

Explorative Studie zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von
Neutrophil Extracellular Traps und deren Einfluss auf die Gerinnung im Rahmen der
systemischen Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass

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

vorgelegt von Julia Schiederich
aus Köln

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Sander

Gutachterin: Prof. Dr. Kemkes-Matthes

Tag der Disputation: 04.08.2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. PRÄAMBEL..... | 1 |
| 1.2. GRUNDLAGEN DER KARDIOCHIRURGIE | 2 |
| 1.2.1. INDIKATIONEN FÜR EINEN KARDIOPULMONALEN BYPASS | 2 |
| 1.2.2. FUNKTIONEN UND AUFBAU EINES KARDIOPULMONALEN BYPASSSES | 2 |
| 1.2.3. PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER GERINNUNG WÄHREND DES KARDIOPULMONALEN BYPASSSES..... | 3 |
| 1.3. SYSTEMISCHE INFLAMMATION UND SEPSIS | 4 |
| 1.3.1. DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE DER SYSTEMISCHEN INFLAMMATIONSANTWORT NACH KARDIOCHIRURGISCHEN EINGRIFFEN | 4 |
| 1.3.2. HERAUSFORDERUNG DER DISKRIMINATION ZWISCHEN EINEM SIRS UND EINER SEPSIS BEI KARDIOCHIRURGISCHEN PATIENTEN | 6 |
| 1.3.3. KOAGULOPATHIE BEI SYSTEMISCHER INFLAMMATION..... | 7 |
| 1.3.4. PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER SYSTEMISCHEN INFLAMMATIONSANTWORT AUF DEN KARDIOPULMONALEN BYPASS..... | 9 |
| 1.4. NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS) ALS BINDEGLIED ZWISCHEN GERINNUNGS- UND IMMUNSYSTEM IM RAHMEN DES KARDIOPULMONALEN BYPASSSES..... | 11 |
| 1.4.1. DEFINITION..... | 11 |
| 1.4.2. NETOSE | 12 |
| 1.4.3. ROLLE DER NETS IN DER PATHOGENESE DES SIRS | 14 |
| 1.4.4. NETS UND KARDIOPULMONALER BYPASS..... | 15 |
| 1.4.5. NETS UND IHRE AUSWIRKUNGEN AUF DAS GERINNUNGSSYSTEM..... | 16 |
| 1.4.6. HERAUSFORDERUNG DER QUANTIFIZIERUNG VON NETS..... | 16 |
| 2. ZIELSETZUNG | 18 |
| 3. METHODIK..... | 21 |
| 3.1. ORGANISATORISCHE VORAUSSETZUNGEN..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. STUDIENDESIGN UND -KOLLEKTIV | 21 |
| 3.3. PROBENREKRUTIERUNG | 22 |
| 3.4. EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN | 23 |
| 3.5. ZIELPARAMETER | 23 |
| 3.6. DATENSCHUTZ | 24 |
| 3.7. NARKOSEFÜHRUNG | 24 |
| 3.8. MESSMETHODEN..... | 25 |
| 3.8.1. DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)..... | 25 |
| 3.8.2. ERYTHROZYTEN-LYSE..... | 31 |
| 3.8.3. FLUORESZENZMIKROSKOPIE..... | 31 |
| 3.8.4. ELISA..... | 33 |
| 3.8.5. GERINNUNGSANALYSEN | 34 |
| 3.8.5.1. ROTATIONSTHROMBELASTOMETRIE | 34 |
| 3.8.5.2. IMPEDANZAGGREGOMETRIE | 37 |
| 3.9. STATISTIK | 39 |
| 4. ERGEBNISSE..... | 41 |
| 4.1. BASISCHARAKTERISTIKA..... | 41 |
| 4.2. ETABLIERUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON NETS..... | 42 |
| 4.2.1. PMA STIMULATION UND 7 – AAD | 42 |
| 4.2.2. FLUORESZENZMIKROSKOPIE..... | 43 |
| 4.3. ZEITLICHER VERLAUF DER PLASMAKONZENTRATION VON NETS | 45 |
| 4.4. KORRELATION ZWISCHEN NETS UND INFLAMMATIONSPARAMETERN | 46 |
| 4.5. KORRELATION ZWISCHEN NETS UND KOAGULATIONSPARAMETERN | 47 |
| 4.5.1. KORRELATION ZWISCHEN NETS UND GLOBALEN GERINNUNGSPARAMETERN..... | 47 |
| 4.5.2. KORRELATION ZWISCHEN NETS UND THROMBELASTOGRAPHISCHEN PARAMETERN | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.3. KORRELATION ZWISCHEN NETS UND IMPEDANZAGGREGOMETRISCHEN PARAMETERN | 50 |
| 4.6. KORRELATION ZWISCHEN NETS UND INTENSIVMEDIZINISCHEN PARAMETERN | 50 |
| 5. DISKUSSION..... | 51 |
| 5.1. BEWERTUNG DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE ALS METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON NETS | 51 |
| 5.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE..... | 53 |
| 5.3. LIMITATIONEN DER STUDIE | 58 |
| 5.3.1. LIMITATIONEN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE..... | 58 |
| 5.3.2. LIMITATIONEN DES STUDIENDESIGNS | 59 |
| 5.4. AUSBLICK..... | 60 |
| 6. SCHLUSSFOLGERUNG..... | 62 |
| 7. ZUSAMMENFASSUNG..... | 63 |
| 8. SUMMARY | 64 |
| 9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 65 |
| 10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 68 |
| 11. TABELLENVERZEICHNIS..... | 69 |
| 12. MATERIALVERZEICHNIS | 70 |
| 13. LITERATURVERZEICHNIS..... | 72 |
| 14. PUBLIKATIONEN..... | 84 |
| 15. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG..... | 85 |
| 16. DANKSAGUNG | 86 |
| 17. LEBENSLAUF | 87 |

1. Einleitung

1.1. Präambel

Im Jahr 2019 wurden in Deutschland über 175.000 kardiochirurgische Eingriffe durchgeführt, knapp 72.000 unter Einsatz des kardiopulmonalen Bypasses (*Cardiopulmonary Bypass*, CPB)¹⁰. Aktuellere Fallzahlen aus dem Jahr 2020 liegen bei über 161.000 kardiochirurgischen Eingriffen, davon knapp 64.000 unter Einsatz des CPBs. Diese geringeren Fallzahlen müssen jedoch durch die besonderen Umstände der COVID-19-Pandemie bei der Interpretation berücksichtigt werden¹¹.

Durch die immer älter werdende Bevölkerung sind 33,5 % der Patienten, welche einen kardiochirurgischen Eingriff benötigen, zwischen 70 und 79 Jahren alt¹⁰. Eingriffe unter Einsatz des CPBs gehen sowohl mit einem erhöhten Blutungsrisiko, als auch einem erhöhten Risiko für eine systemische Inflammationsreaktion einher⁹⁷. Je älter die Patienten sind, desto häufiger spielen hier auch Vorerkrankungen eine Rolle, da sie die Entstehung einer systemischen Inflammation bzw. Sepsis begünstigen können⁹⁷.

Die systemische Inflammation nach CPB kann mit einer Immunsuppression einhergehen und zudem zu weiteren Komplikationen, wie myokardialer Dysfunktion, Blutungsstörungen, aber auch bis hin zur bakteriellen Superinfektion führen und stellt somit ein relevantes Problem im Klinikalltag dar^{77,78}. Die Sepsis ist trotz intensiver Therapien immer noch mit einer hohen Mortalität und langfristigen Morbidität assoziiert^{5,96,114}. Eine frühzeitige Diagnose der Sepsis bildet weiterhin eine der Hauptsäulen zur Senkung der Mortalität^{21,96}, wird allerdings durch die physiologischen postoperativen Alterationen der Vital- und infektiologischen Laborparameter erschwert. Hieraus leitet sich die Notwendigkeit einer Suche nach spezifischen Biomarkern ab.

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) fungieren als Teil der angeborenen Immunabwehr¹⁸ und scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Inflammationsantwort nach CPB einzunehmen⁹. Allerdings ist ihre Quantifizierung bisher aufwändig und der experimentellen Forschung vorbehalten. Eine kliniktaugliche Quantifizierung von NETs würde neue Potenziale eröffnen und könnte so dazu beitragen, eine postoperative systemische Inflammationsreaktion frühzeitig zu detektieren und zudem gezielter zu therapieren^{43,68,118,119}.

1.2. Grundlagen der Kardiochirurgie

1.2.1. Indikationen für einen kardiopulmonalen Bypass

Ein Teil der elektiv geplanten kardiochirurgischen Eingriffe, wie z.B. ein Herzklappenersatz oder aber auch ein Koronararterienbypass sind operativ nur bei nichtschlagenden Herzen durchführbar. Der Koronararterienbypass (Coronary Artery Bypass Graft, CABG) zählt zu den häufigsten Herzoperationen in Deutschland und erfolgt, um stenosierte Koronararterien mittels *Bypass-Graft* zu überbrücken. Als Standardverfahren gilt hierbei der *On-Bypass* mit Verwendung des CPBs^{58,91}.

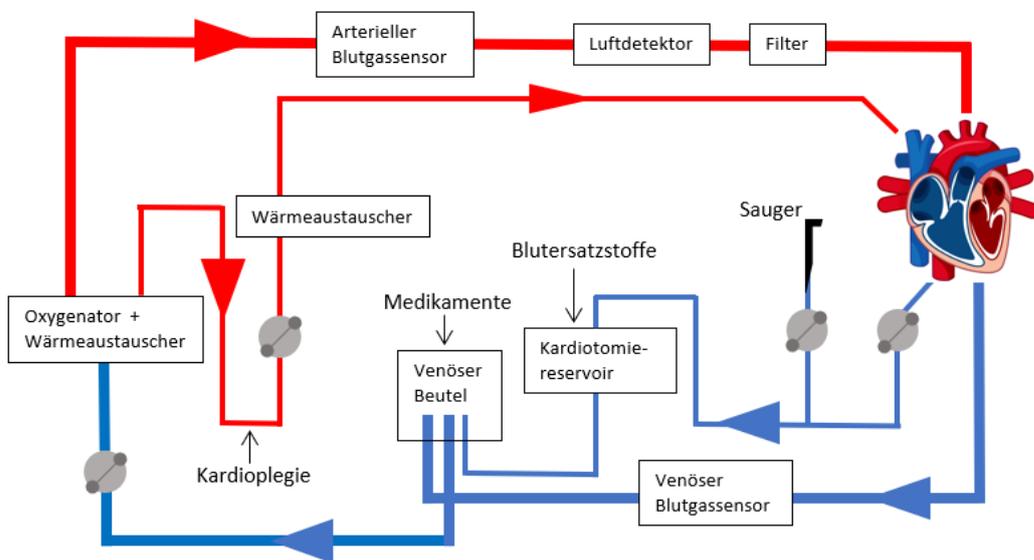


Abb. 1 Schematische Darstellung eines CPBs. Das venöse Blut wird über Pumpen zum Oxygenator transportiert, dort mit Sauerstoff angereichert und wieder über die Aorta zurückgepumpt. Adaptiert von Larsen et al. 2017⁵⁸.

1.2.2. Funktionen und Aufbau eines kardiopulmonalen Bypasses

Zu den Funktionen der extrakorporalen Kreislaufunterstützung zählen das Ersetzen bzw. Unterstützen

- der Pumpfunktion des Herzens
- des Gasaustauschs der Lunge
- der Regulierung der Bluttemperatur

Abb. 1 zeigt schematisch das Funktionsprinzip eines CPBs. Hierbei gelangt das venöse Blut passiv über die beiden Hohlvenen aus dem Körper über Kanülen und Schläuche in ein Reservoir, wo es gesammelt wird. An der Membran eines Oxygenators wird

Einleitung

sauerstoffarmem, venösem Blut Kohlenstoffdioxid (CO₂) entzogen und Sauerstoff (O₂) hinzugefügt. Mithilfe einer Pumpe wird dieses - nun oxygenierte Blut - dem Patienten arteriell wieder hinzugeführt. Ein Temperaturregler ermöglicht je nach Bedarf eine Kühlung oder Erwärmung des Blutes.

Um ein adäquates Herzzeitvolumen sicher zu stellen, muss mithilfe von Pumpen das oxygenierte Blut wieder zurück in den Kreislauf gelangen. Man unterscheidet hierbei zwischen okklusiven Rollenpumpen und nichtokklusiven Zentrifugalpumpen⁵⁸. Okklusive Rollenpumpen gehen mit einer höheren Bluttraumatisierung und erhöhtem Embolierisiko einher, welche vor allem bei längeren Eingriffen (> 4 Stunden) auftreten können. Bei Routineeingriffen (< 4 Stunden) werden diese dennoch bevorzugt^{58,91}. Ein Membranoxygenator übernimmt während der extrakorporalen Zirkulation die Oxygenierungs- und Decarboxylierungsfunktion der Lunge und besteht aus einer semipermeablen Membran, durch die O₂ und CO₂ entlang des Konzentrationsgefälles hindurch diffundieren können⁵⁸.

Die meisten Oxygenatoren ermöglichen eine Oxygenierung von ca. 60 – 80 % der Sauerstoffversorgung, da durch die auftretende Hämodilution die O₂-Transportkapazität gesenkt wird. Um die Stoffwechselaktivität zu reduzieren und die Ischämietoleranz der Organe zu steigern, wird die Körpertemperatur gesenkt³⁷.

1.2.3. Pathophysiologische Grundlagen der Gerinnung während des kardiopulmonalen Bypasses

Patienten können auf Grund des CPBs eine Dilutionskoagulopathie entwickeln. Die Hämodilution entsteht dabei durch die Notwendigkeit einer Volumengabe mit Kristalloiden, dem Primingvolumen und der Kardioplegielösung. Dadurch kann sich der Hämatokrit auf bis zu 50 % des Ausgangswertes reduzieren. Es kommt zu einer Dilutionsazidose, einer Reduktion des Proteingehalts mit folglich transkapillärer Flüssigkeitsverschiebung ins Gewebe und zu einem Abfall der Konzentration an Gerinnungsfaktoren und Thrombozytenmenge³⁷.

Eine intraoperative Dilutionskoagulopathie führt häufig zu einer gesteigerten Blutungsneigung und korreliert mit einer Verlängerung der Prothrombinzeit und aPTT⁷⁴. *In-vivo* geht dies mit einer Alteration der plasmatischen Gerinnung einher, welches sich primär durch eine Hypofibrinogenämie bemerkbar macht⁷². Eine klinisch relevante Thrombozytopenie tritt häufig erst verzögert auf³⁸. Eine Hämodilution mit einem

Einleitung

Hämatokrit (Hkt) < 18 % oder ein Hämoglobin (Hb) < 6 g/dl entspricht rechnerisch einer Abnahme der plasmatischen Faktorenkonzentration von <30 %⁴². Der *International Normalized Ratio* (INR) nimmt zu, ebenso verlängert sich die aPTT⁴². In der Thrombelastographie zeigen sich eine reduzierte Gerinnselfestigkeit (*Maximum Clot Firmness*, MCF) und ein verringerter α -Winkel, ebenso wie eine verlangsamte Gerinnselformung (*Clotting Time*, CT, *Clot Formation Time*, CFT). Die Kombination dieser Werte lässt auf eine eingeschränkte Thrombozyten-Fibrinogen-Interaktion und geringer Plasmakonzentrationen schließen⁴².

Neben der Hämodilution bewirkt auch die mit dem CPB einhergehende Hypothermie klinisch relevante Nebenwirkungen, wie die Zunahme der Blutviskosität, eine verminderte Gerinnungsaktivität mit dadurch erhöhter Blutungsneigung und eine Unterdrückung der Immunabwehr, was das Risiko eines *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) erhöht^{17,37}.

1.3. Systemische Inflammation und Sepsis

1.3.1. Definition und Epidemiologie der systemischen Inflammationsantwort nach kardiochirurgischen Eingriffen

Das SIRS wird definiert als eine nicht-infektiöse, d.h. ohne Nachweis von pathogenen Krankheitserreger, verursachte systemische Entzündungsreaktion und liegt vor, wenn mindestens zwei der insgesamt vier SIRS-Kriterien erfüllt werden⁹⁶:

- Fieber ($\geq 38,0^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36,0^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie (Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$)
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation (bestätigt durch Abnahme einer arteriellen Blutgasanalyse mit $p_a\text{CO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa}$ bzw. 32 mmHg)
- Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder mehr als 10 % unreife Neutrophile im Differenzialblutbild⁹⁶

Neben herzchirurgischen Eingriffen wird ein SIRS beispielsweise auch durch schwere Traumata, Verbrennungen, oder große abdominal- und herzchirurgische Operationen ausgelöst^{46,96}. Darüber hinaus können schwere Grunderkrankungen, wie eine akute Pankreatitis, eine Addison-Krise, und Ischämien ein SIRS verursachen⁹⁶. Operative Patienten, welche die SIRS-Kriterien erfüllten, weisen eine höhere Mortalität auf als

Einleitung

Patienten ohne SIRS. Zudem konnte ein linearer Anstieg der Mortalität bei jedem weiteren erfüllten SIRS-Kriterium nachgewiesen werden^{24,51,94,96}.

Die Definition der oben genannten SIRS-Kriterien hatte den ursprünglichen Zweck, frühzeitig klinische Kriterien für die Diagnostik der Sepsis zu identifizieren. Hauptkritikpunkte präsentierten sich allerdings auf Grund ihrer eingeschränkten diskriminativen Validität bei zu hoher Sensitivität und geringer Spezifität, besonders bei operativen Patienten^{*96,109}. Insbesondere postoperative Alterationen der Vital- und Laborwerte können zu positiven SIRS-Kriterien führen, welches zu einer hohen Sensitivität und geringen Spezifität in Bezug auf die Prädiktion einer Sepsis führt. Dies zeigte sich in einer Studie, in der Patienten zwar die SIRS-Kriterien erfüllten, ohne aber an einer Sepsis zu leiden und umgekehrt zeigten sich septische Patienten, die weniger als zwei der SIRS-Kriterien erfüllten⁹⁶. Die damit einhergehende hohe Varianz der Inzidenz des postoperativen SIRS erschwert eine Diskrimination zwischen postoperativen SIRS und manifesten Infektionen und bedarf spezifischer Marker^{78,114}.

Eine aktuelle retrospektive Analyse zeigte, dass ein SIRS zu 28,3 % innerhalb 24 Stunden nach kardiochirurgischen Eingriffen postoperativ nachgewiesen werden kann⁹⁷. Eine erhöhte Mortalität bei SIRS-positiven zu SIRS-negativen Patienten konnte hierbei nicht beobachtet werden, allerdings zeigte sich, dass Patienten mit SIRS postoperativ häufiger katecholaminpflichtig waren und längere Beatmungszeiten auf der Intensivstation aufwiesen⁹⁷. Ebenso benötigten Patienten mit SIRS häufiger eine intraaortale Ballonpumpe (IABP), eine Dialyse, oder litten vermehrt an postoperativen Blutungen⁹⁷. Hieraus leitet sich ab, dass die SIRS-Kriterien, auch wenn sie seit der Einführung der Sepsis-3-Definition nicht mehr für die Diagnose der Sepsis verwendet werden, für die Identifikation einer systemischen Inflammation relevant und valide sind^{41,96}. Zudem können positive SIRS-Kriterien den Verdacht eines septischen Verlaufs weiterhin erhärten^{96,114}. Dennoch bleibt die Identifikation der Sepsis und des SIRS bei postoperativen Patienten insbesondere bei kardiochirurgischen Patienten eine Herausforderung, da die physiologischen Veränderungen nach einer Operation das Auftreten einer Infektion verschleiern können. Ein Lösungsansatz könnte die Evaluation diskriminativer Biomarker zur Erkennung einer systemischen Inflammation nach kardiochirurgischen Eingriffen sein.

* Zur besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Dissertation auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Es wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Verwendung der männlichen Form geschlechtsneutral verstanden werden soll.

1.3.2. Herausforderung der Diskrimination zwischen einem SIRS und einer Sepsis bei kardiochirurgischen Patienten

Die Sepsis ist definitionsgemäß *„eine akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion“*²¹. Nicht mehr die Schwere der Infektion, sondern die Immunantwort auf die Infektion rückt nun in den Fokus der aktuellen Definition⁹³. Für die Diagnose einer sepsisassoziierten Organdysfunktion ist eine Veränderung des *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*-Score um ≥ 2 Punkte nötig. Trotz adäquater Therapie kann die Sepsis in einen septischen Schock münden. Dieser ist definiert als *„eine trotz adäquater Volumentherapie persistierende arterielle Hypotension mit der Notwendigkeit einer Therapie mit Vasopressoren, um einen mittleren arteriellen Blutdruck von ≥ 65 mmHg zu erreichen. Gleichzeitig muss der Laktatwert im Serum ≥ 2 mmol/l betragen“*⁹³. Bei einer Sepsis liegt die Mortalität bei über 10 % bei stationären Patienten außerhalb der Intensivstation²¹. Der SOFA-Score dient als Prädiktor der Letalität septischer Patienten^{96,114}. Je höher der SOFA-Score ausfällt, desto höher die Wahrscheinlichkeit für eine höhere Mortalität⁹⁶. Bei der schwersten Erkrankungsentität, dem septischen Schock, liegt die Mortalität bei über 40 %^{93,96}.

In der aktuellen Leitlinie zur Therapie der Sepsis haben die SIRS-Kriterien keinen Stellenwert in der Definition der Sepsis mehr²¹, da sie eine adaptive Entzündungsreaktion des Wirts widerspiegeln, welche durch Infektion, aber auch durch andere Ursachen hervorgerufen werden können und somit nicht zwangsläufig ein Zeichen einer dysregulierten Immunantwort sind⁹⁶. Limitiert durch eine schlechte Diskriminanzvalidität und konvergente Validität weisen die SIRS-Kriterien eine zu geringe Spezifität bei hoher Sensitivität für Infektionen auf^{21,96}. Infolgedessen wurden qSOFA- und SOFA-Score für die Definition der Sepsis etabliert⁹⁶. Während der qSOFA-Score für Patienten außerhalb der Intensivstation etabliert wurde, wird der SOFA-Score bei intensivmedizinischen Patienten angewendet.

Der SOFA-Score ist im Vergleich zum qSOFA-Score in der Berechnung deutlich zeitintensiver, was zu Zeiteinbußen in der darauffolgenden Therapie führen kann^{56,67}, dadurch zwar spezifischer, aber weniger sensitiv, als die SIRS-Kriterien. Zudem können Vorerkrankungen bei herzchirurgischen Patienten zu Alterationen der Organsysteme führen, welche entsprechend den SIRS-Kriterien zu falsch-positiven Diagnosefindungen führen könnten.

Einleitung

Das Auftreten einer Sepsis nach kardiochirurgischen Eingriffen ist mit einer Prävalenz von 0,39 % bis 2,5 % selten, allerdings weisen diese Patienten bei verlängerter intensivmedizinischer Behandlung mit invasiver Beatmung eine hohe Sterblichkeit von 65 % bis 79 % auf, was mit der Schwere ihrer Grunderkrankung erklärbar ist⁷⁸.

Die hohe Sepsis-assoziierte Mortalität nach kardiochirurgischen Eingriffen zeigt die Notwendigkeit von diskriminativen Biomarkern auf. Die bislang genutzten Entzündungsparameter, wie C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT) zur Verlaufskontrolle sind etabliert, zur frühzeitigen Diagnose einer Sepsis nach kardiochirurgischen Eingriffen sind sie allerdings nicht suffizient⁸⁰. Die postoperative Alteration der Vitalparameter und mangelnde Trennschärfe sind hierbei vordergründig zu nennen.

Eine Diskriminierung zwischen SIRS und Sepsis stellt eine alltägliche intensivmedizinische Herausforderung dar, weil nach kardiochirurgischen Eingriffen sowohl die Vital- als auch Laborwerte alteriert sind⁹⁶. Als Folge dessen ist die frühzeitige Diagnose einer Sepsis häufig schwierig. Zusätzlich könnte durch eine verbesserte und spezifischere Diagnostik und, daraus resultierend, durch einen schnelleren und effektiveren Therapiebeginn auch die Mortalität im Rahmen der systemischen Inflammation gesenkt werden.

Da die Diagnostik eines SIRS meist auf einer klinischen Manifestation beruht, ist sie gerade bei postoperativen Patienten nach CPB oft erschwert, weil ihre Symptome mit denen von gewöhnlichen postoperativen Komplikationen häufig verwechselt werden können⁷⁸. Entzündungsparameter, wie CRP und PCT sind i.d.R. nach operativen Eingriffen erhöht, weshalb sie für die postoperative SIRS-Diagnostik eher weniger geeignet sind⁷⁸.

1.3.3. Koagulopathie bei systemischer Inflammation

Sobald es zum Kontakt der Blutkomponenten mit den künstlichen Oberflächen des extrakorporalen Systems kommt, wird Faktor XII aktiviert, wodurch die intrinsische Gerinnungskaskade initiiert wird, welche letztendlich in der Bildung von Thrombin endet⁷⁷.

Die Ursachen eines verstärkten pro- oder antikoagulatorischen Effektes sind meist multifaktoriell begründet. Sie können Folge einer Thrombozytendysfunktion oder -aktivierung sein, einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung, einer gesteigerten

Einleitung

Fibrinolyse, oder aber auch in einer Immunmodulation über aktivierte neutrophile Granulozyten begründet liegen.

Im Endeffekt ist jede Entzündungsreaktion mit einer Aktivierung des Gerinnungssystems verbunden. Diese reicht von einer klinisch unbedeutsamen und laborchemisch nur schwer nachweisbaren Aktivierung der Gerinnungsfaktoren über eine ausgeprägte Thrombozytopenie mit Verlängerung der Blutungszeit bis hin zu einem fulminanten Krankheitsbild, der disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC)⁶¹.

Die systemische Inflammation ist eng mit einer Aktivierung des Gerinnungssystems verknüpft, so dass umgekehrt eine Koagulopathie die Entzündungsaktivität verstärken kann⁶³. Eine überschießende, systemisch wirksame, Entzündungsantwort auf eine Infektion kann zu mikrovaskulären Zirkulationsstörungen mit septischen Koagulopathien bis hin zu Organversagen führen. Eine Aktivierung der Gerinnung und konsekutiver Fibrinablagerung führt allerdings auch zu einer Begrenzung der Entzündungsreaktion auf den Ort der Infektion⁷¹. Ein besseres Verständnis dieser Wechselwirkungen könnte Angriffspunkt neuer Therapieansätze werden und sich positiv auf unterstützende Behandlungsstrategien auswirken⁶¹.

Bei der entzündungsinduzierten Aktivierung der Gerinnung können sowohl alterierte Endothelzellen, als auch aktivierte mononukleäre Zellen die Gerinnungskaskade mit Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine vermitteln. Interleukin-6 (IL-6) scheint hierbei ein wichtiger Induktor bei der Expression des *Tissue Factors* zu sein^{62,108}.

Beides führt zu einer Expression von *Tissue Factor* und somit Thrombin und folglich Fibrin. Physiologisch haben die meisten Zellen, die *Tissue Factor* exprimieren, keinen direkten Kontakt zu Blut. Wird die Integrität der Gefäßwand zerstört, ändert sich dies. Zusätzlich werden physiologische Antikoagulationsmechanismen und die Fibrinolyse gedrosselt, was die intravasale Fibrinbildung zusätzlich fördert⁶¹.

Da in atherosklerotischen Plaques ebenfalls *Tissue Factor* exprimiert wird, wird dieses bei Ruptur des Plaques exponentiell ins Blut freigesetzt, welches die Koagulopathie insbesondere bei kardiochirurgischen Patienten verstärken kann⁶¹.

1.3.4. Pathophysiologische Grundlagen der systemischen Inflammationsantwort auf den kardiopulmonalen Bypass

Die Pathogenese der systemischen Inflammation im Rahmen eines CPBs ist komplex und beinhaltet verschiedene, miteinander interagierende Signalwege. Die Aktivierung des Kontaktsystems durch Blutkontakt mit synthetischen Oberflächen, der Ischämie- und Reperfusionsschaden, welcher die Gefäßpermeabilität erhöht und in einer Endotoxinfreisetzung aus dem Darm mündet, aber auch das chirurgische Trauma und die Hypothermie während des CPBs sind potenzielle Trigger einer systemischen Inflammationsreaktion, indem sie eine Akute-Phase-Reaktion induzieren^{29,57,77,78}.

Kardiochirurgische Patienten stellen hierbei ein anspruchsvolles Patientenkollektiv dar, da eine adäquate Gewebepfusion bereits präoperativ eingeschränkt sein kann⁷⁸. Es zeigte sich eine signifikant höhere Inzidenz eines SIRS nach CABG im Vergleich zum *Off-Pump Coronary Artery Bypass* (OPCAB), was die Vermutung bestärkt, dass alleine die Verwendung des CPBs die inflammatorische Kaskade aktivieren kann¹².

Es kommt zu einer Gewebszerstörung mit Freisetzung von zellulären Bestandteilen, welche zu einer proinflammatorischen, aber auch antiinflammatorischen Reaktionen aktivieren können⁷⁸. Die dadurch entstandene systemische Entzündungsreaktion mit einhergehender Immunsuppression kann zu weiteren Komplikationen, wie myokardialer Dysfunktion, respiratorischem Versagen, Nieren- und neurologischer Dysfunktion, Blutungsstörungen, veränderter Leberfunktion, und schließlich multiplem Organversagen führen^{77,78}. Durch die resultierende Immunsuppression ist der Patient für eine bakterielle Superinfektion gefährdet und so kann eine sterile systemische Inflammation in das Krankheitsbild einer Sepsis übergehen⁷⁸. Risikofaktoren sind hierfür v.a. eine prolongierte Bypass-Zeit, Nikotinabusus, chronische Entzündungen, und Diabetes mellitus. Eine intraindividuelle Variabilität spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle^{9,12,16}. Das gehäufte Auftreten eines SIRS nach CPB im Vergleich zu kardiochirurgischen Eingriffen ohne CPB lässt zudem die Vermutung nahe, dass der Blutkontakt mit synthetischen Materialien des CPBs die unspezifische Immunantwort durch Auslösung der Komplementkaskade aktiviert und so ein SIRS begünstigen kann^{9,12,16}. Da die Oberflächen des CPBs nicht mit Endothelzellen ausgekleidet sind, fehlt dessen antiinflammatorische Wirkung und es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems, hauptsächlich über seinen alternativen Weg, was zur Freisetzung von Proteasen und freien Sauerstoffradikalen mit konsekutiver Endothelschädigung führt⁷⁸. Zudem kommt es durch die Komplementaktivierung zur Induktion der Komplementfaktoren C3a und C5a, welche anaphylaktische und chemotaktische

Einleitung

Wirkung besitzen und so u.a. Neutrophile an den Entzündungsherd locken⁷⁷. C3a und C5a könnten hier als Maß für die Thrombogenität einzelner Materialien dienen^{37,77}.

Nach CPB zeigten sich die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-6 und IL-8 erhöht und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 erniedrigt. Dieses Ungleichgewicht kann mit ursächlich für ein SIRS nach CPB sein⁷⁷.

Studien zeigen, dass eine erhöhte Menge an proinflammatorischen Zytokinen mit einem negativen Outcome nach Herzoperationen in Verbindung gebracht werden kann⁷⁷. TNF- α und IL-1 β setzen die kontraktile Funktion des Myokards herab, indem sie die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) verhindern⁷⁷. Ebenso induziert TNF- α glomeruläre Fibrinablagerungen und eine Vasokonstriktion, wodurch es zu einer verminderten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Nierenfunktionsstörung im Rahmen des CPBs kommen kann⁷³.

Des Weiteren induzieren Zytokine und Endotoxine die endotheliäre Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) über die *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS)⁷⁷. NO induziert eine Vasodilatation und führt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, u.a. auch in den Pulmonalgefäßen, was dort zu einer pulmonalvaskulären Barrieredysfunktion mit Lungenödem und eingeschränkter Sauerstoffversorgung führt⁷⁷. Die iNOS trägt somit entscheidend zu der Induktion der Organfehlfunktionen während eines SIRS bei und könnte ein wichtiger Angriffspunkt therapeutischer Targets darstellen⁷⁷.

Der Verlust des Gefäßtonus, der Austritt der Kapillarflüssigkeit und die Extravasation der Leukozyten führen letztendlich zu einer Organdysfunktion. Auch die myokardiale Hypoxie und Ischämie ist ein proinflammatorischer Stimulus^{77,78}. Die enge Verknüpfung von Inflammation, Gerinnung und Fibrinolyse kann zu Fibrinablagerungen, aber auch zur DIC mit deutlich erhöhter Mortalität führen⁷⁸.

Molekularbiologisch beginnt die Immunantwort mit der Erkennung von *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), wie das weitreichend untersuchte *High-Mobility-Group-Box Protein 1* (HMGB1), Histonen, oder Interleukin-1 (IL-1)^{35,89} und Strukturmotiven von mikrobiologischen Pathogenen, den *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), wie Lipopolysaccharide (LPS)^{35,89}. DAMPs sind endogene Moleküle, die von geschädigten oder abgestorbenen Zellen aus dem Extra- oder Intrazellularraum freigesetzt werden und durch das Binden an *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), wie *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), sowohl das angeborene Immunsystem aktivieren, als auch Entzündungsreaktionen fördern^{35,44,70,89}. Getriggert wird deren Freisetzung u.a. durch schwere Traumata, nicht-infektiöse Entzündungen,

Einleitung

aber auch durch kardiochirurgische Eingriffe unter Einsatz des CPBs^{35,70,89,90}. PRRs erkennen DAMPs oder PAMPs und stimulieren so die Phagozytose und Entzündungsreaktionen und induzieren die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen und starten somit die entzündliche Signalkaskade^{35,89}. TLR-Rezeptoren spielen daher eine zentrale Rolle bei Inflammationsprozessen, da sie Signalkaskaden erkennen und weitere initiieren⁷⁸.

HMGB1 triggert die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Kaskaden durch Aktivierung des *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B)-Signalweges durch Bindung an TLR2, TLR4, und TLR9, was zu vermehrter Makrophagenmigration führt und Neutrophile am Ort ihrer Freisetzung bindet^{35,89,112}. Studien zeigten, dass HMGB-1 nicht nur bei septischen Patienten, sondern auch im Rahmen des postoperativen SIRS nach CPB erhöht ist^{53,99}.

Histone sind im Rahmen der NETs-Forschung in zweierlei Hinsicht bedeutungsvoll, da sie nicht nur die Rolle der DAMPs wahrnehmen, sondern zudem essenzieller Bestandteil der NETs sind^{47,104}. Histone stammen aus Nukleosomen, können entweder aktiv oder passiv freigesetzt werden und ermöglichen die Chromatinkondensation im Zellkern und steuern die Regulierung genetischer Reparaturmechanismen; zudem bilden sie das Grundgerüst der NETs^{47,104}.

Die angeborene Immunantwort wird, neben der Freisetzung von DAMPs, maßgeblich durch neutrophile Granulozyten angeregt. Neben der Phagozytose sind diese in der Lage NETose zu betreiben, wodurch schließlich NETs freigesetzt werden, welches im folgendem Kapitel detailliert beschrieben wird^{18,32}.

1.4. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) als Bindeglied zwischen Gerinnungs- und Immunsystem im Rahmen des kardiopulmonalen Bypasses

1.4.1. Definition

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) sind extrazelluläre Strukturen, bestehend aus einem Grundgerüst aus Chromatinfasern, die zusammengesetzt sind aus Desoxyribonukleinsäure (*Desoxyribonucleic Acid*, DNA) und Histonen, an welche spezifische antimikrobielle Proteine, u.a. neutrophile Elastase, Myeloperoxidase (MPO), Cathepsin G, Proteinase 3, HMGB1 angeheftet sind. Sie werden von aktivierten neutrophilen Granulozyten gebildet^{19,116}.

Einleitung

NETs fungieren als wichtige Effektorder angeborener Immunabwehr, indem sie Mikroorganismen binden, sie an ihrer Ausbreitung hindern und für eine hohe lokale Konzentration an antimikrobiellen Wirkstoffen triggern, um so Bakterien abzutöten und Virulenzfaktoren abzubauen¹⁸. Sie gelten als wichtiges Bindeglied, sowohl in der Aktivierung des Immun-, als auch des Gerinnungssystems^{18,32}.

Neutrophile Granulozyten machen beim gesunden Menschen mit ca. 60 % den Großteil der Leukozyten aus¹⁹. Entsteht ein Entzündungsherd, so folgen sie einem chemotaktischen Gradienten und wandern in Richtung des infizierten Gewebes¹⁹. Zu den immunregulatorischen Funktionen der neutrophilen Granulozyten gehören die Phagozytose, die Bildung von *Reactive Oxygen Species* (ROS) und die Bildung von NETs¹¹⁶.

NETs sind mit diversen Erkrankungen assoziiert, wie z.B. der chronischen Granulomatose, Vaskulitis, Präeklampsie oder der zystischen Fibrose^{52,75}. Zudem zeigte sich auch, dass der Blutkontakt mit extrakorporalem Fremdmaterial zu einer Zunahme der NETs führte⁹. Ob der NETs-Anstieg eine Prädisposition für postoperative Komplikationen nach kardiochirurgischen Eingriffen und somit potenzielles Therapieziel darstellt, muss zukünftig noch untersucht werden⁹.

1.4.2. NETose

NETs entstehen im Rahmen einer sogenannten NETose. Dieser Begriff beschreibt die Aktivierung und Freisetzung von NETs und wurde 2004 erstmals von Brinkmann et al. beschrieben¹⁸.

Die NETose ist eine aktive Form des neutrophilen Zelltodes, welche von der Apoptose und Nekrose abzugrenzen ist¹¹⁶. Abb. 2 zeigt die einzelnen Phasen der NETose, bei der Kern- und Granulomembran zerfallen, das Chromatin dekontensiert und letztlich in das Zytoplasma diffundiert, wo es sich mit den zytoplasmatischen Proteinen vermischt und nach der Ruptur der Plasmamembran in den extrazellulären Raum freigesetzt wird¹¹⁶.

Einleitung

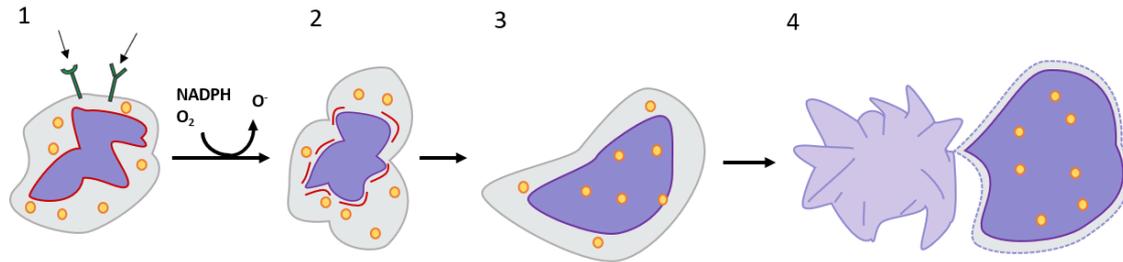


Abb. 2 Phasen der NETs-Formation. (1) bis (4) zeigen schematisch die einzelnen Phasen der NETose. Nach Aktivierung durch Stimuli kommt es zur Bildung von ROS (1). Die Kernmembran beginnt, in eine Kette von Vesikeln, zu zerfallen. Die Integrität der Granula wird langsam aufgehoben (2). Das Kernmaterial füllt nun einen Großteil der Zelle und vermischt sich mit den Granula (3). Integrität von Kern und Granula ist vollständig verloren gegangen. Die Zelle kontrahiert und setzt NETs frei (4). Adaptiert von Brinkmann et al. 2007¹⁹.

Die NETose ist durch eine Vielzahl von Stimuli auslösbar, u.a. Mikroben, *Phorbol myristate acetate* (PMA), Lipopolysaccharide (LPS), entzündliche Zytokine, wie IL-8 und TNF- α , Wachstumsfaktoren, sowie durch aktivierte Endothelzellen und Thrombozyten. Ist der initiale Trigger erfolgt, so unterscheidet man zwei Formen der NETose^{18,83,116}:

- a) Suizidale NETose
- b) Vitale NETose

Die suizidale NETose wird induziert durch Ligandenbindung an neutrophilen TLR, Komplementaktivierung oder Zytokinen¹¹⁶. Daraufhin werden die Calciumspeicher des endoplasmatischen Retikulums ins Zytoplasma entleert, wodurch die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und das Glykoprotein gp91phox phosphoryliert wird¹¹⁶. Diese induziert die funktionsfähige Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), welche mit der Generierung von ROS beginnt. ROS fungieren als *Second Messenger* und bewirken die Auflösung der Granula und Kernmembran^{19,116}. Durch die abschließende Ruptur der Plasmamembran werden die NETs freigesetzt und führen zum Tod der Zelle¹¹⁶. ROS scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen, auch wenn bislang unklar ist, wie genau sie beim Abbau der Kernhülle oder an der Durchmischung der einzelnen NETs-Strukturen beteiligt sind¹¹⁶.

Bei der vitalen Form der NETose bleibt die Integrität der Plasmamembran der Neutrophilen Granulozyten intakt. Die NETs-Freisetzung erfolgt hier über vesikulären Export¹¹⁶. Die netzartigen Neutrophilen werden dadurch zu anukleären Zytoplasten, welche weiterhin in der Lage sind, Pathogene zu erkennen und abzufangen¹¹⁶.

Einleitung

Studien haben gezeigt, dass Neutrophile in der Lage sind, zwischen der Mikrobengröße zu differenzieren. NETs werden bevorzugt bei größeren Pathogenen und mikrobiellen Clustern freigesetzt, die nicht von Phagozyten eliminiert werden können⁸³.

Kardiochirurgische Patienten haben i.d.R. mehrere Komorbiditäten, wie Arteriosklerose oder Diabetes Mellitus. Diese Vorerkrankungen können zu chronischen Entzündungsprozessen führen, was in einem präoperativen *Priming* der frei zirkulierenden neutrophilen Granulozyten mündet⁹. Durch die Entzündungsreaktion im Rahmen des CPBs kann folglich die NETose ausgelöst werden⁹.

1.4.3. Rolle der NETs in der Pathogenese des SIRS

NETs sind auch im Rahmen steriler Inflammationsreaktionen nachweisbar^{46,52}. Es konnte gezeigt werden, dass NETs nicht nur unter septischen Bedingungen nachgewiesen werden können, sondern auch bei steriler Inflammationsreaktion nach schwerem Trauma oder Verbrennungen. NETs werden durch inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-8 oder TNF- α und weitere Entzündungsmediatoren bei SIRS-Patienten freigesetzt^{46,52}. Sie verändern die mikrovaskuläre Homöostase und dadurch den Blutfluss, was u.a. zu Multiorganversagen führen kann. TNF- α aktiviert die Phagozytose, die Degranulation und Aktivität des oxidativen *Bursts*. IL-8 stimuliert u.a. die Adhäsion der Neutrophilen⁵².

Lange Zeit wurde angenommen, dass zirkulierende freie DNA (cf-DNA) von nekrotischen und/oder apoptotischen Zellen stammt, bis ein möglicher Zusammenhang zwischen cf-DNA und NETs dargelegt wurde⁴⁶. cf-DNA fand man hierbei sowohl bei infektiösen, als auch nicht-infektiösen Patienten.

Gab man Plasma, welches von SIRS-Patienten entnommen wurde, zu gesunden isolierten neutrophilen Granulozyten, kam es zu einer gesteigerten Freisetzung von NETs und der Bildung von ROS⁵². Wurde dagegen gesunden neutrophilen Granulozyten Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-8) hinzugeführt, zeigte sich danach ebenfalls ein Anstieg der ROS und NETs. Da SIRS-Patienten erhöhte Spiegel von Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-8) aufweisen⁵², stellte sich die Frage, ob bei diesen Patienten somit auch mit einem erhöhten Anstieg der NETs zu rechnen ist. Um eine Kausalität zu überprüfen, wurde das Plasma der SIRS-Patienten zuvor mit TNF- α , IL-1 β oder IL-8-Antikörpern (AK) inkubiert, welches zur einer Reduktion der Konzentration an NETs führte⁵². Die durch TNF- α , IL-1 β oder IL-8 vermittelten ROS könnten somit mitverantwortlich für eine erhöhte NETs-

Einleitung

Bildung bei SIRS-Patienten sein. Zytokine scheinen demnach an einer Zunahme der NETs bei SIRS beteiligt zu sein⁵².

1.4.4. NETs und kardiopulmonaler Bypass

Neutrophile Granulozyten und insbesondere NETs scheinen bei der Entwicklung eines postkardiologischen SIRS eine relevante Rolle zu spielen⁹. Die Bildung von NETs und deren Ablagerungen im vaskulären System könnten die Mikrozirkulation beeinträchtigen, wie es z.B. beim myokardialen *No-Reflow*-Phänomen beschrieben ist^{9,111}. Durch Okklusion und Schädigung der pulmonalen und systemischen Mikrozirkulation, welche durch die übermäßige NETs Produktion getriggert wurde, könnte es zu Organschäden kommen⁹.

Ischämien mit konsekutiven Reperfusionsschäden und das operative Trauma im Rahmen des CPBs führen zu einer Aktivierung der Endothelzellen und gesteigerter Expression von Adhäsionsmolekülen, welche die Migration von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Schädigung begünstigen²⁹. Bei kritisch kranken Patienten, wozu das untersuchte Studienkollektiv aufgrund des vorhandenen SIRS und der Invasivität des herzchirurgischen Eingriffes gezählt werden kann, könnte eine solch ungehemmte NETs-Aktivierung zu Organschäden führen, welche bei gesünderen Patienten aufgrund ihrer geringeren Komorbiditäten ausbleiben könnte. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Bildung von NETs bei kritisch kranken Patienten mit der 28-Tage- Mortalität und DIC assoziiert war¹.

Ein wichtiger therapeutischer Ansatz könnte folglich die Hemmung der NETose durch Peptidyl-Arginin-Deiminase-Inhibitoren³ oder die Steigerung des NETs- Abbaus durch exogene DNAsen I darstellen, um somit die negativen Folgen einer übermäßigen NETs-Produktion zu mindern und das Outcome der Patienten nach CPB zu bessern¹¹³.

Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von NETs und der Länge der Bypassdauer⁹. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Bildung der NETs eher durch Kontakt mit dem extrakorporalen Kreislauf und die dadurch entstandenen Komplement- und Thrombozytenaktivierung ausgelöst werden könnte⁹.

1.4.5. NETs und ihre Auswirkungen auf das Gerinnungssystem

Vorherige Studien konnten zeigen, dass NETs eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunthrombose spielen und mit septischen Koagulopathien assoziiert sind¹¹⁰.

NETs besitzen einen überwiegend prokoagulatorischen Effekt. Sie aktivieren die Gerinnungskaskade, indem sie zum einen als Stimulus für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation fungieren, als auch, als Gerüst für solche dienen¹¹⁶. Die Hauptbestandteile der NETs (DNA, Proteasen, Histone) wirken auf Grund ihrer negativen Ladung prokoagulatorisch³⁹. DNA bspw. induziert aufgrund ihrer negativen Ladung die Thrombinbildung im Plasma und erhöht die Proteaseaktivität von Gerinnungsfaktoren^{50,102,116}.

Durch die negative Ladung der NETs sind diese in der Lage, Plasmaproteine wie Fibrinogen, Fibronectin und den von Willebrandfaktor zu binden und so den Thrombus zu stabilisieren⁸³.

Patienten mit tiefer Venenthrombose (TVT) weisen sowohl eine höhere Konzentration von zirkulierenden Nukleosomen als auch aktivierten, neutrophilen Granulozyten auf⁸³. Zugleich zeigte sich bei Patienten mit erhöhten Konzentrationen ein dreifach höheres Risiko für eine TVT im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der ein klinischer Verdacht auf eine TVT besteht, die objektiven Tests jedoch negativ waren⁸³. Die immunhistochemische Anfärbung von venösem Thrombenmaterial zeigte, dass NETs besonders bei der Thrombusreifung eine Rolle spielen. Darüber hinaus führte im selben Modell eine Infusion mit Histonen zu einer Vergrößerung der Thromben. Eine Erschöpfung der Neutrophilen, genauso wie die Behandlung mit DNasen, führte zu vergleichsweise kleineren Thromben⁸³.

Diese Studienergebnisse lassen vermuten, dass NETs auch *in-vivo* eine wichtige Rolle im Rahmen der Koagulation spielen und womöglich einen entscheidenden Einfluss auf die damit einhergehenden Komplikationen haben könnten.

1.4.6. Herausforderung der Quantifizierung von NETs

Die Anfänge der NETs-Visualisierung machten 2004 Brinkmann et al. und 2007 Fuchs et al.^{18,40}. Sie nutzten die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM), um NETs darzustellen²². Die TEM ermöglichte die Charakterisierung der Morphologie und veranschaulichte beispielsweise die

Einleitung

Desintegration der Kernmembran der NETs freisetzenden Zellen⁴⁰. Die REM hingegen visualisierte NETs-Strukturen, wie Histone und Elastase, und stellte dar, dass NETs in der Lage sind, Bakterien einzuschließen¹⁸.

In entzündlichen Proben konnte jedoch beobachtet werden, dass Fibrin die NETs imitiert und eine zuverlässige Differenzierung im TEM und REM somit nicht möglich ist. Für eine sichere Verifizierung ist die Fluoreszenzmikroskopie demnach besser geeignet²². Die Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch limitiert durch die Expertise des Untersuchers und durch eine geringe Probengröße²². Eine weitere Möglichkeit der Visualisierung ist die *Dual Laser Spinning-Disk* Mikroskopie. Hierbei lassen sich der Vorgang der NETose, wie auch die einzelnen NETs gut darstellen². Die *Dual Laser Spinning-Disk* Mikroskopie ermöglicht bspw. eine Visualisierung der NETose in Lebersinusoiden im Rahmen einer bakteriellen Sepsis⁷¹. Hierbei wird ein zellimpermeabler DNA-Farbstoff verwendet, um die extrazelluläre DNA zu färben. Die Hinzugabe von DNAsen, wodurch sich der Farbstoff auflöste, beweist, dass es sich bei den gefärbten Strukturen um DNA handelt⁷¹, ebenso wie fluoreszenzmarkierte AK, die spezifisch an Elastase und Histonen binden⁷¹.

Durch eine Hinzugabe von fluoreszenzmarkierten E.Coli konnte zudem eine Interaktion und Behinderung der bakteriellen Verbreitung mikroskopisch dargestellt werden⁷¹.

Neben der direkten Visualisierung der NETs mittels Fluoreszenzmikroskopie stehen für die Quantifizierung die Methoden der Durchflusszytometrie, ELISA und PCR zur Verfügung^{1,22,60,68}. Für eine sichere Identifikation des SIRS mit Hilfe einer spezifischen und objektiven NETs-Quantifizierung konnte bislang keine der Methoden erfolgreich etabliert werden^{22,68}.

2015 konnte eine Kombination aus Hochgeschwindigkeits-Multispektral-Bildgebung und morphometrischer Bildanalyse sicher durchgeführt werden¹¹⁹, welche spezifisch und objektiv ist und einen quantitativen Nachweis der NETose ermöglicht⁶⁸. Im selben Jahr wurde zudem die direkte Durchflusszytometrie zur Identifizierung und Quantifizierung von NETs eingeführt⁴⁴. Beide Ansätze ermöglichten die Quantifizierung einer hohen Anzahl von Zellen, ebenso wie die morphologische Analyse, aber sie boten auch gewisse Einschränkungen. Beide Methoden waren hochspezialisierte Verfahren, welche Expertenkompetenz erforderten, und machten sie somit für den klinischen Alltag auf Intensivstation eher ungeeignet. Zudem ist die verwendete *Gating*-Strategie noch in der Diskussion^{66,115}. Daraufhin wurde 2018 eine optimierte Methode der Durchflusszytometrie veröffentlicht⁶⁰, welche nun Vollblut ohne Zellfixierung nutzte, was eine Durchführung auf Intensivstationen praktikabler erscheinen ließ.

2. Zielsetzung

Das SIRS stellt im klinischen Alltag eine Herausforderung dar, erfordert personelle und finanzielle Ressourcen und führt trotz guter intensivmedizinischer Behandlung noch häufig zu Komplikationen⁷. Speziell für herzchirurgische Patienten wäre ein diskriminativer Biomarker erstrebenswert, da sie durch eine kompromittierte Immunabwehr besonders von einem SIRS betroffen sind^{13,28,77}.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist ein frühzeitige Diagnostik und schneller Therapiebeginn entscheidend für das Outcome der Patienten und suggeriert somit auch die Notwendigkeit einer möglichst frühzeitigen und spezifischen Identifikation des SIRS bzw. der Sepsis⁶⁴. Eben diese ist allerdings aufgrund der physiologischen postoperativen Reaktionen erschwert, weshalb sich die Frage stellt, wie eine schnelle und spezifische Prädiktion eines SIRS bei chirurgischen Intensivpatienten erreicht werden kann.

Sowohl Gerinnungs-, als auch Immunsystem sind im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge der Sepsis eng miteinander verknüpft. NETs scheinen an dieser Immunhämostase mitzuwirken und rücken daher vermehrt in den Fokus der Prädiktion einer systemischen Inflammation und könnten somit potentielle Biomarker darstellen^{31,31,32,49,100}.

Allerdings gehen beide Krankheitsbilder mit einem erhöhten Anstieg der Zytokine, wie IL-8 und TNF- α , einher, bei denen man vermutet, dass diese, nehmen einer Vielzahl von anderen Stimuli, eine NETose induzieren könnten^{9,46,52,96}. Daher ist unklar, ob das alleinige Vorhandensein von NETs eine zuverlässige Unterscheidung dieser beiden kritischen Krankheitsbilder erlaubt.

Bisherige Studien konnten zeigen, dass es nach operativen Eingriffen zu einem Anstieg der NETs kam, ohne jedoch einen Zusammenhang zum SIRS herzustellen^{32,46,79,90}. In wieweit sich die NETs-Anstiege in Bezug auf SIRS und Sepsis differenzieren lassen, ist ebenso ungeklärt.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch NETose zur Freisetzung von Nukleinsäuren kommt, aber ob diese auch zur Detektion postoperativer systemischer Inflammationszustände geeignet sind, ist noch unklar^{32,116}. Auch die Menge an freizirkulierenden NETs im zeitlichen Verlauf einer systemischen Inflammationsreaktion und deren möglichen Assoziation zur Gerinnungsfunktion sind von Interesse.

Zielsetzung

Durch die Etablierung von NETs als prädiktiven Biomarker könnten die Patienten mit einem höheren Risiko für die Entwicklung eines postoperativen SIRS schneller demaskiert und adäquat therapiert werden und so die Diskrimination zwischen SIRS und Sepsis vereinfachen⁷⁵. Auf Grund der methodischen Limitationen (s. Kapitel 5.3.1.) existiert nur eine geringe Anzahl von Studien, welche die Effekte der NETs *in-vivo* bei kardiochirurgischen Patienten mit postoperativen SIRS untersuchten. Ursächlich ist hierfür u.a. die Komplexität der Methoden, sodass für diese Studie eine neuartige Methode zur durchflusszytometrischen Quantifizierung der NETs aus Vollblut etabliert wurde^{22,68}.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es daher, eine valide Methode zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von NETs zu etablieren, welche sowohl untersucherunabhängig ist, als auch die NETs in einer hohen Anzahl quantifizieren lässt, und so für die klinische Intensivmedizin zugänglich zu machen, um somit den potenziellen Nutzen für die translationale Forschung zu evaluieren. Somit sollte die Methodik zum einen etabliert und zum anderen die Menge der NETs bei postoperativen Patienten mit SIRS und deren möglichen Bezug zu Koagulopathien geprüft werden.

Die Durchflusszytometrie basierte auf anti-MPO- und anti-Histon-markierten neutrophilen Granulozyten, welche als Surrogate für NETs dienten und im Anschluss durchflusszytometrisch quantifiziert wurden. Durch Modifizierungen (s. Kapitel 5.1.) konnte die Methode der Durchflusszytometrie vereinfacht und die Dauer des Protokolls verkürzt werden. Eine veränderte *Gating*-Strategie führte zu einer präziseren Differenzierung der gefärbten Zellpopulationen und ermöglichte eine zuverlässigere NETs-Quantifizierung und stellt so einen vielversprechenden Ansatz dar, da sie nun eine direkte Analyse der *in-vivo* gebildeten NETs aus peripheren Blutproben ermöglicht.

Um diese Zielsetzung zu validieren, wurden folgende Haupt- und Subhypothesen aufgestellt:

Haupthypothese I

Die Menge an frei-zirkulierenden NETs im peripheren Blut steigt im Rahmen einer systemischen Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass im Vergleich zu den präoperativen Plasmaspiegeln signifikant an.

Haupthypothese II

Die Menge an frei zirkulierenden NETs im peripheren Blut korreliert mit einem prokoagulatorischen Gerinnungsstatus.

Zielsetzung

Subhypothese II

Die koagulatorischen Veränderungen haben einen klinisch relevanten Einfluss und wirken sich auf das Outcome des Patienten nach kardiopulmonalem Bypass aus.

3. Methodik

3.1. Organisatorische Voraussetzungen

Das Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM , Standort Gießen) ist ein Krankenhaus der Maximalversorgung. An den zwei Standorten Gießen und Marburg werden jährlich rund 436 000 Patienten in 80 Kliniken versorgt: 342 000 ambulant und 94 000 stationär⁸⁶.

Die Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen führt pro Jahr über 2000 herz- und gefäßchirurgische Operationen durch und umfasst 16 Intensivplätze^{84,85}.

Die Studie wurde durch das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) (Grant Nummer „TI 07.001_Schneck_00“) gefördert und ermöglichte so die Durchführung dieser Studie an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Operationen und darauffolgenden Analysen wurden im Labor für experimentelle Anästhesie durchgeführt.

3.2. Studiendesign und -kollektiv

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine monozentrische, prospektive, explorative, nicht-interventionelle Beobachtungsstudie, die zwischen Oktober 2018 und März 2019 an der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie am UKGM (Standort Gießen) unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Sander nach Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission (AZ86/18) und Registrierung im deutschen Studienregister (DRKS00013584) durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 20 Patienten untersucht, welche einen kardiochirurgischen Eingriff mit Beteiligung eines CPBs benötigten. Im Rahmen des geförderten Gesamtprojektes wurden zudem drei weitere Patientenkollektive mit jeweils 20 volljährigen Patienten nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligungserklärung untersucht: Patienten im septischen Schock und zu dieser Gruppe gematchte Kontrollprobanden, sowie Patienten nach großen abdominalen Eingriffen. Laut Studienplan wurden Patienten eingeschlossen, die eine koronare Bypass Operation, unter Verwendung eines CPBs, benötigten und welche postoperativ die SIRS Kriterien erfüllten³³.

3.3. Probenrekrutierung

Den Patienten wurde an vier verschiedenen Messzeitpunkten jeweils ca. 30 ml Vollblut über einen liegenden Zugang entnommen, aufgeteilt in drei 7,5 ml EDTA S-Monovetten® (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) für die Durchflusszytometrie, eine 3 ml Citrat S-Monovette® (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) für die Thrombelastographie und eine 1,6 ml Hirudin S-Monovette® (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) für die Impedanzaggregometrie. Das abzentrifugierte Blutplasma wurde bei – 80°C aufbewahrt.

Die Messzeitpunkte für die Abnahme der Blutproben wurden laut Studienplan wie folgt definiert:

t_0 : Einschluss des Patienten im Rahmen der anästhesiologischen Narkoseeinleitung vor Operationsbeginn

t_{postOP} : Postoperativ nach Aufnahme auf die Intensivstation

t_{24h} : 24 Stunden nach OP

t_{72h} : 72 Stunden nach OP

Die Datenerhebung erfolgte zu den definierten Zeitpunkten. Erfasst wurden Basiskriterien, wie Alter und Geschlecht, ebenso wie Vorerkrankungen, antikoagulatorische Therapie und ASA-Klassifikation. Diverse Laborparameter, wie Blutbild, Blutgasanalyse (BGA), Gerinnungsparameter, Leber- und Nierenretentionsparameter, sowie Inflammationsparameter Laktat-Dehydrogenase (LDH), CRP und PCT wurden dem klinikinternen Routinelabor entnommen und in einem Case Report Form erfasst.

3.4. Ein- und Ausschlusskriterien

Laut Studienplan wurden folgenden Ein- und Ausschlusskriterien definiert:

| Einschlusskriterien | Ausschlusskriterien |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Alter ≥ 18 Jahre - Einwilligung des Patienten oder des gesetzlichen Vertreters zur Studienteilnahme - Erfüllen der SIRS-Kriterien - Elektive Herzchirurgie mit Anwendung des CPBs | <ul style="list-style-type: none"> - Alter < 18 Jahre - Schwangerschaft - Schwere Insuffizienzen oder Stenose der Herzklappen (III°) - Floride Autoimmunerkrankungen - Aktive maligne hämatogene Grunderkrankung - Erkrankungen, welche eine immunsuppressive Therapie erfordern - Einsatz einer „Mini-HLM“ - Akute Infektion vor Studieneinschluss - Kardiogener Schock - Notfall-Operation - Präoperative ECMO- od. IABP-Therapie |

Tab. 1 Übersicht über Ein- und Ausschlusskriterien laut Studienplan SEPNETs. SIRS: Temperatur ≥ 38 od. $< 36^\circ\text{C}$, Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$, resp. Insuffizienz mit Atemfrequenz $> 22/\text{min}$ oder $p_a\text{CO}_2 < 32\text{mmHg}$, Leukozytose $\geq 12.000/\mu\text{l}$ oder Leukopenie $< 4.000/\mu\text{l}$ ³³.

3.5. Zielparameter

| Hauptzielparameter | |
|---|--|
| Menge der NETs im peripheren Blut | <ul style="list-style-type: none"> - präoperativ (%) - postoperativ (%) - 24 Stunden (%) - 72 Stunden (%) |
| Globalgerinnung | <ul style="list-style-type: none"> - PTT (s) - Quick (%) /INR - AT-III (%) - Fibrinogen (g/l) - Thrombozytenzahl (giga/l) |
| Rotationsthrombelastographie (NATEM[®], FIBTEM[®], EXTEM[®], INTEM[®]) | <ul style="list-style-type: none"> - CT (s) - CFT (s) - MCF (mm) - LI 60 (%) |
| Thrombozytenaggregometrie (ASPI[®], ADP[®], TRAP[®]) | <ul style="list-style-type: none"> - AUC (Units) |

Tab. 2 Übersicht der Hauptzielparameter laut Studienplan SEPNETs.

| Nebenzielparameter | |
|---------------------------------------|---|
| Stammdaten | <ul style="list-style-type: none"> - Alter (Jahren) - Geschlecht (männlich/weiblich) - Vorerkrankungen (s. Kapitel 4.1.) - Therapie mit Antikoagulanzen und/oder Thrombozytenaggregationshemmern (prophylaktisch/therapeutisch) - Katecholaminbedarf ($\mu\text{g}/\text{min}$) - Krankenhaus-Mortalität (Patient verstorben: ja/nein) |
| Operative Parameter | <ul style="list-style-type: none"> - Eingriffsdauer (min) - CPB-Dauer (min) - Ischämie-Zeit des Herzens (min) - Blutverlust (ml) - Menge an applizierten Blutkomponenten (ml) |
| Intensivmedizinische Parameter | <ul style="list-style-type: none"> - SOFA-Score (0-24 Punkte) - Therapie mit niedermolekularen Heparinen (ja/nein) - Postoperativer Drainagefluss/Blutverlust (ml) - Delir (ja/nein) |
| Infektionsstatus | <ul style="list-style-type: none"> - CRP (mg/l) - PCT ($\mu\text{g}/\text{l}$) - Leukozyten (giga/l) |

Tab. 3 Übersicht der Nebenzielparameter laut Studienplan SEPNETs.

3.6. Datenschutz

Eine Pseudonymisierung des Studienkollektivs wurde durch die Zuordnung von Studiennummern anstelle des Patientennamens gewährleistet. Die Messwerte wurden in einer verschlüsselten Studiendatenbank ohne Bezug auf den Patienten gespeichert. Eine Tabelle zur Reidentifikation wurde vom Studienverantwortlichen archiviert. Die Datensätze verbleiben ausschließlich innerhalb der Klinik, eine Herausgabe an Dritte, auch zu Auswertungszwecken, erfolgt nicht.

Ein internes Qualitätsmanagement konnte durch regelmäßige Laborbesprechungen, in welchen der Studienstatus und etwaige Probleme mit den Verantwortlichen besprochen wurde, gewährleistet werden. Ebenso fanden regelmäßige Berichtserstattungen an das DZIF statt.

3.7. Narkoseführung

Vorbereitung, Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte nach dem Standard der Klinik für Anästhesie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie des UKGM geltenden *Standard Operating Procedure* (SOP) in der Kardiochirurgie. Die Verantwortung lag hierbei bei dem zuständigen Anästhesisten. Für die Einleitung wurde

Methodik

gewichtsadaptiert Propofol, Sufentanil und Pancuronium, für die Aufrechterhaltung der Narkose Sevofluran und eine Sufentanil-Dauerinfusion appliziert. Zur Antikoagulation erfolgte eine Gabe von Heparin 400 IE/kgKG vor CPB, welches in einem Verhältnis von 1:1 mit Protamin antagonisiert³⁶. Eine erfolgreiche Antagonisierung wurde mittels der *Activated Clotting Time* (ACT) kontrolliert. Jegliche Gabe von Blut- und Gerinnungsprodukten erfolgte nach der fachkundlichen Entscheidung der behandelnden Ärzte, unabhängig von dieser Studie.

3.8. Messmethoden

3.8.1. Durchflusszytometrie (FACS)

Prinzip

Die Durchflusszytometrie (*FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting*) wird zur Analyse und Aufbereitung heterogener Zellsuspensionen genutzt, welche sich die Grundlagen von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften zu Nutze machen. Es ermöglicht somit eine genaue Charakterisierung einzelner Zellen einer Größenordnung von 0,2 bis 150 µm in einer kurzen Zeit und identifiziert so verschiedene Zellpopulationen^{45,59}.

Die Durchflusszytometrie besteht im Wesentlichen aus drei Hauptkomponenten:

1) Das Flüssigkeitssystem

Mithilfe der hydrodynamischen Fokussierung ist es möglich, die gefärbten Zellen einer Zellsuspension einzeln aufeinandergerichtet am Analysepunkt herbeizuführen (Abb. 3). In der Durchflussskammer sind die Zellen der Probe eingebettet in einen schnelleren Hüllstrom, meist bestehend aus *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Eine Differenz von Druck, Geschwindigkeit und Dichte verhindern ein Durchmischen von Zell – und Hüllstrom⁵⁹.

Methodik

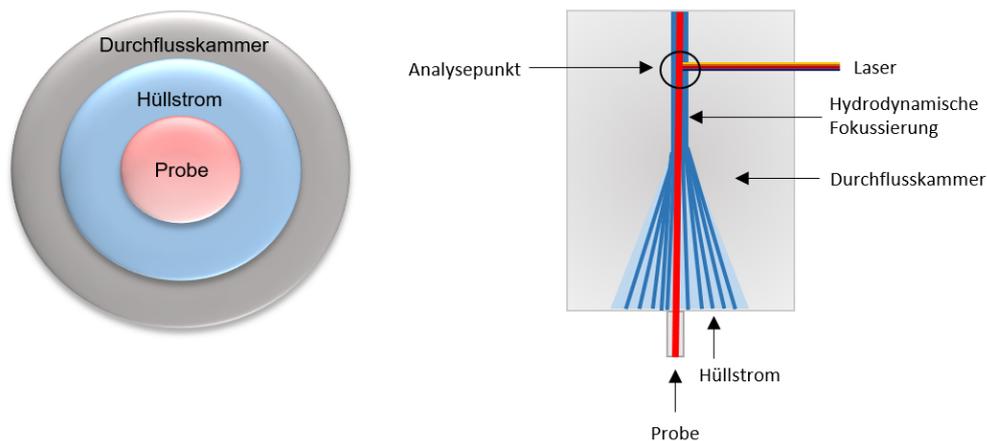


Abb. 3 Hydrodynamische Fokussierung am Analysepunkt. Die Zellprobe liegt coaxial umgeben von einem Hüllstrom (links). Durch die Form der Durchflusskammer werden Turbulenzen minimiert und gewährleistet, dass die Zellen einzeln den Analysepunkt passieren (rechts). Adaptiert von Leach et al. 2013⁵⁹.

2) Das optische System

Das optische System besteht aus einer Anregungs- und einer Sammeloptik⁵⁹. Kohärentes Laserlicht trifft im Analysepunkt auf partikuläre Strukturen wie z.B. Granulozyten, welche im Folgenden als *Event* bezeichnet werden. Abhängig von der Größe, Kernkomplexität und Unregelmäßigkeit der inneren und äußeren Struktur des *Events*, entsteht Streulicht in alle Richtungen. Über die Intensität des Streulichts kann man Größe und Granularität der *Events* analysieren. Weitere Informationen erhält man, indem Partikel vorher mit Fluorochromen markiert wurden⁴⁵.

Sobald ein *Event* in das Laserlicht eintrifft, entsteht Streuung in alle Richtungen des Raumes. Dabei ist die Intensität des *Forward Scattered Light* (FSC) direkt proportional zur Größe eines Partikels⁴⁵.

Sideward Scattered Light (SSC) ist ein Maß für die Granularität. Je inhomogener ein *Event* ist, desto größer die Intensität beim SSC. Nimmt man FSC und SSC zusammen, so lassen sich Aussagen über die physikalischen Eigenschaften von heterogenen Zellpopulationen treffen, welche z.B. die Differenzierung von Blutzellen ermöglicht.

Um spezifische biochemische Eigenschaften einer Zelle zu bestimmen, werden Farbstoffe verwendet, die direkt an die Farbstoffe binden können oder Fluorochrome, die an Liganden gebunden sind, wie z.B. monoklonale AK. Diese werden dann mit Licht der Wellenlänge angeregt, die für dieses Molekül charakteristisch ist.

Methodik

3) Das elektronische System

Das elektronische System besteht aus *Photomultipliern*, die die einfallenden Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln. Sobald sich ein *Event* in das Laserlicht bewegt, wandelt der Detektor die aufgenommene Lichtintensität in elektrische Spannung um, welche proportional zu der Anzahl der detektierten Photonen steht (Abb. 4)⁵⁹.

Die Events können nun eindimensional in Form von Histogrammen oder zweidimensional in Form von *Dot Plots* dargestellt werden (Abb. 4)⁴⁵.

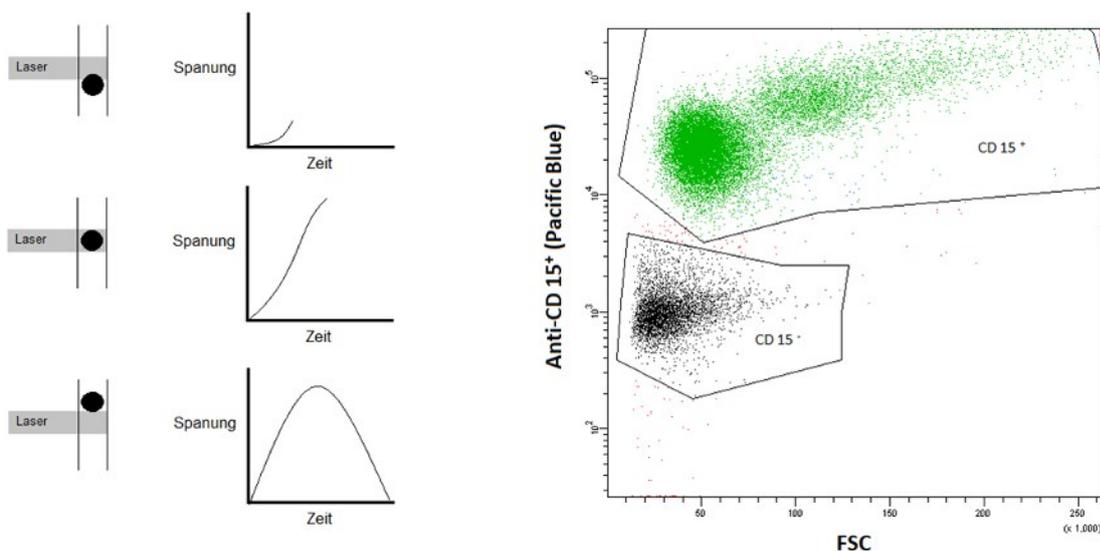


Abb. 4 Links: Abhängigkeit der Spannung von Eintritt des Events in das Laserlicht. Event erreicht den Lichtkegel (oben). Event ist in der Mitte des Lichtkegels und Spannung erreicht Höhepunkt (mitte). Event hat den Lichtkegel verlassen und Spannung kehrt zum Ursprung zurück (unten). Adaptiert von Givan et al. 2001⁴⁵. Rechts: Detektierte Events in Form eines Dot Plots.

Durchführung

Die Quantifizierung der NETs wurde mittels Durchflusszytometrie ausgeführt. Die Probenaufbereitung geschah im hiesigen Forschungslabor, während die durchflusszytometrische Untersuchung (BD FACS Canto™ II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und Darstellung (BD FACSDIVA Software, Version 6.1.3, Franklin Lakes, New Jersey, USA) in Kooperation mit dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen fertiggestellt wurde. Die Experimente konnten in acht Farb-Optionen mit drei Lasern durchgeführt werden und ermöglichten eine parallele Nutzung der Fluorochrome Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Peridin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC). Um eine Beeinflussung durch den Untersucher zu vermeiden,

Methodik

wurden die Proben verblindet. Aus EDTA-Vollblut wurden drei verschiedene Ansätze in 7,5 ml S-Monovetten® (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) angefertigt.

Ansatz FMO ohne MPO:

Um unspezifische Bindungsstellen an F_C-Rezeptoren zu unterbinden, wurden zu 100 µl EDTA-Vollblut 10 µl Immunglobulin G 10 % (IgG Gamunex, 100 mg/ml, Grifols, Barcelona, Spanien) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden 5 µl konjugiertes Alexa Fluor® 647 Anti-H3-Histone (BioLegend, San Diego, USA) zugefügt und eine weitere Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln abgewartet. Danach wurden 5 µl Pacific Blue™ Anti-human CD15 (SSEA-1, BioLegend, San Diego, USA) ergänzt und es erfolgte eine erneute Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Ansatz FMO ohne HIS:

Um unspezifische Bindungsstellen an F_C-Rezeptoren zu unterbinden, wurden zu 100 µl EDTA-Vollblut 10 µl Immunglobulin G 10 % (IgG Gamunex, 100 mg/ml, Grifols, Barcelona, Spanien) hinzugegeben. Die Probe wurde im Anschluss 40 min inkubiert und anschließend 10 µl Anti-Myeloperoxidase (MPO, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und 5 µl Pacific Blue™ Anti-human CD15 (SSEA-1, BioLegend, San Diego, USA) appliziert. Danach musste eine erneute Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln abgewartet werden.

Ansatz der Tripletts:

Um unspezifische Bindungsstellen an F_C-Rezeptoren zu unterbinden, wurden zu 100 µl EDTA-Vollblut 10 µl Immunglobulin G 10 % (IgG Gamunex, 100 mg/ml, Grifols, Barcelona, Spanien) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte die Applikation von 5 µl konjugiertem Alexa Fluor® 647 Anti-H3-Histone (BioLegend, San Diego, USA). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden weitere 5 µl Pacific Blue™ Anti-human CD15 (SSEA-1, BioLegend, San Diego, USA) und 10 µl Anti-Myeloperoxidase (MPO, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) ergänzt und eine erneute Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln abgewartet.

Für alle drei Ansätze folgte nach der Inkubationszeit von 30 min die Aufreinigung und Erythrozytenlyse mit 1 ml BD Pharm-Lyse™ (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser, BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten), welche vorher auf Raumtemperatur gebracht wurde. Nach einer weiteren Inkubationsdauer von 10 min bei Raumtemperatur

Methodik

im Dunkeln wurde zum Beenden der Lyse und Abwaschen der überschüssigen AK 1 ml PBS/BSA 2 % (PBS: gibco® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien; BSA: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Die Proben wurden nun bei 200 g für 10 min mit der Heraeus Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland) zentrifugiert, damit die Events mit gebundenen Farbstoffen auf den Boden sanken. Der Überstand wurde dekantiert und die Proben mit je 300 µl PBS/BSA 2 % aufgefüllt, damit die *Events* wieder homogen verteilt wurden. Danach wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen.

Die Qualität der Proben wurde mithilfe von 5 µl 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) überprüft, welches 5 min vor Messung appliziert wurde und eine intakte Zellmembran der neutrophilen Granulozyten bestätigte.

Gating-Strategie

Dargestellt wurden die Ergebnisse in Form von zweidimensionalen *Dot Plots*. Der *FSC* wird auf der Abszissenachse dargestellt und zeigt die Größe der Zellen an. Der *SSC* wird auf der Ordinatenachse dargestellt und spiegelt die Granularität der Zellen wider. In einem ersten Schritt konnten somit die verschiedenen Zellarten anhand ihrer Größe und Granularität voneinander abgegrenzt werden. Abb. 5A zeigt exemplarisch eine solche Darstellung.

Im nächsten Schritt wurde nach CD 15⁺ Oberflächenmerkmalen selektiert, wodurch ausschließlich neutrophile Granulozyten identifiziert werden konnten (Abb. 5B).

Im Rahmen der *Fluorescence-minus-one* (FMO) Methode wurden neben den eigentlichen Triplets der Patientenprobe mit allen drei AK, zusätzlich noch ein FMO ohne anti-MPO-AK und ein FMO ohne anti-Histon-AK vorbereitet, um somit später die Zellen als NETs zu identifizieren, welche sowohl MPO, als auch H3-Histon positiv waren (Abb. 5C-E).

Die ermittelten NETs wurden prozentual von allen im FACS erfassten neutrophilen Granulozyten angegeben. Ergebnisse unter 0,5 % und größere Zellaggregate wurden nicht in die Wertung miteinbezogen.

Methodik

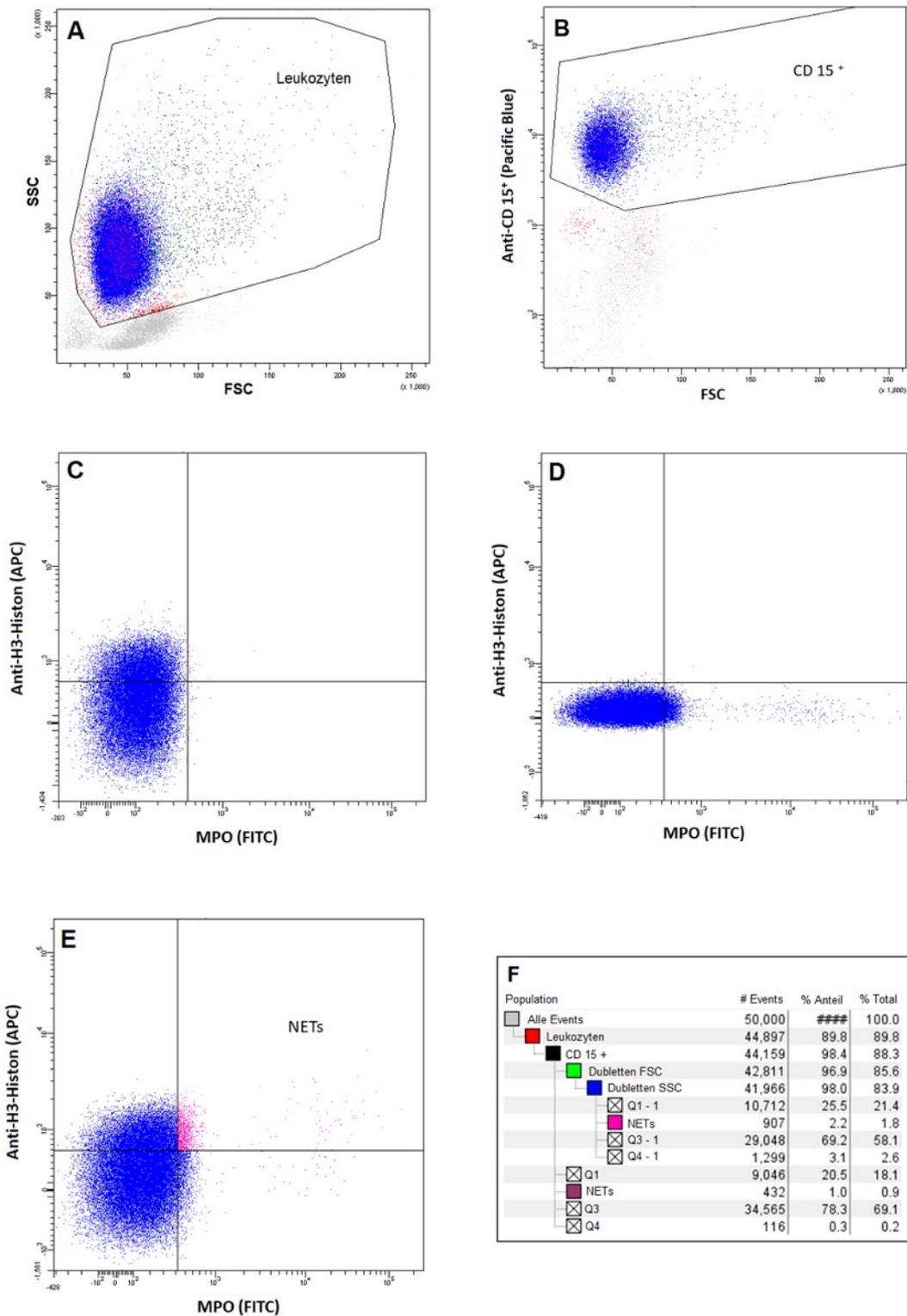


Abb. 5 Gating-Strategie mittels Fluorescence-minus-one (FMO) Methode. Als erstes werden die Leukozyten eingegrenzt (A) und in einem weiteren Schritt die neutrophilen Granulozyten als CD 15⁺-Zellen identifiziert (B). (C) zeigt die Probe ohne MPO-AK und (D) die Probe ohne anti-H3-Histon. Zellen, die sowohl MPO, als auch Anti-H3-Histon positiv sind, werden als Surrogate für NETs gewertet (E). In dieser Probe sind 2,2 % der neutrophilen Granulozyten als NETs zu werten (F). Abk. APC: Allophycocyanin; CD: Cluster of Differentiation; FITC: Fluorescein isothiocyanate; FSC: Forward Scatter; MPO: Myeloperoxidase; NETs: Neutrophil Extracellular Traps; SSC: Side Scatter.

3.8.2. Erythrozyten-Lyse

Qualitativ hochwertigere FACS Ergebnisse werden durch die Verwendung einer Erythrozyten-Lyse gewonnen. Um sicherzustellen, dass die verwendete BD Pharm-Lyse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) keinen negativen Einfluss auf die getesteten neutrophilen Granulozyten hat, wurden vor der Erhebung der Patienten, Proben mit 7-AAD getestet. 7-AAD ist ein fluoreszierender DNA-Interkalator und bindet selektiv zwischen der Base Cytosin und Guanin und verändert seine Fluoreszenzeigenschaft. Es wird ausschließlich die DNA von nicht-viablen Zellen gefärbt, da 7-AAD nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann. 7-AAD bezeichnet man daher auch als Avitalfarbstoff⁸.

3.8.3. Fluoreszenzmikroskopie

Im Januar 2019 erfolgte in Kooperation mit dem Labor der Klinik für Pneumologie (SFB *Molecular Mechanisms of Emphysema, Hypoxia and Lung Aging*) der Justus-Liebig-Universität Gießen die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie.

Prinzip

Spontane Emission, die beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems zurück in einen Zustand niedrigerer Energie entsteht, bezeichnet man als Fluoreszenz. Trifft Licht einer bestimmten Anregungswellenlänge auf ein Molekül, so werden die Photonen absorbiert und die Elektronen auf ein energetisch höheres Niveau gehoben. Gelangen sie von dort wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück, wird die frei werdende Energie in Form von Wärme und Photonen, sprich Fluoreszenzlicht, abgegeben¹⁴.

Bei der normalen Fluoreszenzmikroskopie entsteht viel Streulicht, wodurch die Auflösung verschlechtert wird. Abb. 6 zeigt das Wirkprinzip der Konfokalmikroskopie, welche die Verwendung einer weiteren Blende (*Pinhole*) direkt vor dem Detektor nutzt, wodurch nur das Licht aus der Fokusebene den Detektor erreicht. Das Licht, welches ober- und unterhalb der Fokusebene entsteht, wird ausgeblendet. Somit resultiert deutlich weniger Streulicht und das Präparat kann streifenweise von einem Lichtpunkt durchmustert werden¹⁵.

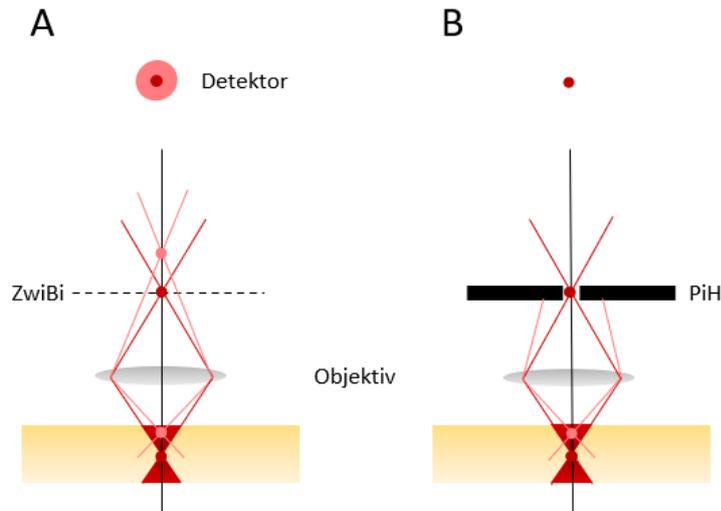


Abb. 6 Wirkprinzip eines Detektionsspinholes. (A) Licht aus dem Fokus (dunkelroter Punkt) wird vom Objektiv als Punkt in das Zwischenbild (ZwiBi) abgebildet. Licht von oberhalb der Fokusebene (rosa Punkt) ist als stark defokussierter Kreis zu sehen, da das Bild oberhalb der Zwischenebenen entsteht. Die scharfe Abbildung wäre durch den unscharfen Hintergrund verschleiert. (B) Durch ein Pinhole (PiH) in der Zwischenebene, gelangt nur das Licht aus dem Fokus auf den Detektor, Licht aus extrafokalen Ebenen wird blockiert. Adaptiert von Borlinghaus et al. 2016¹⁵.

Durchführung

Um zu bestätigen, dass es sich bei den MPO- und anti-H3-Histon-AK auch tatsächlich um NETs handelte, nutzten wir für die qualitative Messung die konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SP5, Wetzlar, Deutschland). Diese Untersuchung wurde mit gesundem Spenderblut durchgeführt. Eine Quantifizierung der NETs wurde im Rahmen der Mikroskopie nicht durchgeführt.

Für die Stimulierung der NETs Bildung wurden 100 µl Blut eines gesunden Spenders mit 10 µl PMA, Sigma, St. Louis, Vereinigte Staaten) für insgesamt 240 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte eine 10-minütige Erythrozytenlyse mit 1 ml Pharmlyse™ (1:10 Dilution, BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten). Diese wurde mit 1 ml PBS (gibco® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien) gestoppt und die Probe danach für 10 min bei 200 g und 20°C mit der Heraeus Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nun folgte eine Zentrifugation für 3 min im Cytospin® (Cellspin 1, Tharmac, Wiesbaden, Deutschland), um die Zellen auf einem Deckglas zu fixieren. Gefärbt wurde die Probe mit 5 µl Alexa Fluor® 647 anti-H3-Histon (Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten), 5 µl Pacific Blue™ Anti-Human CD15 (SSEA-1) (Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten) und 10 µl Anti-MPO (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich).

Methodik

Nach einer Inkubationszeit von 30 min in Dunkelheit wurden die Proben vorsichtig mit PBS (gibco® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien) gewaschen und anschließend mit einem optischen Öl benetzt. Nachfolgend konnte die Probe analysiert werden.

3.8.4. ELISA

Prinzip

ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das zur Gruppe der quantitativen *Immunassay*-Verfahren gehört und sich die enzymatische Farbreaktion zunutze macht, anhand derer die Antigenkonzentration bestimmt werden kann. Hierbei kann entweder der AK oder das Antigen an einer festen Phase immobilisiert sein. Als Enzym wird in der Regel die Meerrettich-Peroxidase genutzt, welche das fluorimetrisch nachweisbare Substrat 3-(p-Hydroxyphenyl) -propionsäure (HPPA) oder das colorimetrisch detektierbare 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) umsetzt. Die klassischen Schritte eines ELISA sind folgende:

1) Bindung

Als erstes muss der AK bzw. das Antigen an die feste Phase binden. Hierbei hat sich als feste Phase die Mikrotiterplatte im 96-Well-Format etabliert. Diese Mikrotiterplatten, bestehend aus Polystyrol, sind aufgrund ihrer hohen Bindungskapazität für Proteine besonders gut geeignet und weitestgehend pH-unabhängig, da sie hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.

2) Blockung

Durch das Abblocken freier Proteinbindungsstellen werden unspezifisch adsorbierte enzymmarkierte AK bzw. Antigene reduziert und die Hintergrundaktivität somit minimiert. Genutzt wird hierfür meist 10 mM PBS mit 0,5-5 % BSA.

3) Waschung

Das Waschen muss zwischen jedem einzelnen Inkubationsschritt erfolgen. Als Universalpuffer hat sich hierbei PBS/0,05 % Tween 20 bewährt⁶⁵.

Durchführung

Die hierfür verwendeten EDTA-Blutproben wurden zunächst 10 min bei 200 g mittels Heraeus Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland) und anschließend nochmal 10 min bei 4°C und 6082 g in der Mikro 200R Typ 2405 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert.

Die Messungen beinhalteten HMGB1 (Humanes HMGB1 ELISA Kit, Aviva Systems Biology, San Diego, USA), MPO (Humanes MPO Instant ELISA, eBioscience, Frankfurt a.M., Germany) und IL8 (IL-8, Human IL-8/CXCL8 Quantikine HS ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) und wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.8.5. Gerinnungsanalysen

Zu den *Point of Care* (POC)-Verfahren, welche genutzt wurden, zählten die Thrombelastographie (ROTEM® delta, Matel Medizintechnik, Hausmannstaetten, Österreich) und die Thrombozyten-Impedanzaggregometrie (Multiplate®, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz). Alle weiteren Gerinnungsparameter wurden dem klinikinternen Routinelabor entnommen.

3.8.5.1. Rotationsthrombelastometrie

System und Zubehör

Das ROTEM® delta Hämostaseanalysesystem (delta, Matel Medizintechnik, Hausmannstaetten, Österreich) besteht aus einem Messgerät mit vier Kanälen mit integriertem Computersystem. Eine automatische Pipette, welche mit der Messeinheit verbunden ist, sorgte für standardisierte Volumina und beugte Behandlungsfehlern vor. Während der Messung wurden die Daten automatisch ausgewertet und in Form von Messwerten und Diagrammen aufgezeichnet. Ein Wärmeblock sorgte für eine konstante Temperatur von 37°C für die gesamte Dauer der Messung²³.

Prinzip

Messung der viskoelastischen Veränderungen der Gerinnselformung erfolgte nach Hinzugabe von ionisiertem Calcium, um die Gerinnung des Citratblutes zu reaktivieren und weiterer Aktivatoren (Tab. 4). Der Messstab rotiert in der feststehenden Küvette und durch das sich bildende Gerinnsel erhöht sich die Viskosität des Blutes. Dadurch nimmt

Methodik

der Widerstand zu, welcher durch einen optischen Detektor gemessen wird. Diese Widerstandserhöhung wird graphisch dargestellt und gleichzeitig auch numerisch erfasst. Die Zugabe von verschiedenen Aktivatoren, lassen Rückschlüsse auf spezifische Gerinnungsprobleme zu²³. Das Messprinzip ist in Abb. 7 exemplarisch dargestellt.

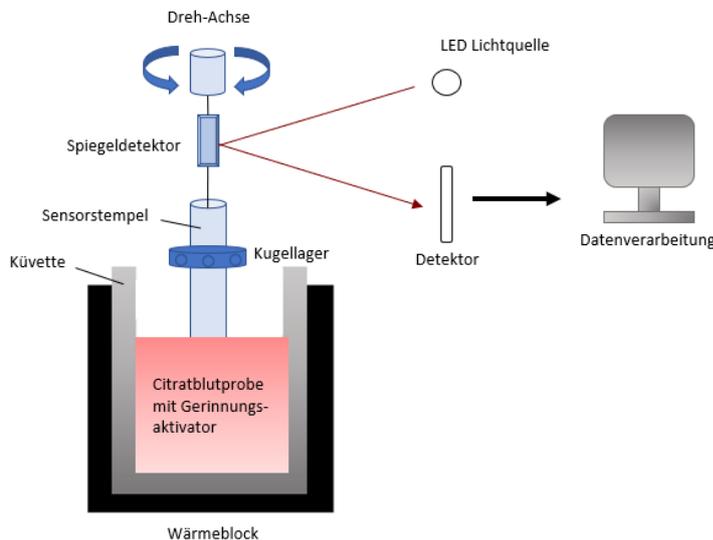


Abb. 7 Schematische Abbildung der ROTEM® Detektionsmethode. Adaptiert von ROTEM® Leitfaden²³.

| Test | Aktivator/Inhibitor | Mögliche Verwendung |
|----------------|---|---|
| NATEM® | Rekalzifizierung (Ca ²⁺) | Analyse der Aktivierung oder Inhibierung des Gerinnungsgleichgewichts |
| EXTEM® | Gewebsthromboplastin (<i>Tissue Factor</i>) | Ermittlung von Gerinnelbildung, Fibrinpolymerisation und Fibrinolyse über den extrinsischen Weg |
| INTEM® | Kontaktphase (wie aPTT und ACT) | Ermittlung von Gerinnelbildung, Fibrinpolymerisation und Fibrinolyse über den intrinsischen Weg |
| FIBTEM® | Gewebsthromboplastin + Thrombozytenhemmung | Durch die Zugabe von Cytochalasin D werden Thrombozyten blockiert, wodurch eine qualitative Erfassung von Fibrinogen und dessen Einfluss auf das Gerinnel möglich ist |

Tab. 4 ROTEM® Reagenzien. Entnommen aus ROTEM® Leitfaden²³ und *Anästhesie Journal* 2009¹⁰³.

Methodik

Abb. 8 zeigt eine typische graphische Darstellung einer Thrombelastographie und veranschaulicht die verschiedenen Parameter, die sich mithilfe einer Thrombelastographie erfassen lassen: Neben der Gerinnungszeit (CT in s), werden ebenso die Gerinnselbildungszeit (CFT in s), die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF in mm) und die maximale Lyse (ML in mm) angezeigt.

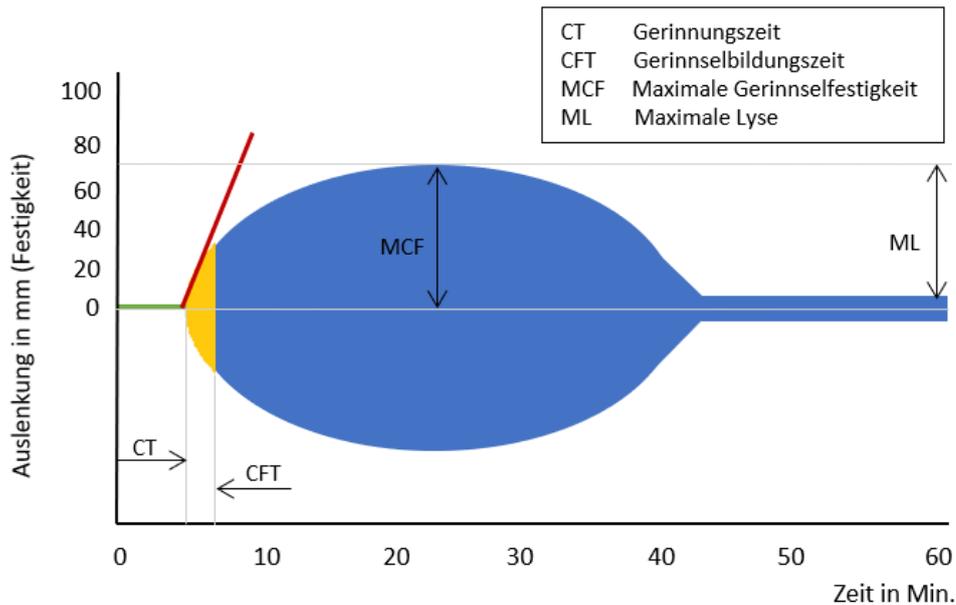


Abb. 8 Typische graphische Darstellung einer Thrombelastographie. Entnommen aus ROTEM® Analyse²³.

Durchführung

Der Messansatz erfolgte mit 2,7 ml Citratblut. Mit Hilfe der elektronischen Pipette erfolgte nun das Pipettieren von Blut und Reagenzien in die Küvetten nach vorgegebener Reihenfolge. Danach wurde der Küvettenhalter zügig am dafür vorgesehenen Messkanal befestigt und die Messung begann.

Testparameter

Cloting Time (s): Latenzzeit vom Zeitpunkt der Zugabe des Aktivators bis zum Eintritt der Gerinnselbildung, entspricht dem Quick Wert (EXTEM) bzw. der aPTT (INTEM). Verlängerung der CT kann durch Gerinnungsstörungen, hauptsächlich durch Mangel an Gerinnungsfaktoren oder Heparin verursacht werden.

MCF (mm): Die Gerinnselfestigkeit wird durch die „maximum clot firmness“ (MCF, ROTEM) erfasst.

Methodik

CFT (s): „Clot formation time“ (CFT, ROTEM) oder „k-Wert“ wird die Zeit vom Eintritt der Gerinnungsbildung bis zum Erreichen einer Amplitude von 20 mm definiert. Dieser Wert liefert einen Hinweis auf die Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung.

Lysisindex (%): Der Lyse-Index (LI) gibt die Abnahme 60 min nach Gerinnungsbildung an und stellt das Ausmaß der Fibrinolyse dar. Beträgt er <85 %, liegt eine Hyperfibrinolyse vor²³.

3.8.5.2. Impedanzaggregometrie

Das Multiplate[®]-System ist ein Messgerät, welches mit Hilfe der Impedanzaggregometrie eine quantitative Thrombozytenfunktionsanalyse im Vollblut ermöglicht. Hierfür bietet das System mehrere dafür vorgesehene Messkanäle, mehrere Tests und zwei voneinander unabhängige Sensoreinheiten pro Messzelle. Es dient zum einen zur Diagnostik von angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen, wird aber vor allem zur Messung des Einflusses von therapeutisch genutzten Plättcheninhibitoren und -aktivatoren genutzt^{87,88}.

Aufbau der Gerätschaft und der Messzelle

Der Multiplate[®] Analyzer ist ein System, welches aus einem Computer mit Windows XP-Betriebssystem und fünf Messkanälen besteht. Die Messzellen wurden in die dafür vorgesehenen Aussparungen gesteckt. Ein integrierter Wärmeblock sorgte für eine konstante Betriebstemperatur von 37°C. Ein Kabel verband jeweils eine Messzelle mit dem Gerät. Die Durchführung erfolgte über Maus, Tastatur und elektronische Pipette. Die Messverläufe und Messergebnisse wurden zeitgleich auf dem Monitor übertragen und konnten nach Beendigung der Messung ausgedruckt werden^{87,88}.

Prinzip und Durchführung

Für die Messung wurden 300 µl 0,9 % NaCl und 300 µl Hirudinblut mit einer computergesteuerten Pipette in die Messzelle pipettiert. In dieser Messzelle befanden sich zwei unabhängige Sensorpaare, aus hochleitfähigen Kupferdrähten, die zusätzlich eine Silberbeschichtung aufwiesen, welche dem Oxidationsschutz dienten. Ein magnetisierter, teflonbeschichteter Rührstab in der Messzelle durchmischte den Inhalt^{87,88}.

Methodik

Nach einer Inkubationszeit von 3 min wurden die jeweiligen Aktivatoren (Tab. 5) hinzugegeben und es kam zur Adhäsion der nun aktivierten Thrombozyten an den Sensordrähten und Aggregatbildung (Abb. 9), die folglich zu einer Widerstandserhöhung zwischen den Sensordrähten führten. Diese Widerstandserhöhung (bzw. Impedanzänderung) wurde aufgezeichnet und graphisch gegen die Zeit aufgetragen und bildete somit die *Area Under the Curve* (AUC) (Abb. 9). Diese wird beeinflusst durch das Aggregationsmaximum und die Aggregationsgeschwindigkeit und wird angegeben in $AU \cdot \text{min}^{106}$. Waren Bindungsstellen auf den Thrombozyten z.B. durch die pharmakologische Antikoagulation blockiert, konnten diese nicht durch die hinzugegebenen Aktivatoren aktiviert werden und eine Impedanzänderung blieb aus.

Um eine frühzeitige Koagulation zu verhindern, wurde das Blut in die dafür vorhergesehenen Hiruduin S-Monovette® 1,6 ml (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen, wodurch eine Antikoagulation ohne Beeinträchtigung der Calciumkonzentration ermöglicht wurde. Citrat würde Calcium binden und zu einem reduzierten Calciumspiegel führen, welches eine potentielle Fehlerquelle darstellen würde^{87,88}.

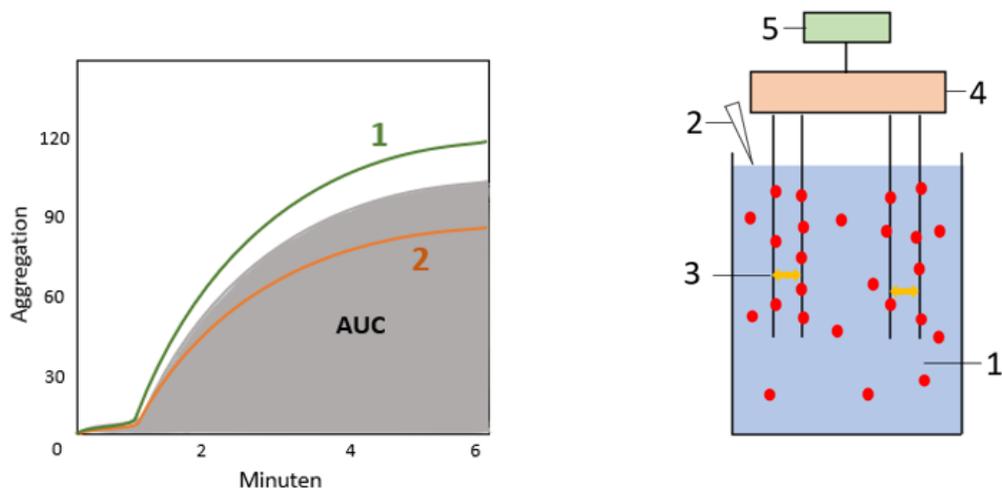


Abb. 9 Links: Typische Multiplate® Darstellung. (1) und (2) Resultat der beiden unabhängigen Elektrodenpaare, dient der internen Qualitätskontrolle. AUC= Area under the Curve) entspricht dem Maß der Thrombozyteninhibition. Rechts: Multiplate® Messprinzip. (1) Küvette mit Blutprobe, (2) Thrombozytenaktivator wird mittels Pipette hinzugefügt, (3) Widerstandserhöhung durch aktivierte Thrombozyten an Elektroden, (4) Messung des Widerstandes, (5) Datenverarbeitung. Adaptiert von *Anästhesie Journal*¹⁰³.

| Reagenz | Beschreibung | Sensitiv für |
|--|--|--|
| ADPtest[®] (Adenosindiphosphat) | Stimulation der (ADP)-Rezeptoren der Thrombozyten, v.a. P ₂ Y ₁₂ , welcher durch Clopidogrel, Prasugrel und Tiklopidin blockiert wird. | Hemmung des P ₂ Y ₁₂ -Rezeptors. Hemmung/Fehlen des GPIIb/IIIa-Rezeptors |
| ASPItest[®] (Arachidonsäure) | Cyklooxygenase katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure zu Thromboxan A ₂ und wirkt somit als sehr wirkungsvoller Thrombozytenaktivator | COX-Inhibitoren, z.B. Aspirin und NSARs. Hemmung/Fehlen des GPIIb/IIIa-Rezeptors |
| TRAPtest[®] (Thrombinrezeptor Activator Protein 6) | TRAP-6 bindet direkt am Thrombin-Rezeptor und führt zur Thrombozytenaktivierung | Wirkung von GPIIb/IIIa-Antagonisten bei Aspirin und Clopidogrel Therapie |

Tab. 5 Verwendete Reagenzien und deren Sensitivität. Entnommen aus Roche Diagnostics⁸⁸.

3.9. Statistik

Die Datenerfassung und -analysen, sowie studienbezogene Dokumentation erfolgten mittels Microsoft-Excel[®] (Microsoft, Version 2010) und R (Version 3.4.2) in Zusammenarbeit mit der Sektion für medizinische Informatik in der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie am UKGM (Standort Gießen).

Klinische Patientendaten wurden dem elektronischen Patientendaten-Managementsystem (PDMS), Meona (Version: 85.559_a4) entnommen. Des Weiteren wurden Narkoseprotokolle und OP-Berichte herangezogen, um intraoperative Parameter wie Operations- und Anästhesiezeiten, CPB-Dauer, Patiententemperatur und auch die verabreichten Blutprodukte und gerinnungsbeeinflussende Medikamente zu erfassen (NarkoData, Version: 4.12.2.8370). Postoperativ wurde die Akte der Intensivstation herangezogen (ICUData[®], Version: 3.5.0.8015, IMESO GmbH, Gießen, Deutschland).

Die Verteilung der Stichproben wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Normalverteilte Angaben wurden mit Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Für nicht-normalverteilte Angaben wurden Median und Konfidenzintervalle genutzt.

Methodik

Für die statistische Auswertung der Unterschiede der frei zirkulierenden NETs-Anzahl zwischen den verschiedenen Studienkollektiven wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt, ebenso wie der Wilcoxon-Test für Unterschiede innerhalb des einzelnen Studienkollektivs.

Die Veränderung der frei zirkulierenden NETs im zeitlichen Verlauf wurde mithilfe des Friedman Tests analysiert, die Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb eines Studienkollektivs mithilfe des Wilcoxon-Tests.

Die Korrelation der NETs mit den erwarteten Parametern wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson ausgedrückt.

4. Ergebnisse

4.1. Basischarakteristika

Die allgemeinen Charakteristika (Tab. 6), Vorerkrankungen (Tab. 7) sowie Antikoagulation (Tab. 8) der inkludierten Patienten werden im Folgenden dargestellt:

| Allgemeine Charakteristika | |
|-----------------------------|----------------|
| Alter (Jahren) | 70 (62-79) |
| Geschlecht (% männlich) | 75 |
| BMI (kg x m ⁻²) | 30 (27,6-36,5) |
| ASA | III (III) |
| SOFA zu Beginn | n.a. |
| SOFA 24 Stunden | 3 (1-3,8) |
| SOFA 72 Stunden | 3,5 (1-4,8) |
| Bypassdauer (min) | 93 (74,8-111) |
| OP-Dauer (min) | 201 (104-376) |
| Krankenhaus-Mortalität (%) | 0 (0%) |

Tab. 6 Allgemeine Charakteristika des Studienkollektivs. Abk.: ASA: American Society of Anesthesiology; BMI: Body Mass Index; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

| Vorerkrankungen | |
|--------------------------------------|-----------|
| Diabetes mellitus (%) | 12 (60%) |
| Chronische Niereninsuffizienz (%) | 5 (25%) |
| Arteriosklerose (%) | 20 (100%) |
| Maligne Krebserkrankung (%) | 0 (0%) |
| Aktuell positive Raucheranamnese (%) | 5 (25%) |
| Aortenklappenstenose (%) | 20 (100%) |
| KHK (%) | 20 (100%) |
| pAVK (%) | 7 (35%) |
| cAVK (%) | 6 (30%) |
| VHF (%) | 1 (5%) |
| Rheumatoide Erkrankungen (%) | 0 (0%) |
| Thrombose (%) | 0 (0%) |
| Lungenembolie (%) | 0 (0%) |

Tab. 7 Prozentuale Verteilung der Vorerkrankungen des Studienkollektivs. Abk.: cAVK: cerebrale arterielle Verschlusskrankheit; KHK: Koronare Herzkrankheit; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; VHF: Vorhofflimmern.

| Antikoagulatorische Therapie | |
|---|------------|
| Prophylaktische Heparinisierung präoperativ (%) | 20 (100 %) |
| Prophylaktische Heparinisierung postoperativ (%) | 0 (0%) |
| Prophylaktische Heparinisierung 24 Stunden (%) | 18 (90%) |
| Prophylaktische Heparinisierung 72 Stunden (%) | 16 (80%) |
| Therapeutische Heparinisierung präoperativ (%) | 0 (0%) |
| Therapeutische Heparinisierung postoperativ (%) | 0 (0%) |
| Therapeutische Heparinisierung 24 Stunden (%) | 2 (10%) |
| Therapeutische Heparinisierung 72 Stunden (%) | 3 (15%) |

Tab. 8 Antikoagulatorische Therapie des Studienkollektivs.

4.2. Etablierung der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung von NETs

In Anlehnung an das Protokoll von Lee et al.⁶⁰ haben wir ein verändertes Protokoll zur durchflusszytometrischen Quantifizierung der NETs etablieren können. Eine Validierung dieser Methode erfolgte mittels ELISA aus Plasma und via Fluoreszenzmikroskopie aus Vollblut.

4.2.1. PMA Stimulation und 7 – AAD

Eine PMA Stimulation von neutrophilen Granulozyten aus gesundem Spenderblut zu Beginn der Studie zeigte in der quantitativen Bestimmung mittels Durchflusszytometrie sowohl einen Anstieg der MPO-positiven Zellen, als auch der anti-H3-Histon-positiven Zellen (Abb. 10 A).

Ergebnisse

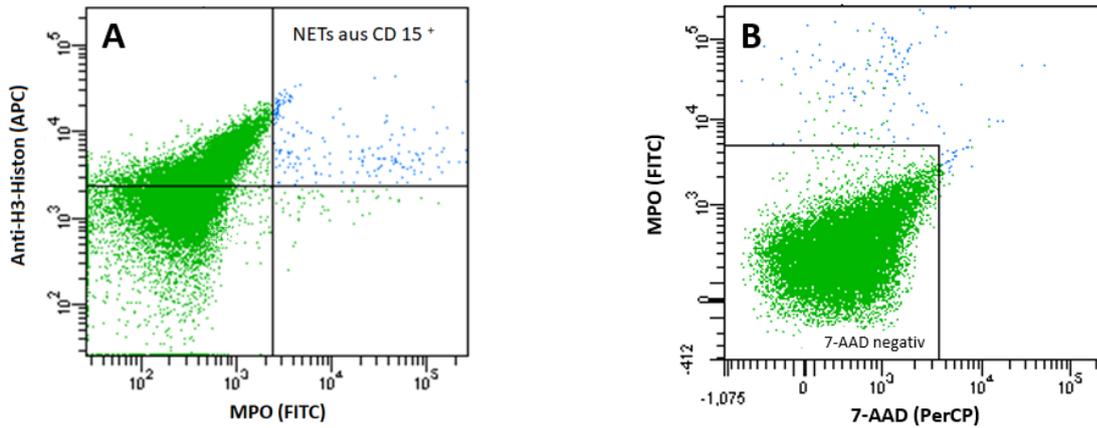


Abb. 10 PMA Stimulation der neutrophilen Granulozyten (A) und Färbung der neutrophilen Granulozyten mit 7-AAD (B). Es zeigen sich keine relevanten Mengen an 7-AAD-positiven Granulozyten.

Abb. 10 B zeigt, dass die verwendete BD Pharm-Lyse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) zu keinem relevanten Anstieg des Anteils an 7-AAD-positiven Events führt und es sich somit um intakte, vitale Zellen handelt.

4.2.2. Fluoreszenzmikroskopie

Neben der quantitativen Bestimmung mittels Durchflusszytometrie erfolgte auch eine qualitative Kontrolle mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hiemit konnten intakte neutrophile Granulozyten eines gesunden Spenders identifiziert werden. Auf deren Zelloberfläche wurden sowohl CD 15⁺, H3-Histon und Myeloperoxidase exprimiert.

Abb. 11 zeigt nicht stimulierte neutrophile Granulozyten von gesunden Spendern in den Färbungen mit Antihuman CD 15⁺-AK (blau), Anti-H3-Histon-AK (rot) und Myeloperoxidase-AK (grün). Die in der Studie untersuchten Zellen messen ca. 15 µm, welches mit der Größe eines gesunden neutrophilen Granulozyten übereinstimmt. Die Stadien der beginnenden NETose und der typische NETs-Schweif werden ebenfalls in Abb. 11 veranschaulicht.

Ergebnisse

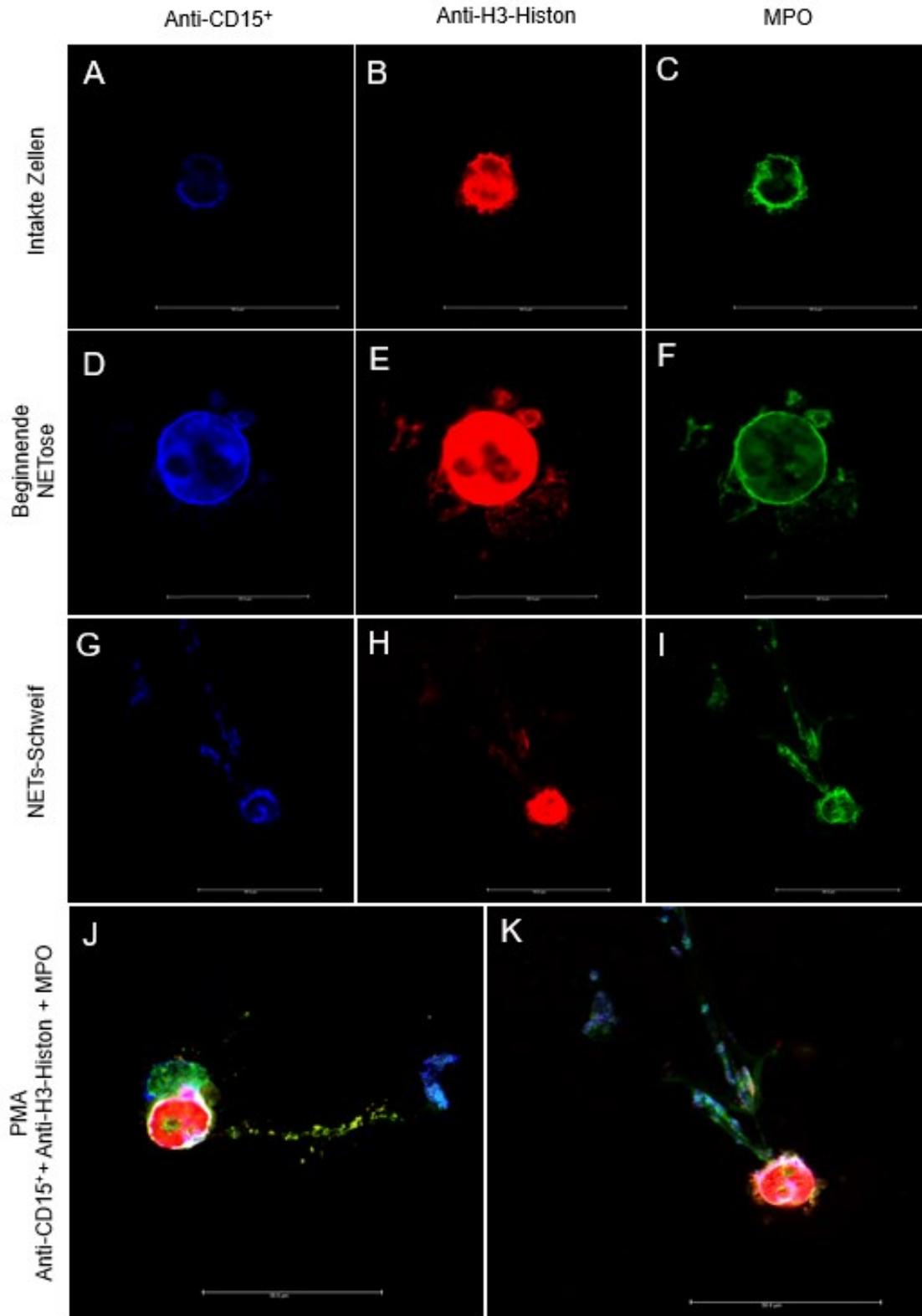


Abb. 11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung intakter neutrophiler Granulozyten (A-C), PMA stimulierte neutrophile Granulozyten mit beginnender NETose (D-F) und typischem NETs-Schweif (G-I). Angefärbt mit Antihuman-CD 15⁺AK (blau), Anti-H3-Histon AK (rot) und Anti-MPO AK (grün). Zudem ein Overlay der drei Färbungen am Beispiel von zwei neutrophilen Granulozyten. Beide neutrophile Granulozyten exprimieren zum Zeitpunkt der Aufnahme NETs. Der Referenzbalken entspricht 50 μ m.

4.3. Zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentration von NETs

Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten nach kardiopulmonalem Bypass einen statistisch signifikanten Anstieg der frei zirkulierenden NETs im Verlauf über 72 Stunden aufweisen (die folgenden Parameter sind als Median und Interquartilsabstand [IQA] angegeben: 2,7 [2,1-3,7] %, Tab. 9). Der Höchstwert der frei zirkulierenden NETs wurde direkt postoperativ gemessen und fiel dann signifikant über 24 und 72 Stunden weiter ab (präOP: 2 [1,7–2,6] %; postOP: 3,5 [2,7–4,6] %; 24h: 2,7 [2,1–3,5] %; 72h: 2,8 [2,1–3,8] %; präOP vs. postOP: $p < 0,001$; postOP vs. 24h: $p = 0,0014$; postOP vs. 72h: $p = 0,01$, Tab. 9, Abb. 12).

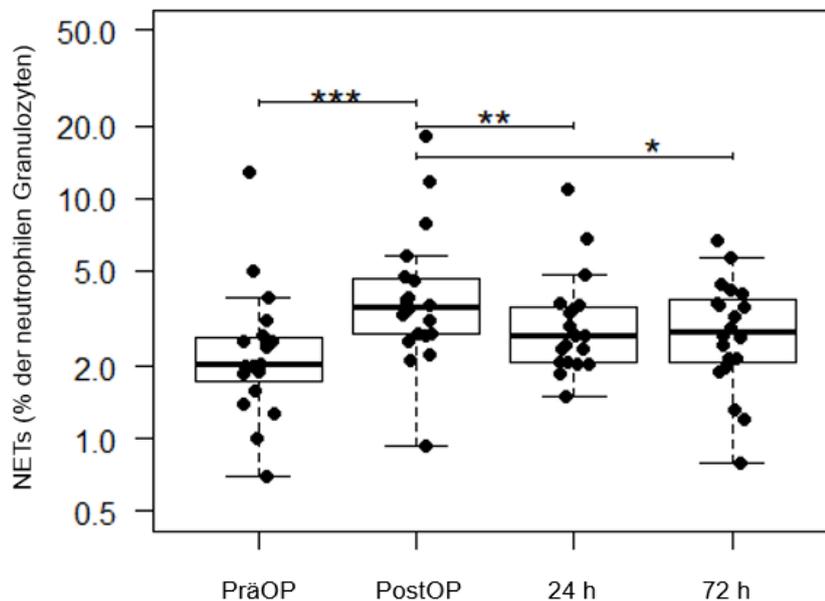


Abb. 12 Prozentualer Anteil der NETs gemessen an der Gesamtmenge der neutrophilen Granulozyten zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Abk.: NETs: Neutrophil Extracellular Traps, präOP: präoperativ, postOP: postoperativ, 24h: 24 Stunden nach OP, 72h: 72 Stunden nach OP.

4.4. Korrelation zwischen NETs und Inflammationsparametern

Bei Patienten, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff unter Einsatz eines CPBs unterzogen, konnte unmittelbar postoperativ ein signifikanter Anstieg der Plasmaspiegel von IL-8 festgestellt werden (präOP vs. postOP: $p = 0,008$) (Abb. 13, Tab. 9). Bei den Plasmaspiegeln von MPO und HMGB1 konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (Abb. 13, Tab. 9).

Ebenso wenig konnte eine Korrelation von MPO und IL-8 mit der Menge an frei zirkulierenden NETs festgestellt.

Die Inflammationsparameter CRP, PCT und Leukozyten stiegen bis zu 72 Stunden postoperativ an, zeigten allerdings keine Korrelation mit der Menge an frei zirkulierenden NETs (Tab. 9).

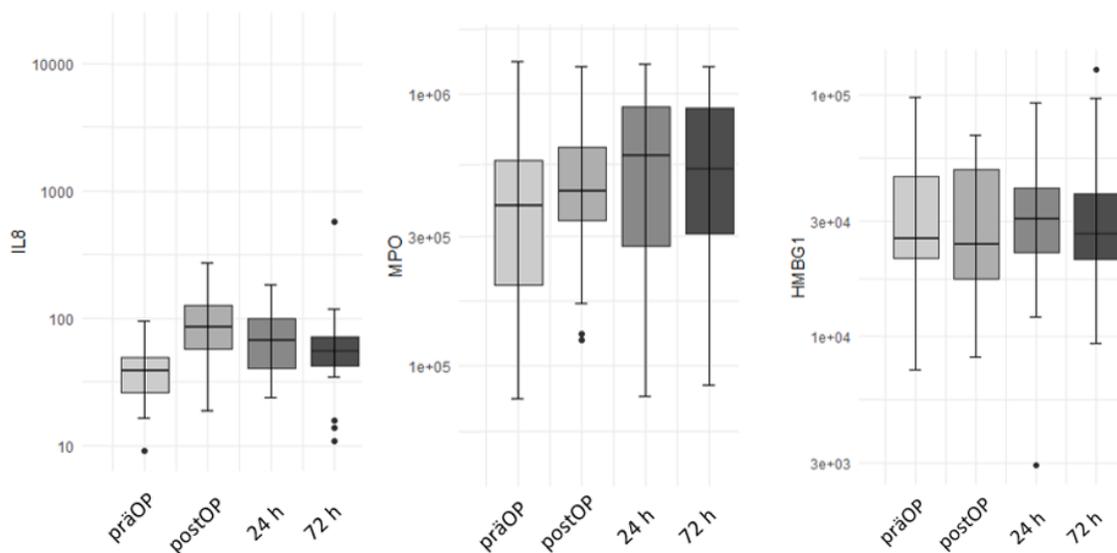


Abb. 13 Plasmaspiegel von IL-8, MPO und HMGB1 zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten. Die Ergebnisse sind dargestellt in Boxplot-Diagrammen. Abk. präOP: präoperativ, postOP: postoperativ, 24h: 24 Stunden nach OP, 72h: 72 Stunden nach OP, IL-8: Interleukin-8, MPO: Myeloperoxidase, HMGB1: High-Mobility Group Box 1.

| Inflammationsparameter | | |
|--|------------|-----------------------------------|
| Leukozyten (Zellen/μl) | PräOP | 8.100 (6.600 – 9.400) |
| | PostOP | 11.000 (7.900 – 15.000) |
| | 24 Stunden | 10.700 (8.200 – 12.200) |
| | 72 Stunden | 10.600 (8.200 – 11.800) |
| CRP (mg/l) | PräOP | 3,8 (1,9 – 10,6) |
| | PostOP | 4,3 (2,6 – 9,2) |
| | 24 Stunden | 75,1 (67,2 – 109,8) |
| | 72 Stunden | 202,4 (156,3 – 241,2) |
| PCT (ng/ml) | PräOP | 0,2 (0,1 – 0,2) |
| | PostOP | n.a. |
| | 24 Stunden | n.a. |
| | 72 Stunden | 1,6 (1,6) |
| NETs (%) | PräOP | 2 (1,7 – 2,6) |
| | PostOP | 3,5 (2,7 – 4,6) |
| | 24 Stunden | 2,7 (2,1 – 3,5) |
| | 72 Stunden | 2,8 (2,1 – 3,8) |
| HMBG1 (pg/ml) | PräOP | 25.241,3 (20.953,1 – 46.031,4) |
| | PostOP | 23.982,5 (17.353,2 – 49.133,1) |
| | 24 Stunden | 30.440,2 (22.238,5 – 41.098,5) |
| | 72 Stunden | 26.584,3 (20.870,2 – 38.988,1) |
| MPO (ng/ml) | PräOP | 392.102,8 (199.581 – 571.528,04) |
| | PostOP | 438.502,8 (341.657,5 – 638.995,4) |
| | 24 Stunden | 595.820,4 (275.593,4 – 892.010,7) |
| | 72 Stunden | 529.317,3 (306.869,6 – 885.046) |
| Interleukin 8 (pg/ml) | PräOP | 39,2 (26,1 – 49) |
| | PostOP | 85,3 (57,7 – 127,9) |
| | 24 Stunden | 67,1 (40,7 – 99) |
| | 72 Stunden | 55,2 (42,9 – 72,2) |

Tab. 9 Übersicht der Inflammationsparameter zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten. Abk. PräOP: präoperativ, PostOP: postoperativ, CRP: c-reaktives Protein, PCT: Procalcitonin, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, MPO: Myeloperoxidase, HMBG1: High-Mobility Group Box 1.

4.5. Korrelation zwischen NETs und Koagulationsparametern

4.5.1. Korrelation zwischen NETs und globalen Gerinnungsparametern

In Bezug auf eine mögliche Assoziation zwischen frei zirkulierenden NETs und globalen Gerinnungsparametern, wie PTT, INR und Fibrinogen konnte keine signifikante Korrelation dargelegt werden (Tab. 10).

| Globale Gerinnungsparameter | | |
|--|-------------------------|--------|
| | Korrelationskoeffizient | p-Wert |
| PTT (Sek.) | 0,03 | 0,79 |
| INR (Ratio) | 0,18 | 0,1 |
| Thrombozyten (Zellen/μl) | -0,032 | 0,78 |
| Fibrinogen (g/l) | -0,26 | 0,07 |

Tab. 10 Übersicht der globalen Gerinnungsparameter und deren Korrelationskoeffizienten. Abk. PTT: partielle Thromboplastinzeit, INR: International Normalized Ratio.

4.5.2. Korrelation zwischen NETs und thrombelastographischen Parametern

Postoperativ konnte eine negative Korrelation zwischen FIBTEM MCF und NETs dargestellt werden (CPB: $r = -0,28$, $p < 0,01$, Abb. 14, Tab. 11). Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen NETs und einer prolongierten INTEM CT und CFT, genauso wie EXTEM CFT (INTEM CT: $r = 0,24$; $p = 0,04$; INTEM CFT: $r = 0,26$; $p = 0,02$; EXTEM CFT: $r = 0,31$; $p < 0,01$, Tab. 11).

Eine signifikante Assoziation zwischen NETs und einer reduzierten LI60 konnte ebenfalls dargestellt werden, jedoch waren die Veränderungen von geringem absolutem Ausmaß (NATEM LI60 CABG: $r = -0,32$, $p < 0,001$; EXTEM LI60 CABG: $r = -0,25$, $p = 0,03$, Tab. 11).

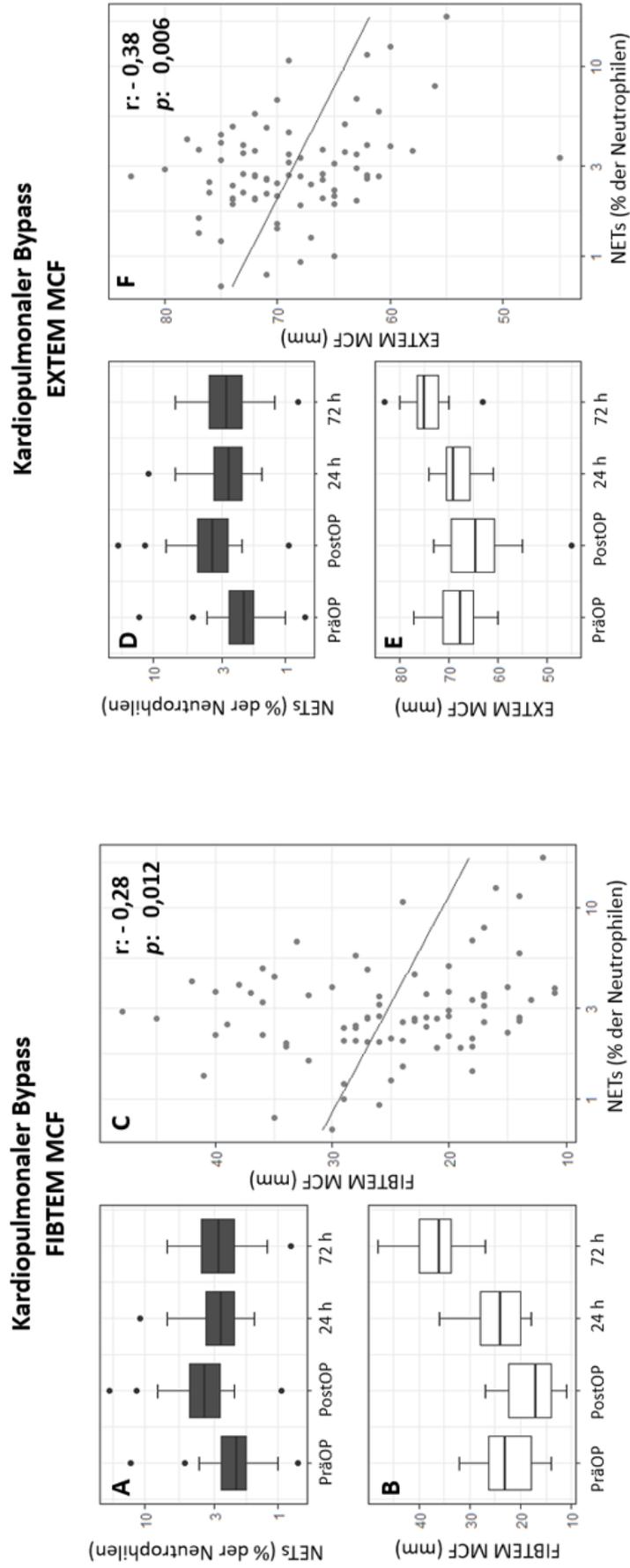


Abb. 14 Negative Korrelation von frei zirkulierenden NETs und FIBTEM MCF (links) und EXTEM MCF (rechts) bei Patienten nach kardiopulmonalem Bypass. Prozentualer NETs-Anteil gemessen an Gesamtmenge der neutrophilen Granulozyten im zeitlichen Verlauf (A und D), FIBTEM MCF (B) und EXTEM MCF (E), beide dargestellt in Boxplot-Diagrammen. Die negative Korrelation von NETs zu FIBTEM MCF (C) und NETs zu EXTEM MCF (F) sind in Scatter plots dargestellt. Abk: präOP: präoperativ, postOP: postoperativ, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, MCF: Mean Clot Firmness, r: Pearson's Korrelationskoeffizient.

| Thrombelastographie | | |
|----------------------------|-------------------------|--------|
| | Korrelationskoeffizient | p-Wert |
| EXTEM CFT (s) | 0,31 | <0,01 |
| FIBTEM CFT (s) | 0,00 | 1,00 |
| INTEM CFT (s) | 0,26 | 0,02 |
| NATEM CFT (s) | -0,09 | 0,44 |
| EXTEM CT (s) | 0,01 | 0,91 |
| FIBTEM CT (s) | -0,02 | 0,85 |
| INTEM CT (s) | 0,24 | 0,04 |
| NATEM CT (s) | -0,10 | 0,38 |
| EXTEM LI60 (%) | -0,25 | 0,03 |
| FIBTEM LI60 (%) | -0,04 | 0,70 |
| INTEM LI60 (%) | -0,21 | 0,06 |
| NATEM LI60 (%) | -0,32 | <0,001 |
| EXTEM MCF (mm) | -0,38 | <0,001 |
| FIBTEM MCF (mm) | -0,28 | <0,01 |
| INTEM MCF (mm) | -0,41 | <0,001 |
| NATEM MCF (mm) | -0,23 | 0,04 |

Tab. 11 Übersicht über die thrombelastographischen Parameter, deren Korrelationskoeffizienten und Signifikanzwerte. Abk.: CFT: Clot Formation Time, CT: Clotting Time, LI60: Lyse-Index 60, MCF: Maximum Clot Firmness.

4.5.3. Korrelation zwischen NETs und impedanzaggregometrischen Parametern

Die Ergebnisse in der Vollblut Impedanzaggregometrie zeigten keine Korrelationen mit frei zirkulierenden NETs (Tab 12).

| Impedanzaggregometrie | | |
|------------------------------|-------------------------|--------|
| | Korrelationskoeffizient | p-Wert |
| ASPItest (Units) | 0,019 | 0,87 |
| TRAPtest (Units) | -0,058 | 0,61 |
| ADPtest (Units) | -0,12 | 0,3 |

Tab. 12 Übersicht über die impedanzaggregometrischen Parameter, deren Korrelationskoeffizienten und Signifikanzniveau.

4.6. Korrelation zwischen NETS und intensivmedizinischen Parametern

Weder der SOFA-Score, noch die Krankenhaus-Mortalität korrelieren mit der Menge an frei zirkulierenden NETs (SOFA: $r = 0,17$, $p = 0,36$).

5. Diskussion

5.1. Bewertung der Durchflusszytometrie als Methode zur Quantifizierung von NETs

Das Ziel dieser Studie war es, eine innovative Methode der durchflusszytometrischen Quantifizierung von frei zirkulierenden NETs bei systemischer Inflammation nach CPB in Rahmen eines translationalen Forschungsprojektes klinisch zu etablieren und deren Interaktion mit dem Gerinnungssystem darzustellen, um neue Ansätze für die Diagnostik und Therapie der systemischen Inflammation zu schaffen.

Die Quantifizierung von NETs stellt bislang eine Herausforderung dar und ist bislang nur mit komplexen Methoden praktiziert worden. Aufgrund der notwendigen hohen fachlichen Expertise waren diese hochspezialisierten Verfahren für die klinische translationale Forschung häufig nur schwierig umsetzbar. Dagegen ermöglicht die Durchflusszytometrie die Quantifizierung hoher Zellzahlen^{1,22,60,68}. Mit dem Ziel eines möglich praktikablen Verfahrens wurde für die vorliegende Studie ein modifiziertes Protokoll von Lee et al. genutzt⁶⁰. Im Vergleich zu der Methodik von Lee et al. wurden direkt konjugierte monoklonale AK und keine polyklonale AK verwendet⁶⁰. Durch diese Veränderung konnte die Methode weiter vereinfacht und das Risiko einer Hintergrundfärbung reduziert werden.

Eine weitere Modifizierung betraf die *Gating*-Strategie. An Stelle der Isotypen-Kontrolle nutzten wir die FMO-Methode nach vorheriger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit IgG⁶⁰. Durch diese Veränderung konnte der Fluoreszenz-*Spillover* von anderen Kanälen reduziert werden und somit Kompensationsfehler minimiert werden, welche durch die Verwendung von mehreren Farben entstehen. Ein weiterer Vorteil war die präzisere Differenzierung der gefärbten Zellpopulationen im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle. Hintergrund der durchgeführten Modifizierungen des Durchflusszytometrie-Protokolls⁶⁰ war ein untersucherunabhängiger und vor allem praktikabler Ansatz der schnellen und zuverlässigen NETs-Quantifizierung, welche den Einsatz in der klinischen Intensivmedizin ermöglichen kann. Diese Wichtigkeit einer automatisierten, durchflusszytometrischen Quantifizierung wird in einem Review aus dem Jahr 2019¹⁰⁷ nochmal verdeutlicht und bestätigt das Potenzial weiterer Modifizierungen.

Diskussion

Um die Methode zu validieren, wurde zu Beginn der Studie mittels PMA eine NETose induziert, welche sowohl in der Durchflusszytometrie, als auch in der Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar waren^{43,60}.

Darüber hinaus zeigte eine durchgeführte Qualitätskontrolle, dass es durch die verwendete BD Pharm-Lyse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) zu keinem relevanten Anstieg des Anteils an 7-AAD-positiven *Events* kam und es sich somit um intakte, vitale Zellen handelt. Ein negativer Einfluss auf die neutrophilen Granulozyten und die vorliegenden Messergebnisse durch die BD Pharm-Lyse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten) konnte ausgeschlossen werden und somit in das Studienprotokoll etabliert werden.

Zuletzt konnten im Rahmen einer qualitativen Kontrolle mittels Fluoreszenzmikroskopie intakte neutrophile Granulozyten eines gesunden Spenders identifiziert werden. Mittels Färbungen mit Antihuman CD 15⁺-AK, Anti-H3-Histon-AK und Myeloperoxidase-AK, konnten die Stadien der beginnenden NETose und der typische NETs-Schweif erfolgreich dargestellt werden und die Ergebnisse in der durchflusszytometrischen Quantifizierung untermauert werden.

Bei den Ergebnissen im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen, dass es sich hierbei um eine unspezifische Färbung handelt, da bei diesen gesunden Spenderproben kein IgG hinzugegeben wurde.

Vorteile der durchflusszytometrischen NETs-Quantifizierung liegen zum einen in der Untersucherunabhängigkeit und zum anderen in dem praktikableren Ansatz der Quantifizierung, der den Gebrauch auch in der klinischen intensivmedizinischen Forschung möglich macht, da sie eine direkte Analyse der *in-vivo* gebildeten NETs aus peripheren Blutproben ermöglicht. Zudem ist die Durchflusszytometrie im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie in der Lage, in kürzerer Zeit eine viel größere Anzahl von Zellen pro Probe zu ermitteln⁶⁶.

Allerdings spielt der Faktor Zeit bei der Methode der Durchflusszytometrie eine wichtige Rolle. Die Blutproben müssen, um eine Autoaktivierung zu verhindern, sofort verarbeitet werden. Die Blutproben der Probanden wurden zwar bei jedem Abnahmezeitpunkt schnellstmöglich weiterverarbeitet, jedoch können geringe zeitliche Unterschiede nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Neben der zeitlichen Probenaufbereitung, gibt es noch weitere Limitationen in Bezug auf die durchflusszytometrische NETs-Quantifizierung welche weiter unten aufgeführt werden (Kap. 5.3.1 Limitationen der Durchflusszytometrie).

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Herzchirurgische Patienten eignen sich für die Untersuchung von Inflammationsreaktionen in besonderem Maße, da bei Ihnen im Gegensatz zu anderen Ursachen systemischer Inflammationsreaktionen (z.B. Sepsis) die Inflammationskaskade zu einem definierten Zeitpunkt aktiviert wird und somit eine systematische Beobachtung ermöglicht. Obwohl die systemische Inflammation im klinischen Alltag auch für erfahrende Intensivmediziner ein immer noch ernst zu nehmendes und eingeschränkt therapierbares Krankheitsbild mit schwerwiegenden Komplikationen ist, so ist die Studienlage über NETs bei postchirurgischen Inflammationen noch relativ gering^{1,44,46,91}.

Wie auch andere Studien, welche verschiedene Methoden zur NETs-Quantifizierung nutzten^{1,27,46,117}, konnten wir einen statistisch signifikanten Anstieg der frei zirkulierenden NETs im Vergleich zu präoperativen Plasmaspiegeln im Rahmen einer systemischen Inflammation nach CPB mittels Durchflusszytometrie erfolgreich nachweisen. Somit kann die Haupthypothese I bestätigt werden.

Einige Studien zeigten ebenfalls einen postoperativen Anstieg der NETs nach CPB und untermauern somit die eigenen Studienergebnisse^{9,9,79,90}.

So zeigte sich in der Studie von Beaubien-Souligny et al. nach erfolgtem CPB ein Anstieg der Konzentration der NETs, unabhängig davon, ob die Patienten einer Hochrisikogruppe oder einer Niedrigrisikogruppe angehörten⁹. Hierbei zählten Patienten mit einem *European System for Cardiac Operative Risk Evaluation II* (euroSCORE) ≤ 1 % zur Niedrigrisikogruppe, wohingegen Patienten mit einem euroSCORE II ≥ 5 % und zusätzlich Diabetes mellitus zur Hochrisikogruppe gezählt wurden. Entscheidend für den NETs Anstieg war die Bypassdauer, welche mit einem proportionalen NETs Anstieg einherging⁹. Dieser Anstieg kann neben einer Reaktion auf Mikroorganismen, den Kontakt mit aktivierten Thrombozyten oder einer Komplementaktivierung im Allgemeinen, auch in einem direkten Blutkontakt mit den Fremdoberflächen der extrakorporalen Zirkulation begründet liegen^{9,79}. Eine fehlende Korrelation zu IL-6 und die positive Korrelation der NETs zur Bypassdauer legen nahe, dass auch auf nicht-zellulärer Ebene, z.B. Fremdoberflächen, Trigger der NETose zu finden sind⁹.

Neben der Studie von Beaubien-Souligny et al. präsentierte noch eine weitere Studie einen ähnlichen Verlauf⁷⁹. Paunel-Görgülü et al. legte dar, dass mit Verlängerung der Bypassdauer, auch die Konzentrationen von mitochondrialer DNA (mtDNA), löslichem

Diskussion

Thrombomodulin und interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), was auf Endothelschaden hinweist, signifikant zunahm⁷⁹. Im Vergleich zur vorliegenden Studie wurden die prä- und postoperativen Plasmaproben zu ähnlichen Zeitintervallen abgenommen⁷⁹. Das Plasma von Patienten mit einer Bypassdauer von mehr als 100 min induzierte die Freisetzung von NETs von gesunden Spendern⁷⁹. Ein weiterer Punkt ist, dass NETs u.a. aus Thrombozyten und DAMPs bestehen, welche dieselben proinflammatorischen Effekte bewirken, welche auch bei einem CPB freigesetzt werden^{46,48,69,79,82,90}.

Mögliche Ursachen für die präoperative Erhöhung der NETs könnten Komorbiditäten, wie die pAVK sein, die durch ihre chronische Entzündung zu einem *Priming* der neutrophilen Granulozyten führt, welche dann wiederum durch die intraoperative Entzündungsreaktion durch den CPB in einem Ausbruch der NETose mündet. Arteriosklerose ist, unabhängig des CPBs, mit NETs assoziiert⁸¹, wodurch deren Ausgangswert präoperativ bereits höher liegt als beispielsweise bei septischen Patienten ohne Arteriosklerose⁸¹. NETs finden sich auch in Thromben, sei es in frischen Thromben bei akutem Myokardinfarkt, bei schwerem Trauma mit mikrovaskulärer Thrombose oder bei thrombotischen Mikroangiopathien⁵⁵. Sie sind somit nicht frei zirkulierend und daher mit ursächlich für eine falsch erniedrigte Menge an NETs. Ebenso könnten sich NETs im Kapillarbett abgelagert haben oder sind an *geprimte* neutrophile Granulozyten gebunden, die im systemischen und pulmonalen mikrovaskulären Bett sequestriert sind¹⁰¹.

Die oben genannten Ursachen der NETs-Erhöhung führen so aber auch zu einer Reduzierung des differenzialdiagnostischen Nutzens verschiedener Krankheitsbilder, wie beispielsweise die Abgrenzung von SIRS zu Sepsis, welche vor allem im intensivmedizinischen Setting von großer Bedeutung wäre. Darüber hinaus könnte die Diskrimination zu anderen Erkrankungen, die eine NETose verursachen, erschwert sein. Dies ist im intensivmedizinischen Alltag insbesondere in Abgrenzung zu einer Sepsis von potentiell hoher Bedeutung.

Zuletzt zeigte sich eine fehlende Korrelation von NETs zu Inflammationsparametern, welche in der unkontrollierten Zunahme nach CPB begründet sein könnte. Selbiges Ergebnis ließ sich auch in einer anderen Studie feststellen⁹. Eine mögliche Erklärung könnten außerdem zeitliche Verläufe der Inflammationsparameter bieten. Während die NETose bereits früh aktiviert wird, lassen sich erhöhte Plasmaspiegel von PCT und CRP erst postoperativ messen. Zu diesen Zeitpunkten fällt allerdings die gemessene NETose-Aktivität in der vorliegenden Studie allerdings bereits wieder ab.

Diskussion

Weder eine Korrelation von NETs zu HMGB1, noch zu MPO konnte dargestellt werden. HMGB1 fungiert als DAMP über die TLR4 Signalkaskade und kann passiv aus geschädigten Zellen nach sterilen Gewebeerletzungen infolge von Ischämien und Reperfusionen freigesetzt werden, um angeborene Immunzellen zu aktivieren^{34,112}.

In Lungengewebe konnte ein signifikanter Anstieg von HMGB1 und TLR4 nach CPB nachgewiesen werden, welcher mit dem Auftreten einer akuten Lungenschädigung korrelierte³⁴. HMGB1 induziert die NETose in ischämischen Hirngewebe nachweislich. Zudem beschreiben Studien, dass HMGB1 die Formation von NETs triggert⁵⁴.

Warum in der vorliegenden Studie eine positive Korrelation von NETs und HMGB1 ausblieb, bleibt fraglich. Möglicherweise war die Größe des untersuchten Studienkollektiv zu gering, aber auch der fehlende Anstieg der HMGB1 Konzentration bei herzchirurgischen Patienten kann ursächlich für die fehlenden Korrelation sein. Zudem könnte dies auch durch ihre unterschiedlichen Wirkungsorte bedingt sein: der Großteil der NETs befindet sich in den Mikrokapillaren, wo sie ursprünglich zu finden sind, während HMGB1 frei zirkuliert^{9,19,54}.

Eine MPO-Freisetzung kann durch verschiedenste Einflussfaktoren induziert werden, u.a. durch oxidativen Stress und Neuroinflammation²⁵, aber auch Arteriosklerose¹⁰⁵ und der Einsatz von Heparin kann eine MPO-Freisetzung fördern⁶. Die beiden letzteren Faktoren waren bei allen Studienteilnehmern zutreffend und könnten somit ursächlich für die nicht vorhandene Korrelation von NETs und MPO-Freisetzung sein.

Neben HMGB1 und MPO scheint auch IL-8 einen entscheidenden Einfluss auf die NETose zu haben. Neben IL-1 β , IL-6 und TNF- α wird dem Zytokin IL-8 eine besondere Rolle als einer der Hauptfaktoren der NETose durch Aktivierung der MAPK Signalkaskade zugeschrieben^{1,4}. Studienergebnisse belegen, dass IL-8 als das einzige Zytokin signifikant positiv mit der NETs Bildung assoziiert war¹. Zudem konnte eine Assoziation mit dem Schweregrad der Erkrankung dargelegt werden¹.

Bei einer Hemmung von IL-8 konnte eine signifikante Hemmung der NETose beobachtet werden^{1,4}. Diese Beobachtungen untermauern die MAPK-Signalkaskade als Hauptweg der IL-8 induzierten NETose¹.

In der vorliegenden Studie blieb eine Korrelation von NETs und IL-8 aus. Zum einen liegt dies möglicherweise in einem zu schnellen Abfall des IL-8 Plasmaspiegels begründet. Zusätzlich ist die IL-8 Plasmakonzentration bei Patienten nicht einheitlich erhöht und bislang unentdeckte Inhibitoren der IL-8 Expression sind nicht gänzlich auszuschließen¹.

Diskussion

Um die Spezifität der NETs als Inflammationsparameter zu erhöhen, könnte ihre kombinierte Analyse mit anderen Organsystemen, wie beispielsweise dem Gerinnungssystem, einen möglichen Ansatz bieten. Ein multiparametrischer Ansatz ist insbesondere im Hinblick auf die physiologische Verknüpfung des Immun- und Gerinnungssystem durch die NETs sinnvoll. Im Rahmen der vorliegenden Studie zeigten die Patienten, die nach einem CPB unter einer systemischen Inflammation litten, eine signifikant negative Korrelation von NETs zu FIBTEM und EXTEM MCF. Auch wenn Koagulopathien nach CPB aufgrund der erforderlichen Heparinisierung und Hämodilution nur vorsichtig beurteilt werden sollten, sind diese Ergebnisse haltbar, da die Patienten eine adäquate Gerinnungsfunktion aufwiesen und auch eine negative Korrelation auch bei chirurgischen Patienten ohne CPB festgestellt wurde⁹². Diese Beobachtung stellt einen potentiellen Ansatz für eine mögliche Differenzierung zwischen SIRS und Sepsis bei kardiochirurgischen Patienten dar.

Prokoagulatorische *in-vitro*-Effekte der NETose wurden bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben^{1,26,30,31,39,49,117}. Die somit zu erwartenden prokoagulatorischen Effekte konnten auch *in-vivo*-Studien bei septischen Patienten bestätigt werden^{92,117}.

Eine begleitende Hyperkoagulation durch die Formation von NETs konnten wir im Rahmen der vorliegenden *in-vivo*-Studie bei Patienten mit systemischer Inflammation nach CPB allerdings nicht feststellen. Im Gegenteil zeigte sich eine Hypokoagulation, welches einen möglichen Ansatz darstellen könnte, septische von SIRS Patienten zu differenzieren. Die von uns aufgestellte Haupthypothese II konnte im Rahmen dieser Studie somit nicht bekräftigt werden.

Dennoch müssen Alterationen der Gerinnung bei herzchirurgischen Patienten mit Vorsicht bewertet werden. Neben einer kleinen Fallzahl der explorativen Pilotstudie, unterlag die Gerinnung auf Grund des ausgewählten Studiendesigns – einer Observationsstudie – unterschiedlicher Einflussfaktoren, wie beispielsweise der Gabe von Heparin. Alle Studienteilnehmer wurden prophylaktisch antikoaguliert und wiesen aufgrund des CPBs eine Hämodilution auf. Diese genannten Faktoren tragen sowohl alleine, als auch in Kombination zu einem hypokoagulatorischen Effekt bei. Schließlich ist die Gerinnung ein hochkomplexes System, welches auch unter physiologischen Bedingungen variable Abweichungen aufweisen und nicht anhand eines Parameters gänzlich erfasst werden kann.

Eine Studie aus 2017 zeigte, dass nicht NETs, sondern die in NETs enthaltenen Histone und die negativ geladenen Nukleinsäuren einen prokoagulatorischen Effekt bewirken⁷⁶.

Diskussion

Dieser prokoagulatorische Effekt wird vermutlich ausgelöst durch eine Neutralisierung der negativ geladenen Nukleinsäuren durch Histon-DNA-Komplexe. Intakte NETs konnten im Rahmen der Studie keinen prokoagulatorischen Effekt auslösen. Intakte NETs weisen möglicherweise nicht genügend negative Nettoladung auf, um das Kontaktsystem zu aktivieren⁷⁶. Die Studie beruhte allerdings auf *in-vitro*-Experimenten. Andere potenziell relevante Zellen oder die Auswirkungen des Blutflusses *in-vivo*, bei dem intravaskuläre NETs den laminaren Blutfluss unterbrechen oder das Endothel verletzen, wurden hier nicht berücksichtigt – genauso wenig, wie der Abbau von NETs durch Endonukleasen und Proteasen, was zur Freisetzung von einzelnen NETs-Komponenten führt und die Gerinnung somit aktivieren könnte^{20,39,98}. Weitere Experimente *in-vivo* könnten hier Klarheit verschaffen.

Bakterien stimulieren nicht nur die NETose und somit indirekt die Koagulopathie, sondern induzieren auch eine Freisetzung von frei zirkulierenden Nukleinsäuren und Histonen und induzieren somit auch direkt das Gerinnungssystem³¹. Bei der sterilen systemischen Inflammation fehlen diese Pathogene, was einen Einfluss auf die differente Funktion der Gerinnung haben könnte^{31,76}. Diese postoperative Assoziation, also eine negative Korrelation bei SIRS Patienten zu positiver Korrelation bei septischen Patienten, könnte eine differenzialdiagnostische Beurteilung ermöglichen und somit Vorteile in der *Point-of-Care-Diagnostik* mit sich bringen, indem sie die Differenzierung zwischen SIRS und Sepsis im intensivmedizinischen Alltag erleichtern könnte.

Neben der fehlenden Hyperkoagulation ließ sich auch kein klinisch relevanter Einfluss der koagulatorischen Veränderungen auf das Outcome der Patienten nach CPB bestätigen. Die von uns aufgestellte Subhypothese II ließ sich demnach ebenso wenig bekräftigen. Auch hierbei könnte die Begründung in der zu geringen Fallzahl und dem gewählten Studiendesign liegen. Eine generell geringe periprozedurale Mortalität bei ansonsten gesunden Patienten nach CPB, welche bei <1-3 % liegt⁹⁵, könnte auch ursächlich dafür sein, dass sich die koagulatorischen Veränderungen nur marginal auswirken und sich in einer kleinen Studiengröße nicht widerspiegeln können.

Ebenso scheint auch die mtDNA ein Aktivator von Inflammations- und Gerinnungskaskaden zu sein. In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass Gewebsverletzungen bei CPB zu einer Freisetzung von *Mitochondrial Damage Associated Molecular Patterns* (mtDAMPs) führen und somit auch zu einem postoperativ signifikanten Anstieg der mtDNA. Patienten mit postoperativen Komplikationen zeigten höhere Plasmakonzentrationen, als jene Patienten mit geringerem Plasmaanstieg der mtDNA^{82,90}.

Diskussion

Die mtDNA könnte somit als früher, direkter Aktivator des SIRS durch Neutrophile Freisetzung angesehen werden und stellt daher einen potenziellen Biomarker für postoperative Komplikationen nach CPB dar. Sollte die mtDNA direkt an der kardialen Entzündung beteiligt sein, so könnte der TLR9, welcher durch mtDNA induziert wird, als therapeutisches Target genutzt werden⁹⁰.

5.3. Limitationen der Studie

5.3.1. Limitationen der Durchflusszytometrie

Inkubationszeit

Die durchflusszytometrische NETs-Quantifizierung scheint bei kürzeren Inkubationszeiten von bis zu 30 min geeignet zu sein⁶⁶. Hauptlimitationsfaktor dieser Methodik liegt in der Suspension, in der die Zellen analysiert werden. Mit Verlängerung der Inkubationszeit ließ sich ein Verlust der neutrophilen Granulozyten feststellen⁶⁶. Dieser beruht entweder auf einem Abbau und/oder einer Kumulation der neutrophilen Granulozyten, welche dadurch nicht mehr vom Raster erfasst werden. Allerdings zeigte sich auch, dass neutrophile Granulozyten nach einer Inkubationszeit von vier Stunden sehr effizient NETs freisetzen konnten⁶⁶. Somit bleibt eine ideale Inkubationszeit, welche zum einen zu einer ausreichenden Freisetzung der NETs führt und zum anderen Messergebnisse nicht zu stark minimiert, noch zu ermitteln.

Gating-Strategie

Durch morphologische Veränderungen der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der NETose und der hohen Viskosität der DNA könnten einzelne NETs aus dem Messbereich gefallen sein. Geschwollene Zellen oder zu Dupletten zusammengelegte NETs wurden somit nicht erfasst⁶⁶. Orientierend an einer anderen Studie⁶⁰, wurden nur vitale Einzelzellen gemessen, wodurch die gemessene Menge an NETs falsch erniedrigt sein könnte.

Des Weiteren befinden sich MPO und citrullierte Histone bei vollständig gebildeten NETs außerhalb der Zelle. Somit könnten mit der durchgeführten *Gating*-Strategie eher stimulierte Granulozyten im Rahmen der NETose, die keine NETs freigesetzt haben, bestimmt worden sein⁶⁶.

Diskussion

Eine Studie präsentierte, dass Zelltrümmer fast 40 % citrullierte Histone enthielten⁶⁶. Der Ausschluss dieser Reste könnte zu einer falsch niedrigen NETs-Quantifizierung geführt haben⁶⁶. Da die vorliegende *Gating*-Strategie allerdings auf alle Proben gleichermaßen angewendet wurde, bleibt die jeweilige Relation konstant.

Limitationen in Bezug auf die durchflusszytometrische NETs-Quantifizierung

Die notwendige anästhesiologische und intensivmedizinische Therapie hat einen beträchtlichen Einfluss auf die kapilläre Perfusion und Gerinnungssituation der Patienten. Daher war es wichtig, die begleitende Katecholamin-, antithrombotische, Hämo- und Gerinnungstherapie zu erfassen. Im Rahmen der Beobachtungsstudie wurde kein Einfluss auf die Therapie genommen, sodass bei der Analytik der Studienergebnisse diese Störgrößen berücksichtigt werden mussten.

Die vorliegende Studie zielte auf eine Quantifizierung der NETs bei systemischer Inflammation nach CPB ab und nicht auf die Kausalitäten der NETose. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass medizinisch indizierte Therapien, wie beispielsweise die Heparinisierung Einfluss auf die NETose hatten. Eine Studie zeigte, dass eine vorzeitige Antikoagulation die NETose hemmen könnte¹¹⁷.

Die durchgeführte präoperative Antikoagulation könnte somit ein Grund für falsch erniedrigte NETs darstellen, jedoch waren alle Studienteilnehmer gleichermaßen von der Antikoagulation betroffen, wodurch die Ergebnisse vergleichbar blieben.

5.3.2. Limitationen des Studiendesigns

Aufgrund des ausgewählten Studiendesigns - einer monozentrischen, prospektiven, explorativen, nicht-interventionellen Beobachtungsstudie – und fehlenden Vergleichsdaten war die Berechnung der Studiengröße nicht möglich. Möglicherweise ist die Größe des vorliegenden Studienkollektivs nicht ausreichend für eine signifikante Korrelation zu den sekundären Zielparametern.

Trotz der durchgeführten Modifizierungen, um das Protokoll praktikabler und untersucherabhängiger zu gestalten, erfordert eine ordnungsgemäße Durchführung der Durchflusszytometrie immer noch ein hohes Maß an fachlicher Expertise und technischen Voraussetzungen, die es aktuell noch ungeeignet für das tägliche Routinelabor machen. Inwieweit dies für die translationale Forschung im intensivmedizinischen Setting genutzt werden kann, müssen zukünftige Studien zeigen.

Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden keine Kausalitäten untersucht, sodass nicht auszuschließen war, dass vereinzelte Komorbiditäten, Vorerkrankungen oder therapeutische Maßnahmen das Ausmaß der NETose inhibiert oder induziert haben.

5.4. Ausblick

Ein Review aus dem Jahr 2019¹⁰⁷ hebt das Potenzial für eine automatisierte Quantifizierung von NETs noch einmal hervor und unterstreicht die Ergebnisse der vorliegenden Studie ebenfalls, wodurch es für den intensivmedizinischen Alltag in Zukunft noch bedeutsamer werden könnte. Die am weitesten verbreitet und akzeptierten Techniken sind SYTOX[®] (Fluoreszenzreader/Fluoreszenzmikroskopie) und Immunmarkierung (Immunfluoreszenzmikroskopie)¹⁰⁷. SYTOX[®] sticht heraus durch niedrige Kosten und einfache Implementierung, ist jedoch anfällig für falsch positive Ergebnisse durch Apoptose und Nekrose der Neutrophilen und sollte daher immer durch die Immunfluoreszenzmikroskopie ergänzt werden¹⁰⁷. Diese Kombination ist am einfachsten zu implementieren, beinhaltet die besten quantitativen Berechnungsmethoden und ist technisch weniger anspruchsvoll als die Durchflusszytometrie¹⁰⁷. Mit Hilfe von halbautomatischen Methoden lässt sich die Quantifizierung in Zukunft möglicherweise noch schneller gestalten, die fachliche Expertise im Bereich der Konfokalmikroskopie bleibt aber auch hier noch notwendig¹⁰⁷.

Eine durch PMA induzierte NETose in den Blutproben von Patienten mit septischem Schock zeigte eine signifikant höhere Fähigkeit zur Freisetzung von NETs in neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu denen von nicht-septischen, kritisch kranken Patienten¹. In zukünftigen Studien muss untersucht werden, ob Patienten, die an einer postoperativen Entzündung leiden, ebenfalls eine reduzierte Kapazität für PMA-induzierte NETose aufweisen.

Um die Ergebnisse einer anderen Studie⁹ und der vorliegenden Studie, welche beide eine Zunahme der NETs nach CPB, aber ohne positive Korrelation zu Entzündungsparametern feststellte, zu bestätigen, wäre es erforderlich, eine Kontrollgruppe zu untersuchen, welche sich einer *Off-Pump*-Herzoperation unterzieht, um zu bestätigen, dass die Exposition des Blutes mit Fremdmaterial im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation den primären Faktor der NETose im untersuchten Studienkollektiv darstellt.

Diskussion

Ob diese Ergebnisse Patienten für postoperative Komplikationen durch vermehrte NETs-Produktion prädisponiert, sollte im Rahmen weiterer Studien untersucht werden, um so zirkulierende NETs als potenzielles Target therapieren zu können.

Nach unseren Erkenntnissen ist die vorliegende Studie die Erste, die eine negative Korrelation von NETs und einer reduzierten Gerinnungsfunktion dargestellt hat. Aufgrund fehlender Kausalitäten und einer möglichen Assoziation sollte dies Gegenstand zukünftiger Studien sein, da deren Evaluierung wichtige Therapieansätze liefern könnte.

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass die Publikationen rund um das Thema NETs seit der Erstentdeckung von Brinkmann et al. 2004¹⁸ ein exponentielles Interesse erfährt und nicht nur im Rahmen der systemischen Inflammation und Sepsis eine entscheidende Rolle spielen, sondern diese auch bei Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis und systemischem Lupus erythematodes, aber auch Krebserkrankungen und noch vielen weiteren Erkrankungen mitwirken. Somit ist eine adäquate, reproduzierbare und objektive Quantifizierung von NETs zielführend für das weitere Verständnis, besonders dann, wenn dadurch therapeutische Angriffspunkte entdeckt werden können¹⁰⁷.

6. Schlussfolgerung

Wie zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, ist und bleibt der Einsatz des CPBs für eine Vielzahl von kardiochirurgischen Eingriffen eine unabdingbare Notwendigkeit. Ihr Einsatz sorgte für eine stetige Weiterentwicklung und Komplexität dieses Fachbereiches und wird auch in Zukunft nicht an Bedeutung verlieren, da der Bedarf an kardiochirurgischen Eingriffen aufgrund der immer weiter steigenden Lebenserwartungen zunehmen wird.

In den vergangenen 70 Jahren hat sich der CPB massiven Modifizierungen unterzogen, wodurch Risiken gemindert werden konnten; aber auch hier ist noch weiterer Verbesserungsbedarf möglich, wie z.B. die Verbesserung der Biokompatibilität.

Die Methodik der durchflusszytometrischen Quantifizierung der frei zirkulierenden NETs konnte von uns erfolgreich etabliert werden und ist für die translationale Forschung in der Intensivmedizin geeignet. Dennoch müssen die bestehenden Limitationen in zukünftigen Studien adressiert werden. Interessant für die frühzeitige Differenzierung von unterschiedlichen Ursachen von systemischen Inflammationsreaktionen wäre vor allem die gegenläufige Reaktion des Gerinnungssystems beim septischen Schock (Hyperkoagulation) und bei der systemischen Inflammationsreaktion (Hypokoagulation). Dieser Ansatz, gerade auch in Bezug auf die frei zirkulierenden NETs, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein, um die Therapie noch effizienter zu gestalten.

Im Rahmen dieser prospektiven Beobachtungsstudie konnte ein signifikanter Anstieg der frei zirkulierenden NETs bei systemischer Inflammation nach kardiopulmonalem Bypass durchflusszytometrisch dargestellt werden. Zusätzlich zeigte sich ein Fibrinogen-assoziiertes hypokoagulatorisches Effekt in der Thrombelastographie.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Methodik der durchflusszytometrischen Quantifizierung der frei zirkulierenden NETs durchaus in der Lage ist, NETs zuverlässig zu detektieren.

7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war es, eine neuartige Methode der durchflusszytometrischen Quantifizierung von frei zirkulierenden NETs bei SIRS nach CPB in einem kliniktauglichen Rahmen zu etablieren und deren Interaktion mit dem Gerinnungssystem darzustellen. Im Rahmen der vorliegenden explorativen, nicht-interventionellen Beobachtungsstudie nutzten wir für die Quantifizierung der NETs die Methodik der Durchflusszytometrie unter Hinzunahme einer FMO-Gatingstrategie. Eine Validierung erfolgte mittels ELISA aus Blutplasma und ebenso via Fluoreszenzmikroskopie aus Vollblut. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung von NETs in einem kardiochirurgischen Studienkollektiv, welches aus 20 volljährigen Patienten bestand, die eine koronare Bypass Operation – unter Verwendung eines CPBs – benötigten und postoperativ an einem SIRS litten. Für die Gerinnungsanalysen nutzten wir, neben den standardisierten Laborparametern, die Rotationsthrombelastometrie und Impedanzaggregometrie. Es konnte ein signifikanter Anstieg der NETs nach CPB im Verlauf über 72 Stunden dargestellt werden mit einem Höchstwert der frei zirkulierenden NETs unmittelbar postoperativ von 3,5 [2,7– 4,6] %. Es ließ sich ein signifikanter Anstieg der frei zirkulierenden NETs im Rahmen eines SIRS über 72 Stunden bestätigen (2,7 [2,1-3,7] %). Durch eine negative Korrelation von frei zirkulierende NETs und FIBTEM MCF in der Thrombelastographie konnte zusätzlich eine, durch SIRS verursachte, Hypokoagulation dargestellt werden ($r = -0,28$, $p < 0,01$). Die globalen Gerinnungsparameter und die Ergebnisse der Impedanzaggregometrie zeigten jedoch keine Korrelation in Bezug auf die Menge an frei zirkulierenden NETs. IL-8 stieg unmittelbar nach CPB an, ohne aber mit der Menge an NETs zu korrelieren. Bei den übrigen Inflammationsparametern wie CRP, PCT und Leukozyten konnte keine signifikante Korrelation zu frei zirkulierenden NETs festgestellt werden. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass mittels der Methodik der durchflusszytometrischen Quantifizierung von frei zirkulierenden NETs, diese zuverlässig detektierbar sind. Zusätzlich zeigte sich ein fibrinogenassoziierter hypokoagulatorischer Effekt in der Thrombelastographie bei SIRS nach CPB.

8. Summary

The aim of this study was to establish a novel method of flow cytometric quantification of free circulating NETs in SIRS after CPB in a clinically suitable setting and to demonstrate their interaction with the coagulatory system. In our exploratory, noninterventional observational study, we used flow cytometry with the addition of the FMO gating strategy to quantify NETs. Validation was performed with ELISA of blood plasma and also with fluorescence microscopy from whole blood. The study population consisted of 20 adult patients who required coronary bypass surgery under CPB and who developed SIRS postoperatively. For coagulation analyses, we used, in addition to standard laboratory parameters, rotational thrombelastometry and impedance aggregometry. A significant increase in NETs after CPB was shown over the course of 72 hours, with a peak of free circulating NETs immediately postoperatively of 3.5 [2.7- 4.6] %. Thus, a significant increase in free circulating NETs could be confirmed in the setting of SIRS over 72 hours (2.7 [2.1-3.7] %). A negative correlation of free circulating NETs and FIBTEM MCF in thrombelastography additionally demonstrated hypocoagulation associated to the presence of SIRS ($r = -0,28$, $p < 0,01$). However, global coagulation parameters showed no correlation with respect to the amount of free circulating NETs. IL-8 increased immediately after CPB, but no correlation to NETs could be detected. No significant correlation to free circulating NETs could be found in the other inflammatory parameters such as CRP, PCT, and leukocytes. In conclusion, the methodology of flow cytometric quantification of free circulating NETs is able to reliably quantify NETs. In addition, a fibrinogen-associated hypocoagulatory effect was shown during CPB-associated SIRS.

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| 7-AAD..... | 7-Aminoactinomycin D |
| Abb..... | Abbildung |
| ACT..... | Activated Clotting Time |
| ADP..... | Adenosindiphosphat |
| AK..... | Antikörper |
| aPTT..... | Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit |
| ASA..... | American Society of Anaesthesiologists |
| AT-III..... | Antithrombin III |
| AUC..... | Area Under the Curve |
| BGA..... | Blutgasanalyse |
| BMI..... | Body-Mass-Index |
| BSA..... | Bovines Serumalbumin |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CABG..... | Coronary Artery Bypass Grafting |
| cAVK..... | Cerebrale Arterielle Verschlusskrankheit |
| CD..... | Cluster of Differentiation |
| cf-DNA..... | circulating free DNA |
| CFT..... | Clot Formation Time |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COX..... | Cyclooxygenasen |
| CPB..... | Cardiopulmonary Bypass |
| CRP..... | C-reaktives Protein |
| CT..... | Clotting Time |
| DAMP..... | Damage Associated Molecular Pattern |
| DIC..... | Disseminierte Intravasale Koagulopathie |
| DNA..... | Desoxyribonucleic Acid |
| ECMO..... | Extracorporeal Membrane Oxygenation |
| EDTA..... | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA..... | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| euroSCORE..... | European System for Cardiac Operative Risk Evaluation |
| FACS..... | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FITC..... | Fluorescein Isothiocyanate |
| FMO..... | Fluorescence Minus One |
| FSC..... | Forward Scattered Light |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| GFR..... | Glomeruläre Filtrationsrate |
| GPIIb/IIIa | Glykoprotein IIb/IIIa |
| Hb | Hämoglobin |
| Hkt..... | Hämatokrit |
| HLM | Herz-Lungen-Maschine |
| HMGB1..... | High Mobility Group Box Protein 1 |
| HPPA | Hydroxyphenylpyruvic acid |
| IABP | Intraaortale Ballonpumpe |
| ICAM | Intercellular Adhesion Molecule |
| IE | Internationale Einheiten |
| IL | Interleukin |
| iNOS..... | Inducible Nitric Oxide Synthase |
| INR..... | International Normalized Ratio |
| IQA..... | Interquartilsabstand |
| kgKG | Körpergewicht in Kilogramm |
| KHK..... | Koronare Herzkrankheit |
| kPa..... | Kilopascal |
| LDH..... | Laktat-Dehydrogenase |
| LI | Lyse-Index |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MAPK..... | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MCF | Maximum Clot Firmness |
| ML..... | Maximum Lysis |
| mmHg..... | Millimeter Quecksilbersäule |
| mmol/l..... | Millimol/Liter |
| MPO | Myeloperoxidase |
| mtDAMPs | Mitochondrial Damage Associated Molecular Patterns |
| mtDNA..... | mitochondriale DNA |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH..... | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NETs | Neutrophil Extracellular Traps |
| NF- κ B | Nuclear Factor ' κ -light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NO..... | Stickstoffmonoxid |
| NSAR | Nichtsteroidales Antirheumatikum |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OP..... | Operation |
| OPCAB..... | Off-Pump Coronary Artery Bypass |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|---|
| p _a CO ₂ | Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Pattern |
| pAVK | Periphere Arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PCT | Procalcitonin |
| PerCP | Peridin-Chlorophyll-A-Protein |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMA | Phorbol Myristate Acetate |
| POC | Point of Care |
| PRRs | Pattern Recognition Receptors |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SOFA-Score | Sepsis-Related Organ Failure Assessment Score |
| SOP | Standard Operating Procedure |
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| SSC | Sideward Scattered Light |
| t | Zeitpunkt |
| Tab. | Tabelle |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TRAP-6 | Thrombinrezeptor Aktivator Protein 6 |
| TVT | Tiefe Venenthrombose |
| UKGM | Universitätsklinikum Gießen Marburg |
| VHF | Vorhofflimmern |

10. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1 Schematische Darstellung eines CPBs..... | 2 |
| Abb. 2 Phasen der NETs-Formation..... | 13 |
| Abb. 3 Hydrodynamische Fokussierung am Analysepunkt | 26 |
| Abb. 4 Abhängigkeit der Spannung von Eintritt des Events in das Laserlicht und deren Darstellung in Form eines Dot Plots..... | 27 |
| Abb. 5 Gating-Strategie mittels Fluorescence-minus-one (FMO) Methode | 30 |
| Abb. 6 Wirkprinzip eines Detektionspinholes | 32 |
| Abb. 7 Schematische Abbildung der ROTEM® Detektionsmethode..... | 35 |
| Abb. 8 Graphische Darstellung einer Thrombelastographie | 36 |
| Abb. 9 Multiplate® Darstellung und Messprinzip | 38 |
| Abb. 10 PMA Stimulation der neutrophilen Granulozyten und Färbung mit 7-AAD..... | 43 |
| Abb. 11 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung neutrophiler Granulozyten | 44 |
| Abb. 12 Prozentualer Anteil der NETs gemessen an der Gesamtmenge der neutrophilen Granulozyten zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten..... | 45 |
| Abb. 13 Plasmaspiegel von IL-8, MPO und HMBG1 zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten..... | 46 |
| Abb. 14 Negative Korrelation von frei zirkulierenden NETs und FIBTEM MCF und EXTEM MCF bei Patienten nach kardiopulmonalem Bypass | 49 |

11. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1 Übersicht über Ein- und Ausschlusskriterien laut Studienplan SEPNETs..... | 23 |
| Tab. 2 Übersicht der Hauptzielparameter laut Studienplan SEPNETs..... | 23 |
| Tab. 3 Übersicht der Nebenzielparameter laut Studienplan SEPNETs..... | 24 |
| Tab. 4 ROTEM® Reagenzien..... | 35 |
| Tab. 5 Verwendete Reagenzien und deren Sensitivität..... | 39 |
| Tab. 6 Allgemeine Charakteristika des Studienkollektivs..... | 41 |
| Tab. 7 Prozentuale Verteilung der Vorerkrankungen des Studienkollektivs..... | 41 |
| Tab. 8 Antikoagulatorische Therapie des Studienkollektivs..... | 42 |
| Tab. 9 Übersicht der Inflammationsparameter zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten..... | 47 |
| Tab. 10 Übersicht der globalen Gerinnungsparameter und deren Korrelationskoeffizienten..... | 48 |
| Tab. 11 Übersicht über die thrombelastographischen Parameter, deren Korrelationskoeffizienten und Signifikanzwerte..... | 50 |
| Tab. 12 Übersicht über die impedanzaggregometrischen Parameter, deren Korrelationskoeffizienten und Signifikanzniveau..... | 50 |
| Tab. 13 Liste der verwendeten Materialien..... | 71 |

12. Materialverzeichnis

| Material | Typ |
|--------------------------------|---|
| Abnahmeröhrchen – Citrat | S-Monovette® 3ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Abnahmeröhrchen – EDTA | S-Monovette® 7,5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Abnahmeröhrchen – Hirudin | S-Monovette® 1,6ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Anti-Histon | Alexa Fluor® 647 Anti-Histone, H3 Phospho (Ser10). Clone: 11 D8. Cat: 650806. Lot: B207225. Konz.: 140µg/ml, BioLegend®, San Diego, USA |
| Anti-Human CD15 | Pacific Blue™ Anti-Human CD15 (SSEA-1), Clone: W6D3, Isotype: Maus IgG1, Kappa, Cat: 323022, Lot: B257908, Konz.: 400µg/ml, BioLegend®, San Diego, USA |
| Anti-MPO | Anti-MPO, Konz.: 0,1mg/ml, Lot: GR323629-10, Abcam, Cambridge, GBR |
| BSA | Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Cup and Pin Pro | ROTEM®, Tem Innovation GmbH, München, Deutschland |
| Desinfektion | Kodan® Tinktur Forte farblos Antiseptikum, Alkoholisches Hautseptikum, Art.Nr.: 104012, Schülke, Norderstedt, Deutschland |
| Durchflusszytometer | BD FACSCANTO™ II, Geräte Nummer: 34124, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Durchflusszytometer - Software | BD FACSDIVA Software, Version 6.1.3 |
| Fluoreszenzmikroskop | Leica TCS SP5, Wetzlar, Deutschland |
| Immunglobulin G | Gamunex 10 %, Grifols, Barcelona, Spanien |
| Isotyp His | Alexa Fluor® 647 IgG2b, Alexa Isotyp Control, Clone: MPG 11, Isotype: Mouse IgG2b, Cat: 400330, Lot: B257071, Konz.: 0,5mg/ml, BioLegend®, San Diego, USA |
| Isotyp MPO | Isotyp MPO, Qb 91356, Mouse IgG1 (B11/6) (FITC)- Isotyp Control, Lot: GR3218824-5, Abcam, Cambridge, GBR |
| Kanüle | Safety Multifly Kanüle®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Lyse | BD Pharm Lyse™, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| PBS-Puffer | Phosphate Buffered Saline, pH 7,2, Gibco® by life technologies™, Carlsbad, USA |

Materialverzeichnis

| | |
|---|---|
| Pipetten | Eppendorf AG, genutzt in den Größen: 0,5-10 µl + 10-100µl + 50 -200µl +100-1000µl, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen 10µl | SafeSeal-Tips® professional 10µl, BioZym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Pipettenspitzen 100µl | Nerbe Plus GmbH & Co. KG., Winsen, Deutschland |
| Pipettenspitzen 1000µl | Nerbe Plus GmbH & Co. KG., Winsen, Deutschland |
| Reaktionsgefäß | Eppendorf Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Röhren-Tubes für FACS Messung | Proberöhre 75x12mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| ROTEM (Thrombelastometrie) | ROTEM® delta, SN Nummer:2369, Matel Medizintechnik, Hausmannstaetten, Österreich |
| ROTEM Reagenz ex-tem® | Tem Inovation GmbH, München, Deutschland |
| ROTEM Reagenz Fib-tem® | Tem Inovation GmbH, München, Deutschland |
| ROTEM Reagenz In-tem® | Tem Inovation GmbH, München, Deutschland |
| ROTEM Reagenz Sta-tem® | Tem Inovation GmbH, München, Deutschland |
| ROTEM Software | ROTEM® Messmodul, Library Version: libROTEM: 20070213-rawlog |
| Shutdown Solution | BD FACS™ Shutdown Solution, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Thrombozytenaggregatometrie | Multiplate® Analyzer, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz |
| Trägerflüssigkeit für Durchflusszytometer | BD FACSTFlow™, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA |
| Waage | Präzisionswaage Typ L310, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Zentrifuge (groß) | Heraeus Megafuge 16R Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific LED GmbH, Osterode, Deutschland |
| Zentrifuge (klein) | Mikro 200R Zentrifuge Typ 2405, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland |
| Zytozentrifuge | Cytospin®, Cellspin 1, Tharmac, Wiesbaden, Deutschland |

Tab. 13 Liste der verwendeten Materialien.

13. Literaturverzeichnis

1. Abrams ST, et al. A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* **200**(7):869–880, 2019.
2. Alasmari SZ. In Vivo Imaging of Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Visualization Methods and Outcomes. *Biomed Res Int* :4192745, 2020.
3. Aliko A, et al. Discovery of Novel Potential Reversible Peptidyl Arginine Deiminase Inhibitor. *Int J Mol Sci* **20**(9):2174, 2019.
4. An Z, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages. *Cell Cycle* **18**(21):2928–2938, 2019.
5. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **369**(9):840–851, 2013.
6. Baldus S, et al. Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation* **113**(15):1871–1878, 2006.
7. Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence* **5**(1):20–26, 2014.
8. BD Biosciences. 7-AAD. [online] <https://wwwbdbiosciences.com/us/applications/research/apoptosis/buffers-and-ancillary-products/7-aad/p/559925>. [Abgerufen am 29.12.2020]
9. Beaubien-Souligny W, et al. Increased Circulating Levels of Neutrophil Extracellular Traps During Cardiopulmonary Bypass. *CJC Open* **2**(2):39–48, 2020.

Literaturverzeichnis

10. Beckmann A, et al. German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* **68**(4):263–276, 2020.
11. Beckmann A, et al. German Heart Surgery Report 2020: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* **69**(4):294–307, 2021.
12. Boeken U, Feindt P. Ist das SIRS/Sepsis-Syndrom in der Herzchirurgie Folge der extrakorporalen Zirkulation und damit unvermeidlich? *Herz- Thorax- Gefäßchirurgie (Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie)* **22**(2):110–118, 2008.
13. Boomer JS, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**(23):2594–2605, 2011.
14. Borlinghaus RT, ed. *Fluoreszenz, Bandnr. 135*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2016.
15. Borlinghaus RT, ed. *Konfokale Mikroskopie, Bandnr. 401*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2016.
16. Born F, et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome in der Herzchirurgie: Neue Therapiemöglichkeiten durch den Einsatz eines Cytokin-Adsorbers während EKZ? *Kardiotechnik* **23**(2):41–46, 2014.
17. Bräuer A, et al. Strategien zur Vermeidung von perioperativer Hypothermie bei Off-Pump-Bypass- Chirurgie. *Anästhesiologie & Intensivmedizin* **52**:251–262, 2011.
18. Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**(5663):1532–1535, 2004.
19. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* **5**(8):577–582, 2007.

Literaturverzeichnis

20. Brühl M-L von, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* **209**(4):819–835, 2012.
21. Brunkhorst F, et al. S3-Leitlinie Sepsis 2018: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge – Zusammenfassung starker Empfehlungen. *Anästhesiologie & Intensivmedizin* **61**:178–188, 2020.
22. Buhr N, Köckritz-Blickwede M von. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *J Immunol Res* :4604713, 2016.
23. Calatzis A, Spannagl M, Vorweg M. ROTEM® Analyse. Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen. *Team Innovations GmbH*, 2013.
24. Cecconi M, et al. Sepsis and septic shock. *Lancet* **392**(10141):75–87, 2018.
25. Chen S, et al. Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds. *Front Physiol* **11**:433, 2020.
26. Clark SR. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**(4):463–469, 2007.
27. Czaikoski PG, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLOS ONE* **11**(2):e0148142, 2016.
28. Dąbrowska AM, Słotwiński R. The immune response to surgery and infection. *Cent Eur J Immunol* **39**(4):532–537, 2014.
29. Day JRS, Taylor KM. The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass. *Int J Surg* **3**(2):129–140, 2005.
30. Delabranche X, et al. Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Shock* **47**(3):313–317, 2017.
31. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care* **7**(1):117, 2017.

Literaturverzeichnis

32. Delgado-Rizo V, et al. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol* **8**:81, 2017.
33. Dellinger RP, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* **41**(2):580–637, 2013.
34. Deng Y, et al. Cardiopulmonary Bypass Induces Acute Lung Injury via the High-Mobility Group Box 1/Toll-Like Receptor 4 Pathway. *Dis Markers* :8854700, 2020.
35. Denning N-L, et al. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* **10**:2536, 2019.
36. Dinges G. Standards im Bereich Kardiochirurgie. [online] https://www.ukgm.de/ugm_2/deu/umr_ana/16810.html. [abgerufen am 13.11.2021].
37. Feindt P, Harig F, Weyand M, et al., eds. *Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine*. Steinkopff, Darmstadt, 2006.
38. Fries D, et al. Die Dilutionskoagulopathie, ein unterschätztes Problem? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **39**(12):745–750, 2004.
39. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(36):15880–15885, 2010.
40. Fuchs TA, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**(2):231–241, 2007.
41. Gando S, et al. The SIRS criteria have better performance for predicting infection than qSOFA scores in the emergency department. *Sci Rep* **10**(1):8095, 2020.
42. Gänsslen A, et al. Hämostase im Schock. *Anästhesiologie & Intensivmedizin* **57**:58-67, 2016.

Literaturverzeichnis

43. Gavillet M, et al. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am J Hematol* **90**(12):1155–1158, 2015.
44. Gentile LF, Moldawer LL. DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock* **39**(1):113–114, 2013.
45. Givan AL. *Introduction to Flow Cytometry*. Wiley-Liss, New York, 2002.
46. Hamaguchi S, et al. Identification of neutrophil extracellular traps in the blood of patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Int Med Res* **41**(1):162–168, 2013.
47. Henneman B, et al. Structure and function of archaeal histones. *PLoS Genet* **14**(9):e1007582, 2018.
48. Hirose T, et al. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. *PLOS ONE* **9**(11):e111755, 2014.
49. Iba T, et al. Is the neutrophil a 'prima donna' in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care* **18**(4):230, 2014.
50. Kannemeier C, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(15):6388–6393, 2007.
51. Kaukonen K, et al. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med* **372**(17):1629–1638, 2015.
52. Keshari RS, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLOS ONE* **7**(10):e48111, 2012.
53. Kim N, et al. Prognostic role of serum high mobility group box 1 concentration in cardiac surgery. *Sci Rep* **10**(1):6293, 2020.
54. Kim S-W, Lee J-K. Role of HMGB1 in the Interplay between NETosis and Thrombosis in Ischemic Stroke: A Review. *Cells* **9**(8):1794, 2020.

55. Kimball AS, et al. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front Immunol* **7**:236, 2016.
56. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care* **23**(1):374, 2019.
57. Landis RC, et al. Attenuating the Systemic Inflammatory Response to Adult Cardiopulmonary Bypass: A Critical Review of the Evidence Base. *The Journal of ExtraCorporeal Technology* **46**:197–211, 2014.
58. Larsen R. Herz-Lungen-Maschine und extrakorporale Zirkulation. In: *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 47–81, 2017.
59. Leach M. et al., ed. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
60. Lee KH, et al. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis. *Int J Lab Hematol* **40**(4):392–399, 2018.
61. Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hämostaseologie* **30**:10–16, 2010.
62. Levi M, et al. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *European Journal of Investigation* **27**:3–9, 1997.
63. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* **38**(2 Suppl):S26-34, 2010.
64. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update. *Crit Care Med* **46**(6):997–1000, 2018.
65. Luttmann W, et al., eds. *Der Experimentator: Immunologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.

Literaturverzeichnis

66. Manda-Handzlik A, et al. Flow cytometric quantification of neutrophil extracellular traps: Limitations of the methodological approach. *Am J Hematol* **91**(3):E9-10, 2016.
67. Marx G, Weigand M. Zweifel an der Überlegenheit der neuen Definition. *Deutsches Ärzteblatt* **114**(29-30):1429, 2017.
68. Masuda S, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta* **459**:89–93, 2016.
69. Maugeri N, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost* **12**(12):2074–2088, 2014.
70. McCarthy CG, et al. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**(2):H184-96, 2014.
71. McDonald B, et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**(3):324–333, 2012.
72. McLoughlin T, et al. Profound Normovolemic Hemodilution: Patients and in a Porcine Model. *Anesth Analg* **83**:459–465, 1996.
73. Meldrum DR, Donahoo KK. Role of TNF in Mediating Renal Insufficiency Following Cardiac Surgery: Evidence of a Postbypass Cardiorenal Syndrome. *Journal of Surgical Research* **85**:185–199, 1999.
74. Murray D, et al. Packed Red Cells in Acute Blood Loss: Dilutional Coagulopathy as a Cause of Surgical Bleeding. *Anesth Analg* **80**:336–342, 1995.
75. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol* **61**(2):194–211, 2021.

Literaturverzeichnis

76. Noubouossie DF, et al. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* **129**(8):1021–1029, 2017.
77. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* **21**:232–244, 2002.
78. Paternoster G, Guarracino F. Sepsis After Cardiac Surgery: From Pathophysiology to Management. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **30**(3):773–780, 2016.
79. Paunel-Görgülü A, et al. cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Sci Rep* **7**(1):17421, 2017.
80. Pierrakos C, et al. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* **24**(1):287, 2020.
81. Qi H, Yang S, Zhang L. Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis. *Front Immunol* **8**:928, 2017.
82. Qin C, et al. Platelets activation is associated with elevated plasma mitochondrial DNA during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg* **11**(1):90, 2016.
83. Rao AN, Kazzaz NM, Knight JS. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World J Cardiol* **7**(12):829–842, 2015.
84. RHÖN-KLINIKUM AG. UKGM Gießen/Marburg - Herz- und gefäßchirurgische Intensivmedizin. [online] https://www.ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_kv/43589.html. [abgerufen am 08.12.2020].

Literaturverzeichnis

85. RHÖN-KLINIKUM AG. UKGM Gießen/Marburg - Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie. [online] https://www.ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_kvvc/index.html. [abgerufen am 08.12.2020].
86. RHÖN-KLINIKUM AG. UKGM Gießen/Marburg - Profil. [online] https://www.ukgm.de/ugm_2/deu/192.html. [abgerufen am 08.12.2020].
87. Roche Deutschland Holding GmbH. Multiplate® Analyzer - Gerinnungsdiagnostik. [online] <https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer.html#Downloads>. [abgerufen am 12.04.2019].
88. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Multiplate Produkt-Katalog **2013**:3–11.
89. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* **18**(4):e27, 2018.
90. Sandler N, et al. Mitochondrial DAMPs Are Released During Cardiopulmonary Bypass Surgery and Are Associated With Postoperative Atrial Fibrillation. *Heart Lung Circ* **27**:122–129, 2017.
91. Sarkar M, Prabhu V. Basics of cardiopulmonary bypass. *Indian J Anaesth* **61**(9):760–767, 2017.
92. Schneck E, et al. Flow Cytometry-Based Quantification of Neutrophil Extracellular Traps Shows an Association with Hypercoagulation in Septic Shock and Hypocoagulation in Postsurgical Systemic Inflammation-A Proof-of-Concept Study. *J Clin Med* **9**(1):174, 2020.
93. Shankar-Hari M, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**(8):775–787, 2016.

Literaturverzeichnis

94. Shankar-Hari M, et al. Epidemiology of sepsis and septic shock in critical care units: comparison between sepsis-2 and sepsis-3 populations using a national critical care database. *Br J Anaesth* **119**(4):626–636, 2017.
95. Shea MJ. Koronararterielle Bypass-Operation (CABG) [online] <https://www.msmanuals.com/de-de/profi/herz-kreislauf-krankheiten/kardiovaskul%C3%A4re-tests-und-verfahren/koronararterielle-bypass-operation-cabg>. [abgerufen am 09.11.2021].
96. Singer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**(8):801–810, 2016.
97. Squicciarro E, et al. Prevalence and Clinical Impact of Systemic Inflammatory Reaction After Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **33**(6):1682–1690, 2019.
98. Stakos DA, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* **36**(22):1405–1414, 2015.
99. Stevens NE, et al. Therapeutic targeting of HMGB1 during experimental sepsis modulates the inflammatory cytokine profile to one associated with improved clinical outcomes. *Sci Rep* **7**(1):5850, 2017.
100. Stoppelaar SF de, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* **112**(4):666–677, 2014.
101. Summers C, et al. Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax* **69**(7):623–629, 2014.
102. Swystun LL, Mukherjee S, Liaw PC. Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *J Thromb Haemost* **9**(11):2313–2321, 2011.
103. Szabados S, Ganter MT, Hofer CK. Perioperatives Monitoring der Blutgerinnung. *Anästhesie Journal* (2), 2009.

Literaturverzeichnis

104. Szatmary P, et al. Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders. *J Cell Mol Med* **22**(10):4617–4629, 2018.
105. Teng N, et al. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Report* **22**(2):51–73, 2017.
106. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* **96**(12):781–788, 2006.
107. van Breda SV, et al. Computational Methodologies for the in vitro and in situ Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* **10**:1562, 2019.
108. van der Poll T, et al. Elimination of Interleukin 6 Attenuates Coagulation Activation in Experimental Endotoxemia in Chimpanzees. *Journal of Experimental Medicine* **179**:1253–1259, 1994.
109. Vincent J-L, et al. Sepsis definitions: time for change. *The Lancet* **381**(9868):774–775, 2013.
110. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)* **85**(10):1178–1190, 2020.
111. Wahba A, et al. Effects of extracorporeal circulation and heparin on the phenotype of platelet surface antigens following heart surgery. *Thrombosis Research* **97**:379–386, 2000.
112. Wang H, Ward MF, Sama AE. Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis. *Expert Opin Ther Targets* **18**(3):257–268, 2014.
113. Wang S, et al. DNase-1 Treatment Exerts Protective Effects in a Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Sci Rep* **8**(1):17788, 2018.
114. Weis S, Pletz MW, Bauer M. Sepsis - neue Definition, neue Kontroversen. *Epidemiologisches Bulletin* **37**:415–419, 2017.

Literaturverzeichnis

115. Williams D, Gavillet M. Response to correspondence: Flow cytometric quantification of neutrophil extracellular traps: Limitations of the methodological approach by Ciepiela et al. *Am J Hematol* **91**(3):E10, 2016.
116. Yang H. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front Immunol* **7**:302, 2016.
117. Yang S, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis. *Shock* **47**(2):132–139, 2017.
118. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol* **60**(3):277–284, 2013.
119. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J Immunol Methods* **423**:104–110, 2015.

14. Publikationen

- 03.12.2020 Evaluation von Neutrophilen Extracellulären Traps zur Diskriminierung von postoperativen und septischen Inflammationsreaktionen – Proof-of-Concept-Studie einer durchflusszytometrischen Methode
- Virtuelle Postervorstellung, Jahrestagung der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, 1.-4.12.2020*
- 08.01.2020 Flow Cytometry-Based Quantification of Neutrophil Extracellular Traps Shows an Association with Hypercoagulation in Septic Shock and Hypocoagulation in Postsurgical Systemic Inflammation – A Proof-of-Concept Study
- Publiziert im Journal of Clinical Medicine: J. Clin. Med. 2020, 9, 174; doi:10.3390/jcm9010174*
- 16.11.2018 Formation von Neutrophil Extracellular Traps und deren Einfluss auf die Gerinnung im Rahmen der humanen Sepsis und Inflammation (SEPNETs-Studie)
- Entwicklung einer durchflusszytometrischen Methodik zur Quantifizierung von Neutrophil Extracellular Traps aus humanem Blut
- Postervorstellung, 2. Science Day der Justus-Liebig-Universität in Gießen*

15. 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. 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 und indirekt 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

16. Danksagung

Zu Beginn gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Sander für die Überlassung des Themas, der freundlichen Unterstützung und der Gelegenheit unter seiner Verantwortung diese Arbeit zu erstellen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei PD Dr. med. Christian Koch und PD Dr. med. Emmanuel Schneck bedanken für die großartige Betreuung und ermutigende Unterstützung bei der Durchführung, sowohl fachlich, als auch menschlich. Danke, dass ihr jederzeit erreichbar wart. Die Betreuung hätte nicht besser sein können!

Mein besonderer Dank gilt Dr. Melanie Markmann für die Beratung bei der Auswertung der Rohdaten, sowie der statistischen Analyse, ebenso Ilona Magel und Gaby Michel, für die gute Einarbeitung, welche mit ihrer ruhigen und gelassenen Art und ihrem Wissen und ihrer Erfahrung diese Dissertation ermöglicht haben. Danke, dass ihr mir bei Problemen immer mit Rat und Tat beiseite gestanden habt.

Danken möchte ich selbstverständlich auch allen Probanden, die durch Ihre Teilnahme diese Studie erst ermöglicht haben.

Trotz erstklassiger Betreuung durch das gesamte Team, steht und fällt jedes Studium und jede Promotion mit der Unterstützung von Familie und Freunden. Daher möchte ich mich bei Ihnen ganz besonders bedanken:

Meinen Eltern, dass sie von Beginn an immer hinter mir standen und mir alles ermöglicht haben!! Ohne Sie wäre das alles in dem Rahmen nicht möglich gewesen. Danke für eure unermüdliche Unterstützung und Ermunterung in allen Situationen!

Bedanken möchte ich mich auch bei Franzi und Emil für die gute Teamarbeit und freundschaftliche Atmosphäre. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.