

Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin der Universität Tübingen

**Thrombozytopathie bei Patienten unter venovenöser
und venoarterieller ECMO-Therapie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Hidiatov, Oleg

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Bakchoul

2. Berichterstatter: Privatdozent. Dr. M. Köppen

Tag der Disputation: 20.01.2025

Großer Dank gebührt meiner geliebten Ehefrau Katharina, meiner Tochter Alisa
und meinen Eltern

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	12
1.1 Extrakorporale Lebensunterstützungsverfahren	12
1.2 Venovenöse und venoarterielle ECMO	16
1.3 Indikationen und Ziele für die Implantation der va. und vv. ECMO	17
1.4 Pathophysiologie der ECLS	19
1.4.1 Blutkontakt zur Fremdoberfläche	20
1.4.2 Blutströmung unter ECLS	21
1.4.3 Thrombozyten und Antikoagulation unter ECMO	21
1.5 Patientenbezogene Komplikationen unter ECMO	23
1.5.1 Blutungen	23
1.5.2 Heparin-induzierte Thrombozytopenie	24
1.5.3 Erworbenes von Willebrand-Syndrom	26
1.6 Physiologie der Thrombozyten	26
1.6.1 Die δ -Granula der Thrombozyten	27
1.6.2 Die α -Granula der Thrombozyten	29
1.6.3 Thrombozyten und deren Funktion	31
1.6.4 Rolle der Adhäsionsrezeptoren der Thrombozyten	32
1.6.5 Die Rolle der Rezeptoren für lösliche Agonisten (ADP, Thrombin)	33
1.7 Storage pool disease, exhausted platelets und andere Sekretionsdefekte	34
1.8 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	37
2 MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 Der Aufbau und die Dauer der Studie sowie deren Population	39
2.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien der Studie	40
2.3 Studienbezogene Blutentnahmen	40
2.4 Blutproben der gesunden Probanden als Vergleichsreferenz	41
2.5 Das Ex-Vivo-Model der extrakorporalen Zirkulation, der Chandler-Loop	42
2.6 Labormethoden-etablierung und FC-Protokollvalidierung zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion in Vollblutproben bei gesunden Spendern	44

2.7	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	45
2.8	Bestimmung der Thrombozytenfunktion/Granula-Expression mittels Durchflusszytometrie	45
2.8.1	CD62P-PE als FC-Marker für α -Granula-Expression und CD63-PE für δ -Granula-Expression	45
2.9	Mepacrin-Assay.....	47
2.10	Erhebung klinischer Daten aus der prospektiven Studie.....	48
2.11	Statistische Analysen	50
2.12	Ethik.....	51
3	ERGEBNISSE.....	52
3.1	Ergebnisse des etablierten Thrombozytenaktivierungsassays mittels PRP-und WB-Proben gesunder Spender	52
3.2	Einfluss der Lagerungszeit auf die durchflusszytometrische Messung der Thrombozytendegranulationsmarker	54
3.3	Einfluss von Scherstress auf die Blutplättchenfunktion im Chandler-Loop-Modell.....	55
3.4	Einsatz von Mepacrin-Assay nach Scherstresssimulation	58
3.5	Ergebnisse der prospektiven In-vivo-Studie zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion/-degranulation bei Patienten unter ECMO.....	59
3.5.1	Verhalten von α - und δ -Granula-Expression bei Patienten unter vv. ECMO-Therapie.....	59
3.5.2	Verhalten von α - und δ -Granula-Expression bei Patienten unter va. ECMO-Therapie.....	60
3.5.3	Bestimmung und Überprüfung der Korrelation des löslichen P-Selectins im Blutplasma gegenüber P-Selectin der Thrombozyten bei ECMO-Patienten.....	62
3.6	Thrombozytendegranulation, Blutungen sowie thrombotische Ereignisse	64
4	DISKUSSION.....	68
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	93
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	94
9	DANKSAGUNG.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) 17

Abbildung 2: Ein Transmissionselektronenmikroskopiebild (TEM), Morphologie eines gesunden Blutplättchens 27

Abbildung 3: Schematische Darstellung δ -Granula-Inhalte 28

Abbildung 4: Chandler-Loop-System 44

Abbildung 5: Beispiel eines Durchflusszytometrie-Diagramms von einem/er gesunden Spender/in 46

Abbildung 6: Grafische Darstellung des Testergebnisses von Mepacrin-Assay zwischen Tagesspender vs. va. ECMO-Patient 48

Abbildung 7: Gliederung der prospektiven ECMO-Studie 49

Abbildung 8 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse vom FC-Thrombozytenaktivierungsprotokoll mittels PRP-und WB gesunder Spender, Lagerungstest der Proben bis zu 3 Tage 53

Abbildung 9 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse von Thrombozytendegradationsmarker unter Scherstresssimulation mittels Chandler-Loop-System 56

Abbildung 10: Grafische Darstellung der Charakterisierung der δ -Granula-Sekretionskapazität der Thrombozyten bei gesunden Vollblutspenderproben vor und nach der Rotation im Chandler-Loop durch Mepacrin-Assay 58

Abbildung 11 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse sowie Beurteilung der Thrombozytendegradationsmarker bei Patienten unter vv. ECMO-Therapie 60

Abbildung 12 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse sowie Beurteilung der Thrombozytendegranulationmarker bei Patienten unter va. ECMO-Therapie 62

Abbildung 13: Überprüfung der Korrelation des löslichen P-Selectins im Blutplasma gegenüber P-Selectin der Thrombozyten bei ECMO-Patienten..... 63

Abbildung 14 A-H: Zusammenschau von CD63-Expression mit Blutungs- und Thromboseereignissen unter vv. und va. ECMO-Gruppen..... 65

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Einwirkung von Scherkräften, der Fremdkörperoberfläche sowie des Blutflusses auf die Thrombozytenfunktion . 73

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Demografische Daten der Studienpopulation und Indikationen für verschiedene ECMO-Implantationsarten.....</i>	49
<i>Tabelle 2: Statistische Ergebnisse des Thrombozytenaktivierungsprotokolls mittels PRP- und WB-Proben gesunder Spender, Blutentnahme (Tag 0) vs. 3-tägig gelagerten Proben (Tag 3).....</i>	55
<i>Tabelle 3: Statistische Ergebnisse der Thrombozytendegradationsmarker in Heparinblut vs. Citratblut.....</i>	57
<i>Tabelle 4: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der vv. ECMO-Therapie, α- und δ-Granula-Sekretion nach ADP-Stimulation.....</i>	66
<i>Tabelle 5: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der vv. ECMO-Therapie, α- und δ-Granula-Sekretion nach TRAP-6-Stimulation.....</i>	66
<i>Tabelle 6: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der va. ECMO-Therapie, α- und δ-Granula-Sekretion nach ADP-Stimulation.....</i>	67
<i>Tabelle 7: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der va. ECMO-Therapie, α- und δ-Granula-Sekretion nach TRAP-6-Stimulation.....</i>	67

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abb.</i>	<i>Abbildung</i>
<i>ACS</i>	<i>Akutes Koronarsyndrom</i>
<i>ADP</i>	<i>Adenosindiphosphat</i>
<i>AMP</i>	<i>Adenosinmonophosphat</i>
<i>ANP</i>	<i>atriales natriuretisches Peptid</i>
<i>APL</i>	<i>artificial pump-lung</i>
<i>ARDS</i>	<i>acute respiratory distress syndrom</i>
<i>AT/AT III</i>	<i>Antithrombin</i>
<i>Bi-VAD</i>	<i>biventricular assist device</i>
<i>CD107b</i>	<i>Lysosome-associated membrane protein 2</i>
<i>CD109</i>	<i>GPI-gebundenes Zelloberflächenantigen, das von CD34+-Zelllinien exprimiert wird</i>
<i>CD41</i>	<i>Integrin α-IIb</i>
<i>CD62P</i>	<i>Thrombozyten-Selektin</i>
<i>CD63</i>	<i>Oberflächenprotein aus der Gruppe der Tetraspanine</i>
<i>CHS</i>	<i>Chediak-Higashi-Syndrom</i>
<i>CPB</i>	<i>kardiopulmonale Bypass</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>ECC</i>	<i>extrakorporale Zirkulation</i>
<i>ECLS</i>	<i>extracoporeal life support</i>
<i>ECMO</i>	<i>extracoporeal membrane oxygenation</i>
<i>FACS</i>	<i>Durchflusszytometrie/fluorescence-activated-cell-sorter</i>
<i>FC</i>	<i>Durchflusszytometrie, fluorescence cytometry</i>
<i>Fc-Fragment</i>	<i>Fc-Domäne von IgG-Antikörper</i>
<i>FI</i>	<i>Fold increase</i>
<i>Fibrocystin-L</i>	<i>Transmembranprotein</i>
<i>FIX</i>	<i>Christmas-Faktor</i>
<i>FSC</i>	<i>forward scatter</i>
<i>FV</i>	<i>XXX, Proaccelerin</i>
<i>FVII</i>	<i>Proconvertin</i>
<i>FVIII</i>	<i>Antihämophilie Faktor A</i>
<i>FX</i>	<i>Stuart-Prower-Faktor</i>
<i>FXI</i>	<i>Rosenthal-Faktor</i>
<i>FXII</i>	<i>Hagemann-Faktor</i>
<i>FXIII</i>	<i>Fibrinstabilisierender Faktor</i>
<i>G_i</i>	<i>Gi-Proten-gekoppelte-Rezeptoren</i>
<i>GPIb</i>	<i>vWF-Rezeptor auf Thrombozyten</i>
<i>GPIb-V-IX</i>	<i>von-Willebrand-Rezeptor</i>
<i>GPIbα</i>	<i>ein Teil des vWF-Rezeptors</i>
<i>GPS</i>	<i>Grey-Platelet-Syndrom</i>
<i>G_q</i>	<i>Subtyp der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren</i>
<i>HC</i>	<i>healthy control, gesunde Kontrollprobe</i>
<i>HIT</i>	<i>Heparin induzierte Thrombozytopenie</i>
<i>HIV</i>	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
<i>HLM</i>	<i>Herz-Lungen-Maschine</i>

<i>HPS</i>	<i>Hermansky-Pudlak-Syndrom</i>
<i>IABP</i>	<i>Intraaortale Ballonpumpe</i>
<i>IgA</i>	<i>Immunglobulin A</i>
<i>IgG</i>	<i>Immunglobulin G</i>
<i>IgM</i>	<i>Immunglobulin M</i>
<i>ISTH</i>	<i>Internationale Gesellschaft für Thrombose und Hämostase, International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>
<i>LAMP-2</i>	<i>Lysosome-associated membrane protein 2</i>
<i>LTA</i>	<i>Lichttransmissionsaggregometrie</i>
<i>L-VAD</i>	<i>left ventricular assist device</i>
<i>MFI</i>	<i>mittlere Fluoreszenzintensität</i>
<i>MI</i>	<i>Myokardinfarkt</i>
<i>MP</i>	<i>Mikropartikel</i>
<i>MRP4</i>	<i>Multidrug Resistance-Associated Protein 4</i>
<i>NR/LR</i>	<i>Non- und Low-Responder</i>
<i>P2X1</i>	<i>ATP Rezeptor</i>
<i>P2Y1</i>	<i>G-Protein-gekoppelter Rezeptor für ADP und ATP</i>
<i>P2Y12</i>	<i>Chemorezeptor für Adenosindiphosphat</i>
<i>PAR1</i>	<i>Thrombinrezeptor</i>
<i>PAR4</i>	<i>Thrombinrezeptor</i>
<i>PBS</i>	<i>Pufferlösung</i>
<i>PC5</i>	<i>Phycoerythrin cyanin 5.1</i>
<i>PE</i>	<i>Phycoerythrin</i>
<i>PF4</i>	<i>Plättchenfaktor 4</i>
<i>PI3K</i>	<i>Phosphoinositid-3-Kinasen, Phosphoinositid-3-Kinasen</i>
<i>PLT</i>	<i>Blutplättchen</i>
<i>PLT-Ag</i>	<i>Blutplättchenaggregate</i>
<i>PRP</i>	<i>Plättchen-reiches-Plasma</i>
<i>PS</i>	<i>Phosphatidylserin, Phosphatidylserin</i>
<i>P-Selectin</i>	<i>Thrombozyten-Selektin</i>
<i>PSGL-1</i>	<i>transmembranäres Glykoprotein, das an weitere Zelladhäsionsmoleküle, die Selektine, bindet</i>
<i>R-VAD</i>	<i>right ventricular assist device</i>
<i>SD</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>SPD</i>	<i>Storage pool disease</i>
<i>sP-Selektin</i>	<i>lösliches P-Selectin</i>
<i>Src</i>	<i>Tyrosinkinase</i>
<i>SSC</i>	<i>side scatter</i>
<i>Syk</i>	<i>Tyrosinkinase</i>
<i>Tab.</i>	<i>Tabelle</i>
<i>TEM</i>	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>
<i>TF</i>	<i>Gewebefaktor</i>
<i>Thrombin</i>	<i>Faktor II</i>
<i>TP</i>	<i>Thromboxan-Prostanoid</i>
<i>TPFI</i>	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
<i>TRAP-6</i>	<i>Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid</i>
<i>TVT</i>	<i>tiefe Beinvenenthrombose</i>
<i>UFH</i>	<i>Unfraktioniertes Heparin</i>

<i>va.</i>	<i>venoarteriell</i>
<i>VMAT2</i>	<i>vesikulärer Monoamintransporter 2</i>
<i>VNUT</i>	<i>Vesicular nucleotide transporter</i>
<i>vv.</i>	<i>venovenös</i>
<i>vWf</i>	<i>von Willebrand-Faktor</i>
<i>WB</i>	<i>whole blood, Vollblut</i>
<i>WHO</i>	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
<i>α-Granula</i>	<i>Alpha Granula</i>
<i>αIIbβ3</i>	<i>Fibrinogenrezeptor</i>
<i>δ-Granula</i>	<i>Delta Granula, dichte Granula, dense granula</i>

1 Einleitung

1.1 Extrakorporale Lebensunterstützungsverfahren

Vor ca. 70 Jahren fand der erste Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) während eines herzchirurgischen Eingriffes an einem Menschen statt. Damals schrieb Herr John Heysham Gibbon (1903-1973) eines der bedeutendsten Kapitel in der Geschichte der extrakorporalen Zirkulation. Jahrzehnte später kam es zur Entwicklung der passageren mechanischen Organersatzverfahren wie beispielsweise der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) oder der kardialen Unterstützungssystemen wie L-VAD (left ventricular assist device), R-VAD (right ventricular assist device) und Bi-VAD (biventricular assist device), die immer noch bis heute einen Modernisierungs- bzw. Modifizierungswandel erleben.

Der kardiogene Schock ist eine bekannte schwerwiegende Komplikation des akuten Koronarsyndroms (ACS) und betrifft 5–10 % der Fälle eines akuten Myokardinfarkts (MI) (Kolte, Khera et al. 2014). Trotz der technischen Fortschritte zur frühen Revaskularisierung ist ein kardiogener Schock im Zusammenhang mit einem akuten MI mit signifikant hoher Sterblichkeit verbunden. 35–50 % der Patienten überleben keine 30 Tage nach einem stattgehabten Ereignis (Zeymer, Bueno et al. 2020).

Die Etablierung einer koronaren Reperfusion ist die wirksamste therapeutische Maßnahme bei solchen Patienten (Hochman, Sleeper et al. 1999). Während eine frühe Revaskularisierung bei akutem Myokardinfarkt-assoziiertem kardiogenem Schock die Mortalität reduziert hat (Puymirat, Fagon et al. 2017, Benenati, Toma et al. 2022), kann eine Myokardschädigung durch Revaskularisierung immer noch einen kardiogenen Schock auslösen und dies auch mit ungewissem Langzeitergebnis (Ng and Yeghiazarians 2013, Khera, Secemsky et al. 2020).

Darüber hinaus ist ein zunehmender Anteil des kardiogenen Schocks mittlerweile auf nicht-ischämische Ursachen zurückzuführen, also Nicht-Myokardinfarkt-assoziiertem kardiogenem Schock (Gonzalez-Pacheco, Manzur-Sandoval et al. 2021, Osman, Syed et al. 2021). Das Management sollte sich daher auf die

Aufrechterhaltung der hämodynamischen Stabilität und einer angemessenen Gewebepfusion konzentrieren. Zur Aufrechterhaltung der Herzleistung können Volumenexpansion und pharmakologische Therapien in Form von Vasopressoren und Inotropika eingesetzt werden. Allerdings sollten Dosierung und Behandlungsdauer aufgrund des damit verbundenen Anstiegs des myokardialen Sauerstoffbedarfs und der Vasokonstriktion auf ein Minimum beschränkt werden (Thiele, Ohman et al. 2019). Die alleinige Verwendung pharmakologischer Wirkstoffe kann die linksventrikuläre Nachlast und den myokardialen Sauerstoffbedarf erhöhen, was zu Komplikationen führen kann (Samsky, Morrow et al. 2021, Masiero, Cardaioli et al. 2022).

Um die hämodynamische Stabilisierung bei Patienten mit kardiogenem Schock zu unterstützen, wurden als wichtige therapeutische Optionen mechanische Kreislaufunterstützungssysteme entwickelt (Hajjar and Teboul 2019, McDonagh, Metra et al. 2021, Masiero, Cardaioli et al. 2022).

Die intraaortale Ballonpumpe (IABP) ist nach wie vor das am weitesten verbreitete mechanische Kreislaufunterstützungsverfahren. Gemäß den aktuellen Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie gibt es eine Empfehlung der Klasse IIb für Patienten mit ACS und schwerem refraktärem kardiogenem Schock, während seine routinemäßige Anwendung bei Patienten mit kardiogenem Schock nach ACS ohne mechanische Komplikationen nicht empfohlen wird (Byrne, Rossello et al. 2023). Allerdings gibt es Belege aus einer großen Metaanalyse, die nahe legen, dass sich die Anwendung der IABP zwar positiv auf die hämodynamischen Parameter auswirken kann, jedoch kein Überlebensvorteil mit deren Anwendung verbunden ist (Unverzagt, Buerke et al. 2015, Ouweneel, Eriksen et al. 2017, Li, Yan et al. 2019). Darüber hinaus wurde eine der größten randomisierten Studien zu diesem Thema durchgeführt, nämlich die IABP-SHOCK II-Studie. Diese zeigte, dass die Verwendung von IABP keinen Einfluss auf die Gesamtmortalität bei Patienten mit kardiogenem Schock nach einem Herzinfarkt hat (Thiele, Zeymer et al. 2013). Ebenso gibt es derzeit keine hochrangigen Beweise für die Verwendung von linksventrikulären Unterstützungsgeräten wie Impella bei der gleichen Patientenkohorte. Ihre

Verwendung bleibt daher eine Empfehlung der Klasse IIb des American College of Cardiology (Amsterdam, Wenger et al. 2014, Batchelor, Wheelahan et al. 2022).

Die ECMO oder auch mit dem angloamerikanischen Überbegriff ECLS (extracorporeal life support) genannt, ist ein alternatives System, das Kreislaufunterstützung und Lungengasaustausch anbietet und die Organperfusion bei Links-, Rechts- oder globaler Herzinsuffizienz/-versagen wiederherstellen kann (Rao, Khalpey et al. 2018). Sein Einsatz hat in den letzten zwei Jahrzehnten erheblich zugenommen, wobei einige alte Studien auf eine vorteilhafte Wirkung bezüglich des Überlebens der Patienten unter ECMO hinweisen (Chen, Lin et al. 2008, Combes, Leprince et al. 2008). Während die venovenöse ECMO (vv. ECMO) eine stabile Hämodynamik erfordert, umgeht die venoarterielle ECMO (va. ECMO) sowohl das Herz als auch die Lunge und bietet auf diese Weise respiratorische sowie hämodynamische Unterstützung bei kardiogenem Schock (Makdisi and Wang 2015).

Wie Warren Zapol, einer der Entdecker der ECMO, 1972 in einem Leitartikel im „New England Journal of Medicine“ feststellte, besteht das Ziel von ECLS-Verfahren darin, Zeit zu gewinnen und gleichzeitig eine angemessene Gewebedurchblutung aufrechtzuerhalten (Zapol and Kitz 1972).

Eine aktuelle systematische Überprüfung und Metaanalyse hochwertiger randomisierter kontrollierter Propensity-Score-Matched-Studien, die die Ergebnisse von mechanischen Kreislaufunterstützungssystemen sowohl ohne als auch unter deren Einsatz untersuchten und miteinander verglichen, zeigte, dass sich die Sterblichkeitsrate bei Patienten mit kardiogenem Schock unter ECMO oder IABP deutlich reduzierte, während andere Unterstützungssysteme diese nicht signifikant senken konnten (Low, Ling et al. 2024).

Derzeit wird die Verwendung von ECMO nur für refraktäre Fälle von kardiogenem Schock nach einem akuten Myokardinfarkt empfohlen und hängt von der

individuellen Erfahrung der speziellen Behandlungszentren ab (Zeymer, Bueno et al. 2020).

ECMO kann aber auch eine Brücke zur Genesung von ARDS-Patienten (acute respiratory distress syndrom) sein, indem es der Lunge Zeit zum Heilen gibt und gleichzeitig die Sauerstoffversorgung und Belüftung unterstützt (Brodie and Bacchetta 2011).

Der Einsatz von ECMO bei ARDS hat in den letzten Jahren aufgrund technologischer Fortschritte und Verbesserungen bei der Patientenauswahl/-behandlung erheblich zugenommen. Allerdings bleibt die optimale Behandlung von ARDS-Patienten mittels ECMO immer noch umstritten und die Sterblichkeitsraten bei diesen Patienten variieren stark zwischen den einzelnen Studien (Munshi, Walkey et al. 2019). Darüber hinaus können mehrere Faktoren die Sterblichkeitsrate bei dieser Patientenkohorte beeinflussen, darunter die Patientenauswahl, der Zeitpunkt der ECMO-Initiierung, die Dauer der ECMO-Unterstützung und Komplikationen im Zusammenhang mit der ECMO-Anwendung (Peek, Mugford et al. 2009).

Mehrere frühere systematische Übersichtsarbeiten haben die Sterblichkeitsraten bei ARDS-Patienten unter ECMO untersucht. Beispielsweise wurde 2013 eine systematische Übersicht veröffentlicht, die über eine gepoolte Sterblichkeitsrate von 43 % bei ARDS-Patienten unter ECMO berichtete (Zampieri, Mendes et al. 2013). Ein anderer systematischer Review berichtete über eine Sterblichkeitsrate von 38 % (Schmidt, Bailey et al. 2014). Diese Überprüfungen umfassten jedoch Studien mit unterschiedlichen Patientenpopulationen und ECMO-Managementprotokollen, die die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben könnten.

In einer weiteren systematischen Übersichtsarbeit, wo Studien mit einer einheitlichen Patientenpopulation und standardisierten ECMO-Protokollen auf Sterblichkeitsraten von ARDS-Patienten unter ECMO-Einsatz bewertet wurden, konnten in verschiedenen Studien erhebliche Schwankungen der Sterblichkeitsraten aufgezeigt werden. Sie lagen zwischen 22 % und 62,6 % (Sanivarapu, Osman et al. 2023). Die Variabilität der Mortalität konnte jedoch

durch verschiedene Faktoren erklärt werden, insbesondere durch das Alter, den Schweregrad der Hypoxämie, der Ätiologie des ARDS und der Entwicklung von Organschäden. Auch ECMO-bedingte Faktoren wie die Entwicklung einer Thrombozytopenie, Blutungen aufgrund kontinuierlicher Antikoagulation und die Art der Kanülierung beeinflussen die Sterblichkeitsrate ebenfalls.

Letztendlich kann ein umfassendes detailliertes Verständnis der zuvor erwähnten Faktoren eine weitreichende Hilfestellung in der klinischen Praxis geben. Dadurch kann die Behandlung der ECMO-Patienten in Zukunft verbessert werden und schließlich, die globale Belastung durch diese schwere und lebensbedrohliche Krankheit wie ARDS verringert werden.

1.2 Venovenöse und venoarterielle ECMO

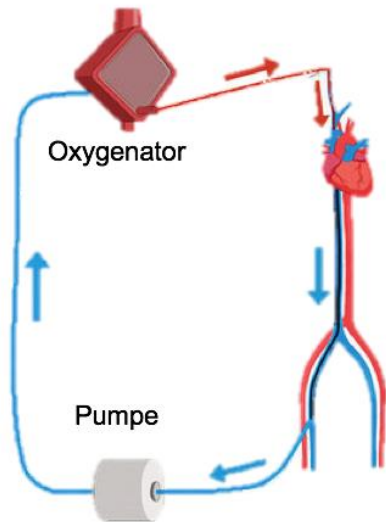
Die relative Einfachheit des ECMO-Schaltkreises kann die Physiologie des Patienten auf unterschiedliche Weise verändern. Sobald man bei einem Patienten mit der Unterstützung beginnt, sind je nach Art und Lage der Kanülen sowie je nach den zugrundeliegenden klinischen Bedingungen unterschiedliche hämodynamische Veränderungen potenziell möglich. Wenn das Blut, das die künstliche Lunge verlässt, in das venöse System des Patienten zurückfließt, spricht man von einer venovenösen ECMO (vv. ECMO) und das System steht tatsächlich im Einklang mit der kardiopulmonalen Physiologie des Patienten.

(Abb. 1A)

Wenn das Blut, das den künstlichen Kreislauf verlässt, in die Arterie des Patienten zurückgeführt wird, spricht man von einer venoarteriellen ECMO (va. ECMO). Die Kreisläufe verlaufen hier stattdessen parallel zueinander. **(Abb. 1B)**

ECMO

a) Venovenöse Kanülierung



b) Venoarterielle Kanülierung

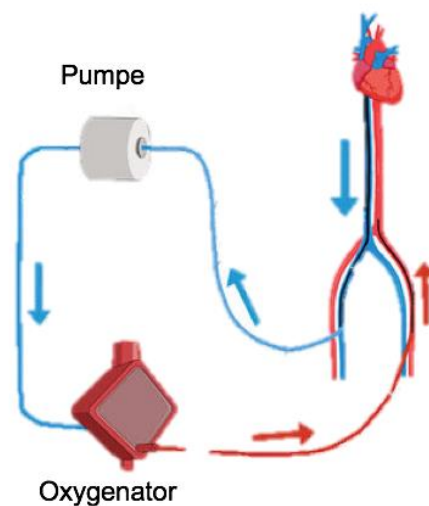


Abbildung 1: Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO)

a) Venovenöse Kanülierung; b) Venoarterielle Kanülierung (adaptiert nach Upchurch, Blumenberg et al. 2021)

Im Weiteren werde ich die va. und vv. ECMO getrennt betrachten und die jeweiligen Indikationen erläutern sowie die Therapieziele näher beschreiben.

1.3 Indikationen und Ziele für die Implantation der va. und vv. ECMO

Eine Hauptindikation für die Implantation der va. ECMO ist der kardiogene Schock, der als ein Zustand der Gewebhypoperfusion definiert ist, der durch das akute Herzversagen hervorgerufen wird (Authors/Task Force, McDonagh et al. 2024). Obwohl praktisch jede Ursache einer Myokardfunktionsstörung zugrunde liegen kann, ist der akute Myokardinfarkt die Hauptursache für den kardiogenen Schock. Weitere häufige Ursachen sind Myokarditis, Lungenembolie, Schock nach Kardiotomie und akut dekompensierte schwerste chronische Herzinsuffizienz. Die Inzidenz eines kardiogenen Schocks bei Patienten mit akutem MI liegt in den aktuellen Datensätzen bei 3–13 %, obwohl diese Zahlen sehr wahrscheinlich unterschätzt werden, da sie präklinische Todesfälle nicht berücksichtigen (van Diepen, Katz et al. 2017). Trotz der

Verbesserungen bei den unterstützenden Therapien und Reperfusionstrategien bleibt die Sterblichkeitsrate inakzeptabel hoch und der kardiogene Schock stellt die häufigste Todesursache bei Patienten dar, die wegen eines MI ins Krankenhaus eingeliefert werden. In dieser dramatischen Situation kann die sofortige Einrichtung einer peripheren mechanischen Kreislaufunterstützung den Patienten stabilisieren und Zeit für diagnostische und therapeutische Verfahren gewinnen, die unter Aufrechterhaltung einer angemessenen Gewebedurchblutung durchgeführt werden können.

Der Endpunkt jeder mechanischen Kreislaufunterstützung besteht darin, eine adäquate Organperfusion wiederherzustellen, um Schäden vorzubeugen oder eine normale Organfunktion wiederherzustellen, wenn eine Schädigung bereits begonnen hat. Die Reduzierung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks, der Herzwandspannung und der Lungenstauung, zusammen mit einer Modulation der neurohormonellen Reaktion auf akute und chronische Herzinsuffizienz wie endogene Katecholamin-, Renin-Angiotensin-, ANP- und Zytokinfreisetzung, sind Ziele der mechanischen Kreislaufunterstützung, gleich ob mit va. ECMO oder mit L-VAD.

Die Erholung des Herzmuskels nach einem akuten reversiblen kardiogenen Schock oder einem „*Reverse Remodeling*“ des Herzens bei chronischer Herzinsuffizienz ist das, was man letztendlich bei Patienten erreichen möchten. Wenn dies nicht möglich ist und die Organfunktionsstörung nicht behoben werden kann, bieten diese Systeme auch andere Optionen an: *Bridge-to-Transplantation*, *Bridge-to-Bridge* oder Zieltherapie. Diese Endpunkte, insbesondere die Zieltherapie, können mit linksventrikulären Unterstutzungsgeräten erreicht werden. Während L-VAD ein einventrikuläres Unterstutzungssystem darstellt und einen normal funktionierenden rechten Ventrikel und regelrechte eigene Lungenfunktion erfordert, übernimmt die va. ECMO sowohl Herz- als auch Lungenbypass und reproduziert somit den vollständigen kardiopulmonalen Bypass (CPB), wie beispielsweise die HLM bei Operationen am offenen Herzen.

Während es bei der va. ECMO primär um das Herzversagen und entsprechend um die Aufrechterhaltung der Kreislaufsituation geht, handelt es sich bei der vv. ECMO um passagere maschinelle Übernahme der Lungenfunktion bei akutem Atemnotsyndrom.

Der erste Bericht über ARDS wurde 1967 von Herrn Ashbaugh und seinem Team veröffentlicht.

ARDS ist durch einen akuten Beginn einer Ateminsuffizienz mit arterieller Hypoxämie und Lungenversteifung gekennzeichnet, die nicht auf das Herzversagen zurückzuführen ist, sondern auf ein massives „läsionales“ (durch eine erhöhte Permeabilität der Alveolar-Kapillar-Membran verursachtes) Lungenödem zurückzuführen ist (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). ARDS kann als Ergebnis einer stereotypen Reaktion der Lunge auf einen oder mehrere Entzündungsreize angesehen werden, die hauptsächlich von der Lunge (z. B. fulminante Lungenentzündung) oder von einem anderen Organ (z. B. bei Sepsis) ausgeht. Die Entzündungsreaktion führt zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die aus den Kapillaren in die Alveolen austreten und Entzündungsmediatoren freisetzen. Dadurch verstärkt sich die Entzündungsreaktion weiter (Bellani, Messa et al. 2009). Dies führt dann zu einer erhöhten Permeabilität der Alveolar-Kapillar-Membran mit der Bildung eines proteinreichen Alveolarödems und zur fulminanten Reduktion der Compliance der Lunge (Ware and Matthay 2000). Die klinische Folge ist die Entwicklung einer schweren arteriellen Hypoxämie und einer Steigerung der Atemarbeit, die häufig eine Intubation des Patienten und einen Einsatz mechanischer Beatmung sowie bei Erschöpfung dieser zusätzlich die passagere Anlage einer vv. ECMO erfordert.

1.4 Pathophysiologie der ECLS

Die ECLS-Systeme, wie die vv. und va. ECMO, üben einen tiefgreifenden Einfluss auf den normalen Ablauf der Körperfunktionen aus. Die Pathophysiologie unter den Bedingungen des extrakorporalen Kreislaufs ist zum einen davon gekennzeichnet, dass im Verbund (extrakorporaler Kreislauf +

menschlicher Organismus) nicht nur das künstliche System als Variable auftritt, sondern darüber hinaus ein erkrankter Zustand des Organismus besteht. Die pathophysiologische Bedeutung ergibt sich aus den Bedingungen, wie die extrakorporale Zirkulation in Bezug auf die Fremdmaterialoberfläche, Antikoagulation, Hämodilution und Hämodynamik durchgeführt wird. Alle diese Parameter und noch viele mehr, die hier nicht erwähnt sind, üben in erster Linie ihren Einfluss auf die Blutbestandteile aus, dann auf die Regelsysteme und schließlich auf die Endorgane der Blutzirkulation.

1.4.1 Blutkontakt zur Fremdoberfläche

Typischerweise scheitert oft die moderne ECMO-Behandlung aufgrund einer kritischen Verengung oder Okklusion künstlicher Austauschstellen (z. B. durch Embolien oder Thrombosen). Da in der ECMO das Blut dem Kontakt der künstlichen Oberflächen ausgesetzt wird, geht dieser mit Entzündungsreaktionen und Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen sowie Aktivierung des Gerinnungssystems einher (Oliver 2009, Millar, Fanning et al. 2016). Abhängig von der Ladung und Zusammensetzung der freiliegenden Oberfläche kommt es zu Proteinablagerungen und -denaturierungen sowie zur Thrombinproduktion. Deswegen ist eine kontinuierliche Antikoagulation unter der ECMO-Therapie erforderlich, um die Aktivierung des Gerinnungssystems zu verhindern bzw. zu verzögern. Es ist eine deutliche Herausforderung das Gleichgewicht zwischen übermäßiger und unzureichender Antikoagulation (Blutung vs. Thromboembolien bei Patienten oder im extrakorporalen System) zu finden (Oliver 2009, Figueroa Villalba, McMullan et al. 2022). Wenn die Antikoagulation nicht optimal ist, kommt es zu einer Aktivierung der Blutgerinnung, die eine Verbrauchskoagulopathie mit dem Abfall der Thrombozyten und der Blutgerinnungsfaktoren, insbesondere Fibrinogen, nach sich zieht. Eine Hyperaktivierung des fibrinolytischen Systems kann ebenfalls in Gang gesetzt werden und damit zu kritischen Blutungen (massive gastrointestinale Blutungen, Hirnblutungen) führen (Oliver 2009, Murphy, Hockings et al. 2015, Sarathy, Turek et al. 2021).

1.4.2 Blutströmung unter ECLS

Die Strömungsdynamik des Blutes im künstlichen Kreislaufsystem ist ein weiteres Merkmal mit pathophysiologischer Bedeutung. Es lassen sich verschiedene Strömungsmuster beobachten: Laminarer und turbulenter Fluss, Zonen mit hoher Beschleunigung, Druckgradienten in den Strömungskanälen. Strömungsbedingte Kräfte können sich auf die Blutbestandteile negativ auswirken. Wenn bestimmte Scherkräfte auf eine Zelloberfläche wirken, können diese Zellen irreversible Schäden erleiden (Murphy, Hockings et al. 2015).

Obwohl widerstandsfähigere Materialien und biologisch verträglichere Beschichtungen für den extrakorporalen Kreislauf entwickelt wurden, ist die Hämokompatibilität immer noch begrenzt und eine sorgfältige Überwachung des ECMO-Systems weiterhin erforderlich. Jeder Teil des Kreislaufs muss häufig auf Blutgerinnsel und Verformungen der Schläuche überprüft werden, insbesondere dort, wo der Blutfluss turbulenter ist, so beispielsweise an Anschlüssen, Absperrhähnen und Kanülen. Die zu erwartenden Komplikationen können je nach verwendeter Pumpentechnologie und Patientenpopulation (Erwachsene vs. Kinder) unterschiedlich sein. Die beliebtesten Technologien sind die Rollenpumpe und die Zentrifugalpumpe. Die Rollenpumpe ist in der pädiatrischen Intensivmedizin sehr verbreitet (Barrett, Jagers et al. 2013).

Die Gesamtkomplikationsrate unterscheidet sich nicht wesentlich mit einem allerdings signifikanten Unterschied in der Hämolyserate zugunsten von Rollenpumpen bei Kindern (Mielck and Quintel 2005).

Spezifische Komplikation bei Rollenpumpen ist die Luftembolie, die meist durch Leitungs- oder Stromkreisunterbrechungen verursacht wird. Die Zentrifugalpumpen hingegen sind einer Entkopplung zwischen Pumpenkopf und Pumpenmotor ausgesetzt, wodurch die Behandlung unterbrochen und Thromben verursacht werden können.

1.4.3 Thrombozyten und Antikoagulation unter ECMO

Die extrakorporale Zirkulation übt einen tiefgreifenden Effekt auf die Thrombozyten aus. Die physikochemischen Eigenschaften lösen an der Thrombozytenoberfläche beides aus, die plasmatische Gerinnung und die

Plättchenaktivierung. Die Beschichtung von künstlichen Oberflächen mit Plasmaproteinen verändern das Interaktionsgeschehen. Ein Blut-Luft-Kontakt führt zusätzlich zu einer Plättchendestruktion. Aktivierte Plättchen zeigen funktionell eine eingeschränkte Aggregabilität und morphologisch eine Entleerung ihrer Granula (Balle, Jeppesen et al. 2018). Es kommt zum Abfall der Thrombozytenkonzentration, die initial besonders ausgeprägt sein kann. Aus dem Plättchengranula werden Serotonin, Plättchenfaktor 4 (PF4) sowie saure Phosphatasen ausgeschüttet, die wiederum die Thrombozytenaktivierung begünstigen (Balle, Jeppesen et al. 2018, Jiritano, Serraino et al. 2020).

Die systemische Antikoagulation während der ECMO soll die Thrombinbildung kontrollieren und das Risiko thrombotischer und hämorrhagischer Komplikationen begrenzen (Muslem, Caliskan et al. 2018). Unfraktioniertes Heparin (UFH) ist das am häufigsten verwendete Antikoagulationstherapie (Oliver 2009). UFH wirkt durch Bindung und Inaktivierung von Faktor Xa und Thrombin. Heparin ist jedoch kein direkter Thrombininhibitor und seine Wirksamkeit hängt vom Vorhandensein von Antithrombin (AT/AT III) ab. UFH erhöht die Kinetik der natürlichen Thrombin-Antithrombin-Bindung um das 2.000- bis 4.000-fache. Daher hängt die Wirksamkeit von Heparin als Antikoagulation stark von der AT-Konzentration ab. AT ist eine Art „Selbstmord“-Substrat vom Thrombin und sobald es an Thrombin und Faktor Xa gebunden wird, muss es von der Leber wiederhergestellt werden. Deshalb verbraucht die chronische Heparinverabreichung die endothelialen und zirkulierenden AT-Reserven. Darüber hinaus kann Heparin durch Plasmaproteine, die Endotheloberfläche und vor allem durch zirkulierende Blutplättchen gebunden und inaktiviert werden, die das Heparin durch Freisetzung von PF4 abfangen. Aufgrund dieses komplexen Szenarios ist eine genaue Dosierung nicht definiert, die zur korrekten Abschwächung der Thrombinbildung erforderlich ist und kann im Verlauf einer ECMO stark variieren. Der klassische Dosisbereich wird zwischen 20 und 70 IU/kg/h angegeben (Oliver 2009, Annich 2015). Diese kann jedoch je nach Bedingungen von Person zu Person und sogar innerhalb derselben Person variieren. Grundsätzlich führt eine chronische UFH-Infusion zu einem AT-Verbrauch und damit zu einer geringeren Heparinsensitivität. Sobald AT korrigiert

ist, sinkt die erforderliche UFH-Dosis. Gleichzeitig ist der Verbrauch von Blutplättchen während der ECMO unvermeidlich. Der Thrombozytenabfall führt allerdings zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber UFH. Dennoch nimmt hier die Empfindlichkeit gegenüber UFH dann ab, sobald allogene Thrombozytenkonzentrate verabreicht werden und die Thrombozyten wieder steigen. Insgesamt führt dies dazu, dass eine kontinuierliche Anpassung der UFH-Dosis erforderlich ist, auch wenn generell ein Trend zu höheren Dosen zu beobachten ist, je länger das ECMO-System in Betrieb bleibt (Ranucci, Ballotta et al. 2011).

1.5 Patientenbezogene Komplikationen unter ECMO

1.5.1 Blutungen

Blutungen sind eine der häufigsten Komplikationen während der ECMO zum einen aufgrund der systemischen Antikoagulation und zum anderen wegen der Thrombozytenfunktionsstörung, die aus der Aktivierung durch Kontakt und Scherbeanspruchung resultiert.

In der Literatur wird von signifikanten Blutungen mit einer Inzidenz bis zu 50 % berichtet (Cheng, Hachamovitch et al. 2014). Es gibt dafür verschiedene Gründe: Der erste Grund ist die kontinuierliche therapeutische Antikoagulation mittels UFH und der Zweite ist eine bereits vorangegangene oder durch das künstliche Unterstützungssystem induzierte systemische Inflammation, die zu einem Ungleichgewicht des Gerinnungssystems im Patienten führen kann. Aus diesem Grund können selbst herkömmliche Routineeingriffe wie das endotracheale Absaugen, Anlegen einer Magensonde oder Harnkatheterisierung zu massiven unkontrollierbaren Blutungen führen, die weitere Interventionen sowie eine Änderung des Antikoagulationsregimes erfordern.

Ein Problem stellen vor allem die intrakraniellen Blutungen dar, die die Mortalität unter ECLS deutlich erhöhen. Gastrointestinale Blutungen können aber ebenfalls zum ernsthaften Problem für den Patienten werden, da sie häufig erst später diagnostiziert werden. Zur Behandlung von relevanten Blutungen sind daher eine rechtzeitige Intervention sowie Operation von großer Bedeutung. Die Wiederherstellung einer adäquaten Gerinnung durch Substitution von

Gerinnungsfaktoren sollte ebenfalls parallel erfolgen (Anselmi, Guinet et al. 2016).

1.5.2 Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Heparin induzierte Thrombozytopenie (HIT) kommt bei Patienten mit ECMO und anderen Kreislaufunterstützungsverfahren viel häufiger vor als bei der restlichen Population. Die Rede ist von etwa 15 % (Koster, Huebler et al. 2007, Warkentin, Greinacher et al. 2009, Lusebrink, Scherer et al. 2023). HIT kann besonders schwierig zu diagnostizieren sein, da es viele andere Gründe für eine niedrige Thrombozytenzahl gibt (Althaus, Straub et al. 2020).

Es gibt zwei Typen von HIT. Der Typ-I ist eine nicht-immunvermittelte Reaktion. Dieser ist weitaus häufiger als Typ-II und kann bereits am ersten Tag der Therapie mittels Heparins auftreten. Es handelt sich dabei um eine milde Reaktion, die mit keinen schwerwiegenden Komplikationen verbunden ist und bei der sich die Thrombozytenzahl wieder spontan normalisiert (Warkentin 2023).

Der Typ-II-HIT ist eine durch Antikörper vermittelte Immunreaktion. Da die Bildung der Antikörper einige Zeit in Anspruch nimmt, tritt diese Reaktion normalerweise nach 5 bis 14 Tagen ab Beginn der Heparin-gabe auf. Wenn ein Patient jedoch innerhalb der letzten 100 Tage der Heparintherapie ausgesetzt war, können Antikörper im Blut noch verbleiben, was dazu führen kann, dass sich die Erkrankung bereits am ersten Tag der erneuten Heparin-Exposition manifestiert. Dabei handelt es sich um eine sehr schwerwiegende Reaktion des Immunsystems, die zu einer Hyperkoagulation und zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann (Warkentin 2023).

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird PF4 in den α -Granula der Blutplättchen gespeichert und bei der Blutplättchenaktivierung freigesetzt. PF4 ist positiv geladen und kann daher an das negativ geladene Heparan (eine heparinähnliche Substanz, die normalerweise auf der Endothelzelloberfläche vorhanden ist) binden. PF4 kann auch mit einer viel höheren Affinität als Heparan an exogenes Heparin binden (Nicolas, Nicolas et al. 2024).

Die Bindung von PF4 an Heparin kann die Bildung von IgG-, IgA- oder IgM-Antikörpern auslösen, die für den Heparin-PF4-Komplex spezifisch sind. HIT kann nur auftreten, wenn sich IgG-Antikörper nach der Bindung mit Heparin-PF4-Komplex mit dem F_c-Fragment auf der Blutplättchenoberfläche verankert und damit zur Thrombozytenaktivierung führt. Aktivierte Blutplättchen setzen dann prothrombotische Substanzen wie Thrombin und PF4 frei. Da IgG mehr Blutplättchen aktiviert, wird mehr PF4 freigesetzt und bildet mehr Komplexe mit Heparin, wodurch mehr weitere Blutplättchen aktiviert werden. Dies führt zu einem stark hyperkoagulierbaren Zustand und einem kontinuierlichen Kreislauf, der nur durchbrochen werden kann, wenn Heparin abgesetzt und eine geeignete Behandlung eingeleitet wird (Nicolas, Nicolas et al. 2024).

HIT kann vielerlei Symptome aufweisen. Das führende klinische Merkmal ist ein Abfall der Thrombozytenzahl um mehr als 50 % nach Beginn einer Heparintherapie (Bakchoul, Greinacher et al. 2016, Hidiatov, Zlamal et al. 2020). Die Thrombozytenzahl sinkt, weil Makrophagen die IgG-beschichteten Thrombozyten verbrauchen und das retikuloendotheliale System sie entfernt. Wenn die Thrombozyten gleichzeitig aktiviert werden, aggregieren sie und es bildet sich ein Thrombus.

Da HIT einen hyperkoagulierbaren Zustand verursacht, kann es zu venösen und/oder arteriellen Thrombosen kommen, wodurch die Morbidität und die Letalität dieser Erkrankung deutlich ansteigt (Bakchoul, Greinacher et al. 2016). Die häufigsten Komplikationen sind tiefe Beinvenenthrombose (TVT), Lungenembolie oder Hautnekrose. Letzteres stellt insbesondere dann ein Risiko dar, wenn Warfarin in der Akutphase verabreicht wurde. Das Risiko dieser Komplikationen ist innerhalb der ersten 10 Tage am höchsten. Der prothrombotische Zustand bleibt jedoch bis zu 30 Tage nach Absetzen von Heparin bestehen (Fathi 2018).

Bei Verdacht auf eine HIT sollte durch geeignete diagnostische Tests das Vorhandensein von Anti-PF4-Heparin-Komplex-Antikörpern ausgeschlossen werden. Wenn dies bestätigt wird, sollte Heparin abgesetzt und durch einen

direkten Thrombininhibitor (Bivalirudin oder Argatroban) ersetzt werden (Warkentin 2023).

1.5.3 Erworbenes von Willebrand-Syndrom

Das erworbene von Willebrand-Syndrom ist durch den Verlust der großen Multimere des von-Willebrand-Faktors gekennzeichnet, was zu einer Störung der Blutplättchenadhäsion am zerstörten Endothel führt. Verantwortlich für diesen Zustand, der bei ECMO-Patienten recht häufig vorkommt, sind hohe Scherkräfte, die durch Zentrifugalpumpen erzeugt werden (Heilmann, Geisen et al. 2012, Kalbhenn, Schlagenhaut et al. 2018, Schlagenhaut, Kalbhenn et al. 2020, Panholzer, Bajorat et al. 2021, Kalbhenn and Zieger 2022). Es ist jedoch immer noch unklar, ob dieser Zustand mit klinisch relevanten Blutungen einhergeht und die Notwendigkeit eines therapeutischen Ansatzes (Faktorersatz oder Desmopressingabe) erforderlich ist (Kalbhenn, Glonnegger et al. 2022).

1.6 Physiologie der Thrombozyten

Nach ihrer Freisetzung aus Megakaryozyten zirkulieren Blutplättchen als winzige Wächter des Gefäßsystems. In dieser Funktion sind sie mit Organellen und Membransystemen ausgestattet, die zu vielen Aspekten der Wirtsabwehr beitragen, einschließlich Hämostase, Thrombose, Entzündung, Angiogenese und Wundheilung (Frojmovic and Milton 1982, Wagner and Burger 2003, Gawaz, Langer et al. 2005, Gawaz 2006, Boilard, Nigrovic et al. 2010). In ihrem Arsenal sind Granula hervorzuheben. Das sind in sich geschlossene vesikuläre Strukturen, die hohe Konzentrationen bioaktiver Ladungen speichern. Die Granulaladungen werden in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Situationen aus aktivierten Blutplättchen freigesetzt und dienen der Aufrechterhaltung der Integrität der Blutgefäße (Lemons, Chen et al. 1997, King and Reed 2002, Flaumenhaft 2003, Whiteheart 2011). Die wichtigsten Blutplättchenorganellen, die δ -Granula und die α -Granula, kommen nur bei Blutplättchen vor. Allerdings enthalten Thrombozyten auch eine Reihe von Organellen wie Lysosomen und Mitochondrien, die allen eukaryotischen Zellen gemeinsam sind. Obwohl diese Organellen in erster Linie Haushaltsfunktionen erfüllen, gibt es Hinweise darauf, dass sie auch an der Aufrechterhaltung der

Gefäßintegrität beteiligt sind. Darüber hinaus ist das Blutplättchen aufgrund seiner ungewöhnlichen Art der Biogenese mit einzigartigen Membransystemen ausgestattet, darunter mit dem offenen kanalikulärem System und dem dichten tubulären System, die sich durch sein Inneres ziehen (White 2004, White, Key et al. 2005). Diese Membransysteme tragen auch zur Funktion der Blutplättchen bei der Abwehr des Wirts bei. **(Abb. 2)**

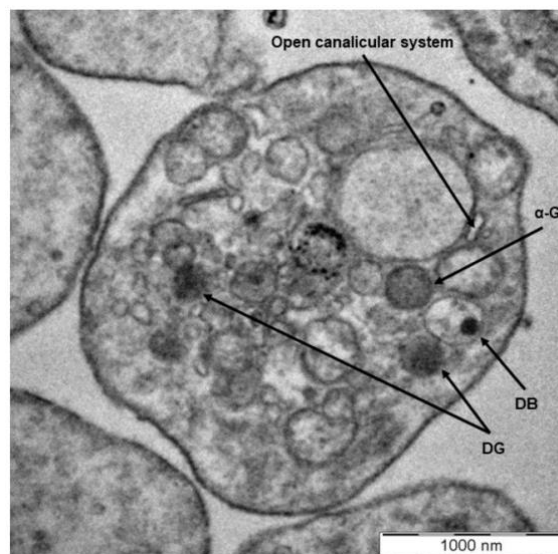


Abbildung 2: Ein Transmissionselektronenmikroskopiebild (TEM), Morphologie eines gesunden Blutplättchens

Die scheibenförmige, verdichtete Struktur weist auf ein ruhendes Plättchen hin, mit klarer Visualisierung der δ -Granula (eng. dense granula, im Bild als DG) und dichter Körperchen (eng. dense body, im Bild als DB), der α -Granula (im Bild als α -G) und eines offenen, kanalikulärem Systems (Maßstab 1000 nm) (Repsold and Joubert 2021).

1.6.1 Die δ -Granula der Thrombozyten

Die dichten Thrombozytengranula sind lysosomenbezogene Organellen, die nur bei Blutplättchen vorkommen (Raposo, Marks et al. 2007). Die Blutplättchen enthalten durchschnittlich drei bis acht dichte Granula (Gerrard, Rao et al. 1977, White and Gerrard 1978). Diese Granula haben einen Durchmesser von ca. 150 nm und sind so elektronendicht, dass sie ohne Färbung mit dem Elektronenmikroskop nachgewiesen werden können. **(Abb. 2)** Der luminale pH-Wert dichter Granula beträgt ca. 5,4, verglichen mit einem zytosolischen pH-Wert

Neben Transportern enthalten die δ Granula mehrere andere Membranproteine. Die Membran der dichten Granula exprimieren Marker wie das Tetraspanin CD63 (Granulophysin) und das Lysosomal-assoziierte Membranprotein-2 (LAMP-2, CD107b). (**Abb. 3**) CD63 ist am Membrantransport beteiligt und unterstützt die Lieferung von Membranproteinen an Vesikel. Es wird nach der Aktivierung auf der Blutplättchenoberfläche exprimiert, wo es mit α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) assoziiert wird (Israels, McMillan-Ward et al. 2001, van der Zee, Biro et al. 2006).

1.6.2 Die α -Granula der Thrombozyten

Die α -Granula stellt die größte Granula-Population in Blutplättchen dar, wobei 50–80 Granula in einem einzelnen Thrombozyten vorhanden sind. Ein α -Granula hat einen Durchmesser von 200–500 nm, macht 10 % des Blutplättchenvolumens aus und hat eine berechnete Oberfläche von 14 μm^2 /Thrombozyt (Harrison and Cramer 1993, Blair and Flaumenhaft 2009). Das durch TEM beschriebene klassische α -Granula weist mehrere Merkmale auf, darunter (I) die periphere Membran des Granula, (II) ein elektronendichtes Nukleoid, das Chemokine und Proteoglykane enthält, (III) einen angrenzenden, weniger elektronendichten Bereich zum Nukleoid, das Fibrinogen enthält, und (IV) eine periphere elektronenluzente Zone, die den von Willebrand-Faktor (vWf) enthält (Blair and Flaumenhaft 2009). Neuere bildgebende Verfahren stellen jedoch in Frage, ob dieses klassische α -Granula repräsentativ für alle α -Granula ist. Die Elektronentomographie mit dreidimensionaler Rekonstruktion des Thrombozyteninneren zeigt morphologisch unterschiedliche α -Granula-Populationen (van Nispen tot Pannerden, de Haas et al. 2010). Durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie wurden α -Granula identifiziert, die offenbar nicht alle Bestandteile des klassischen α -Granula aufweisen (Sehgal and Storrie 2007). Diese Beobachtungen der Heterogenität der α -Granula haben grundlegende Fragen hinsichtlich deren Identität aufgeworfen. Während die Granula mit einem klassischen Erscheinungsbild im Elektronenmikroskop und solche, die mit Antikörpern gegen P-Selectin, vWf und Fibrinogen in der Immunfluoreszenz gefärbt sind, eindeutig als α -Granulat identifiziert werden können, ist die Identifizierung anderer vesikulärer Strukturen weniger leicht

einzuordnen. α -Granula gelten wie die δ -Granula als lysosomenbezogene Organellen und weisen einige Ähnlichkeiten auf. Sie haben ein saures Inneres, das durch eine Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -empfindliche H^+ -pumpende ATPase erzeugt wird. Diese Pumpe ist für die Erzeugung eines elektrochemischen Gradienten über die α -Granula-Membran verantwortlich (Grinstein, Vander Meulen et al. 1982, Grinstein and Furuya 1983). Es wurde außerdem berichtet, dass α -Granula hohe Konzentrationen an Kationen enthalten (Grinstein, Furuya et al. 1983), wenn auch nicht so hoch wie die der δ -Granula. Während dichte Granula jedoch für ihren hohen Gehalt an kleinen Molekülen bekannt sind, sind die α -Granula für ihren reichlichen Proteingehalt bekannt. Die α -Granula-Transmembranproteine erfüllen auch wichtige Funktionen in der Blutplättchenbiologie. P-Selectin und Integrine befinden sich auf der Oberfläche der α -Granula der Blutplättchen und verlagern sich bei der Thrombozytenaktivierung auf die Oberfläche der Plasmamembran. Diese Proteine tragen zur Interaktion zwischen Thrombozyten untereinander, Thrombozyten und Leukozyten sowie Thrombozyten und Endothelzellen bei. Die meisten α -Granula-Transmembranrezeptoren wie $\text{aIIb}\beta_3$ und GPIb sind auch auf der Plasmamembran des ruhenden Blutplättchens vorhanden und es wird angenommen, dass Rezeptoren aus α -Granula einen Reservepool bilden. Andere Rezeptoren wie P-Selectin, CD109 und Fibrocystin-L werden in α -Granula ruhenden Blutplättchen sequestriert und ihre Translokation zur Plasmamembran dient als empfindlicher Indikator für die Blutplättchenaktivierung.

P-Selectin (CD62P) ist möglicherweise das am besten charakterisierte Protein, das in der α -Granula-Membran vorkommt. Die Gewebeverteilung von P-Selectin ist auf Thrombozyten und Endothelzellen beschränkt. In ruhenden Blutplättchen verbleibt das Protein intraluminal, wandert aber bei der Thrombozytenaktivierung zur extrazellulären Oberfläche. Sobald die Lektindomäne von P-Selectin auf der Blutplättchenoberfläche freigelegt wird, interagiert sie mit PSGL-1 auf Immunzellen und rekrutiert sie an Entzündungsherden (Hrachovinova, Cambien et al. 2003). Das Thrombozyten-P-Selectin wirkt auch bei der Arteriosklerose und der Leukozytenrekrutierung während der Thrombusbildung (Palabrica, Lobb et al. 1992, Yokoyama, Ikeda et al. 2005).

1.6.3 Thrombozyten und deren Funktion

Traditionell werden die Blutstillung und damit auch die Entstehung eines Thrombus als zweistufiger Prozess, nämlich als primäre (Blutstillung) und sekundäre Hämostase (Bildung von Fibringerinnseln) betrachtet. In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch deutlich, dass die Aktivierung von Thrombozyten und die Blutgerinnung hochgradig reziproke Prozesse sind, die jeweils auf interaktive Weise zur Hämostase und Thrombose beitragen. Es wird angenommen, dass die Thrombozytenadhäsion durch freiliegendes Gefäßkollagen, den von Willebrand-Faktor und andere Komponenten der subendothelialen Matrix initiiert wird, während freiliegender Gewebefaktor (eng. tissue factor TF) gleichzeitig die Gerinnungskaskade auslöst. Diese Erkenntnisse über die anhaltenden Wechselwirkungen zwischen Blutplättchen und der Gerinnungsaktivierung haben zu neuen Konzepten der zellgesteuerten Gerinnung mit getrennten Rollen für TF-tragende Zellen und Blutplättchen geführt (Mackman 2008, Kocaturk and Versteeg 2013).

Dabei findet der Gerinnungsprozess in verschiedenen Phasen statt (Mackman 2008): (I) einer Initiationsphase der TF-Expression und der Erzeugung kleiner Mengen an aktiviertem Faktor FVII, FIX und FX; (II) eine Amplifikationsphase, in der Blutplättchen und vWF (mit FVIII) für eine erhöhte prokoagulierende Aktivität sorgen, was zur Aktivierung von FX (über aktiviertes FVIII und FIX) und zur Aktivierung von Prothrombin (über aktiviertes FV und FX) führt; (III) Rückführung des gebildeten Thrombins, z. B. zur Aktivierung von FXI; (IV) eine Ausbreitungsphase, in der große Mengen an Thrombin und Fibrin gebildet werden; (V) die Verlängerungsphase, in der die fortgesetzte Thrombinaktivität für die Aktivierung der Blutplättchen, den Umbau und die Fibrinolyse von Blutgerinnseln sowie die Wundheilung sorgt.

Während der verschiedenen Phasen des Gerinnungsprozesses können aktivierte Blutplättchen den Gerinnungsprozess durch mindestens vier Mechanismen unterstützen und steuern (Heemskerk, Mattheij et al. 2013), nämlich durch (I) die Freisetzung des prokoagulierenden Phospholipids

Phosphatidylserin (PS) an ihrer Außenfläche; (II) Freisetzung von Gerinnungsfaktoren wie FV und FXIII sowie von gerinnungshemmenden Faktoren wie dem *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TPFI); (III) Bereitstellung eines Gerüsts für die Bildung von Fibrinfasern; und (IV) Stimulierung der Retraktion des Fibringerinnsels. Im Folgenden beschreibe ich die Rolle der Adhäsionsrezeptoren der Thrombozyten (Mackman 2008, Kocaturk and Versteeg 2013).

1.6.4 Rolle der Adhäsionsrezeptoren der Thrombozyten

Die Wechselwirkung des GPIb-V-IX-Rezeptors mit VWF ist einer der ersten Schritte bei der scherabhängigen Blutplättchenadhäsion und somit eine Voraussetzung für die prokoagulierende Rolle der Blutplättchen unter den Bedingungen hoher Scherung. GPIb-V-IX mit ca. 25.000 Kopien auf Blutplättchen induziert allein nur schwache intrazelluläre Signale und aktiviert Src-verwandte Proteinkinasen, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und kleine GTPasen. Diese Ereignisse verursachen nur geringe Calcium-Flüsse, eine begrenzte Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und eine Ausbreitung der Blutplättchen (Canobbio, Balduini et al. 2004). Unter Gerinnungsbedingungen gibt es jedoch Hinweise darauf, dass der GPIb-V-IX-Komplex durch Wechselwirkung mit VWF die Phosphatidylserin (PS)-Exposition der Blutplättchen und dadurch die Bildung von Thrombin erhöht (Beguin, Kumar et al. 1999). Darüber hinaus scheint GPIb-V-IX eine umfassendere Rolle zu spielen, als nur vWF-Rezeptor zu fungieren. Es bindet Thrombin mit hoher Affinität, was die Aktivierung der Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 unterstützt (De Candia, Hall et al. 2001). Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass GPIIb mit mehreren Gerinnungsfaktoren wie FVII, FXI, FXII und Kininogen mit hohem Molekulargewicht interagiert, obwohl die funktionellen Konsequenzen dieser Wechselwirkungen unklar sind (Heemskerk, Mattheij et al. 2013). Man kann daraus schließen, dass es diese Kombination von Eigenschaften ist, die GPIb-V-IX zu einem so entscheidenden Rezeptor bei der Thrombusbildung macht (Bergmeier, Chauhan et al. 2008). GPIIb/IIIa ist das am häufigsten vorkommende Glykoprotein der Thrombozytenmembran mit ca. 80.000 Kopien pro Blutplättchen

und zusätzlichen Kopien im offenen, kanalikulärem System und in den α -Granula. Die Integrin-Outside-In-Signalisierung über Src- und Syk-Tyrosinkinasen reguliert die Ausbreitung von Blutplättchen über eine Fibrinogenoberfläche und vermittelt das Zurückziehen eines Blutplättchen-Fibrin-Gerinnsels (van der Meijden, Feijge et al. 2012). Als persistenter Prozess ist die Signalübertragung über das aktivierte GPIIb/IIIa (Outside-In-Signalisierung) auf verschiedene Weise am Gerinnungsprozess beteiligt. Die Signalübertragung von außen nach innen trägt über die Verlängerung des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs zur Agonisten-induzierten PS-Exposition bei (van der Meijden, Feijge et al. 2012). Dieser Weg wird jedoch durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus eingeschränkt, da PS-exponierende Blutplättchen mit hohen Ca^{2+} -Spiegeln nach und nach ihre Integrine schließen, wodurch die Signalübertragung von außen nach innen aufgehoben wird (Cosemans, Iserbyt et al. 2008).

1.6.5 Die Rolle der Rezeptoren für lösliche Agonisten (ADP, Thrombin)

Die dichten Granula enthalten hohe Konzentrationen der Adenosinnukleotide ADP und ATP. Nach der Sekretion verstärkt ADP die Thrombozytenaktivierung durch Interaktion mit den purinergen Rezeptoren P2Y1 und P2Y12. Ähnlich wie die PARs koppelt der P2Y1-Rezeptor an G_q , was zu einer oszillierenden Ca^{2+} -Mobilisierung durch Phospholipase-C β -Stimulation führt (Rosado, Meijer et al. 2001). Der P2Y12-Rezeptor signalisiert über einen G_i -gekoppelten Weg, der zyklisches AMP senkt und den PI3K-Weg stimuliert. Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Aufrechterhaltung der Blutplättchenaggregation schien ADP die durch Gewebefaktoren ausgelöste Thrombinbildung zu verstärken, wobei dieser Effekt der Stimulation der P2Y12- und nicht der P2Y1-Rezeptoren zugeschrieben wurde (Dorsam, Tuluc et al. 2004). Die Signalübertragung über P2Y12-Rezeptoren verlängert den Ca^{2+} -Anstieg der Blutplättchen als Folge (I) einer verstärkten Ca^{2+} -Mobilisierung durch die 1,4,5-Triphosphat-Rezeptoren aufgrund der Hemmung der Proteinkinase A und (II) einer verlängerten Aktivierung von PI3K (van der Meijden, Schoenwaelder et al. 2008). Es gibt auch Hinweise darauf, dass P2Y12 die P2Y1-induzierten Ca^{2+} -Reaktionen über die Hemmung

der Adenylatcyclase und die Aktivierung von PI3K reguliert (Harrison and Cramer 1993).

Thromboxan A2 ist ein bekannter autokriner Mediator für die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. Es interagiert mit den TP (Thromboxan-Prostanoid-Rezeptoren), die wie die PARs an G_q gekoppelt sind, jedoch in geringerem Maße (Offermanns 2006). Die Stimulation von TP-Rezeptoren führt zu einer begrenzten Ca²⁺-Mobilisierung und ist daher kaum wirksam bei der Vermittlung der Thrombozyten-PS-Exposition (Swieringa, Kuijpers et al. 2014).

1.7 Storage pool disease, exhausted platelets und andere Sekretionsdefekte

Unter physiologischen Bedingungen sind Blutplättchen relativ inerte Kreislaufzellen, die hauptsächlich damit beschäftigt sind, das Gefäßsystem auf Schäden am Endothel zu überprüfen. Bei einer Endothelschädigung kommt eine Reihe extrazellulärer Matrixstrukturen zum Vorschein, die eine sich schnell ausbreitende Signalkaskade in Thrombozyten auslösen können, die schließlich zur Bildung eines stabilen Gerinnsels oder Thrombus an der Stelle der Gefäßverletzung führt. Darüber hinaus führt die Aktivierung der Blutplättchen zur Sekretion von mehreren hunderten bioaktiven Molekülen aus freisetzbaren Granula. Die Thrombozytensekretion ist nach wie vor unvollständig verstanden, aber es wird immer deutlicher, dass sie eine Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen spielt, die über die traditionellen thrombotischen/hämostatischen Szenarien hinausgehen (Golebiewska and Poole 2015).

Die Funktion jedes sekretorischen Blutplättchen-Granula wird durch seinen Inhalt definiert. Die Vielfalt der Inhalte der Granula und deren spezifische Funktionen sind in folgendem dargestellt. **(Abb. 4)**

Granula-Art	Inhalte	Funktion
<u>α-Granula</u>	P-Selektin, vWF, PF-4, VEGF, F V, F XII	Adhäsion, Chemokine, Zytokine, Gerinnungsfaktoren
<u>δ-Granula</u>	ADP, ATP, 5-HT	Thrombozyten-Agonisten, Gerinnungs-Kofaktoren

Abbildung 4: Zusammenfassung von α - und δ -Granula der Thrombozyten und deren Klassifizierung nach Inhalt und Funktion

(adaptiert nach Andreas Wersäll, Ewelina M. Golebiewska, and Alastair W. Poole; Seite 638; P. Gresele et al., *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*, Springer International Publishing AG 2017)

Es wird angenommen, dass die Synthese und Verpackung von Thrombozyten-Granula hauptsächlich im frühen Megakaryozytenstadium erfolgt. Über die genauen Mechanismen der Granulasortierung und des Transports zu ihrem endgültigen Bestimmungsort in Blutplättchen ist jedoch wenig bekannt (Machlus and Italiano 2013). Eine fehlerhafte Granula-Synthese führt zu Storage pool disease (SPD), bei der es den Blutplättchen entweder an δ -Granula (Hermansky-Pudlak-Syndrom, HPS, und Chediak-Higashi-Syndrom, CHS) oder α -Granula (Grey-Platelet-Syndrom, GPS) mangelt (Masliah-Planchon, Darnige et al. 2013). Zu den Blutungserscheinungen bei SPD-Patienten gehören spontane Blutergüsse, Epistaxis, Menorrhagie und anhaltendes Bluten nach einem Trauma oder einer kleineren Operation wie beispielsweise einer Zahnextraktion (Nurden, Freson et al. 2012).

SPD gehört zu den häufigsten erblichen Thrombozytenerkrankungen. Einige Schätzungen gehen davon aus, dass fast 90 % der Blutplättchenstörungen auf Sekretionsstörungen zurückzuführen sind (Mumford, Frelinger et al. 2015). Anders als bei schweren angeborenen Thrombozytendefekten wie der Glanzmann-Thrombasthenie oder dem Bernard-Soulier-Syndrom, bei denen die Thrombozyten einen tiefgreifenden Aggregationsdefekt aufweisen und die Diagnose durch die Messung von Oberflächenglykoproteinen (α IIb β 3 bzw. GPIIb-V-IX) bestätigt werden kann, erfordert die Diagnose einer SPD eine komplexere Reihe von Tests. Es ist wahrscheinlich, dass ein großer Teil der SPD-Patienten nicht diagnostiziert wird. Die Internationale Gesellschaft für Thrombose und

Hämostase (ISTH) empfiehlt aktuell die α - und δ -Granula-Sekretionstests als Erstlinientests für die Diagnose erblicher Thrombozytenerkrankungen, um SPD zu bestätigen oder auszuschließen (Gresele, Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on et al. 2015).

SPD kann sich als Reaktion auf eine Reihe externer Faktoren entwickeln. Mehrere Berichte deuten auf verschiedene Erkrankungen hin, die unter anderem die SPD mitverursachen, darunter idiopathische Myelofibrose (Mouly, Youssefian et al. 2000), Lupus (Pareti, Capitanio et al. 1980) und Nierenversagen (Soslau, Brodsky et al. 1990, Soslau, Schwartz et al. 1990), Knochenmarktransplantation (Sakashita, Akiyama et al. 2001) sowie beispielweise medikamentöse Behandlung mit Tamoxifen (Nayak and Schmaier 2012). Während die Ätiologie der erworbenen SPD gänzlich unklar bleibt, könnte einer der Mechanismen darin bestehen, dass Thrombozytenaktivatoren dem beschädigten Endothel, dem Thrombin und Immunkomplexen ausgesetzt werden, was zur Degranulation und Zirkulation „erschöpfter“ (engl. exhausted) Blutplättchen führt (Pareti, Capitanio et al. 1980).

Funktionell sind die Thrombozytenaktivierungsmarker (CD62 und CD63) auch an Zellinteraktionen beteiligt und werden direkt nach dem Aktivierungsreiz ausgeschleust, sodass sie nur an aktivierten Thrombozyten gemessen werden können. Eine Abnahme der Expression dieser Marker könnte bedeuten, dass der Aktivierungsreiz nicht mehr vorhanden ist, oder sie nur für einen begrenzten Zeitraum exprimiert werden, wonach es zu einem „Thrombozytenerschöpfungszustand“ kommt. Dieses Phänomen wird bei degranulierten Blutplättchen beschrieben, die scheinbar schnell ihre CD62-Oberfläche verlieren, aber im Blutkreislauf bestehen bleiben und ihre Fähigkeit zur Aggregatbildung behalten (Michelson 1996).

Einige Studien deutete vermehrt darauf hin, dass durch die ECMO oder CPB dieser „erschöpfte“ Zustand der Blutplättchen mitverursacht wird, was wiederum klinisch zu einem erhöhten Risiko von Blutungskomplikationen führt (Harker,

Malpass et al. 1980, Harker and Ritchie 1980, Kalbhenn, Schlagenhaut et al. 2018, Balle, Jeppesen et al. 2019).

Die erworbene SPD ist häufiger als die erbliche SPD und kann zu einer Exazerbation der Grunderkrankung führen. Daher kann die Prüfung der Thrombozytensekretion bei Erkrankungen, die bekanntermaßen mit einer „Erschöpfung“ der Thrombozyten einhergehen, die Diagnose und Behandlung unterstützen. SPD oder Sekretionsdefekte können auch bei der Vorbereitung von Thrombozytentransfusionen in Blutplättchen auftreten (Washitani, Irita et al. 1988).

1.8 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Mithilfe von ECMO-Systemen kann die Blutzirkulation aufrechterhalten und ein stark beeinträchtigter Gasaustausch vorübergehend unterstützt werden, bis die ursprüngliche Lungen- oder Herzfunktion des Patienten wiederhergestellt ist. Allerdings bleibt die Sterblichkeit mit 60 bis 70 % unter *va*. ECMO und 30 bis 40 % unter *vv*. ECMO immer noch sehr hoch. Trotz enormer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten stellen Blutungen und thromboembolische Ereignisse bei Patienten mit extrakorporalen Systemen immer noch ein herausforderndes Problem dar (Balle, Jeppesen et al. 2018, Doyle and Hunt 2018, Thomas, Kostousov et al. 2018, Granja, Hohenstein et al. 2020).

Pathologische Blutflussmuster und hohe Druckgradienten in der ECMO erzeugen eine enorme Scherspannung, die die Aktivierung und Degranulation der Blutplättchen induziert (Doyle and Hunt 2018). Während eine verringerte Agonisten-Reaktion der Thrombozyten auf eine Blutungsneigung hinweist, kann die Aktivierung von Blutplättchen *in vivo* auch mit einem erhöhten Thromboserisiko verbunden sein. Balle et al. zeigten, dass Patienten unter laufender ECLS-Therapie eine verminderte Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation aufweisen (Balle, Jeppesen et al. 2018).

Daher will ich mit dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersuchen und entsprechende Methoden sowie Ziele erarbeiten:

- 1) Eine sensitive und einfach anzuwendende Labormethode zur Bestimmung des Thrombozytenaktivierungsstatus mittels Durchflusszytometrie im Vollblut und PRP etablieren, die routinemäßig eingesetzt werden kann.

- 2) In einer eigenen In-vitro-Studie die Reaktion der Thrombozyten in WB- und PRP gesunder Spender auf Scherbelastung unter Verwendung eines Ex-vivo-Simulationsmodells für die extrakorporale Zirkulation (Chandler-Loop-Modell) mittels des in Punkt (1) erwähnten Thrombozytenaktivierungsassays zu überprüfen.

- 3) In einer prospektiven Studie den bereits oben erwähnten Thrombozytenaktivierungsassay bei Patienten unter ECMO zu verwenden und mit den aktuell gängigen Labormethoden (Mepacrin-Assay) zu validieren.

- 4) Den Einfluss der ECMO auf die Plättchendegranulation zu untersuchen und eine mögliche Erklärung für Blutungen sowie thromboembolische Ereignisse zu erarbeiten.

2 Material und Methoden

2.1 Der Aufbau und die Dauer der Studie sowie deren Population

Bei der Studie handelt es sich um eine prospektive Studie, in der die Rolle des Scherstressses während der extrakorporalen Kreislaufunterstützung auf die Thrombozytenfunktion überprüft werden sollte.

In diese Studie wurden Patienten nach konsekutiver Einholung der Einverständniserklärung eingeschlossen, die sich von März 2018 bis April 2020 einer mechanischen Kreislaufunterstützung oder einem Lungenfunktionsersatzverfahren in Form von va. und vv. ECMO auf der Intensivstation (Station 39) der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Herzchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unterzogen. Es bestand jedoch immer wieder die Ausnahme, dass einige Patienten, bei denen die Verwendung von ECC aufgrund einer Herz- und Lungenerkrankung indiziert war, sich kognitiv nicht in der Lage fühlten, ihre schriftliche Einverständniserklärung abzugeben. Der Grund dafür lag zumeist darin, dass bei einigen von ihnen Bewusstseinsstörungen vorlagen, die durch verschiedene Faktoren verursacht wurden, darunter die Anästhesie, die bei mehreren Patienten zur Erleichterung der künstlichen Beatmung eingesetzt wurde, dann aber auch die zerebrale Malperfusion und Delirium aufgrund verminderter Herzleistung und systemischer Entzündung. Bei Patienten, die aufgrund einer Beeinträchtigung des Bewusstseins und/oder eines beeinträchtigten Geisteszustands nicht selbst eine schriftliche Einverständniserklärung abgeben konnten, wurde die Einwilligung schnellstmöglich im Verlauf der Studie von einem/er Betreuer/in des/der Patienten/in eingeholt.

Die Indikation zur va. oder vv. ECMO-Behandlung wurde von den Ärzten (Anästhesie, Herzchirurgie) gestellt, die die Patienten während ihres gesamten Krankenhausaufenthalts nach etablierten Standardverfahren betreuten. Daher basierte die Indikation für eine Behandlung mit einem der Geräte ausschließlich auf dem Gesundheitszustand des/der Patienten/in und komplett unabhängig von den Studienabläufen.

Bei einigen Patienten wurde die Implantation der ECLS-Geräte in einem externen Krankenhaus durch das „ECLS-Team“ des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. In diesen Fällen wurden die Patienten nach Implantation auf die Intensivstation der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Tübingen transportiert. Alle weiteren ECLS-Behandlungen wurden dann in Tübingen fortgeführt.

Die gesamte Studiendauer einschließlich Messung und abschließender Analyse aller Parameter betrug insgesamt 2 Jahre. Die Dauer der ECC-Unterstützung variierte bei jedem einzelnen Patienten zwischen mehreren Tagen und Wochen und verkürzte sich selten um eine Woche.

2.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien der Studie

Es wurden in die Studie männliche und weibliche Patienten ≥ 18 Jahre, die sich aufgrund von Herzversagen oder Lungenversagen oder einer Kombination dieser beiden Erkrankungen einem Anschluss an eine extrakorporale Kreislaufunterstützung (va. ECMO) oder Lungenersatzverfahren (vv. ECMO) unterzogen.

Als Ausschlusskriterien galten folgende:

- 1) Die in der Krankenvorgeschichte bereits diagnostizierte erbliche Erkrankung der plasmatischen Gerinnung oder der Thrombozyten.
- 2) Bekannte diagnostizierte HIT
- 3) Mindestabnahme von 2 Blutentnahmen innerhalb der Studie nicht erreicht
- 4) Teilnahme an anderen klinischen Forschungsstudien, die eine Evaluation von Medikamenten oder medizinischen Geräten innerhalb von 30 Tagen nach Randomisierung einschlossen
- 5) Diagnostizierte Hepatitis B und C sowie HIV-Infektion
- 6) Das Alter < 18 Jahren

2.3 Studienbezogene Blutentnahmen

Abhängig vom Ort, an dem die ECLS-Implantation durchgeführt wurde, wurde die Tag 1-Probe entweder auf der Intensivstation 39 der Klinik für Anästhesiologie in Tübingen oder an einem anderen Ort (z. B. in einem externen Krankenhaus) entnommen, an dem die Implantation durchgeführt wurde.

Das Blut, das in einem externen Krankenhaus oder an einem Ort außerhalb der Intensivstation 39 entnommen wurde, wurde vom ECLS-Team zur weiteren Verarbeitung und Analyse zur Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen transportiert. Konnten im Rahmen der notfallmäßigen ECLS-Implantation aus logistischen Gründen keine Blutproben entnommen werden, wurde von der Blutbank in Tübingen das örtliche Labor des externen Krankenhauses kontaktiert. Standen vor der ECLS-Implantation entnommene Serumblutproben für Studienzwecke zur Verfügung, wurden diese über die üblichen Transportkurierdienste für Blutprodukte an die Blutbank in Tübingen übermittelt. Die Blutentnahme für Studienzwecke wurde gemäß den routinemäßigen Standards der Hygiene entweder durch einen Arzt oder entsprechendes Intensivpflegepersonal durchgeführt, das in Blutentnahmeverfahren geschult wurde. Die ersten 2ml Blut zu jedem Probeentnahmezeitpunkt wurden verworfen, um eine Probenverdünnung zu vermeiden. Insgesamt wurden zu jedem Zeitpunkt 12,0 ml Vollblut (9ml Lithium-Heparinblutröhrchen + 3ml Citratblutröhrchen) für Studienanalysen entnommen. Die für diese Studie entnommene Gesamtblutmenge betrug 56ml, einschließlich der Blutmenge, die zu Beginn jedes Blutentnahmeverfahrens verworfen wurde. Der Zeitaufwand für die Blutentnahme betrug maximal 3 Minuten pro Probeentnahmezeitpunkt. Vor der Blutentnahme oder zu Studienzwecken im Allgemeinen mussten keine zusätzlichen Medikamente verabreicht werden. Die Arterienkatheter, die für Studienblutentnahmeverfahren meist verwendet wurden, wurden im Rahmen der routinemäßigen Intensivbehandlung eingeführt. Diese Katheter wurden auch zur Blutdrucküberwachung, Blutgasanalyse und weiteren Blutentnahmen eingesetzt, die routinemäßig bei Intensivbehandlungen durchgeführt wurden. Für Studienzwecke mussten keine zusätzlichen Katheterplatzierungen oder andere invasive Eingriffe durchgeführt werden. Durch das studienbezogene Blutentnahmeverfahren bestand kein Infektionsrisiko für den Patienten.

2.4 Blutproben der gesunden Probanden als Vergleichsreferenz

Die Vergleichsreferenzblutproben wurden von freiwilligen gesunden Spendern entnommen, wie es vom Wissenschafts- und Standardisierungskomitee der

International Society on Thrombosis and Haemostasis für Thrombozytenphysiologie empfohlen ist (Cattaneo, Cerletti et al. 2013). Kurz gesagt, WB-Proben (engl. Whole blood = Vollblut) wurden unter Verwendung eines Citrat-Antikoagulans (BD Vacutainer 6 ml 9NC 0,105 M, Buff. Na³Citrat, Heidelberg, Deutschland) durch Venenpunktion mit einer 21-Gauge-Butterfly-Nadel (B. Braun, Melsungen, Deutschland) aus einer Unterarmvene ohne Stauung von gesunden Spendern nach Vorlegen eines Aufklärungsschreibens und deren Einwilligung entnommen. Das erste Blutröhrchen mit der Menge von 2 ml wurde verworfen, um präanalytische Artefakte zu vermeiden. Die nachfolgenden Blutproben wurden ausschließlich für die oben genannte Studie verwendet.

2.5 Das Ex-Vivo-Model der extrakorporalen Zirkulation, der Chandler-Loop

Der Chandler-Loop-Apparat ist ein experimentelles System, das den Forschern ermöglicht, die molekularen und zellulären Wechselwirkungen von Blut oder anderen Materialien in einem Ex-Vivo-Rotationsmodell zu untersuchen.

Das Chandler-Loop-System wurde zur Simulation der extrakorporalen Blutzirkulation entwickelt (Slee, Alferiev et al. 2014).

Ich benutzte ein nicht-industriell-hergestelltes Chandler-Loop-Modell, welches in Anlehnung an das Chandler-Loop-System[®] von Herrn Ebo Kunze (Neuffen, Deutschland, ISO 10993-4) zusammengebaut wurde.

In dieser Studie wurden vier Polyvinylchlorid-Schläuche (Rohrlänge: 50 cm; Durchmesser: 3/8 × 3/32 Zoll, Raumedic GmbH, Helmbrechts, Deutschland) mit Bioline-Heparin (Maquet Medical Getinge Group, Rastatt, Deutschland) beschichtet und mit 6 ml heparinisierendem (Endkonzentration 3 IU/ml entsprechend der Konzentration während eines HLM-Einsatzes) menschlichem WB gefüllt.

Zudem wurden die Proben aber auch mittels Citratmonovetten (siehe Kapitel 2.4) zusätzlich abgenommen, um den Vergleich zwischen den jeweiligen Antikoagulantien (Heparin vs. Citrat) zu erarbeiten. Die Schläuche wurden anschließend zu geschlossenen Ringen (engl. Loops) verbunden und eine Stunde lang mit 99 Umdrehungen pro Minute (U/min) in einem auf 37 °C

temperierten Wasserbad um ihre Rotationsachse gedreht, um somit die Strömungsbedingungen etwa annähernd einer ECLS zu simulieren. **(Abb. 4)** Typischerweise geschehen die Experimente mit einer niedrigeren Drehzahl von etwa 20-40 U/min, was bei Ringdurchmessern von 10-20 cm einer natürlichen Strömungsgeschwindigkeit in der Blutbahn entspricht. Damit werden in der Forschung vor allem hämorheologische Effekte und Wechselwirkungen des Blutes mit künstlichen Materialien oder Beschichtungen, also deren Biokompatibilität bzw. deren Hämokompatibilität untersucht.

Da die Länge der Schläuche in unseren Experimenten etwa die Doppelte war, entschieden wir uns auch für die viel höhere Drehzahl, um eine adäquate Scherbelastung zu reproduzieren.

Nach den Rotationen wurden Proben gesammelt, um von einem Teil der Proben PRP herzustellen und anschließend sowohl im Vollblut als auch in PRP die Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometriemessung zu analysieren.

Zur Herstellung von PRP werden WB-Proben bei $120 \times g$ (Zentrifuge: Hettich Rotina 46 R, Tuttlingen, Deutschland) für 15 Minuten bei Raumtemperatur ohne Pause zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird die obere Schicht mit den Blutplättchen in ein leeres Röhrchen überführt. Die Thrombozytenzahl (engl. Platelet, kurz PLT) wird mit einem automatischen Hämatologieanalysator (CELL-DYN Ruby, North Chicago, USA) gemessen und mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Dulbecco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) auf $300 \times 10^3/\mu\text{L}$ Thrombozyten eingestellt.

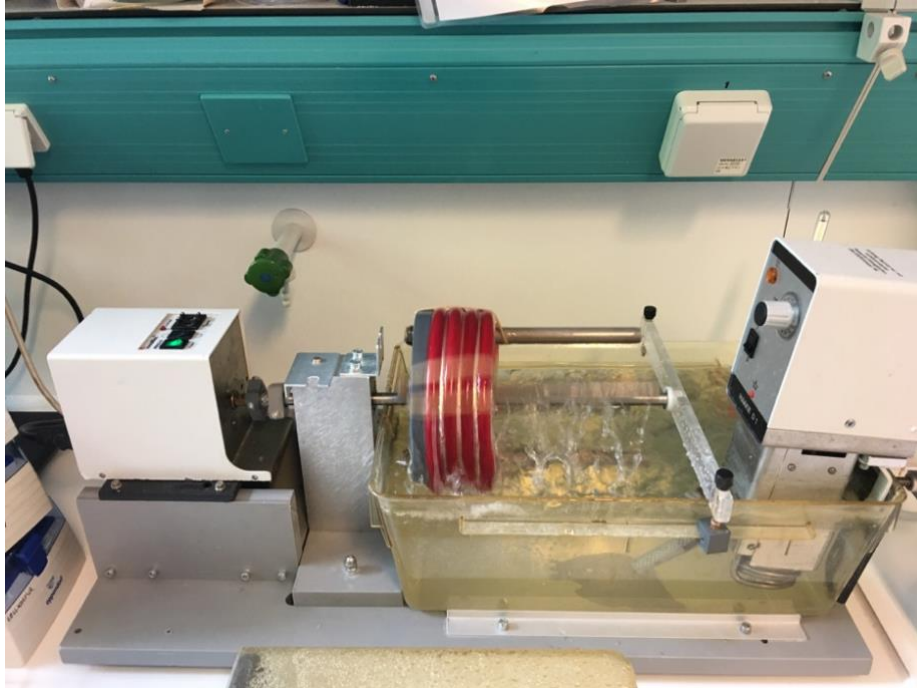


Abbildung 4: Chandler-Loop-System

Rotationsgenerator (links im Bild) + drehbare Achse (mittig im Bild) mit vier eingespannten blutgefüllten Loops sowie Temperaturregulator (rechts im Bild). Oberhalb der Loops wurde noch eine Kuppel (im Bild nicht dargestellt) in etwa der gleichen Form wie die Wanne installiert, damit eine konstante Temperatur erhalten bleibt.

2.6 Labormethoden etablierung und FC-Protokollvalidierung zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion in Vollblutproben bei gesunden Spendern

WB- oder PRP-Proben wurden jeweils mit Puffer (PBS, Biochrom, Berlin, Deutschland), Adenosindiphosphat (ADP; 10 μ M, Hart Biologicals, Hartlepool, UK) oder Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP-6; 10 μ M, Hart Biologicals, Hartlepool, Großbritannien) versetzt. Zunächst wurden 12,5 μ L Patientenblutproben mit 2,5 μ L Puffer oder 10 μ M ADP oder 10 μ M TRAP-6 in Aliquot-Reagenzgläsern inkubiert. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und 20 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit BD CellFIX-Lösung (Becton, Dickinson, Benelux, Belgien) fixiert wurden.

Nach der Fixierung wurden die Proben entweder direkt oder nach dreitägiger Lagerung bei 4 bis 6 °C mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, um die Thrombozyten-Granula-Expression zu untersuchen und die Verwendung dieses Protokolls für den klinischen Einsatz zu validieren. Die Dauer der Lagerung der

Proben wurde so ausgewählt, damit eine Durchflusszytometrie-Analyse durch die chemische Fixierung bis zu 3 Tage nach primärer Probengewinnung noch möglich war. Die Daten werden als Mittelwert \pm SD des gemessenen FI im Vergleich zu ruhenden Zellen (nach Inkubation mit Puffer) dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert ein Experiment und einen Patienten.

2.7 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie/fluorescence-activated-cell-sorter (kurz engl. FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass verschiedene mikroskopisch kleine Partikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch intrazellulärer Zusammensetzung unterschieden werden können. Es werden zudem Zellen mit Antikörpern markiert, die wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff bzw. einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper versehen sind. Die Messung der Zellen im FACS beruht darauf, dass die so markierten Zellen von einem Leserstrahl erfasst werden. Es kommt dadurch zu Lichtstreuungen sowie zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff bekommt man ein spezifisches Signal. Außerdem lässt es sich unabhängig von den gekoppelten Farbstoffen eine Aussage über die Größe der Zelle und deren Granularität treffen. Entscheidendes Merkmal dieser Methode ist, dass innerhalb kürzester Zeit mehrere tausende Zellen in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden und charakterisiert werden können.

2.8 Bestimmung der Thrombozytenfunktion/Granula-Expression mittels Durchflusszytometrie

2.8.1 CD62P-PE als FC-Marker für α -Granula-Expression und CD63-PE für δ -Granula-Expression

Die Durchflusszytometriemessungen wurden mit dem Navios FC (Beckman Coulter, Deutschland) durchgeführt. Es wurden PC5-markiertes Anti-Human-CD41 (Anti-CD41; Beckman Coulter, Brea, USA), PE-markiertes Anti-Human-

CD63-PE, PE-markiertes Anti-Human-CD62P und eine entsprechende Isotypkontrolle verwendet (alle von Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten). Die Detektion der Thrombozyten wurden im FACS basierend auf ihr charakteristisches Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, kurz FSC) also Sortierung nach der Zellgröße und Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) nach deren Granularität mit der Markierung mittels blutplättchenspezifischen Anti-CD41-Antikörpermarkern eingestellt.

Der einzelne Blutplättchenbereich wurde auf eine mittlere Größe zwischen 2 und 4 µm eingestellt. Kleinere Ereignisse wurden als Mikropartikel und größere Ereignisse als Aggregate, also restliche Blutzellkonglomerate mit teils darin verfangenen Thrombozyten, bezeichnet. (**Abb. 5**)

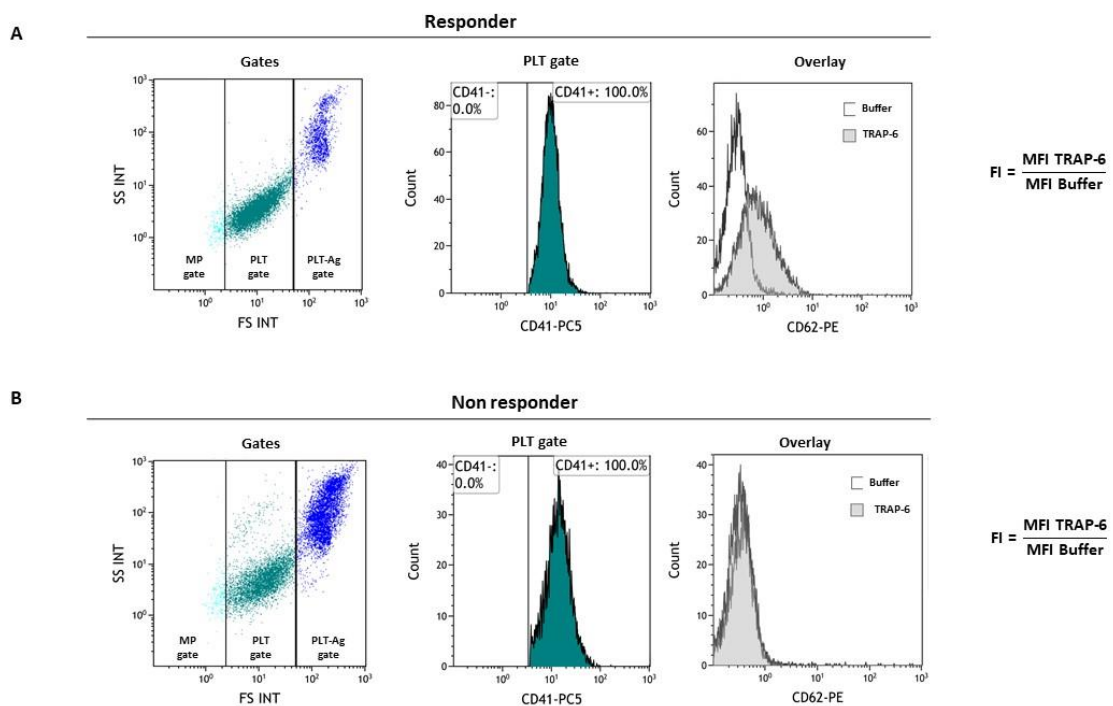


Abbildung 5: Beispiel eines Durchflusszytometrie-Diagramms von einem/er gesunden Spender/in

Histogramme rechts oben und unten stellen die Veränderungen der CD62P-Expression in Blutplättchen ohne Stimulation sowie mit TRAP-6-Stimulation bei Responder/in (obere Reihe A) und Non-Responder/in (untere Reihe B) dar. Links oben und unten sind zwei Plot-Darstellungen, in denen Thrombozyten und andere Zellbestandteile nach Größe und Granularität geordnet sind. MP=Mikropartikel, PLT=Blutplättchen, PLT-Ag=Blutplättchenaggregate (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

Zur Bestimmung des Aktivierungsstatus/Granula-Expressionsstatus wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Messeinheit verwendet. Um einen Vergleich zwischen den an verschiedenen Tagen erzielten Ergebnissen zu ermöglichen, bediente ich mich des „Fold increase“ (FI), eines Faktors um den sich das Verhältnis der MFI-Werte von ADP/TRAP-6-stimulierten zu nicht-stimulierten Puffer-Proben veränderte. Der FI wurde wiederum zwischen der gesunden Kontrollprobe und des/der ECMO-Patienten/in, d. h. (FI-Patient/in : FI-Kontrolle) verglichen. Die Degranulation wurde durch Quantifizierung der Expression zweier spezifischer Thrombozyten-Granula-Expressionsmarker, CD62P-PE für α -Granula und CD63-PE für δ -Granula, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von den jeweiligen Agonisten (ADP und TRAP-6) bestimmt.

2.9 Mepacrin-Assay

Für den Mepacrin-Assay wurde die kinetische Aufnahme von Mepacrin und die Freisetzung in WB-Proben bestimmt. Zur isolierten Untersuchung der δ -Granula-Expression eignet sich dieser am besten (Cai, Mullier et al. 2016, Andres, Henning et al. 2018).

Mepacrine ist ein autofluoreszentes Antibiotikum, das spezifisch in den δ -Granula der Thrombozyten eingelagert wird. Nach Aktivierung von Blutplättchen mittels Agonisten und folglich der δ -Granula-Freisetzung nimmt die intrazelluläre Konzentration von Mepacrine wieder ab. Diese Abnahme kann im FACS gemessen werden und ist somit ein Ersatzmarker für die δ -Granula-Expression (Cai, Mullier et al. 2016, Andres, Henning et al. 2018).

Nach der Beladung mit Mepacrin-Dihydrochlorid-Farbstoff (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (5 μ M für 30 Minuten bei 37 °C) wurde die auf Mepacrin basierende Fluoreszenz in CD41-positiven Blutplättchen bestimmt. MFI wurden mit und ohne Scherbeanspruchung bestimmt. Gefärbte Blutplättchen wurden mit 10 μ M TRAP-6 aktiviert und weitere 5 Minuten lang direkt analysiert. (**Abb. 6**)

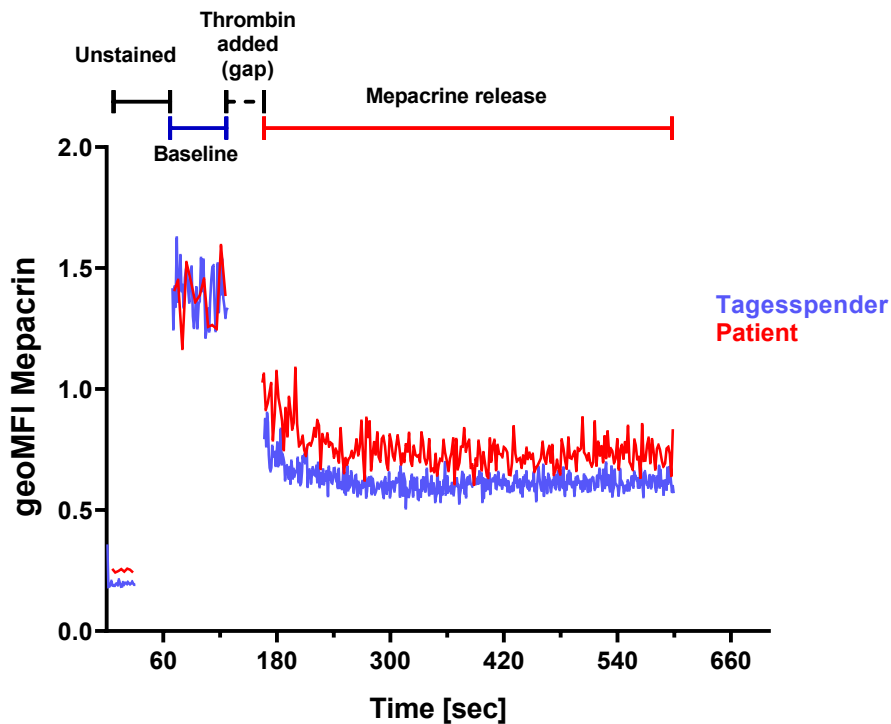


Abbildung 6: Grafische Darstellung des Testergebnisses von Mepacrin-Assay zwischen Tagesspender vs. va. ECMO-Patient

Tagesspender (violett), va. ECMO-Patient (rot). Vergleich der MFI-Werte von Mepacrine-Aufnahme und die durch TRAP-6 induzierte Freisetzungskapazität bei gesundem Tagesspender und einem va. ECMO-Patienten

2.10 Erhebung klinischer Daten aus der prospektiven Studie

Um die klinische Auswirkung der ECMO-Therapie auf die Thrombozytenfunktion zu überprüfen, wurden insgesamt 43 Patienten in die Studie einbezogen, die sich einer vv. und va. ECMO-Therapie aufgrund unterschiedlicher Indikationen unterzogen haben. **(Abb. 7) (Tab. 1)**

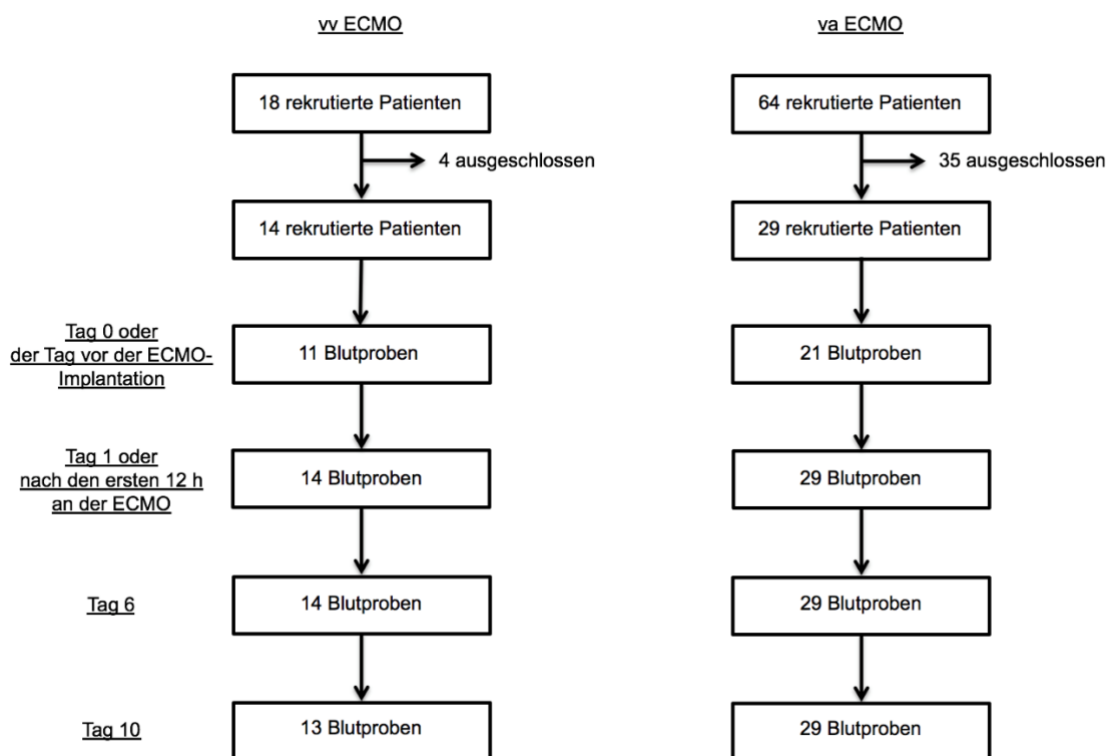


Abbildung 7: Gliederung der prospektiven ECMO-Studie

Rekrutierte Studienpatienten und entsprechende Entnahmen der Blutproben während der Zeitspanne von 10 Tagen unter vv. und va. ECMO. Tag 0-Probe wurde vor der ECMO-Implantation bzw. innerhalb der ersten 12 Stunden an der ECMO-Therapie abgenommen; Tag 1-Probe entsprechend nach 12-Stunden an der ECMO; Tag-6- und Tag-10-Probe nach 6 und 10 Tagen ab Beginn der ECMO-Unterstützung (Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

Tabelle 1: Demografische Daten der Studienpopulation und Indikationen für verschiedene ECMO-Implantationsarten (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

	vv ECMO	va ECMO
Male/Female, n/n	10/4	21/8
Age, y, mean±SD	55,6±11,7	65,7±14,8
Diagnosis, n (%)		
ARDS	13 (92,9%)	
Pneumonia	13 (92,9%)	
Acute lung injury	1 (7,1%)	
Cardiogenic shock		18 (62,1%)
Coronary heart disease		20 (68,9%)
Valvular heart disease		13 (44,8%)
CMP		4 (13,8%)
(N)STEMI		12 (41,4%)
ACS		5 (17,2%)

Die Krankenakten wurden retrospektiv auf Blutungs- und Thromboseereignisse analysiert. Unter Berücksichtigung der Blutungsskala der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde die Häufigkeit von Blutungen unter mechanischer Kreislaufunterstützung ebenfalls binär für jeden Tag berechnet (Manukjan, Eilenberger et al. 2019). Es wurden mehrere Untergruppen gebildet (z. B. oropharyngeale Blutungen, Epistaxis, Blutungen aus Katheterpunktionsstellen, gastrointestinale und pulmonale Blutungen, retroperitoneale und intrakranielle Blutungen, Hämothoraces sowie perikardiale, retroperitoneale oder Hauthämatome). Die Inzidenz von Thrombosen unter mechanischen Kreislaufunterstützungsgeräten wurde auch unter Berücksichtigung verschiedener thromboembolischer Ereignisse bestimmt, wobei die Ereignisse für jeden Tag binär gezählt wurden. So waren es beispielweise folgende Ereignisse:

- Extrakorporale Gerinnelbildung in Dialysegeräten, in ECMO/Oxygenatoren oder in diversen Drainagen.
- Gerinnelbildung im Zusammenhang mit allen möglichen Kathetern, einschließlich ECMO-Kanülen.
- Intrakorporale Thromben, einschließlich z. B. intraventrikulärer Thromben, bildbasierte Diagnose von Schlaganfällen und ischämischen Hirnläsionen.

2.11 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism 7 (La Jolla, USA) durchgeführt. Zur Analyse normalverteilter Ergebnisse wurde der ungepaarte T-Test verwendet. Nichtparametrische Tests wurden verwendet, wenn die Daten nicht einer Normalverteilung folgten, die durch den Omnibus-Normalitätstest von D'Agostino und Pearson ermittelt wurde. Für kleine Stichprobengrößen wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Alle Daten werden als Mittelwert \pm SD angegeben. Als statistische Signifikanz wurde ein p-Wert $<0,05$ angenommen.

Kontinuierliche Variablen werden nach Behandlungs-/ECC-System unter Verwendung deskriptiver Statistiktabelle zusammengefasst, einschließlich der Anzahl der verfügbaren Beobachtungen, des Mittelwerts, der Standardabweichung, des Minimums und des Maximums. Qualitative Variablen

werden auf ähnliche Weise mithilfe von Zählungen und Prozentsätzen zusammengefasst. Der Ausgangswert wird als letzte Bewertung vor Beginn der ECC definiert.

2.12 Ethik

Studien mit menschlichen Blutproben wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät (222/2017BO01) der Eberhard Karls Universität Tübingen, Deutschland, genehmigt und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des etablierten Thrombozytenaktivierungsassays mittels PRP- und WB-Proben gesunder Spender

Zur Validierung des Thrombozytenfunktionsassays wurden vorerst Proben (PRP und WB) von gesunden Spendern durchflusszytometrisch analysiert. Wie in der unteren **Abbildung 8 (A-B)** gezeigt wird, konnte kein signifikanter Unterschied bei der Messung der CD62P-Expression nach Stimulation mittels ADP und TRAP-6 weder in PRP noch in WB beobachtet werden (**Abb. 8A** mittlerer FI \pm SD von CD62P nach ADP-Stimulation in WB vs. PRP: $1,47 \pm 0,53$ vs. $1,19 \pm 0,26$, $p = 0,547$; **Abb. 8B** nach TRAP-6-Stimulation in WB vs. PRP: $1,88 \pm 0,76$ vs. $1,44 \pm 0,76$, $p = 0,420$). Eine ähnliches Expressionsverhalten von CD63 wurde auch in PRP- und WB-Proben nach ADP-Stimulation beobachtet (**Abb. 8C** mittlerer FI \pm SD von CD63 nach ADP-Stimulation in WB vs. PRP: $1,20 \pm 0,08$ vs. $1,11 \pm 0,16$, $p = 0,246$). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach TRAP-6-Stimulation eine signifikant höhere Expression von δ -Granula in WB im Vergleich zu PRP-Proben (**Abb. 8D** mittlerer FI \pm SD von CD63 nach TRAP-6-Stimulation in WB vs. PRP: $1,66 \pm 0,34$ vs. $1,27 \pm 0,19$, $p = 0,039$) (Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

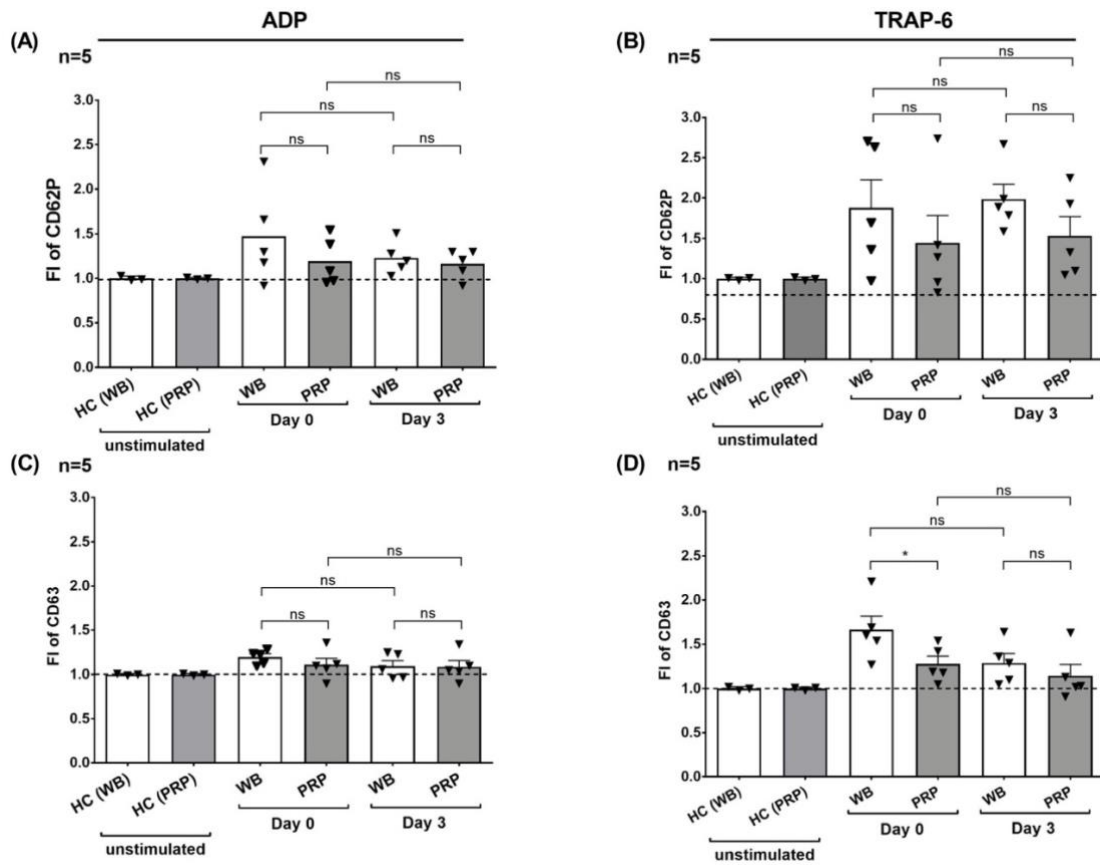


Abbildung 8 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse vom FC-Thrombozytenaktivierungsprotokoll mittels PRP- und WB gesunder Spender, Lagerungstest der Proben bis zu 3 Tage

Thrombozytendegradationsmarker (CD62P und CD63) im Vergleich zwischen PRP- und WB-Proben sowie untereinander, als auch nach deren Lagerung für 3 Tage. Abkürzungen: HC (healthy control) = gesunde Kontrollprobe. (ns = $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

3.2 Einfluss der Lagerungszeit auf die durchflusszytometrische Messung der Thrombozytendegradationsmarker

Um den Einfluss der Lagerzeit auf die Thrombozytendegradation zu untersuchen, wurden Agonisten (ADP oder TRAP-6) zu PRP oder WB hinzugefügt und die Proben nach 20-minütiger Inkubation fixiert. Die Expression der Degradationsmarker in fixierten Proben wurde entweder unmittelbar direkt oder nach 3 tägiger Lagerung bei 4 bis 6 °C analysiert.

Es wurde eine vergleichbare CD62P-Expression bei WB (ADP: $p = 0,548$; TRAP-6: $p = 0,691$) sowie bei PRP-Proben (ADP: $p = 0,888$; TRAP-6: $p = 0,691$) sowohl direkt als auch nach 3 tägiger Lagerungszeit detektiert. **(Abbildung 8A und B sowie Tab.2)**

Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied in der δ -Granula- bzw. Lysosomenexpression (CD63) auf Stimulation mittels der jeweiligen Agonisten in WB (ADP: $p = 0,238$; TRAP -6: $p = 0,150$) und in PRP (ADP: $p = 0,531$; TRAP-6: $p = 0,222$). **(Abbildung 8C und D sowie Tab. 2)**

Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass die Fixierung von WB- und PRP-Proben bis zu 3 Tagen ein geeigneter und vor allem flexibler Ansatz zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion für klinische Anwendungen ist.

Tabelle 2: Statistische Ergebnisse des Thrombozytenaktivierungsprotokolls mittels PRP- und WB-Proben gesunder Spender, Blutentnahme (Tag 0) vs. 3-tägig gelagerten Proben (Tag 3) (n=5) (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

Vollblut			Plättchenreiches-Plasma			p-value (WB vs. PRP)
Tag 0	Tag 3	p-value	Tag 0	Tag 3	p-value	
CD62P + ADP	CD62P + ADP		CD62P + ADP	CD62P + ADP		
1.47±0.53	1.23±0.18	p=0.548	1.19±0.26	1.16±0.16	p=0.888	p=0.547
CD62P + TRAP-6	CD62P + TRAP-6		CD62P + TRAP-6	CD62P + TRAP-6		
1.88±0.76	1.99±0.41	p=0.691	1.44±0.76	1.53±0.53	p=0.691	p=0.420
CD63 + ADP	CD63 + ADP		CD63 + ADP	CD63 + ADP		
1.20±0.08	1.09±0.14	p=0.238	1.11±0.16	1.09±0.14	p=0.531	p=0.246
CD63 + TRAP-6	CD63 + TRAP-6		CD63 + TRAP-6	CD63 + TRAP-6		
1.66±0.34	1.29±0.24	p=0.150	1.27±0.19	1.14±0.28	p=0.222	p=0.039

3.3 Einfluss von Scherstress auf die Blutplättchenfunktion im Chandler-Loop-Modell

Es wurde mit dem Ex-vivo-Modell vor allem der Einfluss der Scherbelastung auf die Thrombozytenfunktion/-degranulation überprüft. Dafür wurden mehrere Versuche mit jeweils unterschiedlichen Antikoagulanzen durchgeführt (siehe Kapitel 2.5).

In den Experimenten mit heparinisiertem WB konnte eine signifikante Verringerung von CD62P aus den Chandler-Loop-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben nach ADP- und TRAP-6-Stimulation beobachtet werden ($p < 0,0001$ und $p \leq 0,0001$). (**Abb. 9A, B**)

Die δ -Granula-Freisetzungsmarker zeigten zum einen keinen signifikanten Unterschied zwischen WB-Kontrollproben im Vergleich zu den Chandler-Loop-Simulationsproben nach ADP-Stimulation. Allerdings erwies sich eine deutlich signifikante CD63-Reduktion nach TRAP-6-Zugabe (ADP: $p = 0,0926$; TRAP-6: $p = 0,0083$). (**Abb. 9C, D sowie Tab. 3**)

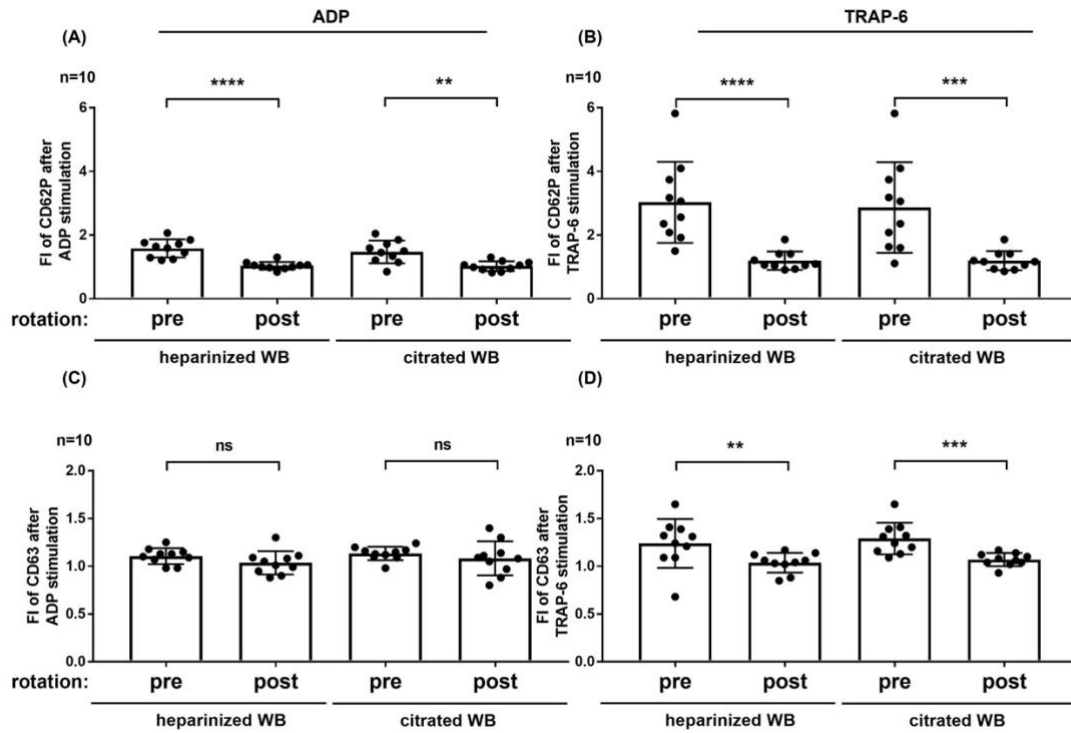


Abbildung 9 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse von Thrombozytendegradationsmarker unter Scherstresssimulation mittels Chandler-Loop-System

Sowohl mit Heparin als auch mit Citrat antikoaguliertem Spenderblut ($ns = p > 0,05$; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$) (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

Tabelle 3: Statistische Ergebnisse der Thrombozytendegradationsmarker in Heparinblut vs. Citratblut (n=10)(Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

Heparinblut			Citratblut		
Kontrolle	Rotation	p-value	Kontrolle	Rotation	p-value
CD62P + ADP	CD62P + ADP		CD62P + ADP	CD62P + ADP	
1.58±0.28	1.04±0.12	p=0.0001	1.47±0.35	1.03±0.15	p=0.0021
CD62P + TRAP-6	CD62P + TRAP-6		CD62P + TRAP-6	CD62P + TRAP-6	
3.03±1.27	1.20±0.29	p=0.0001	2.87±1.42	1.20±0.30	p=0.0006
CD63 + ADP	CD63 + ADP		CD63 + ADP	CD63 + ADP	
1.11±0.08	1.04±0.12	p=0.0926	1.13±0.07	1.08±0.18	p=0.1716
CD63 + TRAP-6	CD63 + TRAP-6		CD63 + TRAP-6	CD63 + TRAP-6	
1.24±0.26	1.04±0.10	p=0.0083	1.29±0.17	1.07±0.07	p=0.0005

Um den Ursprung der Thrombozytenfunktionsstörung zu untersuchen, verwendeten wir als nächstes mit Citrat antikoagulierte WB-Proben, um die Aktivierung der zellulären und plasmatischen Hämostase zu hemmen. In unserem Modell wurde dann nach ECC-Simulation ebenfalls eine signifikante Verringerung der Freisetzung von α -Granula aus Blutplättchen in Citrat-WB-Proben beobachtet (ADP: p = 0,0021; TRAP-6: p = 0,0006). (**Abb. 9 A+B, Tab. 3**) Nach Stimulation mit ADP wurde kein signifikanter Unterschied in der Freisetzung von δ -Granula im Vergleich vor und nach Rotation in einem Chandler-Loop-System beobachtet (ADP: p = 0,1716). (**Abbildung 9C + Tab. 3**) Eine signifikante Verringerung der δ -Granula-Freisetzung wurde in Citrat-WB-Proben nach TRAP-6-Aktivierung sowie nach Stimulation im Chandler-Loop-System beobachtet (TRAP-6: p = 0,0005). (**Abbildung 9D + Tab. 3**) Diese Daten deuten darauf hin, dass der Scherstresseinfluss sowohl in heparinisierten als auch in mit Citrat antikoagulierten Vollblutproben eine verminderte α - und δ -Granulaexpression nach Aktivierung der Thrombozyten mittels Agonisten ADP und TRAP-6 verursacht.

3.4 Einsatz von Mepacrin-Assay nach Scherstresssimulation

Um die Sekretionskapazität der Thrombozyten unter Scherbelastung zu überprüfen und die Daten zur Thrombozytenaktivierung zu bestätigen, wurde der Mepacrin-Assay nach Chandler-Loop-Simulation mit vier gesunden Spenderproben durchgeführt. Alle vier Spender zeigten nach der Rotationssimulation verminderte Mepacrin-Freisetzungsmuster. (**Abb. 10**) Somit kann von einer erworbenen δ -SPD ausgegangen werden. Die Aufnahme und Freisetzung von Mepacrin ist unter Scherbelastung im Vergleich zur Kontrolle (vor Rotation) signifikant verringert, was schließlich die Daten in Kapitel 3.3 zu mangelnder Thrombozytenaktivierbarkeit nach Scherbelastung zusätzlich bekräftigen (Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

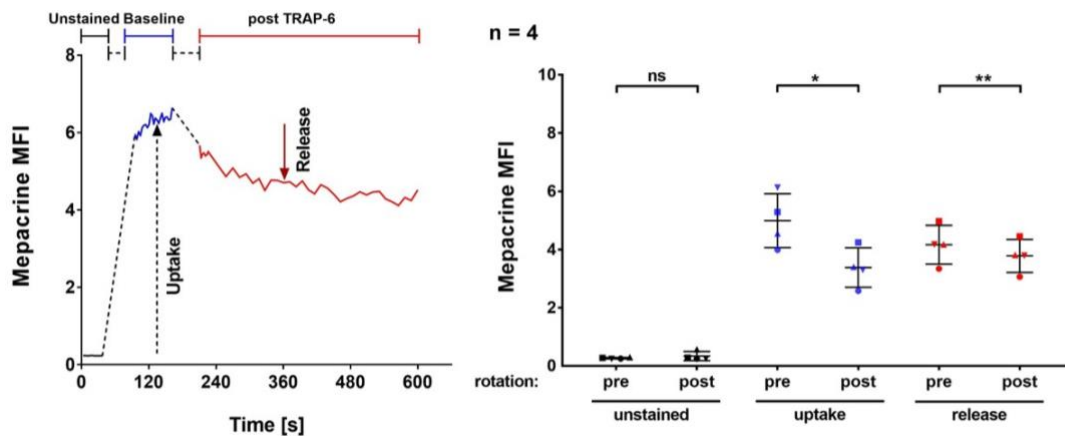


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Charakterisierung der δ -Granula-Sekretionskapazität der Thrombozyten bei gesunden Vollblutspenderproben vor und nach der Rotation im Chandler-Loop durch Mepacrin-Assay

Postrotationsproben zeigen eine signifikante Abnahme der durch TRAP-6 induzierten Aufnahme- und Freisetzungskapazität von Mepacrin im Vergleich zu Proben vor der Rotation ($p = 0,0210$, $p = 0,0045$). MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; TRAP, Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid. ($n=4$) (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

3.5 Ergebnisse der prospektiven In-vivo-Studie zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion/-degranulation bei Patienten unter ECMO

3.5.1 Verhalten von α - und δ -Granula-Expression bei Patienten unter vv. ECMO-Therapie

Es wurden Daten von 14 Patienten ausgewertet, die sich einer vv. ECMO unterzogen haben. Die Thrombozytenfunktion wurde gemäß dem oben beschriebenen FACS-Protokoll (siehe Kapitel 2.8) getestet.

Alle gesammelten Baseline-WB-Proben von Patienten vor der ECMO-Implantation (Tag 0, n = 11) zeigten eine signifikant geringere Reaktion auf ADP sowie auf TRAP-6-Zugabe im Vergleich zur gesunden Spenderproben (ADP: p = 0,0053; TRAP-6: p < 0,0001). **(Abb. 11 A, B)**

Nach einem Tag unter vv. ECMO (Tag 1, n = 14) wurde eine statistisch nicht signifikante Reduktion der α -Granulafreisetzung in den mit ADP behandelten Blutproben der Patienten beobachtet. Außerdem konnte man bei den mit TRAP-6 stimulierten Proben im Vergleich zu gesunden Spenderproben eine statistisch gering signifikante Freisetzung feststellen (ADP: p = 0,3004; TRAP-6: p = 0,0008). Der Unterschied nach 6-tägiger Verweildauer des Patienten an der ECMO (Tag 6, n = 14) im Vergleich zu gesunden Referenzproben war wie auch nach 10 Tagen (n=13) signifikant geringer (Tag 6 ADP: p = 0,0237; TRAP-6: p < 0,0001; Tag 10 ADP: p = 0,0217; TRAP-6: p < 0,0001). **(Abb. 11 A, B)**

Darüber hinaus war die δ -Granula-Reaktion auf ADP auch an verschiedenen Blutentnahmetagen im Vergleich zu Proben von gesunden Spendern ebenfalls verringert (ADP: Tag 0 [n = 11], p = 0,0362; Tag 1 [n = 14], p = 0,0033; Tag 6 [n = 14], p = 0,7203; Tag 10 [n = 13], p < 0,0024). Eine ähnliche Reaktion zeigte sich nach TRAP-6-Stimulation an verschiedenen Tagen (Tag 0 [n = 11], p = 0,0002; Tag 1 [n = 14], p < 0,0001; Tag 6 [n = 14], p = 0,0003; Tag 10 [n = 13] p < 0,0001). **(Abb. 11 C, D)**

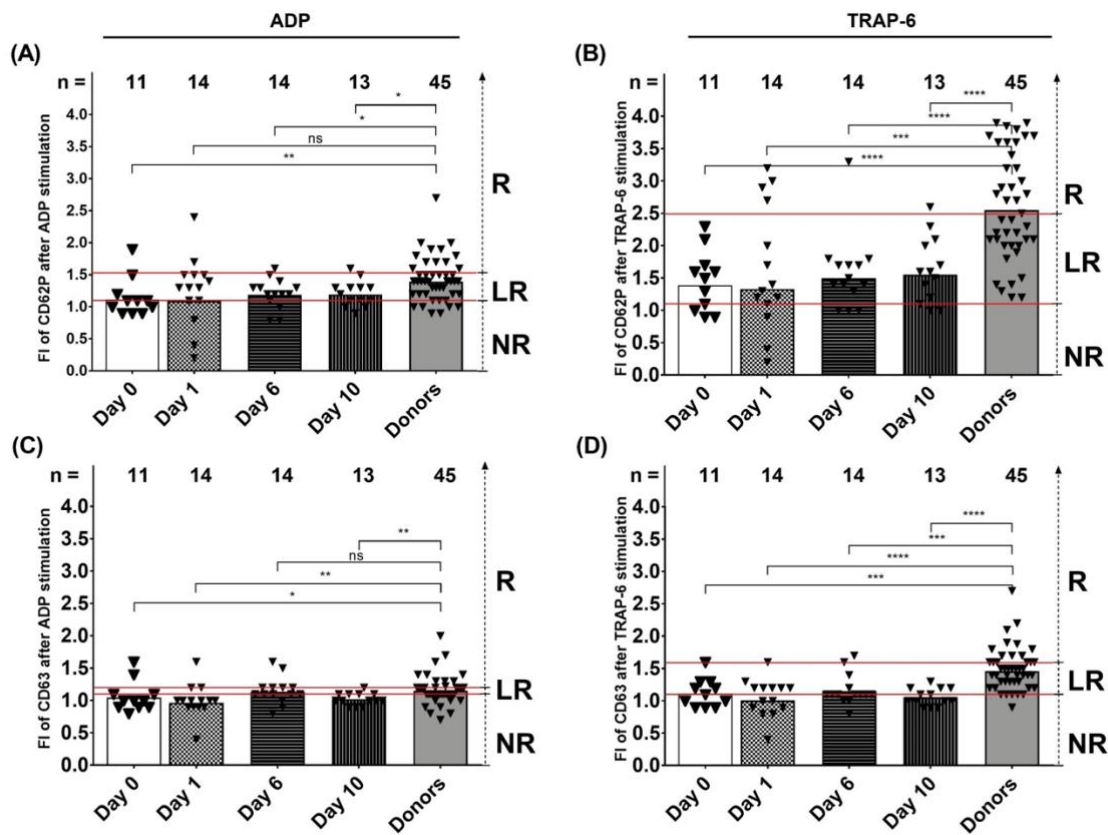


Abbildung 11 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse sowie Beurteilung der Thrombozytendegranulationsmarker bei Patienten unter vv. ECMO-Therapie

Die Freisetzung von α -Granula ist an allen Tagen signifikant reduziert, außer am Tag 1 nach ADP-Stimulation im Vergleich zu den gesunden Spenderproben (A, B). Die Freisetzung von δ -Granula war an allen Tagen nach Stimulation mit ADP und TRAP-6 signifikant verringert, außer am Tag 6 nach der ADP-Stimulation (C, D). (ns = $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$) (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

3.5.2 Verhalten von α - und δ -Granula-Expression bei Patienten unter va. ECMO-Therapie

Auf die gleiche Art und Weise wie bei WB-Proben von Patienten unter der vv. ECMO zeigten die Patienten unter der va. ECMO ($n = 29$) nach Aktivierung mit ADP eine ähnlich verringerte Expression von CD62P im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben ($n = 45$) (Tag 0 [$n = 21$], $p = 0,0084$; Tag 1 [$n = 29$], $p = 0,0012$; Tag 6 [$n = 29$], $p = 0,0155$; Tag 10 [$n = 29$], $p = 0,2452$). Nach TRAP-6-Stimulation war ebenfalls der mittlere FI der Patienten an allen Tagen im Vergleich zum mittleren FI gesunder Spender verringert (Tag 0 [$n = 21$],

$p = 0,0017$; Tag 1 [n = 29], $p < 0,0007$; Tag 6 [n = 29], $p < 0,0001$; Tag 10 [n = 27], $p < 0,0001$). (**Abb. 12 A, B**)

Darüber hinaus nahm die Expression von δ - und Lysosomen-Granula in Gegenwart von ADP auf die gleiche Weise ab wie bei α -Granula (Tag 0 [n = 21], $p = 0,0017$; Tag 1 [n = 29], $p = 0,0007$; Tag 6 [n = 29], $1,01 \pm 0,13$ vs. $1,25 \pm 0,26$, $p < 0,0001$; Tag 10 [n = 29], $1,01 \pm 0,20$ vs. $1,25 \pm 0,26$, $p = 0,0001$). Nach der TRAP-6-Stimulation zeigten auch die Blutplättchen an allen Tagen eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den gesunden Spendern (Tag 0 [n = 21], $p = 0,0002$; Tag 1 [n = 29], $1,08 \pm 0,19$ vs. $1,71 \pm 0,48$, $p < 0,0001$; Tag 6 [n = 29], $1,10 \pm 0,14$ vs. $1,71 \pm 0,48$, $p = 0,0006$; am Tag 10 [n = 29], $1,12 \pm 0,19$ vs. $1,71 \pm 0,48$, $p < 0,0001$). (**Abb. 12 C, D**)

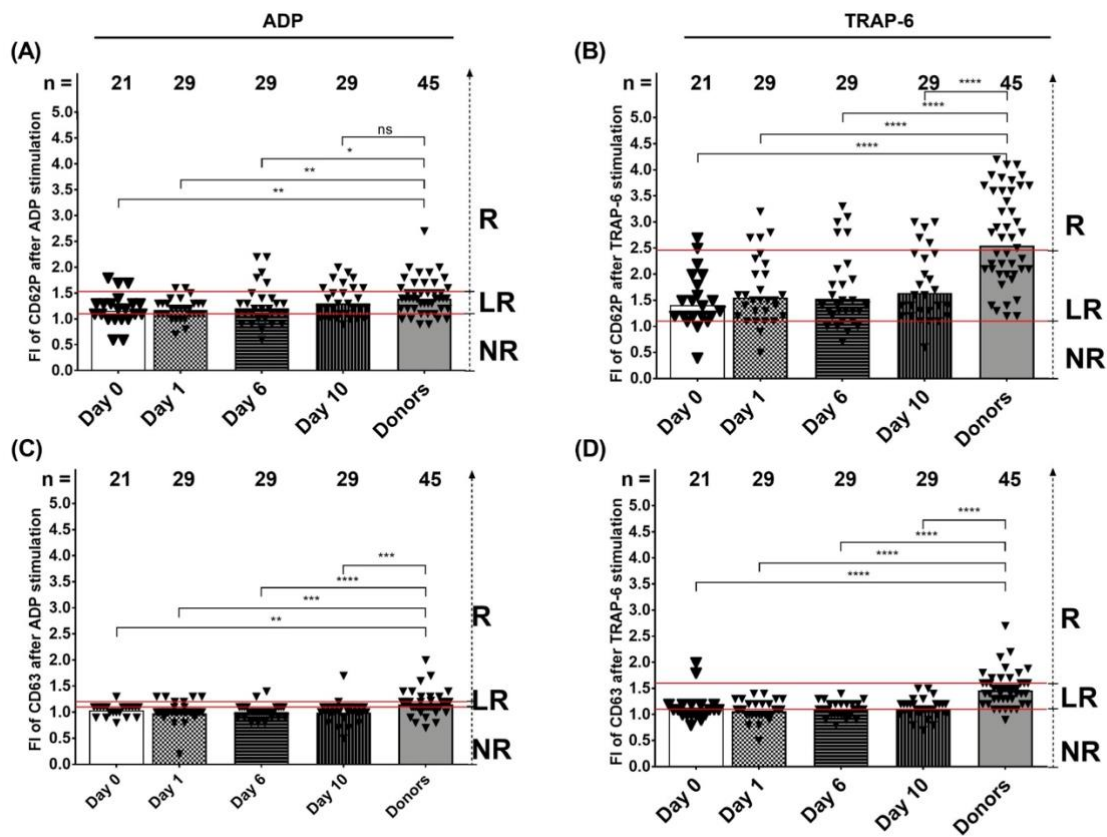


Abbildung 12 A-D: Grafische Darstellung der Ergebnisse sowie Beurteilung der Thrombozytendegranulationmarker bei Patienten unter va. ECMO-Therapie

Die Freisetzung von α -Granula war an allen Tagen signifikant reduziert, außer am Tag 10 nach ADP-Stimulation im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (A–B).

Auch die Freisetzung von δ -Granula während 10 Tagen war mit ADP und TRAP-6 an allen Tagen signifikant verringert (C–D). ($ns = p > 0,05$; $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$). (Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

3.5.3 Bestimmung und Überprüfung der Korrelation des löslichen P-Selectins im Blutplasma gegenüber P-Selectin der Thrombozyten bei ECMO-Patienten

Wir überprüften auch die longitudinalen Veränderungen des löslichen P-Selectin-Spiegels (sP-Selektin), um Messungen einer erhöhten P-Selectin-Expression bei den Thrombozyten zu verifizieren. Es gab lediglich eine Korrelation zwischen P-Selectin-Konzentration nach TRAP-6-Aktivierung und sP-Selectin, nämlich am Tag 6 ($p=0,0270$). Es ergab sich eine signifikante Abnahme der Plasmakonzentration von sP-Selectin zwischen Tag 0 und Tag 1 ($9,40 \pm 3,76$ vs. $7,11 \pm 2,83$; $p = 0,0027$) und Tag 0 sowie Tag 6 ($9,40 \pm 3,76$ vs. $7,44 \pm 3,72$;

$p = 0.0206$). Es fanden sich jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen Tag 0 und Tag 10 ($9,40 \pm 3,76$ vs. $7,40 \pm 5,00$; $p = 0,3631$). (**Abb. 13**)

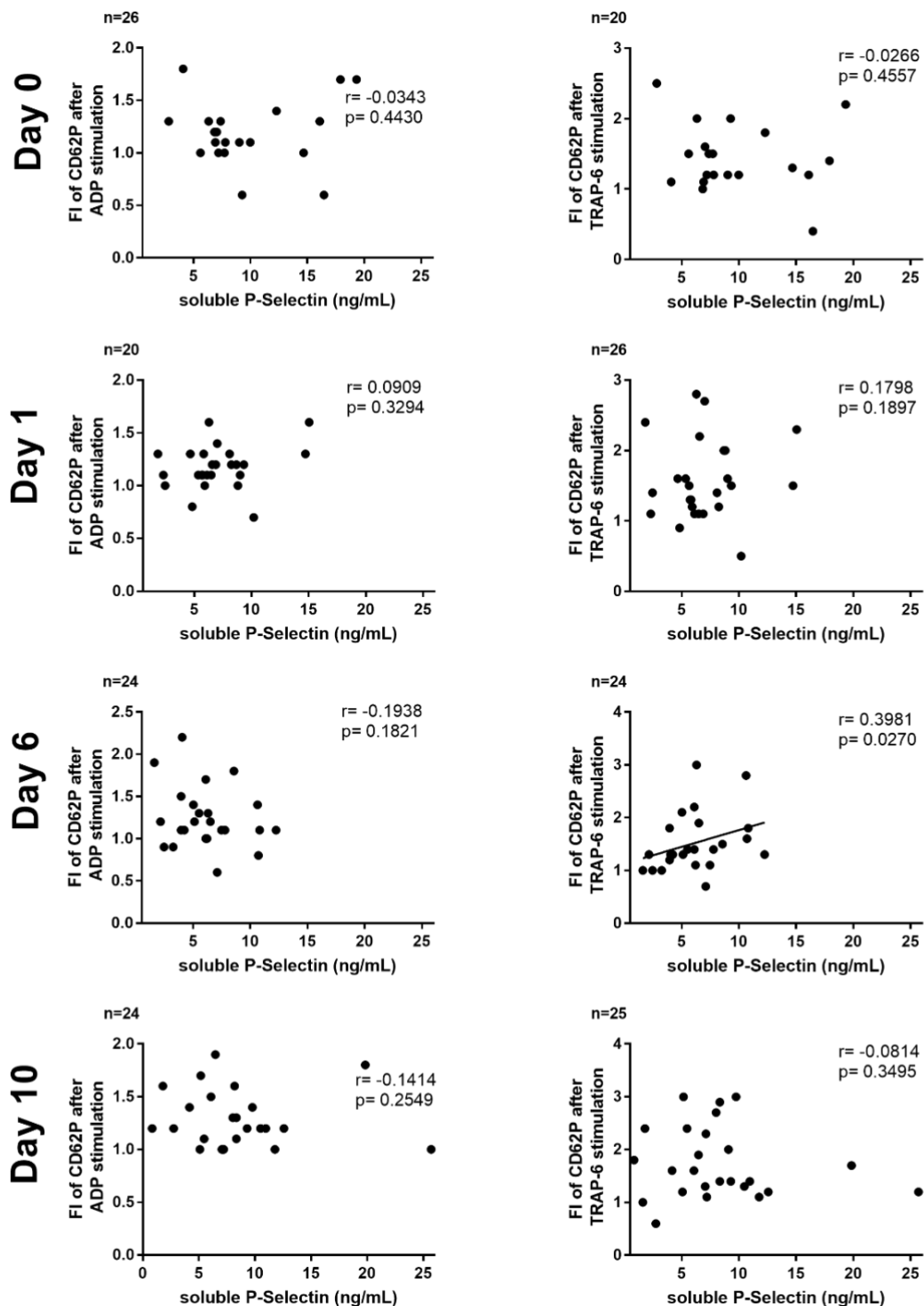


Abbildung 13: Überprüfung der Korrelation des löslichen P-Selectins im Blutplasma gegenüber P-Selectin der Thrombozyten bei ECMO-Patienten

Es gab keine Korrelation (Spearman r) zwischen sP-Selectin und P-Selectin nach Stimulation mit ADP und TRAP-6 während 10 Tagen der va-ECMO-Therapie, mit Ausnahme einer Korrelation am Tag 6 zwischen P-Selectin-Konzentration nach TRAP-6-Aktivierung und sP-Selectin ($p=0,0270$). Zwischen Tag 0 und Tag 1 ($p = 0,0027$) sowie Tag 0 und Tag 6 ($p = 0,0206$) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Plasmakonzentration von sP-Selectin. Die Konzentrationen von löslichem P-Selectin (sP-Selectin) im Plasma wurden mittels Enzymimmunoassay (EIA) unter Verwendung von Kits von R&D Systems (Minneapolis, USA) gemessen (Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

3.6 Thrombozytendegranulation, Blutungen sowie thrombotische Ereignisse

Wir konnten bereits an den vorherigen Ergebnissen (siehe 3.7 und 3.8) beobachten, dass es an verschiedenen Tagen in beiden ECMO-Gruppen deutlich mehr Non- und Low-Responder (NR/LR) als Responder gab. (**Abb. 11 A-D und Abb. 12 A-D**) Sowohl in der vv. als auch in der va. ECMO-Patientengruppe gab es einen stetigen Anstieg der Anzahl der NR/LR vom Tag 0 bis zum Tag 10. Es wurde zudem an bestimmten Tagen die höchste Anzahl der Responder sowie der klinischen Blutungs- und Thromboseereignissen während der vv. oder va. ECMO-Therapie dokumentiert. (**Abb. 14 A-H**) Hinsichtlich der Blutungshäufigkeit konnten wir an den verschiedenen Testtagen keinen signifikanten Unterschied zwischen vv. ECMO und va. ECMO beobachten (Tag 0: $p = 0,2481$, Tag 1: $p = 0,7354$, Tag 6: $p = 0,4568$, Tag 10: $p = 0,7132$). Die Häufigkeit von Thrombosen war zwischen vv. ECMO und va. ECMO an den verschiedenen Testtagen ähnlich (Tag 0: $p = 0,7397$, Tag 1: $p = 0,5119$, Tag 6: $p = 0,6308$, Tag 10: $p = 0,4525$). Die meisten Blutungsereignisse traten nach dem 6 Tag in beiden Gruppen etwa gleich auf und fast alle Patienten waren NR + LR. Die höchste Anzahl an Respondern wurde am Tag 1 unter vv. ECMO beobachtet (27 % der Patienten exprimierten CD62 nach Stimulation mit ADP oder TRAP-6). Darüber hinaus konnten wir an den verschiedenen Tagen keine Unterschiede hinsichtlich Blutungen oder Thrombosen zwischen Responder und NRs beobachten. Eine Einschränkung stellt jedoch die geringe Stichprobengröße dar. (**Abb. 14 A-H**) (**Tab. 4-7**)

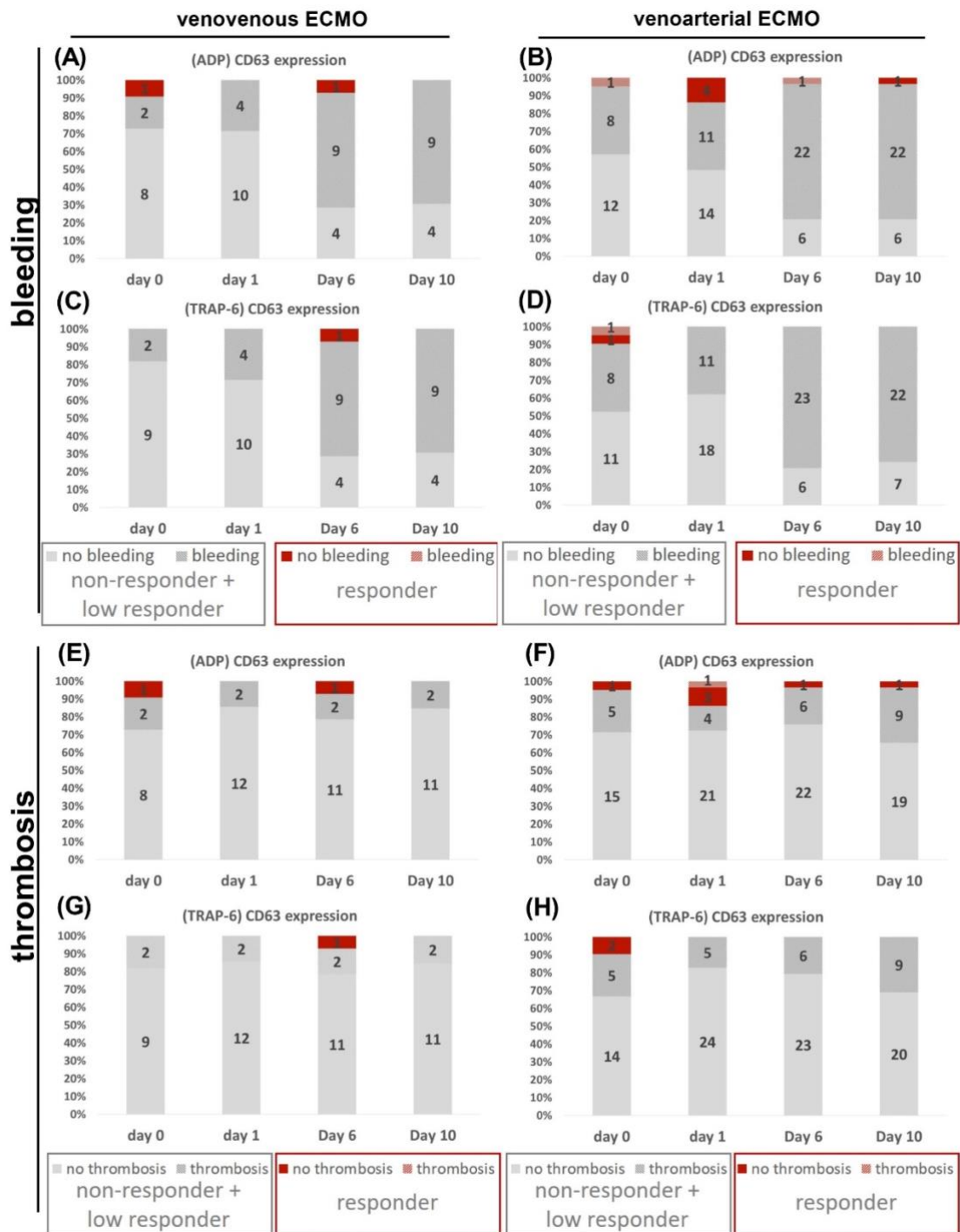


Abbildung 14 A-H: Zusammenschau von CD63-Expression mit Blutungs- und Thromboseereignissen unter vv. und va. ECMO-Gruppen

A-D veranschaulichen die Blutungsereignisse entsprechend der CD63-Expressionskapazität nach Stimulation mit ADP und TRAP-6. E-H zeigen die Anzahl thromboembolischer Ereignisse entsprechend dem Aktivierungsstatus der Blutplättchen auf. Bei Patienten mit vv. ECMO gab es nahezu keine Responder bis auf einen. Unter der Therapie beobachteten wir bei diesem keine

thromboembolischen Ereignisse. Der Höhepunkt der Blutungsereignisse liegt am 6. Tag.
(Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

Tabelle 4: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der vv. ECMO-Therapie, α - und δ -Granula-Sekretion nach ADP-Stimulation (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

		ADP					
		CD62P			CD63		
		Reaktion	Blutung	Thrombose	Reaktion	Blutung	Thrombose
Tag 0, n=11	non+low responder	90.9% (10/11)	10% (1/10)	20% (2/10)	90.9% (10/11)	20% (2/10)	20% (2/10)
	responder	9.1% (1/11)	100% (1/1)	0% (0/1)	9.1% (1/11)	0% (0/1)	0% (0/1)
Tag 1, n=14	non+low responder	85.7% (12/14)	33.3% (4/12)	16.7% (2/12)	100% (14/14)	28.6% (4/14)	14.3% (2/14)
	responder	14.3% (2/14)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/14)	0% (0/0)	0% (0/0)
Tag 6, n=14	non+low responder	100% (14/14)	64.3% (9/14)	14.3% (2/14)	92.9% (13/14)	69.2% (9/13)	15.4% (2/13)
	responder	0% (0/14)	0% (0/0)	0% (0/0)	7.1% (1/14)	0% (0/1)	0% (0/1)
Tag 10, n=13	non+low responder	100% (13/13)	69.2% (9/13)	15.7% (2/13)	100% (13/13)	69.2% (9/13)	15.4% (2/13)
	responder	0% (0/13)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/13)	0% (0/0)	0% (0/0)

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der vv. ECMO-Therapie, α - und δ -Granula-Sekretion nach TRAP-6-Stimulation (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

		ADP					
		CD62P			CD63		
		Reaktion	Blutung	Thrombose	Reaktion	Blutung	Thrombose
Tag 0, n=11	non+low responder	90.9% (10/11)	20% (2/10)	20% (2/10)	100% (11/11)	18.2% (2/11)	18.2% (2/11)
	responder	9.1% (1/11)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/11)	0% (0/0)	0% (0/0)
Tag 1, n=14	non+low responder	64.3% (9/14)	44.4% (4/9)	11.1% (1/9)	100% (14/14)	28.6% (4/14)	14.3% (2/14)
	responder	35.7% (5/14)	0% (0/5)	20% (1/5)	0% (0/14)	0% (0/0)	0% (0/0)
Tag 6, n=14	non+low responder	85.7% (12/14)	66.7% (8/12)	16.7% (2/12)	92.9% (13/14)	69.2% (9/13)	15.4% (2/13)
	responder	14.3% (2/14)	50% (1/2)	0% (0/2)	7.1% (1/14)	0% (0/1)	0% (0/1)
Tag 10, n=13	non+low responder	92.3% (12/13)	75% (9/12)	16.7% (2/12)	100% (13/13)	69.2% (9/13)	15.4% (2/13)
	responder	7.7% (1/13)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/13)	0% (0/0)	0% (0/0)

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der va. ECMO-Therapie, α - und δ -Granula-Sekretion nach ADP-Stimulation (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

		ADP					
		CD62P			CD63		
		Reaktion	Blutung	Thrombose	Reaktion	Blutung	Thrombose
Tag 0, n=21	non+low responder	85.7% (18/21)	75% (6/18)	27.8% (5/18)	95.2% (20/21)	40% (8/20)	25% (5/20)
	responder	14.3% (3/21)	100% (3/3)	0% (0/3)	4.8% (1/21)	100% (1/1)	0% (0/1)
Tag 1, n=29	non+low responder	93.1% (27/29)	33.3% (9/27)	14.8% (4/27)	86.2% (25/29)	44% (11/25)	16% (4/25)
	responder	6.9% (2/29)	100% (2/2)	50% (1/2)	13.8% (4/29)	0% (0/4)	25% (1/4)
Tag 6, n=29	non+low responder	82.8% (24/29)	79.2% (19/24)	25% (6/24)	96.6% (28/29)	78.6% (22/28)	21.4% (6/28)
	responder	17.2% (5/29)	80% (4/5)	0% (0/5)	3.4% (1/29)	100% (1/1)	0% (0/1)
Tag 10, n=29	non+low responder	75.9% (22/29)	81.8% (18/22)	31.8% (7/22)	96.6% (28/29)	78.6% (22/28)	32.1% (9/28)
	responder	24.1% (7/29)	57.1% (4/7)	28.6% (2/7)	3.4% (1/29)	0% (0/1)	0% (0/1)

Tabelle 7: Gegenüberstellung der Daten der Non/Low-Responder sowie Responder der erhobenen Blutungs- und Thrombosedaten während der va. ECMO-Therapie, α - und δ -Granula-Sekretion nach TRAP-6-Stimulation (Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

		ADP					
		CD62P			CD63		
		Reaktion	Blutung	Thrombose	Reaktion	Blutung	Thrombose
Tag 0, n=21	non+low responder	90.5% (19/21)	47.4% (9/19)	26.3% (5/19)	90.5% (19/21)	42.1% (8/19)	26.3% (5/19)
	responder	9.5% (2/21)	0% (0/2)	0% (0/2)	9.5% (2/21)	50% (1/2)	0% (0/2)
Tag 1, n=29	non+low responder	93.1% (27/29)	37% (10/27)	14.8% (4/27)	100% (29/29)	37.9% (11/29)	17.2% (5/29)
	responder	6.9% (2/29)	50% (1/1)	50% (1/1)	0% (0/29)	0% (0/0)	0% (0/0)
Tag 6, n=29	non+low responder	89.7% (26/29)	80.8% (21/26)	19.2% (5/26)	100% (29/29)	79.3% (23/29)	20.7% (6/29)
	responder	10.3% (3/29)	66.7% (2/3)	33.3% (1/3)	0% (0/29)	0% (0/0)	0% (0/0)
Tag 10, n=29	non+low responder	82.8% (24/29)	79.2% (19/24)	29.2% (7/24)	100% (29/29)	75.9% (22/29)	31% (9/29)
	responder	17.2% (5/29)	60% (3/5)	40% (2/5)	0% (0/29)	0% (0/0)	0% (0/0)

4 Diskussion

Zuallererst möchte ich hervorheben, dass bereits oben vorgestelltes FC-Protokoll einen einfach durchzuführenden FC-Assay zur Analyse der Aktivierung von Thrombozyten in Vollblutproben beschreibt.

Die Fähigkeit dieses Assays, die Thrombozytenaktivierung in fixierten sowie drei Tage lang gelagerten Proben nachzuweisen, wurde in den In-vitro-Experimenten deutlich bestätigt. Darüber hinaus wurde die Eignung dieser Methode zur Untersuchung der Thrombozytendegradationsmarker unter dem Einfluss der Scherkräfte während der mechanischen Kreislaufunterstützung mittels vv. und va. ECMO im klinischen Umfeld validiert. Die Daten aus der klinischen Studie bestätigen frühere Berichte über die erworbene Plättchendysfunktion bei Patienten unter ECMO (Malfertheiner, Philipp et al. 2016, Kalbhenn, Schlagenhaut et al. 2018, Mansour, Roussel et al. 2020, Schlagenhaut, Kalbhenn et al. 2020, Panholzer, Bajorat et al. 2021, Siegel, Chalupsky et al. 2022, Mirus, Heubner et al. 2023).

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, verschiedene Aspekte der Thrombozytenfunktion in einer kleinen Menge Vollblut und auch bei thrombozytopenischen Patienten zu testen, wo die anderen Assays wie LTA oder Impedanzaggregometrie funktionell beeinträchtigt sind (Cattaneo, Cerletti et al. 2013, Frelinger, Rivera et al. 2021, Mezzano, Harrison et al. 2022).

Dies eröffnet zusammen mit der zunehmenden Verfügbarkeit von Durchflusszytometern und Verbesserungen bei den Probenvorbereitungen, einschließlich neuer Fixierungsmöglichkeiten und vorgefertigter Materialien, zukünftige Möglichkeiten die Tests an entfernten Standorten mit wenig Aufwand zu ermöglichen (Dovlatova, Lordkipanidze et al. 2014, Dovlatova, May et al. 2015).

Insbesondere im Bereich leichter Blutungsstörungen könnte es interessant werden, denn mittlerweile wird die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) bei der Diagnose dieser Patienten durch die Durchflusszytometrie vermehrt herausgefordert.

In der Vergangenheit gab es zahlreiche Berichte, in denen mehrere FC-Methoden zum Nachweis der Thrombozytenaktivierung beschrieben wurden. Einer der ersten Berichte wurde 1987 von Shattil et al. erstellt (Shattil, Cunningham et al. 1987).

Neben der LTA ist die WB-Durchflusszytometrieanalytik eine weitere leistungsstarke Methode zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion (Michelson 1996). Seit den 1990er Jahren hat sich die Durchflusszytometrie in zahlreichen Studien als unverzichtbarer Bestandteil der Thrombozytenaktivierungsanalyse etabliert (Linden 2013, Dovlatova, Lordkipanidze et al. 2014, Pasalic, Pennings et al. 2017, Mezzano, Harrison et al. 2022, Jourdi, Ramstrom et al. 2023). Obwohl das FC-Verfahren mit WB bereits mehrfach beschrieben wurde, ist es immer noch nicht gänzlich standardisiert und ich persönlich sehe die Neuheit bzw. die Weiterentwicklung in der Verwendung dieser Methode in 24-Stunden-Routinelaborsystemen, um solche Thrombozytenfunktionstests rund um die Uhr anbieten zu können. Es ermöglicht die Gewinnung von Längsschnittdaten bei kritisch kranken Patienten und könnte ein wichtiger Schritt zur Verbesserung der Behandlung der Thrombozytenfunktionsstörungen sein.

Die Expertenmeinung der internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (eng. ISTH) aus dem Jahr 2023 ergab, dass die semiquantitative FC-Messung der P-Selectin-Expression bei Thrombozyten im Vollblut, nicht jedoch in PRP oder gewaschenen Blutplättchen, derzeit die geeignetste Methode zur Messung der α -Granula-Sekretion ist (Johnston, Pickett et al. 1987, Tschoepe, Spangenberg et al. 1990, Mezzano, Harrison et al. 2022, Jourdi, Ramstrom et al. 2023).

Es wurde ebenfalls erwähnt, dass die Korrelation zwischen der FC-Messung und der LTA bezogen auf die P-Selectin-Expression als äußerst unsicher einzustufen ist. Da es sich bei der Thrombozytenaggregation und -sekretion um voneinander abhängige und stark korrelierende Funktionen handelt, sollte dieser Zusammenhang durch weitere Studien mit validierten Kontrollen und Grenzwerten noch untersucht werden, um präzisere diagnostische Kriterien für Thrombozytensekretionsstörungen festzulegen (Jourdi, Ramstrom et al. 2023).

Darüber hinaus wurde in dem Paper aus dem Jahre 2018 von Gresele et al. berichtet, dass die Agonisten-stimulierte Expression von P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche durch FC-Messung bei einigen Patienten mit GPS, einer α -Granula-Störung, normal war (Gresele, Falcinelli et al. 2018). Dies deutet darauf hin, dass dieser Test in seltenen Fällen α -SPD möglicherweise nicht erkennt.

Der neue Assay bietet zudem im Vergleich zu zuvor zitierten FC-Protokollen mehrere weitere Vorteile an. Dieser ermöglicht die Aktivierung der Blutplättchen direkt im Vollblut anstelle des bisherigen zeitaufwändigeren Verfahrens in PRP. Wie die bereits oben erwähnten Ex-vivo-Experimente gezeigt haben, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Aktivierungsfähigkeit der Blutplättchen in PRP und WB.

Der nächste Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Fixierung aktivierter WB-Proben bei 4 °C routinemäßig 3 Tage lang gelagert werden können, sodass keine sofortige Durchflusszytometriemessung erforderlich ist und man somit eine gewisse zeitliche Flexibilität hat (Dovlatova, Lordkipanidze et al. 2014).

Wie die Überprüfung des Protokolls gezeigt hat, gibt es im Vergleich zu PRP und nach 3-tägiger Lagerungszeit keine Unterschiede im Verhalten der beiden Granula-Expressionsmarker. Zudem kann durch die Verwendung von Vollblut das Risiko des Verlusts von Blutplättchen oder einer Voraktivierung dieser durch Zentrifugationsschritte vermieden werden.

Man kann diese Methode gut zur Verlaufsmessung der Degranulationsmarker verwenden. Darüber hinaus erfordert die Durchführung der einzelnen Protokollschritte bis auf die Verwendung von FC kein speziell geschultes Personal.

Die Kosten der FC-Messungen wurden von dem Expertenkonsens der ISTH als ungewiss eingestuft, was möglicherweise teils auf die unterschiedlichen Vorstellungen von Kosten und Budgets der jeweiligen Labore zurückzuführen ist (Mezzano, Harrison et al. 2022). Die Tatsache ist, dass die Neuanschaffungskosten des Durchflusszytometriegeräts im fünfstelligen

Bereich liegen und eventuell nicht von jedem Labor bzw. jeder Forschungsgruppe getragen werden können.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine vielseitige und gleichzeitig sensitive Prüfung einer Vielzahl von Eigenschaften und Funktionen von Blutplättchen. Die hohe Sensitivität erfordert allerdings Kenntnisse über den Grad der Thrombozytenvoraktivierung, um die Ergebnisse adäquat interpretieren zu können. Andererseits ist die Durchflusszytometrie einer der wenigen Thrombozytenfunktionstests, bei der man mit wenig Aufwand zu seinen Ergebnissen kommen kann. Und auch wenn der Umgang bei den herkömmlichen Thrombozytenfunktionsassays mittels FC qualifiziertes Personal erfordert und daher in vielen klinischen Umgebungen als unpraktisch angesehen wird, könnten neu eingeführte und zukünftige Verbesserungen durchaus den Weg für eine breitere klinische Anwendung ebnen. Darüber hinaus besteht weiterhin der Bedarf an Studien, die FC-Methoden mit den klinischen Situationen verknüpfen und mit anderen etablierten Alternativverfahren vergleichen.

Bei der Beurteilung thrombotischer Ereignisse mittels FC ist die Situation allerdings komplizierter, da die zugrunde liegenden Mechanismen viel komplexer sind. Bei anhaltender Hyperkoagulabilität oder Gefäßwandproblemen ist außerdem zu bedenken, dass die meisten Ex-vivo-Thrombozytenfunktionsstudien auf zirkulierende Thrombozyten abzielen. Dies bedeutet, dass eine geringere Thrombozytenaktivierungsreaktion meist zu erwarten ist. Dies war in der Tat auch in folgender Studie der Fall, in der bei Patienten, die mit dem Hanta-Virus infiziert waren, eine geringere Thrombozytenaktivierung in zirkulierenden Blutplättchen festgestellt wurde und die Zerstörung der Blutplättchen somit andauerte (Connolly-Andersen, Sundberg et al. 2015).

Für thrombozytenaggregationshemmende Arzneimitteltests oder in akuten Situationen ist die Durchflusszytometrie möglicherweise weniger nützlich, da die Bearbeitungszeit trotz der technischen Verbesserungen und Optimierungen bei der Probenvorbereitung immer noch als zu lang angesehen wird. Darüber hinaus

bedeutet die Möglichkeit der Verwendung mehrfarbiger Protokolle auch, dass die Datenanalyse und deren Interpretation immer komplexer werden. Eine zukünftige Herausforderung könnte dann darin bestehen, Multiparameter-Analysealgorithmen zu entwickeln und zu bewerten, die das Potenzial haben, Defekte und Merkmale der Thrombozytenfunktionalität zu erfassen und zu identifizieren, was wiederum diagnostisches und/oder prognostisches Potenzial mit sich bringen könnte.

Trotz enormer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten stellen Blutungen und Thromboembolien immer noch Herausforderungen in der ECC-Therapie dar. Pathologische Blutflussmuster, künstliche prokoagulierende hydrophobe Oberflächen und teilweise unphysiologische Druckgradienten, wie zum Beispiel innerhalb von ECMO- oder VAD-Systemen, erzeugen eine erhebliche Scherbelastung, die wiederum eine Aktivierung der Blutplättchen und Ablösung ihrer Rezeptoren induziert (Diehl, Aleker et al. 2010, Heilmann, Geisen et al. 2012, Lukito, Wong et al. 2016, Fuchs, Berg et al. 2018, Chen, Mondal et al. 2019).

Die Daten der prospektiven Studie (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2) bestätigen, dass die mechanische Kreislaufunterstützung zu einer deutlich signifikanten Verringerung der Aktivierung von Blutplättchen und ihrer Fähigkeit, die α -, δ -Granula zu exprimieren, führt. Chen et al. zeigten, dass die schwerste pumpeninduzierte Thrombozytenstörung in einem Ex-vivo-Modell auftrat, ähnlich einer va. ECMO-Therapie (Chen, Zhang et al. 2020). Dies kann durch eine sehr hohe nicht-physiologische Scherstressbelastung erklärt werden, die durch eine hohe Drehzahl des Pumpenmechanismus zustande kommt.

In der untenstehenden Abbildung werden alle wichtigen Einflussfaktoren und pathophysiologische Prozesse zusammengefasst, die zu einer Thrombozytendysfunktion bzw. Thrombozytopathie in Form von α - oder δ -SPD führen könnten. **(Abb. 15)**

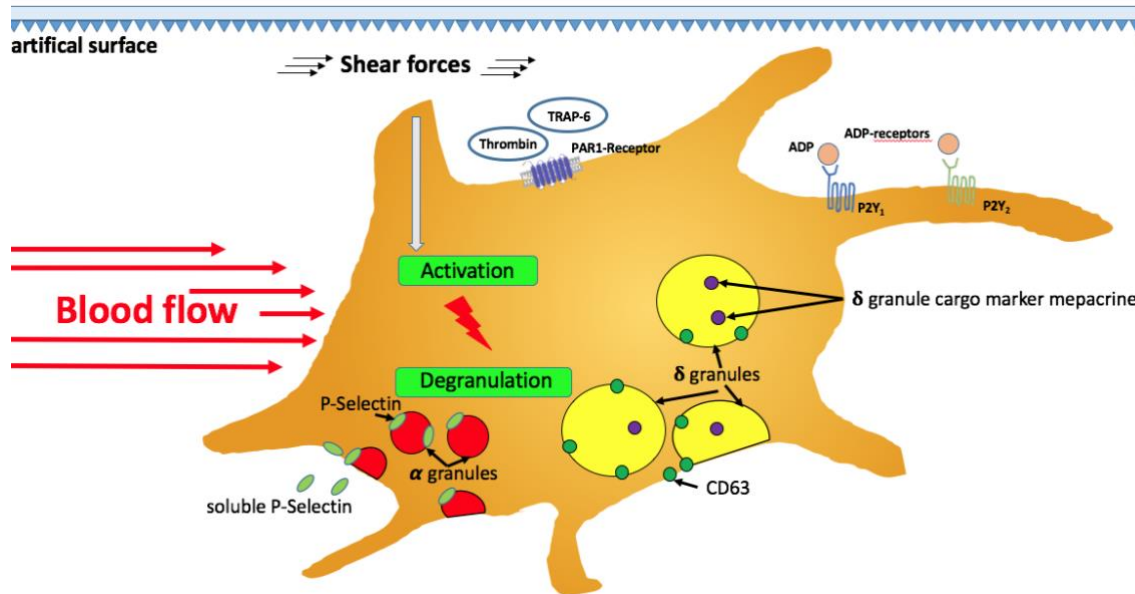


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Einwirkung von Scherkräften, der Fremdkörperoberfläche sowie des Blutflusses auf die Thrombozytenfunktion
(Hidiatov, Gaupp et al. 2023)

In einem weiteren Schritt dieser Studie wurde das Chandler-Loop-Modell verwendet, um die bereits mehrfach erwähnten Scherstressbedingungen während eines ECMO-Betriebes zu simulieren. Zum Vergleich wurden Blutproben von sieben gesunden Spendern mit Citrat oder Heparin im Vorfeld gerinnungshemmend behandelt, um den genauen Mechanismus der Plättchendysfunktion aufzuklären. Nach einer Stunde Rotation bei einer maximalen Geschwindigkeit von 99 U/min im Chandler-Loop-System kam es nach Zugabe von Agonisten zu einer signifikanten Verringerung der α -, δ -Granula-Expressionsmarker im Citratblut. Dies bedeutet, dass Scherkräfte, die durch die Rotation entlang der inneren Schlauchschleifenwände entstehen, einen erheblich negativen Einfluss auf die Funktion der Blutplättchen ausüben. Wie van Oeveren et al. bereits in ihrer Arbeit beschrieben haben, könnte die Ursache in der systembedingt verringerten Anzahl von Blutplättchen sowie in der durch Scherkräfte induzierten Artefakten liegen, die sich auf die Blutbestandteile und die Blutplättchenaggregation auswirken (van Oeveren, Tielliu et al. 2012). Die Ergebnisse von In-vitro-Experimenten zur Thrombozytenaktivierung zeigen, dass das oberflächenexprimierte CD62P ein empfindliches Maß für die durch

mechanische Scherung induzierte Thrombozytenaktivierung darstellt (Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

Das Chandler-Loop-System ist ein gut geeignetes dynamisches Flussmodell, das hauptsächlich zur Hämokompatibilitätsprüfung verschiedener Stents in der Kardiologie und Angiologie verwendet wird (Christensen, Larsson et al. 2006, Sinn, Scheuermann et al. 2011). Aber es bleibt dabei, dass es sich nur um ein Modell mit Einschränkungen und Limitationen handelt. Einer der Nachteile dieses Systems ist vor allem der kontinuierliche Blut-Luft-Kontakt, der eine Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation sowie Scherkräfte induziert (Thorsen, Klausen et al. 1993, Ritz-Timme, Eckelt et al. 1998, Culp, Porter et al. 2003).

Der zweite Nachteil ist die Begrenzbarkeit in der Drehzahleinstellung. Daher ist es leider nicht möglich Bedingungen mit noch höherer Scherbelastung, wie etwa bei einer vv. oder va. ECMO, zu erzeugen.

Auch wenn die Methoden begrenzt sind, zeigen die Ergebnisse, wie empfindlich die Blutplättchen auf Veränderungen der äußeren Umgebung sowie in Bezug auf die verschiedenen rheologischen Bedingungen reagieren.

Als Beweis dafür dient erneut die in Kapitel 3.5.1 und 3.5.2 dargestellte prospektive klinische Studie, in der die Aktivierung von Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie bei Patienten vor und nach Implantation der vv. und va. ECMO während einer Zeitspanne von 10 Tagen untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Sekretionsdefekt von α - und δ -Granula in den beiden Gruppen. Geisen et al. zeigten zuvor ähnliche Ergebnisse bei Patienten, die sich unterschiedlichen VAD-Therapien unterzogen haben (Geisen, Brehm et al. 2018).

Bei der Überprüfung, ob die Thrombozytenfunktionsstörung durch die Aktivierung von Endothelzellen verursacht wurde, wurde die Konzentrationen vom löslichen P-Selectin im Plasma gemessen.

P-Selectin ist ein Plasmamembran-Glykoprotein, das eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von Blutplättchen an Monozyten und Neutrophilen spielt. P-Selectin wird in den α -Granula von Blutplättchen und den Weibel-Palade-

Körperchen von Endothelzellen gespeichert (Sharda and Flaumenhaft 2018). Bei der Zellaktivierung wird das gespeicherte P-Selectin schnell an die Zelloberfläche mobilisiert und später in die intrazellulären Kompartimente zurückgeführt. Ohne Endothelaktivierung sind Blutplättchen die Hauptquelle für zirkulierendes sP-Selectin, was dieses Protein zu einem zuverlässigen Marker für die Thrombozytenaktivierung in vivo macht (Ferroni, Martini et al. 2009).

Somit deuten die in unseren Experimenten festgestellten erhöhten sP-Selectin-Konzentrationen im Plasma eindeutig darauf hin, dass eine verringerte Thrombozytenreaktivität durch ECMO-induzierte Thrombozytenaktivierung und – „erschöpfung“ verursacht wurde.

In der Studie konnte man bereits einen Anstieg des sP-Selectins bei Patienten vor der ECMO-Implementierung bzw. in den ersten 12 Stunden unter dieser beobachten. Als mögliche Ursachen könnte zum einen die zugrunde liegende Erkrankung (koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz) sowie die zusätzliche Scherbeanspruchung eine Degranulation des α -Granula induzieren, was anschließend später zu einer verminderten Granula-Exozytose als Reaktion auf die In-vitro-Agonisten geführt habe (Ridker, Buring et al. 2001).

Es könnte beispielsweise der kardiogene Schock in Folge einer bereits zuvor bestehenden schwersten koronaren Herzerkrankung für den erhöhten Wert am Tag 0 verantwortlich sein (Tscharre, Wittmann et al. 2022). Das gleiche Verhalten von sP-Selektin zeigte die Studie von Zhou et al. aus dem Jahre 2013. In dieser wurden die APL-Geräte (artificial pump-lung) den Schafen implantiert, die für Atemunterstützung bis max. 30 Tage sorgten. Während des 30-tägigen Studienzeitraums gab es in der Geräte- und der Scheingruppe keine drastische Veränderung des oberflächen-exprimierten CD62P, mit Ausnahme des Anstiegs der sP-Selectin-Konzentration der Gerätegruppe im Vergleich zum Ausgangswert (Zhou, Niu et al. 2013).

Es ist interessant festzustellen, dass das oberflächen-exprimierte CD62P mit dem löslichen P-Selectin weiterhin empfindlich gegenüber chemisch induzierter

Thrombozytenaktivierung durch ADP und Thrombin war. Es ist bekannt, dass P-Selectin-Moleküle auf der Blutplättchenoberfläche in weniger als 2 Stunden aus dem Blutkreislauf entfernt werden können, was gleichzeitig zu einem Anstieg der löslichen P-Selectin-Konzentration führt (Michelson, Barnard et al. 1996). Es wurde durch mehrere Studien belegt, dass sP-Selektin zu dem Zeitpunkt anstieg, als Oberflächen-P-Selektin im klinischen Umfeld beispielweise während einer Operation unter Verwendung eines kardiopulmonalen Bypasses zu sinken begann (Ferroni, Pulcinelli et al. 1999, Gritters-van den Oever, Schoorl et al. 2009).

Die Beobachtung des P-Selectin-Verhaltens steht ebenfalls im Einklang mit den früheren Berichten über den P-Selectin-Ausstoß aus aktivierten Blutplättchen im Körperkreislauf (Ushiyama, Laue et al. 1993, Berger, Hartwell et al. 1998, Leytin, Allen et al. 2004).

Die Ergebnisse der In-vitro-Experimente zur Thrombozytenaktivierung legen nahe, dass P-Selectin-Moleküle auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten durch mechanische Kräfte leichter als lösliches P-Selectin abgespalten werden können, während sie nach der chemisch induzierten Aktivierung teilweise auf der Thrombozytenoberfläche noch verbleiben.

Die Reduktion von sP-Selektin unter der va. ECMO am Tag 6 könnte wiederum als Zeichen klinischer Verbesserung der Hämodynamik unter ECC bedeuten (Muthiah, Connor et al. 2016).

Wahrscheinlich weist lösliches P-Selectin nach der ECMO-Implantation nicht auf ein höheres Blutungs- oder Thromboembolierisiko hin und ist für Längsschnittmessungen nicht wirklich geeignet.

Der Mepacrin-Assay wurde in der Studie zusätzlich als Methode zur Überprüfung und Beurteilung des Vorhandenseins sowie der Sekretion dichter Granula verwendet. Man konnte damit eine signifikant verringerte Mepacrinfreisetzung als Reaktion auf die Thrombinstimulation bei Chandler-Loop-Proben im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachweisen (Cai, Mullier et al. 2016, Hidiatov, Gaupp et al. 2023). Da CD63 in δ -Granula enthalten ist und bei

Thrombozytenaktivierung an die Oberfläche verlagert wird, könnte eine Kombination aus erhöhter CD63-Basisexpression und einer verringerten Mepacrin-Freisetzung auf erworbene δ -Granula-Sekretionsdefekte hinweisen (Shen and Frenkel 2007). Dieses Phänomen könnte ein weiterer Faktor sein, der zu einem erhöhten Blutungsrisiko bei ECMO-Patienten beiträgt.

In der Studie von Ivar van Asten et al. wird zudem über einen hohen negativ prädiktiven Wert für den Mepacrin-Fluoreszenzassay berichtet, was noch einmal darauf hindeutet, dass Mepacrin-Methode zum Ausschluss von δ -SPD verwendet werden kann (van Asten, Blaauwgeers et al. 2020).

Die Mepacrinmethode weist aber dennoch mindestens zwei Nachteile auf: Das Experiment muss hierbei innerhalb von 6 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt werden und der Mepacrin-Test weist nur eine mäßige Sensitivität von 76 % und Spezifität von 83 % für den Nachweis eines Degranulationsdefektes von δ -Granula (van Asten, Blaauwgeers et al. 2020). Daher sollte dieser Assay nicht isoliert zur Diagnose von δ -SPD eingesetzt werden.

Wenn man sich den klinischen Daten wie Blutungen und Thrombosen zuwendet, erkennt man in beiden Gruppen (vv. und va. ECMO) eine Tendenz zu einem Zusammenhang zwischen Blutungen und einer verminderten Aktivierbarkeit von Thrombozyten. Auch die Blutungsereignisse nahmen von Tag 0 bis Tag 10 zu, mit einem Maximum am Tag 6, während die Häufigkeit von NR allerdings stabil blieb. Bezogen auf die Gesamtzahl der NR/LR in der jeweiligen ECMO-Kohorte und an dem jeweiligen Tag kommt es bei Patienten zu mehr Blutungsereignissen unter va. im Vergleich zu vv. ECMO. **(Abb. 14 A-D)**

Als eine mögliche Erklärung der vermehrten Blutungsereignissen allgemein unter ECMO, unabhängig von der Kanülierung (va. oder vv.), wäre die Thrombozytopenie zu erwähnen, die fast alle der ECLS-Patienten gemeinsam haben. Die Thrombozytopenie bei ECMO-Patienten steht im Einklang mit früheren Berichten und es wurde auch damals vermutet, dass sie zu Blutungskomplikationen zusätzlich beiträgt (Abrams, Baldwin et al. 2016,

Thomas, Kostousov et al. 2018). Zu den Ursachen einer Thrombozytopenie gehören die Grunderkrankung (z. B. Sepsis), die Aktivierung von Blutplättchen, Adhäsion und Verlust im extrakorporalen Kreislauf sowie Hämodilution (Malfertheiner, Philipp et al. 2016). Das Risiko schwerer Blutungen bei ECMO-Patienten, die nur an einer Thrombozytopenie leiden, kann durch die in unserer Studie dokumentierten Thrombozytenfunktionsstörung erheblich erhöht sein (Jiritano, Serraino et al. 2020, Hidiatov, Gaupp et al. 2023).

Interessanterweise zeigt eine Studie von Siegel et al, dass bei den meisten untersuchten Parametern der Thrombozytenfunktion auch nach der ECMO-Explantation Anzeichen einer Thrombozytendysfunktion teils weiterhin bestehen, was darauf hindeutet, dass die Thrombozyten nach der ECMO-Therapie noch einige Zeit in einem dysfunktionalen Zustand bleiben (Siegel, Chalupsky et al. 2022). Medizinisches Personal sollten sich darüber im Klaren sein, dass Patienten auch nach Absetzen der ECMO weiterhin ein erhebliches Blutungsrisiko tragen können.

Bezüglich der Thromboseereignisse gab es bei vv. ECMO maximal zwei Patienten in der NR/LR-Gruppe und keinen in der Responder-Gruppe, die eine klinisch manifeste Thrombose aufwiesen. **(Abb. 14 E, G)** In keiner der beiden ECMO-Gruppen kam es während des Zeitraums von 10 Tagen zu einem Anstieg thrombotischer Ereignisse. Insbesondere in der va. ECMO+NR/LR-Gruppe konnte ein leicht stetiger Anstieg thrombotischer Ereignisse beobachtet werden. **(Abb. 14 F, H)** Bei den Respondern war kein klares Zuwachsmuster an Thromboembolien erkennbar. Insgesamt weisen die va. ECMO-Patienten im Durchschnitt etwa 8 % mehr Thrombosen auf als die vv. ECMO-Patienten, was ebenfalls bereits zwei weitere Studien belegen konnten (Fuchs, Berg et al. 2018, Mansour, Roussel et al. 2020).

Unsere Studie ist auch nicht ohne Einschränkungen. Aufgrund des Beobachtungscharakters der Studie kann man keinen kausalen Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktionsstörung nach der ECMO-Explantation feststellen. Dies könnte durch die Hinzufügung eines Zeitpunkts nach ECMO-

Therapie untermauert worden sein, der in dieser Studie nicht berücksichtigt wurde. Darüber hinaus kann die Thrombozytenfunktion bei ECMO-Patienten durch eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst werden, darunter die Grunderkrankung, die Medikation und die Kanülierungsstrategie. Aufgrund der relativ geringen Stichprobengröße waren die Möglichkeiten einer multivariaten Analyse und einer Subgruppenanalyse jedoch begrenzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Blutplättchen von ECMO-Patienten eine schwere Funktionsstörung aufweisen, die bei Patienten zu Blutungskomplikationen und schlechtem Outcome führt.

Darüber hinaus wurde in beiden Untergruppen der Studienpopulation erstmals ein Defekt der Thrombozytensekretion detektiert. Das bedeutet, wir stellten sowohl bei Patienten mit va. als auch mit vv. ECMO eine stark verringerte Expression von CD62 und CD63 fest. Diese Pathologien stellen eine schwere Thrombozytenfunktionsstörung dar. Die Thrombozytendysfunktion führt zu einer erheblich beeinträchtigten Hämostase und kann teilweise die hohe Inzidenz spontaner Blutungen während der ECMO-Therapie erklären.

Durch die vorliegende Studie konnte gezeigt werden, dass Scherstress einen direkten Einfluss auf die Thrombozytendegranulation in mechanisch unterstützten Kreislaufsystemen aufweist. Die durch ECMO erzeugter nicht physiologischer Scherstress induziert Thrombozytenaktivierung und verursacht wiederum α -, δ - bzw. Lysosomen-Granula-Defekte in Thrombozyten. Das führt dann zu einer erhöhten Adhäsion an Fibrinogen, Kollagen und von Willebrand-Faktor (Chen, Zhang et al. 2020).

Außerdem deuten die obigen Daten daraufhin, dass Blutungen und Thrombosen bei ECMO multifaktoriell sind und dass in Zukunft weitere Studien erforderlich sind, um die genauen Mechanismen zur Vorbeugung und Behandlung von Blutungen und Thrombosen unter ECC-Systemen zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die extrakorporale Zirkulation wird häufig bei Intensivpatienten mit eingeschränkter Lungen- oder Herzfunktion eingesetzt. Obwohl ECC eine lebensrettende Therapieoption ist, ist dieses mit einem erhöhten Risiko für Blutungen und Thrombosen verbunden. Die Behandlung von Blutungen und thromboembolischen Ereignissen bei ECC-Patienten stellt immer noch eine Herausforderung dar, was teilweise auf den Mangel an Informationen über die pathophysiologischen Veränderungen der Hämostase und der Thrombozytenfunktion während des Eingriffs zurückzuführen ist. Mithilfe einer Kombination aus einem Ex-vivo-Modell für Scherspannung und einer empfindlichen und benutzerfreundlichen Labormethode ließ sich die Funktionsfähigkeit der Blutplättchen während der ECC analysieren.

Nach der Scherspannungssimulation in einem Ex-vivo-ECC-Modell mit geschlossenem Regelkreis konnte eine signifikant verringerte Reaktion von α -Granula nach Aktivierung mit ADP und TRAP-6 sowie eine deutlich verringerte CD63-Expression nach Aktivierung mit TRAP-6 nachgewiesen werden. Zudem war die Aufnahme von Mepacrin im Ex-vivo-Scherspannungsmodell ebenfalls deutlich reduziert.

Bei Patienten unter venovenöser und venoarterieller ECMO zeigte sich nach Stimulation mit ADP und TRAP-6 am Tag 1, 6 und 10 auch eine beeinträchtigte CD62P-Degranulation im Vergleich zu den gesunden Spenderproben. Es wurde jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Degranulation der Blutplättchen und dem Auftreten von Blutungen oder thromboembolischen Ereignissen beobachtet.

Der in der Arbeit verwendete Vollblut-Durchflusszytometrieassay mit sofortiger Fixierung sowie anschließender Lagerung bis zu 72 Stunden stellt eine sensitive und einfach anwendbare Methode zur Bestimmung des Thrombozytenaktivierungsstatus dar und die Daten bestätigen, dass erhöhte

Scherstressbedingungen unter ECC zu einer deutlich beeinträchtigten Degranulation der Thrombozyten führen können.

6 Literaturverzeichnis

Fachbücher:

1. Andreas Wersäll, Ewelina M. Golebiewska, and Alastair W. Poole, Seite 638; P. Gresele et al., "Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders"; Springer International Publishing AG 2017
2. Robert Flaumenhaft and Secil Koseoglu, "Platelet Contents", S. 133-153; H. Schulze, J. Italiano (eds.), "Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation"; Springer International Publishing Switzerland 2016.

Alphabetisch organisierter Paper-Verzeichnis

- Abrams, D., M. R. Baldwin, M. Champion, C. Agerstrand, A. Eisenberger, M. Bacchetta and D. Brodie (2016). "Thrombocytopenia and extracorporeal membrane oxygenation in adults with acute respiratory failure: a cohort study." *Intensive Care Med* **42**(5): 844-852.
- Althaus, K., A. Straub, H. Haberle, P. Rosenberger, O. Hidiatov, S. Hammer, S. Nowak-Harnau, S. Enkel, R. Riessen and T. Bakchoul (2020). "Heparin-induced thrombocytopenia: Diagnostic challenges in intensive care patients especially with extracorporeal circulation." *Thromb Res* **188**: 52-60.
- Amsterdam, E. A., N. K. Wenger, R. G. Brindis, D. E. Casey, Jr., T. G. Ganiats, D. R. Holmes, Jr., A. S. Jaffe, H. Jneid, R. F. Kelly, M. C. Kontos, G. N. Levine, P. R. Liebson, D. Mukherjee, E. D. Peterson, M. S. Sabatine, R. W. Smalling and S. J. Zieman (2014). "2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." *J Am Coll Cardiol* **64**(24): e139-e228.
- Andre, P., S. M. Delaney, T. LaRocca, D. Vincent, F. DeGuzman, M. Jurek, B. Koller, D. R. Phillips and P. B. Conley (2003). "P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries." *J Clin Invest* **112**(3): 398-406.
- Andres, O., K. Henning, G. Strauss, A. Pflug, G. Manukjan and H. Schulze (2018). "Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach." *Platelets* **29**(4): 347-356.
- Annich, G. M. (2015). "Extracorporeal life support: the precarious balance of hemostasis." *J Thromb Haemost* **13 Suppl 1**: S336-342.
- Anselmi, A., P. Guinet, V. G. Ruggieri, M. Aymami, B. Lelong, S. Granry, Y. Malledant, Y. Le Tulzo, P. Gueret, J. P. Verhoye and E. Flecher (2016). "Safety of recombinant factor VIIa in patients under extracorporeal membrane oxygenation." *Eur J Cardiothorac Surg* **49**(1): 78-84.
- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty and B. E. Levine (1967). "Acute respiratory distress in adults." *Lancet* **2**(7511): 319-323.
- Authors/Task Force, M., T. A. McDonagh, M. Metra, M. Adamo, R. S. Gardner, A. Baumbach, M. Bohm, H. Burri, J. Butler, J. Celutkiene, O. Chioncel, J. G. F. Cleland, M. G. Crespo-Leiro, D. Farmakis, M. Gilard, S. Heymans, A. W. Hoes, T. Jaarsma, E. A. Jankowska, M. Lainscak, C. S. P. Lam, A. R. Lyon, J. J. V. McMurray, A. Mebazaa, R. Mindham, C. Muneretto, M. Francesco Piepoli, S. Price, G. M. C. Rosano, F. Ruschitzka, A. K. Skibelund and E. S. C. S. D. Group (2024). "2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." *Eur J Heart Fail*.
- Bakchoul, T., A. Greinacher and T. E. Warkentin (2016). "Heparin-induced thrombocytopenia in 2017 and beyond." *Thromb Haemost* **116**(5): 781-782.

- Balle, C. M., A. N. Jeppesen, S. Christensen and A. M. Hvas (2018). "Platelet Function During Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients: A Systematic Review." Front Cardiovasc Med **5**: 157.
- Balle, C. M., A. N. Jeppesen, S. Christensen and A. M. Hvas (2019). "Platelet Function During Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients." Front Cardiovasc Med **6**: 114.
- Barrett, C. S., J. J. Jagers, E. F. Cook, D. A. Graham, V. V. Yarlagadda, S. A. Teele, C. S. Almond, S. L. Bratton, J. D. Seeger, H. J. Dalton, P. T. Rycus, P. C. Laussen and R. R. Thiagarajan (2013). "Pediatric ECMO outcomes: comparison of centrifugal versus roller blood pumps using propensity score matching." ASAIO J **59**(2): 145-151.
- Batchelor, R. J., A. Wheelahan, W. C. Zheng, D. Stub, Y. Yang and W. Chan (2022). "Impella versus Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Acute Myocardial Infarction Cardiogenic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis." J Clin Med **11**(14).
- Beguin, S., R. Kumar, I. Keularts, U. Seligsohn, B. S. Collier and H. C. Hemker (1999). "Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor." Blood **93**(2): 564-570.
- Bellani, G., C. Messa, L. Guerra, E. Spagnoli, G. Foti, N. Patroniti, R. Fumagalli, G. Musch, F. Fazio and A. Pesenti (2009). "Lungs of patients with acute respiratory distress syndrome show diffuse inflammation in normally aerated regions: a [18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose PET/CT study." Crit Care Med **37**(7): 2216-2222.
- Benenati, S., M. Toma, C. Canale, R. Vergallo, R. D. Bona, D. Ricci, M. Canepa, G. Crimi, F. Santini, P. Ameri and I. Porto (2022). "Mechanical circulatory support in patients with cardiogenic shock not secondary to cardiomyopathy: a network meta-analysis." Heart Fail Rev **27**(3): 927-934.
- Berger, G., D. W. Hartwell and D. D. Wagner (1998). "P-Selectin and platelet clearance." Blood **92**(11): 4446-4452.
- Bergmeier, W., A. K. Chauhan and D. D. Wagner (2008). "Glycoprotein Iba1 and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice." Thromb Haemost **99**(2): 264-270.
- Blair, P. and R. Flaumenhaft (2009). "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." Blood Rev **23**(4): 177-189.
- Boillard, E., P. A. Nigrovic, K. Larabee, G. F. Watts, J. S. Coblyn, M. E. Weinblatt, E. M. Massarotti, E. Remold-O'Donnell, R. W. Farndale, J. Ware and D. M. Lee (2010). "Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production." Science **327**(5965): 580-583.
- Brodie, D. and M. Bacchetta (2011). "Extracorporeal membrane oxygenation for ARDS in adults." N Engl J Med **365**(20): 1905-1914.
- Byrne, R. A., X. Rossello, J. J. Coughlan, E. Barbato, C. Berry, A. Chieffo, M. J. Claeys, G. A. Dan, M. R. Dweck, M. Galbraith, M. Gilard, L. Hinterbuchner, E. A. Jankowska, P. Juni, T. Kimura, V. Kunadian, M. Leosdottir, R. Lorusso, R. F. E. Pedretti, A. G. Rigopoulos, M. Rubini Gimenez, H. Thiele, P. Vranckx, S. Wassmann, N. K. Wenger, B. Ibanez and E. S. C. S. D. Group (2023). "2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes." Eur Heart J **44**(38): 3720-3826.
- Cai, H., F. Mullier, B. Frotscher, M. E. Briquel, M. Toussaint, F. Massin, T. Lecompte and V. Latger-Cannard (2016). "Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder." Semin Thromb Hemost **42**(3): 282-291.
- Canobbio, I., C. Balduini and M. Torti (2004). "Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex." Cell Signal **16**(12): 1329-1344.
- Cattaneo, M., C. Cerletti, P. Harrison, C. P. Hayward, D. Kenny, D. Nugent, P. Nurden, A. K. Rao, A. H. Schmaier, S. P. Watson, F. Lussana, M. T. Pugliano and A. D. Michelson (2013). "Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH." J Thromb Haemost.
- Chen, Y. S., J. W. Lin, H. Y. Yu, W. J. Ko, J. S. Jerng, W. T. Chang, W. J. Chen, S. C. Huang, N. H. Chi, C. H. Wang, L. C. Chen, P. R. Tsai, S. S. Wang, J. J. Hwang and F. Y. Lin (2008). "Cardiopulmonary resuscitation with assisted extracorporeal life-support versus conventional cardiopulmonary resuscitation in adults with in-hospital cardiac arrest: an observational study and propensity analysis." Lancet **372**(9638): 554-561.

- Chen, Z., N. K. Mondal, S. Zheng, S. C. Koenig, M. S. Slaughter, B. P. Griffith and Z. J. Wu (2019). "High shear induces platelet dysfunction leading to enhanced thrombotic propensity and diminished hemostatic capacity." Platelets **30**(1): 112-119.
- Chen, Z., J. Zhang, T. Li, D. Tran, B. P. Griffith and Z. J. Wu (2020). "The impact of shear stress on device-induced platelet hemostatic dysfunction relevant to thrombosis and bleeding in mechanically assisted circulation." Artif Organs **44**(5): E201-E213.
- Cheng, R., R. Hachamovitch, M. Kittleson, J. Patel, F. Arabia, J. Moriguchi, F. Esmailian and B. Azarbal (2014). "Complications of extracorporeal membrane oxygenation for treatment of cardiogenic shock and cardiac arrest: a meta-analysis of 1,866 adult patients." Ann Thorac Surg **97**(2): 610-616.
- Christensen, K., R. Larsson, H. Emanuelsson, G. Elgue and A. Larsson (2006). "Effects on blood compatibility in vitro by combining a direct P2Y₁₂ receptor inhibitor and heparin coating of stents." Platelets **17**(5): 318-327.
- Combes, A., P. Leprince, C. E. Luyt, N. Bonnet, J. L. Trouillet, P. Leger, A. Pavie and J. Chastre (2008). "Outcomes and long-term quality-of-life of patients supported by extracorporeal membrane oxygenation for refractory cardiogenic shock." Crit Care Med **36**(5): 1404-1411.
- Connolly-Andersen, A. M., E. Sundberg, C. Ahlm, J. Hultdin, M. Baudin, J. Larsson, E. Dunne, D. Kenny, T. L. Lindahl, S. Ramstrom and S. Nilsson (2015). "Increased Thrombopoiesis and Platelet Activation in Hantavirus-Infected Patients." J Infect Dis **212**(7): 1061-1069.
- Cosemans, J. M., B. F. Iserby, H. Deckmyn and J. W. Heemskerk (2008). "Multiple ways to switch platelet integrins on and off." J Thromb Haemost **6**(8): 1253-1261.
- Culp, W. C., T. R. Porter, T. C. McCowan, P. K. Roberson, C. A. James, W. J. Matchett and M. Moursi (2003). "Microbubble-augmented ultrasound declotting of thrombosed arteriovenous dialysis grafts in dogs." J Vasc Interv Radiol **14**(3): 343-347.
- De Candia, E., S. W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R. K. Andrews and R. De Cristofaro (2001). "Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets." J Biol Chem **276**(7): 4692-4698.
- Dean, G. E., H. Fishkes, P. J. Nelson and G. Rudnick (1984). "The hydrogen ion-pumping adenosine triphosphatase of platelet dense granule membrane. Differences from F1F0- and phosphoenzyme-type ATPases." J Biol Chem **259**(15): 9569-9574.
- Diehl, P., M. Aleker, T. Helbing, V. Sossong, F. Beyersdorf, M. Olschewski, C. Bode and M. Moser (2010). "Enhanced microparticles in ventricular assist device patients predict platelet, leukocyte and endothelial cell activation." Interact Cardiovasc Thorac Surg **11**(2): 133-137.
- Dorsam, R. T., M. Tuluc and S. P. Kunapuli (2004). "Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets." J Thromb Haemost **2**(5): 804-812.
- Dovlatova, N., M. Lordkipanidze, G. C. Lowe, B. Dawood, J. May, S. Heptinstall, S. P. Watson, S. C. Fox and U. G. S. Group (2014). "Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders." J Thromb Haemost **12**(5): 660-665.
- Dovlatova, N., J. A. May and S. C. Fox (2015). "Remote platelet function testing--Significant progress towards widespread testing in clinical practice." Platelets **26**(5): 399-401.
- Doyle, A. J. and B. J. Hunt (2018). "Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components." Front Med (Lausanne) **5**: 352.
- Fathi, M. (2018). "Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Identification and treatment pathways." Glob Cardiol Sci Pract **2018**(2): 15.
- Ferroni, P., F. Martini, S. Riondino, F. La Farina, A. Magnapera, F. Ciatti and F. Guadagni (2009). "Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation." Clin Chim Acta **399**(1-2): 88-91.
- Ferroni, P., F. M. Pulcinelli, L. Lenti and P. P. Gazzaniga (1999). "Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis?" Thromb Haemost **81**(3): 472-473.
- Figuerola Villalba, C. A., D. M. McMullan, R. C. Reed and W. L. Chandler (2022). "Thrombosis in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Circuits." ASAIO J **68**(8): 1083-1092.
- Fitch-Tewfik, J. L. and R. Flaumenhaft (2020). "Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH.013." "Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 77.
- Flaumenhaft, R. (2003). "Molecular basis of platelet granule secretion." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1152-1160.

- Foster, C. J., D. M. Prosser, J. M. Agans, Y. Zhai, M. D. Smith, J. E. Lachowicz, F. L. Zhang, E. Gustafson, F. J. Monsma, Jr., M. T. Wiekowski, S. J. Abbondanzo, D. N. Cook, M. L. Bayne, S. A. Lira and M. S. Chintala (2001). "Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs." *J Clin Invest* **107**(12): 1591-1598.
- Frelinger, A. L., 3rd, J. Rivera, D. E. Connor, K. Freson, A. Greinacher, P. Harrison, S. Kunishima, M. Lordkipanidze, A. D. Michelson, S. Ramstrom and P. Gresele (2021). "Consensus recommendations on flow cytometry for the assessment of inherited and acquired disorders of platelet number and function: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology." *J Thromb Haemost* **19**(12): 3193-3202.
- Frojmovic, M. M. and J. G. Milton (1982). "Human platelet size, shape, and related functions in health and disease." *Physiol Rev* **62**(1): 185-261.
- Fuchs, G., N. Berg, L. M. Broman and L. Prahil Wittberg (2018). "Flow-induced platelet activation in components of the extracorporeal membrane oxygenation circuit." *Sci Rep* **8**(1): 13985.
- Fukami, M. H., H. Holmsen and K. Ugurbil (1984). "Histamine uptake in pig platelets and isolated dense granules." *Biochem Pharmacol* **33**(23): 3869-3874.
- Gawaz, M. (2006). "Platelets in the onset of atherosclerosis." *Blood Cells Mol Dis* **36**(2): 206-210.
- Gawaz, M., H. Langer and A. E. May (2005). "Platelets in inflammation and atherogenesis." *J Clin Invest* **115**(12): 3378-3384.
- Geisen, U., K. Brehm, G. Trummer, M. Berchtold-Herz, C. Heilmann, F. Beyersdorf, J. Schelling, A. Schlagenhaut and B. Zieger (2018). "Platelet Secretion Defects and Acquired von Willebrand Syndrome in Patients With Ventricular Assist Devices." *J Am Heart Assoc* **7**(2).
- Gerrard, J. M., G. H. Rao and J. G. White (1977). "The influence of reserpine and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on serotonin storage organelles of blood platelets." *Am J Pathol* **87**(3): 633-646.
- Golebiewska, E. M. and A. W. Poole (2015). "Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond." *Blood Rev* **29**(3): 153-162.
- Gonzalez-Pacheco, H., D. Manzur-Sandoval, R. Gopar-Nieto, A. Alvarez-Sangabriel, C. Martinez-Sanchez, G. Eid-Lidt, A. Altamirano-Castillo, S. Mendoza-Garcia, J. L. Briseno-Cruz, F. Azar-Manzur, D. Araiza-Garaygordobil, D. Sierra-Lara, G. M. Jimenez-Rodriguez, E. A. Lazcano-Diaz, F. Baranda-Tovar, J. S. Valencia-Alvarez, M. A. Cutz-Ijchajchal, J. C. Penagos-Cordon, P. Morejon-Barragan and A. Arias-Mendoza (2021). "Cardiogenic Shock Among Patients with and without Acute Myocardial Infarction in a Latin American Country: A Single-Institution Study." *Glob Heart* **16**(1): 78.
- Granja, T., K. Hohenstein, P. Schussel, C. Fischer, T. Prufer, D. Schibilsky, H. P. Wendel, K. Jaschonek, L. Serna-Higueta, C. Schlensak, H. Haberle, P. Rosenberger and A. Straub (2020). "Multi-Modal Characterization of the Coagulopathy Associated With Extracorporeal Membrane Oxygenation." *Crit Care Med* **48**(5): e400-e408.
- Gresele, P., E. Falcinelli and L. Bury (2018). "Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders." *Int J Lab Hematol* **40** Suppl 1: 34-45.
- Gresele, P., T. Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on and Hemostasis (2015). "Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH." *J Thromb Haemost* **13**(2): 314-322.
- Grinstein, S. and W. Furuya (1983). "The electrochemical H⁺ gradient of platelet secretory alpha-granules. Contribution of a H⁺ pump and a Donnan potential." *J Biol Chem* **258**(12): 7876-7882.
- Grinstein, S., W. Furuya, J. Vander Meulen and R. G. Hancock (1983). "The total and free concentrations of Ca²⁺ and Mg²⁺ inside platelet secretory granules. Measurements employing a novel double null point technique." *J Biol Chem* **258**(24): 14774-14777.
- Grinstein, S., J. Vander Meulen and W. Furuya (1982). "Possible role of H⁺--alkali cation countertransport in secretory granule swelling during exocytosis." *FEBS Lett* **148**(1): 1-4.
- Gritters-van den Oever, M., M. Schoorl, M. Schoorl, P. C. Bartels, M. P. Grooteman and M. J. Nube (2009). "The role of the extracorporeal circuit in the trapping and degranulation of platelets." *Blood Purif* **28**(3): 253-259.
- Hajjar, L. A. and J. L. Teboul (2019). "Mechanical Circulatory Support Devices for Cardiogenic Shock: State of the Art." *Crit Care* **23**(1): 76.
- Harker, L. A., T. W. Malpass, H. E. Branson, E. A. Hessel, 2nd and S. J. Slichter (1980). "Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha-granule release." *Blood* **56**(5): 824-834.

- Harker, L. A. and J. L. Ritchie (1980). "The role of platelets in acute vascular events." Circulation **62**(6 Pt 2): V13-18.
- Harrison, P. and E. M. Cramer (1993). "Platelet alpha-granules." Blood Rev **7**(1): 52-62.
- Heemskerck, J. W., N. J. Mattheij and J. M. Cosemans (2013). "Platelet-based coagulation: different populations, different functions." J Thromb Haemost **11**(1): 2-16.
- Heilmann, C., U. Geisen, F. Beyersdorf, L. Nakamura, C. Benk, G. Trummer, M. Berchtold-Herz, C. Schlensak and B. Zieger (2012). "Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS)." Intensive Care Med **38**(1): 62-68.
- Hidiatov, O., A. Gaupp, I. Marini, L. Pelzi, M. Wagner, F. Rigoni, A. Witzemann, H. Haberle, P. Martus, K. C. Ngamsri, F. M. Konrad, P. Rosenberger, A. Straub, T. Bakchoul and K. Althaus (2023). "Characterization of Shear Stress Mediated Platelet Dysfunction: Data from an Ex Vivo Model for Extracorporeal Circulation and a Prospective Clinical Study." Thromb Haemost **123**(4): 415-426.
- Hidiatov, O., J. Zlamal, P. Aidery and T. Bakchoul (2020). "[Acquired immune thrombocytopenia: An update on aspects of diagnosis and management relevant for intensive care medicine]." Dtsch Med Wochenschr **145**(11): 747-753.
- Hochman, J. S., L. A. Sleeper, J. G. Webb, T. A. Sanborn, H. D. White, J. D. Talley, C. E. Buller, A. K. Jacobs, J. N. Slater, J. Col, S. M. McKinlay and T. H. LeJemtel (1999). "Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock." N Engl J Med **341**(9): 625-634.
- Hrachovinova, I., B. Cambien, A. Hafezi-Moghadam, J. Kappelmayer, R. T. Camphausen, A. Widom, L. Xia, H. H. Kazazian, Jr., R. G. Schaub, R. P. McEver and D. D. Wagner (2003). "Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A." Nat Med **9**(8): 1020-1025.
- Israels, S. J., E. M. McMillan-Ward, J. Easton, C. Robertson and A. McNicol (2001). "CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets." Thromb Haemost **85**(1): 134-141.
- Jiritano, F., G. F. Serraino, H. Ten Cate, D. Fina, M. Matteucci, P. Mastroberto and R. Lorusso (2020). "Platelets and extra-corporeal membrane oxygenation in adult patients: a systematic review and meta-analysis." Intensive Care Med **46**(6): 1154-1169.
- Johnston, G. I., E. B. Pickett, R. P. McEver and J. N. George (1987). "Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry." Blood **69**(5): 1401-1403.
- Jourdi, G., S. Ramstrom, R. Sharma, T. Bakchoul, M. Lordkipanidze and F.-P. i. T. s. group (2023). "Consensus report on flow cytometry for platelet function testing in thrombocytopenic patients: communication from the SSC of the ISTH." J Thromb Haemost **21**(10): 2941-2952.
- Kalbhenn, J., H. Glonnegger, M. Buchsel, H. J. Priebe and B. Zieger (2022). "Acquired von Willebrand Syndrome and Desmopressin Resistance During Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation in Patients With COVID-19: A Prospective Observational Study." Crit Care Med **50**(8): 1246-1255.
- Kalbhenn, J., A. Schlagenhauf, S. Rosenfelder, A. Schmutz and B. Zieger (2018). "Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery." J Heart Lung Transplant **37**(8): 985-991.
- Kalbhenn, J. and B. Zieger (2022). "Bleeding During Veno-Venous ECMO: Prevention and Treatment." Front Med (Lausanne) **9**: 879579.
- Khera, R., E. A. Secemsky, Y. Wang, N. R. Desai, H. M. Krumholz, T. M. Maddox, K. A. Shunk, S. S. Virani, D. L. Bhatt, J. Curtis and R. W. Yeh (2020). "Revascularization Practices and Outcomes in Patients With Multivessel Coronary Artery Disease Who Presented With Acute Myocardial Infarction and Cardiogenic Shock in the US, 2009-2018." JAMA Intern Med **180**(10): 1317-1327.
- King, S. M. and G. L. Reed (2002). "Development of platelet secretory granules." Semin Cell Dev Biol **13**(4): 293-302.
- Kocaturk, B. and H. H. Versteeg (2013). "Tissue factor-integrin interactions in cancer and thrombosis: every Jack has his Jill." J Thromb Haemost **11** Suppl 1: 285-293.
- Kolte, D., S. Khera, W. S. Aronow, M. Mujib, C. Palaniswamy, S. Sule, D. Jain, W. Gotsis, A. Ahmed, W. H. Frishman and G. C. Fonarow (2014). "Trends in incidence, management, and

- outcomes of cardiogenic shock complicating ST-elevation myocardial infarction in the United States." J Am Heart Assoc **3**(1): e000590.
- Koster, A., S. Huebler, E. Potapov, O. Meyer, M. Jurmann, Y. Weng, M. Pasic, T. Drews, H. Kuppe, M. Loebe and R. Hetzer (2007). "Impact of heparin-induced thrombocytopenia on outcome in patients with ventricular assist device support: single-institution experience in 358 consecutive patients." Ann Thorac Surg **83**(1): 72-76.
- Lemons, P. P., D. Chen, A. M. Bernstein, M. K. Bennett and S. W. Whiteheart (1997). "Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery." Blood **90**(4): 1490-1500.
- Leytin, V., D. J. Allen, A. Gwozdz, B. Garvey and J. Freedman (2004). "Role of platelet surface glycoprotein Ibalpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates." Transfusion **44**(10): 1487-1495.
- Li, Y., S. Yan, S. Gao, M. Liu, S. Lou, G. Liu, B. Ji and B. Gao (2019). "Effect of an intra-aortic balloon pump with venoarterial extracorporeal membrane oxygenation on mortality of patients with cardiogenic shock: a systematic review and meta-analysis." Eur J Cardiothorac Surg **55**(3): 395-404.
- Linden, M. D. (2013). "Platelet flow cytometry." Methods Mol Biol **992**: 241-262.
- Low, C. J. W., R. R. Ling, M. Lau, N. S. H. Liu, M. Tan, C. S. Tan, S. L. Lim, B. Rochweg, A. Combes, D. Brodie, K. Shekar, S. Price, G. MacLaren and K. Ramanathan (2024). "Mechanical circulatory support for cardiogenic shock: a network meta-analysis of randomized controlled trials and propensity score-matched studies." Intensive Care Med **50**(2): 209-221.
- Lukito, P., A. Wong, J. Jing, J. F. Arthur, S. F. Marasco, D. A. Murphy, P. J. Bergin, J. A. Shaw, M. Collecutt, R. K. Andrews, E. E. Gardiner and A. K. Davis (2016). "Mechanical circulatory support is associated with loss of platelet receptors glycoprotein Ibalpha and glycoprotein VI." J Thromb Haemost **14**(11): 2253-2260.
- Lusebrink, E., C. Scherer, L. Binzenhofer, S. Hoffmann, J. Hopler, A. Kellnar, M. Thienel, D. Jaskowiak, S. Peterss, T. Petzold, S. Deseive, R. Hein, S. Brunner, S. Kaab, D. Braun, H. Theiss, J. Hausleiter, C. Hagl, S. Massberg and M. Orban (2023). "Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Undergoing Venarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation." J Clin Med **12**(1).
- Machlus, K. R. and J. E. Italiano, Jr. (2013). "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation." J Cell Biol **201**(6): 785-796.
- Mackman, N. (2008). "Tissue-specific hemostasis: role of tissue factor." J Thromb Haemost **6**(2): 303-305.
- Mackman, N. (2008). "Triggers, targets and treatments for thrombosis." Nature **451**(7181): 914-918.
- Makdisi, G. and I. W. Wang (2015). "Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology." J Thorac Dis **7**(7): E166-176.
- Malfertheiner, M. V., A. Philipp, M. Lubnow, F. Zeman, T. B. Enger, T. Bein, D. Lunz, C. Schmid, T. Muller and K. Lehle (2016). "Hemostatic Changes During Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Prospective Randomized Clinical Trial Comparing Three Different Extracorporeal Membrane Oxygenation Systems." Crit Care Med **44**(4): 747-754.
- Mansour, A., M. Roussel, P. Gaussem, F. Nedelec-Gac, A. Pontis, E. Flecher, C. Bachelot-Loza and I. Gouin-Thibault (2020). "Platelet Functions During Extracorporeal Membrane Oxygenation. Platelet-Leukocyte Aggregates Analyzed by Flow Cytometry as a Promising Tool to Monitor Platelet Activation." J Clin Med **9**(8).
- Manukjan, G., J. Eilenberger, O. Andres, C. Schambeck, S. Eber and H. Schulze (2019). "Functional Classification of Paediatric Patients with Non-syndromic Delta-Storage Pool Deficiency." Hamostaseologie **39**(4): 383-391.
- Masiero, G., F. Cardaioli, G. Rodino and G. Tarantini (2022). "When to Achieve Complete Revascularization in Infarct-Related Cardiogenic Shock." J Clin Med **11**(11).
- Masliyah-Planchon, J., L. Darnige and S. Bellucci (2013). "Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update." Br J Haematol **160**(1): 5-11.
- McDonagh, T. A., M. Metra, M. Adamo, R. S. Gardner, A. Baumbach, M. Bohm, H. Burri, J. Butler, J. Celutkiene, O. Chioncel, J. G. F. Cleland, A. J. S. Coats, M. G. Crespo-Leiro, D. Farmakis, M. Gilard, S. Heymans, A. W. Hoes, T. Jaarsma, E. A. Jankowska, M. Lainscak, C. S. P. Lam, A. R. Lyon, J. J. V. McMurray, A. Mebazaa, R. Mindham, C. Muneretto, M. Francesco Piepoli, S. Price, G. M. C. Rosano, F. Ruschitzka, A. Kathrine Skibelund and E. S. C. S. D. Group (2021). "2021

- ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure." Eur Heart J **42**(36): 3599-3726.
- Mezzano, D., P. Harrison, A. L. Frelinger, 3rd, A. D. Mumford, P. Noris, M. Lordkipanidze and P. Gresele (2022). "Expert opinion on the use of platelet secretion assay for the diagnosis of inherited platelet function disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology." J Thromb Haemost **20**(9): 2127-2135.
- Michelson, A. D. (1996). "Flow cytometry: a clinical test of platelet function." Blood **87**(12): 4925-4936.
- Michelson, A. D., M. R. Barnard, H. B. Hechtman, H. MacGregor, R. J. Connolly, J. Loscalzo and C. R. Valeri (1996). "In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11877-11882.
- Mielck, F. and M. Quintel (2005). "Extracorporeal membrane oxygenation." Curr Opin Crit Care **11**(1): 87-93.
- Millar, J. E., J. P. Fanning, C. I. McDonald, D. F. McAuley and J. F. Fraser (2016). "The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology." Crit Care **20**(1): 387.
- Mirus, M., L. Heubner, J. Kalbhenn and P. M. Spieth (2023). "Hemostatic disorders associated with extracorporeal membrane oxygenation." Minerva Anesthesiol **89**(6): 586-596.
- Mouly, S., T. Youssefian, F. Souni, E. Cramer, F. Lefrere, B. Varet and O. Hermine (2000). "Acquired delta-storage pool deficiency associated with idiopathic myelofibrosis." Leuk Lymphoma **37**(5-6): 623-627.
- Mumford, A. D., A. L. Frelinger, 3rd, C. Gachet, P. Gresele, P. Noris, P. Harrison and D. Mezzano (2015). "A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders." Thromb Haemost **114**(1): 14-25.
- Munshi, L., A. Walkey, E. Goligher, T. Pham, E. M. Uleryk and E. Fan (2019). "Venovenous extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis." Lancet Respir Med **7**(2): 163-172.
- Murphy, D. A., L. E. Hockings, R. K. Andrews, C. Aubron, E. E. Gardiner, V. A. Pellegrino and A. K. Davis (2015). "Extracorporeal membrane oxygenation-hemostatic complications." Transfus Med Rev **29**(2): 90-101.
- Muslem, R., K. Caliskan and F. W. G. Leebeek (2018). "Acquired coagulopathy in patients with left ventricular assist devices." J Thromb Haemost **16**(3): 429-440.
- Muthiah, K., D. Connor, K. Ly, E. E. Gardiner, R. K. Andrews, J. Qiao, D. Rutgers, D. Robson, J. Low, S. Jarvis, P. Macdonald, K. Dhital, P. Jansz, J. Joseph and C. S. Hayward (2016). "Longitudinal changes in hemostatic parameters and reduced pulsatility contribute to non-surgical bleeding in patients with centrifugal continuous-flow left ventricular assist devices." J Heart Lung Transplant **35**(6): 743-751.
- Nayak, L. and A. H. Schmaier (2012). "A platelet acquired storage pool disorder associated with tamoxifen therapy." Case Rep Hematol **2012**: 948351.
- Ng, R. and Y. Yeghiazarians (2013). "Post myocardial infarction cardiogenic shock: a review of current therapies." J Intensive Care Med **28**(3): 151-165.
- Nicolas, D., S. Nicolas, A. Hodgens and M. Reed (2024). Heparin-Induced Thrombocytopenia. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Samar Nicolas declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Alexander Hodgens declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Mirembe Reed declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
- Nurden, A. T., K. Freson and U. Seligsohn (2012). "Inherited platelet disorders." Haemophilia **18 Suppl 4**: 154-160.
- Offermanns, S. (2006). "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors." Circ Res **99**(12): 1293-1304.
- Oliver, W. C. (2009). "Anticoagulation and coagulation management for ECMO." Semin Cardiothorac Vasc Anesth **13**(3): 154-175.
- Osman, M., M. Syed, S. Patibandla, S. Sulaiman, B. Kheiri, M. K. Shah, C. Bianco, S. Balla and B. Patel (2021). "Fifteen-Year Trends in Incidence of Cardiogenic Shock Hospitalization and In-Hospital Mortality in the United States." J Am Heart Assoc **10**(15): e021061.
- Ouweneel, D. M., E. Eriksen, K. D. Sjauw, I. M. van Dongen, A. Hirsch, E. J. Packer, M. M. Vis, J. J. Wykrzykowska, K. T. Koch, J. Baan, R. J. de Winter, J. J. Piek, W. K. Lagrand, B. A. de Mol,

- J. G. Tijssen and J. P. Henriques (2017). "Percutaneous Mechanical Circulatory Support Versus Intra-Aortic Balloon Pump in Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction." J Am Coll Cardiol **69**(3): 278-287.
- Palabrica, T., R. Lobb, B. C. Furie, M. Aronovitz, C. Benjamin, Y. M. Hsu, S. A. Sajer and B. Furie (1992). "Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets." Nature **359**(6398): 848-851.
- Panholzer, B., T. Bajorat, A. Haneya, D. Kowalski, D. Juhl, A. Rocke, M. Shneyder, P. Kuta, H. Clausnizer, R. Junker, A. Kowalski, A. Tulun, A. Al-Suraimi, J. Cremer, J. Kalbhenn, B. Zieger and U. Nowak-Gottl (2021). "Acquired von Willebrand syndrome in ECMO patients: A 3-year cohort study." Blood Cells Mol Dis **87**: 102526.
- Pareti, F. I., A. Capitanio, L. Mannucci, C. Ponticelli and P. M. Mannucci (1980). "Acquired dysfunction due to the circulation of "exhausted" platelets." Am J Med **69**(2): 235-240.
- Pasalic, L., G. J. Pennings, D. Connor, H. Campbell, L. Kritharides and V. M. Chen (2017). "Flow Cytometry Protocols for Assessment of Platelet Function in Whole Blood." Methods Mol Biol **1646**: 369-389.
- Peek, G. J., M. Mugford, R. Tiruvoipati, A. Wilson, E. Allen, M. M. Thalany, C. L. Hibbert, A. Truesdale, F. Clemens, N. Cooper, R. K. Firmin, D. Elbourne and C. t. collaboration (2009). "Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial." Lancet **374**(9698): 1351-1363.
- Puymirat, E., J. Y. Fagon, P. Aegerter, J. L. Diehl, A. Monnier, C. Hauw-Berlemont, F. Boissier, G. Chatellier, B. Guidet, N. Danchin, N. Aissaoui and R. College des Utilisateurs de Bases de donnees en (2017). "Cardiogenic shock in intensive care units: evolution of prevalence, patient profile, management and outcomes, 1997-2012." Eur J Heart Fail **19**(2): 192-200.
- Ranucci, M., A. Ballotta, H. Kandil, G. Isgro, C. Carlucci, E. Baryshnikova, V. Pistuddi, Surgical and G. Clinical Outcome Research (2011). "Bivalirudin-based versus conventional heparin anticoagulation for postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation." Crit Care **15**(6): R275.
- Rao, P., Z. Khalpey, R. Smith, D. Burkhoff and R. D. Kociol (2018). "Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Cardiogenic Shock and Cardiac Arrest." Circ Heart Fail **11**(9): e004905.
- Raposo, G., M. S. Marks and D. F. Cutler (2007). "Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation." Curr Opin Cell Biol **19**(4): 394-401.
- Repsold, L. and A. M. Joubert (2021). "Platelet Function, Role in Thrombosis, Inflammation, and Consequences in Chronic Myeloproliferative Disorders." Cells **10**(11).
- Ridker, P. M., J. E. Buring and N. Rifai (2001). "Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events." Circulation **103**(4): 491-495.
- Ritz-Timme, S., N. Eckelt, E. Schmidtke and H. Thomsen (1998). "Genesis and diagnostic value of leukocyte and platelet accumulations around "air bubbles" in blood after venous air embolism." Int J Legal Med **111**(1): 22-26.
- Rosado, J. A., E. M. Meijer, K. Hamulyak, I. Novakova, J. W. Heemskerk and S. O. Sage (2001). "Fibrinogen binding to the integrin alpha(IIB)beta(3) modulates store-mediated calcium entry in human platelets." Blood **97**(9): 2648-2656.
- Ruiz, F. A., C. R. Lea, E. Oldfield and R. Docampo (2004). "Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes." J Biol Chem **279**(43): 44250-44257.
- Sakashita, C., H. Akiyama, Y. Satoh, T. Inoue, K. Ohashi, S. Mori, H. Sakamaki, K. Hiruma, M. Endoh, N. Akamatsu and K. Tanoue (2001). "Acquired storage-pool disorders occurring late after allogeneic bone marrow transplantation: partial activation of platelets in asymptomatic patients." Int J Hematol **74**(2): 222-227.
- Samsky, M. D., D. A. Morrow, A. G. Proudfoot, J. S. Hochman, H. Thiele and S. V. Rao (2021). "Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction: A Review." JAMA **326**(18): 1840-1850.
- Sanivarapu, R. R., U. Osman and A. Latha Kumar (2023). "A Systematic Review of Mortality Rates Among Adult Acute Respiratory Distress Syndrome Patients Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation Therapy." Cureus **15**(8): e43590.
- Sarathy, S., J. W. Turek, J. Chu, A. Badheka, M. A. Nino and M. L. Raghavan (2021). "Flow Monitoring of ECMO Circuit for Detecting Oxygenator Obstructions." Ann Biomed Eng **49**(12): 3636-3646.

- Schlagenhauf, A., J. Kalbhenn, U. Geisen, F. Beyersdorf and B. Zieger (2020). "Acquired von Willebrand Syndrome and Platelet Function Defects during Extracorporeal Life Support (Mechanical Circulatory Support)." Hamostaseologie **40**(2): 221-225.
- Schmidt, M., M. Bailey, J. Sheldrake, C. Hodgson, C. Aubron, P. T. Rycus, C. Scheinkestel, D. J. Cooper, D. Brodie, V. Pellegrino, A. Combes and D. Pilcher (2014). "Predicting survival after extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory failure. The Respiratory Extracorporeal Membrane Oxygenation Survival Prediction (RESP) score." Am J Respir Crit Care Med **189**(11): 1374-1382.
- Sehgal, S. and B. Storrie (2007). "Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release." J Thromb Haemost **5**(10): 2009-2016.
- Sharda, A. and R. Flaumenhaft (2018). "The life cycle of platelet granules." F1000Res **7**: 236.
- Shattil, S. J., M. Cunningham and J. A. Hoxie (1987). "Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry." Blood **70**(1): 307-315.
- Shen, Y. M. and E. P. Frenkel (2007). "Acquired platelet dysfunction." Hematol Oncol Clin North Am **21**(4): 647-661, vi.
- Siegel, P. M., J. Chalupsky, C. B. Olivier, I. Bojti, J. S. Pooth, G. Trummer, C. Bode and P. Diehl (2022). "Early platelet dysfunction in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation is associated with mortality." J Thromb Thrombolysis **53**(3): 712-721.
- Sinn, S., T. Scheuermann, S. Deichelbohrer, G. Ziemer and H. P. Wendel (2011). "A novel in vitro model for preclinical testing of the hemocompatibility of intravascular stents according to ISO 10993-4." J Mater Sci Mater Med **22**(6): 1521-1528.
- Slee, J. B., I. S. Alferiev, R. J. Levy and S. J. Stachelek (2014). "The use of the ex vivo Chandler Loop Apparatus to assess the biocompatibility of modified polymeric blood conduits." J Vis Exp(90).
- Soslau, G., I. Brodsky, B. Putatunda, J. Parker and A. B. Schwartz (1990). "Selective reduction of serotonin storage and ATP release in chronic renal failure patients platelets." Am J Hematol **35**(3): 171-178.
- Soslau, G., A. B. Schwartz, B. Putatunda, J. D. Conroy, J. Parker, R. F. Abel and I. Brodsky (1990). "Desmopressin-induced improvement in bleeding times in chronic renal failure patients correlates with platelet serotonin uptake and ATP release." Am J Med Sci **300**(6): 372-379.
- Swieringa, F., M. J. Kuijpers, J. W. Heemskerk and P. E. van der Meijden (2014). "Targeting platelet receptor function in thrombus formation: the risk of bleeding." Blood Rev **28**(1): 9-21.
- Thiele, H., E. M. Ohman, S. de Waha-Thiele, U. Zeymer and S. Desch (2019). "Management of cardiogenic shock complicating myocardial infarction: an update 2019." Eur Heart J **40**(32): 2671-2683.
- Thiele, H., U. Zeymer, F. J. Neumann, M. Ferenc, H. G. Olbrich, J. Hausleiter, A. de Waha, G. Richardt, M. Hennersdorf, K. Empen, G. Fuernau, S. Desch, I. Eitel, R. Hambrecht, B. Lauer, M. Bohm, H. Ebelt, S. Schneider, K. Werdan, G. Schuler and I. I. t. i. Intraaortic Balloon Pump in cardiogenic shock (2013). "Intra-aortic balloon counterpulsation in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock (IABP-SHOCK II): final 12 month results of a randomised, open-label trial." Lancet **382**(9905): 1638-1645.
- Thomas, J., V. Kostousov and J. Teruya (2018). "Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation." Semin Thromb Hemost **44**(1): 20-29.
- Thorsen, T., H. Klausen, R. T. Lie and H. Holmsen (1993). "Bubble-induced aggregation of platelets: effects of gas species, proteins, and decompression." Undersea Hyperb Med **20**(2): 101-119.
- Tscharre, M., F. Wittmann, D. Kitzmantl, S. Lee, B. Eichelberger, P. P. Wadowski, G. Laufer, D. Wiedemann, B. Forstner-Bergauer, C. Ay, S. Panzer, D. Zimpfer and T. Gremmel (2022). "Platelet activation and aggregation in different centrifugal-flow left ventricular assist devices." Platelets **33**(2): 249-256.
- Tschoepe, D., P. Spangenberg, J. Esser, B. Schwippert, B. Kehrel, P. Roesen and F. A. Gries (1990). "Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets." Cytometry **11**(5): 652-656.
- Turner, N. A., J. L. Moake and L. V. McIntire (2001). "Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow." Blood **98**(12): 3340-3345.

- Unverzagt, S., M. Buerke, A. de Waha, J. Haerting, D. Pietzner, M. Seyfarth, H. Thiele, K. Werdan, U. Zeymer and R. Prondzinsky (2015). "Intra-aortic balloon pump counterpulsation (IABP) for myocardial infarction complicated by cardiogenic shock." Cochrane Database Syst Rev **2015**(3): CD007398.
- Upchurch, C., A. Blumenberg, D. Brodie, G. MacLaren, B. Zakhary and R. G. Hendrickson (2021). "Extracorporeal membrane oxygenation use in poisoning: a narrative review with clinical recommendations." Clin Toxicol (Phila) **59**(10): 877-887.
- Ushiyama, S., T. M. Laue, K. L. Moore, H. P. Erickson and R. P. McEver (1993). "Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin." J Biol Chem **268**(20): 15229-15237.
- van Asten, I., M. Blaauwgeers, L. Granneman, H. F. G. Heijnen, M. Kruip, E. A. M. Beckers, M. Coppens, J. Eikenboom, R. Y. J. Tamminga, G. Pasterkamp, A. Huisman, K. P. M. van Galen, S. J. A. Korporaal, R. E. G. Schutgens and R. T. Urbanus (2020). "Flow cytometric mepacrine fluorescence can be used for the exclusion of platelet dense granule deficiency." J Thromb Haemost **18**(3): 706-713.
- van der Meijden, P. E., M. A. Feijge, F. Swieringa, K. Gilio, R. Nergiz-Unal, K. Hamulyak and J. W. Heemskerk (2012). "Key role of integrin alpha(IIb)beta (3) signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation." Cell Mol Life Sci **69**(20): 3481-3492.
- van der Meijden, P. E., S. M. Schoenwaelder, M. A. Feijge, J. M. Cosemans, I. C. Munnix, R. Wetzker, R. Heller, S. P. Jackson and J. W. Heemskerk (2008). "Dual P2Y₁₂ receptor signaling in thrombin-stimulated platelets--involvement of phosphoinositide 3-kinase beta but not gamma isoform in Ca²⁺ mobilization and procoagulant activity." FEBS J **275**(2): 371-385.
- van der Zee, P. M., E. Biro, Y. Ko, R. J. de Winter, C. E. Hack, A. Sturk and R. Nieuwland (2006). "P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction." Clin Chem **52**(4): 657-664.
- van Diepen, S., J. N. Katz, N. M. Albert, T. D. Henry, A. K. Jacobs, N. K. Kapur, A. Kilic, V. Menon, E. M. Ohman, N. K. Sweitzer, H. Thiele, J. B. Washam, M. G. Cohen, C. American Heart Association Council on Clinical, C. Council on, N. Stroke, C. Council on Quality of, R. Outcomes and L. Mission (2017). "Contemporary Management of Cardiogenic Shock: A Scientific Statement From the American Heart Association." Circulation **136**(16): e232-e268.
- van Nispen tot Pannerden, H., F. de Haas, W. Geerts, G. Posthuma, S. van Dijk and H. F. Heijnen (2010). "The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes." Blood **116**(7): 1147-1156.
- van Oeveren, W., I. F. Tielliu and J. de Hart (2012). "Comparison of modified chandler, roller pump, and ball valve circulation models for in vitro testing in high blood flow conditions: application in thrombogenicity testing of different materials for vascular applications." Int J Biomater **2012**: 673163.
- Wagner, D. D. and P. C. Burger (2003). "Platelets in inflammation and thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): 2131-2137.
- Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **342**(18): 1334-1349.
- Warkentin, T. E. (2023). "Heparin-induced thrombocytopenia (and autoimmune heparin-induced thrombocytopenia): an illustrious review." Res Pract Thromb Haemost **7**(8): 102245.
- Warkentin, T. E., A. Greinacher and A. Koster (2009). "Heparin-induced thrombocytopenia in patients with ventricular assist devices: are new prevention strategies required?" Ann Thorac Surg **87**(5): 1633-1640.
- Washitani, Y., Y. Irita, K. Yamamoto, H. Shiraki, H. Kiyokawa, Y. Maeda and M. Yoshinari (1988). "Prevention of acquired defects in platelet function during blood processing." Transfusion **28**(6): 571-575.
- White, J. G. (2004). "Medich giant platelet disorder: a unique alpha granule deficiency I. Structural abnormalities." Platelets **15**(6): 345-353.
- White, J. G. and J. M. Gerrard (1978). "Recent advances in platelet structural physiology." Suppl Thromb Haemost **63**: 49-60.
- White, J. G., N. S. Key, R. A. King and G. M. Vercellotti (2005). "A 'touch' of the White platelet syndrome." Platelets **16**(6): 346-361.
- Whiteheart, S. W. (2011). "Platelet granules: surprise packages." Blood **118**(5): 1190-1191.

- Yokoyama, S., H. Ikeda, N. Haramaki, H. Yasukawa, T. Murohara and T. Imaizumi (2005). "Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates." J Am Coll Cardiol **45**(8): 1280-1286.
- Zampieri, F. G., P. V. Mendes, O. T. Ranzani, L. U. Taniguchi, L. C. Pontes Azevedo, E. L. Vieira Costa and M. Park (2013). "Extracorporeal membrane oxygenation for severe respiratory failure in adult patients: a systematic review and meta-analysis of current evidence." J Crit Care **28**(6): 998-1005.
- Zapol, W. M. and R. J. Kitz (1972). "Buying time with artificial lungs." N Engl J Med **286**(12): 657-658.
- Zeymer, U., H. Bueno, C. B. Granger, J. Hochman, K. Huber, M. Lettino, S. Price, F. Schiele, M. Tubaro, P. Vranckx, D. Zahger and H. Thiele (2020). "Acute Cardiovascular Care Association position statement for the diagnosis and treatment of patients with acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: A document of the Acute Cardiovascular Care Association of the European Society of Cardiology." Eur Heart J Acute Cardiovasc Care **9**(2): 183-197.
- Zhou, K., S. Niu, G. Bianchi, X. Wei, N. Garimella, B. P. Griffith and Z. J. Wu (2013). "Biocompatibility assessment of a long-term wearable artificial pump-lung in sheep." Artif Organs **37**(8): 678-688.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurde am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin durch Univ. Prof. Dr. Tamam Bakchoul betreut, in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin.

Die Konzeption der Studie und Versuche erfolgten unter der Anleitung von Herrn Univ. Prof. Dr. Tamam Bakchoul und Prof Dr. med. Andreas Straub.

Die klinischen Rohdaten (Erhebung der Blutungs-Scores, Dokumentation der thromboembolischen Ereignisse) wurde durch Frau Alisha Gaupp zur Verfügung gestellt.

Die Versuche wurden nach der Einarbeitung durch die Postdoktoranden Herrn Dr. med. Rabie Jouni und Frau Dr. rer. nat. Irene Marini (Herstellung von PRP, Plättchenaktivierungsversuche, Durchflusszytometriemessungen) von mir eigenständig durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Rabie Jouni und Frau Flaviana Rigoni erfolgte die Etablierung und Durchführung der Thromzytenfunktionstests (Plättchenaktivierungsassay). Das Chandler-Loop-Gerät wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. med. Andreas Straub zur Verfügung gestellt. Die statistische Auswertung erfolgte nach initialer Einweisung von Herrn Dr. med. Rabie Jouni und Frau PD. Dr. med. Karina Althaus sowie nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Martus eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau PD. Dr. med. Karina Althaus verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 31.05.2024

8 Veröffentlichungen

1. Althaus K, Pelzl L, **Hidiatov O**, Amiral J, Marini I, Bakchoul T. Evaluation of a flow cytometer-based functional assay using platelet-rich plasma in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res.* 2019 Aug;180:55-61. doi: 10.1016/j.thromres.2019.05.016. Epub 2019 May 31.
2. Althaus K, Straub A, Häberle H, Rosenberger P, **Hidiatov O**, Hammer S, Nowak-Harnau S, Enkel S, Riessen R, Bakchoul T. Heparin-induced thrombocytopenia: Diagnostic challenges in intensive care patients especially with extracorporeal circulation. *Thromb Res.* 2020 Apr;188:52-60. doi: 10.1016/j.thromres.2020.01.026. Epub 2020 Jan 29.
3. **Hidiatov O**, Zlamal J, Aidery P, Bakchoul T. [Acquired immune thrombocytopenia: An update on aspects of diagnosis and management relevant for intensive care medicine]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2020 Jun;145(11):747-753. doi: 10.1055/a-0962-6361. Epub 2020 Jun 3.
4. **Hidiatov O**, Gaupp A, Marini I, Pelzl L, Wagner M, Rigoni F, Witzemann A, Häberle H, Martus P, Ngamsri KC, Konrad FM, Rosenberger P, Straub A, Bakchoul T, Althaus K. Characterization of Shear Stress Mediated Platelet Dysfunction: Data from an Ex Vivo Model for Extracorporeal Circulation and a Prospective Clinical Study. *Thromb Haemost.* 2023 Apr;123(4):415-426. doi: 10.1055/a-1988-3174. Epub 2022 Nov 28.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Erstbetreuer bzw. meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tamam Bakchoul bedanken. Ich möchte einen Dank dafür aussprechen, dass er mir die wunderbare Welt der Forschung eröffnet und mich gelehrt hat, sich kritisch mit Forschungsergebnissen auseinandersetzen zu können. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, an diesem großen Projekt zu arbeiten und meine Daten auf verschiedenen Konferenzen bzw. Symposien vor großen Experten auf diesem Gebiet zu präsentieren. Ihre Ansätze haben mich dabei unterstützt, ein fortgeschrittenes Forschungsniveau zu erreichen. Diese Begeisterung wird mich weiterhin immer inspirieren.

Ich möchte mich ebenfalls bei den anderen Mitgliedern unseres Forschungslabors bedanken, insbesondere bei Frau Dr. rer. nat. Irene Marini und Herrn Dr. med. Rabi Jouni, die mich in die Labormethoden einführten sowie mich im Umgang mit dem FACS-Gerät vertraut machten. Sie zeigten mir immer wieder, wie es ist, auf einem hohen Niveau Wissenschaft zu betreiben.

Als nächstes möchte ich mich bei Flavianna Rigoni bedanken, die meine Arbeit vom ersten Tag an mit ihrer freundlichen Art, ihrer Warmherzigkeit und vor allem ihren technischen Fähigkeiten unterstützt hat.

Das gleiche gilt für meine Zweitbetreuerin, Frau PD. Dr. med. Karina Althaus, die mit ihrer umfassenden fachlichen Expertise und ihrer klinisch weitreichenden Kompetenz eine entscheidende Stütze für mich war. Sie begegnete mir bei diversen wissenschaftlichen Diskussionen immer auf der gleichen Augenhöhe und gab mir zahlreiche Tipps für meine zukünftige Forschungslaufbahn.

Meinen Dank möchte ich auch an meine großartigen Studienkollegen und leidenschaftlichen Forscher Jan Zlamal und Miriam Wagner richten. Durch Eure positive Art und Leichtigkeit sowie unsere gemeinsamen Kaffeepausen schienen sogar die harten Tage im Labor weniger anstrengend.

Darüber hinaus gebührt mein großer Dank dem Routinelabor- und dem HLA-Laborteam der Transfusionsmedizin Tübingen, insbesondere Franziska Lyshy

und Simone Weit. Beide boten freundlicherweise ihre Hilfe und Unterstützung an, wann immer sie gebraucht wurde.

Abschließend möchte ich meiner Familie und insbesondere der wichtigsten Person in meinem Leben danken, meiner Ehefrau Katharina. Sie hat mich in mehreren Phasen dieser Arbeit stets unterstützt und motiviert. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich gehabt und war gerade in stressigen Zeiten sehr geduldig mit mir. Sie hat mich stets ermutigt, weiter zu machen. Meine liebe Katja, ohne Dich und Deine endlose Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.