Explorative Studie zur Formation von Neutrophil Extracellular Traps und deren Einfluss auf die Gerinnung im Rahmen der postoperativen systemischen Inflammation

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

vorgelegt von Kramer, Emil Valentin
aus Tübingen

Gießen 2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Sander

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Hecker

Tag der Disputation: 22.10.2026

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Immunsystem 1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem 2
1.1.2 Das adaptive Immunsystem 2
1.1.3 Neutrophile Granulozyten 3
1.2 Neutrophil Extracellular Traps (NETs) 5
1.2.1 Formen der NETose 5
1.2.2 Auslöser der NETose 6
1.2.3 Physiologische Funktion der NETs 6
1.2.4 NET-vermittelte Pathologien 7
1.2.4.1 Die Rolle der NETs bei Sepsis 7
1.2.4.2 NETs und Hämostase 8
1.2.4.3 NETs in der Tumorbiologie 8
1.2.4.4 NETs und chirurgisches Trauma 9
1.2.5 Nachweis und Quantifizierung von NETs 9
1.3 Gerinnungssystem 10
1.3.1 Primäre (zelluläre) Hämostase 10
1.3.2 Sekundäre (plasmatische) Hämostase 10
1.3.3 Fibrinolyse und Gerinnungsregulation 11
1.3.4 Immunothrombose 12
1.3.5 Wechselwirkung zwischen Hämostase und Sepsis 12
1.4 Charakterisierung von systemischen Inflammationszuständen in der operativen Intensivmedizin 13
1.4.1 Sepsis 13
1.4.2 Historische Sepsisdefinitionen und das SIRS-Konzept 14
1.4.3 Abgrenzung von Sepsis und steriler systemischer Inflammation 15
1.4.4 Diagnostik Sepsis 16
1.4.5 Biomarker der Sepsis 16
1.5 Große abdominelle chirurgische Eingriffe 18
1.5.1 Präoperative Risikofaktoren 18
1.5.2 Typische postoperative Komplikationen 18
1.5.3 Pathophysiologie der postoperativen systemischen Inflammation 19
1.6 Zielsetzung 20

2 Material und Methoden 22
2.1 Studiendesign 22
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien 23
2.3 Untersuchungszeitpunkte und Studienablauf 23
2.4 Messmethoden 24
2.4.1 Durchflusszytometrie 24
2.4.1.1 Funktionsweise 25
2.4.1.2 Durchführung 26
2.4.1.3 Probenmaterial 27
2.4.1.4 Protokoll 27
2.4.1.5 Gatingstrategie 28
2.4.2 Vorversuche 31
2.4.3 Immunfluoreszenzmikroskopie 32
2.4.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie 33
2.4.3.2 Durchführung 34
2.4.4 ELISA 35
2.4.4.1 Grundprinzip 35
2.4.4.2 Durchführung 36
2.4.5 Rotations-Thrombelastometrie 37
2.4.5.1 Grundprinzip 37
2.4.5.2 Durchführung 38
2.4.6 Impedanzaggregometrie 40
2.4.6.1 Aufbau 40
2.4.6.2 Messprinzip 40
2.4.7 Laborchemische Analyse 43
2.5 Blutprobengewinnung 43
2.6 Materialien 44
2.7 Statistik 44

3 Ergebnisse 45
3.1 Studienkohorte 45
3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie 46
3.3 Durchflusszytometrische Quantifikation der NET-assoziierten Neutrophilen 47
3.4 Inflammationsparameter 48
3.4.1 Überblick der Ergebnisse 48
3.4.2 Korrelation der NET-Marker mit Inflammationsparametern 49

3.5 Koagulationsparameter 50
3.5.1 Überblick der Ergebnisse 50
3.5.2 Korrelation der NET-Marker mit Koagulationsparametern 52
3.6 Zelluläre NET-assoziierte Parameter und SOFA-Score 55
4 Diskussion 56
4.1 Bewertung der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung von NETs 56
4.1.1 Limitationen der Methode 58
4.2 Interpretation der experimentellen Ergebnisse 60
4.2.1 Durchflusszytometrische Quantifikation der NETs 60
4.2.2 Serologische Inflammationsparameter 62
4.2.3 Koagulationsparameter 64
4.2.4 Zelluläre NET-Parameter und perioperative Organdysfunktion 66
4.3 Limitationen 68
5 Ausblick 70
6 Zusammenfassung 72
7 Summary 73
8 Abkürzungsverzeichnis 74
9 Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis 77
9.1 Abbildungsverzeichnis 77
9.2 Tabellenverzeichnis 77
10 Literaturverzeichnis 79
11 Anhang 97
11.1 Verwendete Geräte 97
11.2 Verwendete Materialien 97
11.3 Verwendete Software 100
12 Publikationsverzeichnis 101
13 Ehrenwörtliche Erklärung 102
14 Danksagung 103
15 Tabellarischer Lebenslauf 104

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes Gebilde aus verschiedenen Komponenten, welches den Körper vor schädlichen Mikroorganismen und anderen Fremdstoffen schützt. Es wird in zwei Hauptkomponenten unterteilt: das angeborene Immunsystem (primäres Immunsystem) und das adaptive Immunsystem (sekundäres Immunsystem). Man kann weiterhin jeweils zelluläre sowie lösliche Faktoren unterscheiden (siehe Abbildung 1).

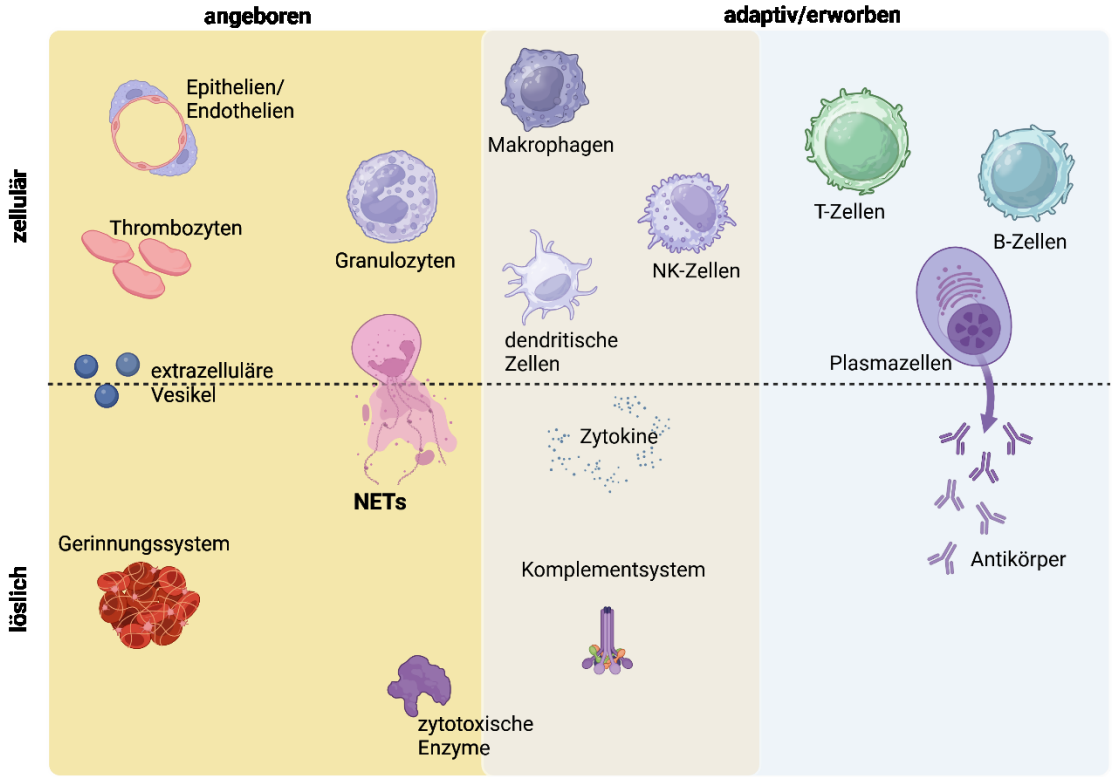


Abbildung 1: Überblick über das angeborene und adaptive Immunsystem. Schematische Darstellung zentraler Komponenten des Immunsystems, unterteilt nach funktioneller Zuordnung zum angeborenen (links) und adaptiven (rechts) Immunsystem sowie nach struktureller Organisation. Im oberen Bereich sind überwiegend zelluläre Bestandteile dargestellt (u. a. Epithel- und Endothelzellen, Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen). Extrazelluläre Vesikel und NETs sind als partikuläre, nicht-zelluläre Strukturen dargestellt, die funktionell zwischen zellulären und löslichen Komponenten vermitteln und daher an der Grenze zwischen beiden Ebenen positioniert sind. Im unteren Bereich sind überwiegend lösliche Bestandteile des Immunsystems dargestellt, darunter Zytokine, das Komplementsystem, Antikörper, zytotoxische Enzyme sowie das Gerinnungssystem. Erstellt mit BioRender.com. *Abkürzungen: NETs: Neutrophil Extracellular Traps, NK-Zellen: natürliche Killerzellen.* Angelehnt an [61].

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die primäre Immunantwort wird bereits kurz nach der Schädigung oder nach Kontakt mit einem Fremdkörper aktiviert. Aufgaben der natürlichen oder angeborenen Immunantwort sind die Erkennung solcher Stimuli, die Rekrutierung von Zellen der primären Immunantwort sowie das Bahnen und Initiieren der sekundären Immunantwort [8].

Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind physikalische Barrieren, wie das Epithel, sowie verschiedene Immunzellen und lösliche Faktoren, die je nach Bedarf in ihrer Konzentration und Aktivität reguliert werden. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen unter anderem Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen. Die humoralen, also löslichen Bestandteile der angeborenen Immunantwort stellen eine heterogene Gruppe dar, zu der unter anderem Zytokine, das Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine und antimikrobielle Peptide gehören. Bestimmte Strukturen der Pathogene, sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), werden durch spezifische Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) auf Zellen der angeborenen Immunantwort erkannt und initiieren nach Ligandenbindung eine Immunantwort, unter anderem durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [116].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Beim adaptiven Immunsystem handelt es sich um die spezifische Immunabwehr, welche eine zielgerichtete Erkennung und Bekämpfung spezifischer Antigene ermöglicht. Darüber hinaus erlaubt das adaptive Immunsystem eine effektive Immunantwort gegen Pathogene, die Mechanismen zur Umgehung des angeborenen Immunsystems entwickelt haben. Durch Bildung von Gedächtniszellen kann eine langfristige Immunität erreicht werden und die adaptive Immunantwort bei erneutem Antigenkontakt beschleunigt werden [72].

Zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems sind T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. T-Zellen entstammen der lymphatischen Zellreihe und reifen im Thymus zu naiven T-Zellen. Sie erkennen über spezifische T-Zellrezeptoren von körpereigenen Zellen präsentierte, zu Peptidfragmenten prozessierte Antigene. Anhand ihrer

Oberflächenproteine unterteilt man sie in $CD4^+$- und $CD8^+$-Zellen. $CD4^+$-Zellen umfassen die Gruppe der T-Helferzellen und interagieren mit antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen) über deren Major Histocompatibility Complex (MHC)-Klasse-II-Moleküle, wodurch die Immunantwort insbesondere über die Ausschüttung von Zytokinen koordiniert wird. $CD8^+$-Zellen, auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, erkennen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentierte Antigene, die auf allen kernhaltigen Körperzellen sowie auf Thrombozyten exprimiert werden, und können bei Infektion oder Entartung die Apoptose der betroffenen Zellen auslösen. $CD8^+$-Zellen sind somit ein wichtiger Bestandteil der Bekämpfung intrazellulärer Erreger [72].

Im Knochenmark entwickeln sich reife, naive B-Zellen, die auf ihrer Oberfläche membranständige Antikörper tragen und Antigene unabhängig von einer MHC-vermittelten Präsentation erkennen können. Nach Bindung des spezifischen Antigens wird dieses über MHC-Klasse-II den $CD4^+$-Zellen präsentiert. Nach Aktivierung proliferieren B-Zellen und differenzieren zu Plasmazellen, die hochaffine Antikörper produzieren. Zusätzlich entstehen Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine deutlich schnellere und effektivere Immunantwort ermöglichen. Insgesamt erlaubt das adaptive Immunsystem eine hochspezifische und passgenaue Immunantwort, die jedoch verzögert einsetzt und erst nach Tagen bis Wochen ihre volle Effektivität erreicht [72].

1.1.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten entstammen, ebenso wie eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie Mastzellen, der myeloischen Zelllinie und gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie reifen im Knochenmark und gelangen anschließend in den Blutkreislauf. Sie stellen mit 55–75% den größten Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten [73].

Granulozyten stellen die erste Verteidigungslinie der zellulären Infektabwehr dar. Sie zirkulieren für etwa 6-12 Stunden im Blut und überleben auch im Gewebe nur wenige Tage. Chemotaktische Signale von Pathogenen, wie Komplementfragmente oder von gewebsansässigen Makrophagen freigesetzte Chemokine, vermitteln die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blut in das Gewebe. Dort besteht ihre Hauptaufgabe

in der Beseitigung apoptotischer Zellen sowie in der Elimination pathogener Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Pilze. Die Erkennung und Entfernung dieser Zielstrukturen erfolgt überwiegend durch Phagozytose, einen Prozess, bei dem Partikel von der Plasmamembran umschlossen und in das Zellinnere aufgenommen werden. Hierfür verfügen sie über verschiedene Rezeptoren, die eine Unterscheidung zwischen intakten und zu beseitigenden Zellen ermöglichen. Diese Rezeptoren binden an spezifische Moleküle auf Pathogenen oder apoptotischen Zellen und lösen die Phagozytose aus [100].

Wichtige Rezeptoren neutrophiler Granulozyten sind unter anderem Toll-like-Rezeptoren, die konservierte molekulare Strukturen von Pathogenen (PAMPs) erkennen können, sowie weitere Mustererkennungsrezeptoren wie beispielsweise Mannoserezeptoren. Darüber hinaus exprimieren neutrophile Granulozyten Fc-Rezeptoren, die an opsonisierende Antikörper binden, sowie Komplementrezeptoren, die C3b- und C4b-gebundene Partikel erkennen und deren Phagozytose fördern. Davon abzugrenzen sind Scavenger-Rezeptoren, die apoptotische Zellen über die Erkennung von Phosphatidylserin auf deren Oberfläche identifizieren und deren Aufnahme vermitteln, ohne dabei eine ausgeprägte entzündliche Reaktion auszulösen. Nach der Bindung an einen Zielpartikel wird das Zytoskelett des Granulozyten rasch umstrukturiert, sodass Pseudopodien die aufzunehmende Struktur umschließen. Binnen Sekunden wird das Pathogen eingehüllt und in das Zellinnere transportiert, wo es mit toxinhaltigen Granula fusioniert und das Pathogen abgetötet wird [100, 116].

Diese Granula enthalten verschiedene Enzyme zur Abtötung und Verdauung von Mikroorganismen, darunter Myeloperoxidase (MPO), den Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat-Wasserstoff (NADPH)-Oxidase-Komplex, sowie Proteasen wie Gelatinase. Zusätzlich fusionieren die Phagosomen mit Lysosomen, welche vor allem Hydrolasen enthalten, die ebenfalls antimikrobiell wirken. Einen zentralen Mechanismus zur Abtötung der Mikroorganismen stellt der sogenannte oxidative Burst dar, bei dem große Mengen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt werden. Diese werden in weiteren Reaktionsschritten zu zusätzlichen toxischen Verbindungen wie Wasserstoffperoxid und Hypochlorit umgesetzt, die ausgeprägt mikrobizid wirken und somit entscheidend zur Pathogenelimination beitragen [57, 116].

1.2 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Neutrophile Granulozyten entfalten ihre antimikrobielle Wirkung nicht nur durch Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von Erregern, sondern können zusätzlich netzartige Strukturen aus DNA und antimikrobiellen Proteinen in den extrazellulären Raum freisetzen. Diese sogenannten Neutrophil Extracellular Traps (NETs) dienen dazu, Krankheitserreger zu binden, zu immobilisieren und deren Eliminierung zu fördern [22].

1.2.1 Formen der NETose

Die Freisetzung von NETs geht zumeist mit einem speziellen Zelltodprozess, der lytischen NETose einher, welcher sich grundlegend von anderen Zelltodtypen wie Apoptose und Nekrose unterscheidet (siehe Abbildung 2) [49]. Dabei reorganisieren die Neutrophilen ihr Zytoskelett, verlieren ihre Polarität und werden aktiviert. Die Kernhülle zerfällt, worauf das Chromatin in das Zytoplasma der noch intakten Zelle übertritt und hier dekondensiert. Es kommt zu Kontakt mit Bestandteilen des Zytoplasmas und der Granula, die für die Funktion und Struktur der NETs wichtig sind. In einem nächsten Schritt wird die Plasmamembran durchlässig, sodass die NETs nach 3-8 Stunden nach Aktivierung in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Durch die Zerstörung der Plasmamembran kommt es zum Zelltod der Neutrophilen [104].

Hiervon kann die nicht-lytische NETose unterschieden werden, bei der Chromatin und Granulainhalte bereits kurz nach Kontakt, insbesondere mit Staphylococcus aureus, aus der vitalen Zelle ausgeschleust werden. Bei diesem Prozess bleibt die Plasmamembran intakt und es entstehen innerhalb von wenigen Minuten NETs und kernlose Zytoplasmen, die weiterhin zur Phagozytose in der Lage sind [104, 111].

Es gibt nicht nur einen Signalweg der zur NET-Ausschüttung führt, sondern mehrere unterschiedliche Wege, die vom jeweiligen Stimulus abhängen. Gemeint ist ein intrazellulärer Signalweg, der nach Aktivierung durch einen äußeren Trigger zur Freisetzung der NETs führt [16].

Morphologisch bestehen die NETs aus glatten Filamenten mit einem Durchmesser von ungefähr 17 nm, die aus gestapelten Nukleosomen bestehen, an die Granulaproteine angelagert sind [22, 143]. Die NETs haben ein wolkenförmiges Erscheinungsbild und können ein Volumen einnehmen, das 10-15 mal größer ist, als die Ursprungszelle [21].

1.2.2 Auslöser der NETose

Eine große Bandbreite verschiedener physiologischer Stimuli kann zur Ausbildung von NETs führen. Beschrieben sind sowohl mikrobielle Auslöser wie Bakterien [22], Pilzhyphen, Viren, Parasiten, aber auch der Kontakt mit ROS, Antikörper, Immunkomplexe und Kontakt mit aktivierten Thrombozyten [21].

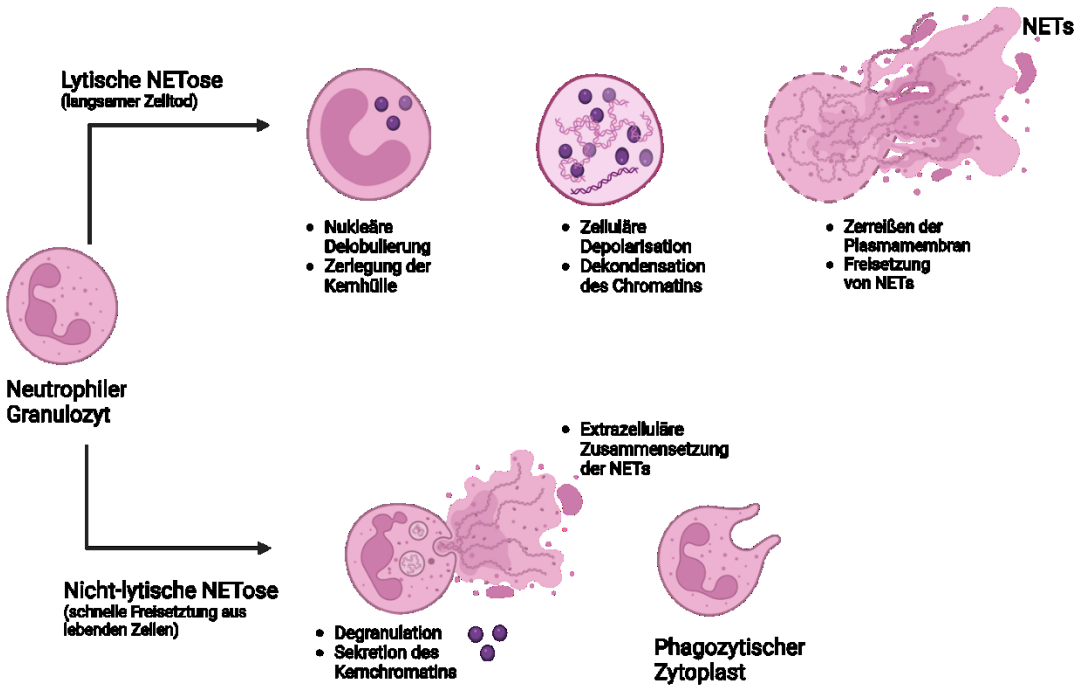


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zwei Hauptformen der NET-Bildung. Der obere Pfad zeigt die lytische NETose, die mit dem Verlust der Zellintegrität und dem Zelltod einhergeht und über Chromatindekondensation, Auflösung der Kernhülle und Ruptur der Zellmembran zur Freisetzung von NETs führt. Der untere Pfad stellt die nicht-lytische NETose dar, bei der NETs unabhängig vom Zelltod durch sekretorische Abgabe von Chromatin und Granulaproteinen freigesetzt werden und ein kernloser, weiterhin phagozytosefähiger Zytoplast verbleibt. Erstellt mit BioRender.com. *Abkürzungen: NETs: Neutrophil Extracellular Traps.* Adaptiert nach [104].

1.2.3 Physiologische Funktion der NETs

Die primäre physiologische Funktion von NETs besteht in der Abwehr unterschiedlicher Pathogene. Durch ihre netzartige, extrazelluläre Struktur können Mikroorganismen immobilisiert und lokal konzentriert werden, was deren weitere Ausbreitung verhindert [98].

NETs enthalten eine Vielzahl antimikrobieller Komponenten, darunter Proteasen, antimikrobielle Peptide und Histone, die zur direkten Schädigung oder Abtötung gebundener Erreger beitragen können [22]. Insbesondere gegenüber Pathogenen, die aufgrund ihrer Größe oder Morphologie einer intrazellulären Elimination entzogen sind, wie etwa Pilzhyphen, kommt NETs eine besondere Bedeutung zu [19].

Neben diesen direkten antimikrobiellen Effekten tragen NETs auch zur Regulation der Immunantwort bei. NET-assoziierte Proteasen können die Aktivität von Zytokinen und Chemokinen modulieren und so entzündliche Prozesse beeinflussen [16, 38].

1.2.4 NET-vermittelte Pathologien

Neben ihrer protektiven Funktion sind NETs auch an der Entstehung und Progression verschiedener pathologischer Prozesse beteiligt. Eine überschießende oder fehlregulierte NET-Bildung kann dabei selbst zum Treiber von Gewebeschädigung, Entzündungsverstärkung und thrombotischen Komplikationen werden [44, 104].

1.2.4.1 Die Rolle der NETs bei Sepsis

Im Rahmen einer Sepsis kommt es im Zuge der NET-Freisetzung neben protektiven Effekten zu Mechanismen, die zur Verstärkung der septischen Organschädigung führen können [74]. Ein zentraler Pathomechanismus ist die Schädigung des Endothels durch die zytotoxische Wirkung NET-assoziierter Histone [123]. Weitere NET-Komponenten wie Defensine erhöhen die endotheliale Permeabilität, während die neutrophile Elastase durch die Degradation extrazellulärer Matrixstrukturen Zell-Zell-Verbindungen destabilisiert [104].

NETs bündeln dabei verschiedene neutrophile Pathogenitätsfaktoren, einschließlich reaktiver Sauerstoffspezies und proteolytischer Granulaproteine, und können über diese konzentrierte extrazelluläre Präsentation wesentlich zur Gewebe- und Organschädigung im Rahmen der Sepsis beitragen [59].

1.2.4.2 NETs und Hämostase

Es gibt mehrere NET-vermittelte Mechanismen, die Thrombosen begünstigen, umgekehrt können thrombotische Prozesse auch die NET-Bildung fördern [104].

Im Rahmen von Thrombosen kommt es hypoxiebedingt zur vermehrten Freisetzung des von-Willebrand-Faktors (vWF) sowie von P-Selektin, was zur Rekrutierung von Neutrophilen führt und einen Auslöser der NETose darstellt [46].

Die intravasale Bildung von NETs entfaltet ausgeprägte prokoagulatorische und prothrombotische Effekte, da NETs als strukturelles Gerüst für die Anlagerung von Thrombozyten und Erythrozyten dienen. Dadurch werden die Thrombozytenaggregation sowie die Fibrinablagerung gefördert [50]. Darüber hinaus können NETs den prokoagulatorischen Faktor XIIa rekrutieren und somit den intrinsischen Gerinnungsweg initiieren. Im Rahmen der lytischen NETose wird zusätzlich Tissue Factor (TF) freigesetzt, der als zentraler physiologischer Initiator der Gerinnungskaskade gilt [59, 104].

1.2.4.3 NETs in der Tumorbiologie

Zwischen NETs und Tumorerkrankungen bestehen vielfältige Wechselwirkungen. Beispielsweise führt eine erhöhte Expression von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) in vielen Tumoren zu einer gesteigerten systemischen NETose [41] und begünstigt so NET-assoziierte Komplikationen wie Thrombosen [104].

Ferner können NETs als proinflammatorisches Signal eine vermehrte Tumorzellproliferation begünstigen [59]. Zusätzlich können NETs in tumorfreiem Gewebe eine metastatische Nische bilden, da sie sich in der Mikrozirkulation von Organen ablagern und hier eine Anhaftung von zirkulierenden Tumorzellen erleichtern [39, 59]. Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass NETs Tumorzellen abschirmen und sie vor der zytotoxischen Wirkung durch $CD8^+$ T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) schützen, indem sie den direkten Kontakt verhindern [140].

1.2.4.4 NETs und chirurgisches Trauma

Große chirurgische Eingriffe gehen infolge von Gewebetrauma mit einer ausgeprägten sterilen Entzündungsreaktion einher, die eine frühe Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Freisetzung von NETs als spezifische Aktivierungsform der angeborenen Immunantwort umfasst [93, 104, 119].

Eine überschießende oder fehlregulierte NET-Bildung wird auch bei steriler Inflammation als potenzieller Verstärker entzündlicher und hämostatischer Prozesse diskutiert und ist somit nicht auf infektiöse Situationen beschränkt [44, 65].

1.2.5 Nachweis und Quantifizierung von NETs

Die Entdeckung der NETs durch Brinkmann et al. im Jahre 2004 führte zur Entwicklung verschiedener Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung. Zunächst wurden mittels Elektronenmikroskopie morphologische Details wie die Auflösung der Kernmembran oder die Visualisierung der netzartigen Struktur dargestellt [22, 49].

In der Folge wurde zunehmend die Fluoreszenzmikroskopie als weitere Methode etabliert, welche mittels fluoreszierender Antikörper gegen Histone, MPO oder citrullinierte Proteine eine direkte und gezielte Visualisierung ermöglichte [67]. Trotz hoher Spezifität ist die Methode jedoch subjektiv und untersucherabhängig [26].

Zur quantitativen Erfassung von NETs wurden darüber hinaus indirekte Verfahren entwickelt, insbesondere Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-basierte Ansätze zum Nachweis von MPO-Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Komplexen. Diese erfassen jedoch ausschließlich lösliche NET-assoziierte Komponenten, erlauben keine direkte Bestimmung der Anzahl NET-bildender Zellen und können zudem durch apoptotische oder nekrotische Prozesse beeinflusst werden [29].

Eine Weiterentwicklung stellte die Einführung der Durchflusszytometrie dar, welche eine objektive, schnelle und reproduzierbare Quantifizierung von NET-bildenden Zellen ermöglichte [53]. Spätere Verbesserungen, wie die Verwendung von unfixiertem Vollblut, erhöhten die praktische Anwendbarkeit der Methode im klinischen Alltag zusätzlich [79].

1.3 Gerinnungssystem

1.3.1 Primäre (zelluläre) Hämostase

Die primäre Hämostase oder auch zelluläre Hämostase, dient der schnellen Blutstillung durch Ausbildung eines Thrombozytenpfropfs. Sie unterteilt sich in die drei Phasen Adhäsion, Aktivierung und Aggregation. Bei der Adhäsion haften die Thrombozyten an geschädigtem Endothel. Dies wird durch das Freilegen von subendothelialen Bindegewebsproteinen, an die sich der Glykoprotein Ib- Rezeptor und der von-Willebrand-Faktor binden können, vermittelt. Anschließend kommt es in der Aktivierungsphase zu einer Freisetzung von Mediatoren wie Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A_2 und plättchenaktivierendem Faktor (PAF). Dies führt zur Ausbildung von Pseudopodien und zur Exposition prokoagulatorischer Phospholipide auf der Thrombozytenoberfläche, wodurch der Gerinnungsprozess weiter gefördert wird. In einem letzten Schritt folgt die Aggregation, vermittelt über den Glykoprotein IIb/IIIa–Rezeptor, welcher Fibrinogen bindet, sodass es zur Anlagerung weiterer Thrombozyten und somit Bildung eines Thrombozytenpfropfes („weißer Thrombus“) kommt [51].

1.3.2 Sekundäre (plasmatische) Hämostase

Die sekundäre Hämostase führt zur Ausbildung eines stabilen Fibrinnetzes, das den in der primären Hämostase gebildeten Thrombozytenpfropf dauerhaft absichert. Dabei wird die sogenannte Gerinnungskaskade in Gang gesetzt, die sich in zwei Aktivierungswege unterteilen lässt: den extrinsischen und den intrinsischen Weg (siehe Abbildung 3). Der extrinsische Weg wird durch die Freisetzung des TF bei Endothelverletzungen gestartet, was zur Aktivierung von Faktor VII (Proconvertin) führt. Zur Initiierung des intrinsischen Wegs kommt es durch den Kontakt von Faktor XII (Hageman-Faktor) mit negativ geladenen Oberflächen, wie freiliegendem Kollagen. Beide Wege führen zu einer Aktivierung des Faktors X (Stuart-Power-Faktor) und leiten somit die gemeinsame Endstrecke ein. Im weiteren Verlauf wird Prothrombin (Faktor II) in Thrombin umgewandelt, das die Konversion von Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin katalysiert. Das Fibrin bildet ein Netz, welches den Thrombus längerfristig stabilisiert und somit die Stabilität des Gerinnsels gewährleistet [64].

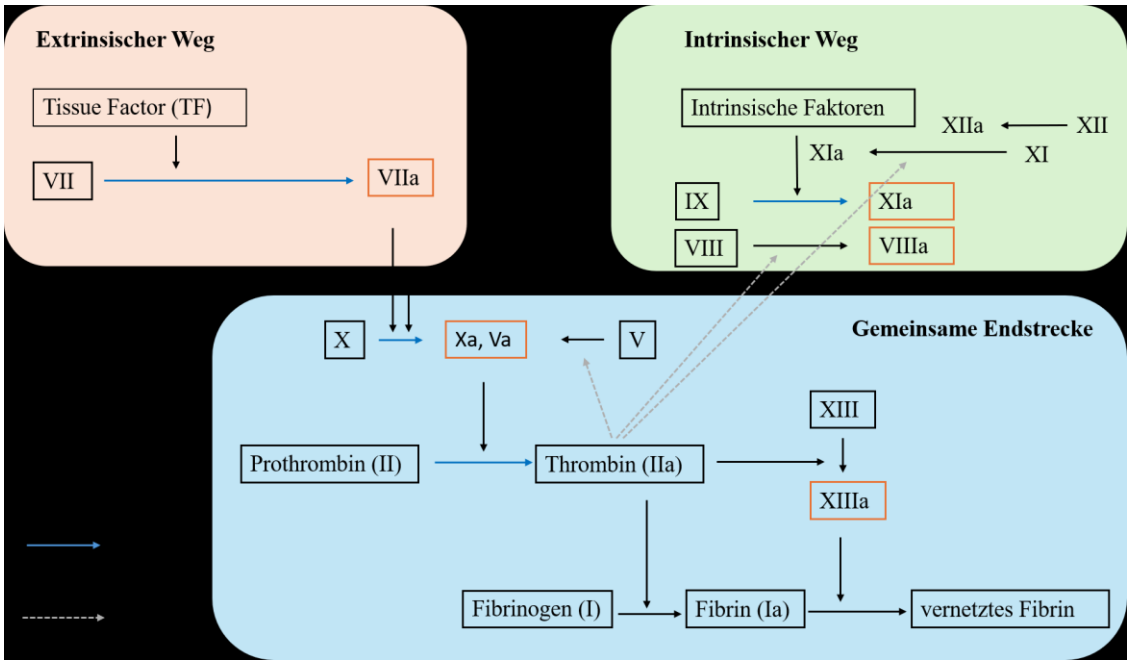


Abbildung 3: Überblick über die Gerinnungskaskade. Dargestellt sind der extrinsische (orange) und der intrinsische (grün) Aktivierungsweg der Gerinnungskaskade sowie die gemeinsame Endstrecke (blau). Der extrinsische Weg wird durch den Tissue Factor initiiert, der intrinsische Weg durch Kontaktaktivierung. Beide Wege münden in die Aktivierung von Faktor X. In der gemeinsamen Endstrecke führt die Thrombinbildung zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und zur Stabilisierung des Fibrinnetzes durch Faktor XIIIa. Modifiziert nach [62].

1.3.3 Fibrinolyse und Gerinnungsregulation

Nach Abschluss der Gerinnselbildung setzt die Fibrinolyse als regulierter Abbauprozess des Fibringerinnsels ein, der der Wiederherstellung der Gefäßdurchgängigkeit dient. Zentraler Mediator der Fibrinolyse ist Plasmin, das aus seinem inaktiven Vorläufer Plasminogen durch Aktivatoren wie den Gewebesplasminogenaktivator (t-PA) oder Urokinase gebildet wird. Plasmin spaltet das Fibrin des Gerinnsels und inaktiviert darüber hinaus verschiedene Faktoren der Gerinnungskaskade. Somit wird nicht nur der Abbau des Gerinnsels gefördert, sondern auch die weitere Gerinnung gehemmt. Insgesamt stellt die Regulation von Hämostase und Fibrinolyse ein hochkomplexes, dynamisches System dar, das physiologisch sowohl eine effektive Blutstillung als auch die Wiederherstellung der Gefäßdurchgängigkeit gewährleistet. Das Zusammenspiel aktivierender und hemmender Mechanismen ist dabei entscheidend, um sowohl überschießende Blutungen als auch thrombotische Ereignisse zu verhindern [64].

1.3.4 Immunothrombose

Das Konzept der Immunothrombose beschreibt das koordinierte Zusammenspiel immunologischer und hämostaseologischer Mechanismen zur lokalen Eindämmung von Infektionen. Im Gegensatz zum klassischen Verständnis der Thrombose als primär pathologische Fehlregulation der Hämostase erweitert die Immunothrombose dieses Bild um eine physiologische Schutzfunktion. Durch die gezielte Bildung von Gerinnseln insbesondere in der Mikrozirkulation können Krankheitserreger lokal immobilisiert und ihre systemische Ausbreitung begrenzt werden, zugleich wird die Zirkulation geschädigter oder infizierter Wirtszellen eingeschränkt [44].

Die Immunothrombose kann auf unterschiedliche Art ausgelöst werden. Neben direkter Aktivierung durch bakterielle Strukturen, spielen auch negativ geladene Oberflächen eine Rolle, über die das intrinsische Gerinnungssystem aktiviert wird. Zusätzlich führt die Aktivierung von Endothelzellen zur Freisetzung von TF und damit zur Initiierung des extrinsischen Gerinnungswegs.

Eine zentrale Rolle innerhalb dieses Konzepts kommt den NETs zu, die unter anderem durch die Bereitstellung eines prokoagulatorischen Gerüstes und der Präsentation gerinnungsaktiver Moleküle diesen Prozess verstärken [96]. NETs fungieren hierbei als strukturgebendes Bindeglied zwischen der angeborenen Immunantwort und der Aktivierung von Thrombozyten sowie der plasmatischen Gerinnung und sind damit an der Auslösung und Aufrechterhaltung immunothrombotischer Prozesse beteiligt [40, 44].

Im Rahmen einer Sepsis kann es zu einer unkontrollierten überschießenden Aktivierung der Immunothrombose kommen [44]. Insbesondere durch das Zusammenspiel zwischen NETs, Thrombozyten und Thrombin kann die resultierende Mikrozirkulationsstörung daher eine Multiorganschädigung begünstigen [32, 96]. Somit kann die Immunothrombose nicht nur physiologisch einen Teil zur Immunantwort beitragen, sondern bei dysregulierter Aktivierung auch schwere pathologische Folgen haben.

1.3.5 Wechselwirkung zwischen Hämostase und Sepsis

Zwischen Hämostase und Inflammation besteht eine enge bidirektionale Wechselwirkung. Schwere systemische Infektionen können dieses physiologische Zusammenspiel erheblich beeinträchtigen und über multiple inflammatorische und

endotheliale Mechanismen eine Dysregulation der Gerinnung auslösen, die bei einem Großteil der Betroffenen klinisch relevante Gerinnungsstörungen nach sich zieht [83].

Proinflammatorische Zytokine bewirken eine Induktion des TF auf Monozyten und Endothelzellen und initiieren dadurch eine Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade und somit eine Thrombinbildung. Thrombin führt nicht nur zur Fibrinbildung und fördert die Gerinnselbildung, sondern verstärkt als proinflammatorischer Mediator ebenfalls die Entzündungsreaktion [83]. Durch die gegenseitige Verstärkung kann ein Teufelskreis entstehen.

Im Rahmen der Sepsis ist das Gleichgewicht zwischen Gerinnungsförderung und Gerinnungshemmung gestört. Wichtige antikoagulatorische Mechanismen und Mediatoren wie Antithrombin, das Protein-C-System sowie der Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (TFPI) sind herabreguliert, während simultan die Fibrinolyse über einen Anstieg des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) gehemmt wird [82]. Beide Mechanismen tragen letztlich zu einer prokoagulatorischen Situation bei und begünstigen die potenziell lebensbedrohliche Entstehung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC).

Im Rahmen der DIC kommt es durch eine massive Dysregulation der Hämostase zur ubiqitären Bildung mikrovaskulärer Thromben, was direkt zu Endorganschäden führen kann. Gleichzeitig führt der übermäßige Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten zu einem Mangel dieser und somit zu einer erhöhten Blutungsneigung [52]. Die fehlregulierte Hämostase ist damit ein wesentlicher Faktor der komplexen Pathophysiologie der Sepsis, die sowohl thrombotische als auch hämorrhagische Komplikationen fördert.

1.4 Charakterisierung von systemischen Inflammationszuständen in der operativen Intensivmedizin

1.4.1 Sepsis

Seit 2016 gibt es eine erneuerte Definition für Sepsis, erstellt von der Sepsis-3-Taskforce, einer Arbeitsgruppe der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM). Sepsis ist hier definiert als akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine dysregulierte körpereigene Reaktion auf eine Infektion [132].

Angezeigt wird diese Organdysfunktion durch einen Anstieg des Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Scores von ≥ 2 Punkten. Der Score kann Werte zwischen 0 und 24 annehmen, wobei sechs verschiedene Organsysteme berücksichtigt werden. Je Organsystem werden bis zu vier Punkte für die Dysfunktion vergeben. Ein Anstieg um ≥ 2 Punkte geht bei stationär behandelten Patienten mit Infektion außerhalb von Intensivstationen (ITS) mit einem Letalitätsrisiko von über 10 % einher [132, 148]. Der SOFA-Score ist jedoch recht aufwendig zu bestimmen und wird daher für die Anwendung außerhalb der ITS als ungeeignet beschrieben [25].

Zur raschen Identifikation von Patientinnen und Patienten mit erhöhtem Risiko für einen schweren Verlauf bei Verdacht auf eine Infektion wurde der quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA)-Score eingeführt. Er basiert auf drei klinisch einfach zu erhebenden Parametern: einer Atemfrequenz von ≥ 22 / min, einem veränderten mentalen Status (Glasgow Coma Scale [GCS] < 15) sowie einem systolischen Blutdruck ≤ 100 mmHg [132].

Der qSOFA-Score weist eine vergleichsweise hohe Spezifität für das Vorliegen einer Sepsis auf, wird aber aufgrund seiner begrenzten Sensitivität nicht als alleiniger Screeningtest empfohlen [25, 47]. Die aktuelle S3-Leitlinie empfiehlt stattdessen die regelmäßige Anwendung eines geeigneten Screeninginstruments außerhalb der Intensivstation, um eine Sepsis frühzeitig zu erkennen. Als mögliches Vorgehen wird die kombinierte Nutzung mehrerer Scores mit komplementären Eigenschaften, wie etwa des spezifischeren qSOFA mit den sensitiveren SIRS-Kriterien, vorgeschlagen [25].

1.4.2 Historische Sepsisdefinitionen und das SIRS-Konzept

In den früheren Sepsisdefinitionen, der Sepsis-1-Definition von 1992 und der Sepsis-2-Definition von 2001, wurde zwischen dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) und Sepsis unterschieden [17, 84]. Sepsis wurde dabei als systemische Entzündungsreaktion auf eine Infektion definiert, während das SIRS vergleichbare systemische Inflammationsreaktionen beschreibt, die auch ohne infektiösen Auslöser auftreten können.

Das SIRS wurde anhand klinischer und laborchemischer Kriterien definiert. Es lag vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt waren: Körpertemperatur ≥ 38°C

oder ≤ 36°C, Herzfrequenz ≥ 90 / min, Atemfrequenz ≥ 20 / min oder Hyperventilation mit einem arteriellen Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) ≤ 32 mmHg in der Blutgasanalyse (BGA) sowie eine Leukozytose > 12.000 / µl, eine Leukopenie < 4000 / µl oder ein Anteil unreifer neutrophiler Granulozyten > 10 %.

Die Diagnose einer Sepsis wurde nach den Sepsis-1- und Sepsis-2-Definitionen gestellt, wenn mindestens zwei der SIRS-Kriterien erfüllt waren und diese systemische Reaktion auf eine Infektion zurückgeführt werden konnte [17, 84].

Mit der Einführung der Sepsis-3-Definition wurde das SIRS nicht mehr als Definitionskriterium der Sepsis berücksichtigt [132]. Hauptgrund hierfür war die geringe Spezifität der SIRS-Kriterien, die häufig auch bei nichtinfektiösen Zuständen erfüllt sind und somit keine ausreichende Trennschärfe zwischen infektiöser und steriler Inflammation erlauben [24, 132]. Die Sepsis-3-Taskforce betonte jedoch ausdrücklich, dass SIRS-Kriterien weiterhin einen hohen Stellenwert für die Erkennung systemischer Entzündungsreaktionen und möglicher Infektionen besitzen, insbesondere aufgrund ihrer hohen Sensitivität [132].

Die Aufgabe des SIRS als Bestandteil der Sepsisdefinition wird bis heute kontrovers diskutiert. Kritisch angemerkt wird insbesondere, dass eine stärkere Fokussierung auf Organdysfunktion und Mortalitätsprädiktion durch SOFA-basierte Scores mit dem Risiko einer verzögerten Sepsisdiagnose einhergehen kann [37, 43, 131]. Vor allem im intensivmedizinischen und perioperativen Kontext besteht eine erhebliche Überlappung zwischen infektiöser Sepsis und nichtinfektiöser systemischer Inflammation [106, 132]. Daher hat das SIRS auch weiterhin einen hohen Stellenwert und seine Berechtigung. Im aktuellen Update der S3-Leitlinie Sepsis werden daher explizit wieder die SIRS-Kriterien als ein mögliches Screening-Tool mit hoher Sensitivität für die Sepsis erwähnt [25].

1.4.3 Abgrenzung von Sepsis und steriler systemischer Inflammation

Die Diagnosestellung einer Sepsis stellt die Behandler insbesondere bei kritisch kranken Patienten vor eine große Herausforderung [147]. Im Jahr 2017 wurden weltweit etwa 11,0 Millionen sepsisassoziierte Todesfälle geschätzt, was 19,7 % aller weltweiten Todesfälle entspricht, wobei die Mortalität erheblich zwischen verschiedenen Ländern variiert [121]. In Deutschland liegt die 30-Tage-Sterblichkeit hospitalisierter Sepsispatienten bei etwa

26,5 % [12]. Daher ist eine möglichst frühe Diagnose entscheidend, um umgehend eine Behandlung einzuleiten [114], denn mit jeder Stunde Verzögerung der Behandlung steigt die Mortalität stark an [128]. Zudem existiert kein universell akzeptierter Goldstandard, eine Sepsis zu diagnostizieren, insbesondere die Unterscheidung von einer infektiösen und einer nichtinfektiösen Ursache einer klinischen Verschlechterung ist anspruchsvoll [76].

1.4.4 Diagnostik Sepsis

Die Diagnose Sepsis beruht auf einer akut lebensbedrohlichen Organdysfunktion, die auf eine dysregulierte körpereigene Reaktion, hervorgerufen durch eine Infektion, zurückgeht [132]. Insbesondere der Nachweis dieser Infektion kann schwierig sein und fußt auf verschiedenen Aspekten. Klinische Parameter wie zum Beispiel eine Hyper- oder Hypothermie, Blutwerte und Biomarker, ein klinischer Fokus wie beispielsweise trüber Urin, aber auch der kulturelle Nachweis des Erregers spielen eine wichtige Rolle. Diese Veränderungen sind allerdings nicht immer vorhanden und auch gerade bei kritisch kranken Patienten nicht immer auf eine Infektion zurückzuführen [77, 147]. Bei Patienten mit Sepsis sind in bis zu ca. 40% der Blutkulturen keine Erreger nachweisbar [110], die Sensitivität nimmt insbesondere deutlich ab, wenn bereits eine antimikrobielle Therapie eingeleitet wurde [35].

Insbesondere bei kritisch-kranken chirurgischen Patienten auf ITS ist es daher sehr schwer zu differenzieren, ob eine systemische Inflammationsreaktion durch eine Infektion oder sterile Inflammation nach einer Operation oder einem anderen Trauma begründet ist. Auch gängige Scores wie SIRS-Kriterien, der SOFA- und qSOFA-Score, sind teilweise nur bedingt geeignet, diese Unterscheidung zu treffen, da diese Kriterien bei der Mehrzahl dieser Patienten erhöht sind [69, 71].

1.4.5 Biomarker der Sepsis

Biomarker können zur Diagnosefindung und Identifizierung eines pathologischen Zustands genutzt werden, die Schwere einer Erkrankung anzeigen und diese klassifizieren, als Prognosemarker dienen oder zur Überwachung und Vorhersage von Interventionen nützlich sein [15].

Zu den am besten untersuchten Biomarkern zur Identifikation der Sepsis gehören C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT). Das CRP gehört zu den Akut-Phase-Proteinen und wird hauptsächlich hepatisch gebildet. Es wird bei Gewebeverletzungen, Infektionen und Inflammation ausgeschüttet und ist als löslicher Mustererkennungsrezeptor in der Lage Strukturen wie Lipopolysaccharide, Phosphorylcholin und Lysophosphatidylcholin zu binden [102]. Die Synthese wird hauptsächlich durch Interleukin (IL)-6, IL-1β und Tumornekrosefaktor (TNF)-α angeregt, wobei ein Anstieg erst nach 4 bis 6 Stunden zu beobachten ist, mit dem Höchstwert nach 36 bis 48 Stunden [45, 113]. Es ist ein guter Indikator für Inflammation, mit einer guten Sensitivität, aber zeigt nicht nur im Rahmen einer Infektion erhöhte Werte, sondern auch postoperativ, bei autoimmun- und rheumatisch erkrankten Patienten [113, 124].

PCT wird unter normalen Umständen in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse produziert und im Golgi-Apparat gespeichert. Im Falle einer systemischen Infektion wird CALC-1, das Gen, auf dem das PCT codiert ist, in allen Zellen des Organismus hochreguliert und folglich auch vermehrt in den Blutfluss abgegeben [5]. Die Synthese wird ebenfalls durch die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1β und TNF-α, aber auch direkt durch Lipopolysaccharide, angeregt. Das vor allem bei viralen Infektionen ausgeschüttete Interferon-γ reduziert jedoch die PCT-Produktion [45]. Zwei Stunden nach der Stimulation lässt sich ein PCT-Anstieg beobachten, der Höhepunkt ist nach etwa 12 bis 24 Stunden erreicht, die Halbwertszeit beträgt etwa 24 Stunden [113]. Die Infektion kann zwar somit früher angezeigt werden, als beim CRP und die Spezifität ist etwas besser, dennoch kann eine sichere Unterscheidung zwischen Infektion und nicht-infektiöser Inflammation nicht getroffen werden [5, 76, 139].

Es gibt noch einige weitere Biomarker die klinisch eingesetzt und viele weitere, die aktuell noch erforscht werden. Bislang hat sich jedoch kein Marker im klinischen Alltag zusätzlich zu den etablierten Parametern durchgesetzt, der eine bessere Diskriminierung zwischen Sepsis und anderen systemischen Inflammationsreaktionen ermöglicht, weshalb hier auch weiterhin ein großer Forschungsbedarf besteht [76, 102, 147].

1.5 Große abdominelle chirurgische Eingriffe

Große abdominelle chirurgische Eingriffe bilden die Basis für die Behandlung schwerwiegender Erkrankungen der inneren Organe, wie maligner Tumoren, entzündlicher Darmerkrankungen oder schwerer Notfälle. Diese Eingriffe sind größtenteils unerlässlich für die Therapie der Patienten, gehen aber auch mit speziellen Risiken einher und können mit schwerwiegenden Komplikationen einhergehen [42].

1.5.1 Präoperative Risikofaktoren

Patientinnen und Patienten, die sich großen abdominalchirurgischen Eingriffen unterziehen, weisen häufig eine komplexe präoperative Morbidität auf, darunter fortgeschrittene maligne Erkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko für postoperative Komplikationen assoziiert sind [8]. Darüber hinaus kann die Immunkompetenz dieser Patientengruppe eingeschränkt sein, etwa infolge onkologischer Therapien wie Chemotherapie. Auch die Tumorerkrankung selbst kann unabhängig von therapeutischen Maßnahmen zu einer systemischen Immunsuppression führen, die durch tumorassoziierte immunmodulatorische Mechanismen vermittelt wird [145].

1.5.2 Typische postoperative Komplikationen

Nach großen viszeralchirurgischen Eingriffen besteht ein hohes Risiko für lokale und systemische postoperative Komplikationen. In einer prospektiven Kohortenstudie mit 861 Patientinnen und Patienten, die zwischen 2009 und 2014 am VU University Medical Center in Amsterdam durchgeführt wurde, traten bei 42,4 % postoperative Komplikationen auf, von denen 24,5 % als schwerwiegend (Clavien-Dindo Grad III und höher [42]) klassifiziert wurden [137]. Zu den relevanten postoperativen Komplikationen zählen unter anderem Anastomoseninsuffizienzen, intraabdominelle Abszesse, Wundinfektionen und Pneumonien sowie systemische Komplikationen wie SIRS oder postoperative Sepsis.

Die 30-Tage Mortalitätsrate betrug in der oben genannten Studie 1 - 2,5 %, war bei Patienten mit schwerwiegenden Komplikationen, insbesondere bei Anastomoseninsuffizienz mit konsekutiver Sepsis aber signifikant erhöht [137]. Diese Zahlen sind exemplarisch und können in Abhängigkeit vom Patientenkollektiv, der

Operationsmethode und weiteren Risikofaktoren variieren. Sie verdeutlichen jedoch die erhebliche klinische und prognostische Bedeutung postoperativer Komplikationen nach großen viszeralchirurgischen Eingriffen.

1.5.3 Pathophysiologie der postoperativen systemischen Inflammation

Jeder chirurgische Eingriff geht mit einer Gewebeschädigung einher, die eine lokale Entzündungsreaktion und Aktivierung des Immunsystems auslöst. Insbesondere nach großen operativen Eingriffen kann diese lokale Antwort in eine systemische Inflammationsreaktion übergehen. Dies kann sowohl infektiös bedingt sein, also im Rahmen der Auseinandersetzung des Organismus mit einem oder mehreren Erregern auftreten, als auch durch nichtinfektiöse Reize ausgelöst werden, die unmittelbar mit dem chirurgischen Trauma und der perioperativen Belastung assoziiert sind [4, 34, 120].

Im Folgenden werden die pathophysiologischen Mechanismen der sterilen postoperativen Inflammation näher betrachtet. Auf zellulärer Ebene führt der operative Stress zur Initiierung einer frühen immunologischen Aktivierungsreaktion, die durch die Freisetzung endogener Signalmoleküle, sogenannter damage-associated molecular patterns (DAMPs), vermittelt wird [34, 120]. Ziel dieser Reaktion ist die Einleitung von Reparaturprozessen, die über eine initiale inflammatorische Phase und ein nachgeschaltetes regeneratives Programm gesteuert werden [157].

DAMPs weisen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu PAMPs auf, die von exogenen Erregern stammen. DAMPs und PAMPs können über teilweise überlappende PRRs erkannt werden [120]. Bekannte PRRs sind unter anderem Toll-like-Rezeptoren (TLR) sowie zytoplasmatische „nucleotide-binding-oligomerization-domain“ (NOD)-artige Rezeptoren [2].

Sowohl endogene DAMPs wie High Mobility Group Box 1 (HMGB1) als auch exogene PAMPs wie Lipopolysaccharide (LPS) können beispielsweise beide über TLR4 neutrophile Granulozyten aktivieren und über nachgeschaltete, unter anderem ROS-abhängige Signalwege zur Freisetzung von NETs führen [31, 104].

Große abdominalchirurgische Eingriffe gehen dabei mit perioperativen Stimuli einher, die als Trigger der NETose beschrieben sind, darunter insbesondere Ischämie-Reperfusionsprozesse sowie endotheliale Schädigungen [54, 56, 153].

NETs nehmen in diesem Kontext eine zentrale Rolle in sterilen Inflammationsprozessen ein, da sie sowohl inflammatorische als auch hämostatische Veränderungen modulieren [44, 104]. Eine überschießende oder dysregulierte NET-Bildung kann dabei zur Verstärkung der systemischen Inflammationsreaktion beitragen und potenziell schädigende Effekte entfalten [65, 104].

1.6 Zielsetzung

Postoperative Inflammationsreaktionen sind bei Patienten mit großen abdominalchirurgischen Eingriffen eine relevante Herausforderung im klinischen Alltag. Durch ausgedehnte Gewebetraumen, perioperative Blutverluste und entzündungsfördernde Mechanismen wird eine Immunantwort ausgelöst, die eine frühzeitige Unterscheidung einer sterilen postoperativen systemischen Inflammationsreaktion von einer Sepsis erschwert [4, 85].

Vor diesem Hintergrund könnte die Quantifizierung von NETs einen vielversprechenden Ansatz zur Charakterisierung früher systemischer Inflammationsreaktionen darstellen und zur besseren Einordnung steriler und infektiöser Entzündungszustände beitragen [32].

Neben ihrer Rolle in der angeborenen Immunantwort werden NETs zudem als funktionelle Schnittstelle zwischen Inflammation und Hämostase beschrieben, da sie als struktur- und funktionsgebende Plattform für Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren fungieren [44, 96]. Eine gemeinsame Betrachtung von NET-assoziierten Veränderungen und hämostatischen Parametern im perioperativen Setting ist daher konzeptionell schlüssig.

Das Ziel dieser Studie ist es, NET-assoziierte Veränderungen neutrophiler Granulozyten nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren und deren perioperativen Verlauf zu charakterisieren. Ergänzend soll die prinzipielle Eignung eines durchflusszytometrischen Ansatzes zur Quantifizierung zellulärer NET-assoziierter Veränderungen im perioperativen intensivmedizinischen Setting evaluiert werden. Die Durchflusszytometrie wurde gewählt, da sie eine zeitnahe, hochdurchsatzfähige Analyse zellulärer Veränderungen erlaubt und somit besonders für den Einsatz im perioperativen klinischen Setting geeignet ist [53, 79].

Weiterhin sollen serologische Marker neutrophiler Aktivierung untersucht und deren zeitliche Veränderungen mit den zellulären NET-assoziierten Parametern verglichen werden. Zudem soll untersucht werden, ob NET-bezogene Parameter mit Veränderungen der perioperativen Gerinnung assoziiert sind.

Explorativ soll ferner geprüft werden, ob zelluläre NET-assoziierte Veränderungen im perioperativen Verlauf mit klinischen Parametern der Organdysfunktion in Beziehung stehen.

Zur Beantwortung der Zielsetzung werden folgende Hypothesen aufgestellt:

Haupthypothese

H1: Nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils neutrophiler Granulozyten mit NET-assoziierten Merkmalen im peripheren Blut.

Subhypothesen:

H2: Zwischen den zellulären NET-assoziierten Veränderungen und etablierten Inflammationsparametern sowie serologischen Markern neutrophiler Aktivierung besteht im perioperativen Verlauf ein Zusammenhang.

H3: Zelluläre NET-assoziierte Veränderungen neutrophiler Granulozyten korrelieren mit prokoagulatorischen Veränderungen der perioperativen Gerinnung.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Dissertation basiert auf einer monozentrischen, prospektiven Proof-of-Concept-Studie, die auf die Machbarkeit und explorative Anwendung eines durchflusszytometrischen NET-Nachweises im klinischen Setting in unterschiedlichen Entzündungskonstellationen ausgerichtet war [126]. Die Studie wurde im Zeitraum von Oktober 2018 bis März 2019 an der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM), Standort Gießen, durchgeführt.

Die Studie wurde nach Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission (Aktenzeichen AZ 86/18) sowie Registrierung im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS00013584) durchgeführt.

Insgesamt wurden 80 Patientinnen und Patienten in die Gesamtstudie eingeschlossen und in vier Kollektive mit jeweils 20 Personen eingeteilt.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Kollektiv von 20 Patientinnen und Patienten, die sich komplexen elektiven abdominalchirurgischen Eingriffen unterzogen hatten. Dieses Subkollektiv wurde prospektiv untersucht und bildet die Grundlage aller in dieser Dissertation dargestellten Analysen.

Die weiteren Kollektive der Gesamtstudie umfassten Patientinnen und Patienten nach elektiven herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, ein Kollektiv mit septischem Schock gemäß den Kriterien der S3-Leitlinie Sepsis [24], sowie eine hierzu gematchte Kontrollgruppe. Das Matching erfolgte unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht und relevanten Vorerkrankungen, darunter maligne Erkrankungen, arteriosklerotische Gefäßerkrankungen (koronar, zerebral oder peripher), chronische Nierenerkrankungen und Diabetes mellitus.

Die Durchführung der Studie wurde durch Mittel des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) unterstützt (Grant-Nr. TI 07.001_Schneck_00).

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Alle eingeschlossenen Personen mussten volljährig sein und im Vorfeld der Teilnahme an der Studie, nach ausführlicher Aufklärung, schriftlich zustimmen. Weitere Einschlusskriterien sind das Erfüllen von mindestens zwei der SIRS-Kriterien postoperativ [84]. Bei den Operationen musste es sich um elektive komplexe abdominalchirurgische Eingriffe wie Operationen nach Whipple, offene Kolektomien, Ösophagusresektionen oder vergleichbar große Eingriffe handeln.

Von der Studienteilnahme ausgeschlossen wurden Patienten unter 18 Jahren, Schwangere sowie Personen mit hochgradigen Herzklappenstenosen oder -insuffizienzen (III°), floriden Autoimmunerkrankungen, aktiven malignen hämatologischen Grunderkrankungen oder Erkrankungen, die eine immunsuppressive Therapie erfordern. Weitere Ausschlusskriterien waren akute Infektionen vor Studieneinschluss, kardiogener Schock, Notfalloperationen sowie eine präoperative Behandlung mit einer extrakorporalen Membran-Oxygenierung oder intraaortaler Ballonpumpe.

2.3 Untersuchungszeitpunkte und Studienablauf

Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die Studienzeitpunkte und die durchgeführten Messverfahren.

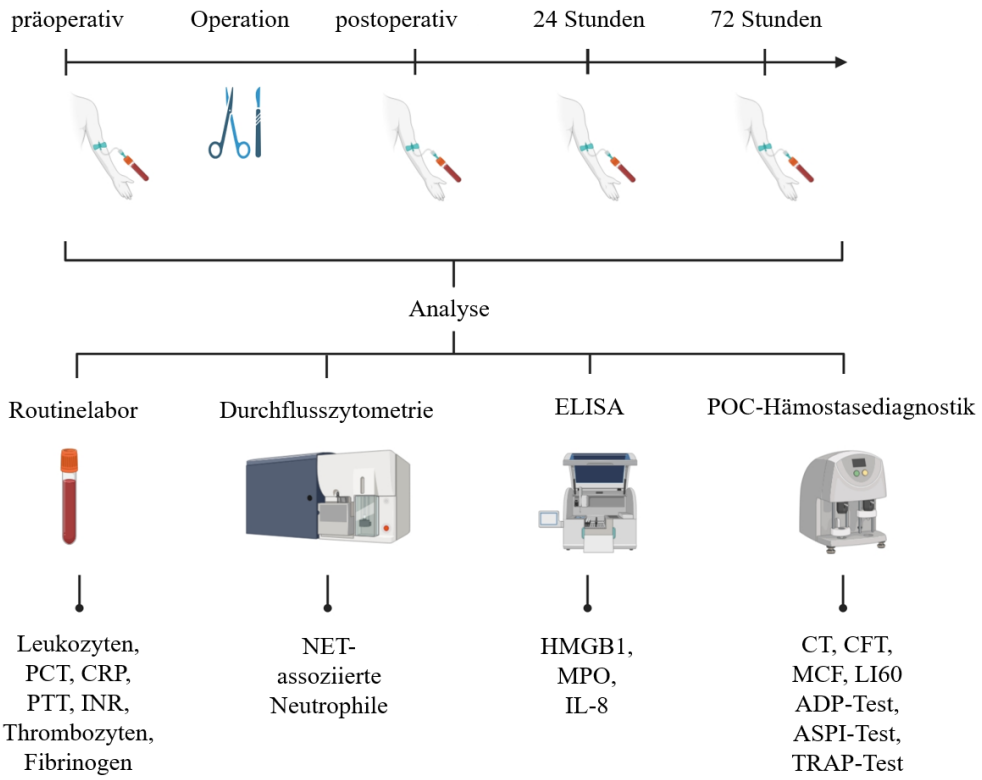


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau. Dargestellt sind die Untersuchungszeitpunkte der Studie mit Blutabnahmen präoperativ, unmittelbar postoperativ sowie 24 Stunden und 72 Stunden nach dem operativen Eingriff. Jede Blutprobe wurde einer standardisierten laborchemischen Analyse einschließlich hämatologischer und gerinnungsrelevanter Parameter unterzogen. Zusätzlich erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse zur Quantifizierung zellulärer NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten. Ergänzend wurden mittels ELISA die Plasmakonzentrationen von HMGB1, MPO und IL-8 bestimmt. Zur Beurteilung der perioperativen Hämostase wurden eine Thrombelastometrie sowie eine Impedanzaggregometrie durchgeführt. Mittels Thrombelastometrie wurden die Parameter CT, CFT, MCF und LI60 bestimmt; die Thrombozytenfunktion wurde mittels ADP-, ASPI- und TRAP-Test untersucht. Erstellt mit BioRender.com. *Abkürzungen: CRP: C-reaktives Protein, PCT: Prokalzitonin, PTT: partielle Thromboplastinzeit, INR: International Normalized Ratio, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, HMGB1: High Mobility Group Box 1, MPO: Myeloperoxidase, IL-8: Interleukin-8, CT: Clotting Time, CFT: Clot Formation Time, MCF: Maximum Clot Firmness, LI60: Lysis Index at 60 min, ADP: Adenosindiphosphat, ASPI: Arachidonsäure, TRAP: Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid.*

2.4 Messmethoden

2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur schnellen, multiparametrischen Analyse von Zellen in Suspension. Als Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) bezeichnet man die Erweiterung dieses Prinzips, bei der Zellen zusätzlich anhand ihrer Fluoreszenzmerkmale sortiert werden können. Dabei macht man sich einerseits die physikalischen Eigenschaften Größe und Granularität der Zellen zunutze, andererseits

können die Zellen aber auch zusätzlich durch spezifische Antikörper markiert werden, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Das zugrunde liegende Prinzip basiert darauf, dass die Zellen einzeln in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden (siehe Abbildung 5). Hierdurch kommt es zu einer Lichtstreuung sowie zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, welche dadurch Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht wird durch verschiedene Spiegel und Filter zerlegt und anschließend detektiert [90].

2.4.1.1 Funktionsweise

Bei dem durch den Laser ausgesendeten Licht handelt es sich um monochromatisches Licht. Dieses Licht wird gebündelt und auf die zu untersuchenden Zellen in der Messküvette gestrahlt. Anhand der entstehenden Lichtstreuung können verschiedene Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen bestimmt werden. Die Größe der Zellen wird anhand des nach antegrad gestreuten Lichts bestimmt, des sogenannten Forward Scatter (FSC). Rückschlüsse auf die Granularität der untersuchten Zellen lassen sich über das lateral gestreute Licht ziehen, den Side Scatter (SSC), der im 90°-Winkel zur Einfallsrichtung detektiert wird. Zusätzlich zu diesen rein physikalischen Messungen können die zu untersuchenden Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Meist wird hierfür ein spezifischer Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Die Farbstoffe werden durch das Licht des Lasers angeregt und emittieren ein Licht mit einer höheren Wellenlänge. Durch die Benutzung verschiedener Linsen, Spiegel und Filter wird das Licht aufgesammelt, geteilt und kann dann durch verschiedene Detektoren erfasst werden. Es können mehrere Farbstoffe parallel untersucht werden, wodurch man in kurzer Zeit eine große Anzahl Zellen auf verschiedene Eigenschaften untersuchen kann [90].

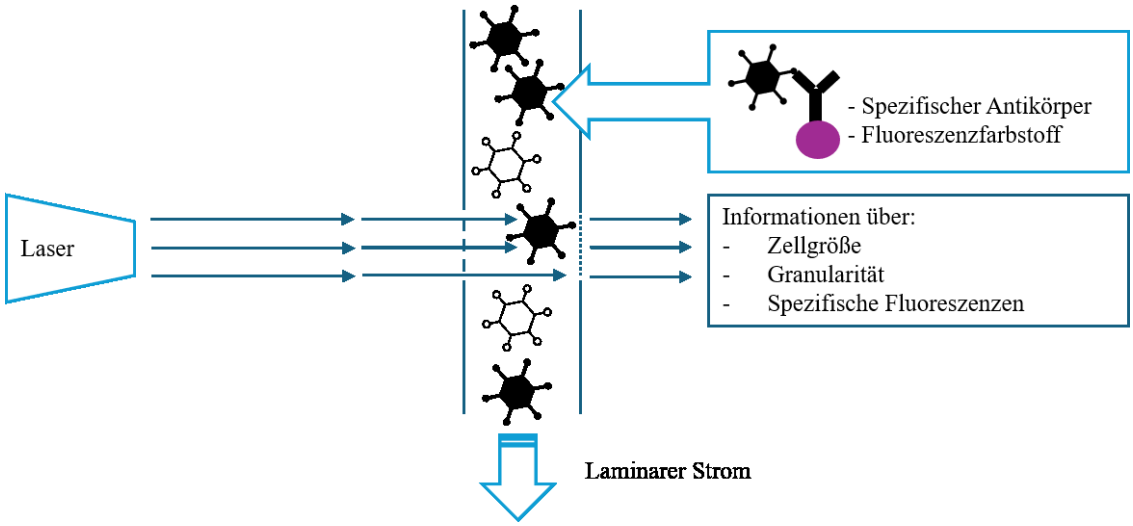


Abbildung 5: Funktionsweise Durchflusszytometer. Die markierten Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Über Lichtstreuung, Reflexion und Lichtemission der fluoreszierenden Farbstoffe lassen sich Aussagen über die Zellgröße, Granularität und spezifische Fluoreszenzen treffen. Adaptiert nach [90].

2.4.1.2 Durchführung

Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um den Anteil neutrophiler Granulozyten zu quantifizieren, die NET-assoziierte zelluläre Merkmale aufwiesen.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte im Forschungslabor der experimentellen Anästhesiologie des Uniklinikums Gießens, die eigentliche Durchflusszytometrie in der spezialisierten zentralen Einrichtung Flow Cytometry Core Facility (FCCF) des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin (Prof. Dr. G. Bein) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Messungen wurden mit dem Gerät BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und mittels der BD FACSDIVA Software (Version 6.1.3, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ausgewertet.

Als Studienprotokoll kam ein adaptiertes Protokoll nach Lee et al. [79] zum Einsatz.

Tabelle 1: Verwendete konjugierte Antikörper. *Abkürzungen: FITC: Fluoresceinisothiocyanat, CD15: Cluster of Differentiation 15, SSEA-1: Stage-Specific-Embryonic Antigen 1, Ser28: Serin 28, nm: Nanometer.*

Antikörper	Fluorochrom	Zielstruktur
Alexa Fluor® 647 anti-Histone H3-Phosphorylated (Ser28)	Alexa Fluor 647 Anregung: 633 nm Emissionsmaximum: 668 nm	H3-Histon
FITC Anti-Myeloperoxidase-Antikörper	FITC Anregung: 488 nm Emissionsmaximum:519 nm	Myeloperoxidase
Pacific Blue™ anti-human CD15 (SSEA-1)	Pacific Blue Anregung: 407 nm Emissionsmaximum: 455 nm	CD15

2.4.1.3 Probenmaterial

Als Ausgangsmaterial diente Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblut der Studienteilnehmer. Es wurden jeweils 100 µl des Vollbluts in 5 ml Durchflusszytometrie-Röhren (Proberöhre 75 x 12 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt.

2.4.1.4 Protokoll

Insgesamt wurden fünf Messansätze durchgeführt. Zwei Ansätze dienten als Fluoreszenz-Minus-One-(FMO)-Kontrollen, bei denen jeweils einer der verwendeten Antikörper gegen MPO bzw. H3-Histon gezielt weggelassen wurde, um die Gatingstrategie zu definieren. Die verbleibenden drei Ansätze enthielten alle konjugierten Antikörper (siehe Tabelle 1) und wurden für die eigentliche Messung und Auswertung herangezogen.

Bei allen Ansätzen wurden 10 µl Immunglobulin G (IgG Gamunex, 100 mg/ml, Grifols, Barcelona, Spanien) zu 100 µl Vollblut gegeben, um unspezifische Bindungsstellen an F_c-Rezeptoren zu blockieren. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden in vier der fünf Ansätze 5 µl Alexa Fluor® 647 anti-Histone H3-phosphorylated (Ser28)-Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Im nächsten Schritt wurden allen fünf Ansätzen 5 µl Pacific Blue™ anti-human CD15-Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) zugesetzt. Zusätzlich erhielten vier der fünf Ansätze 10 µl Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Anti-Myeloperoxidase-Antikörper (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich). Der Ansatz ohne FITC-Anti-

Myeloperoxidase-Antikörper war dabei nicht identisch mit dem Ansatz ohne Alexa Fluor® 647-anti-Histon-Antikörper. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse durch Zugabe von 1 ml BD-Pharm-Lyse (1:10 in destilliertem Wasser verdünnt; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Lyse durch Zugabe von 1 ml 2 % Phosphate-buffered saline (PBS)/ Bovines Serumalbumin (BSA) (PBS: gibco® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA; BSA: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gestoppt und überschüssige Antikörper entfernt.

Die Proben wurden anschließend bei 200 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland). Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstands wurden die Zellpellets in 300 µl 2 % PBS/BSA resuspendiert.

Die nun fertig präparierten Probeansätze wurden lichtgeschützt in die FCCF überführt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

2.4.1.5 Gatingstrategie

Die durch das Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II gewonnenen Daten wurden zweidimensional mittels eines Punktdiagramms (Dot-Plot) dargestellt. Die Gatingstrategie umfasste drei Schritte (siehe Abbildung 6).

Zuerst wurde die Größe der Zellen (FSC) auf der Abszisse gegen die Granularität (SSC) auf der Ordinate aufgetragen. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Zellen lassen sich verschiedene Zellpopulationen unterscheiden. Es wurde ein Gate um die Leukozyten gelegt, so dass in den weiteren Betrachtungen nur noch diese Leukozytenpopulation betrachtet wurde.

In einem zweiten Schritt wurden die neutrophilen Granulozyten aus der Population der Leukozyten selektiert, indem die Größe (FSC) auf der Abszisse gegen das Fluorochrom Pacific Blue auf der Ordinate aufgetragen wurde. Es wurde ein Pacific Blue™ anti-human Cluster of Differentiation 15 (CD15)-Antikörper verwendet. Somit konnten die CD15+ Zellen sicher identifiziert und mit einem weiteren Gate belegt werden.

Die Bestimmung des Anteils der neutrophilen Granulozyten mit NET-assoziierten zellulären Veränderungen erfolgte durch die FMO-Technik. Verwendet wurden die Farbstoffe Alexa Fluor® 647 anti-Histone H3-Antikörper und FITC-Anti-Myeloperoxidase-Antikörper. Es wurde jeweils ein Ansatz vorbereitet, bei dem jeweils einer der beiden Antikörper nicht zur Probe gegeben wurde. Dadurch konnten Grenzwerte für eine positive Antwort für jede Probenreihe definiert werden. Doppelt-positive Ereignisse wurden als neutrophile Granulozyten mit NET-assoziierten zellulären Merkmalen gewertet und als prozentualer Anteil dargestellt. Messwerte unterhalb von 0,5 % sowie größere Zellaggregate wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Die erforderliche Kompensation für die durchflusszytometrischen Messungen wurde mit freundlicher Unterstützung durch die Arbeitsgruppe Hackstein vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt und regelmäßig kontrolliert.

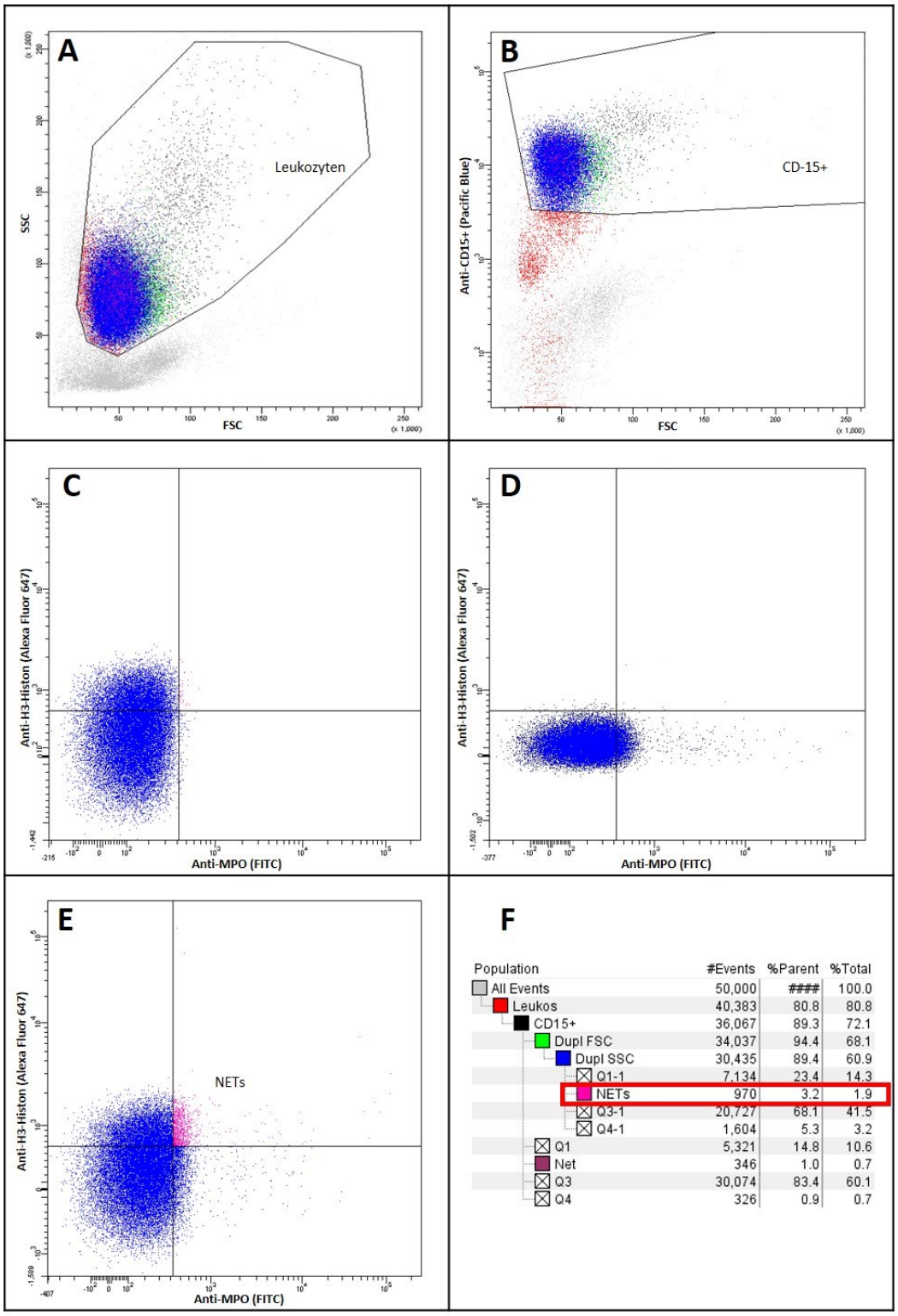


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der Gatingstrategie. Die Leukozyten wurden anhand von Größe und Granularität identifiziert und ausgewählt (**A**), anschließend wurden die neutrophilen Granulozyten über ihre CD15-Positivität selektiert (**B**), mittels der Fluorescence Minus One (FMO) Methode konnten Grenzen für die Anti-MPO und Anti-H3-Histon definiert werden, wobei **C** kein Anti-MPO und **D** kein Anti-H3-Histon enthält. Die Zellen, die sowohl MPO als auch H3-Histon positiv sind, werden als neutrophile Granulozyten gewertet, die NET-assoziierte zelluläre Merkmale aufweisen (**E**), in dieser Probe zeigten 3,2 % der neutrophilen Granulozyten NET-assoziierte zelluläre Merkmale (**F**), *Abkürzungen: CD: Cluster of Differentiation; FITC: Fluoresceinisothiocyanat, FSC: Forwardscatter, MPO: Myeloperoxidase, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, SSC: Sidescatter.*

2.4.2 Vorversuche

7-AAD

Die Intaktheit der Zellmembran der Granulozyten nach der Erythrozytenlyse wurde in mehreren Versuchsreihen durch Zugabe von 5 µl 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 5 Minuten vor der Durchflusszytometrie überprüft. 7-AAD ist ein fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoff, der selektiv an DNA bindet. Bei intakten Zellen kann 7-AAD die Zellmembran nicht durchdringen, weshalb nur avitale Zellen bzw. deren DNA angefärbt werden. 7-AAD gilt als gängiger Zellviabilitätsmarker [90].

Stimulation mit PMA

Als Positivkontrolle zum Nachweis einer durch das gewählte Protokoll detektierbaren NETose diente ein Vorversuch aus Vollblut einer gesunden Probandin. 100 µl des Vollbluts wurde für 4 Stunden mit 10 µl Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) stimuliert [53, 79]. PMA gilt als starker Stimulus der NETose [21]. Im Anschluss wurden sowohl eine stimulierte als auch die unstimulierte Probe nach dem Studienprotokoll vorbereitet.

2.4.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Durch die Immunfluoreszenzmikroskopie können bestimmte Zielstrukturen, wie zum Beispiel Oberflächenproteine von Zellen, sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 7). Hierfür wird ein spezifischer Antikörper verwendet, der gegen die Zielstruktur gerichtet ist. Dieser Antikörper wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der durch Licht mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden kann und dann Licht in einer anderen Wellenlänge abstrahlt.

Das Licht passiert ausgehend von einer Lichtquelle einen Anregungsfilter, durch den nur der Wellenlängenbereich des Lichts passieren kann, auf den der Fluoreszenzfarbstoff reagiert. Dieses Licht wird durch einen dichroitischen Spiegel reflektiert und auf die Probe gestrahlt. Dieser Spiegel reflektiert Licht bestimmter Wellenlängen, ist aber für Licht in anderen bestimmten Wellenlängen durchlässig. Die fluoreszierenden Farbstoffe werden angeregt und emittieren Licht einer anderen Wellenlänge. Dieses Licht kann den dichroitischen Spiegel nun passieren und wird nach Passage eines Emissionsfilters durch den Detektor erfasst. Es ist somit nur die Fluoreszenz sichtbar. Es können auch mehrere Antikörper mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen parallel verwendet werden, um verschiedene Strukturen auf einer Zelle sichtbar zu machen [80, 101].

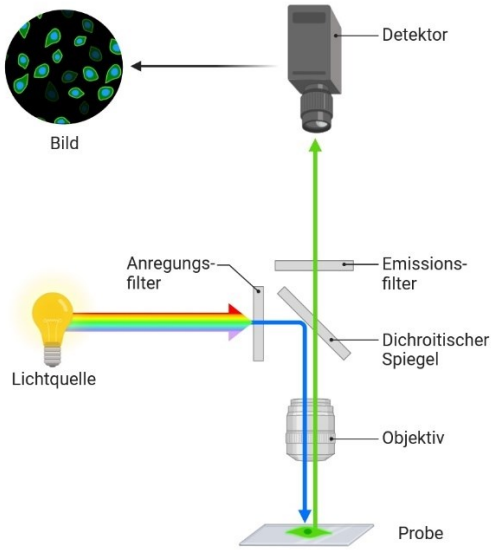


Abbildung 7: Grundprinzip Fluoreszenzmikroskopie. Eine Lichtquelle emittiert breitbandiges Licht, das durch einen Anregungsfilter selektiv gefiltert wird. Der dichroitische Spiegel lenkt das gefilterte Licht auf die Probe, die fluoreszierende Moleküle enthält. Diese emittieren Licht einer längeren Wellenlänge, das durch das Objektiv gesammelt, vom Emissionsfilter gefiltert und schließlich vom Detektor erfasst wird. Erstellt mit BioRender.com.

2.4.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Eine Weiterentwicklung der klassischen Immunfluoreszenzmikroskopie ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, welche computergestützt ultradünne Schnittbilder mit hoher Auflösung von Zellen oder Strukturen erstellt (siehe Abbildung 8). Sie wird vor allem für fixierte Zellen verwendet, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt worden sind.

Um eine möglichst hohe Auflösung und möglichst dünne Schnitte zu erhalten, wird die Beleuchtung auf den kleinstmöglichen Punkt fokussiert („fokal“). Es werden nur Strukturen in einer horizontalen Ebene anvisiert. Der Beleuchtungsfleck ist beugungsbegrenzt, kann also physikalisch nicht noch kleiner gewählt werden. Um trotz allem ein zweidimensionales Bild zu erhalten, wird die gesamte Ebene durch einen Laser Punkt für Punkt abgefahren. Technisch wird dies durch einen Rasterscan verwirklicht. Zwei Spiegel bewegen den Beleuchtungspunkt in x- und y-Richtung, Reihe für Reihe über die Probe. Das Signal wird synchron erfasst und zu einem Gesamtbild zusammengesetzt.

Das emittierte Licht wird zusätzlich durch eine Lochblende erneut fokussiert, so dass nur Licht, welches aus der Fokalebene kommt, erfasst wird. Licht von oberhalb oder unterhalb der gewünschten Ebene wird abgeschnitten [80, 101].

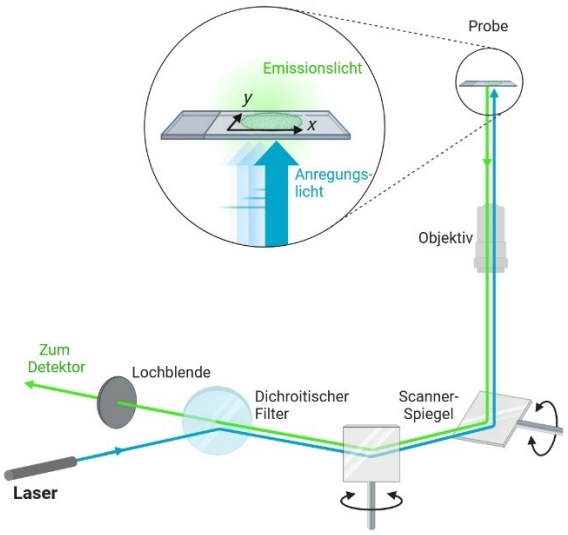


Abbildung 8: konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Ein Laser erzeugt ein fokussiertes Anregungslicht. Dieses wird durch einen dichroitischen Filter zum Scanner-Spiegel geleitet, der den Lichtstrahl über die Probe bewegt. Die fluoreszierte Emission der Probe wird durch das Objektiv gesammelt, passiert nun den dichroitischen Filter und wird durch eine Lochblende fokussiert, um Streulicht außerhalb der Fokalebene zu eliminieren. Das gefilterte Signal erreicht schließlich den Detektor. Erstellt mit BioRender.com.

2.4.3.2 Durchführung

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte zur qualitativen Verifizierung, dass es sich bei den MPO- und anti-H3-Histon-positiven Zellen um neutrophile Granulozyten mit NETose-kompatiblen Veränderungen handelt. Die Analysen wurden in Kooperation mit dem Labor der Klinik für Pneumologie (FSB Molecular Mechanisms of Emphysema, Hypoxia and Lung Aging) der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial wurden 100 µl Vollblut eines gesunden Spenders mit 10 µl PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) versetzt und insgesamt vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das PMA diente hierbei als Stimulus für die NETose. Im Anschluss wurden die roten Blutkörperchen lysiert. Hierfür wurde 1 ml 1:10 verdünnte Pharmlyse™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) zu der Probe hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert.

Zur Beendigung der Lyse wurden 1 ml PBS (gibco® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA) zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 200 g und 20 °C für 10 Minuten (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland), woraufhin der Überstand dekantiert wurde.

Die Zellen wurden daraufhin durch eine dreiminütige Zentrifugation mit einer Zytozentrifuge (Cellspin 1, Tharmac, Wiesbaden, Deutschland) auf einem Deckglas fixiert.

Zu den fixierten Zellen wurden 5 µl Pacific Blue™ Anti-Human CD15 (SSEA-1) (BioLegend, San Diego, USA), 5 µl Alexa Fluor® 647 anti-H3-Histon (BioLegend, San Diego, USA), und 10 µl Anti-MPO (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) zur Färbung hinzugegeben.

Nach 30-minütiger Inkubationsphase in der Dunkelheit und einem vorsichtigen Waschzyklus mit PBS (gibco® by life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA) konnte die Probe durch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

2.4.4 ELISA

Enzym-Immunoassays ermöglichen einen quantitativen Nachweis von Antikörpern oder Antigenen. Bei den in der Arbeit verwendeten Kits handelt es sich um Sandwich-Enzymimmunoassays.

2.4.4.1 Grundprinzip

Das Grundprinzip des Sandwich-ELISA ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. In einem ersten Schritt werden die Mulden (Wells) mit einem spezifischen Fangantikörper beschichtet. Zumeist werden Mikrotierplatten im 96-Well-Format verwendet. Die Adsorption der Antikörper auf der Oberfläche der Platte basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen. Im nächsten Schritt werden unspezifische Proteinbindungsstellen geblockt, um ungewollte Hintergrundaktivität zu reduzieren. In kommerziellen ELISA-Kits sind bereits entsprechend präparierte Platten enthalten.

Im Anschluss werden die eigentlichen Proben oder Standardlösungen in die entsprechenden Wells gegeben. Befindet sich das anvisierte Antigen in der Lösung, kommt es zu einer spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung. Nach Inkubation wird der Rest der Probe oder Standardlösung entfernt und es folgen Waschzyklen.

Das Zielantigen verbleibt gebunden an den Fangantikörper im Well und kann nun durch einen zweiten Antikörper, den Detektionsantikörper markiert werden. Eine Grundvoraussetzung ist, dass Fangantikörper und Detektionsantikörper an verschiedenen Epitopen des Antigens binden. Der Detektionsantikörper ist meist mit Biotin konjugiert. Nach der Inkubation und Entfernen des Überstands folgen erneut Waschzyklen.

Es wird nun Avidin hinzugegeben, ein aus dem Hühnereiweiß stammendes Protein, welches eine hohe Affinität zu Biotin besitzt. An das Avidin ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert welches, nach einem weiteren Waschschritt und Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat, eine Reaktion katalysiert, die einen Farbumschlag bewirkt.

Nach Abstoppen der Reaktion mittels Schwefelsäurelösung kann der Farbumschlag spektrophotometrisch bestimmt werden. Die Konzentration des Antigens kann nun durch einen Vergleich mit einer Standardkurve ermittelt werden, welche durch Verdünnungsreihen des gereinigten Antigens erstellt werden [23, 91].

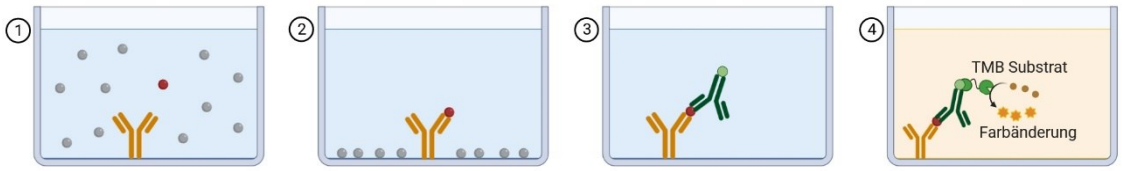


Abbildung 9: Grundprinzip Sandwich-ELISA. 1.) Hinzugabe der Probe in die Wells, die mit spezifischem Antikörper gegen das Zielantigen vorbeschichtet sind, 2.) Der Fängerantikörper bindet an das Antigen mit hoher Spezifität, 3.) Biotin-markierter Detektionsantikörper bindet das immobilisierte Antigen, 4.) Meerrettichperoxidase-konjugiertes Avidin bindet an Biotin und katalysiert eine Enzym-Substrat-Reaktion, die eine Farbänderung hervorruft. Erstellt mit BioRender.com. *Abkürzungen: TMB: Tetramethylbenzidin.*

2.4.4.2 Durchführung

Als Ausgangsmaterial für die ELISA-Bestimmungen wurde EDTA-Plasma verwendet. Das EDTA-Blut wurde zuerst mit 200 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland) und danach mit 6082 g für 10 min bei 4°C (Mikro 200R Typ 2405, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Das aliquotierte EDTA-Plasma wurde im Anschluss bei -80°C eingelagert und erst unmittelbar vor der eigentlichen Messung aufgetaut.

Es wurden drei kommerzielle ELISA-Kits verwendet, mit denen die Proteine HMGB1 (Humanes HMGB1 ELISA Kit, Aviva Systems Biology, San Diego, USA), MPO (Humanes MPO Instant ELISA, eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland) und IL-8 (IL-8 Human IL-8/CXCL8 Quantikine HS ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) quantifiziert wurden. Die Bestimmungen wurden jeweils streng nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.5 Rotations-Thrombelastometrie

Die Rotations-Thrombelastometrie ermöglicht als POC-Diagnoseverfahren eine schnelle Analyse der in-vitro-Blutgerinnung aus einer Citrat-Vollblutprobe und somit eine Aussage über die qualitative und quantitative Koagulation. Verwendet wurde das Thrombelastometrie System ROTEM® delta (TEM Innovations GmbH, München, Deutschland). Das System verfügt über vier Messkanäle.

2.4.5.1 Grundprinzip

In Abbildung 10 ist das Prinzip der Messung schematisch dargestellt. Das Citrat-Vollblut wird mittels einer automatisierten Pipette in spezielle Einwegmessgefäße (Cups) mit einem Durchmesser von acht Millimetern überführt. Die Proben werden konstant bei einer Temperatur von 37,0°C gehalten.

Das Gerät verfügt über eine rotierende Vertikalachse, auf die ein sechs Millimeter breiter Plastikstift fest aufgesteckt wird. Die Achse ist auf einem Kugellager gelagert und oszilliert permanent in einem Winkel von 4,75° nach links und nach rechts. Der Motor, der die Achse antreibt, ist über eine elastische Feder mit der Achse verbunden.

Durch eine Rekalzifizierung und Zugabe von unterschiedlichen zusätzlichen Reagenzien zu der Citrat-Blutprobe wird die Gerinnungskaskade angestoßen (siehe Tabelle 2). Das Messgefäß wird nun im Messkanal platziert, sodass die Achse mit dem rotierenden Plastikstift vom Blut umgeben ist. Findet keine Gerinnung statt, kann der Plastikstempel ungehindert in der Probe rotieren. Bildet sich jedoch ein Blutgerinnsel zwischen Plastikstift und Messgefäß, steigt der Widerstand und die Rotation wird behindert.

Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Federspannung des Motors und der Spannung des Gerinnsels ein. Mit steigender Festigkeit des Gerinnsels und somit auch steigender Federspannung nimmt die Rotationsamplitude der oszillierenden Achse ab.

Die Rotationsamplitude wird optisch erfasst. Hierzu wird Licht einer Diode auf eine am oberen Ende der Messachse angebrachte Spiegelplatte gerichtet. Die reflektierten Lichtsignale werden von einem Detektorchip registriert und durch eine spezielle Software ausgewertet. Aus der gemessenen Rotationsamplitude wird anschließend eine graphische Amplitude berechnet und zeitabhängig dargestellt. Die graphische Amplitude kann Werte zwischen 0 mm bei ungehinderter Rotation (also keiner Gerinnselbildung) und 100 mm

bei maximal gebremster Rotation annehmen. Die entstehende Kurve (siehe Abbildung 11) wird mathematisch interpretiert und es werden verschiedene Zielparameter angegeben (siehe Tabelle 3) [141].

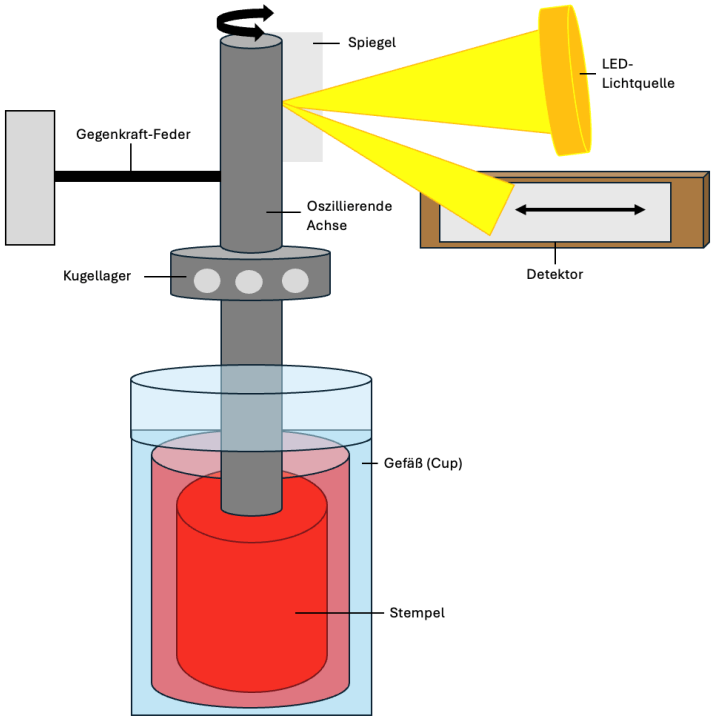


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des ROTEM®-Messverfahrens. Die oszillierende Bewegung des Stempels in der Blutprobe wird über einen Spiegel, eine LED und einen Photodetektor optisch registriert. Die gemessene Torsionskraft spiegelt die Dynamik der Gerinnselbildung wider. *Abkürzungen: LED: Light Emitting Diode*. Angelehnt an [60].

2.4.5.2 Durchführung

Die Messungen wurden streng nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Vorbereitung der Proben wurde die automatische Pipette und die vorgegebene Reihenfolge eingehalten. Nach Beenden des letzten Pipettierschrittes wurde die Probe zügig in die vorgesehene Messposition verbracht.

Zuerst wurde die Blutprobe rekalzifiziert, um die Wirkung des Citrats aufzuheben und eine Gerinnselbildung zu ermöglichen. Im Anschluss wurden je nach Test weitere Aktivatoren oder Inhibitoren zu der Probe hinzugefügt um Aussagen über die extrinsische und intrinsische Gerinnungskaskade, über die Gerinnselstabilität oder über vorhandene Medikamentenwirkung zu erhalten [89].

Tabelle 2: verwendete ROTEM®-Tests. *Abkürzungen: DOAK: direkte orale Antikoagulantien, VKA: Vitamin-K-Antagonisten, UFH: unfraktioniertes Heparin, NMH: niedermolekulares Heparin*. Modifiziert nach [55].

Test	Aktivatoren und Zusätze	Klinische Anwendung
EXTEM	$CaCl_2$ + rekombinanter Gewebefaktor	Beurteilung der extrinsischen Gerinnungskaskade, Wirkung von DOAKs, VKA
INTEM	$CaCl_2$ + Oberflächenaktivator (Ellagsäure)	Beurteilung der intrinsischen Gerinnungskaskade, Wirkung von UFH
FIBTEM	$CaCl_2$ + rekombinanter Gewebefaktor + Cytochalasin D	Durch Ausschalten der Thrombozytenfunktion reine Beurteilung der Fibrinpolymerisation, Detektion einer Hyperfibrinolyse oder eines F XIII Mangels
NATEM	$CaCl_2$	Allgemeiner Überblick über das Gerinnungsgleichgewicht, Expression von Gewebefaktor auf zirkulierenden Zellen, Wirkung von NMH

Tabelle 3: ROTEM®-Testparameter. Modifiziert nach [141].

Parameter	Definition	Wichtigste Einflussfaktoren
Gerinnungszeit Clotting Time (CT) [s]	Zeit vom Beginn des Tests (Zugabe des Gerinnungsaktivators) bis 2 mm Amplitude	Gerinnungsfaktoren, Antikoagulanzien
Gerinnselbildungszeit Clot Formation Time (CFT) [s]	Zeit zwischen 2 mm Amplitude und 20 mm Amplitude	Thrombozyten, Fibrinogen
Gerinnselfestigkeit Maximum Clot Firmness (MCF) [mm]	Maß für die maximale Gerinnselfestigkeit; maximal erreichte Amplitude	Thrombozyten, Fibrinogen, Faktor XIII, Fibrinolyse
Lyse-Index nach 60 min Lysis index at 60 min (LI60) [%]	Verhältnis der Amplitude 60 min nach CT zur MCF (in %)	(Hyper-)Fibrinolyse

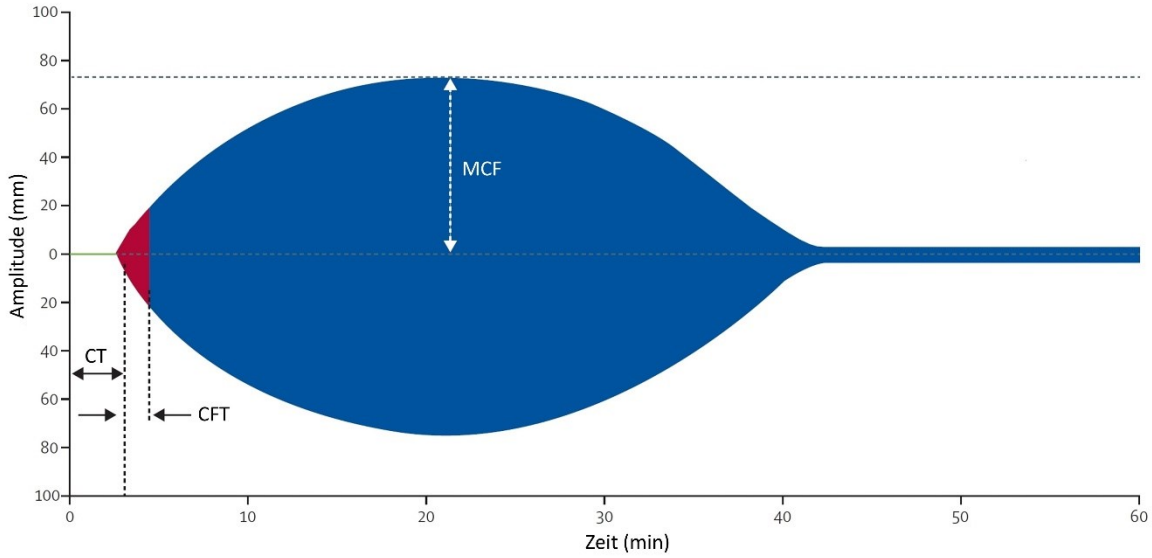


Abbildung 11: ROTEM®-Parameter. Schematisch dargestellt ist das Ergebnis einer Thrombelastometrie. Die Rotationsamplitude [mm] wird auf der Y-Achse gegen die Zeit [min] auf der X-Achse aufgetragen. Aus der Form der entstehenden Kurve lassen sich verschiedene Messwerte ableiten. *Abkürzungen: CT: Clotting Time, CFT: Clot Formation Time, MCF: Maximum Clot Firmness.* Modifiziert nach [48].

2.4.6 Impedanzaggregometrie

Die Thrombozyten-Impedanzaggregometrie ermöglicht als POC-Diagnoseverfahren eine Aussage über die Thrombozytenfunktion. Verwendet wurde das Mehrfachelektroden-Impedanzaggregometer Multiplate® (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz).

2.4.6.1 Aufbau

Das Multiplate®-Gerät besteht aus einem Windows-Computer mit spezifischer Software, einer automatischen Pipette und einem Messblock mit fünf Kanälen, welcher konstant bei 37,0°C gehalten wird.

2.4.6.2 Messprinzip

Das Messprinzip der Impedanzaggregometrie ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Ausgangsmaterial für die Messung ist antikoaguliertes Vollblut, wobei die Antikoagulation durch Hirudin herbeigeführt wird (Abnahme des Bluts in 1,6 ml Hirudin S-Monovette®, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland). Mittels der automatischen

Pipette werden 300 µl des Vollbluts und 300 µl 0,9 % NaCl in eine Testzelle überführt. Die Testzellen sind jeweils mit einem Rührstäbchen ausgestattet und enthalten zwei voneinander unabhängige Sensoreinheiten, welche jeweils aus zwei silberbeschichteten Kupferdrähten bestehen. Zwischen den Testelektroden wird ein Stromfluss durch eine Wechselspannung angelegt, wodurch sich die negativ geladenen Thrombozyten an die Elektroden anlagern. Der Stromfluss nimmt ab und die Impedanz steigt.

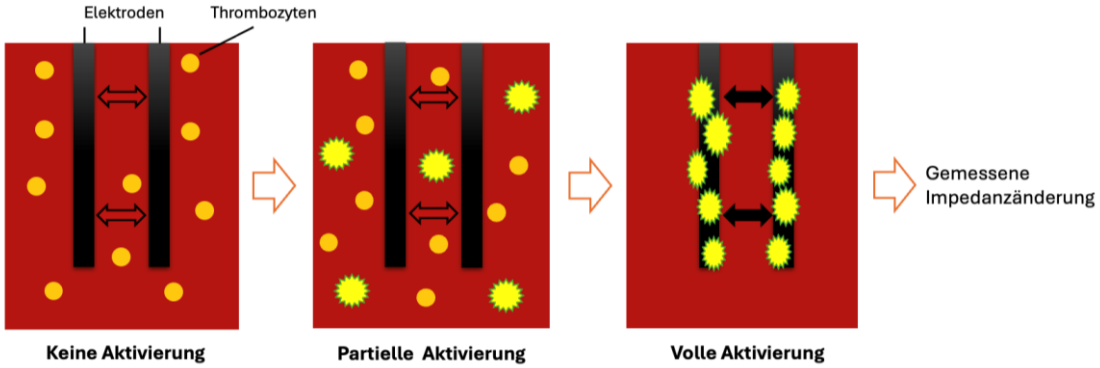


Abbildung 12: Funktionsprinzip der Impedanzaggregometrie. Schematische Darstellung der zunehmenden Anlagerung aktivierter Thrombozyten an die Elektrodenoberfläche in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad. Die hieraus resultierende progressive Zunahme der elektrischen Impedanz dient als Maß für die Thrombozytenaggregation. Modifiziert nach [18].

Nach drei Minuten unter kontinuierlichem Rühren werden verschiedene Agonisten hinzugefügt, um die Aggregation zusätzlich zu stimulieren. Die aggregierten Thrombozyten lagern sich an die Metalloberfläche der Elektroden an, wodurch es zu einer Impedanzerhöhung kommt. Diese Impedanzänderung wird sechs Minuten lang erfasst und in Aggregationseinheiten (AU) umgerechnet, welche in einem Koordinatensystem gegen die Zeit aufgetragen werden (Vergleich Abbildung 13). Die Aggregation wird zusätzlich durch die Angabe der Fläche unter der Kurve (Area under the Curve [AUC]) in AU * min quantifiziert. Zur einfacheren Auswertung wird die AUC in der Einheit Units (U) angegeben, wobei 1 U = 10 AU * min. Weitere Parameter sind die maximale Aggregation und die Aggregationsgeschwindigkeit [94, 117].

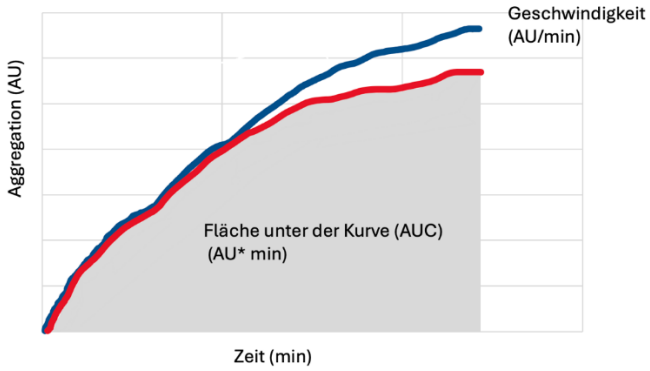


Abbildung 13: Exemplarische Aggregationskurve. Darstellung der Aggregationsgeschwindigkeit (Steigung der Kurve) sowie der Fläche unter der Kurve (Area under the Curve [AUC] in AU * min) als Maß für die thrombozytäre Aggregationsantwort. Modifiziert nach [94].

Die Fähigkeit der Thrombozyten auf die Stimulation durch die Agonisten zu reagieren, ist davon abhängig, ob die Stimulantien an den entsprechenden Rezeptoren binden können. Thrombozytenaggregationshemmer können diese Bindung verhindern. Je nach verwendetem Stimulans kann somit die Wirkung der verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmer nachgewiesen werden. Einen Überblick über die verwendeten Aggregationsagonisten gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: verwendete Multiplate®-Testreagenzien. Übersicht über Aggregationsagonisten, deren Wirkmechanismen und relevante Einflussfaktoren. Modifiziert nach [118].

Test	Beschreibung	Einflussfaktoren
ADP-Test (Adenosindiphosphat)	Aktivierung der Thrombozyten über ADP-Rezeptoren (Vor allem $P2Y_{12}$), führt zu Freilegung der Bindungsstelle GPIIb/IIIa	Hemmung des $P2Y_{12}$-Rezeptors (Clopidogrel, Prasugrel, Ticlopidin, Ticagrelor und Cangrelor), Hemmung/ Fehlen des GPIIb/IIIa-Rezeptors
ASPI-Test (Arachidonsäure)	Arachidonsäure wird durch die Thrombozyten-Cyclooxygenase-1 (COX-1) zu Thromboxan A2 umgewandelt. Thromboxan A2 bewirkt über den Thromboxan-Rezeptor eine Thrombozytenaggregation	Hemmung der COX-1 (Vor allem durch Acetylsalicylsäure und NSARs), Hemmung/ Fehlen des GPIIb/IIIa-Rezeptors
TRAP-Test (Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid 6 (TRAP-6))	Aktivierung der Thrombozytenaggregation über den Thrombinrezeptor (Vor allem Protease-aktivierter Rezeptor 1 (PAR-1))	Nur geringe Einflussfaktoren durch COX-Hemmer und ADP-Antagonisten, Hemmung/ Fehlen GPIIb/IIIa-Rezeptors

2.4.7 Laborchemische Analyse

Weitere gängige Routineparameter wurden durch das Routinelabor des Universitätsklinikums Gießen bestimmt.

2.5 Blutprobengewinnung

Die Blutproben für das untersuchte Kollektiv wurden präoperativ, unmittelbar postoperativ sowie 24 Stunden und 72 Stunden postoperativ abgenommen. Für die durchflusszytometrische Analyse, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und ELISA-Messungen wurden EDTA-Vollblutproben verwendet. Thrombelastometrische Messungen erfolgten aus Citratblut, die Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Impedanzaggregometrie aus Hirudinblut.

Die Blutproben wurden entweder durch periphere Venenpunktion oder, sofern vorhanden, über bereits liegende venöse bzw. arterielle Katheter gewonnen, um zusätzliche Punktionen zu vermeiden. Bei Katheterentnahmen wurde vor der Probengewinnung 2 ml Blut aspiriert und verworfen sowie der Katheter nach der Entnahme standardisiert gespült.

2.6 Materialien

Eine vollständige Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Antikörper, ELISA-Kits, ROTEM®-Reagenzien sowie der eingesetzten Software ist im Anhang aufgeführt (Kapitel 11.1 bis 11.3.).

2.7 Statistik

Die erhobenen Werte wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf eine mögliche Normalverteilung überprüft. Normalverteilte Daten wurden durch den Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung, nicht normalverteilte Daten als Median mit Interquartilsabstand dargestellt.

Die zeitabhängige Variation des Anteils neutrophiler Granulozyten, die NET-assoziierte zelluläre Merkmale aufwiesen, wurde mit dem Friedman-Test analysiert, ergänzt durch den paarweisen Wilcoxon-Test zur Untersuchung von Unterschieden zwischen den Zeitpunkten.

Zusammenhänge zwischen NET-assoziierten Parametern und weiteren Variablen wurden als Pearson-Korrelationskoeffizient ausgedrückt. Sowohl klinische als auch laborchemische und experimentelle Daten wurden in einer externen Datenbank (Microsoft Excel, Redmond, WA, USA) erfasst. Die Weiterverarbeitung, Analyse und Auswertung erfolgte mithilfe der Statistiksoftware R.

Zusammenhänge mit hoher statistischer Signifikanz ($p < 0{,}001$) wurden mit *** gekennzeichnet, signifikante Zusammenhänge mit $p < 0{,}01$ mit ** und solche mit $p < 0{,}05$ mit *.

3 Ergebnisse

3.1 Studienkohorte

Die Studienkohorte umfasste 20 erwachsene Teilnehmende. Zusätzlich wurden Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI), American Society of Anesthesiologists (ASA)-Score sowie der SOFA-Score erfasst. Bei allen Teilnehmenden wurden komplexe abdominalchirurgische Eingriffe (major abdominal surgery, MAS) durchgeführt (Operationen nach Whipple, offene Hemikolektomien, Ösophagusresektionen sowie weitere MAS-Eingriffe). Betrachtet wurden außerdem die Vorerkrankungen sowie die Antikoagulation (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Überblick über die Studienkohorte. Die Daten werden als Median, Interquartilsabstand, als absolute Angabe und prozentualer Anteil der Studiengruppe angegeben. *Abkürzungen: ASA: American Society of Anesthesiologists, BMI: Body-Mass-Index, SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment.*

Alter (Jahren)	68 (54 - 70)
Geschlecht (% männlich)	60
BMI (kg/m²)	24 (22,4 – 26,9)
ASA:	
I	1 (5 %)
II	8 (40 %)
III	11 (55 %)
IV	0
V	0
Eingriffstyp	
Operationen nach Whipple	8 (40 %)
Offene Hemikolektomie	4 (20 %)
Ösophagusresektion	4 (20 %)
Andere MAS	4 (20 %)
Verstorben im Krankenhaus	1 (5 %)
Vorerkrankungen:	
Diabetes mellitus	1 (5 %)
Chronische Nierenerkrankung	1 (5 %)
Arteriosklerose	5 (25 %)
Maligne Krebserkrankung	13 (65 %)
Antikoagulatorische Therapie:	
Prophylaktische Heparinisierung (präoperativ)	20 (100 %)
Prophylaktische Heparinisierung (postoperativ)	0
Prophylaktische Heparinisierung (24 Stunden)	18 (90 %)
Prophylaktische Heparinisierung (72 Stunden)	18 (90 %)

Therapeutische Heparinisierung (präoperativ)	0
Therapeutische Heparinisierung (postoperativ)	1 (5 %)
Therapeutische Heparinisierung (24 Stunden)	1 (5 %)
Therapeutische Heparinisierung (72 Stunden)	1 (5 %)

3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie diente als qualitativer Nachweis, dass es sich bei den MPO- und anti-H3-Histon-Antikörper positiven Zellen tatsächlich um neutrophile Granulozyten mit NETose-kompatiblen Veränderungen handelt. In Abbildung 14 werden exemplarisch die Ergebnisse der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

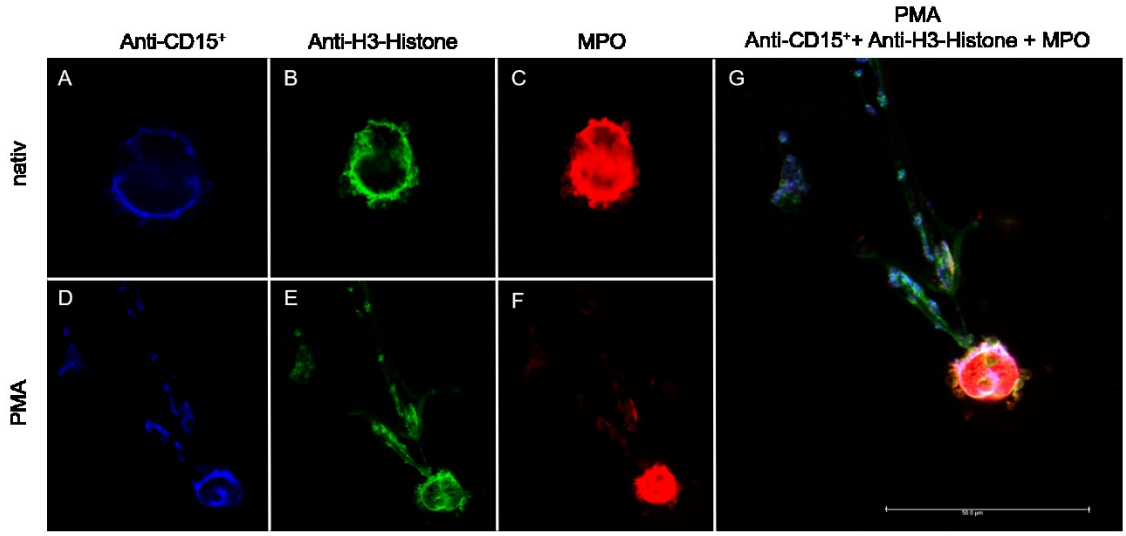


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopie nativer und PMA-stimulierter Neutrophiler. Native Neutrophile sind in der oberen Reihe mit den entsprechenden Markierungen dargestellt (A-C), während in der unteren Reihe die NET-freisetzenden Neutrophilen nach PMA-Stimulation mit den jeweiligen Färbungen gezeigt werden (D-F). NETs zeigen eine typische Kometenschweif-Konfiguration. Kachel G zeigt die Überlagerung aller gefärbten Antikörper. *Abkürzungen: MPO: Myeloperoxidase, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat.*

3.3 Durchflusszytometrische Quantifikation der NET-assoziierten Neutrophilen

Der Anteil neutrophiler Granulozyten, die NETose-assoziierte Marker exprimierten, wurde jeweils durchflusszytometrisch quantifiziert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Anteils NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten zwischen der präoperativen und der unmittelbaren postoperativen Messung ($p = 0{,}03$). Zu den Messzeitpunkten 24 h und 72 h war im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert keine weitere signifikante Erhöhung nachweisbar (siehe Tabelle 6, Abbildung 15).

Tabelle 6: Quantifikation der NET-assoziierten neutrophilen Granulozyten. Die Daten werden als Median und Interquartilsabstand angegeben. *Abkürzungen: NETs: Neutrophil Extracellular Traps*.

Präoperativ	2,6 (1,7 - 3,3)
Postoperativ	2,9 (2,3 - 5,2)
24 Stunden	2,6 (2 - 3,8)
72 Stunden	2,7 (2,3 - 3,9)

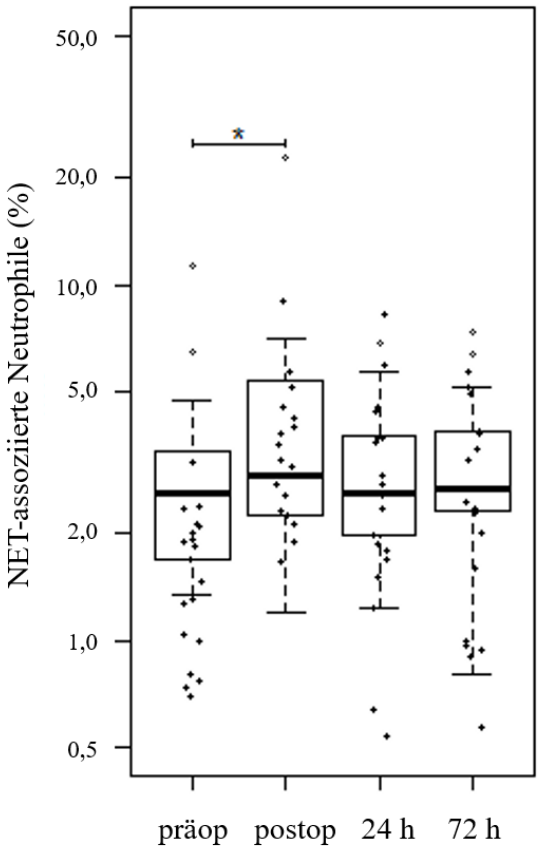


Abbildung 15: Verlauf des Anteils NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten. Dargestellt sind Boxplot-Diagramme mit Median, Interquartilsabstand, Whiskern (1,5-facher Interquartilsabstand) sowie Einzeldatenpunkten. Ein signifikanter Unterschied zwischen präoperativer und postoperativer Messung ist mit * gekennzeichnet (*$p < 0{,}05$). $n = 20$. *Abkürzungen: NETs: Neutrophil Extracellular Traps, präop: präoperativ, postop: postoperativ, h: Stunden.*

3.4 Inflammationsparameter

3.4.1 Überblick der Ergebnisse

Zu den definierten Messzeitpunkten wurden die etablierten Inflammationsparameter Leukozytenzahl, CRP und PCT aus dem Routinelabor erfasst. Ergänzend erfolgten ELISA-Analysen des Plasmas auf HMGB1, MPO und Interleukin 8.

Die zeitlichen Verläufe der Inflammationsparameter sind in Tabelle 7 dargestellt.

Die mittels ELISA bestimmte MPO-Plasmakonzentration zeigte signifikante Anstiege sowohl zwischen dem präoperativen und dem unmittelbar postoperativen Messzeitpunkt ($p = 0{,}02$) als auch zwischen dem präoperativen Messzeitpunkt und 24 Stunden nach der Operation ($p = 0{,}004$). Auch die IL-8-Plasmaspiegel nahmen signifikant zu (präoperativ vs. postoperativ: $p = 0{,}008$; präoperativ vs. 24 Stunden: $p = 0{,}05$). Für HMGB1 zeigten sich zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen.

Tabelle 7: Ergebnisse der Inflammationsparameter. Die Daten werden als Median und Interquartilsabstand angegeben. *Abkürzungen: CRP: C-reaktives Protein, PCT: Procalcitonin, HMGB1: High-Mobility-Group-Protein B1, MPO: Myeloperoxidase.*

Laborchemisch bestimmte Inflammationsparameter		
Leukozyten (nL^{-1})	Präoperativ	7,6 (6 - 9)
	Postoperativ	10,3 (9,4 - 12,5)
	24 Stunden	11,5 (9,3 - 12,9)
	72 Stunden	7,4 (6,5 - 11,6)
CRP (mg/L)	Präoperativ	5,1 (1,7 - 10,3)
	Postoperativ	6,5 (2,5 - 11,4)
	24 Stunden	68 (46,6 - 88,5)
	72 Stunden	149 (115,7 - 200)
PCT (µg/L)	Präoperativ	-
	Postoperativ	0,6 (0,4 - 0,7)
	24 Stunden	0,7 (0,3 - 0,9)
	72 Stunden	0,8 (0,4 - 0,9)
Mittels ELISA bestimmte Parameter		
HMGB1 (pg/mL)	Präoperativ	31.126,8 (20.032,8 - 38.097,8)
	Postoperativ	25.343,5 (21.913,1 - 41.784,2)
	24 Stunden	28.800,1 (21.687,7 - 39.665,6)
	72 Stunden	21.780,6 (16.867 - 34.755,6)

MPO (ng/mL)	Präoperativ	367.381,5 (187.582 - 499.310,8)
	Postoperativ	480.111 (344.182,5 - 885.513,8)
	24 Stunden	713.023,1 (433.356,9 - 913.219,4)
	72 Stunden	351.888,5 (235.179,9 - 711.455,7)
Interleukin 8 (pg/mL)	Präoperativ	35 (20,4 - 49,8)
	Postoperativ	71,1 (58,2 - 129,1)
	24 Stunden	60,9 (41,2 - 110,4)
	72 Stunden	41,9 (27,1 - 63,6)

3.4.2 Korrelation der NET-Marker mit Inflammationsparametern

Weder für die etablierten laborchemischen Inflammationsparameter noch für die mittels ELISA bestimmten serologischen Parameter konnte ein signifikanter Zusammenhang mit dem Anteil NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Korrelation NET-assoziierter Neutrophiler mit Inflammationsparametern. *Abkürzungen: CRP: C-reaktives Protein, PCT: Procalcitonin, HMGB1: High-Mobility-Group-Protein B1, MPO: Myeloperoxidase.*

Parameter	**Korrelationskoeffizient**	***p*-Wert**
Leukozyten (nL^{-1})	-0,12	0,33
CRP (mg/L)	-0,12	0,34
PCT (µg/L)	0,12	0,68
HMGB1 (pg/mL)	-0,08	0,51
MPO (ng/mL)	-0,06	0,6
Interleukin 8 (pg/mL)	0,04	0,70

3.5 Koagulationsparameter

3.5.1 Überblick der Ergebnisse

Es wurden zu jedem Abnahmezeitpunkt eine Thrombelastometrie (ROTEM®) sowie eine Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Impedanzaggregometrie (Multiplate®) erhoben. Zusätzlich wurden im Routinelabor gängige Globalparameter der Gerinnung bestimmt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der Koagulationsparameter. Die Daten werden als Median und Interquartilsabstand angegeben. *Abkürzungen: CFT: Clot Formation Time, CT: Clotting Time, LI: Lysis Index, MCF: Maximum Clot Firmness, PTT: Partielle Thromboplastinzeit, INR: International Normalized Ratio.*

Thrombelastometrie		
EXTEM CFT (s)	Präoperativ	54 (45,5 - 63,3)
	Postoperativ	58 (47,8 - 72,3)
	24 Stunden	52 (48 - 62,5)
	72 Stunden	48 (40,5 - 55)
EXTEM CT (s)	Präoperativ	66 (60 - 69,3)
	Postoperativ	70,5 (60,8 - 73)
	24 Stunden	68 (57 - 77)
	72 Stunden	77 (62,5 - 85,5)
EXTEM LI60 (%)	Präoperativ	92,5 (91 - 94,3)
	Postoperativ	94,5 (93 - 96)
	24 Stunden	93 (90 - 93,8)
	72 Stunden	91 (88,5 - 93)
EXTEM MCF (mm)	Präoperativ	67 (66,3 - 73)
	Postoperativ	68 (66,5 - 71,3)
	24 Stunden	70 (67 - 71)
	72 Stunden	72 (70 - 73,5)
INTEM CFT (s)	Präoperativ	55 (46 - 65)
	Postoperativ	53 (50 - 64,5)
	24 Stunden	52 (46 - 66)
	72 Stunden	47 (42,5 - 55)
INTEM CT (s)	Präoperativ	186 (134 - 201,3)
	Postoperativ	158 (142,8 - 169,8)
	24 Stunden	171 (153 - 195)
	72 Stunden	172 (153,5 - 215)
INTEM LI60 (%)	Präoperativ	90,5 (89 - 92,3)

	Postoperativ	93 (91 - 95)
	24 Stunden	91 (89,3 - 93)
	72 Stunden	90 (86 - 91)
INTEM MCF (mm)	Präoperativ	65,5 (62 - 69,3)
	Postoperativ	66 (65 - 68)
	24 Stunden	66 (63 - 69)
	72 Stunden	68 (66,5 - 70,5)
FIBTEM CFT (s)	Präoperativ	130 (71 - 272,5)
	Postoperativ	340,5 (197,5 - 627,5)
	24 Stunden	178 (108,5 - 308,3)
	72 Stunden	65 (55,5 - 76,5)
FIBTEM CT (s)	Präoperativ	62 (57,5 - 69,3)
	Postoperativ	65,5 (55,5 - 71)
	24 Stunden	68 (61 - 78,5)
	72 Stunden	68 (58,5 - 79)
FIBTEM LI60 (%)	Präoperativ	100
	Postoperativ	100
	24 Stunden	100
	72 Stunden	100
FIBTEM MCF (mm)	Präoperativ	23 (19,8 - 29)
	Postoperativ	21 (17,8 - 23)
	24 Stunden	25 (21,5 - 26,5)
	72 Stunden	33 (30 - 34)
NATEM CFT (s)	Präoperativ	139,5 (106 - 150,3)
	Postoperativ	118,5 (87,8 - 201,5)
	24 Stunden	155 (131,5 - 236)
	72 Stunden	129,5 (94,3 - 220,3)
NATEM CT (s)	Präoperativ	529,5 (507,8 - 627,5)
	Postoperativ	474 (382 - 597,5)
	24 Stunden	611 (536 - 687)
	72 Stunden	497 (455 - 774,5)
NATEM LI60 (%)	Präoperativ	91,5 (90 - 94,3)
	Postoperativ	95 (93 - 96,3)
	24 Stunden	92 (90 - 93,3)
	72 Stunden	92 (89 - 96)
NATEM MCF (mm)	Präoperativ	61,5 (56,8 - 66,5)
	Postoperativ	61 (56,3 - 66)
	24 Stunden	61 (55,5 - 64,5)
	72 Stunden	69 (64,5 - 72,5)

Vollblut-Impedanzaggregometrie		
ASPI-Test (Einheiten)	Präoperativ	78 (58,5 - 94)
	Postoperativ	81,5 (61 - 92,8)
	24 Stunden	93 (46,8 - 113,5)
	72 Stunden	64 (44 - 78)
ADP-Test (Einheiten)	Präoperativ	64 (35,5 - 86)
	Postoperativ	74,5 (57,9 - 84,5)
	24 Stunden	78 (54,5 - 102)
	72 Stunden	50 (37 - 67)
TRAP-Test (Einheiten)	Präoperativ	96 (69 - 115,5)
	Postoperativ	111 (78,5 - 127,5)
	24 Stunden	104,5 (95,3 - 137,8)
	72 Stunden	76 (61,5 - 111,5)
Globale Gerinnungsparameter		
PTT (s)	Präoperativ	29 (26,5 - 30)
	Postoperativ	27 (25 - 30)
	24 Stunden	31 (28,3 - 35,8)
	72 Stunden	32 (28,8 - 35,3)
INR	Präoperativ	0,9 (0,9 - 1)
	Postoperativ	1 (1 - 1,1)
	24 Stunden	1,05 (1 - 1,1)
	72 Stunden	1,05 (0,9 - 1,1)
Thrombozyten (nL^{-1})	Präoperativ	254,5 (213,8 - 299,8)
	Postoperativ	226 (194 - 250)
	24 Stunden	214 (181 – 244,5)
	72 Stunden	213 (157 - 241,5)
Fibrinogen (g/L)	Präoperativ	-
	Postoperativ	3,32 (2,7 - 3,7)
	24 Stunden	3,44 (2,9 - 3,8)
	72 Stunden	4,9 (4,3 - 5,5)

3.5.2 Korrelation der NET-Marker mit Koagulationsparametern

Zwischen den bestimmten globalen Gerinnungsparametern Partielle Thromboplastinzeit (PTT), International Normalized Ratio (INR), Thrombozytenzahl und Fibrinogen und den durchflusszytometrisch bestimmten NET-assoziierten neutrophilen Granulozyten zeigte sich keine signifikante Korrelation.

Demgegenüber zeigten einzelne der mittels Thrombelastometrie erhobenen Daten Assoziationen mit den zellulären NET-assoziierten Parametern. Für die CFT ergaben sich in den drei Kanälen EXTEM, INTEM und FIBTEM positive Korrelationskoeffizienten, jedoch konnte das Signifikanzniveau nur für die EXTEM CFT erreicht werden (EXTEM CFT: $r = 0{,}27$, $p = 0{,}02$). Die CFT im FIBTEM verfehlte das Signifikanzniveau knapp (FIBTEM CFT: $r = 0{,}25$, $p = 0{,}05$). In denselben drei Kanälen konnte eine signifikante negative Korrelation der MCF mit dem Anteil NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten gezeigt werden (EXTEM MCF: $r = -0{,}28$, $p < 0{,}01$; INTEM MCF: $r = -0{,}32$, $p < 0{,}01$; FIBTEM MCF: $r = -0{,}25$, $p = 0{,}03$) (siehe Abbildung 16).

Für die mittels Impedanzaggregometrie bestimmten Parameter konnte keine signifikante Assoziation zu den zellulären NET-assoziierten Veränderungen festgestellt werden.

Die einzelnen Korrelationskoeffizienten und Signifikanzniveaus sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Korrelation der NET-Marker mit Koagulationsparametern. Signifikanzniveau: *: $p < 0{,}05$; **: $p < 0{,}01$. *Abkürzungen: CFT: Clot Formation Time, CT: Clotting Time, LI: Lysis Index, MCF: Maximum Clot Firmness, PTT: Partielle Thromboplastinzeit, INR: International Normalized Ratio.*

Parameter	**Korrelationskoeffizient**	***p*-Wert**
Thrombelastometrie		
EXTEM CFT (s)	0,27	0,02*
EXTEM CT (s)	0,12	0,30
EXTEM LI60 (%)	0,01	0,97
EXTEM MCF (mm)	-0,28	< 0,01**
INTEM CFT (s)	0,20	0,09
INTEM CT (s)	0,12	0,33
INTEM LI60 (%)	0,02	0,85
INTEM MCF (mm)	-0,32	< 0,01**
FIBTEM CFT (s)	0,25	0,05
FIBTEM CT (s)	0,00	0,99
FIBTEM LI60 (%)	0,06	0,59
FIBTEM MCF (mm)	-0,25	0,03*
NATEM CFT (s)	-0,01	0,91
NATEM CT (s)	-0,04	0,74
NATEM LI60 (%)	0,03	0,84
NATEM MCF (mm)	-0,09	0,46

Vollblut-Impedanzaggregometrie		
ASPI-Test (Einheiten)	-0,063	0,6
TRAP-Test (Einheiten)	-0,085	0,48
ADP-Test (Einheiten)	-0,07	0,56
Globale Gerinnungsparameter		
PTT (s)	-0,09	0,5
INR	0,08	0,52
Thrombozyten (nL^{-1})	-0,16	0,17
Fibrinogen (g/L)	-0,1	0,7

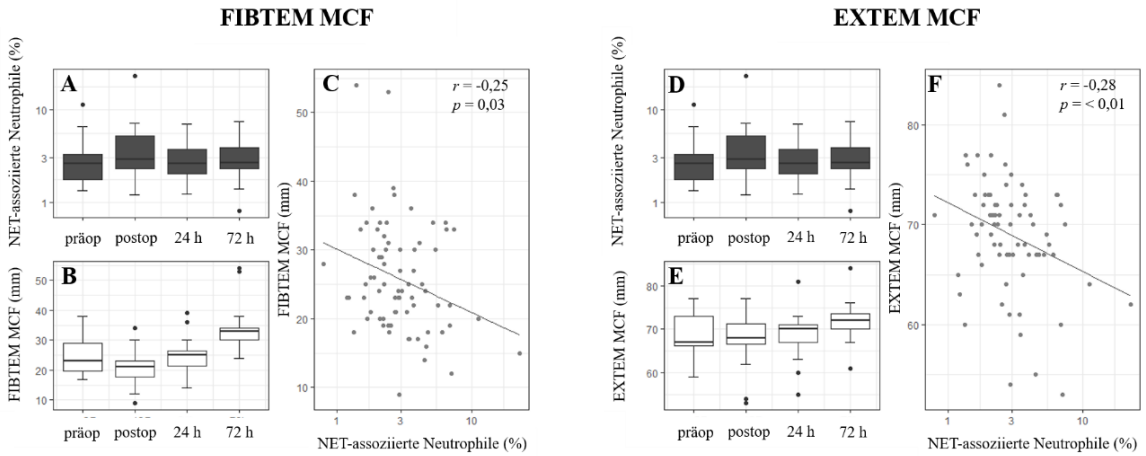


Abbildung 16: Korrelation der NET-Marker mit FIBTEM/EXTEM MCF. Die zeitlichen Verläufe des Anteils NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten (A, D) sowie der MCF im FIBTEM- (B) und EXTEM-Assay (E) sind als Boxplot-Diagramme dargestellt. Streudiagramme zeigen die Korrelation zwischen dem Anteil NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten und der FIBTEM-MCF (C) sowie der EXTEM-MCF (F). Angegeben sind der Pearson-Korrelationskoeffizient (*r*) und das Signifikanzniveau (*p*). *Abkürzungen: präop: präoperativ, postop: postoperativ, h: Stunden, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, MCF: Maximum Clot Firmness.*

3.6 Zelluläre NET-assoziierte Parameter und SOFA-Score

Zwischen den durchflusszytometrisch bestimmten NET-assoziierten neutrophilen Granulozyten und dem SOFA-Score konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (r = -0,02, p = 0,38). Aufgrund fehlender Parameter konnte der SOFA-Score präoperativ sowie unmittelbar postoperativ nicht bestimmt werden, sodass die Auswertung auf die Zeitpunkte 24 und 72 Stunden nach dem Eingriff beschränkt blieb.

Der zeitliche Verlauf des SOFA-Scores ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Perioperativer Verlauf des SOFA-Scores. Die Daten werden als Median und Interquartilsabstand angegeben. *Abkürzungen: SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment.*

Präoperativ	-
Postoperativ	-
24 Stunden	2 (0 - 3)
72 Stunden	3,5 (1,8 - 4,8)

4 Diskussion

Die vorliegende prospektive, explorative Beobachtungsstudie untersuchte, ob der Anteil NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen ansteigt. Die Ergebnisse werden im Kontext systemischer Inflammation sowie perioperativer Gerinnungsveränderungen eingeordnet. Diese Fragestellung ist klinisch und methodisch insofern relevant, als Daten zur durchflusszytometrischen Quantifizierung zirkulierender NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten im unmittelbaren postoperativen Verlauf solcher Eingriffe bislang nicht systematisch vorlagen.

Es zeigte sich unmittelbar postoperativ ein signifikanter, jedoch transienter Anstieg des Anteils zellulärer NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten. Dieser frühe postoperative Anstieg war nach 24 und 72 Stunden nicht mehr signifikant erhöht. Zudem bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den zellulären NET-assoziierten Parametern und etablierten klinischen Inflammationsmarkern sowie ausgewählten serologischen Surrogatparametern neutrophiler Aktivierung.

In Bezug auf die perioperative Hämostase ergaben sich keine Assoziationen zu globalen Gerinnungsparametern oder zur Thrombozytenfunktion in der Impedanzaggregometrie. Demgegenüber konnten Zusammenhänge zwischen zellulären NET-assoziierten Veränderungen und einzelnen thrombelastometrischen Parametern beschrieben werden.

4.1 Bewertung der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung von NETs

Zur Quantifikation von NETs stehen verschiedene methodische Ansätze zur Verfügung, darunter serologische Verfahren, DNA-basierte Assays sowie licht- und konfokalmikroskopische Techniken [21, 104]. Viele dieser Verfahren sind mit einer mehrstufigen Probenaufbereitung sowie einer nachgelagerten Auswertung verbunden und werden typischerweise mit einer zeitlichen Entkopplung von Probenentnahme und Analyse durchgeführt [136].

Im perioperativen Setting großer chirurgischer Eingriffe besteht jedoch ein besonderes Interesse an Verfahren, die eine zeitnahe und hochdurchsatzfähige Beurteilung der NETose im Verlauf ermöglichen. Daraus ergibt sich der Bedarf an praktikablen und

reproduzierbaren Methoden, die eine zeitlich engmaschige Erfassung NET-assoziierter Veränderungen im peripheren Blut erlauben.

Die Durchflusszytometrie bietet als Einzelzellmethode grundsätzlich die Möglichkeit, zelluläre Aktivierungs- und Strukturveränderungen neutrophiler Granulozyten schnell und objektiv zu erfassen [97]. Bislang fand sie jedoch nur in wenigen Studien Anwendung zur Quantifizierung NET-assoziierter Parameter. Methodische Arbeiten von Gavillet et al. sowie Lee et al. konnten zeigen, dass sich NET-assoziierte Veränderungen neutrophiler Granulozyten durch die Kombination spezifischer Marker durchflusszytometrisch erfassen lassen [53, 79]. Eine systematische Anwendung dieses Ansatzes im perioperativen Kontext großer chirurgischer Eingriffe lag jedoch bislang nicht vor.

Auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Studie das von Lee et al. etablierte durchflusszytometrische Protokoll adaptiert und im Hinblick auf seine Anwendbarkeit im zeitkritischen perioperativen Kontext modifiziert [79]. Die Anpassungen dienten dazu, einen bestehenden methodischen Ansatz an die Anforderungen des zeitkritischen perioperativen Settings anzupassen und seine prinzipielle klinische Anwendbarkeit zu prüfen.

Die von Lee et al. beschriebene Verwendung von unfixiertem Vollblut wurde beibehalten und durch den Einsatz direkt konjugierter monoklonaler Antikörper ergänzt. Der Einsatz direkt konjugierter Antikörper ist grundsätzlich mit einer Vereinfachung des Färbeprotokolls verbunden und kann zu einer Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale beitragen [86].

Eine weitere Anpassung betraf die Gating-Strategie. Anstelle von Isotypenkontrollen wurde ein FMO-Kontrollverfahren nach Blockade potenziell unspezifischer Bindungsstellen eingesetzt. Dieses Vorgehen berücksichtigt Fluoreszenz-Spillover- und Spreading-Effekte, die insbesondere bei Mehrfarben-Panels die Trennschärfe zwischen negativen und schwach positiven Populationen beeinflussen können [130]. Das FMO-Verfahren erlaubt damit eine realistischere Abschätzung der Hintergrundfluoreszenz und unterstützt eine reproduzierbare Abgrenzung der relevanten Zellpopulationen.

Vor der Analyse von Patientenproben wurde das Verfahren in Vorversuchen methodisch überprüft. Nach ex vivo-Stimulation von Vollblut mit PMA, einem etablierten Induktor der NETose [21], konnte die Induktion NET-assoziierter Veränderungen sowohl

durchflusszytometrisch als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nachvollzogen werden. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie diente dabei als qualitative Plausibilisierung, dass die MPO- und anti-H3-Histon-positiven Zellen neutrophile Granulozyten mit NETose-kompatiblen Veränderungen darstellen. Darüber hinaus zeigte sich in mehreren Versuchsreihen nach Erythrozytenlyse eine weitgehend intakte Zellmembran der Granulozyten, was durch eine geringe 7-AAD-Positivität belegt wurde.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die durchflusszytometrische Quantifizierung zellulärer NET-assoziierter Veränderungen im perioperativen Kontext prinzipiell durchführbar ist.

4.1.1 Limitationen der Methode

Eine wesentliche Einschränkung der Durchflusszytometrie zur Quantifikation von NETs ergibt sich aus der grundsätzlichen Methodik des Verfahrens. Die Durchflusszytometrie erfasst ausschließlich intakte Zellen und analysiert diese anhand definierter Kriterien wie Größe, Granularität und der Markierung mit spezifischen Antikörpern. Extrazelluläre NET-Fasern oder freie NET-Fragmente können daher nicht direkt detektiert werden. Die NETose wird folglich nur indirekt erfasst, indem zelluläre Merkmale gemessen werden, die mit bestimmten Phasen des NETose-Prozesses assoziiert sind [136].

Da zentrale NET-Komponenten wie Myeloperoxidase (MPO) oder Histon-assoziierte Strukturen bei vollständig gebildeten NET-Strukturen überwiegend extrazellulär lokalisiert sind, bildet die durchflusszytometrische Analyse primär aktivierte, noch zellulär erfassbare neutrophile Granulozyten ab [92].

Entsprechend werden insbesondere frühe Phasen der lytischen (suizidalen) NETose sowie initiale Schritte der vitalen NETose erfasst, in denen die Zellmembran noch weitgehend intakt ist [22, 105], während vollständig freigesetzte NET-Strukturen und deren Abbauprodukte methodisch kaum oder nicht erfasst werden [154]. Das Verfahren bildet somit nur einen Teilaspekt der NETose ab, sodass eine indirekte Einschätzung des NETose-Ausmaßes nur unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sensitivität für einzelne NETose-Formen und -Stadien möglich ist [136]. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, inwieweit die im Blut gemessenen NETose-assoziierten Zellen die tatsächliche NET-Aktivität im Organismus abbilden.

Darüber hinaus ist die Methode in hohem Maße von der gewählten Gating-Strategie abhängig. Morphologische Veränderungen neutrophiler Granulozyten im Verlauf der NETose, einschließlich Zellschwellung, veränderter Granularität sowie der Bildung größerer Zellaggregate, können dazu führen, dass NET-assoziierte Zellen außerhalb definierter Messfenster der Durchflusszytometrie liegen [22, 136]. In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich vitale Einzelzellen ausgewertet. Größere Zellaggregate wurden nicht in die Analyse einbezogen. Diese Vorgehensweise erhöht die methodische Stringenz und Vergleichbarkeit zwischen Proben, kann jedoch mit einer systematischen Untererfassung fortgeschrittener NETose-Stadien einhergehen.

Neben diesen konzeptionellen Einschränkungen ist die Durchflusszytometrie ein methodisch anspruchsvolles Verfahren. Die Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen NET-Quantifizierung ist in der Literatur nicht durchgehend gewährleistet, da bereits geringe Unterschiede in Probenvorbereitung, die Auswahl und Kombination von Antikörpern und Fluorochromen sowie die Gating-Strategie zu deutlich abweichenden Ergebnissen führen können [136, 154]. Die Methode reagiert somit empfindlich auf methodische Details, sodass eine Vergleichbarkeit zwischen Studien nicht automatisch gegeben ist.

Ein weiterer kritischer Aspekt betrifft die klinische Aussagekraft der durchflusszytometrisch erfassten NETose-assoziierten Neutrophilen im peripheren Blut. Die pathophysiologisch relevanten Effekte der NETose treten überwiegend lokal, im Bereich der Kapillaren, auf [59, 81]. Entsprechend spiegelt die durchflusszytometrische Quantifizierung im peripheren Blut die lokale NET-Aktivität nur eingeschränkt wider und stellt primär einen Surrogatparameter dar [136].

Schließlich ist die geringe ex vivo-Stabilität neutrophiler Granulozyten zu berücksichtigen. Diese neigen bereits kurz nach der Blutentnahme zur spontanen Aktivierung bzw. können durch Probenmanipulation aktiviert werden [6]. Daher müssen Vollblutproben unmittelbar verarbeitet werden, eine Lagerung oder Kryokonservierung ist, abgesehen von Serumproben, nicht möglich [78]. Die zeitkritische Probenhandhabung erschwert eine standardisierte Durchführung und limitiert die praktische Anwendbarkeit des Verfahrens. Zwar wurden die Proben in der vorliegenden Studie unmittelbar nach Blutentnahme verarbeitet, geringfügige Unterschiede im Verarbeitungszeitpunkt lassen sich methodisch jedoch nicht vollständig ausschließen.

4.2 Interpretation der experimentellen Ergebnisse

4.2.1 Durchflusszytometrische Quantifikation der NETs

In der vorliegenden Studie zeigte sich unmittelbar postoperativ ein signifikanter Anstieg des Anteils NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut, während sich die Werte nach 24 und 72 Stunden nicht mehr signifikant vom präoperativen Ausgangsniveau unterschieden. Diese frühe und transiente Dynamik spricht dafür, dass NET-assoziierte zelluläre Veränderungen vor allem im unmittelbaren perioperativen Zeitraum auftreten und rasch wieder abklingen.

Das zugrunde liegende durchflusszytometrische Analyseprinzip zur Erfassung NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten wurde in mehreren methodischen Arbeiten hinsichtlich Spezifität und Validität untersucht [53, 79, 154]. Vergleichbare Daten aus dem unmittelbaren perioperativen Kontext großer abdominalchirurgischer Eingriffe liegen bislang nur in sehr begrenztem Umfang vor.

Serologische NET-Marker wurden hingegen in mehreren chirurgischen Studien untersucht. Diese Surrogatparameter bilden zwar andere Dimensionen der NETose ab und sind somit nicht direkt vergleichbar, zeigen in verschiedenen chirurgischen Kollektiven aber ebenfalls einen postoperativen Anstieg der NET-Marker.

In der prospektiven Arbeit von Liu et al. wurden bei pädiatrischen Patienten nach Lebertransplantation NET-Marker im Serum bestimmt. Dabei zeigte sich 24 Stunden postoperativ ein ausgeprägter und signifikanter Anstieg, wobei frühere Zeitpunkte nicht erfasst wurden [88]. Auch in Studien von Zheng et al. und Ivey et al. kam es bei Patientinnen und Patienten nach Pankreatektomie zu postoperativen Anstiegen der Serum-NET-Parameter [63, 155], wobei die höchsten Werte typischerweise erst an den Tagen 3 bis 4 erreicht wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete sehr frühe und bereits innerhalb von 24 bis 72 Stunden wieder abklingende Aktivierung unterscheidet sich somit deutlich von den dargestellten zeitlichen Verläufen serologischer Marker. Diese Unterschiede lassen sich zum einen durch die Heterogenität der untersuchten Populationen erklären (insbesondere das pädiatrische Kollektiv bei Liu et al.) und zum anderen durch die unterschiedlichen gewählten Messansätze begründen. Serologische NET-Komponenten bilden vor allem vollständig freigesetzte NET-Strukturen ab, während durchflusszytometrische

Messungen primär frühe zelluläre Veränderungen neutrophiler Granulozyten widerspiegeln. Daher sind Unterschiede in der zeitlichen NET-Kinetik zwischen zellulären und serologischen Markern plausibel.

Der in dieser Kohorte beobachtete Anstieg des Anteils NET-assoziierter Neutrophiler zwischen präoperativer und unmittelbarer postoperativer Messung war zwar statistisch signifikant, im absoluten Ausmaß jedoch eher moderat. Eine mögliche Erklärung liegt in den Charakteristika des untersuchten Patientenguts. In 65 % der Fälle lag eine maligne Tumorerkrankung vor. Mehrere Arbeiten konnten bei Patientinnen und Patienten mit kolorektalem Karzinom, Pankreaskarzinom oder Magenkarzinom bereits präoperativ erhöhte serologische NET-Marker nachweisen [99, 107, 115, 156]. Unter Berücksichtigung der nicht direkt vergleichbaren Messmethodik könnte eine vorbestehende erhöhte NET-Aktivität den präoperativen Ausgangswert in dieser Kohorte angehoben und den perioperativen Effekt zumindest teilweise maskiert haben.

Darüber hinaus ist es denkbar, dass bei einem Teil der untersuchten, schwerkranken Probanden bereits präoperativ Veränderungen der neutrophilen Granulozyten bestehen, die zu einer verminderten zusätzlichen Aktivierbarkeit führen. In Studien zur Sepsis wurde eine solche reduzierte NETose nach ex vivo Stimulation der Granulozyten beschrieben [58, 108]. Eine Übertragung dieses Mechanismus auf das perioperative Setting ist nicht ohne weiteres möglich, kann aber als Hypothese für zukünftige Forschung dienen.

Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass NET-assoziierte Prozesse überwiegend lokal ablaufen und eine periphere Messung zellulärer NET-assoziierter Veränderungen diese Prozesse möglicherweise nur eingeschränkt widerspiegelt, ohne das tatsächliche Ausmaß der NET-assoziierten Prozesse vollständig abzubilden [59].

Methodisch ist zudem zu berücksichtigen, dass unterschiedliche NET-Detektionsverfahren teils stark divergierende Ergebnisse liefern können. Wie Stoimenou et al. zeigen konnten, liefern unterschiedliche Verfahren, wie etwa serologische NET-Marker, immunfluoreszenzbasierte NET-Detektion oder zelluläre Aktivierungsmarker, selbst beim gleichen Probenmaterial teils deutlich abweichende Ergebnisse [136]. Dies verdeutlicht, dass die verschiedenen Methoden unterschiedliche Aspekte der NETose abbilden [104] und ein direkter Vergleich zwischen Studien nur im Kontext der verwendeten Messmethodik sinnvoll möglich ist.

Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass große abdominalchirurgische Eingriffe mit einem Anstieg NET-assoziierter Neutrophiler im peripheren Blut einhergehen. Der signifikante Anstieg unmittelbar nach der Operation bestätigt diesen Zusammenhang, auch wenn die Aktivierung nur vorübergehend nachweisbar war. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die biologischen Hintergründe und die klinische Relevanz dieser Beobachtung genauer einzuordnen.

4.2.2 Serologische Inflammationsparameter

Zur ergänzenden Einordnung der postoperativen systemischen Inflammation wurden neben den zellulären NET-assoziierten Parametern auch etablierte klinische Entzündungsparameter sowie ausgewählte humorale Inflammationsmarker untersucht. Untersucht wurde, ob die etablierten klinischen Entzündungsparameter Leukozytenzahl, CRP und PCT sowie die ausgewählten serologischen Marker, die mittels ELISA bestimmt wurden, mit den früh auftretenden zellulären NET-assoziierten Veränderungen korrespondieren. Diese serologischen Marker (HMGB1, MPO und IL-8) stellen zwar keine spezifischen NET-Marker dar, werden in der Literatur jedoch im Zusammenhang mit neutrophiler Aktivierung und NET-assoziierten Prozessen beschrieben [9, 87, 125, 138].

Im Gegensatz zu den zellulären NET-assoziierten Parametern, die in dieser Arbeit einen frühen postoperativen Peak mit rascher Normalisierung zeigten, wiesen die etablierten Inflammationsparameter Leukozytenzahl, CRP und PCT erwartungsgemäß deutlich abweichende zeitliche Verläufe auf. Die Leukozytenzahl stieg unmittelbar postoperativ an, erreichte nach 24 Stunden ihr Maximum und normalisierte sich bis 72 Stunden wieder. Dieses Muster entspricht der bekannten postoperativen Leukozytose nach großen chirurgischen Eingriffen [150]. Das CRP zeigte dagegen einen verzögerten Anstieg mit den höchsten Werten am dritten postoperativen Tag und folgt damit der beschriebenen Kinetik dieses Akut-Phase-Proteins [150]. Für PCT ergaben sich lediglich geringe postoperative Veränderungen, was im nicht-infektiösen perioperativen Setting plausibel ist, da dieser Marker primär zur Detektion bakterieller Infektionen und systemischer Sepsis etabliert ist [14, 47] und bei steriler Entzündungsreaktion häufig nur moderat ansteigt [10].

Aufgrund der unterschiedlichen Kinetiken und biologischen Bezugsebenen überrascht das Ausbleiben signifikanter Korrelationen mit den zellulären NET-assoziierten Parametern nicht.

IL-8 wird als früh freigesetztes proinflammatorisches Zytokin in mehreren Arbeiten als relevanter Parameter der perioperativen Inflammation und als potenzieller Biomarker diskutiert, wobei der in der vorliegenden Kohorte beobachtete Anstieg der IL-8-Spiegel unmittelbar postoperativ sowie nach 24 Stunden den in der Literatur beschriebenen perioperativen Verläufen entspricht [66, 109]. Trotz dieser zeitlich überlappenden frühen postoperativen Aktivierung ließ sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen den IL-8-Spiegeln und den zellulären NET-assoziierten Parametern nachweisen.

Als zentrales proinflammatorisches Chemokin spielt IL-8 eine indirekte Rolle im Kontext der NETose [149]. Es kann als früher Mediator der neutrophilen Aktivierung über intrazelluläre Mitogen-activated-protein-kinase- (MAPK)-Signalwege NET-Freisetzung induzieren [28, 129]. Diese Signalwege sind jedoch hochgradig kontextabhängig und nicht allein durch die systemische IL-8-Konzentration determiniert [28]. Serologisch bestimmte IL-8-Spiegel erlauben daher keine direkte Aussage über die Aktivierung dieser intrazellulären Signalwege oder über das tatsächliche Ausmaß der NETose.

In der vorliegenden Studie zeigte sich sowohl unmittelbar postoperativ als auch nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg der MPO-Plasmaspiegel. MPO ist ein zentraler Bestandteil von NET-Strukturen und spielt eine aktive Rolle bei der Umwandlung von Chromatin in NETs [27]. Für MPO gibt es für abdominalchirurgische Kollektive keine belastbaren Daten, während vergleichbare perioperative Verläufe insbesondere aus der Herz- und Thoraxchirurgie beschrieben sind [3, 103].

Eine signifikante Korrelation zwischen MPO-Spiegeln und zellulären NET-assoziierten Parametern ließ sich jedoch nicht nachweisen. Dies ist pathophysiologisch erklärbar, da MPO nicht ausschließlich im Rahmen der NETose freigesetzt wird, sondern auch bei klassischer neutrophiler Degranulation, oxidativem Stress [30, 68] oder infolge pharmakologischer Einflüsse wie einer systemischen Heparingabe [11]. Serologisch erhöhte MPO-Spiegel reflektieren somit primär eine unspezifische neutrophile Aktivierung und lassen keine verlässliche Unterscheidung zwischen NET-Freisetzung und anderen Aktivierungsmechanismen zu [136].

HMGB1 ist ein nukleäres Protein, das über passive Freisetzung im Rahmen von Nekrose, aktive Sekretion durch Immunzellen sowie im Kontext der NETose freigesetzt werden kann [33, 149]. Extrazellulär fungiert HMGB1 als DAMP und reflektiert insbesondere sterile Inflammation und Gewebeschädigung [7, 142, 146]. In der vorliegenden Studie zeigten sich jedoch keine signifikanten perioperativen Veränderungen der HMGB1-Spiegel.

Ein postoperativer Anstieg wurde nicht beobachtet. Dies könnte u.a. dadurch bedingt sein, dass HMGB1 zwar primär als unspezifischer Marker das Ausmaß von Gewebeschädigung widerspiegelt, aber auch stark vom zugrunde liegenden Krankheitsbild abhängt [33, 142]. In der untersuchten Kohorte lag ein hoher Anteil maligner Erkrankungen vor, für die bereits präoperativ erhöhte HMGB1-Spiegel beschrieben sind [36]. Zwar kann HMGB1 als proinflammatorischer Stimulus unter bestimmten Bedingungen die NET-Bildung fördern [138, 149], ist jedoch aufgrund seiner fehlenden Spezifität als serologischer Marker nicht geeignet, das Ausmaß zellulärer NET-assoziierter Prozesse verlässlich abzubilden.

Zusammengefasst erfasst keiner der analysierten serologischen Inflammationsparameter die mittels Durchflusszytometrie bestimmten frühen Aktivierungs- und Strukturveränderungen neutrophiler Granulozyten direkt und erlaubt keine verlässliche Aussage zur zellulären NET-Aktivität. Entsprechend zeigte sich keine signifikante Assoziation mit den zellulären NET-assoziierten Parametern, sodass die Subhypothese H2 nicht bestätigt werden konnte.

4.2.3 Koagulationsparameter

Aufbauend auf dem Konzept der Immunothrombose [44] wurde untersucht, ob sich zelluläre NET-assoziierte Veränderungen im perioperativen Verlauf in globalen oder funktionellen Gerinnungsparametern widerspiegeln.

Weder für die globalen Gerinnungsparameter noch für die mittels Impedanzaggregometrie bestimmten Thrombozytenfunktionsparameter zeigte sich eine signifikante Beziehung mit den zellulären NET-assoziierten Veränderungen.

Das Ausbleiben von Assoziationen zu den betrachteten Gerinnungsparametern ist vor allem auf die unterschiedlichen methodischen Ansatzpunkte der verwendeten

Messverfahren zurückzuführen. INR und PTT erfassen die Zeit bis zur initialen Gerinnselbildung und erlauben daher nur begrenzte Aussagen zu einzelnen Abschnitten der plasmatischen Gerinnungskaskade. Prozesse, die über frühe, funktionelle oder lokale Veränderungen der Gerinnung vermittelt werden, werden durch diese Parameter nur eingeschränkt abgebildet [133, 135]. Auch die Bestimmung von Fibrinogen und Thrombozytenzahl bildet primär quantitative Aspekte einzelner Gerinnungskomponenten ab, während funktionelle oder strukturelle Veränderungen der Gerinnselbildung, wie sie beispielsweise im Kontext NET-vermittelter Mechanismen diskutiert werden [50], durch diese Parameter nicht erfasst werden [13, 134].

Die Impedanzaggregometrie ist ein Verfahren zur funktionellen Beurteilung der agonisteninduzierten Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten in antikoaguliertem Vollblut unter statischen Bedingungen und eignet sich besonders zur Detektion der Effekte von Thrombozytenaggregationshemmern [70]. NETs können zwar als Thrombozytenaktivatoren fungieren, vermitteln ihre Effekte jedoch über Mechanismen, die sich grundlegend von den agonisteninduzierten Aggregationswegen unterscheiden, die in der Impedanzaggregometrie geprüft werden [50].

Generell sind NET-vermittelte Effekte auf die Hämostase vor allem lokal und kontextabhängig [81, 95], was das Ausbleiben einer Assoziation zu den betrachteten Gerinnungsparametern zusätzlich erklärt.

Im Gegensatz zu den übrigen Gerinnungsparametern zeigten sich jedoch für einzelne thrombelastometrische Parameter Zusammenhänge mit den zellulären NET-assoziierten Veränderungen. Die Thrombelastometrie erlaubt als funktionelles Verfahren die Beurteilung der dynamischen Gerinnselbildung unter Berücksichtigung plasmatischer, zellulärer und fibrinbasierter Komponenten. Damit werden Aspekte der Hämostase erfasst, die durch klassische Gerinnungsparameter nicht dargestellt werden [151].

Für die CFT zeigten sich in den drei Kanälen (EXTEM, INTEM, FIBTEM) positive Korrelationskoeffizienten, wobei statistische Signifikanz nur für EXTEM erreicht wurde. Die CFT beschreibt die Geschwindigkeit der Gerinnselbildung nach initialer Fibrinbildung. In denselben Kanälen war die MCF signifikant negativ mit den zellulären NET-assoziierten Parametern korreliert. Die MCF spiegelt die maximale mechanische Stabilität des Gerinnsels wider. Damit waren CFT und MCF die einzigen untersuchten

Gerinnungsmarker, die einen messbaren Zusammenhang mit zellulären NET-assoziierten Veränderungen zeigten.

Da es sich um die erste Beschreibung dieser Beobachtung handelt und die vorliegende Studie nicht auf die Untersuchung zugrunde liegender Kausalmechanismen ausgelegt war, bleiben die Ursachen dieser Assoziation unklar.

Vor dem Hintergrund, dass NETs mit Fibrin und Thrombozyten interagieren und damit die Gerinnselarchitektur und -festigkeit beeinflussen können [75, 144], ist zu erwarten, dass potenzielle NET-Effekte eher in viskoelastischen Vollblutverfahren als in plasmatischen Globaltests sichtbar werden.

H3 wurde in der ursprünglich erwarteten prokoagulatorischen Richtung nicht bestätigt. Die beobachteten Assoziationen mit thrombelastometrischen Parametern liefern dennoch einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen.

4.2.4 Zelluläre NET-Parameter und perioperative Organdysfunktion

Große abdominalchirurgische Eingriffe gehen häufig mit einer perioperativen Organdysfunktion einher [112]. Ein häufig verwendeter klinischer Score zur Beschreibung von Organdysfunktion ist der SOFA-Score, der ursprünglich zur Erfassung sepsisassoziierter Organdysfunktion validiert wurde und das Ausmaß manifester Funktionsstörungen mehrerer Organsysteme in einem zusammengesetzten Score abbildet [132]. Im perioperativen Setting können jedoch auch sterile Entzündungsreaktionen mit vorübergehenden Organfunktionsstörungen einhergehen, ohne dass eine infektiöse Genese vorliegt [112, 127]. Entsprechend eignet sich der SOFA-Score im perioperativen Verlauf nur eingeschränkt zur Differenzierung zwischen steriler Inflammation und Sepsis, stellt jedoch weiterhin einen klinisch relevanten Parameter zur Beschreibung perioperativer Organdysfunktion dar [112, 127].

Alle in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten erfüllten postoperativ die SIRS-Kriterien, da dies als Einschlusskriterium definiert war, sodass eine inflammatorische Aktivierung einen erwartbaren Bestandteil des perioperativen Verlaufs darstellte. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob zelluläre NET-Parameter über die Abbildung reiner Inflammation hinaus auch mit dem Ausmaß perioperativer Organdysfunktion assoziiert sind.

Es wurde explorativ untersucht, ob zwischen den durchflusszytometrisch bestimmten zellulären NET-assoziierten Veränderungen neutrophiler Granulozyten und dem SOFA-Score ein Zusammenhang besteht.

In der vorliegenden Studie ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen den zellulären NET-assoziierten Parametern und dem SOFA-Score nachweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der SOFA-Score präoperativ sowie unmittelbar postoperativ aufgrund unzureichender Datenlage nicht berechnet werden konnte und die Analyse somit auf spätere Zeitpunkte beschränkt war.

Während der SOFA-Score im Verlauf zwischen dem ersten und dritten postoperativen Tag einen Anstieg zeigte, waren die zellulären NET-assoziierten Neutrophilen ausschließlich im unmittelbaren postoperativen Zeitraum signifikant erhöht.

Diese unterschiedliche zeitliche Kinetik ist plausibel. Die durchflusszytometrisch erfassten zellulären NET-assoziierten Veränderungen mit ihrer frühen und transienten Erhöhung bilden primär frühe Aktivierungs- und Strukturveränderungen neutrophiler Granulozyten ab. Der SOFA-Score erfasst hingegen als klinischer Summenparameter das Ausmaß manifester Organdysfunktion, welches typischerweise durch multifaktorielle und zeitlich verzögert auftretende Prozesse geprägt ist. Eine direkte Beziehung zwischen den beiden Ebenen ist daher nicht unbedingt zu erwarten.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass zelluläre NET-assoziierte Parameter in diesem Setting keine geeigneten Marker zur Abbildung perioperativer Organdysfunktion darstellen und insbesondere nicht zur Differenzierung zwischen steriler Inflammation und infektiös bedingter Organdysfunktion herangezogen werden können.

Das Ausbleiben einer Korrelation bedeutet jedoch nicht, dass NET-assoziierte zelluläre Mechanismen im Rahmen der perioperativen Inflammation keine Rolle spielen, sondern verdeutlicht vielmehr die unterschiedlichen Ebenen der erfassten Prozesse sowie den explorativen Charakter dieser Fragestellung. Die vorliegende Studie war nicht darauf ausgelegt, eine klinische Diskrimination zwischen SIRS und Sepsis zu untersuchen, und erlaubt aufgrund ihres explorativen Designs keine belastbaren Aussagen in dieser Hinsicht. Entsprechende Fragestellungen sollten Gegenstand zukünftiger prospektiver Studien sein, die gezielt auf definierte infektiöse Komplikationen und klinisch relevante Endpunkte ausgerichtet sind.

4.3 Limitationen

Die Interpretation der vorliegenden Studienergebnisse erfolgt unter Berücksichtigung verschiedener Limitationen. Das prospektive, monozentrische, explorative und nicht-interventionelle Beobachtungsdesign dieser Studie ist nicht geeignet, kausale Zusammenhänge zu belegen. Daher erlauben die dargestellten Assoziationen ausschließlich hypothesengenerierende Schlussfolgerungen.

Zudem schränkt die begrenzte Fallzahl die statistische Aussagekraft einzelner Analysen ein und könnte dazu beigetragen haben, dass insbesondere moderate Effekte nicht detektiert wurden.

Durch das Einschlusskriterium von mindestens zwei SIRS-Kriterien wurden ausschließlich Patientinnen und Patienten mit bereits klinisch fassbarer systemischer Reaktion erfasst. Dies entspricht der Zielsetzung der Arbeit. Aussagen zu unkomplizierten postoperativen Verläufen ohne SIRS sind daraus jedoch nicht ableitbar.

Die Studienpopulation umfasste heterogene große abdominalchirurgische Eingriffe mit unterschiedlichen OP-Charakteristika (z.B. OP-Dauer, Blutverlust), die nicht unbedingt miteinander vergleichbar sind. Dies erhöht das Risiko relevanter Verzerrung durch Störfaktoren. Aufgrund der Fallzahl war eine belastbare Adjustierung für solche Einflussvariablen nicht möglich.

Neben eingriffsbedingten Unterschieden sind auch patienten- und behandlungsbezogene Einflussfaktoren zu berücksichtigen. Das untersuchte Kollektiv umfasste Patientinnen und Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen, einem hohen Anteil maligner Vorerkrankungen sowie variablen intensivmedizinischen Behandlungsverläufen. Diese Faktoren konnten im Rahmen des Beobachtungsdesigns nicht kontrolliert werden und könnten sich auf die untersuchten NET-assoziierten Parameter ausgewirkt haben.

Insbesondere perioperative antikoagulatorische Therapien stellen einen potenziell relevanten Einflussfaktor auf NET-assoziierte Parameter dar. In der untersuchten Kohorte erhielten alle Patientinnen und Patienten präoperativ eine prophylaktische Heparinisierung, die in einem Großteil der Fälle auch im weiteren postoperativen Verlauf fortgeführt wurde. Experimentelle und klinische Daten deuten darauf hin, dass eine frühe Antikoagulation die NET-Freisetzung modulieren bzw. reduzieren kann [20, 50, 152].

Vor diesem Hintergrund kann nicht ausgeschlossen werden, dass Heparinisierung zu einer Abschwächung oder zeitlichen Verschiebung messbarer NET-assoziierter Veränderungen beigetragen hat. Auch der Einfluss weiterer perioperativer Faktoren auf die untersuchten NET-assoziierten Parameter konnte im Rahmen des Studiendesigns nicht systematisch kontrolliert werden.

Eine weitere Limitation betrifft die zeitliche Auflösung der Probenentnahme. Obwohl mehrere perioperative Zeitpunkte untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass relevante NET-assoziierte Veränderungen auch außerhalb dieser Intervalle auftraten. Insbesondere sehr frühe oder verzögert einsetzende immunologische Prozesse könnten durch das gewählte Zeitfenster nur unvollständig erfasst worden sein.

Neben den genannten design- und settingbedingten Einschränkungen sind auch methodische Limitationen der durchflusszytometrischen Quantifikation zellulärer NET-assoziierter Veränderungen bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, die bereits in Kapitel 4.1.1 diskutiert wurden.

5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit erweitert das Verständnis früher perioperativer Dynamiken zellulärer NET-assoziierter Veränderungen im Kontext der postoperativen Inflammation und deren mögliche Beziehung zu funktionellen Gerinnungsparametern. Aufgrund des explorativen Studiendesigns sind die Befunde hypothesengenerierend. Daraus ergeben sich mehrere Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen.

Als wichtigster Schritt sollten zur externen Validierung die beobachteten frühen und transienten perioperativen Veränderungen zellulärer NET-assoziierter Parameter in größeren, möglichst multizentrischen Kollektiven repliziert werden. Dabei sollten insbesondere die Reproduzierbarkeit geprüft und relevante Einflussfaktoren (Patientenmerkmale, Eingriffscharakteristika) systematisch berücksichtigt werden. Dies ist erforderlich, um die biologische Bedeutung der beobachteten Dynamik besser einordnen zu können.

Methodisch sollten zukünftige Studien den NET-Nachweis um ergänzende Verfahren erweitern. Die Kombination durchflusszytometrischer NET-Parameter mit serologischen NET-Komponenten oder bildgebenden Verfahren würde erlauben, unterschiedliche Stadien der NETose differenzierter abzubilden und lokale von systemischen Effekten besser zu trennen [104, 136]. Insbesondere die parallele Untersuchung lokaler und peripher bestimmter NET-Parameter ist ein methodisch naheliegender Ansatz, um eine mögliche Diskrepanz zwischen diesen Kompartimenten zu charakterisieren.

Ein weiterer Ansatz sind standardisierte und (teil-)automatisierte Auswertungsverfahren, um die Interpretation zellbasierter NET-assoziierter Veränderungen in Zukunft zu erleichtern. In der Zytometrie bereits etablierte automatisierte Analyseansätze wie zum Beispiel algorithmusgestütztes Gating oder clustering-basierte Methoden zur Populationsidentifikation könnten dazu beitragen, die Variabilität zwischen Untersuchern zu reduzieren und die Auswertung zu beschleunigen [1, 122]. Dadurch lässt sich die Nutzung durchflusszytometrischer Daten auch in zeitkritischen klinischen Kontexten erleichtern.

Die explorativen Zusammenhänge mit einzelnen thrombelastometrischen Parametern sprechen dafür, in Folgestudien gezielt thrombelastometrische Diagnostik einzubeziehen. Damit ließe sich die Rolle NET-assoziierter Mechanismen im perioperativen Setting weiter eingrenzen, ohne kausale Schlüsse zu ziehen [75, 144].

Zusätzlich wäre es von Interesse, die hier untersuchten zellulären NET-Parameter in klar definierten klinischen Subgruppen, über den perioperativen Verlauf hinweg sowie unter Einbeziehung zusätzlicher früher Messzeitpunkte zu analysieren. Dadurch könnten potenzielle Zusammenhänge mit postoperativen Komplikationen und dem Verlauf der systemischen Inflammation differenzierter erfasst werden.

Die Ergebnisse erlauben zwar keine klinische Diskriminierung zwischen steriler Inflammation und Sepsis, sie liefern jedoch eine Grundlage, um in Folgestudien gezielt nach prädiktiven oder mechanistischen Zusammenhängen zu suchen. Die beobachtete frühe und transiente Dynamik zellulärer NET-assoziierter Veränderungen legt nahe, dass diese Parameter weniger als diagnostische Marker einer manifesten Sepsis, sondern vielmehr als Indikatoren einer frühen Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu interpretieren sind. Ob frühe NET-assoziierte Veränderungen in Zukunft darüber hinaus zur Verlaufs- oder Risikoabschätzung geeignet sind, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden und sollte in Folgestudien gezielt untersucht werden.

6 Zusammenfassung

In dieser prospektiven, explorativen und monozentrischen Beobachtungsstudie wurden perioperative Veränderungen zellulärer NET-assoziierter Parameter neutrophiler Granulozyten bei 20 erwachsenen Patientinnen und Patienten nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen untersucht. Diese Eingriffe sind mit einer ausgeprägten Aktivierung des angeborenen Immunsystems verbunden, wobei NETs zunehmend als relevante Akteure steriler Inflammation und potenzielle Modulatoren hämostatischer Prozesse diskutiert werden [34, 44, 104]. Postoperativ erfüllten alle Probanden die Kriterien eines SIRS, welches als Einschlusskriterium definiert war. Ziel war es, die perioperative Dynamik zellulärer NET-assoziierter Veränderungen zu charakterisieren, deren potenzielle Bezüge zur perioperativen Inflammation und Hämostase explorativ zu untersuchen sowie die klinische Anwendbarkeit eines durchflusszytometrischen Ansatzes zu evaluieren, der nach Bestätigung der methodischen Machbarkeit eingesetzt wurde.

Im perioperativen Verlauf zeigte sich ein signifikanter postoperativer Anstieg des Anteils NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten mit früher, transienter Dynamik, die sich deutlich von den zeitlichen Verläufen etablierter serologischer Inflammationsmarker unterschied. Entsprechend ließ sich weder zu klassischen Entzündungsparametern noch zu den serologischen NET-assoziierten Markern IL-8, MPO und HMGB1 eine signifikante Korrelation nachweisen, was angesichts unterschiedlicher zeitlicher und biologischer Bezugsebenen plausibel erscheint. Im Hinblick auf die Hämostase zeigte sich keine Assoziation zu globalen Gerinnungsparametern oder zur Thrombozytenfunktion, während erstmals Zusammenhänge mit einzelnen thrombelastometrischen Parametern beobachtet wurden. Ein Zusammenhang zwischen zellulären NET-assoziierten Parametern und perioperativer Organdysfunktion, erfasst mittels SOFA-Score, ließ sich nicht nachweisen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass zelluläre NET-assoziierte Veränderungen primär frühe Aktivierungsprozesse der angeborenen Immunantwort widerspiegeln und nicht geeignet sind, das Ausmaß perioperativer Organdysfunktion oder eine klinische Diskrimination zwischen steriler Inflammation und Sepsis abzubilden. Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse die Bedeutung zellulärer NET-assoziierter Veränderungen im perioperativen Kontext und liefern Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zur Rolle von NETs.

7 Summary

In this prospective, exploratory, single-center observational study, perioperative changes in cellular NET-associated parameters of neutrophil granulocytes were investigated in 20 adult patients undergoing major abdominal surgery. Such surgical procedures are accompanied by pronounced activation of the innate immune system, and NETs are increasingly discussed as relevant mediators of sterile inflammation and potential modulators of hemostatic processes [34, 44, 104]. All included patients fulfilled the criteria of a SIRS, which was defined as an inclusion criterion. The aim of this study was to characterize the perioperative dynamics of cellular NET-associated changes, to explore their potential associations with perioperative inflammation and hemostasis, and to evaluate the clinical applicability of a flow cytometry–based approach for the quantification of these cellular alterations. Following confirmation of methodological feasibility in preliminary experiments, a flow cytometric method was applied to quantify NET-associated neutrophil changes in peripheral blood.

During the perioperative course, a significant postoperative increase in the proportion of NET-associated neutrophils was observed, characterized by an early and transient dynamic pattern that differed markedly from the time courses of established serological inflammatory markers. Accordingly, no significant correlations were found with routine inflammatory parameters or with the serological NET-associated markers IL-8, MPO, and HMGB1, which appears plausible given differences in biological reference levels and temporal kinetics. With respect to hemostasis, no associations were detected with global coagulation parameters or platelet function assessed by impedance aggregometry. In contrast, associations with selected thromboelastometric parameters were observed for the first time.

No relationship was found between cellular NET-associated parameters and perioperative organ dysfunction as assessed by the SOFA score. These findings suggest that cellular NET-associated changes primarily reflect early activation processes of the innate immune response and are not suitable for assessing the extent of perioperative organ dysfunction or for clinically discriminating between sterile postoperative inflammation and sepsis. Overall, these findings support the relevance of cellular NET-associated alterations in the perioperative setting and provide a rationale for further investigations into the role of NETs in perioperative inflammation and hemostasis.

8 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD ..... 7-Aminoactinomycin D
ADP ..... Adenosindiphosphat
ASA ..... American Society of Anesthesiologists
ASPI ..... Arachidonic Acid stimulation
AU ..... Aggregationseinheiten
AUC ..... Area under the Curve
BGA ..... Blutgasanalyse
BMI ..... Body-Mass-Index
BSA ..... Bovines Serumalbumin
CD15 ..... Cluster of Differentiation 15
CFT ..... Clot Formation Time
COX ..... Cyclooxygenase
CRP ..... C-reaktives Protein
CT ..... Clotting Time
DAMPs ..... damage-associated molecular patterns
DIC ..... disseminated intravascular coagulation
DNA ..... Desoxyribonucleinsäure
DOAK ..... direkte orale Antikoagulantien
DZIF ..... Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
EDTA ..... Ethylendiamintetraacetat
ELISA ..... Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESICM ..... European Society of Intensive Care Medicine
FACS ..... Fluorescence Activated Cell Sorting
FCCF ..... Flow Cytometry Core Facility
FITC ..... Fluoresceinisothiocyanat
FMO ..... Fluoreszenz-Minus-One
FSC ..... Forward Scatter
GCS ..... Glasgow Coma Scale
G-CSF ..... Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GP ..... Glykoprotein
HMGB1 ..... High Mobility Group Box 1
HRP ..... Horseradish peroxidase

IgG ..... Immunglobulin G
IL ..... Interleukin
INR ..... International Normalized Ratio
ITS ..... Intensivstation
LED ..... Light Emitting Diode
LI ..... Lysis index
LPS ..... Lipopolysaccharide
MAPK ..... Mitogen-activated protein kinase
MAS ..... Major abdominal surgery
MCF ..... Maximum Clot Firmness
MHC ..... Major Histocompatibility Complex
min ..... Minute
ml ..... Milliliter
mm ..... Millimeter
mmHg ..... Millimeter Quecksilbersäule
MPO ..... Myeloperoxidase
NADPH ..... Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat-Wasserstoff
NETs ..... Neutrophil Extracellular Traps
NK-Zellen ..... Natürliche Killerzellen
NMH ..... niedermolekulares Heparin
NOD ..... nucleotide-binding-oligomerization-domain
NSAR ..... Nicht-steroidale Antirheumatika
OP ..... Operation
PAF ..... plättchenaktivierender Faktor
PAI-1 ..... Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PAMPs ..... pathogen-associated molecular patterns
PAR-1 ..... Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS ..... Phosphate-buffered saline
pCO_2 ..... Kohlendioxidpartialdruck
PCT ..... Procalcitonin
PMA Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
postop ..... postoperativ
präop ..... präoperativ
PRRs ..... pattern recognition receptors
PTT ..... Partielle Thromboplastinzeit

qSOFA-Score ..... quick Sequential Organ-Failure Assessment Score
ROS .....reactive oxygen species
s .....Sekunde
SCCM.....Society of Critical Care Medicine
SIRS ..... Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOFA-Score .....Sequential Organ Failure Assessment Score
SSC.....Side Scatter
TF ..... Tissue Factor
TFPI..... Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor
TLR ..... Toll-like-Rezeptoren
TMB ..... Tetramethylbenzidin
TNF ..... Tumornekrosefaktor
t-PA .....Tissue Plasminogen Activator
TRAP.....Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
UFH..... unfraktioniertes Heparin
UKGM..... Universitätsklinikum Gießen und Marburg
VKA ..... Vitamin-K-Antagonisten
vWF.....von-Willebrand-Faktor
µl..... Mikroliter

9 Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über das angeborene und adaptive Immunsystem. 1

Abbildung 2: Schematische Darstellung der zwei Hauptformen der NET-Bildung. 6

Abbildung 3: Überblick über die Gerinnungskaskade. 11

Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau. 24

Abbildung 5: Funktionsweise Durchflusszytometer. 26

Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der Gatingstrategie. 30

Abbildung 7: Grundprinzip Fluoreszenzmikroskopie. 32

Abbildung 8: konfokale Fluoreszenzmikroskopie. 33

Abbildung 9: Grundprinzip Sandwich-ELISA. 36

Abbildung 10: Schematischer Aufbau des ROTEM®-Messverfahrens. 38

Abbildung 11: ROTEM®-Parameter. 40

Abbildung 12: Funktionsprinzip der Impedanzaggregometrie. 41

Abbildung 13: Exemplarische Aggregationskurve. 42

Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopie nativer und PMA-stimulierter Neutrophiler. 46

Abbildung 15: Verlauf des Anteils NET-assoziierter neutrophiler Granulozyten. 47

Abbildung 16: Korrelation der NET-Marker mit FIBTEM/EXTEM MCF. 54

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete konjugierte Antikörper. 27

Tabelle 2: verwendete ROTEM®-Tests. 39

Tabelle 3: ROTEM®-Testparameter. 39

Tabelle 4: verwendete Multiplate®-Testreagenzien. 42

Tabelle 5: Überblick über die Studienkohorte. 45

Tabelle 6: Quantifikation der NET-assoziierten neutrophilen Granulozyten. 47

Tabelle 7: Ergebnisse der Inflammationsparameter. 48

Tabelle 8: Korrelation NET-assoziierter Neutrophiler mit Inflammationsparametern. 49

Tabelle 9: Ergebnisse der Koagulationsparameter. 50

Tabelle 10: Korrelation der NET-Marker mit Koagulationsparametern. 53

Tabelle 11: Perioperativer Verlauf des SOFA-Scores. 55

Tabelle 12: Geräteliste 97

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien 97

Tabelle 14: Chemikalien 98

Tabelle 15: Antikörper 99

Tabelle 16: ELISA-Kits 99

Tabelle 17: ROTEM®-Reagenzien 99

Tabelle 18: Software 100

10 Literaturverzeichnis

1. Aghaeepour N, Finak G, Hoos H, Mosmann TR, Brinkman R, Gottardo R, Scheuermann RH (2013) Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. Nat Methods 10(3):228–238. doi:10.1038/nmeth.2365
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124(4):783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
3. Alam SR, Lewis SC, Zamvar V, Pessotto R, Dweck MR, Krishan A, Goodman K, Oatey K, Harkess R, Milne L, Thomas S, Mills NM, Moore C, Semple S, Wiedow O, Stirrat C, Mirsadraee S, Newby DE, Henriksen PA (2015) Perioperative elafin for ischaemia-reperfusion injury during coronary artery bypass graft surgery: a randomised-controlled trial. Heart 101(20):1639–1645. doi:10.1136/heartjnl-2015-307745
4. Alazawi W, Pirmadjid N, Lahiri R, Bhattacharya S (2016) Inflammatory and Immune Responses to Surgery and Their Clinical Impact. Annals of surgery 264(1):73–80. doi:10.1097/SLA.0000000000001691
5. Aloisio E, Dolci A, Panteghini M (2019) Procalcitonin: Between evidence and critical issues. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 496:7–12. doi:10.1016/j.cca.2019.06.010
6. Alvarez-Larrán A, Toll T, Rives S, Estella J (2005) Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. Clin Lab Haematol 27(1):41–46. doi:10.1111/j.1365-2257.2004.00661.x
7. Andersson U, Tracey KJ (2011) HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. Annu Rev Immunol 29:139–162. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101323
8. Ansorge S, Täger M (2014) Immunologie. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 893–930
9. Asiri A, Hazeldine J, Moiemen N, Harrison P (2024) IL-8 Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in Severe Thermal Injury. International Journal of Molecular Sciences 25(13):7216. doi:10.3390/ijms25137216

10. Azzini AM, Dorizzi RM, Sette P, Vecchi M, Coledan I, Righi E, Tacconelli E (2020) A 2020 review on the role of procalcitonin in different clinical settings: an update conducted with the tools of the Evidence Based Laboratory Medicine. Annals of Translational Medicine 8(9):610. doi:10.21037/atm-20-1855

11. Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, Eiserich JP, Sydow K, Lau D, Szöcs K, Klinke A, Kubala L, Berglund L, Schrepfer S, Deuse T, Haddad M, Risius T, Klemm H, Reichenspurner HC, Meinertz T, Heitzer T (2006) Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. Circulation 113(15):1871–1878. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590083

12. Bauer M, Groesdonk HV, Preissing F, Dickmann P, Vogelmann T, Gerlach H (2021) Sterblichkeit bei Sepsis und septischem Schock in Deutschland. Ergebnisse eines systematischen Reviews mit Metaanalyse. Anaesthesist 70(8):673–680. doi:10.1007/s00101-021-00917-8

13. Baum H (2019) Thrombozyten. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik:2295–2296. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_3027

14. Becker KL, Snider R, Nylen ES (2008) Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. Crit Care Med 36(3):941–952. doi:10.1097/CCM.0B013E318165BABB

15. Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clinical Pharmacology & Therapeutics 69(3):89–95. doi:10.1067/mcp.2001.113989

16. Boeltz S, Amini P, Anders H-J et al (2019) To NET or not to NET:current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ 26(3):395–408. doi:10.1038/s41418-018-0261-x

17. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 101(6):1644–1655. doi:10.1378/chest.101.6.1644

18. Bradbury JL, Thomas SG, Sorg NR, Mjaess N, Berquist MR, Brenner TJ, Langford JH, Marsee MK, Moody AN, Bunch CM, Sing SR, Al-Fadhl MD, Salamah Q, Saleh T, Patel NB, Shaikh KA, Smith SM, Langheinrich WS, Fulkerson DH, Sixta S (2021) Viscoelastic Testing and Coagulopathy of Traumatic Brain Injury. J Clin Med 10(21). doi:10.3390/jcm10215039

19. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V (2014) Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. Nat Immunol 15(11):1017–1025. doi:10.1038/ni.2987

20. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, Meyer SF de, Bhandari AA, Wagner DD (2012) Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. J Thromb Haemost 10(1):136–144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x

21. Brinkmann V, Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? Journal of Cell Biology 198(5):773–783. doi:10.1083/jcb.201203170

22. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303(5663):1532–1535. doi:10.1126/science.1092385

23. Bröker B, Schütt C, Fleischer B (2019) In vitro-Methoden Grundwissen Immunologie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, S 265–295

24. Brunkhorst FM, Weigand MA, Pletz M et al (2020) S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge : Langfassung. Med Klin Intensivmed Notfmed 115(Suppl 2):37–109. doi:10.1007/s00063-020-00685-0

25. Brunkhorst FM, Adamzik M, Axer H et al (2025) S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge – Update 2025. Med Klin Intensivmed Notfmed:1–69. doi:10.1007/s00063-025-01317-1

26. Buhr N de, Köckritz-Blickwede M von (2020) Detection, Visualization, and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NET Markers. Methods Mol Biol 2087:425–442. doi:10.1007/978-1-0716-0154-9_25

27. Burn GL, Raisch T, Tacke S, Winkler M, Prumbaum D, Thee S, Gimber N, Raunser S, Zychlinsky A (2025) Myeloperoxidase transforms chromatin into neutrophil extracellular traps. Nature 647(8090):747–756. doi:10.1038/s41586-025-09523-9

28. Cambier S, Gouwy M, Proost P (2023) The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. Cell Mol Immunol 20(3):217–251. doi:10.1038/s41423-023-00974-6

29. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR (2012) Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. J Clin Invest 122(7):2661–2671. doi:10.1172/JCI61303

30. Chen S, Chen H, Du Q, Shen J (2020) Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds. Front Physiol 11:433. doi:10.3389/fphys.2020.00433

31. Chen T, Li Y, Sun R, Hu H, Liu Y, Herrmann M, Zhao Y, Muñoz LE (2021) Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. Front. Immunol. 12:775267. doi:10.3389/fimmu.2021.775267

32. Chen Z, Zhang H, Qu M, Nan K, Cao H, Cata JP, Chen W, Miao C (2021) Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis. Front Cell Infect Microbiol 11:653228. doi:10.3389/fcimb.2021.653228

33. Chen R, Kang R, Tang D (2022) The mechanism of HMGB1 secretion and release. Exp Mol Med 54(2):91–102. doi:10.1038/s12276-022-00736-w

34. Chen GY, Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol 10(12):826–837. doi:10.1038/nri2873

35. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, Stabler SN, Akhter M, Davidson AC, Gavric M, Lawandi A, Jinah R, Saeed Z, Demir K, Huang K, Mahpour A, Shamatutu C, Caya C, Troquet J-M, Clark G, Yansouni CP, Sweet D (2019) Blood Culture Results Before and After Antimicrobial Administration in Patients With Severe

Manifestations of Sepsis: A Diagnostic Study. Annals of internal medicine 171(8):547–554. doi:10.7326/M19-1696

36. Chung HW, Lim J-B, Jang S, Lee KJ, Park KH, Song SY (2012) Serum high mobility group box-1 is a powerful diagnostic and prognostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Sci 103(9):1714–1721. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02358.x

37. Churpek MM, Snyder A, Han X, Sokol S, Pettit N, Howell MD, Edelson DP (2017) Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment, Systemic Inflammatory Response Syndrome, and Early Warning Scores for Detecting Clinical Deterioration in Infected Patients outside the Intensive Care Unit. Am J Respir Crit Care Med 195(7):906–911. doi:10.1164/rccm.201604-0854OC

38. Clancy DM, Sullivan GP, Moran HBT, Henry CM, Reeves EP, McElvaney NG, Lavelle EC, Martin SJ (2018) Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. Cell Rep 22(11):2937–2950. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.062

39. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Bourdeau F, Kubes P, Ferri L (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. J Clin Invest 123(8):3446–3458. doi:10.1172/JCI67484

40. Delabranche X, Stiel L, Severac F, Galoisy A-C, Mauvieux L, Zobairi F, Lavigne T, Toti F, Anglès-Cano E, Meziani F, Boisramé-Helms J (2017) Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. Shock 47(3):313–317. doi:10.1097/SHK.0000000000000719

41. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, Scadden DT, Wagner DD (2012) Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A 109(32):13076–13081. doi:10.1073/pnas.1200419109

42. Dindo D, Demartines N, Clavien P-A (2004) Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. Annals of surgery 240(2):205–213. doi:10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae

43. Ding R, Meng Y, Ma X (2018) The Central Role of the Inflammatory Response in Understanding the Heterogeneity of Sepsis-3. BioMed research international 2018:5086516. doi:10.1155/2018/5086516

44. Engelmann B, Massberg S (2013) Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol 13(1):34–45. doi:10.1038/nri3345

45. Eschborn S, Weitkamp J-H (2019) Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association 39(7):893–903. doi:10.1038/s41372-019-0363-4

46. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD (2015) P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. Blood 126(2):242–246. doi:10.1182/blood-2015-01-624023

47. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W et al (2021) Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. Intensive Care Med 47(11):1181–1247. doi:10.1007/s00134-021-06506-y

48. Fletcher TE, Leblebicioglu H, Bozkurt I, Sunbul M, Bilek H, Asik Z, Barut S, Gunes F, Gemici U, Hewson R, Wilson D, O'Shea MK, Woolley T, Faragher B, Parmar K, Lalloo DG, Beeching NJ, Hunt BJ (2019) Rotational thromboelastometry alongside conventional coagulation testing in patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: an observational cohort study. The Lancet Infectious Diseases 19(8):862–871. doi:10.1016/S1473-3099(19)30112-4

49. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. Journal of Cell Biology 176(2):231–241. doi:10.1083/jcb.200606027

50. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wrobleski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A 107(36):15880–15885. doi:10.1073/pnas.1005743107

51. Furie B, Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med 359(9):938–949. doi:10.1056/NEJMra0801082

52. Gando S (2010) Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. Crit Care Med 38(2 Suppl):S35-42. doi:10.1097/CCM.0b013e3181c9e31d

53. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, Williams DA (2015) Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. Am J Hematol 90(12):1155–1158. doi:10.1002/ajh.24185

54. Ge L, Zhou X, Ji W-J, Lu R-Y, Zhang Y, Zhang Y-D, Ma Y-Q, Zhao J-H, Li Y-M (2015) Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 308(5):H500-9. doi:10.1152/ajpheart.00381.2014

55. Görlinger K, Pérez-Ferrer A, Dirkmann D, Saner F, Maegele M, Calatayud ÁAP, Kim T-Y (2019) The role of evidence-based algorithms for rotational thromboelastometry-guided bleeding management. Korean J Anesthesiol 72(4):297–322. doi:10.4097/kja.19169

56. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, Resink TJ (2010) Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. FEBS letters 584(14):3193–3197. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.006

57. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. Blood 92(9):3007–3017. doi:10.1182/blood.V92.9.3007

58. Hashiba M, Huq A, Tomino A, Hirakawa A, Hattori T, Miyabe H, Tsuda M, Takeyama N (2015) Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. J Surg Res 194(1):248–254. doi:10.1016/j.jss.2014.09.033

59. Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C (2022) Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. Cardiovasc Res 118(13):2737–2753. doi:10.1093/cvr/cvab329

60. Hochleitner G, Sutor K, Levett C, Leyser H, Schlimp CJ, Solomon C (2017) Revisiting Hartert's 1962 Calculation of the Physical Constants of

Thrombelastography. Clin Appl Thromb Hemost 23(3):201–210. doi:10.1177/1076029615606531

61. Hoffmann G (2020) Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei COVID-19: ein zweischneidiges Schwert. Trillium GmbH Medizinischer Fachverlag
62. Horn F (2015) Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium, 6. Aufl. Thieme ElectronicBook Library. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
63. Ivey AD, Pratt HG, Niemann B, Ranson K, Puleo A, Fagan BM, Rao P, Landreth KM, Liu TW, Boone BA (2024) Pancreatectomy Induces Cancer-Promoting Neutrophil Extracellular Traps. Ann Surg Oncol 31(6):3707–3717. doi:10.1245/s10434-023-14841-1
64. Jelkmann W (2011) Blut. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg) Physiologie des Menschen. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 477–502
65. Jorch SK, Kubes P (2017) An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nat Med 23(3):279–287. doi:10.1038/nm.4294
66. Kaufmann KB, Heinrich S, Staehle HF, Bogatyreva L, Buerkle H, Goebel U (2018) Perioperative cytokine profile during lung surgery predicts patients at risk for postoperative complications-A prospective, clinical study. PLOS ONE 13(7):e0199807. doi:10.1371/journal.pone.0199807
67. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med 15(6):623–625. doi:10.1038/nm.1959
68. Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH (2018) Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. Med Sci (Basel) 6(2):33. doi:10.3390/medsci6020033
69. Koch C, Edinger F, Fischer T, Brenck F, Hecker A, Katzer C, Markmann M, Sander M, Schneck E (2020) Comparison of qSOFA score, SOFA score, and SIRS criteria for the prediction of infection and mortality among surgical intermediate and intensive care patients. World J Emerg Surg 15(1):63. doi:10.1186/s13017-020-00343-y

70. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K (2017) Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. International Journal of Molecular Sciences 18(8). doi:10.3390/ijms18081803

71. Krebs ED, Hassinger TE, Guidry CA, Berry PS, Elwood NR, Sawyer RG (2019) Non-utility of sepsis scores for identifying infection in surgical intensive care unit patients. Am J Surg 218(2):243–247. doi:10.1016/j.amjsurg.2018.11.044

72. Kruse A (2015) Das Immunsystem: eine Übersicht. In: Rink (Hrsg) Immunologie für Einsteiger. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 1–14

73. Kruse A (2015) Die lymphatischen Organe: Blutbildung und Konferenzzentren. In: Rink (Hrsg) Immunologie für Einsteiger. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 15–31

74. Kumar S, Payal N, Srivastava VK, Kaushik S, Saxena J, Jyoti A (2021) Neutrophil extracellular traps and organ dysfunction in sepsis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 523:152–162. doi:10.1016/j.cca.2021.09.012

75. Laridan E, Martinod K, Meyer SF de (2019) Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. Semin Thromb Hemost 45(1):86–93. doi:10.1055/s-0038-1677040

76. Larsen FF, Petersen JA (2017) Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. Eur J Intern Med 45:46–50. doi:10.1016/j.ejim.2017.09.030

77. Laupland KB, Zahar J-R, Adrie C, Schwebel C, Goldgran-Toledano D, Azoulay E, Garrouste-Orgeas M, Cohen Y, Jamali S, Souweine B, Darmon M, Timsit J-F (2012) Determinants of temperature abnormalities and influence on outcome of critical illness. Crit Care Med 40(1):145–151. doi:10.1097/CCM.0b013e31822f061d

78. Ledderose C, Hashiguchi N, Valsami E-A, Rusu C, Junger WG (2023) Optimized flow cytometry assays to monitor neutrophil activation in human and mouse whole blood samples. J Immunol Methods 512:113403. doi:10.1016/j.jim.2022.113403

79. Lee KH, Cavanaugh L, Leung H, Yan F, Ahmadi Z, Chong BH, Passam F (2018) Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in

patients with thrombosis and sepsis. International Journal of Laboratory Hematology 40(4):392–399. doi:10.1111/ijlh.12800

80. Leica Microsystems CMS GmbH (2008) Leica TCS SP5, Leica TCS SP5 X User Manual, Mannheim

81. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, Stürzl M, Staats L, Mahajan A, Schauer C, Kremer AN, Völkl S, Amann K, Evert K, Falkeis C, Wehrfritz A, Rieker RJ, Hartmann A, Kremer AE, Neurath MF, Muñoz LE, Schett G, Herrmann M (2020) Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. EBioMedicine 58:102925. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102925

82. Levi M, van der Poll T (2015) Coagulation in patients with severe sepsis. Semin Thromb Hemost 41(1):9–15. doi:10.1055/s-0034-1398376

83. Levi M, van der Poll T (2017) Coagulation and sepsis. Thromb Res 149:38–44. doi:10.1016/j.thromres.2016.11.007

84. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 31(4):1250–1256. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B

85. Li Y, Palmer A, Lupu L, Huber-Lang M (2022) Inflammatory response to the ischaemia-reperfusion insult in the liver after major tissue trauma. Eur J Trauma Emerg Surg 48(6):4431–4444. doi:10.1007/s00068-022-02026-6

86. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR Journal 46(3):258–268. doi:10.1093/ilar.46.3.258

87. Liu Y, Pu X, Qin X, Gong J, Huang Z, Luo Y, Mou T, Zhou B, Shen A, Wu Z (2022) Neutrophil Extracellular Traps Regulate HMGB1 Translocation and Kupffer Cell M1 Polarization During Acute Liver Transplantation Rejection. Front. Immunol. 13:823511. doi:10.3389/fimmu.2022.823511

88. Liu Y, Shu H, Wan P, Wang X, Xie H (2023) Neutrophil extracellular traps predict postoperative pulmonary complications in paediatric patients undergoing parental liver transplantation. BMC Gastroenterol 23(1):237. doi:10.1186/s12876-023-02744-0

89. Lorenz B (2020) Einfach und praktisch: Thrombelastographie. Notfall Rettungsmed 23(3):218–224. doi:10.1007/s10049-020-00693-9

90. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2014) Durchflusscytometrie Der Experimentator: Immunologie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, S 73–101

91. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2014) Quantitative Immunoassays Der Experimentator: Immunologie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, S 103–131

92. Manda-Handzlik A, Ostafin M, Bystrzycka W, Sieczkowska S, Moskalik A, Demkow U, Ciepiela O (2016) Flow cytometric quantification of neutrophil extracellular traps: Limitations of the methodological approach. Am J Hematol 91(3):E9-10. doi:10.1002/ajh.24257

93. Margraf A, Ludwig N, Zarbock A, Rossaint J (2020) Systemic Inflammatory Response Syndrome After Surgery: Mechanisms and Protection. Anesth Analg 131(6):1693–1707. doi:10.1213/ANE.0000000000005175

94. Martin Orban, Dirk Sibbing (2014) Multiplate Analyzer Antiplatelet Therapy in Cardiovascular Disease. John Wiley & Sons, Ltd, S 82–91

95. Martinod K, Wagner DD (2014) Thrombosis: tangled up in NETs. Blood 123(18):2768–2776. doi:10.1182/blood-2013-10-463646

96. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczkowska E, Jenne CN (2017) Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. Blood 129(10):1357–1367. doi:10.1182/blood-2016-09-741298

97. McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. Current protocols in immunology 120:5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40

98. Menegazzi R, Decleva E, Dri P (2012) Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? Blood 119(5):1214–1216. doi:10.1182/blood-2011-07-364604

99. Miller-Ocuin JL, Liang X, Boone BA, Doerfler WR, Singhi AD, Tang D, Kang R, Lotze MT, Zeh HJ (2019) DNA released from neutrophil extracellular traps (NETs) activates pancreatic stellate cells and enhances pancreatic tumor growth. OncoImmunology 8(9):e1605822. doi:10.1080/2162402X.2019.1605822

100. Müller-Newen G, Petrides PE (2014) Blut – Thrombocyten und Leukocyten. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 877–892

101. Murphy K, Weaver C (2018) Anhänge Janeway Immunologie. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, S 979–1175

102. Opal SM, Wittebole X (2020) Biomarkers of Infection and Sepsis. Critical Care Clinics 36(1):11–22. doi:10.1016/j.ccc.2019.08.002

103. Origer P, Ahishakiye D, Hacquebard J-P, Germay O, Stevens E, Kapessidou P (2013) Is Myeloperoxidase release during cardiac surgery under cardiopulmonary bypass related to short term outcomes? European Journal of Anaesthesiology 30:73. doi:10.1097/00003643-201306001-00225

104. Papayannopoulos V (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nat Rev Immunol 18(2):134–147. doi:10.1038/nri.2017.105

105. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. Journal of Cell Biology 191(3):677–691. doi:10.1083/jcb.201006052

106. Paruk F, Chausse JM (2019) Monitoring the post surgery inflammatory host response. J Emerg Crit Care Med 3(0):47. doi:10.21037/jeccm.2019.08.06

107. Pastor B, Abraham J-D, Pisareva E, Sanchez C, Kudriavstev A, Tanos R, Mirandola A, Mihalovičová L, Pezzella V, Adenis A, Ychou M, Mazard T, Thierry AR (2022) Association of neutrophil extracellular traps with the production of circulating DNA in patients with colorectal cancer. iScience 25(2):103826. doi:10.1016/j.isci.2022.103826

108. Patel JM, Sapey E, Parekh D, Scott A, Dosanjh D, Gao F, Thickett DR (2018) Sepsis Induces a Dysregulated Neutrophil Phenotype That Is Associated with Increased Mortality. Mediators of Inflammation 2018:4065362. doi:10.1155/2018/4065362

109. Pecqueux M, Brückner F, Bogner A, Oehme F, Hau H-M, Bechtolsheim F von, Held H-C, Baenke F, Distler M, Riediger C, Weitz J, Kahlert C (2023) Interleukin-8 is superior to CRP for the prediction of severe complications in a prospective cohort

of patients undergoing major liver resection. Langenbecks Arch Surg 408(1):377. doi:10.1007/s00423-023-03041-w

110. Phua J, Ngerng W, See K, Tay C, Kiong T, Lim H, Chew M, Yip H, Tan A, Khalizah H, Capistrano R, Lee K, Mukhopadhyay A (2013) Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. Crit Care 17(5):R202. doi:10.1186/cc12896

111. Pilsczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P (2010) A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. J Immunol 185(12):7413–7425. doi:10.4049/jimmunol.1000675

112. Prowle JR, Forni LG, Bell M, Chew MS, Edwards M, Grams ME, Grocott MPW, Liu KD, McIlroy D, Murray PT, Ostermann M, Zarbock A, Bagshaw SM, Bartz R, Bell S, Bihorac A, Gan TJ, Hobson CE, Joannidis M, Koyner JL, Levett DZH, Mehta RL, Miller TE, Mythen MG, Nadim MK, Pearse RM, Rimmele T, Ronco C, Shaw AD, Kellum JA (2021) Postoperative acute kidney injury in adult non-cardiac surgery: joint consensus report of the Acute Disease Quality Initiative and PeriOperative Quality Initiative. Nat Rev Nephrol 17(9):605–618. doi:10.1038/s41581-021-00418-2

113. Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM (2006) Markers for sepsis diagnosis: what is useful? Critical Care Clinics 22(3):503-19, ix-x. doi:10.1016/j.ccc.2006.03.003

114. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Med 43(3):304–377. doi:10.1007/s00134-017-4683-6

115. Richardson JJR, Hendrickse C, Gao-Smith F, Thickett DR (2017) Neutrophil Extracellular Trap Production in Patients with Colorectal Cancer In Vitro. International Journal of Inflammation 2017:4915062. doi:10.1155/2017/4915062

116. Rink L, Kruse A, Haase H (2012) Das angeborene Immunsystem. In: Rink L, Haase H, Kruse A (Hrsg) Immunologie für Einsteiger. Spektrum, Heidelberg, S 39–58

117. Roche Diagnostics GmbH (2013) Multiplate® analyzer Operator's Manual, 2. Aufl, Mannheim

118. Roche Diagnostics GmbH (2013) Produktkatalog Multiplate®Analyzer, Mannheim

119. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H (2010) The sterile inflammatory response. Annu Rev Immunol 28:321–342. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101311

120. Rossaint J, Margraf A, Zarbock A (2019) Perioperative Inflammation. Der Anaesthesist 68(7):421–427. doi:10.1007/s00101-019-0596-9

121. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M (2020) Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet (London, England) 395(10219):200–211. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7

122. Saeys Y, van Gassen S, Lambrecht BN (2016) Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. Nat Rev Immunol 16(7):449–462. doi:10.1038/nri.2016.56

123. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT (2012) Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. PLoS One 7(2):e32366. doi:10.1371/journal.pone.0032366

124. Santonocito C, Loecker I de, Donadello K, Moussa MD, Markowicz S, Gullo A, Vincent J-L (2014) C-reactive protein kinetics after major surgery. Anesth Analg 119(3):624–629. doi:10.1213/ANE.0000000000000263

125. Sarr D, Oliveira LJ, Russ BN, Owino SO, Middii JD, Mwalimu S, Ambasa L, Almutairi F, Vulule J, Rada B, Moore JM (2021) Myeloperoxidase and Other Markers of Neutrophil Activation Associate With Malaria and Malaria/HIV Coinfection in the Human Placenta. Front. Immunol. 12:682668. doi:10.3389/fimmu.2021.682668

126. Schneck E, Mallek F, Schiederich J, Kramer E, Markmann M, Hecker M, Sommer N, Weissmann N, Pak O, Michel G, Hecker A, Padberg W, Boening A, Sander M, Koch C (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. J Clin Med 9(1). doi:10.3390/jcm9010174

127. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC (2016) Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315(8):762–774. doi:10.1001/jama.2016.0288

128. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, Lemeshow S, Osborn T, Terry KM, Levy MM (2017) Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. N Engl J Med 376(23):2235–2244. doi:10.1056/NEJMoa1703058

129. Shu Q, Zhang N, Liu Y, Wang X, Chen J, Xie H, Pan F, Zhao L, Ding X, Wen Y, Wang L, Xie W, Lu J, Su G, Peng H, Yang P (2023) IL-8 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation Through an Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase- and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway-Dependent Mechanism in Uveitis. Investigative Ophthalmology & Visual Science 64(13):19. doi:10.1167/iovs.64.13.19

130. Siddiqui S, Livák F (2023) Principles of Advanced Flow Cytometry: A Practical Guide. Methods Mol Biol 2580:89–114. doi:10.1007/978-1-0716-2740-2_5

131. Simpson SQ (2018) SIRS in the Time of Sepsis-3. Chest 153(1):34–38. doi:10.1016/j.chest.2017.10.006

132. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315(8):801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287

133. Stief T (2019) Thromboplastinzeit, partielle aktivierte. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik:2292–2293. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_3023

134. Stief T, Kiefer P (2019) Fibrinogen. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik:863–864. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_1114

135. Stief T, Kiefer P (2019) Thromboplastinzeit. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik:2291–2292. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_3022

136. Stoimenou M, Tzoros G, Skendros P, Chrysanthopoulou A (2022) Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. International Journal of Molecular Sciences 23(24):15823. doi:10.3390/ijms232415823

137. Straatman J, Cuesta MA, Lange-de Klerk ESM de, van der Peet DL (2016) Long-Term Survival After Complications Following Major Abdominal Surgery. J Gastrointest Surg 20(5):1034–1041. doi:10.1007/s11605-016-3084-4

138. Tadie J-M, Bae H-B, Jiang S, Park DW, Bell CP, Yang H, Pittet J-F, Tracey K, Thannickal VJ, Abraham E, Zmijewski JW (2013) HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 304(5):L342-9. doi:10.1152/ajplung.00151.2012

139. Tang BMP, Eslick GD, Craig JC, McLean AS (2007) Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases 7(3):210–217. doi:10.1016/S1473-3099(07)70052-X

140. Teijeira Á, Garasa S, Gato M, Alfaro C, Migueliz I, Cirella A, Andrea C de, Ochoa MC, Otano I, Etxeberria I, Andueza MP, Nieto CP, Resano L, Azpilikueta A, Allegretti M, Pizzol M de, Ponz-Sarvisé M, Rouzaut A, Sanmamed MF, Schalper K, Carleton M, Mellado M, Rodriguez-Ruiz ME, Berraondo P, Perez-Gracia JL, Melero I (2020) CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. Immunity 52(5):856-871.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.03.001

141. Tem Innovations GmbH (2012) ROTEM® delta US Operation Manual, 2. Aufl, München

142. Tsung A, Tohme S, Billiar TR (2014) High-mobility group box-1 in sterile inflammation. J Intern Med 276(5):425–443. doi:10.1111/joim.12276

143. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. PLoS Pathog 5(10):e1000639. doi:10.1371/journal.ppat.1000639

144. Varjú I, Kolev K (2019) Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps. Thromb Res 182:1–11. doi:10.1016/j.thromres.2019.08.003

145. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI (2021) Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. Nat Rev Immunol 21(8):485–498. doi:10.1038/s41577-020-00490-y

146. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME (2015) DAMPs from Cell Death to New Life. Front. Immunol. 6:422. doi:10.3389/fimmu.2015.00422

147. Vincent J-L (2016) The Clinical Challenge of Sepsis Identification and Monitoring. PLoS Med 13(5):e1002022. doi:10.1371/journal.pmed.1002022

148. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, Mendonça A de, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med 22(7):707–710. doi:10.1007/BF01709751

149. Wang H, Kim SJ, Lei Y, Wang S, Wang H, Huang H, Zhang H, Tsung A (2024) Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. Sig Transduct Target Ther 9(1):235. doi:10.1038/s41392-024-01933-x

150. Watt DG, Horgan PG, McMillan DC (2015) Routine clinical markers of the magnitude of the systemic inflammatory response after elective operation: a systematic review. Surgery 157(2):362–380. doi:10.1016/j.surg.2014.09.009

151. Whiting D, DiNardo JA (2014) TEG and ROTEM: technology and clinical applications. Am J Hematol 89(2):228–232. doi:10.1002/ajh.23599

152. Yang S, Qi H, Kan K, Chen J, Xie H, Guo X, Zhang L (2017) Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis. Shock 47(2):132–139. doi:10.1097/SHK.0000000000000741

153. Zhang F, Li Y, Wu J, Zhang J, Cao P, Sun Z, Wang W (2022) The role of extracellular traps in ischemia reperfusion injury. Front. Immunol. 13:1022380. doi:10.3389/fimmu.2022.1022380

154. Zharkova O, Tay SH, Lee HY, Shubhita T, Ong WY, Lateef A, MacAry PA, Lim LHK, Connolly JE, Fairhurst A-M (2019) A Flow Cytometry-Based Assay for High-Throughput Detection and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps in Mixed Cell Populations. Cytometry A 95(3):268–278. doi:10.1002/cyto.a.23672

155. Zheng R, Burkhart RA (2024) Casting a Wide NET? The Impact of Pancreatectomy on Neutrophil Extracellular Traps. Ann Surg Oncol 31(6):3575–3577. doi:10.1245/s10434-024-15085-3

156. Zhu T, Zou X, Yang C, Li L, Wang B, Li R, Li H, Xu Z, Di Huang, Wu Q (2021) Neutrophil extracellular traps promote gastric cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. International Journal of Molecular Medicine 48(1). doi:10.3892/ijmm.2021.4960

157. Zindel J, Kubes P (2020) DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 15(1):493–518. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847

11 Anhang

11.1 Verwendete Geräte

Tabelle 12: Geräteliste

Geräte	Hersteller, Ort
BD FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, (USA)
Fluoreszenz Mikroskop	Leica, Wetzlar, (DE)
Mikroplattenreader Epoch	BioTek, Heilbronn, (DE)
Pipetten 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, (DE)
Pipetten 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, (DE)
Pipetten 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, (DE)
Pipetten 50-200 µl	Eppendorf, Hamburg, (DE)
ROTEM®	Tem Innovations, München, (DE)
Waage	Satorius, Göttingen, (DE)
Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16R)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, (DE)
Zentrifuge (mikro 200R, Typ 2405)	Hettich, Tuttlingen, (DE)

11.2 Verwendete Materialien

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Typ	Hersteller, Ort
Citrat S-Monovette	3 ml, 9NC	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
EDTA S-Monovette	7,5 ml, K3E	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
Einmalspritzen	10 ml	B Braun, Melsungen, (DE)
Hirudin S-Monovette	1,6 ml, 9NC	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
Membranadapter	für S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)

Multi-Adapter	für S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
Pipettenspitzen	10 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, (DE)
Pipettenspitzen	200 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, (DE)
Pipettenspitzen	100 µl	Nerbe Plus, Winsen, (DE)
Pipettenspitzen	1000 µl	Nerbe Plus, Winsen, (DE)
Reagenzgefäße	0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
Röhren-Tubes	5ml	Sarstedt, Nümbrecht, (DE)
Safety Multiflex Kanüle		Sarstedt, Nümbrecht, (DE)

Tabelle 14: Chemikalien

Chemikalien	**Hersteller, Ort**
PBS	Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, (USA)
BSA	Roth, Karlsruhe, (DE)
Pharm Lyse	BD Pharm Lyse, Franklin Lakes, (USA)
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, (USA)
7-AAD	BD Biosciences, Franklin Lakes, (USA)
FACS Flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, (USA)
Shutdown Solution	
Kodan® Tinktur Forte farblos Antiseptikum	Schülke & Mayr, Norderstedt, (DE)
NaCl 0,9%	B Braun, Melsungen, (DE)

Tabelle 15: Antikörper

Antikörper	Details	Hersteller, Ort
FITC Anti-MPO antibody [2C7]	(ab11729)Konz.: 50µg (0,1mg/mL)	Abcam, Cambridge, (UK)
Pacific Blue Anti-Human CD15	(SSEA-1) Konz.: 400µg/mL	BioLegend, San Diego, (CA/USA)
Alexa Fluor® 647 anti-Histone H3-Phosphorylated (Ser28) Antibody	Konz.: 140 µg/mL	BioLegend, San Diego, (CA/USA)
Isotyp MPO	Mouse IgG1 (B11/6) (FITC)-Isotyp Control	Abcam, Cambridge, (UK)
Isotyp His	Alexa FluorR 647 IgG2b Konz.: 0,5 mg/mL	BioLegend, San Diego, (CA/USA)
IgG	Gamunex 10% (100mg/ml)	Grifols, Frankfurt a. M., (DE)

Tabelle 16: ELISA-Kits

ELISA-Kits	Details	Absorption (empfohlen)	Hersteller, Ort
HMGB1	Human HMGB1 ELISA Kit	450 nm	Aviva Systems Biology. San Diego, (USA)
MPO	Human MPO Instant ELISA	450 nm	eBioscience, Frankfurt a. M., (DE)
IL-8	Human IL-8/ CXCL8 Quantikine HS ELISA	490 nm	R&D Systems Minneapolis, (USA)

Tabelle 17: ROTEM®-Reagenzien

ROTEM®-Reagenzien	Details	Hersteller, Ort
Grün	Sta-tem® 20 REF: 503-10 Lot: 42090301	Tem Innovations, München, (DE)
Rot	R ex-tem® REF: 503-05 Lot: 42184901	Tem Innovations, München, (DE)
Blau	In-tem® REF: 503-02 Lot: 20823028	Tem Innovations, München, (DE)
Braun	Fib-tem® REF: 503-06 Lot: 42152401	Tem Innovations, München, (DE)

11.3 Verwendete Software

Tabelle 18: Software

Software	Details	Hersteller, Ort
BD FACSDIVA Software	Version: 6.1.3	BD Biosciences, San Jose, (USA)
BioRender.com		BioRender, Toronto, (CAN)
Microsoft Excel		Microsoft, Redmond, (USA)
Microsoft Word		Microsoft, Redmond, (USA)
Patientendaten Management System		IMESO GmbH, Giessen, (DE)
R (Statistische Software)	Version: 3.4.2	The R Foundation, Wien, (AT)
ROTEM® Messmodul	Library Version: libROTEM: 20070213-rawlog Protokoll Version: 7e170170 Backend Version: Backend:1.8.4 Frontend Version: 2.8.1 Datenbank Version: 1.22	Tem Innovations, München, (DE)
ggplot2		Hadley Wickham, Posit PBC, Boston, (USA)

12 Publikationsverzeichnis

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalveröffentlichungen:

„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."

Schneck, E., Mallek, F., Schiederich, J., Kramer, E., Markmann, M., Hecker, M., Sommer, N., Weissmann, N., Pak, O., Michel, G., Hecker, A., Padberg, W., Boening, A., Sander, M., & Koch, C.

Journal of Clinical Medicine. 2020;9(1):174. doi:10.3390/jcm9010174

Poster:

„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"

Schneck E., Mallek F., Schiederich J., Kramer E., Sommer N., Hecker M., Weissmann N., Baal N., Markmann M., Koch C., Sander M.

Science-Day am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 16.11.2018:

Preis für die beste Methodik aus dem Bereich „Grundlagenforschung/ Theoretische Forschung."

13 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

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sander für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und den wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Emmanuel Schneck für die außergewöhnlich engagierte, verlässliche und wertschätzende Betreuung während der gesamten Entstehung dieser Arbeit. Seine fachliche Expertise, die zahlreichen wissenschaftlichen Impulse sowie die konstruktiven Diskussionen haben diese Dissertation entscheidend geprägt. Besonders danke ich ihm für die jederzeitige Erreichbarkeit und die geduldige Begleitung auch in herausfordernden Phasen.

Herrn Prof. Dr. Christian Koch danke ich für die wertvolle wissenschaftliche Beratung und die unkomplizierte Unterstützung bei fachlichen Fragestellungen. Frau Dr. Melanie Markmann gilt mein herzlicher Dank für ihre Hilfe bei der Auswertung der Rohdaten sowie bei der statistischen Analyse. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, insbesondere Ilona Magel und Gaby Michel, für ihre Unterstützung bei sämtlichen laborbezogenen Belangen.

Ein weiterer Dank gilt meinen Mitdoktorandinnen Franziska Mallek und Julia Schiederich für die freundschaftliche, konstruktive und stets angenehme Zusammenarbeit.

Für die finanzielle Unterstützung der Studie danke ich dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (Grant-Nummer: TI 07.001_Schneck_00).

Ich danke außerdem allen Probandinnen und Probanden dieser Studie, ohne deren Bereitschaft zur Teilnahme die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein tief empfundener Dank gilt abschließend meinen Eltern und meiner Partnerin. Der emotionale Rückhalt, die Geduld und das Vertrauen meiner Eltern haben mich während des gesamten Studiums und insbesondere während der Promotionszeit begleitet. Meiner Partnerin danke ich für ihre stetige Motivation, ihre Unterstützung und dafür, dass sie durch ihren Zuspruch und ihr Vertrauen maßgeblich dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit abgeschlossen werden konnte. Ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

15 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der veröffentlichten Fassung der Dissertation entfernt.

The curriculum vitae was removed from the published version of the dissertation.