

Aus der Universitätsklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

In-vitro-Studie zur Blutkompatibilität von modifizierten Oberflächen kleinkalibriger

Gefäßprothesen aus bakterieller Nanocellulose

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Viktoria Kießwetter
aus Burg (bei Magdeburg)
Magdeburg, 2023

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Kießwetter, Viktoria:

In-vitro-Studie zur Blutkompatibilität von modifizierten Oberflächen kleinkalibriger
Gefäßprothesen aus bakterieller Nanocellulose
2023 - 62 Bl., 17 Abb., 6 Tab.

Kurzreferat: Um den steigenden Bedarf an schmalkalibrigen Gefäßprothesen mit klinisch sicher verwendbarer Blutkompatibilität zu decken, bedarf es weiterer Forschung. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Modifizierung der inneren Oberflächen von Prothesen aus bakterieller Nanocellulose (BNC) und deren Auswirkungen auf die Aktivierung der Immunabwehr, sowie das Gerinnungs- und Komplementsystem.

Versuchsgegenstand waren fünf verschiedene Prothesen, synthetisiert in einem Bioreaktor, die sich durch unterschiedliche Oberflächenrauigkeiten auszeichneten. Sie wurden unter körperähnlichen Bedingungen im Chandler-Loop Modell dem Erstkontakt mit menschlichem Blut ausgesetzt. Die Blutproben wurden anschließend im Hinblick auf verschiedene direkte und indirekte Marker der menschlichen Immunreaktion, Gerinnungs- und Komplementkaskade untersucht, sodass die einzelnen Prothesenmodifikationen hinsichtlich ihrer Blutkompatibilität untersucht werden konnten. Ein besonderer Blick lag dabei auf den verschiedenen Oberflächenrauigkeiten der Prothesen und ihrem Einfluss.

Schlüsselwörter: bakterielle Nanocellulose (BNC), schmalkalibrige Gefäßprothesen, Bypass-Chirurgie, Gefäßimplantat, Biomaterialien, Biokompatibilität, Tissue-Engineering

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	5
1 Einführung	6
1.1 Ausgangssituation.....	6
1.2 Der koronare Bypass.....	6
1.3 Bakterielle Nanocellulose als Material für schmalkalibrigen Gefäßersatz	8
1.4 Voruntersuchungen und daraus gezogene Konsequenzen für aktuelle Studie	10
2 Materialien und Methoden	14
2.1 Prothesen.....	14
2.2 Chandler-Loop-Modell.....	16
2.2.1 Aufbau der Loops.....	18
2.2.2 Probanden	18
2.3 Durchführung.....	19
2.3.1 Blutentnahme und Weiterverarbeitung.....	19
2.3.2 Analyseparameter	21
2.3.2 Blutzellzahlen.....	22
2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung	22
2.3.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	24
2.3.5 Zellfreie extrazelluläre DNA (cfDNA)	25
2.3.6 Bestimmung von TAT, C3a und sC5b9.....	26
2.4 Statistik	26
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Erklärung zum Eigenanteil der im Folgenden gezeigten Ergebnisse	27
3.2 Ergebnisse bezüglich der Zellzahlen	27
3.2.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung.....	31
3.3 Ergebnisse bezüglich der Immunantwort (cfDNA und ROS).....	33
3.4 Ergebnisse bezüglich der Gerinnungskaskade (TAT)	34
3.5 Ergebnisse bezüglich der Komplementkaskade (C3a und sC5b9)	35
4 Diskussion	37
4.1 Diskussion des Versuchsaufbaus	37
4.2 Diskussion der Zellzahlanalysen	38

4.3 Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Immunantwort	43
4.4 Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Gerinnungskaskade	46
4.5 Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Komplementkaskade	47
5 Fazit.....	50
6 Zusammenfassung.....	51
Literaturverzeichnis.....	52
Abkürzungsverzeichnis.....	61
Danksagung	62
Lebenslauf	63
Eidesstattliche Versicherung	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung koronararterieller Bypässe zur Überbrückung von Verschlüssen der Koronargefäße

Abbildung 2: Bionanocellulose-Prothese im Quer- und Längsschnitt

Abbildung 3: Oberflächenrauheit der sieben verwendeten Prothesen

Abbildung 4: Schematisches Modell eines zusammengebauten Loops mit 50-mm-Prothese

Abbildung 5: Chandler-Loop-Modell

Abbildung 6: Verteilung der Probandenblutproben auf die Messzeitpunkte

Abbildung 7: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Abbildung 8: Protokoll der ROS-Messungen

Abbildung 9: Erythrozytenzahlen nach 120 min bzw. 240 min

Abbildung 10: Thrombozytenzahlen nach 120 min und 240 min

Abbildung 11: Leukozytenzahlen nach 120 min und 240 min

Abbildung 12: Relative Häufigkeiten der Leukozytenuntergruppen nach 120 min und 240 min

Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen

Abbildung 14: Relative Konzentration an freier DNA nach 120 min und 240 min

Abbildung 15: Relative Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies nach 120 min und 240 min

Abbildung 16: Konzentration des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) nach 240 min

Abbildung 17: Konzentrationen von C3a und sC5b9 nach 240 min

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronologische Übersicht über die bisher durchgeführten Versuche

Tabelle 2: Modifikationen der neuen BNC-Prothesen

Tabelle 3: Darstellung der vier Modifikationen der BNC-Prothese

Tabelle 4: Übersicht über die Analyseparameter

Tabelle 5: Übersicht über die genutzten Antikörper

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten ELISA-Kits

1 Einführung

1.1 Ausgangssituation

Jährlich sterben laut World Health Organization (WHO) weltweit fast 18 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, die somit mit einem Anteil von über 30 % eine der häufigsten Todesursachen darstellen [1]. Neben cerebrovaskulären Erkrankungen, angeborenen Herzfehlern, Endokarditiden und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) gehört auch die koronare Herzerkrankung (KHK) zu den kardiovaskulären Erkrankungen. In Deutschland waren im Jahr 2019 35 % der Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zurückzuführen [2]. Da aktuell keine kausale Therapie der KHK existiert, stehen neben der Risikofaktorreduktion symptomatische Therapien zur Wiederherstellung des Blutflusses im Vordergrund. Trotz einer deutlichen Zunahme interventioneller Therapiemöglichkeiten und damit verbundener Stentimplantationen in den letzten Jahren [3] ist die koronare Bypassoperation bei komplexer KHK unumgänglich und stellt daher beim Patientenkollektiv mit fortgeschrittener KHK den Goldstandard dar [4]. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2019 annähernd 45 000 Bypassoperationen durchgeführt [5]. Aufgrund des demographischen Wandels ist mit einer Zunahme komplexer Fälle mit Indikation zur operativen Revaskularisation zu rechnen, womit der Anspruch an eine moderne Bypasschirurgie untermauert wird [6].

1.2 Der koronare Bypass

Beim koronararteriellen Bypass handelt es sich um eine symptomatische Therapie verschlossener oder verengter Koronargefäße. Ziel ist die Umgehung des betroffenen Gefäßabschnittes mithilfe eines anderen Gefäßes oder einer Gefäßprothese zur

Wiederherstellung des Blutflusses in die betroffenen Areale des Herzmuskels (siehe Abb. 1). Aktuell ist der Goldstandard für koronare Bypässe der autologe Gefäßersatz, insbesondere die Arteria mammaria interna oder die Vena saphena magna werden zumeist verwendet. Häufig besteht bei betroffenen Patienten jedoch das Problem, dass die autologen Gefäße aufgrund von Begleiterkrankungen in einem qualitativ schlechten Zustand sind, bereits für vorherige Operationen genutzt wurden oder ihre Verwendung für den Patienten Risiken birgt [7,8,9,10].

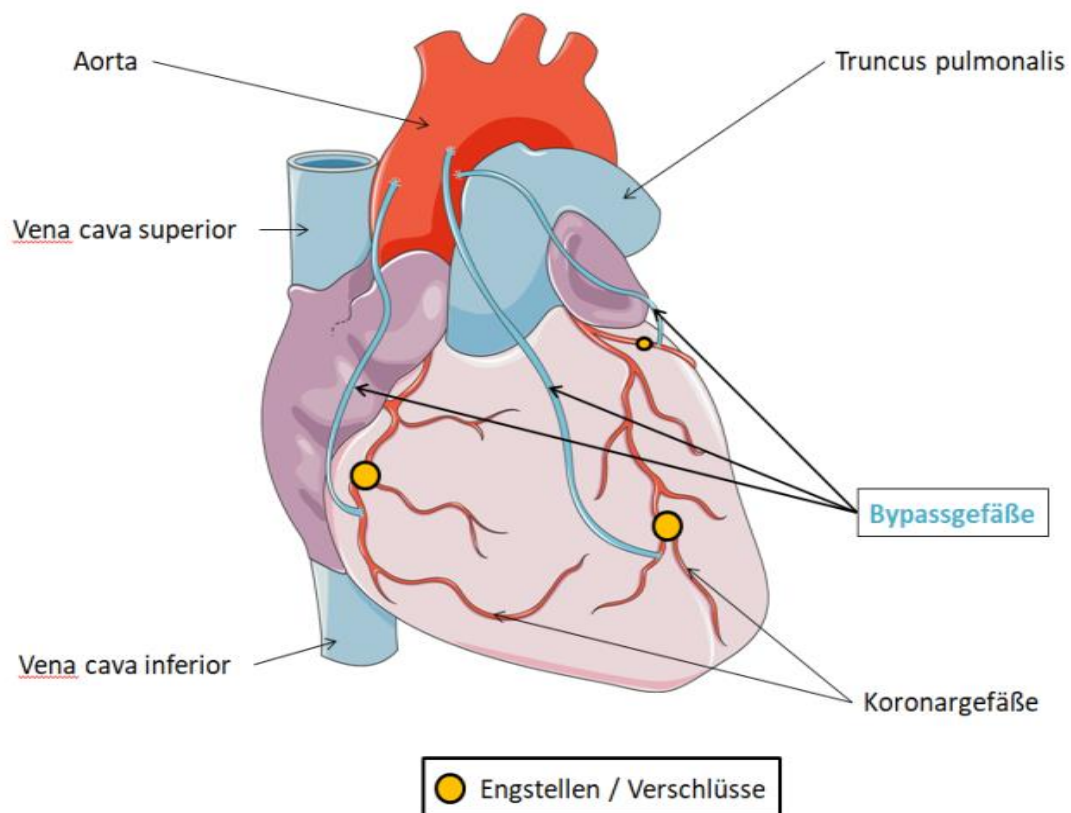


Abbildung 1: Schematische Darstellung koronararterieller Bypässe zur Überbrückung von Verschlüssen der Koronargefäße (Herzsymbol von <https://smart.servier.com>)

Daher wurde in den letzten Jahrzehnten mit synthetischen Prothesen experimentiert, um deren Eigenschaften zu verbessern und diese autologen Gefäßen anzunähern [11]. Als Grundmaterial haben sich die Kunststoffe ‚expandiertes Polytetrafluorethylen‘ (ePTFE, Gore-Tex®) und ‚Polyethylenterephthalat‘ (DAC, Dacron®) bewährt. Sie lösen nur geringe Immunreaktionen aus und werden nicht von körpereigenen Enzymen abgebaut [12,13]. Während der großlumige Gefäßersatz mit diesen Prothesen im Bereich der Aorten Chirurgie mittlerweile Standard ist, konnten sie sich bei kleineren Gefäßdurchmessern (< 5 mm) bisher nicht durchsetzen. Grund dafür sind die, in vielen Studien beobachtete, hohe Thrombogenität, die Fibrosierung und die Intimahyperplasie bei Durchmessern im Bereich derer von Koronargefäßen [14,15,16,17,18].

1.3 Bakterielle Nanocellulose als Material für schmalkalibrigen Gefäßersatz

Es existieren diverse Forschungsansätze, um schmalkalibrige Gefäßprothesen mit verbesserten In-vivo-Eigenschaften zu produzieren. Dabei kann zwischen zellulären und azellulären Prothesen unterschieden werden: Unter zellulären Prothesen ist ein Gefäßersatz zu verstehen, der bei der Implantation bereits eine teilweise oder vollständige Zellbesiedlung aufweist. Geforscht wird zum Beispiel an der Aufbereitung von Umbilikalvenen oder der In-vitro-Anzucht biologischer Gefäße aus autologen Zellen [19,20,21]. Azelluläre Prothesen hingegen fungieren als Gerüst, das nach Implantation eine In-vivo-Zellbesiedlung, entsprechend der physiologischen Dreischichtung des Gefäßendothels aus Intima, Media und Adventitia, ermöglicht und bestenfalls beschleunigt. Vorteilhaft ist bei dieser Methode die schnellere und breitere Verfügbarkeit der Prothesen durch einfachere Herstellung und Lagerung. Bereits verwendete azelluläre, synthetische Gefäßprothesen für große

Durchmesser sind die bereits genannten Kunststoffe ePTFE und DAC. Für kleine Durchmesser wird beispielsweise bakterielle Nanocellulose (BNC), ein biologischer, azellulärer Ansatz, als vielversprechend angesehen [22,23].

Bakterielle Nanocellulose ist bereits seit über 100 Jahren bekannt [15,24,25] Sie wird vom gramnegativen Bakterium *Gluconacetobacter xylinus* extrazellulär in einem Kulturmedium gebildet. Für die medizinische Forschung weist die Synthese durch Bakterien folgende vorteilhafte Eigenschaften auf:

- hohe Bio- und Blutkompatibilität, da keine zusätzlichen biogenen Substanzen, wie Hemicellulose, Lignin oder Pectin enthalten sind, auf die der menschliche Körper mit Inflammation und Abstoßung reagieren könnte [24,26]
- hohe Kristallinität von 80 bis 90 % und eine ultrafeine Netzwerkstruktur mit einem Hundertstel des normalen Faserdurchmessers, was eine enorme Zugfestigkeit bis in Bereiche der Zugfestigkeit von Stahl oder Kevlar gewährleistet [15]
- hoher Polymerisationsgrad, mit Wiederholungen von mehr als 2000 bis 10 000 Einheiten [25]
- Wasserspeicherkapazität, die etwa hundertfach höher ist als die von normaler Cellulose [13]
- individuelle Formbarkeit, entsprechend dem Nutzen, und Beibehaltung dieser Form in vivo [15]
- keine Zersetzung in vivo, da dem Menschen das Enzym Cellulase fehlt [27]

Aufgrund dieser Eigenschaften ist BNC in der Medizin schon weit verbreitet. Es gibt Forschungsansätze zur Verbesserung der Nervenregeneration, zu Knochen- und Knorpeltransplantaten, zu Kontaktlinsen sowie zu Zahn- und Gefäßersatz [15,25,28].

Im medizinischen Alltag werden Cellulose-Patches bereits bei Verbrennungen und Wundheilungsstörungen verwendet [15].

Die ideale Gefäßprothese muss ausreichende mechanische Stabilität, ein geringes Verschlussrisiko durch wenig Intimahyperplasie sowie eine physiologische Endothelauskleidung nach Implantation gewährleisten [29]. Wünschenswert für eine schmalkalibrige Gefäßprothese wäre zusätzlich eine Oberfläche mit geringer Thrombogenität und Immunaktivierung, um frühzeitige Okklusionen zu vermeiden [29]. Bezüglich dieser Oberflächeneigenschaften besteht weiterer Untersuchungsbedarf.










1.4 Voruntersuchungen und daraus gezogene Konsequenzen für aktuelle Studie

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jens Wippermann forscht seit mehreren Jahren zu schmalkalibrigen Prothesen aus bakterieller Nanocellulose. Es wurden bereits Klein- und Großtierexperimente durchgeführt, um die Prothesen unterschiedlichen Drucksystemen auszusetzen. Weiterhin wurden der Einfluss dualer Thrombozytenhemmung nach Implantation untersucht [13,23,30,31,32]. Die Entwicklung ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Dazu wurden im Verlauf die BNC-Prothesen von anfangs 0.5 mm auf klinisch relevante Längen von 10 cm verlängert und ihre Wanddicke wurde angepasst (siehe Abb. 2).



Abbildung 2: Bionanocellulose-Prothese im Quer- und Längsschnitt

Tabelle 1: Chronologische Übersicht über die bisher durchgeführten Versuche. Dargestellt sind die jeweiligen Versuchstiere (Kapseln markieren die Einnahme der doppelten Thrombozytenaggregation mit Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel), die Maße der verwendeten Prothesen, die Offenheitsraten zum Versuchsende und die Versuchsdauer (mm: Millimeter; cm: Zentimeter; Tiersymbole von <https://smart.servier.com>)

	Versuchstierzahl (Implantation in Arteria carotis)	Wanddicke / Durchmesser	Länge (in cm)	Offenheitsraten (am Versuchsende)	Zeitraum
1	20 x 	0,7 mm / 1 mm	0,4 – 0,6	100 %	1 Monat
2	5 x 	0,7 mm / 1-3 mm	0,5	100 %	1 Jahr
3	8 x 	0,6 – 1 mm / 3 – 3,7 mm	1	87,5 %	3 Monate
4	10 x 	2 – 3,5 mm / 3 - 4 mm	10	50 %	3 Monate
5	9 x 	1 – 2,5 mm / 4-5 mm	10	0 %	9 Monate
	9 x  	1 – 2,5 mm / 4-5 mm	10	67 %	9 Monate
6	5 x  	1 – 2,5 mm / 4-5 mm <i>modifiziert</i>	10	80 %	9 Monate

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in den bisherigen Versuchen der Arbeitsgruppe die Offenheitsrate noch nicht auf ein klinisch akzeptables Maß von > 90 % nach zwölf Monaten erhöht werden konnte. Lediglich erste Orientierungsstudien in Ratten mit klinisch nicht relevanten Längen und Durchmessern zeigten eine 100%ige Offenheitsrate, was die Eignung des Materials BNC bestätigt. In folgenden Tierversuchen in Schweinen oder Schafen mit Prothesen mit klinisch relevanten Dimensionen konnte dies noch nicht bestätigt werden. Generell haben sich in der Forschung zu schmalkalibrigen Gefäßprothesen wiederkehrende Mechanismen gezeigt, die häufig zu Transplantatversagen führen: eine hohe Thrombogenität der Prothesenmaterialien, eine überschießende

Proliferation der Neointima mit Einengung des Gefäßlumens und eine immunvermittelte Abstoßung der Prothese [33,34].

Da der initiale Kontakt zwischen Prothese und Blut direkt nach der Implantation von azellulären Prothesen unvermeidbar ist, stellt die Reduktion der thrombogenen und inflammatorischen Prozesse einen Schlüsselfaktor für die folgende In-vivo-Besiedlung mit körpereigenen Zellen und letztlich für die Langzeitoffenheit dar. Um zufriedenstellende Ergebnisse mit BNC-Prothesen relevanter Größe erreichen zu können, müssen zuerst grundlegende Daten zur Thrombogenität und Immunaktivierung der verwendeten Prothesen erhoben werden. Es ist bekannt, dass BNC zu einer Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskade führt [22]. Unklar ist jedoch, ob sich diese Aktivierung durch eine oberflächenveränderte Prothese reduzieren lässt. Aus der Literatur ist bekannt, dass glattere Oberflächen in schmalkalibrigen Gefäßen zu einer reduzierten Thrombogenität führen [35] [36]. Da die Oberflächenbeschaffenheit bzw. -rauheit entscheidend für die Thrombogenität einer Prothese zu sein scheint, wurde die Aufmerksamkeit in dieser In-vitro-Studie auf die Reaktion des Blutes in den ersten Stunden nach Kontakt mit den Prothesenoberflächen gelegt. Es wurden BNC-Oberflächenprofile verschiedener Strukturen und Rauheiten (siehe Kap. 2.1) mit bekannten synthetischen Prothesen (ePTFE und DAC) verglichen. Der Versuchsaufbau wurde mithilfe der Empfehlungen und Hinweise der DIN ISO 10993-4 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 4: Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut), in der die Bioblutkompatibilität von medizinischen Materialien festgelegt ist, konzipiert [37,38]. Die Grundlage bildete ein modifiziertes Chandler-Loop-Modell, wie von Fink et al. [22] beschrieben (siehe Kap. 2.2). Dieses ermöglicht es, die Interaktion von tubulären Prothesen und Blut unter körperähnlichen Bedingungen zu analysieren. Rotationsgeschwindigkeit, Temperatur und Versuchsdauer können manuell

gesteuert werden. In der hiesigen Studie wurde das Blut hinsichtlich folgender Punkte analysiert:

- Veränderung der Zellzahlen des Blutes
- Aktivierung und Anhaftung der Blutzellen
- ausgewählte Mechanismen der Immunreaktion
- Aktivierung der Gerinnungskaskade
- Aktivierung der Komplementkaskade

Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit lautet: Kann die Blutkompatibilität schmalkalibriger BNC-Prothesen durch die Modifizierung der Oberflächenstruktur verbessert werden?

Diesbezüglich wurden im Vorfeld folgende Untersuchungshypothesen aufgestellt:

- 1) BNC-Prothesen mit glatten Oberflächen führen zu einer geringeren Adhäsion von Zellen des peripheren Blutes als raue Oberflächen.
- 2) BNC-Prothesen mit glatten Oberflächen führen zu einer geringeren Aktivierung der Leukozyten und damit auch der immunologischen Abwehrmechanismen als raue Oberflächen.
- 3) BNC-Prothesen mit glatten Oberflächen führen zu einer geringeren Aktivierung der Gerinnungskaskade als raue Oberflächen.
- 4) BNC-Prothesen mit glatten Oberflächen führen zu einer geringeren Aktivierung der Komplementkaskade als raue Oberflächen.

2 Materialien und Methoden

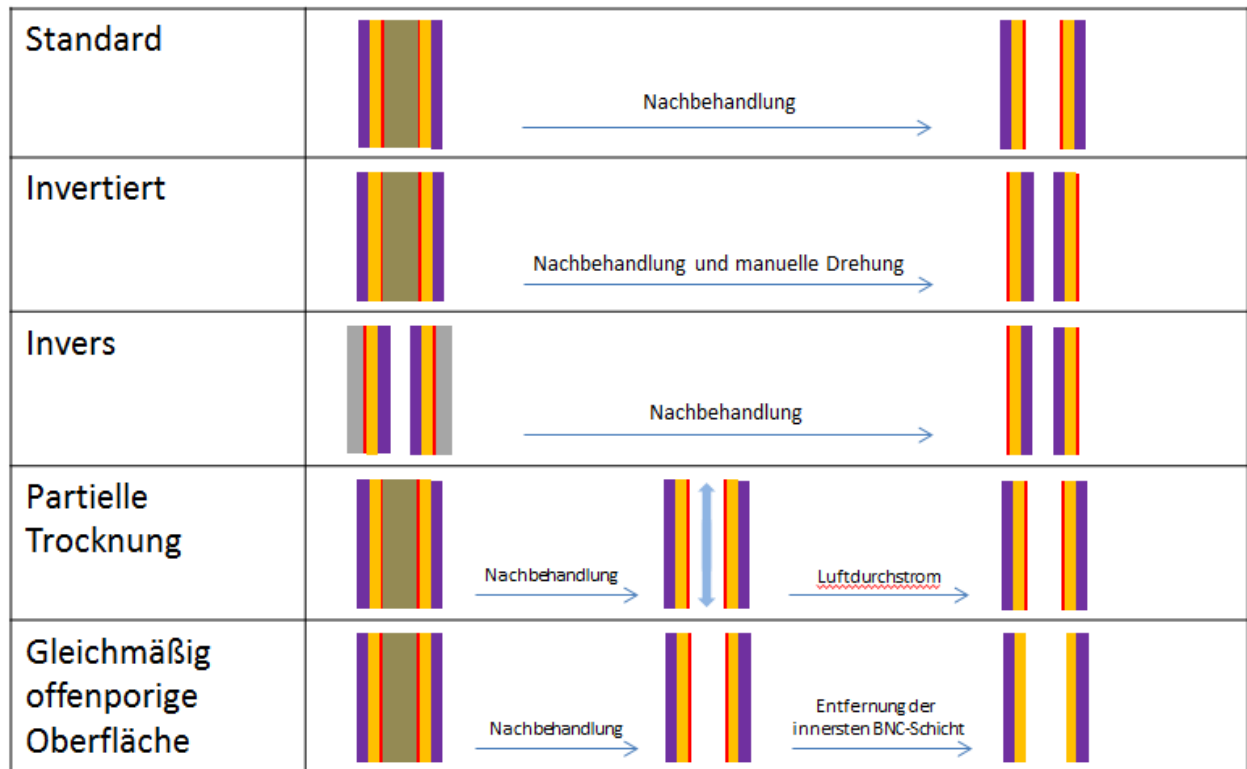
2.1 Prothesen






Die verwendeten BNC-Transplantate wurden mittels der Matrix Mobile Reservoir Technology von KKF Polymers in Jena hergestellt [39]. Die BNC-Bildung erfolgt entlang einer strukturgebenden Formvorlage (Template), wobei die BNC-Oberflächen mithilfe verschiedenartiger Templates und Nachbearbeitungsverfahren modifiziert wurden. Es entstanden vier neuartige Oberflächen (siehe Tabelle 2 und 3), die zusätzlich zu der ursprünglichen Prothese (STD, Standard) aus den Vorversuchen untersucht wurden.

Tabelle 2: Modifikationen der neuen BNC-Prothesen [39].

Invertieren (INV)	- Die Prothese wurde manuell gedreht, sodass die zuvor außenliegende Oberfläche nun zum Lumen zeigt.
Invers (GLAS)	- Die Prothese wurde an der Innenseite eines Glasröhrchens gebildet. Die luminale Oberfläche hatte nie Kontakt zum Gerüst.
partielle Trocknung (PT)	- Nach dem Entstehungsprozess wurde ein Luftstrom durch die Prothese geleitet, um die luminale Seite anzutrocknen.
gleichmäßig offenporige Oberfläche (GOO)	- Die innerste Schicht der Prothese wurde herausgelöst und verworfen.

Tabelle 3: Darstellung der vier Modifikationen der BNC-Prothese im Vergleich zum ursprünglichen (Standard-) Modell. ‚Nachbehandlung‘ bezeichnet den üblichen Reinigungs- und Sterilisationsprozess bei der Herstellung von BNC-Prothesen [39]. Mit freundlicher Genehmigung vom Verlag PLOS, nach Wacker et. al [40] bearbeitet.



Legende:  Bambus-Template  Glas-Röhrchen  Innerste BNC-Schicht  Innere BNC-Schichten  Äußere BNC-Schichten

Alle verwendeten Prothesen wurden vor Versuchsbeginn mit einem Konfokalmikroskop untersucht, um ihre Oberflächen darzustellen (siehe Abbildung 3) und die Rauheit (Rautiefe, R_z) zu messen. Die mittlere Rautiefe R_z wurde abweichend von der allgemeinen Definition über neun statt fünf Einzelmessstrecken ermittelt [41]. Alle Prothesen wiesen mit einer Länge von 50.0 mm, einem Durchmesser von 5.0 mm und einer Wandstärke von 1.0 mm einheitliche Maße auf. Die synthetischen Prothesen, DAC und ePTFE, wurden ebenfalls mit einer Länge von 50.0 mm und einem Durchmesser von 5.0 mm verwendet.

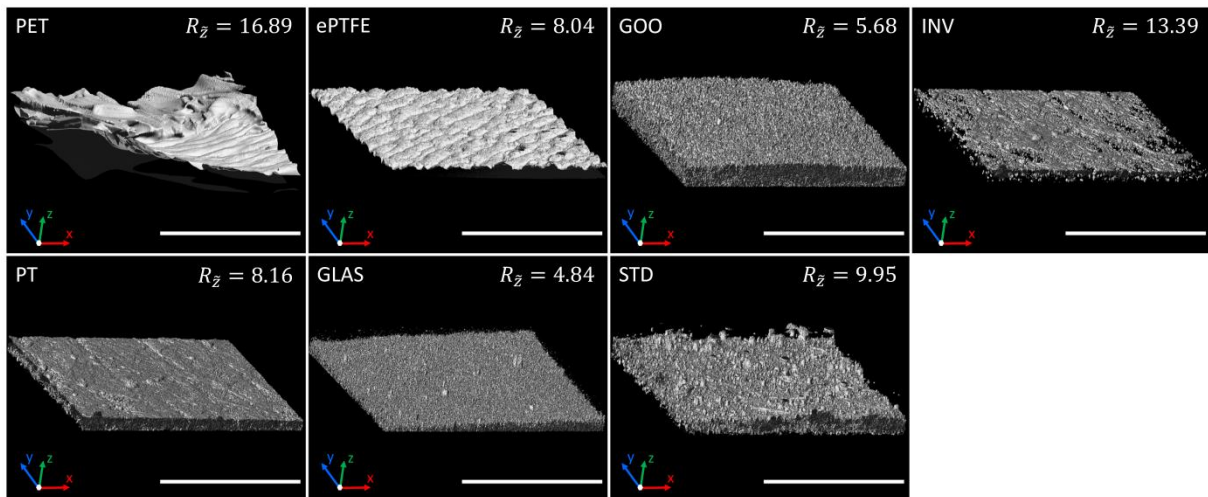


Abbildung 3: Oberflächenrauheit der sieben verwendeten Prothesen. Maßstabsleiste entspricht 200 µm. Mit freundlicher Genehmigung vom Verlag PLOS, nach Wacker et. al [40].

2.2 Chandler-Loop-Modell

Das Chandler-Loop-Modell (ebo kunze / industriedesign, Neuffen, Deutschland) ist ein System zur In-vitro-Testung der Blutkompatibilität, mit dem Wechselwirkungen zwischen Blut und tubulären Gefäßimplantaten untersucht werden können. Mit dem Ziel, den Prozess der Thrombusbildung zu untersuchen, entwickelte A. B. Chandler in den 1950er Jahren dieses Rotationsmodell [42]. Es besteht aus einem wärmeregulierbaren Wasserbad und einer rotierenden Halterung für Schläuche, die über Konnektoren zu Ringen (Loops) verbunden wurden (siehe Abb. 4 und 5). Für die Untersuchung der Biokompatibilität der Prothesen wurde das Wasserbad auf 37.0 °C erwärmt und die Rotationsgeschwindigkeit auf 30 U/min eingestellt. Dies führt zu einem Blutfluss mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 25 cm/s, was mit der Blutflussgeschwindigkeit in koronararteriellen Bypässen vergleichbar ist [43]. Unter gleichmäßiger Rotation kam das Blut mit der gesamten Oberfläche der Loops in Kontakt.

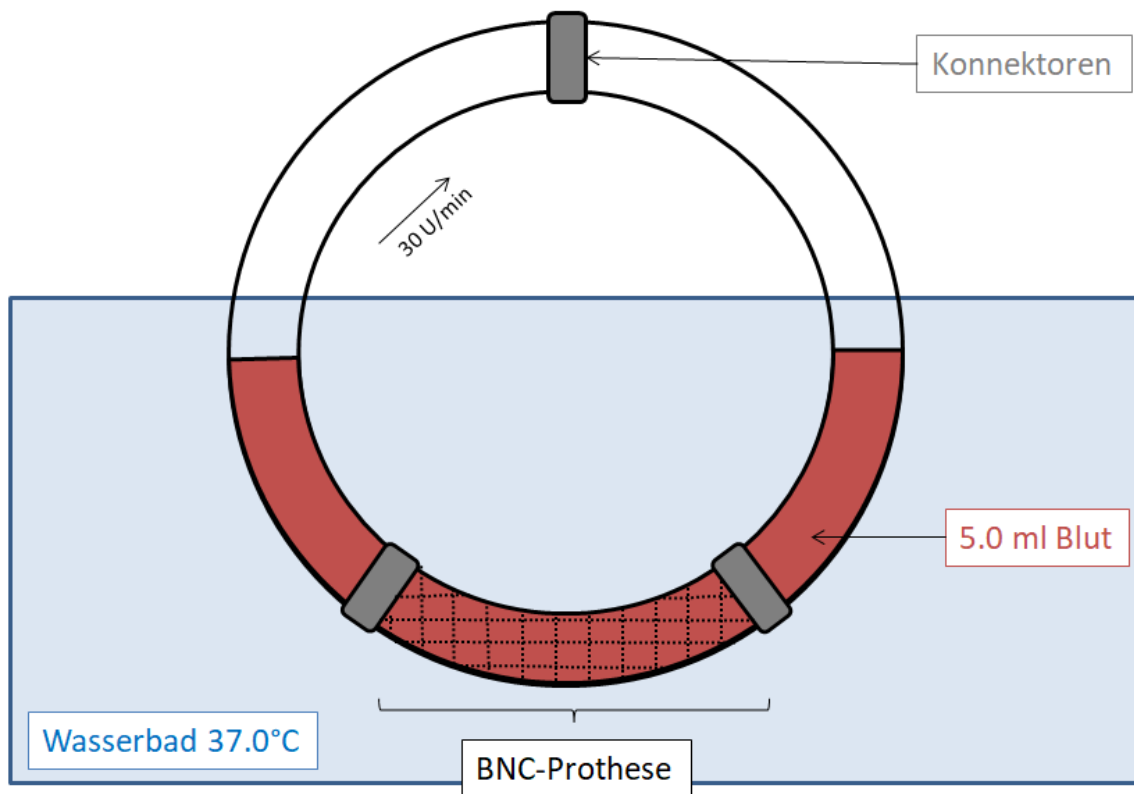


Abbildung 4: Schematisches Modell eines zusammengebauten Loops mit 50-mm-Prothese (U/min: Umdrehung pro Minute; ml: Milliliter; °C: Grad Celsius; BNC: bakterielle Nanocellulose; mm: Millimeter)

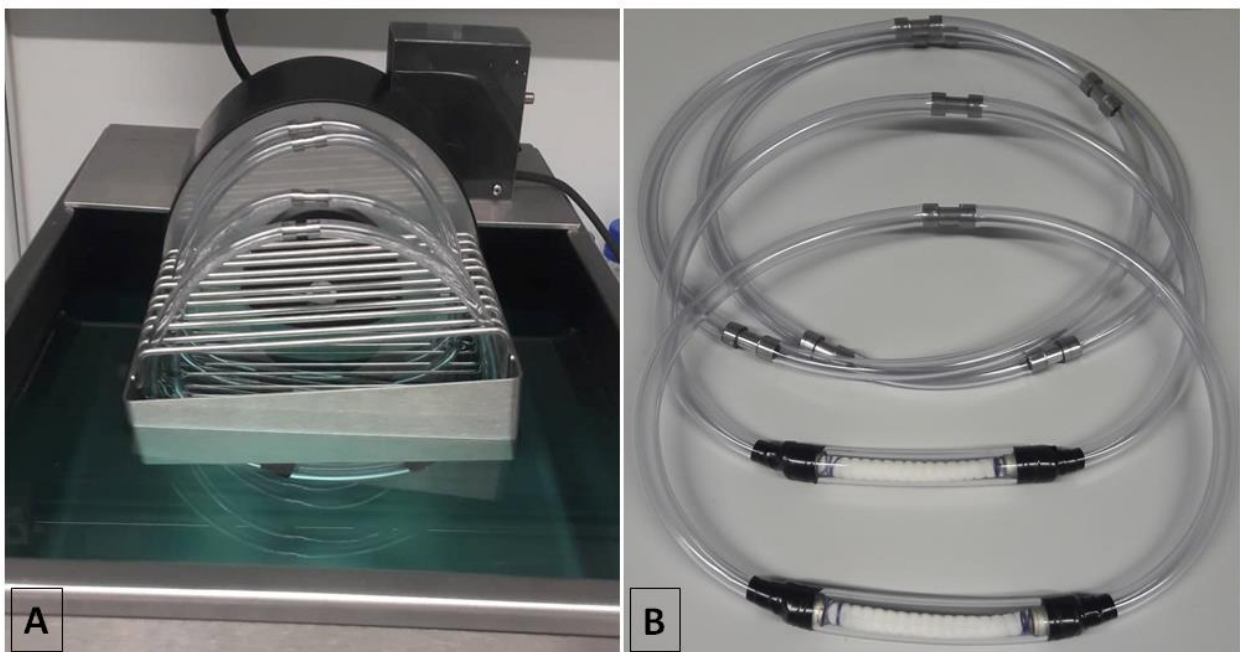


Abbildung 5: A: Chandler-Loop-Modell. Vier Loops sind in die Halterung eingespannt und rotieren im Wasserbecken. B: Vier Loops, davon zwei DAC (unten) und zwei Kontrollen mit heparinisiertem Polyvinylchlorid(PVC)-Schlauch. Zum Schutz vor einfließendem Wasser sind die DAC-Prothesen mit einem PVC-Schlauch größeren Durchmessers abgeklebt worden.

2.2.1 Aufbau der Loops

Für die Versuche wurden Polyvinylchlorid(PVC)-Schläuche mit einer Länge von 450 mm, einem Innendurchmesser von 5.0 mm und einer Wandstärke von 1.0 mm verwendet. Mithilfe von Metallverbindern und einer 50 mm langen Prothese entstanden Loops mit einer Gesamtlänge von 500 mm. Für besseren Halt wurden die Prothesen mittels einer 3-0 Vicryl-Ligatur (Ethicon) an die Metallkonnektoren geknotet. PVC-Schläuche und Konnektoren wurden zuvor mit dem Coreline-Heparin-Conjugate-System (Coreline, Uppsala, Schweden), gemäß den Herstellerangaben, beschichtet. Die finale Heparinkonzentration betrug $0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Als Kontrolle dienten 50 mm lange PVC-Schläuche, die anstelle der zu untersuchenden Prothesen zwischen den Metallkonnektoren befestigt wurden. Um das Eindringen von Flüssigkeit aus dem Wasserbad in das Loop-System zu vermeiden, wurde ein PVC-Schlauch größeren Durchmessers über die Prothese und die angrenzenden Konnektoren geschoben und mit Isolierband versiegelt (siehe Abb. 5).

2.2.2 Probanden

Insgesamt wurden in dieser Studie 21 Freiwillige im Alter zwischen 23 und 35 Jahren rekrutiert. Alle Teilnehmer waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme gesund, nicht schwanger und nahmen keine Medikamente ein. Die Genehmigung der Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission eingeholt (Aktenzeichen 88/18).

2.3 Durchführung

2.3.1 Blutentnahme und Weiterverarbeitung

Für jedes Experiment wurden 50 ml Blut frisch entnommen und in einem Becherglas mit unfraktioniertem Heparin versetzt. Nach gründlichem Schwenken ergab sich eine Endkonzentration von 1.5 IE/ml (Rotexmedica, Trittau, Deutschland). Diese Konzentration wurde gewählt, um ein Gerinnen des Blutes zu verhindern und gleichzeitig einen inhibitorischen Effekt auf das Komplementsystem zu vermeiden, der bei höheren Heparinkonzentrationen über 5 IE/ml zu erwarten ist [44].

Das Blut wurde umgehend nach der Abnahme, wie in Abbildung 6 dargestellt, zur Analyse weiterverarbeitet. Parallel wurden Proben des frischen Blutes entnommen und analysiert, um die Ausgangswerte der untersuchten Laborparameter zu ermitteln. Diese dienen später als Referenz für die Messwerte, um physiologische Unterschiede der Probanden vernachlässigen zu können. Das restliche Blut wurde während des Versuchs in einem verschlossenen Becherglas aufbewahrt. Es wurde als Kontrolle der Heparinisierung des Blutes verwendet, wobei der gesamte Versuch verworfen wurde, falls sich eine Gerinnungsaktivität mit Thrombusbildung im Becherglas zeigte. Die Bestimmung der Ausgangswerte entspricht der Bestimmung der Werte zu den Versuchszeitpunkten (120 und 240 Minuten).

Zuerst wurden 1.0 ml Blut für die Messung der reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entnommen. Anschließend wurde das Blut in ein Polypropylenröhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (K3-EDTA) (1.6 mg/ml) (Sarstedt, 32.332) umgefüllt und auf Eis gekühlt, um eine weitere Aktivierung zu verhindern. Ein Teil wurde zur Bestimmung von Blutbild und Differenzialblutbild genutzt, der andere Teil zentrifugiert (20 min bei 3500 g), um das Plasma zu gewinnen. Dieses wurde für die weiteren Analysen aliquotiert, mit flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zusätzlich wurden nach 240 Minuten, am Versuchsende, Querschnittproben aus den Prothesen-Loops entnommen. Dazu wurden die Prothesen mit 30 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um nur die anhaftenden Zellen zu bewahren, und mit einem Skalpell geteilt. Die Proben wurden aus der Prothesenmitte entnommen, in ein Gefriermedium (Tissue-Tek O.C.T., 4583) gebettet, ebenfalls schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

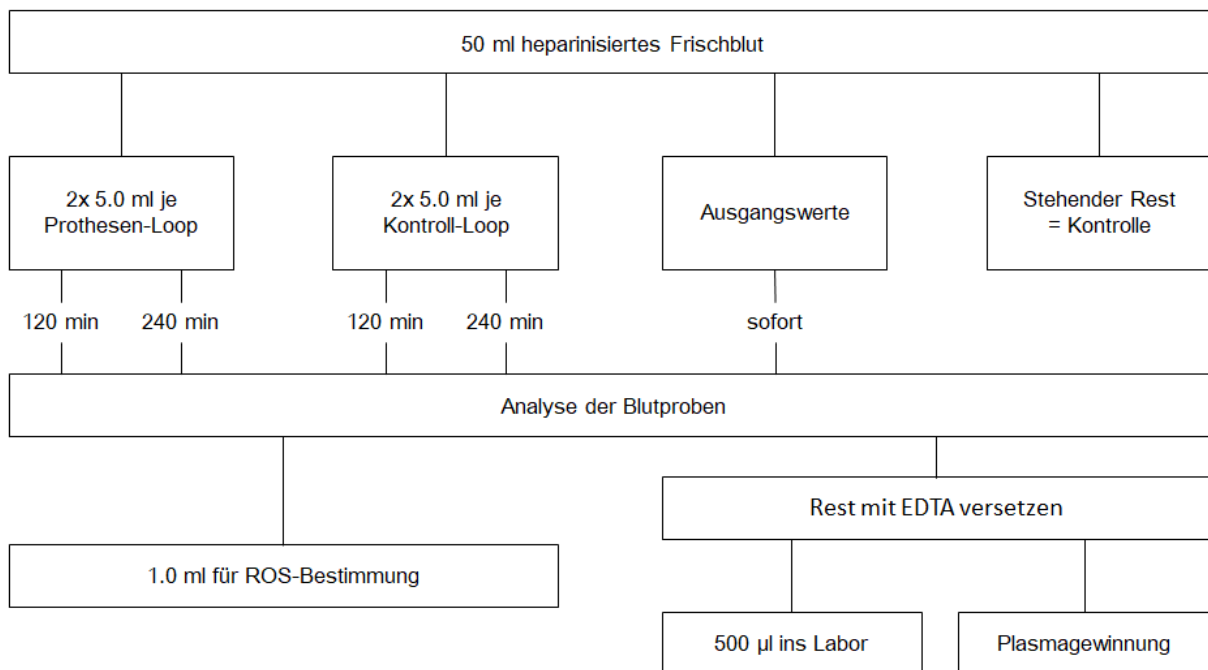


Abbildung 6: Verteilung der Probandenblutproben auf die Messzeitpunkte (Ausgangswert, 120 min, 240 min) und Vorgehen zur Analyse (ROS: reaktive Sauerstoffspezies; ml: Milliliter; μl : Mikroliter; min: Minuten; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure)

2.3.2 Analyseparameter

Die Parameter, die im Rahmen der Studie zur Analyse herangezogen wurden, sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst und erläutert.

Tabelle 4: Übersicht über die Analyseparameter

Analyseparameter	Hintergrund
<p>Blutzellzahlen</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Erythrozyten</i> - <i>Thrombozyten</i> - <i>Leukozyten</i> 	<p>Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein Blutbild angefertigt.</p> <p>Ein Verlust an Erythrozyten im Verlauf des Versuchs könnte auf eine Hämolyse hinweisen, die wiederum für mechanische Störfaktoren sprechen könnte.</p> <p>Thrombozyten haben als erste Zellen Kontakt zur fremden Oberfläche, können so aktiviert werden und leiten die primäre Gerinnung ein.</p> <p>Leukozyten dienen der körpereigenen Immunabwehr und sind maßgeblich an der Reaktion auf Fremdkörper beteiligt. Über das Verhalten der einzelnen Untergruppen gibt das Differenzialblutbild Auskunft.</p>
Immunfluoreszenzfärbung von Prothesenquerschnitten	Anhaftende Zellen und Zellaggregate sollen auf den unterschiedlichen Oberflächen dargestellt werden.
zellfreie DNA (cfDNA) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	Die Bildung von cfDNA und ROS ist ein inflammatorischer Prozess nach Leukozytenaktivierung und kann Auskunft über die Immunaktivität geben.
Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT)	Thrombin ist Bestandteil der Gerinnungskaskade und kann durch Antithrombin III (AT III) gebunden und gehemmt werden. TAT-Konzentrationen geben Aufschluss über die Gerinnungsaktivität.
Komplement-Plasmaproteine (C3a, sC5b9)	Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunabwehr. Durch die Quantifizierung einiger Plasmaproteine kann auf die Aktivierung geschlossen werden.

2.3.2 Blutzellzahlen

Am Versuchstag wurden die Proben unmittelbar nach der Abnahme und zu den beiden Versuchszeitpunkten im Zentrallabor der Universitätsklinik Magdeburg untersucht. Dabei fand eine konventionelle Blutzellfrequenzanalyse statt. Die Menge der zellulären Blutbestandteile wurde mittels Durchflusszytometrie (Sysmex XE-5000, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) bestimmt, ebenso wurden der Hämatokrit- und der Hämoglobinwert ermittelt.

2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Ziel der Immunfluoreszenzfärbungen war es, darzustellen, welche Zellen in welcher Menge der Prothesenoberfläche anhaften. Dazu wurden aus den gefrorenen Prothesenproben Schnitte mit einer Dicke von 10.0 µm hergestellt, wofür das Kryostat Leica CM 1950 (Leica Biosystems, Nussloch, GER) genutzt wurde. Diese Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und anschließend für 24 Stunden getrocknet. Die Färbung erfolgte mittels Immunfluoreszenzantikörpern. Der Ablauf ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt, die Färbungen in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden mit Aceton fixiert und dann mit 3.0% Standard-Eselserum (angesetzt mit PBS) blockiert. Ein primärer Antikörper (Verdünnung 1 : 50 mit 3.0%-Eselserum) wurde für eine Inkubationszeit von 12 Stunden, bei 4.0°C, aufgetragen. Nach dem Waschen folgte eine einstündige Inkubation in Dunkelheit, für die ein Sekundärantikörper (Verdünnung 1 : 500 mit 3.0% Eselserum) verwendet wurde. Schließlich wurden die Präparate mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (Sigma, D9542) gefärbt und eingebettet. Die Aufnahmen entstanden mithilfe des EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA).

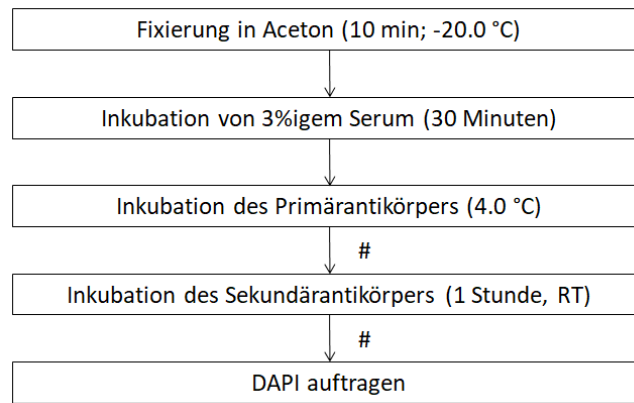


Abbildung 7: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung (#: dreimaliges Waschen mit PBS; RT: Raumtemperatur; min: Minuten; °C: Grad Celsius; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol)

Dargestellt wurden aktivierte Thrombozyten, Erythrozyten und kernhaltige Zellen. Aktivierte Thrombozyten wurden durch Färbung gegen CD62P nachgewiesen. CD62P, auch P-Selektin, ist ein Protein der Thrombozytenoberfläche und vermittelt deren Aggregation [45,46]. Erythrozyten wurden durch Färbung gegen CD235a nachgewiesen, wobei CD235a, auch Glycophorin A, ein transmembranes Glykoprotein ist, das in Erythrozyten und ihren Vorläufern vorkommt [47]. Kernhaltige Zellen wurden mit DAPI detektiert [48], das DNA färbt, über die reife Erythrozyten und Thrombozyten in der Regel nicht mehr verfügen. So kann davon ausgegangen werden, dass, neben einer vernachlässigbaren Anzahl an Vorläufer- und Endothelzellen, Leukozyten sichtbar werden.

Tabelle 5: Übersicht über die genutzten Antikörper

Zielzelle	Primärantikörper	Spezies	Sekundärantikörper	Farbe
aktivierte Thrombozyten	Kaninchen-Anti-Human-CD62P	Kaninchen	Esel-Anti-Kaninchen-Alexa Fluoro 488 (Jackson ImmunoResearch # 711-547-003)	grün
Erythrozyten	Maus-Anti-Human-CD235a	Maus	Esel-Anti-Maus-IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch 715-167-003)	rot

2.3.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die Methode zur Bestimmung der ROS wurde erstmals von Golightly beschrieben [49]. Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) dient bei dieser Methode zum Nachweis der Radikale. Es ist zellwandpermeabel und wird bei Kontakt zu Rodamin 123 oxidiert. Rodamin 123 fluoresziert und lässt so eine quantitative Bestimmung der ROS zu [50].

Alle Messungen wurden als Triplets durchgeführt, wie in Abbildung 8 schematisch gezeigt. 100 µl der Blutproben wurden mit 20 µl DHR 123 (Sigma Nr. D1054) und 900 µl Rinderserumalbumin (BSA) (Carl Roth, K45-001) versetzt. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich eine Stimulation mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) (Sigma, P1585) durchgeführt. Die Proben wurden 15 Minuten lang in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) unter Schwenken bei 37.0 °C inkubiert und anschließend mit PBS (ThermoFisher, 70011-036) gewaschen. Die Proben wurden für 3 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Probenpellets wurden mit 2.0 ml Ammoniumchlorid lysiert. Nach erneuter Zentrifugation und Waschung wurden die Probenpellets in 200 µl PBS resuspendiert und für die Messung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 485 nm und 530 nm in einem Mikroplattenlesegerät (Synergy HT, BioTek Instruments, USA) gemessen und mit Gen5 (Version 1.11.5, BioTek Instruments, USA) analysiert.

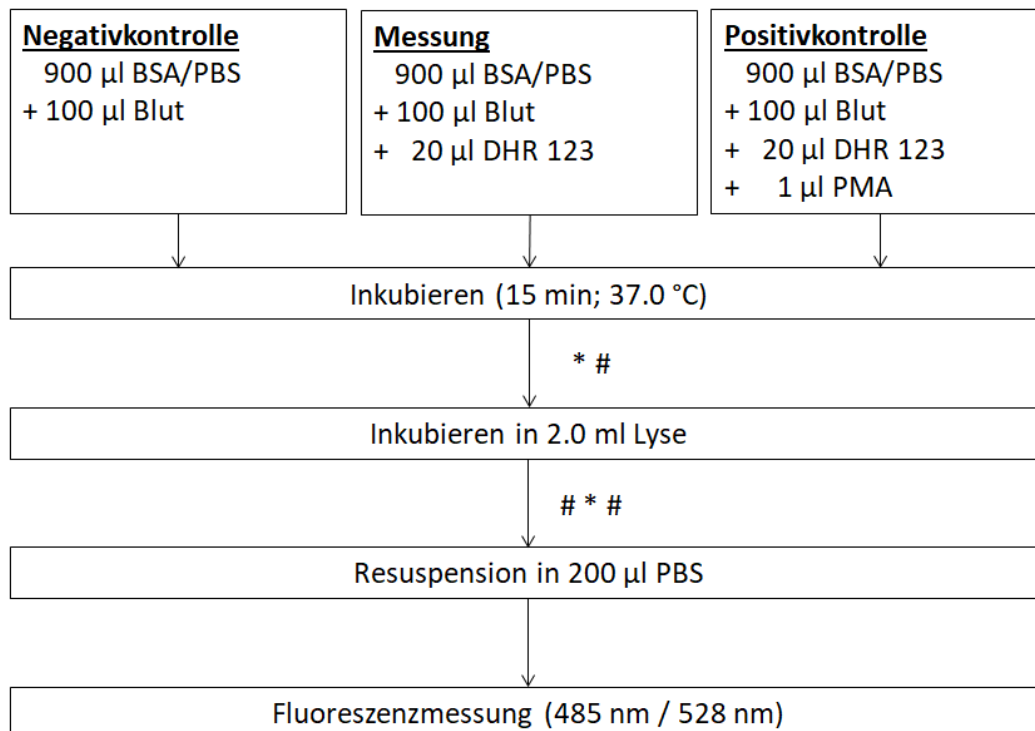


Abbildung 8: Protokoll der ROS-Messungen (*: Waschen in 3.0 ml PBS; #: Zentrifugieren (3 Minuten, 1500 U/min); µl: Mikroliter; BSA: Rinderserumalbumin; DHR 123: Dihydrorhodamin 123; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; min: Minuten; °C: Grad Celsius; ml: Milliliter; U/min: Umdrehungen pro Minute; nm: Nanometer)

2.3.5 Zellfreie extrazelluläre DNA (cfDNA)

Die Quantifizierung der cfDNA wurde in Triplets gemäß der Herstellerangaben (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) mittels Quant-iT PicoGreen dsDNA-Assay durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 485 nm und 530 nm in einem Mikroplattenlesegerät (Synergy HT, BioTek Instruments, USA) gemessen. Zur Interpretation wurde eine definierte Menge (im Bereich von 0 bis 2 g/ml) Kalbsthymus-DNA (Sigma, 73049-39-5) für eine Standardkalibrierungskurve verwendet, wobei nur der lineare Bereich dieser Eichkurve berücksichtigt wurde.

2.3.6 Bestimmung von TAT, C3a und sC5b9

Die Bestimmung der Proteine TAT, C3a und sC5b9 erfolgte mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Es wurden handelsübliche Kits (siehe Tab. 4) gemäß Herstellerangaben genutzt und alle Versuche in Dupletten durchgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten ELISA-Kits

Human Thrombin-Antithrombin Complex ELISA Kit (TAT)	Abcam plc, Cambridge, UK	Katalog Nr. 108907
sC5b9 Human ELISA	Hycult Biotech, Uden, NL	Katalog Nr. HK328-02
Human C3a ELISA Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D	Katalog Nr. BMS2089

2.4 Statistik

Die Daten wurden unter Verwendung von Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) analysiert. Alle Werte sind relativ, normiert anhand der jeweiligen Ausgangswerte zum Startzeitpunkt, wie in Kapitel 2.3.1 (siehe Abb. 6) definiert, dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0.05$ definiert. Die Datensätze der verschiedenen Prothesen wurden aufgrund der geringen Gruppengröße mit nichtparametrischen Tests verglichen. Zunächst erfolgte ein Kruskal-Wallis-Test, als Post-hoc-Test wurde der Dunn's-Multiple-Comparison-Test durchgeführt. Alle kontinuierlich verteilten Daten werden als Median (Q1; Q3) angegeben und der Übersicht halber als Boxplot dargestellt, wobei die Box den Median sowie das untere (Q1) und obere Quartil (Q3) anzeigt und die Whisker das Minimum und das Maximum der Messwerte angeben.

3 Ergebnisse

3.1 Erklärung zum Eigenanteil der im Folgenden gezeigten Ergebnisse

Der folgende Teil der experimentellen Arbeiten wurde durch die Arbeitsgruppe bereits vor Beginn meiner Arbeit durchgeführt:

- Rotationsversuche im Chandler-Loop-Modell, Messung der Blutbilder, zellfreier DNA, TAT, sC5b9 und C3A, N = 3
- Charakterisierung der verschiedenen BNC-Prothesen mittels Konfokalmikroskop

Die Eigenleistung der vorliegenden Dissertation umfasst die folgenden Schritte:

- Etablierung aller Methoden nach Umzug der Arbeitsgruppe von Köln nach Magdeburg
- Durchführung der Rotationsversuche im Chandler-Loop-Modell, Messung der Blutbilder sowie Differenzialblutbilder, der freien Sauerstoffradikale, der zellfreien DNA, TAT, sC5b9 und C3A, N \geq 3
- Durchführung der histologischen Untersuchungen
- Statistische Auswertung

3.2 Ergebnisse bezüglich der Zellzahlen

Die Erythrozytenzahlen blieben über die gesamte Versuchszeit stabil, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den BNC- und den etablierten synthetischen Prothesen (siehe Abb. 9). Im Hinblick auf die Thrombozytenzahlen waren hingegen zu beiden Versuchszeitpunkten deutliche Streuungen zu erkennen. Zum ersten Versuchszeitpunkt, nach 120 Minuten, war eine gleichmäßige moderate Reduktion der Thrombozyten über die BNC-Prothesen zu erkennen, wobei die ePTFE-Prothese (Median 0.890, [0.690; 0.935])

vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Median 0.810, [0.750; 0.900]) war. Zum zweiten Versuchszeitpunkt, nach 240 min, blieb die Reduktion der Thrombozytenzahl in der GOO-Prothese (Median 0.610, [0.060; 0.890]) und der GLAS-Prothese (Median 0.560, [0,455; 0,878]) moderat, während sich bei den übrigen BNC-Prothesen deutliche Reduktionen ergaben. Diese Unterschiede zwischen den BNC-Prothesen sind jedoch nicht signifikant. Die Reduktion der Thrombozytenzahl von der ePTFE-Prothese (Median 0.890, [0.730; 0.980]), die weiterhin im Bereich der Kontrollgruppe lag (Median 0.850, [0.810; 0.880]), war hingegen signifikant ($p = 0.016$) schwächer als bei der INV-Prothese (Median 0.065, [0.023; 0.365]) (siehe Abb. 10). Die Zellzahlveränderungen der Leukozyten wiesen geringere Schwankungen auf. Nach 120 min lag die Menge der Leukozyten in allen Prothesen geringfügig unter dem Bereich der Kontrolle (Median 0.950, [0.930; 0.960]), ohne dass signifikante Unterschiede bestanden. Nach insgesamt 240 min waren die Reduktionen der Leukozytenzahlen von der ePTFE-Prothese (Median 0.915, [0.888; 0.940]) und der GLASprothese (Median 0.930, [0.9000; 0.973]) ebenso minimal wie die in der Kontrollgruppe (Median 0.920, [0.910; 0.930]). Bei den weiteren Prothesen ergab sich eine stärkere Verminderung der Leukozyten, die im Fall von der INV-Prothese (Median 0.435, [0.228; 0.783]) ($p=0.022$) und der STD-Prothese (Median 0.620, [0.173; 0.815]) ($p = 0.021$) signifikant gegenüber der von der GLAS-Prothese war (siehe Abb. 11). Weitere Leukozytenanalysen hinsichtlich der Untergruppen der Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten wiesen nicht auf signifikant unterschiedliche Veränderungen der Transplantate hin. Dabei änderten sich besonders Neutrophile, aber auch Lymphozyten im Versuchsverlauf, verglichen mit den Ausgangswerten, nur geringfügig. Eine tendenzielle Verringerung der Neutrophilen zeigte sich nach 240 Minuten für die INV-Prothese. Die Monozytenanalysen belegen hingegen deutlichere Schwankungen. Es zeichnete sich ein

Trend für verringerte Häufigkeiten zirkulierender Blutmonozyten sowohl für die INV-Prothese als auch für die STD-Prothese ab (siehe Abb. 12).

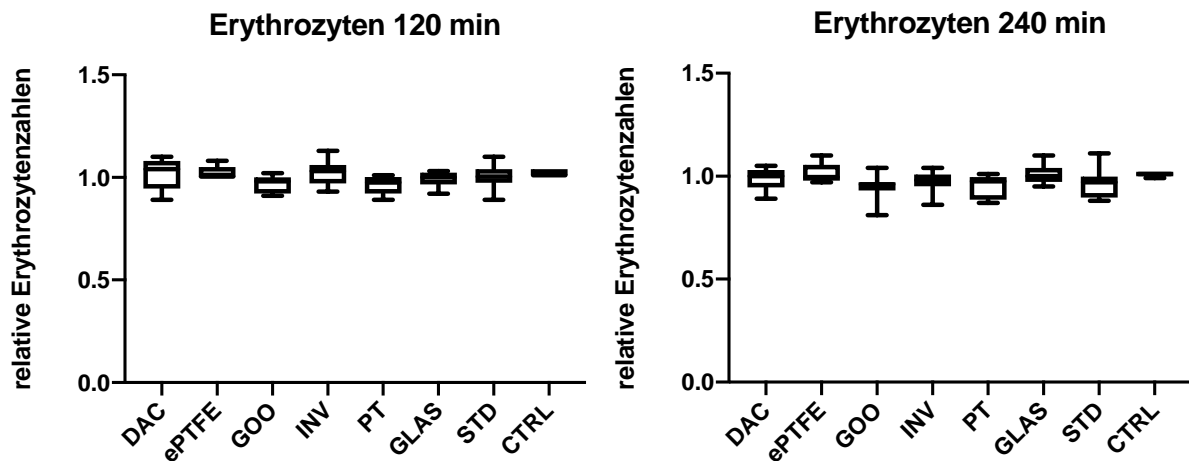


Abbildung 9: Erythrozytenzahlen nach 120 min bzw. 240 min bezogen auf die Ausgangswerte. N = 6 (DAC, ePTFE, GLAS), N = 7 (GOO), N = 8 (INV, PT, STD), N = 49 (CTRL)

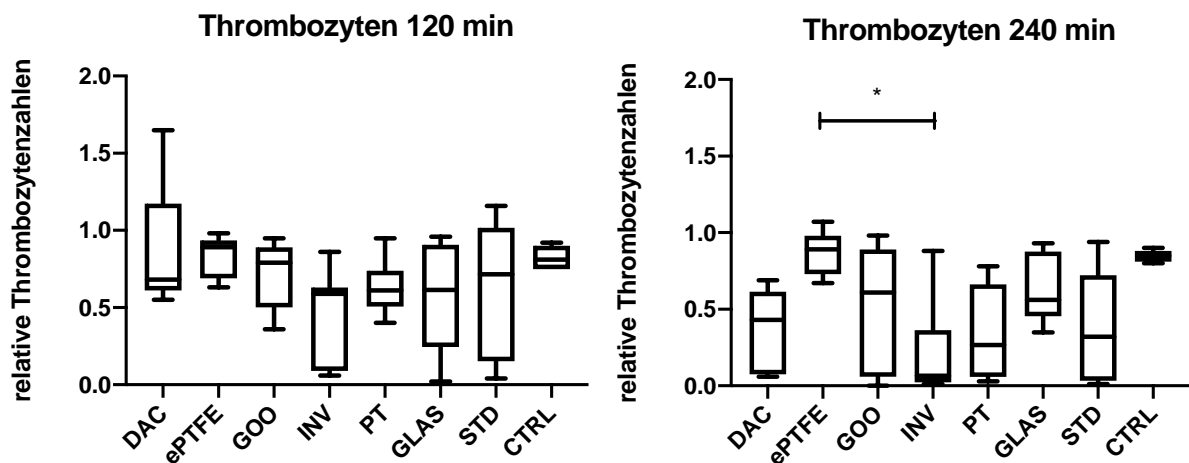


Abbildung 10: Thrombozytenzahlen nach 120 min und 240 min bezogen auf die Ausgangswerte. N = 6 (DAC, ePTFE, GLAS); N = 7 (GOO); N = 8 (INV, PT, STD); N = 49 (CTRL)

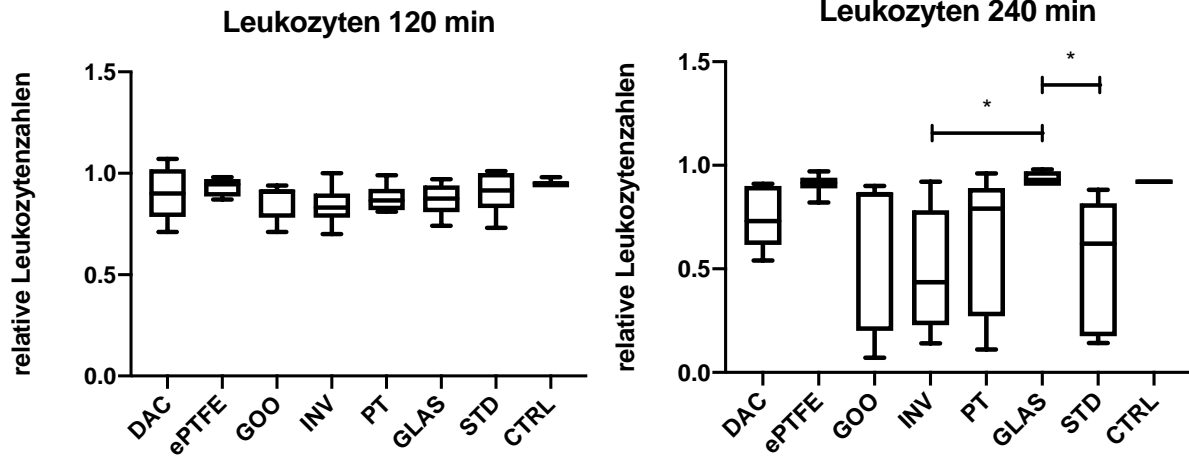
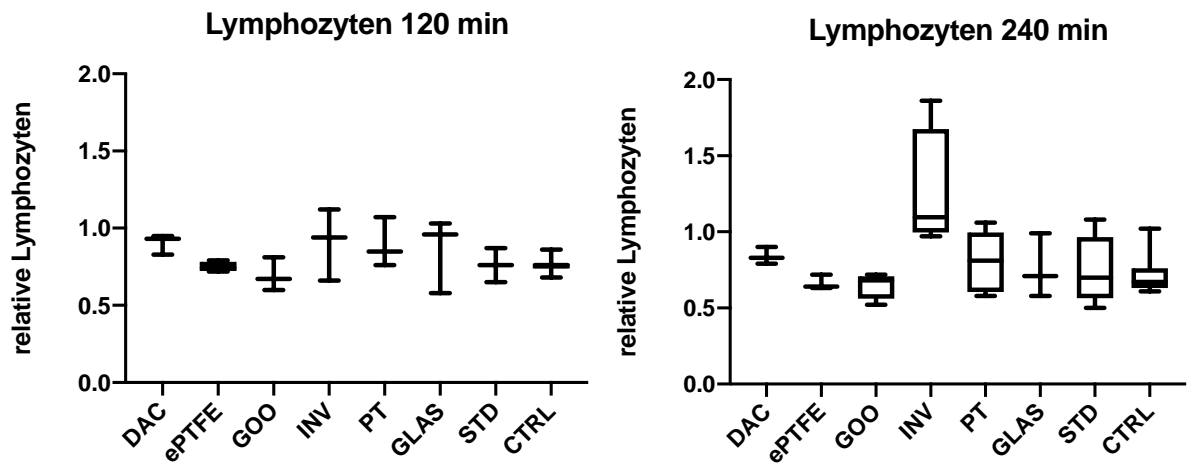
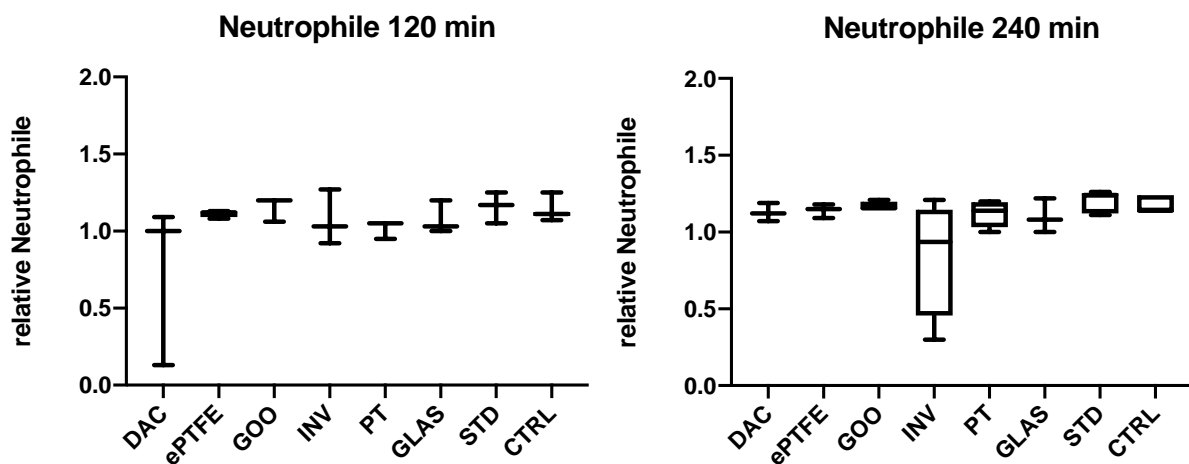


Abbildung 11: Leukozytenzahlen nach 120 min und 240 min bezogen auf die Ausgangswerte. N = 6 (DAC, ePTFE, GLAS); N = 7 (GOO); N = 8 (INV, PT, STD); N = 49 (CTRL)



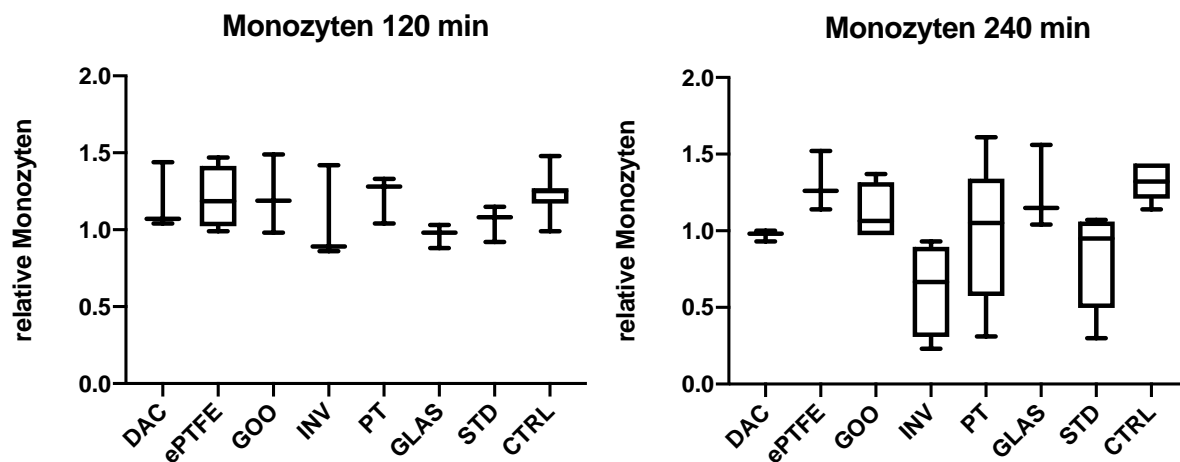


Abbildung 12: Relative Häufigkeiten der Leukozytenuntergruppen nach 120 min und 240 min bezogen auf die Verteilung der Ausgangswerte (von oben nach unten: Neutrophile, Lymphozyten und Monozyten). N = 3 (DAC, ePTFE, GLAS); N = 4 (GOO, INV); N = 5 (PT, STD); N = 27 (CTRL)

3.2.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung

In den kryogeschneitenen Prothesenproben wurde nach Färbung auf Erythrozyten, aktivierte Thrombozyten und kernhaltige Zellen sichtbar (siehe Abbildung 13), dass die GLAS-Prothese im Vergleich zu den anderen BNC-Prothesen die geringste Zellanhaftung aufwies. Besonders starke Anhaftungen waren bei der INV- und der STD-Prothese zu erkennen. Während bei den DAC-, INV-, PT- und STD-Prothesen sichtbare Aggregate mit Beteiligung aktiver Thrombozyten (grün) dargestellt wurden, wiesen die ePTFE- und die GLAS-Prothese keine sichtbaren Anzeichen von Aggregation oder Gerinnung (Thrombenbildung) auf. Bei der GOO-Prothese ergab sich eine moderate Zellanhaftung ohne offenkundige Aggregate.

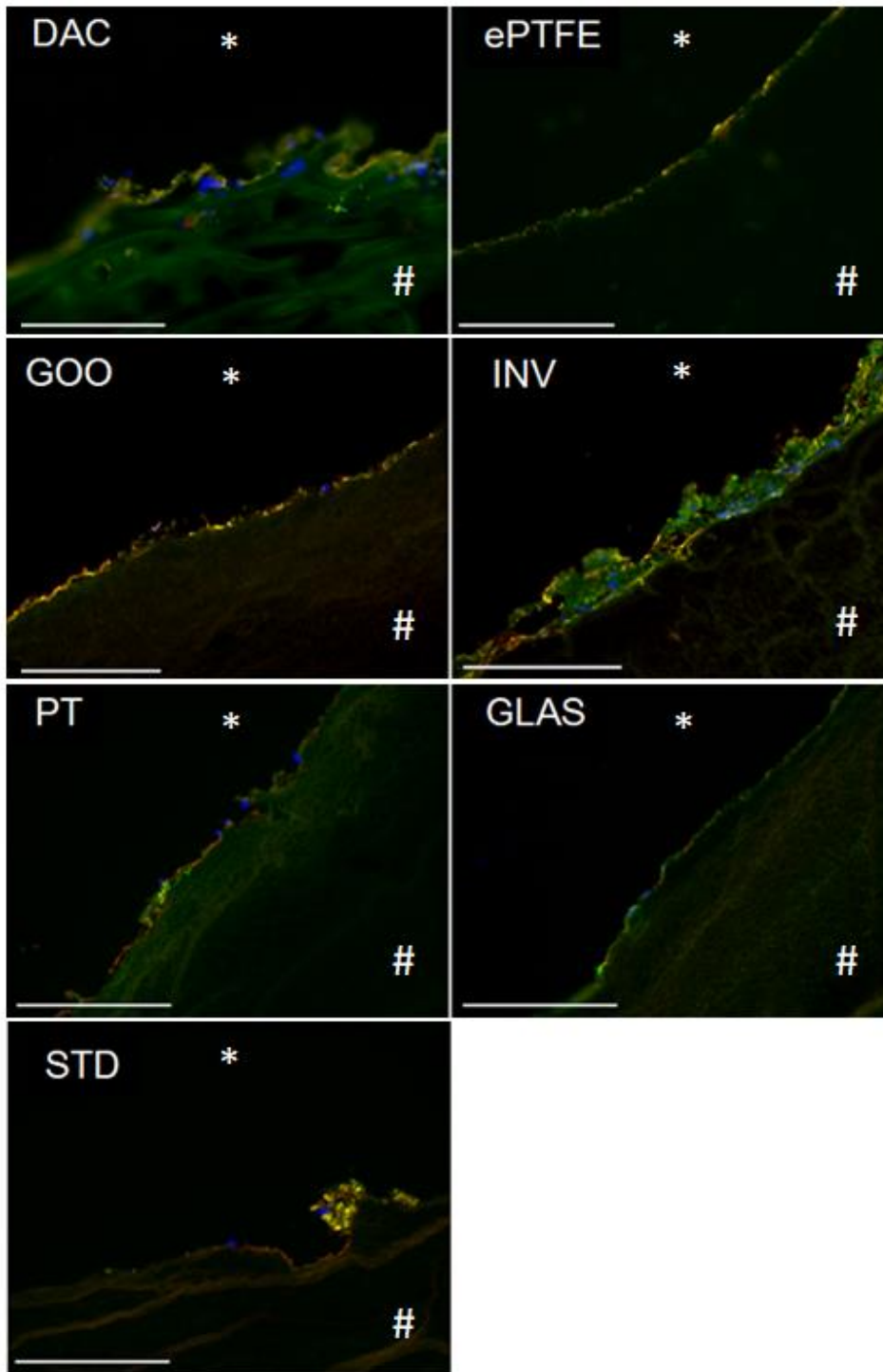


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen aller Prothesen nach der Spülung mit PBS (20-fache Vergrößerung; Maßstab entspricht 200 µm; rot: CD235a/Erythrozyten; grün: CD62P/aktivierte Thrombozyten; blau: DAPI/kernhaltige Zellen; *: Lumen; #: Prothese)

3.3 Ergebnisse bezüglich der Immunantwort (cfDNA und ROS)

Bei allen Prothesen, mit Ausnahme der DAC-Prothese, zeigte sich ein Anstieg der cfDNA im Verlauf der Versuche. Auch die Ausgangswerte der Kontrollgruppe hatten sich nach 120 min verdoppelt und nach 240 min versechsfacht. Die meiste cfDNA wurde in der STD-Prothese (Median 6.765, [5.678; 10.000]) freigesetzt. Nach 120 min war der Unterschied zur DAC-Prothese (Median 1.465, [0.308; 3.365]) signifikant ($p = 0.027$). Weitere Signifikanzen haben sich nicht ergeben. Besonders die Messwerte für die Messung nach 240 min wiesen große Streuungen auf. Am wenigsten cfDNA konnte unter den BNC-Prothesen in den Blutproben bei der PT-Prothese nachgewiesen werden. Die Werte lagen im Median unter denen der Kontrollgruppe. Auch die Blutproben aus der GLAS- und der INV-Prothese setzten cfDNA in ähnlicher Menge wie die Kontrollgruppe frei (siehe Abb. 14).

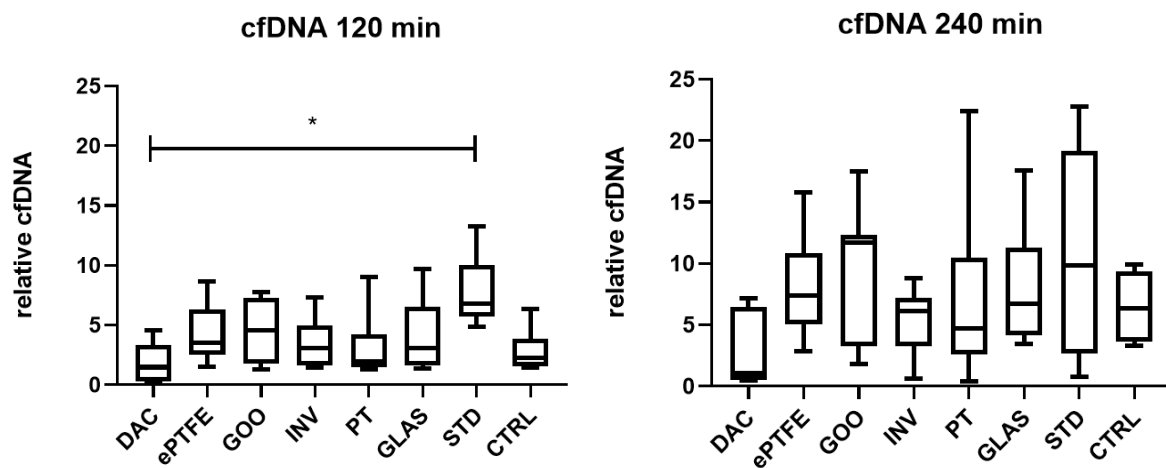


Abbildung 14: Relative Konzentration an freier DNA nach 120 min und 240 min bezogen auf die Ausgangswerte. N = 6 (DAC, ePTFE, GLAS); N = 7 (GOO); N = 8 (INV, PT, STD); N = 49 (CTRL)

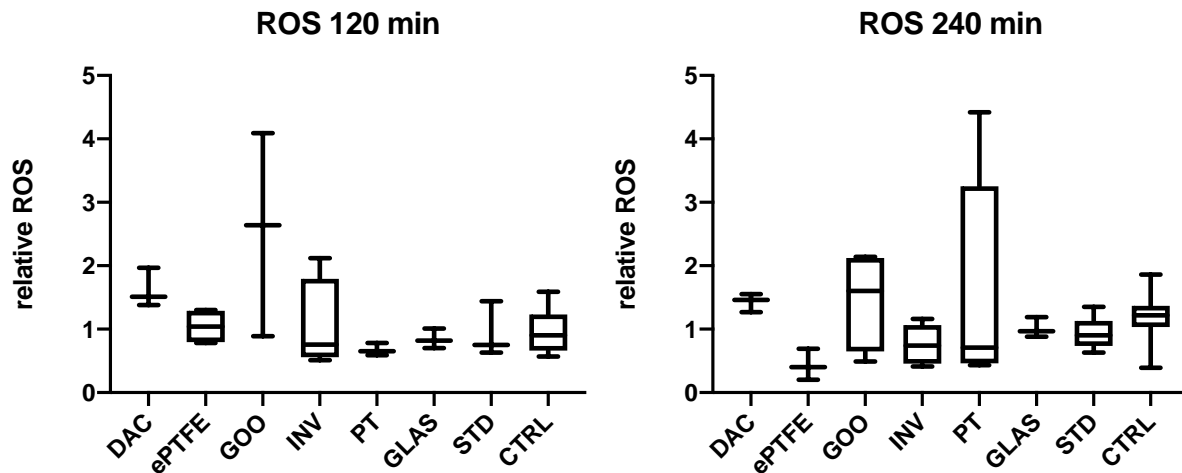


Abbildung 15: Relative Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies nach 120 min und 240 min bezogen auf die Ausgangswerte. N = 3 (DAC, ePTFE, GLAS); N = 4 (GOO); N = 5 (INV, PT, STD); N = 28 (CTRL)

Im Hinblick auf die ROS zeigten sich über die gesamte Versuchsdauer hinweg keine signifikanten Unterschiede. Für alle Prothesen ergaben sich im Median Werte im Bereich des Medians der Kontrollgruppe und damit kaum Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert. Lediglich bei einzelnen Messungen war eine Erhöhung der ROS festzustellen, wobei tendenziell am meisten ROS in den Proben aus der GOO-Prothese gemessen wurden (siehe Abb. 15).

3.4 Ergebnisse bezüglich der Gerinnungskaskade (TAT)

Die Bildung von TAT hat über die Versuchsdauer, verglichen mit den Ausgangswerten, zugenommen. Bei der GOO-Prothese (Median 2.390, [1.680; 3.840], $p = 0,0286$) und der STD-Prothese (Median 5.130, [1.570; 7.470], $p = 0,0323$) ließen sich signifikant mehr TAT nachweisen als bei der GLAS-Prothese (Median 1.200, [1.010; 1.353]). Alle übrigen Prothesen wiesen Werte auf, die unter denen der Kontrollgruppe (Median 1.970, [1.810; 2.230]) lagen (siehe Abb. 16).

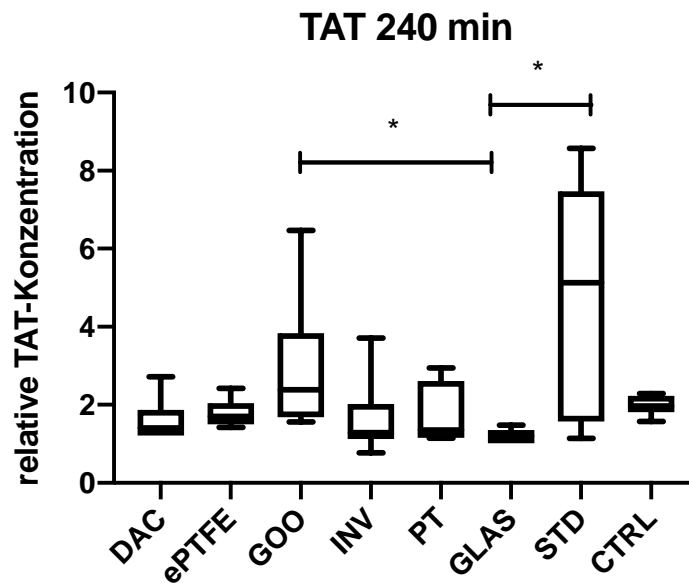


Abbildung 16: Konzentration des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) nach 240 min Versuchszeit bezogen auf die Ausgangswerte. N = 6 (DAC, ePTFE, INV, PT, GLAS); N = 7 (GOO, STD); N = 44 (CTRL)

3.5 Ergebnisse bezüglich der Komplementkaskade (C3a und sC5b9)

Alle Prothesen, inklusive der Kontrollgruppe, wiesen am Versuchsende im Vergleich zu den Ausgangswerten erhöhte Plasmaspiegel von C3a und sC5b auf, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Die höchsten C3a-Werte, 50-mal höher als die Ausgangswerte, wurden bei der PT- und der GLAS-Prothese gemessen. Bei der STD-Prothese zeigte sich mit einer Versechsfachung der Ausgangswerte der geringsten Anstieg. Zu den synthetischen Prothesen resultierten Werte, die im Bereich der Werte der Kontrollgruppe lagen. Auch die sC5b9-Plasmaspiegel hatten sich bis zum Versuchsende in allen Prothesen vervielfacht. Der höchste Anstieg, auf das 30-Fache der Ausgangswerte, war bei der INV-Prothese zu beobachten. Die Werte der synthetischen Prothesen lagen auch hier im Kontrollbereich. Insgesamt ergaben sich besonders bei den BNC-Prothesen Schwankungen der Messwerte (siehe Abb. 17).

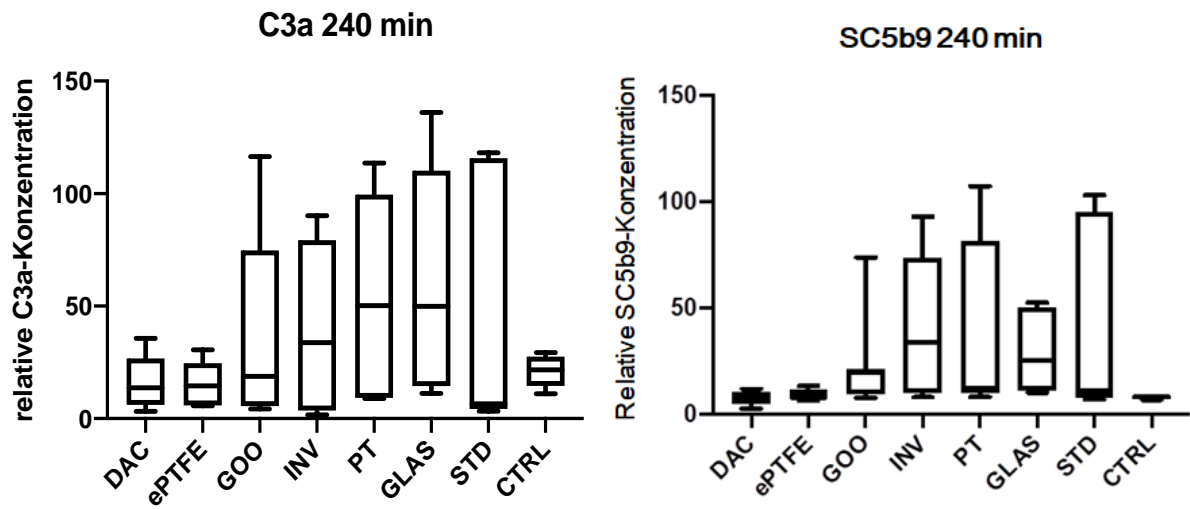


Abbildung 17: Konzentrationen von C3a und sC5b9 nach 240 min bezogen auf die Ausgangswerte. N = 6 (DAC, ePTFE, INV, PT, GLAS); N = 7 (GOO, STD); N = 44 (CTRL)

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

In dieser Dissertation geht es um die Blut-Biokompatibilität schmalkalibriger Gefäßprothesen aus BNC mit dem langfristigen Ziel, diese als Ersatz für autologe Gefäße bei koronaren Bypässen klinisch einsetzen zu können. Es wurde ein In-vitro-Versuchsaufbau anhand von Empfehlungen der DIN-Norm ‚DIN ISO 10993‘ zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten entwickelt. Eingeschlossen waren Untersuchungen des Vollbluts und des Plasmas auf zelluläre und azelluläre Faktoren der Gerinnung, ebenso wie die mikroskopische Darstellung der Prothesen. Das verwendete Chandler-Loop-Modell ist eine etablierte Methode und bietet eine solide Alternative zu In-vivo-Versuchen, um Tierversuche zu reduzieren und trotzdem konstante, körperähnliche und standardisierte Bedingungen für frühe Versuchsreihen zu haben [22,51]. So konnten Temperatur und Rotation für alle Durchläufe einheitlich festgelegt werden. Ebenso war durch exakt abgemessene Blutvolumina eine genaue Antikoagulation möglich und die Kontrollen konnten jeweils zeitgleich, mit dem Blut desselben Probanden und unter denselben Bedingungen laufen [37,52].

Das Modell verfügt jedoch auch über Schwächen. Für Langzeitversuche zur Testung auf späte Komplikationen, wie Thrombosen durch verstärkte neointimale Proliferation, ist das Chandler-Loop-Modell nicht geeignet, da die Loops nicht mit endothelbedeckten Gefäßwänden vergleichbar sind [53]. Weiterhin handelt es sich um ein Niederdruck-Modell, das das menschliche Hochdruck-System nur annähernd nachstellen kann. Die intraluminal wirkenden Kräfte, besonders die Scherkräfte, können bisher nur näherungsweise berechnet werden, da das genaue Zusammenwirken von Rotationsgeschwindigkeit, Füllstand oder Loop-Größe noch nicht ausreichend erforscht ist [54]. Ebenso fehlt bei den verwendeten

Materialien die authentische Interaktion mit dem körpereigenen Endothel. Zudem ist bekannt, dass die Blut-Luft-Grenze ebenfalls zu ungewünschten Aktivierungen verschiedener Plasmaproteine führen kann [38,55].

4.2 Diskussion der Zellzahlanalysen

Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten die Zellzahlanalysen. So zeigte sich, dass die Menge der Erythrozyten über die gesamte Versuchszeit hinweg in allen Prothesen konstant war. Eine massive Hämolyse ließ sich somit ausschließen, ebenso konnten mechanische Störfaktoren durch die Versuchsanordnung ausgeschlossen werden. Eine merkliche Hämolyse wurde aufgrund der Ergebnisse relevanter Arbeiten anderer Arbeitsgruppen durch die BNC-Prothesen nicht erwartet [38,52]. Eine differenzierte Aussage zum Grad der Hämolyse wäre durch die Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma möglich, da dieser Wert ein sensitiver Marker der Hämolyse ist [56]. In der vorliegenden Untersuchungsreihe wurde er aufgrund der konstanten Erythrozytenzahlen jedoch nicht ermittelt.

Im Gegensatz zu den Erythrozytenzahlen waren bei den Thrombozytenzahlen am Versuchsende deutliche Unterschiede zu erkennen. Lediglich die Werte der ePTFE-Prothese lagen im Bereich der Kontrollwerte. Bei allen BNC-Prothesen zeigte sich eine Reduktion der Thrombozytenzahlen, wobei diese bei der GLAS-Prothese am geringsten ausfiel. Für die INV-Prothese ergaben sich signifikant niedrigere Werte, im Vergleich zur ePTFE-Prothese. Bei allen weiteren BNC-Prothesen und der synthetischen DAC-Prothese resultierten ebenfalls deutliche Zellzahlreduktionen, allerdings ohne Signifikanz, da die Thrombozytenzahlen erheblich schwankten (siehe Abb. 10). Am wahrscheinlichsten ist die starke Zellzahlreduktion der Thrombozyten auf deren Aktivierung, Aggregation und Adhäsion

an die Oberflächen der Prothesen zu erklären. Es ist allgemein anerkannt, dass die strukturellen Eigenschaften einer Oberfläche Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung haben. Glattere Oberflächen mit kleinen Poren- und Faserdurchmessern verringern die Thrombogenität körperfremder Biomaterialien [35,36,57,58]. Ebenso wurde beobachtet, dass raue Oberflächen die Thrombozytenaktivierung und die Freisetzung aktivierender Mediatoren fördern [59]. Im Körper haben Thrombozyten frühzeitig Kontakt mit Endotheldefekten oder Fremdoberflächen in Gefäßen. Als elementarer Bestandteil der Blutgerinnung sind aktivierte Thrombozyten hauptverantwortlich für den Verschluss von Gefäßprothesen [35]. Auch im vorliegenden Versuch waren anhand der konfokalmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abb. 3) bereits deutliche Unterschiede bezüglich der Rauheit und Porengröße der einzelnen BNC-Prothesen zu erkennen. Es zeigte sich, dass Prothesen mit größerer Oberflächenrauheit, hier die DAC-Prothese ($R_z = 16.89$) und die INV-Prothese ($R_z = 13.39$), im Vergleich zu glatteren Oberflächen, der GLAS-Prothese ($R_z = 4.84$) und der ePTFE-Prothese ($R_z = 8.04$), deutlichere Thrombozytenabfälle im Sinne einer Aktivierung, Aggregation und Adhäsion aufwiesen. Bei der stichprobenartigen Fluoreszenzfärbung der Prothesenquerschnitte resultierten ähnliche Ergebnisse (siehe Abb. 13). Während bei der GLAS- und der ePTFE-Prothese nur geringe Zellhaftungen zu beobachten waren, waren besonders bei der INV- und der DAC-Prothese Zellaggregate hauptsächlich aus aktivierten Thrombozyten (grün) und wenigen Leukozyten (blau) zu erkennen. Somit konnte die erste Hypothese bestätigt werden. Die Vermutung, dass glattere BNC-Oberflächen zu einer geringeren Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation führen als rauere, konnte anhand der Zellzahlanalysen und der Fluoreszenzbildgebung belegt werden.

Weitere Faktoren, die zur Thrombozytenaktivierung durch Kontakt mit den Prothesenoberflächen führen, sind denkbar. Auch wenn diese in der vorliegenden Arbeit

nicht untersucht wurden, werden sie im Folgenden diskutiert. Ein entscheidender Faktor der Thrombozytenaktivierung könnte die von Oberflächen ausgelöste Proteinadsorption, d. h. die Anhaftung und die damit verbundene Aktivierung von Plasmaproteinen sein, die auch Thrombozyten einschließt. Normalerweise gilt die Annahme, dass hydrophobe Oberflächen (z. B. synthetische Prothesenmaterialien) eine stärkere Proteinadsorption aufweisen als hydrophile (z. B. Cellulose) [60]. Doch auch bei den synthetischen Prothesenmaterialien gibt es Unterschiede. Es konnte gezeigt werden, dass ePTFE im Vergleich zu PET eine höhere Resistenz gegen Proteinadsorption aufweist [61]. Das könnte auch erklären, warum es bei ePTFE zur geringsten Thrombozytenreduktion bei vergleichsweise mittlerer Rautiefe kommt. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass die Hydroxylgruppen der BNC-Oberflächen die Proteinadsorption begünstigen [62,63]. Eine poröse und dadurch vergrößerte Oberfläche erleichtert dabei die Wechselwirkungen zwischen Zelluloseeinheiten und Proteinen [64]. Daher könnte es möglich sein, dass die BNC-Prothesen durch ihre unterschiedlichen Oberflächenstrukturen auch unterschiedliche Adsorptionsfähigkeiten besitzen. Generell konnte der komplexe Prozess der Proteinadsorption schon an BNC-Oberflächen beobachtet werden [62,64], müsste jedoch für eine Aussage hinsichtlich des thrombogenen Potenzials in schmalkalibrigen Gefäßprothesen weiterführend untersucht werden.

Ein weiterer Grund für die deutlicheren Zellzahlreduktionen der Thrombozyten im Vergleich zu den Erythrozyten könnte die höhere Anfälligkeit für Scherkräfte sein, die im Chandler-Loop-Modell bislang jedoch nur unzureichend simuliert werden können [65,66]. Wechselnde Scherkräfte und Turbulenzen begünstigen nachweislich die Koagulation und die Thrombozytenaktivierung [67]. Auch der Luftkontakt des Blutes im Chandler-Loop-Modell sowie die Gasdurchlässigkeit der Prothesenmaterialien könnten eine pH-Wert-Änderung verursachen, die die Koagulation beeinflusst [68]. Als zukünftige Verbesserung könnte eine

Blut-pH-Validierung vor und nach der Inkubation in Betracht gezogen werden. Zudem sollte der Nutzen der Inkubation des gesamten Modells in einem CO₂-Inkubator evaluiert werden. Um die vielfältigen Einflussfaktoren der Thrombozytenaktivierung und der Gerinnung zu minimieren und Messungenauigkeiten durch Zellaggregate zu vermeiden, sollte bei weiteren Versuchen über den Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern, wie ASS oder Clopidogrel, nachgedacht werden. In der Gefäßchirurgie wird die duale Plättchenhemmung bei peripheren Prothesenbypassen bereits präoperativ empfohlen [69].

Bei den Leukozyten zeigten sich ebenfalls Zellzahlreduktionen nach 240 min Versuchszeit. Während es jedoch bei der GLAS- und der ePTFE-Prothese nur zu einem geringen Abfall der Leukozytenzahlen, also einer geringen Leukozytenaktivierung, kam, resultierte bei allen übrigen BNC-Prothesen ein deutlicher Abfall. In wenigen vorherigen Studien konnte bereits ein gleichgerichteter Zusammenhang zwischen der Leukozytenaktivierung und der Oberflächenrauheit gezeigt werden [70,71]. Dies bestätigt die Vermutung der zweiten Arbeitshypothese, dass glattere Oberflächen einen Vorteil hinsichtlich einer geringen Leukozytenaktivierung aufweisen.

In Verbindung mit dem gleichgerichteten Abfall der Thrombozytenzahlen wird der Zusammenhang zwischen Immunreaktion und Gerinnung im menschlichen Blut deutlich. Aktive Thrombozyten sind in der Lage, im Blut zirkulierende Leukozyten durch Chemotaxis und Cytokinausschüttung anzulocken und zu aktivieren [46]. Unter diesen proinflammatorischen Bedingungen können sich Leukozyten schnell verformen, um eine Oberfläche zur Sammlung und Aktivierung von Gerinnungsfaktoren bereitzustellen [72]. Die generelle systemische Thrombogenität wird so erhöht. Die im prokoagulatorischen Zustand freigesetzten Mediatoren der Leukozyten induzieren die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung und können die Gerinnungskaskade sowohl extrinsisch als auch intrinsisch

aktivieren [73]. In den immunhistologischen Färbungen zeigten sich passend dazu vermehrt auftretende Leukozyten (DAPI) in den Präparaten mit aktivierten Thrombozyten (siehe Abb. 13). Mehrheitlich ließ sich diese Reduktion der Leukozyten zudem auf eine abfallende Monozytenzahl im Differenzialblutbild zurückführen. Ein Zusammenhang könnte in der Bildung von Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten bestehen [54,74]. In einigen Studien konnten bereits vermehrte Monozyten-Thrombozyten-Aggregate bei systemischer Inflammation im Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen, wie pAVK und KHK, oder Infektionskrankheiten, wie dem Dengue-Fieber, Malaria und COVID-19, beobachtet werden [75,76,77,78]. Durch die Bindung von Thrombozyten an Monozyten werden diese unter anderem zur Ausschüttung von Mediatoren zur Steigerung der Gefäßpermeabilität angeregt [79]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel verstärken [76]. In weiteren Versuchen müssten die Monozyten-Thrombozyten-Aggregate quantifiziert werden, um diese Überlegungen zu prüfen. Dass dies prinzipiell auch im Chandler-Loop-Modell möglich ist, wurde in Forschungen der Arbeitsgruppe Wippermann bereits nachgewiesen [54].

Generell sind die Funktionen der Monozyten Phagozytose, Migration und Differenzierung von Makrophagen. Im Blut stellen sie weiterhin die größte Quelle an Tissue-Faktor (TF, FIII) dar, einem Gerinnungsfaktor, der normalerweise subendothelial exprimiert wird und die Gerinnungskaskade bei Kontakt mit geschädigtem Endothel extrinsisch aktiviert [74]. Durch Kontakt mit aktivierten Thrombozyten können auch Monozyten TF ausschütten. Kleinere Mengen TF konnten ebenso bei aktivierten neutrophilen Granulozyten gefunden werden [80][81]. Unter Stimulation setzen neutrophile Granulozyten und Monozyten außerdem bestimmte Metallo- und Serinproteasen frei, die durch diverse Mechanismen die Gerinnungsaktivität erhöhen [73]. Dazu gehört die Katalyse der Aktivierung von Faktor V

(FV) auf der Monozytenoberfläche [82] oder die Aktivierung von Faktor X (FX) durch Granulaenzyme [83], aber auch die Inaktivierung von Antithrombin III durch Belegung der Bildungsstellen mit granulozytärer Elastase [84]. Durch die Vielfältigkeit und die Wirkkraft der Abwehrmechanismen durch Monozyten und Makrophagen besitzt ihre Reaktion auf Fremdmaterial einen hohen Stellenwert für die Thrombogenität der Oberflächen [85]. So wurde bereits beobachtet, dass die Immunantwort auf Oberflächenladungen unterschiedlich ausfällt. Bei anionischen Oberflächen wurden proinflammatorische Mechanismen ausgelöst, während kationische Oberflächen keine deutliche Reaktion hervorriefen und als inert galten [86]. Darin kann ein wichtiger Ansatz zur weiteren Verbesserung der BNC-Prothesen liegen, der bei weiteren Modifikationen beachtet werden sollte.

Weitere Schlussfolgerungen zu der Leukozytenaktivierung und den Funktionen der einzelnen Untergruppen lassen sich vorerst nicht aus den Analysen der Differenzialblutbilder ziehen, da sie nicht zwangsläufig mit einer Zellzahlreduktion einhergehen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Immunantwort

In dieser Studie wurde die cfDNA im Plasma zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Insgesamt zeigte sich über die vierstündige Versuchsdauer hinweg eine deutliche Erhöhung der freien DNA in allen Prothesen sowie der Kontrollgruppe, ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Hintergrund der Messung ist ein Abwehrmechanismus des Immunsystems, ‚ETose‘ (ET: Extracellular Traps) genannt, der bisher hauptsächlich bei neutrophilen Granulozyten beobachtet wurde. Bei diesem handelt es sich um die Freisetzung von Chromatinfasern, gemischt mit Histonen und antibakteriell wirksamen Proteinen. Mittlerweile ist bekannt, dass auch andere Leukozytengruppen in der Lage sind, ähnliche ‚Fangnetze‘ auszustoßen

[87,88,89,90]. In Studien wurde die cfDNA bereits stellvertretend für ETs ermittelt [91,92,93]. Der Prozess kann durch aktivierte Thrombozyten vermittelt stattfinden. Diese exprimieren beispielsweise das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1), das sonst von nekrotisierenden Zellen abgegeben wird, [94] oder binden über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), dessen Gruppe Teil der angeborenen Immunabwehr ist, an neutrophile Granulozyten [95]. Ebenso aktivieren die Bestandteile der ETs, die für sich genommen schon proinflammatorisch und -koagulatorisch wirken, wiederum neue Thrombozyten. Extrazelluläre Histone können Endothelschäden hervorrufen und sind maßgeblich an der Bildung von Makro- sowie Mikrothromben beteiligt [96]. Jedoch konnte bei der Messung kein Zusammenhang zwischen der cfDNA und den Thrombozytenzahlen oder den TAT-Komplexen, als Marker der Gerinnungsaktivität, hergestellt werden. Eventuell ist dabei der Zeitfaktor entscheidend. In bisherigen Studien wurden unterschiedliche Zeitspannen bis zur ET-Freisetzung und -Messung angegeben. Teilweise konnten sie bereits 5 min [95], teilweise auch erst 220 min nach Aktivierung der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [97]. Die Zellzahlreduktionen der Leukozyten im Differenzialblutbild konnten ebenfalls nicht in einen Zusammenhang mit den quantitativen Messungen der cfDNA gebracht werden. Somit liegt die Annahme nahe, dass die ETose nicht zwangsläufig mit der Apoptose der Zelle einhergeht. Dieser Umstand wurde auch schon in anderen Studien beobachtet [97,98].

Ein weiterer gemessener Parameter im Versuchsaufbau waren die ROS. Über die gesamte Versuchszeit hinweg zeigte sich bei den ROS in allen Prothesen und der Kontrollgruppe nur ein geringer Anstieg, wobei keine signifikanten Unterschiede auftraten. Physiologisch entstehen die ROS als Nebenprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien, können aber auch von Leukozyten oder Thrombozyten im Rahmen der Inflammations- oder Gerinnungsreaktion gebildet werden. Sie unterstützen beispielsweise die Phagozytose und

konnten bereits in Zusammenhang mit thrombotischen Ereignissen im Herz-Kreislauf-System gebracht werden [99]. Zu den ROS gehören unter anderem Sauerstoffperoxid (H_2O_2), Hyperoxid-Anion (O_2^-), Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Es gilt als bewiesen, dass die ROS-Produktion ein Auslöser der ET-Bildung ist [100]. Zum einen kann das membrangängige H_2O_2 , wie PMA, als ET-Stimulator eingesetzt werden [97]. Zum anderen wird unter Behandlung mit einem Oxidase-Blocker auch die ET-Produktion deutlich abgeschwächt [101]. Im vorliegenden Versuch konnte jedoch die Freisetzung einer großen Menge an cfDNA nicht durch eine ebenso starke ROS-Bildung untermauert werden. Allerdings sind ROS, wie alle Radikale, sehr instabil und lassen sich schwer messen. So haben einige eine extrem kurze Halbwertszeit zwischen 7 und 10^{-9} Sekunden, während andere noch nach einigen Stunden bis Tagen nachweisbar sind [102]. Die Detektion erfolgte mittels Dihydrorhodamin 123 (DHR 123), das in Gegenwart von ROS zu Rhodamin 123 oxidiert [103,104]. Diese Methode gilt als geeignet für die unspezifische Bestimmung von Radikalen [105,106]. Dennoch gibt es Schwächen bezüglich der Genauigkeit der Messungen, vor allem bedingt durch die Detektierung unerwünschter Nebenreaktionen [107]. Trotzdem kann insgesamt von einem niedrigen zellulären oxidativen Stresslevel sowohl in den BNC-Prothesen als auch in den synthetischen Prothesen ausgegangen werden. Daher muss die zweite Arbeitshypothese, dass Prothesen mit glatterer Oberfläche zu einer geringeren Aktivierung immunologischer Abwehrmechanismen führen, teilweise abgelehnt werden. Die Ergebnisse der cfDNA- und ROS-Messungen sind unabhängig von der Oberflächenrauheit. Des Weiteren war die cfDNA-Freisetzung insgesamt in allen Prothesen erhöht, während sich der ROS-Wert bei allen Prothesen im Versuchsverlauf kaum änderte. Die vermutete geringere Leukozytenaktivierung konnte, aufgrund der Zellzahlanalysen (siehe Kap. 4.2), jedoch bestätigt werden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Gerinnungskaskade

Die TAT-Bestimmung zeigte erhöhte Werte in allen Prothesen über den gesamten Versuchszeitraum, auch in der Kontrolle. Die GLAS-Prothese lag, wie die synthetischen Prothesen, im Bereich der Kontrollgruppe und wies die niedrigste TAT-Aktivierung auf, während die GOO- und die STD-Prothese signifikant erhöht waren. Das bestätigt die dritte Arbeitshypothese, dass glattere BNC-Oberflächen eine geringere Aktivierung der Gerinnungskaskade auslösen als rauere. Das generell leicht erhöhte TAT-Level ist wahrscheinlich auch auf eine Aktivierung durch die Blutabnahme, die Versuchsvorbereitungen und den Luftkontakt zurückzuführen [54,55,68]. In vorherigen Studien wurde ebenso nur eine geringe Gerinnungsaktivierung durch BNC-Oberflächen beobachtet [22,108]. TAT-Komplexe wurden in den Versuchsaufbau einbezogen, da sie als indirekter Marker der Gerinnungsaktivität gelten [109]. Ihre Bildung sorgt normalerweise für ein Gleichgewicht von Gerinnung und Lyse im Blut.

Ebenso wie durch Zellaktivierung freigesetzte Mediatoren oder Fremdoberflächen ist auch Thrombin in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren. Daher lohnt sich eine gemeinsame Betrachtung der Thrombozytenzahlen und der TAT-Konzentrationen. Die TAT-Komplexe haben sich generell über die Versuchsdauer erhöht, während die Thrombozytenzahlen, außer in der Kontrollgruppe und bei der ePTFE-Prothese, mäßig bis deutlich niedriger waren. So kann auf eine generelle Gerinnungsaktivität mit Thrombozytenadhäsion und -aggregation im Versuchsaufbau geschlossen werden. Allerdings zeigten beide Messungen nicht den erwartet starken Zusammenhang. Die INV- und die PT-Prothese wiesen bei erheblicher Zellzahlreduktion lediglich eine TAT-Erhöhung leicht über den Kontrollwerten auf. Dies könnte zum Teil an einem physiologischen Effekt liegen: So ist bekannt, dass sich Thrombozyten im Randbereich der Gefäße in höherer Konzentration bewegen [110,111,112].

Um den Strömungswiderstand zu verringern, fließen die größeren Erythrozyten in der Gefäßmitte und drücken kleinere Blutbestandteile, wie die Thrombozyten, an den Rand. Dies bietet im lebenden Organismus den Vorteil, dass die Thrombozyten umgehend auf Endothelschäden oder Botenstoffe, die durch Scherkräfte von Endothelzellen freigesetzt werden, reagieren können. Im Versuch hingegen könnte es dazu führen, dass vor allem Thrombozyten in die Poren der Prothesenoberflächen gedrückt werden, ohne dabei aktiviert zu werden und zur Gerinnungsaktivierung beizutragen. Die immunhistologische Untersuchung bestätigte die vermehrte Thrombozytenanhaftung bei den Prothesen mit der größten Rautiefe, der DAC- ($R_z = 16,89$), der INV- ($R_z = 13,39$) und der STD-Prothese ($R_z = 9,95$). Auch die geringen Zellanhaftungen bei der GLAS-Prothese ($R_z = 4,84$) konnten mittels Immunfluoreszenz visualisiert werden. Ein weiterer Grund für die Unterschiede bezüglich der Zellzahlen und TAT-Komplexe könnte die Thrombozytenaktivierung über vermehrte Hydroxylgruppen an manchen BNC-Oberflächen sein, abhängig vom Herstellungsverfahren (siehe Tab. 2 und 3). Diese zugänglichen Hydroxylgruppen könnten zu einer höheren Proteinadsorption und einer daraus resultierenden Aktivierung des Gerinnungssystems führen [113]. Weiterhin wurde bereits beobachtet, dass besonders getrocknetes BNC, wie bei der PT-Prothese, reich an Hydroxylgruppen ist [63].

4.5 Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Komplementkaskade

Bei allen BNC-Prothesen zeigte sich eine starke Aktivierung der Komplementkaskade, im Gegensatz zu den synthetischen Prothesen, deren Werte im Bereich derer der Kontrollgruppe lagen. Das Komplementsystem gehört, wie die Monozyten und die Granulozyten zur unspezifischen, körpereigenen Immunabwehr. Es kann unverzüglich auf das Eindringen von Pathogenen reagieren und wird bereits bei Infektionsgefahr oder

Gewebeschädigungen aktiviert [114]. Die in der Studie untersuchten Komponenten, C3a und sC5b9, liegen auf der gemeinsamen Endstrecke der verschiedenen Aktivierungswege und sind als Parameter geeignet, um das gesamte Komplementsystem widerzuspiegeln [51,115]. In vorherigen Studien wurde bereits beobachtet, dass BNC-Prothesen eine deutlich höhere Komplementaktivierung hervorrufen als synthetische Prothesen, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt [22,108]. Genaue Ursachen dazu sind noch nicht bekannt, es wird jedoch auch bezüglich der Komplementaktivierung ein Zusammenhang mit funktionellen Oberflächengruppen vermutet [116]. Es ist bekannt, dass BNC viele freie OH-Gruppen enthält [40,117], die ursächlich für die Komplementaktivierung sein könnten. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den hier untersuchten Gruppen festgestellt werden. In folgenden Versuchen zur Verbesserung der Kompatibilität sollte näher auf die chemischen Eigenschaften der BNC-Oberfläche eingegangen werden, indem die freien OH-Gruppen reduziert oder modifiziert werden. Die Oberflächenrauheit dürfte zumindest über die Thrombozytenaktivierung einen Beitrag zur Komplementaktivität liefern.

Es ist nachgewiesen, dass Proteine beider Systeme, der Gerinnung und des Komplements, sich gegenseitig aktivieren können. Unter anderem können aktive Thrombozyten, Thrombin und Plasmin Komplementbestandteile spalten [118,119], während C3a und sC5b9 wiederum die Thrombozytenaktivierung und -aggregation fördern [120]. Es gibt bereits Studien, in denen ein stärkerer Einfluss auf die Inflammationsreaktion bei sC5b9 beobachtet wurde. Dessen Hemmung minimiert eine komplementinduzierte Entzündung demnach effektiver als die Hemmung von C3a [121]. Während sich bei den C3a-Bestimmungen bei allen BNC-Prothesen hohe Werte ergaben, sind die Ergebnisse der sC5b9-Messungen weniger einheitlich. So zeigte sich besonders bei der GLAS-Prothese tendenziell weniger sC5b9 als

bei den anderen BNC-Prothesen. Eine Signifikanz ließ sich jedoch nicht ableiten. Somit wurde die vierte Arbeitshypothese, dass glattere BNC-Prothesenoberflächen zu einer geringeren Komplementaktivierung führen, insgesamt widerlegt. Alle BNC-Oberflächen lösen, unabhängig von der Rauheit, eine deutlich stärkere Komplementantwort aus als synthetische. Lediglich eine Messung deutet auf eine Tendenz in Richtung der Hypothese hin, da die GLAS-Prothese das niedrigste sC5b9-Level unter allen BNC-Prothesen aufwies.

5 Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenmodifikationen einen positiven Einfluss auf die Biokompatibilität der BNC-Prothesen hatten. Besonders die GLAS-Prothese mit einer Oberfläche, die ohne Kontakt zu Fremdmaterial geformt worden war und durch eine niedrige Rauheit charakterisiert ist, führte zu vielversprechenden Werten bezüglich der Zellzahlanalysen und der Gerinnungsaktivität, was die Richtung der formulierten Arbeitshypothesen, dass glattere Oberflächen eine bessere Biokompatibilität aufweisen, bestätigt. Auch die Immunreaktion des Blutes auf die BNC-Oberflächen fiel insgesamt mild aus. Trotzdem bleibt als größter Schwachpunkt die fehlende Endothelauskleidung im Chandler-Loop-Modell. Demnach kann bisher nur gemutmaßt werden, dass die positiven Veränderungen in den Blutanalysen ebenso positive Auswirkungen auf die Ergebnisse von In-vivo-Experimenten hätten.

Zuvor sollte allerdings der Einfluss der viel besprochenen Ladungen der BNC-Oberflächen weiter untersucht werden. Generell entscheidend zur Vermeidung bisher bekannter Komplikationen schmalkalibriger Gefäßprothesen, wie Thrombosierung, Intimahyperplasie und Abstoßungsreaktionen, ist eine schnelle, funktionierende Endothelauskleidung der Prothesen in situ [122,123]. Entscheidend dafür sind das Einwachsen vaskulärer Endothelzellen aus den Anastomosenregionen und das Anheften zirkulierender Endothelvorläuferzellen [124]. Tatsächlich gibt es Oberflächenbeschichtungen, die diesen Proteinen ähneln und zu vielversprechenden Ergebnissen im Hinblick auf die Adhäsion von Endothelzellen führen [125,124]. Interessante Ansätze könnten Beschichtungen der BNC-Prothesen mit Fibronectin, Heparin-Chitosan oder Albumin sein [28,126,127,128].

6 Zusammenfassung

Es besteht ein zunehmender Bedarf an schmalkalibrigen Gefäßprothesen mit überlegener Blutkompatibilität. Daher wurde untersucht, ob die Modifizierung der inneren Oberflächen die Blutkompatibilität von Prothesen aus bakterieller Nanozellulose (BNC) verbessert.

Versuchsgegenstand waren fünf verschiedene Prothesen, synthetisiert in einem Bioreaktor, die sich durch unterschiedliche Oberflächenrauigkeiten auszeichneten. Die Prothesen wurden mit heparinbeschichteten Polyvinylchlorid(PVC)-Schläuchen verbunden, mit Probandenblut befüllt und vier Stunden in einem Chandler-Loop-Modell bei 37.0 °C rotiert. Dann wurde das Blut in Bezug auf Zellzahlen, oxidative Produkte, lösliches Komplement und Gerinnungsmarker analysiert. Die Ergebnisse wurden mit den entsprechenden Werten zu klinisch zugelassenen Prothesen aus Polyethylenterephthalat (DAC) und expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) verglichen. Die Modifikation mit der geringsten Oberflächenrauigkeit (GLAS), zeigte mit weniger als 10 % Leukozyten- und weniger als 50 % Thrombozytenverlust überlegene Ergebnisse im Vergleich zu raueren BNC-Prothesenoberflächen, die teilweise mehr als 65 % Leukozyten- und mehr als 90 % Thrombozytenverlust aufwiesen. Nicht alle Analyseparameter zeigten diese deutlichen Unterschiede. So unterschied sich die Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies und zellfreier DNA nicht signifikant und alle Modifikationen der BNC-Prothesen wiesen eine verstärkte Komplementaktivierung auf. Insgesamt verbesserten einige Modifikation der inneren Kontaktflächen die Biokompatibilität der BNC-Prothesen erheblich. Insbesondere die GLAS-Modifikation, mit der geringsten Oberflächenrauigkeit, zeigte vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Zellzahlreduktionen sowie eine signifikant verminderte Aktivierung des Gerinnungssystems. Weitere Verfahren zur Steigerung der Verträglichkeit und Tierversuche zur Untersuchung der Langzeitentwicklung sind erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). 2021 [cited 10 Mar 2022]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen. Zahl der Todesfälle im Jahr 2019 um 1,6 % gesunken [cited 16 Aug 2021]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html;jsessionid=05BF193429737064CF4C36720F1094D3.live732>.
3. KHK: Bypass langfristig besser als Stent. 27.03.2012. Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/49663/KHK-Bypass-langfristig-besser-als-Stent>.
4. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet J-P, Cremer J, Falk V, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*. 2014; 35:2541–619. Epub 2014/08/29. doi: 10.1093/eurheartj/ehu278 PMID: 25173339.
5. Deutscher Herzbericht 2020.
6. Weintraub WS, Grau-Sepulveda MV, Weiss JM, O'Brien SM, Peterson ED, Kolm P, et al. Comparative effectiveness of revascularization strategies. *N Engl J Med*. 2012; 366:1467–76. Epub 2012/03/27. doi: 10.1056/NEJMoa1110717 PMID: 22452338.
7. Gaudino M, Glieca F, Luciani N, Pragliola C, Tsiopoulos V, Bruno P, et al. Systematic bilateral internal mammary artery grafting. Lessons learned from the CATHolic University EXTensive BIMA Grafting Study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018; 54:702–7. doi: 10.1093/ejcts/ezy148 PMID: 29672700.
8. Rodriguez E, Ormont ML, Lambert EH, Needleman L, Halpern EJ, Diehl J. T., et al. The role of preoperative radial artery ultrasound and digital plethysmography prior to coronary artery bypass grafting. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*; 2001:135–9.
9. Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery*; 1979:253–6.
10. Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C. Development of small-diameter vascular grafts. *World J Surg*. 2007; 31:682–9. doi: 10.1007/s00268-006-0731-z PMID: 17345123.
11. Voorhees AB. The Development of Arterial Protheses. A Personal View. *Arch Surg*. 1985:289ff.
12. Eidt D. et al. Bypassmaterialien in der Gefäßchirurgie. HTA-Bericht 31. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI); 2006.
13. Wippermann J, Schumann D, Klemm D, Kosmehl H, Salehi-Gelani S, Wahlers T. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009; 37:592–6. doi: 10.1016/j.ejvs.2009.01.007 PMID: 19231251.
14. Bravo C., Tichy F., Misek I., Horky D., Stastna M., Valka J., et al. Patency failures in microvascular prosthetic grafts. *Acta vet. Brno*; 1997:183–8.
15. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose D arti®cial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*; 2011:1561–603.

16. Lidman D. H., Daniel R. K. Expanded polytetrafluoroethylene as a microvascular graft: An experimental study. *Journal of Microsurgery*; 1980:447–56.
17. Michael Weyand, MD, Sebastian Kerber, MD, Christof Schmid, MD, Norbert Rolf, MD, and Hans H. Scheld, MD. Coronary Artery Bypass Grafting With an Expanded Polytetrafluoroethylene Graft. *the annals of thoracic surgery*; 1999:1240–4.
18. Tomizawa Y. Vascular Prosthesis for Aortocoronary Bypass Grafting: A Review. *Artificial Organs*; 1995:39–45.
19. Fang S, Riber SS, Hussein K, Ahlmann AH, Harvald EB, Khan F, et al. Decellularized human umbilical artery: Biocompatibility and in vivo functionality in sheep carotid bypass model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020; 112:110955. Epub 2020/04/12. doi: 10.1016/j.msec.2020.110955 PMID: 32409090.
20. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *The Lancet*. 2009; 373:1440–6. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60248-8.
21. Silver GM, Katske GE, Stutzman FL, Wood NE. Umbilical vein for aortocoronary bypass. *Angiology*. 1982; 33:450–3. doi: 10.1177/000331978203300704 PMID: 6979956.
22. Fink H, Hong J, Drotz K, Risberg B, Sanchez J, Sellborn A. An in vitro study of blood compatibility of vascular grafts made of bacterial cellulose in comparison with conventionally-used graft materials. *J Biomed Mater Res A*. 2011; 97:52–8. doi: 10.1002/jbm.a.33031 PMID: 21308986.
23. Scherner M, Reutter S, Klemm D, Sterner-Kock A, Guschlbauer M, Richter T, et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes. Proof of concept. *J Surg Res*. 2014; 189:340–7. doi: 10.1016/j.jss.2014.02.011 PMID: 24726059.
24. Kenji Kamide. *Cellulose and Cellulose Derivatives. Molecular Characterization and its Applications*. 1st ed. Elsevier; 2005.
25. Klemm D, Heublein B, Fink H-P, Bohn A. Cellulose. Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005; 44:3358–93. doi: 10.1002/anie.200460587 PMID: 15861454.
26. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 76:431–8. doi: 10.1002/jbm.a.30570 PMID: 16278860.
27. Märtson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials*. 1999; 20:1989–95. doi: 10.1016/S0142-9612(99)00094-0.
28. Oliveira Barud HG de, da Silva RR, da Silva Barud H, Tercjak A, Gutierrez J, Lustri WR, et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications. Bacterial cellulose. *Carbohydr Polym*. 2016; 153:406–20. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.059 PMID: 27561512.
29. Conte MS. The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail. *The FASEB Journal*; 1998:43–5.
30. Schumann DA, Wippermann J, Klemm DO, Kramer F, Koth D, Kosmehl H, et al. Artificial vascular implants from bacterial cellulose. Preliminary results of small arterial substitutes. *Cellulose*. 2009; 16:877–85. doi: 10.1007/s10570-008-9264-y.
31. Weber C, Reinhardt S, Eghbalzadeh K, Wacker M, Guschlbauer M, Maul A, et al. Patency and in vivo compatibility of bacterial nanocellulose grafts as small-diameter vascular substitute. *J Vasc Surg*. 2018; 68:177S-187S.e1. doi: 10.1016/j.jvs.2017.09.038 PMID: 29248244.
32. Wippermann J. Gefäße aus Papier. *Z Herz- Thorax- Gefäßchir*. 2010; 24:251–6. doi: 10.1007/s00398-010-0797-7.

33. Fang S, Ellman DG, Andersen DC. Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large Animals and Humans. *Cells*. 2021; 10. doi: 10.3390/cells10030713 PMID: 33807009.
34. Lopera Higueta M, Griffiths LG. Small Diameter Xenogeneic Extracellular Matrix Scaffolds for Vascular Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020; 26:26–45. Epub 2019/11/27. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0229. PMID: 31663438.
35. Kämmerer PW, Gabriel M, Al-Nawas B, Scholz T, Kirchmaier CM, Klein MO. Early implant healing. Promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetical titanium surface modifications in vitro. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23:504–10. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02153.x PMID: 21435015.
36. Hecker J. F., Scandrett L. A. Roughness and thrombogenicity of the outer surfaces of intravascular catheters. *Journal of biomedical materials research.*; 1985:381–95.
37. Deutsches Institut für Normung e.V. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 4: Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut; 11.100.20; Dezember 2017 [updated Dezember 2017].
38. Weber M, Steinle H, Golombek S, Hann L, Schlensak C, Wendel HP, et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018; 6:99. Epub 2018/07/16. doi: 10.3389/fbioe.2018.00099 PMID: 30062094.
39. Klemm D, Udhardt U, Marsch S, Schumann D. Method and device for producing shaped microbial cellulose for use as biomaterial, especially for microsurgery.; 2003; 13. Feb. 2001 [updated 2001 Feb 13].
40. Wacker M, Kießwetter V, Slottosch I, Awad G, Paunel-Görgülü A, Varghese S, et al. In vitro hemo- and cytocompatibility of bacterial nanocellulose small diameter vascular grafts: Impact of fabrication and surface characteristics. *PLoS ONE*. 2020; 15:e0235168. Epub 2020/06/24. doi: 10.1371/journal.pone.0235168 PMID: 32579611.
41. Oberflächen & Rauheitswerte. Rt, Rmax, Rz, Ra, Rp, Rmr [cited 17 Aug 2021]. Available from: <https://www.technisches-zeichnen.net/technisches-zeichnen/diverses/rauheitswerte.php>.
42. A. B. Chandler. In Vitro Thrombotic Coagulation of the Blood. A Method for Producing a Thrombus. *Laboratory investigation*; 1958.
43. Bandyk DF, Galbraith TA, Haasler GB, Almassi G. Blood flow velocity of internal mammary artery and saphenous vein grafts to the coronary arteries. *Journal of Surgical Research*. 1988; 44:342–51. doi: 10.1016/0022-4804(88)90176-X.
44. Hirsh J. Relationship between dose, anticoagulant effect and the clinical efficacy and safety of heparin. *Adv Exp Med Biol*. 1992; 313:283–95. doi: 10.1007/978-1-4899-2444-5_28 PMID: 1442265.
45. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2003; 24:2166–79. doi: 10.1016/j.ehj.2003.08.021 PMID: 14659768.
46. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*. 2015; 114:449–58. Epub 2015/08/13. doi: 10.1160/TH14-12-1067 PMID: 26293514.
47. Karsten U, Butschak G, Stahn R, Goletz S. A novel series of anti-human glycoprotein A (CD235a) antibodies defining five extra- and intracellular epitopes. *Int Immunopharmacol*. 2010; 10:1354–60. Epub 2010/08/19. doi: 10.1016/j.intimp.2010.08.001 PMID: 20727998.
48. Chazotte B. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011; 2011:pdb.prot5556. Epub 2011/01/01. doi: 10.1101/pdb.prot5556 PMID: 21205856.

49. Marc Golightly P. DHR Test for CGD. Dihydrorhodamine (DHR) flow cytometry test for Chronic Granulomatous Disease (CGD): A simple test for routine clinical flow cytometry. ICCS e-Newsletter; 2011.
50. Kim Y.-M., Hong S.-J., Billiar T. R., Simmons R. L. Counterprotective Effect of Erythrocytes in Experimental Bacterial Peritonitis Is Due to Scavenging of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Intermediates. *Infection and Immunity*; 1996:3074–80.
51. Gong et al. Tubing Loops as a Model for Cardiopulmonary Bypass Circuits: Both the Biomaterial and the Blood-Gas Phase Interfaces Induce Complement Activation in an in Vitro Model. *Journal of Clinical Immunology*; 1996.
52. van Oeveren W, Tielliu IF, Hart J de. 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; 2012:673163. doi: 10.1155/2012/673163 PMID: 22649450.
53. Sinn S, Scheuermann T, Deichelbohrer S, Ziemer G, Wendel HP. A novel in vitro model for preclinical testing of the hemocompatibility of intravascular stents according to ISO 10993-4. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22:1521–8. Epub 2011/05/21. doi: 10.1007/s10856-011-4335-2 PMID: 21604053.
54. Wacker M, Betke U, Borucki K, Hülsmann J, Awad G, Varghese S, et al. An In Vitro Hemodynamic Loop Model to Investigate the Hemocytocompatibility and Host Cell Activation of Vascular Medical Devices. *J Vis Exp*. 2020. Epub 2020/08/21. doi: 10.3791/61570 PMID: 32894265.
55. Thorsen T, Klausen H, Lie RT, Holmsen H. Bubble-induced aggregation of platelets: effects of gas species, proteins, and decompression. *Undersea & Hyperbaric Medicine : Journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society*. 01 Jun 1993;20(2):101-119.
56. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293:1653–62. doi: 10.1001/jama.293.13.1653 PMID: 15811985.
57. Milleret V, Hefti T, Hall H, Vogel V, Eberli D. Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. *Acta Biomater*. 2012; 8:4349–56. doi: 10.1016/j.actbio.2012.07.032 PMID: 22842036.
58. Telemeco TA, Ayres C, Bowlin GL, Wnek GE, Boland ED, Cohen N, et al. Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning. *Acta Biomater*. 2005; 1:377–85. doi: 10.1016/j.actbio.2005.04.006 PMID: 16701819.
59. Weiss R, Spittler A, Schmitz G, Fischer MB, Weber V. Thrombocyte adhesion and release of extracellular microvesicles correlate with surface morphology of adsorbent polymers for lipid apheresis. *Biomacromolecules*. 2014; 15:2648–55. Epub 2014/05/30. doi: 10.1021/bm500492r PMID: 24844344.
60. Vogler EA. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*. 2012; 33:1201–37. Epub 2011/11/14. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.059 PMID: 22088888.
61. Falkenback D, Lundberg F, Ribbe E, Ljungh A. Exposure of plasma proteins on Dacron and ePTFE vascular graft material in a perfusion model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000; 19:468–75. doi: 10.1053/ejvs.1999.1075 PMID: 10828226.
62. Osorio M, Cañas A, Puerta J, Díaz L, Naranjo T, Ortiz I, et al. Ex Vivo and In Vivo Biocompatibility Assessment (Blood and Tissue) of Three-Dimensional Bacterial Nanocellulose Biomaterials for

- Soft Tissue Implants. *Sci Rep.* 2019; 9:10553. Epub 2019/07/22. doi: 10.1038/s41598-019-46918-x PMID: 31332259.
63. Wei Q, Becherer T, Angioletti-Uberti S, Dzubiella J, Wischke C, Neffe AT, et al. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014; 53:8004–31. Epub 2014/07/15. doi: 10.1002/anie.201400546 PMID: 25045074.
 64. Satyanarayana K.G., Rangan A., Prasad V.S., Esteves Magalhaes W.L. Preparation, Characterization, and Applications of Nanomaterials (Cellulose, Lignin, and Silica) from Renewable (Lignocellulosic) Resources. *Handbook of Composites from Renewable Materials.* 2017.
 65. Anderson GH, Hellums JD, Moake JL, Alfry Jr CP. Platelet lysis and aggregation in shear fields. *Blood Cells;* 1978;4(3):499-511.
 66. van Oeveren W. Obstacles in haemocompatibility testing. *Scientifica (Cairo).* 2013; 2013:392584. Epub 2013/05/07. doi: 10.1155/2013/392584 PMID: 24278774.
 67. Jacek J. Paszkowiak, Alan Dardik. Arterial Wall Shear Stress: Observations from the Bench to the Bedside. *Vascular and Endovascular Surgery;* 2003:47–58.
 68. Foley ME, Mcnicol GP. AN IN-VITRO STUDY OF ACIDOSIS, PLATELET FUNCTION, AND PERINATAL CEREBRAL INTRAVENTRICULAR HÆMORRHAGE. *The Lancet.* 1977; 309:1230–2. doi: 10.1016/S0140-6736(77)92438-2.
 69. Lawall H, Huppert P, Rügenapf G. S3-Leitlinie PAVK - Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin 2016 [cited 6 Feb 2022]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/065-003l_S3_PAVK_periphere_arterielle_Verschlusskrankheit_2020-05.pdf.
 70. Spiller D, Mirtelli C, Losi P, Briganti E, Sbrana S, Counoupas S, et al. In vitro evaluation of the PETU-PDMS material immunocompatibility: the influence of surface topography and PDMS content. *J Mater Sci Mater Med.* 2009; 20:2511–20. doi: 10.1007/s10856-009-3823-0 PMID: 19756971.
 71. Recum AF von, van Kooten TG. The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1995; 7:181–98. doi: 10.1163/156856295x00698 PMID: 7654632.
 72. Tracy P. B., Eide L. L., Mann K. G. Human Prothrombinase Complex Assembly and Function on Isolated Peripheral Blood Cell Populations. *the journal of biological chemistry;* 1985:2119–24.
 73. Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood.* 2016; 128:753–62. doi: 10.1182/blood-2016-05-718114 PMID: 27354721.
 74. Shantsila E, Lip GYH. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb Haemost.* 2009; 102:916–24. doi: 10.1160/TH09-01-0023 PMID: 19888530.
 75. Campbell RA, Franks Z, Bhatnagar A, Rowley JW, Manne BK, Supiano MA, et al. Granzyme A in Human Platelets Regulates the Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Monocytes in Aging. *J Immunol.* 2018; 200:295–304. Epub 2017/11/22. doi: 10.4049/jimmunol.1700885 PMID: 29167233.
 76. Dann R, Hadi T, Montenont E, Boytard L, Alebrahim D, Feinstein J, et al. Platelet-Derived MRP-14 Induces Monocyte Activation in Patients With Symptomatic Peripheral Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology.* 2018; 71:53–65. doi: 10.1016/j.jacc.2017.10.072. PMID: 29301628.

77. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri C, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased Platelet Reactivity and Circulating Monocyte-Platelet Aggregates in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998; 31:352–8. doi: 10.1016/s0735-1097(97)00510-x.
78. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pão CRR, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*. 2020; 136:1330–41. doi: 10.1182/blood.2020007252 PMID: 32678428.
79. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, Assis EF de, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol*. 2014; 193:1864–72. Epub 2014/07/11. doi: 10.4049/jimmunol.1400091 PMID: 25015827.
80. Maugeri N., Brambilla M., Camera M., Carbone A., Tremoli E., Donati M. B., et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *Journal of thrombosis and haemostasis*; 2006:1323–30.
81. Maugeri N., De Geatano G., Carbone A., Donati M. B., Cerletti C. More on: tissue factor in neutrophils. *Journal of thrombosis and haemostasis*; 2005.
82. Allen D. H., Tracy P. B. Human Coagulation Factor V is Activated to the Functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *the journal of biological chemistry*; 1995:1408–15.
83. Plescia J., Altieri D. C. Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation. *the biochemical Journal*; 1996:873–9.
84. Jochum M., Lander S., Heimburger N., Fritz H. Effect of Human Granulocytic Elastase on Isolated Human Antithrombin III. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie*; 1981:103–12.
85. Čolić M, Tomić S, Bekić M. Immunological aspects of nanocellulose. *Immunol Lett*. 2020; 222:80–9. Epub 2020/04/09. doi: 10.1016/j.imlet.2020.04.004. PMID: 32278785.
86. Hua K, Ålander E, Lindström T, Mihriyan A, Strømme M, Ferraz N. Surface Chemistry of Nanocellulose Fibers Directs Monocyte/Macrophage Response. *Biomacromolecules*. 2015; 16:2787–95. Epub 2015/08/18. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00727 PMID: 26247827.
87. Chow OA, Köckritz-Blickwede M von, Bright AT, Hensler ME, Zinkernagel AS, Cogen AL, et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2010; 8:445–54. doi: 10.1016/j.chom.2010.10.005 PMID: 21075355.
88. Köckritz-Blickwede M von, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008; 111:3070–80. doi: 10.1182/blood-2007-07-104018 PMID: 18182576.
89. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, et al. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J Immunol*. 2014; 192:5314–23. doi: 10.4049/jimmunol.1303418 PMID: 24771850.
90. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008; 14:949–53. doi: 10.1038/nm.1855 PMID: 18690244.
91. Paunel-Görgülü A, Wacker M, El Aita M, Hassan S, Schlachtenberger G, Deppe A, et al. cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Sci Rep*. 2017; 7:17421. doi: 10.1038/s41598-017-17561-1 PMID: 29234042.

92. Wang H, Sha L-L, Ma T-T, Zhang L-X, Chen M, Zhao M-H. Circulating Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not a Useful Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *PLoS ONE*. 2016; 11:e0148197. doi: 10.1371/journal.pone.0148197 PMID: 26840412.
93. Zhang S, Lu X, Shu X, Tian X, Yang H, Yang W, et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern Med*. 2014; 53:2763–71. doi: 10.2169/internalmedicine.53.2570 PMID: 25500436.
94. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, Metrio M de, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*. 2014; 12:2074–88. doi: 10.1111/jth.12710 PMID: 25163512.
95. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007; 13:463–9. doi: 10.1038/nm1565 PMID: 17384648.
96. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009; 15:1318–21. doi: 10.1038/nm.2053 PMID: 19855397.
97. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007; 176:231–41. doi: 10.1083/jcb.200606027 PMID: 17210947.
98. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps. Double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012; 189:2689–95. doi: 10.4049/jimmunol.1201719 PMID: 22956760.
99. Loscalzo J. Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31:1059–61. doi: 10.1042/bst0311059 PMID: 14505479.
100. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107:15880–5. doi: 10.1073/pnas.1005743107.
101. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs.
102. Pryor W. A. *Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions*.
103. Roesler J., Hecht A., Freihorst J., Lohmann-Matthes M.-L., Emmendörffer A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *European Journal of Pediatrics*. 1991:161–5.
104. Rothe G., Oser A., Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*. 1988:354–5.
105. Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen Y-R, et al. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res*. 2016; 119:e39-75. Epub 2016/07/14. doi: 10.1161/RES.000000000000110 PMID: 27418630.
106. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52:1–6. Epub 2011/10/02. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030 PMID: 22027063.
107. Wardman P. Methods to Measure the Reactivity of Peroxynitrite-Derived Oxidants Toward Reduced Fluoresceins and Rhodamines. *Nitric Oxide, Part G Oxidative and Nitrosative Stress in Redox Regulation of Cell Signaling*. Elsevier; 2008. pp. 261–82.

- 108.** Frank RD, Weber J, Dresbach H, Thelen H, Weiss C, Floege J. Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. *Kidney Int.* 2001; 60:1972–81. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00009.x PMID: 11703617.
- 109.** Cassar K, Bachoo P, Brittenden J. The role of platelets in peripheral vascular disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2003; 25:6–15. doi: 10.1053/ejvs.2002.1795 PMID: 12525805.
- 110.** Aarts P. A. M. M., van den Broek S. A. T., Prins G. W., Kuiken G. D. C., Sixma J. J., Heethaar R. M. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *ARTERIOSCLEROSIS*; 1988.
- 111.** E.C. Eckstein, F. Belgacem. Model of platelet transport in flowing blood with drift and diffusion terms.
- 112.** Skorzewski T, Erickson LC, Fogelson AL. Platelet motion near a vessel wall or thrombus surface in two-dimensional whole blood simulations. *Biophys J.* 2013; 104:1764–72. doi: 10.1016/j.bpj.2013.01.061 PMID: 23601323.
- 113.** Klemm D, Cranston ED, Fischer D, Gama M, Kedzior SA, Kralisch D, et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. *Materials Today.* 2018; 21:720–48. doi: 10.1016/j.mattod.2018.02.001.
- 114.** Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*; 2002:846–52.
- 115.** Johnson RJ. Complement activation by biomaterials. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 337:507–12.
- 116.** Leitão AF, Gupta S, Silva JP, Reviakine I, Gama M. Hemocompatibility study of a bacterial cellulose/polyvinyl alcohol nanocomposite. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 111:493–502. Epub 2013/07/01. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.06.031 PMID: 23880088.
- 117.** Li X, Tang J, Bao L, Chen L, Hong FF. Performance improvements of the BNC tubes from unique double-silicone-tube bioreactors by introducing chitosan and heparin for application as small-diameter artificial blood vessels. *Carbohydr Polym.* 2017; 178:394–405. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.120 PMID: 29050610.
- 118.** Amara U., Rittirsch D., Flierl M., Bruckner U., Klos A., Gebhard F., et al., editors. *Interaction Between the Coagulation and Complement System.* New York, NY: Springer-Verlag New York; 2009.
- 119.** Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3. A new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006; 12:682–7. doi: 10.1038/nm1419 PMID: 16715088.
- 120.** Markiewski M. M., Nilsson B., Nilsson Ekdahl K., Mollnes T. E., Lambris J. D. Complement and coagulation: strangers or partners in crime. *Trends Immunol*; 2007:184–92.
- 121.** Busche MN, Stahl GL. Role of the complement components C5 and C3a in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion injury. *Ger Med Sci.* 2010; 8. Epub 2010/09/08. doi: 10.3205/000109 PMID: 20930931.
- 122.** Goh ET, Wong E, Farhatnia Y, Tan A, Seifalian AM. Accelerating in situ endothelialisation of cardiovascular bypass grafts. *Int J Mol Sci.* 2014; 16:597–627. Epub 2014/12/29. doi: 10.3390/ijms16010597 PMID: 25551605.
- 123.** Patel SD, Waltham M, Wadoodi A, Burnand KG, Smith A. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010; 4:129–41. Epub 2010/03/03. doi: 10.1177/1753944710362903 PMID: 20200200.
- 124.** Zhuang Y, Zhang C, Cheng M, Huang J, Liu Q, Yuan G, et al. Challenges and strategies for in situ endothelialization and long-term lumen patency of vascular grafts. *Bioact Mater.* 2021; 6:1791–809. Epub 2020/12/05. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.11.028 PMID: 33336112.

- 125.** Avci-Adali M, Perle N, Ziemer G, Wendel HP. Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications. *Eur Cell Mater.* 2011; 21:157–76. Epub 2011/02/11. doi: 10.22203/ecm.v021a13 PMID: 21312162.
- 126.** Chen Z, Li Q, Chen J, Luo R, Maitz MF, Huang N. Immobilization of serum albumin and peptide aptamer for EPC on polydopamine coated titanium surface for enhanced in-situ self-endothelialization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 60:219–29. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.044 PMID: 26706525.
- 127.** Follmann HDM, Martins AF, Gerola AP, Burgo TAL, Nakamura CV, Rubira AF, et al. Antiadhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes. *Biomacromolecules.* 2012; 13:3711–22. doi: 10.1021/bm3011962 PMID: 22998803.
- 128.** Kuzmenko V, Sämfors S, Hägg D, Gatenholm P. Universal method for protein bioconjugation with nanocellulose scaffolds for increased cell adhesion. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013; 33:4599–607. doi: 10.1016/j.msec.2013.07.031 PMID: 24094166.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
BB	Blutbild
BNC	bakterielle Nanocellulose
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
cfDNA	zellfreie DNA-Netze
CGD	chronische granulomatöse Krankheit
CTRL	Kontrolle
DAC	Dacron® (Handelsname von PET)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DHR	Dihydrorhodamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ETs	Extracellular Traps
GLAS	inverse Modifikation
GOO	Modifikation mit gleichmäßig offenporiger Oberfläche
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
IL	Interleukin
INV	invertierte Modifikation
KHK	koronare Herzerkrankung
LPS	Lipopolysaccharide
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Polyethylenterephthalat
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PT	partiell getrocknete Modifikation
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies / freie Sauerstoffradikale
sC5b9	Membranangriffskomplex aus C5b-C9
STD	Standard
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplexe
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TXA ₂	Thromboxan A2
u. a.	unter anderem
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

In-vitro-Studie zur Blutkompatibilität von modifizierten Oberflächen kleinkalibriger Gefäßprothesen aus bakterieller Nanocellulose

in der Klinik für Herz- und Thorax-Chirurgie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Wippermann und Dr. med. Max Wacker

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 18.03.2024

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den 18.03.2024