

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und gefäßnahe Herzchirurgie
Direktor: Professor Dr. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Biokompatibilität von titanbeschichtetem Poly(ether)urethan
Statische und dynamische Untersuchungen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sebastian Riescher

2013

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und gefäßnahe Herzchirurgie
Direktor: Professor Dr. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Biokompatibilität von titanbeschichtetem Poly(ether)urethan
Statische und dynamische Untersuchungen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sebastian Riescher

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Karla Lehle

2. Berichterstatter: PD Dr. Karl-Peter Ittner

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2013

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Materialien	4
II.1. apparative und analytische Mittel	4
II.2. Zellkulturmedien und Lösungen.....	6
II.3. Testmaterial.....	8
III. Analytische und präparative Methodik.....	9
III.1. Gewinnung von Endothelzellen.....	9
III.1.1. Präparation von Endothelzellen aus der Vena Saphena	9
III.1.2. Kryokonservierung von Endothelzellen.....	10
III.2. Methodische Prinzipien bei Zellkulturen.....	11
III.2.1. Auftauen und Anzüchten einer Endothelzellkultur	11
III.2.2. Mediumwechsel	12
III.2.3. Ablösen der Endothelzellen.....	12
III.2.4. Anlegen einer Zwischenkultur	13
III.3. Analytische Methodik.....	14
III.3.1. Zellzahlbestimmung	14
III.3.2. MTS-Reaktion	17
III.3.3. Thrombozytenadhäsionstest.....	18
III.3.4. PBMC Adhäsionstest	20
III.4. Statistische Auswertung.....	21
IV. Methodik der einzelnen Versuche	22
IV.1. Statische Versuche im 96-Well.....	22
IV.1.1. Übersicht über den Versuchsaufbau.....	22
IV.1.2. Protokoll zur Zellzahlbestimmung im 96-well-Maßstab	24
IV.1.3. Protokoll zur MTS Messung im 96-well-Maßstab	26
IV.1.4. Protokoll zum Thrombozytenadhäsionstest im 96-well-Maßstab.....	26
IV.1.5. Protokoll zum PBMC-Adhäsionstest im 96-well-Maßstab	28
IV.2. Dynamische Versuche mit der Perfusionsanlage.....	29
IV.2.1. Übersicht über die Perfusionsanlage	30
IV.2.2. Methoden zum Gebrauch der Perfusionsanlage	31
IV.2.3. Analytische Methoden	38
V. Ergebnisse	43
V.1. Einfluss von Polyurethan und titanisiertem Polyurethan auf Endothelzellen in der statischen Zellkultur.....	43

V.1.1. Proliferationsverhalten	43
V.1.2. Stoffwechselaktivität.....	46
V.1.3. Thrombozytenadhäsion	51
V.1.4. Adhäsion von PBMCs.....	57
V.2. Etablierung einer Perfusionsanlage	62
V.2.1. Modifikationen zur Inbetriebnahme der Perfusionsanlage.....	62
V.2.2. Volumen und Volumenstrom.....	65
V.2.3. Sterilitätstest	67
V.2.4. Weiterentwicklung von Anlage und Methode aufgrund erster Versuchsergebnisse.....	68
V.3. Endothelzelladhäsion und -wachstum in der Perfusionsanlage	75
V.3.1. Endothelzelladhäsion auf Polyurethanschläuchen nach Standardprotokoll	75
V.3.2. Vergleich von Polyurethanschläuchen mit und ohne titanhaltiger Schicht.....	78
V.3.3. Endothelzellwachstum auf Polyurethanschläuchen	81
VI. Diskussion.....	88
VI.1. Nachweis der verbesserten Biokompatibilität nach ISO 10993-4.....	88
VI.2. Entwicklung einer Perfusionsanlage zur Darstellung der Endothelialisierung unter Flussbedingungen.....	92
VI.3. Nachweis der verbesserten Biokompatibilität von titanisiertem Polyurethan unter pulsatilem Strömung	94
VII. Zusammenfassung.....	97
VIII. Literaturverzeichnis.....	98
IX. Veröffentlichungen.....	103
IX.1. Poster.....	103
IX.2. Publikation.....	104

I. Einleitung

Die Linksherzinsuffizienz gewinnt mit einer Prävalenz von 1% und einer Inzidenz von 0,15 – 0,5% in der westlichen Welt zunehmend an Bedeutung. Dabei ist die Mortalität mit bis zu 50% in einem Jahr nach wie vor sehr hoch.¹ Eine Therapieoption ist die Herztransplantation. Trotz Überlebensraten von 97% nach einem Jahr bzw. 60% nach 10 Jahren² versterben jedes Jahr etwa 10% der Patienten auf der Warteliste.³ Grund dafür ist der Mangel an Organen. Linksventrikuläre Unterstützungssysteme (LVAD, left ventricular assist device) stellen zunehmend eine Alternative dar: Für Patienten, die auf ein Spenderorgan warten (bridge to transplantation), für Patienten, die für eine Transplantation nicht in Frage kommen (destination therapy) oder für Patienten, bei denen durch eine zeitweise linksventrikuläre Entlastung Erholung erwartet wird (bridge to recovery)¹. Es existieren VADs, die einen pulsatilen Flow generieren und sogenannte „Continuous-Flow“ VADs. Während erstere die physiologische Situation durch den pulsatilen Fluss besser nachahmen, können VADs, welche eine kontinuierliche Strömung erzeugen, zurzeit die besseren Überlebens- und Komplikationsraten verbuchen.⁴ Derzeit liegen die 1 und 2 Jahresüberlebensraten bei 68% und 58% beim Einsatz von Continuous-Flow VADs und bei 55% und 24% bei Pulsatile-Flow VADs.⁴ Bei beiden Systemen wird für den Patienten eine wesentliche Verbesserung seiner Lebensqualität erreicht: Bis zu 75% der Patienten, die mit einem VAD versorgt wurden, konnten bereits nach 3 Monaten von NYHA III/IV in die NYHA Klassen I und II (NYHA I: keine Beeinträchtigung der körperlichen Leistungsfähigkeit; NYHA II: leichte Beeinträchtigung) heruntergestuft werden. Zudem zeigte sich eine deutliche Verbesserung in der 6 Minuten Gehstrecke.⁴

Allerdings ist der Einsatz von VADs nach wie vor mit einer Vielzahl von Komplikationen assoziiert, allen voran Infektionen, Blutungen und cerebrovaskuläre Ereignisse⁵. Cerebrovaskuläre (hämorrhagische und thromboembolische) Komplikationen mit neurologischen Defiziten betreffen 14 – 47% der Patienten nach einer VAD Implantation⁶. Bis zu 59% der Patienten erleiden eine Infektion des implantierten Systems, wobei am häufigsten das Kabel, das für die percutane Stromversorgung sorgt, betroffen ist.⁷

Ventrikuläre Unterstützungssysteme sind also auf der einen Seite grundsätzlich dazu in der Lage, die Lebenserwartung und Lebensqualität von Patienten mit einer hochgradigen Herzinsuffizienz zu verbessern. Auf der anderen Seite ist die Komplikationsrate derzeit noch

sehr hoch. Dieses Dilemma führte zu der Überlegung, eine neue Generation von Kunstherzen zu konstruieren: vollständig implantierbare Kunstherzen mit einer möglichst anti-thrombogenen Oberfläche und physiologisch geformten Pumpkammern. Durch die vollständige Implantation ohne percutane Stromzufuhr wird eine Eintrittspforte für Erreger vermieden, durch die antithrombogene Oberfläche werden die thrombembolischen Komplikationen reduziert. Pumpkammern, die in ihrer Form so optimiert wurden, dass die Strömungsverhältnisse den physiologischen Bedingungen im menschlichen Herzen entsprechen, verhindern ebenso Thrombenbildung, sowie Hämolyse.

So entwickelten Ingenieure vom DLR (deutsches Zentrum für Luft und Raumfahrt) in Oberpfaffenhofen ein Kunstherz, das genau diese Eigenschaften besitzt: Es ist vollständig implantierbar, so dass Infektionen vermieden werden können, Daten und Energie werden drahtlos übertragen. Zudem verfügt das System über zwei Pumpkammern: Während der Auswurfsphase der einen Kammer wird in der anderen Pumpkammer ein Sog erzeugt, wodurch sich diese wieder füllt – es entsteht eine physiologisch günstige pulsatile Strömung. Durch das Zweikammerkonzept ist sowohl der uni- als auch biventrikuläre Einsatz möglich. Um thrombembolische Komplikationen zu vermeiden, wurden die Pumpkammern in ihrer Form so konstruiert, dass sie die menschlichen Ventrikel nachahmen, um eine möglichst gleichmäßige Strömung ohne Turbulenzen in den Pumpkammern zu gewährleisten.⁸

Das DLR entschied sich bei der Auswahl des Materials für die Pumpkammern für Polyurethan, da Polyurethan auch in anderen biomedizinischen Anwendungen bereits für seine hervorragenden mechanischen Eigenschaften, wie z.B. seine Dehnungskapazität, Flexibilität und seinen Verschleißwiderstand bei gleichzeitig guter Biokompatibilität bekannt ist⁹. Allerdings ist die Hämokompatibilität von Polyurethan nach wie vor ungenügend, zusätzlich limitieren Degradation und Kalzifizierung des Materials den Langzeiteinsatz.⁹

Daher wurden bereits mehrere Ansätze zur Oberflächenmodifikation von Polyurethanen entwickelt, um die Blutkompatibilität zu verbessern, z.B. durch Endothelialisierung, durch Beschichtung mit Antikoagulantien wie Heparin, durch physikalische oder chemische Oberflächenbehandlungen mit Polyethylenglycol, Phospholipid Polymeren, und sulfoniertem Polyethylenoxid.⁹

Um die Biokompatibilität von Polyurethan zu verbessern, wurde in diesem Projekt eine Beschichtung von Polyurethan mit einer titanhaltigen Schicht ausgewählt. Titan gilt schon lange als ein Metall mit hervorragender Biokompatibilität^{10,11}, allerdings war es bis zur

Entwicklung des PACVD (plasma-activated chemical vapor deposition) nicht möglich, Polyurethan damit zu beschichten. Mit diesem Verfahren kann durch Gasabscheidung eine Beschichtung des PU bei Temperaturen zwischen 30 und 35° erfolgen¹². *In vitro* Studien von Lehle et al., sowie Ozkucur et al.¹³ belegten durch verbesserte Endothelzelladhäsion und – wachstumskinetik, sowie erhöhte mitochondriale Aktivität von Endothelzellen auf Polyurethanen mit einer titanhaltigen Beschichtung die Biokompatibilität von titanisiertem PU.¹⁴ Im *in vivo* Tierversuch konnte von Guldner et al. gezeigt werden, dass titanisierte Aortenklappen nach 6 Monaten vollständig endothelialisiert waren¹⁵, mit dem dementsprechend günstigen Effekt bezüglich der Thrombogenität. Analog zu den positiven Ergebnissen von Guldner^{15,16} wurde auch vom DLR eine titanhaltige Beschichtung der „pmf medical titanium gmbh“ (Nürnberg, Germany; Patentnummer EP 0 897 997 B1) für die Pumpkammern aus Polyurethan gewählt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch *in vitro* Studien die verbesserte Biokompatibilität von Polyurethanen, über die in der Literatur mehrfach berichtet wurde, zu belegen.

Die Überprüfung der Biokompatibilität erfolgte *in vitro* in der statischen Zellkultur: Dazu wurde zunächst die Adhäsionsfähigkeit, die Wachstumskinetik sowie mitochondriale Aktivität von humanen Endothelzellen auf Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) bestimmt. Zudem wurde die Thrombogenität von PU und tiPU mit und ohne Endothelzellmonolayer durch einen Thrombozyten- und PBMC Assay abgeschätzt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Bogen von der statischen Kultur hin zu einer Perfusionsanlage mit pulsatilem Strömung geschlagen. Hier wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Scherkräfte die Adhäsion und das Wachstum von Endothelzellen beeinflussen. Die Perfusionsanlage wurde extra für diese Tests von den Entwicklern des oben beschriebenen Kunstherzens vom DLR in Oberpfaffenhofen entwickelt und gebaut. Die Funktionsfähigkeit und Tauglichkeit dieser Anlage wurde im Labor der HTC (Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg) überprüft und optimiert. Letztlich sollte mit dieser Perfusionsanlage untersucht werden, ob Endothelzelladhäsion unter pulsatilem Strömung möglich ist und wie lange ein Endothelzelllayer den mit der Strömung assoziierten Scherkräften standhält.

II. Materialien

Die folgende Aufzählung enthält die für die Versuche verwendeten Materialien in alphabetischer Reihenfolge:

II.1. apparative und analytische Mittel

Geräte und Messapparaturen

Brutschrank CO₂-Auto-Zero:

Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Brutschrank Hera Cell:

Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

CASY® Cell Counter and Analyzer System, Model TTC

Schärfe Systems GmbH (Reutlingen, Deutschland)

E-max Precision Microplate Reader:

Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California, USA)

Eppendorf Multipette Plus:

Eppendorf Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Gilson Pipetten (20, 100, 200, 1000 µl);

Gilson (Villiers Le Bel, Frankreich)

Kamera 25.4 2MP Slider

Diagnostic Instruments (Sterling Heights, Michigan-Territorium, USA)

Kryobox:

Air Liquide (Paris, Frankreich)

Labsystems Finnpipette® 1500 µl:

Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, California, USA)

Mikroskop Leica DMRBE:

Leica Microsystems (Mannheim, Deutschland)

Mikroskop Fluovert FU:

Leitz GmbH (Wetzlar, Deutschland)

Perfusionsanlage

Dualis Medtec GmbH (Oberpfaffenhofen, Deutschland)

Pipetboy acu:

Integra Biosciences GmbH (Fernwald, Deutschland)

Rüttler JKA Vibrax-VXR:

Janka-und-Kunkel AG (Köln, Deutschland)

Sterilbank Hera safe Heraeus®:

Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Sterilbank Laminair Heraeus®:

Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Ultrasonic Flowcomputer novaflow

Novalung® GmbH (Heilbronn, Deutschland)

Victor^{3TM} 1420 Multilabel Counter

PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)

Zentrifuge Megafuge 1.0 R Heraeus Systems Sepatech

Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Zentrifuge Multifuge 1 L-R Heraeus Systems Sepatech

Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte, steril und unsteril

Nunc (Roskilde, Dänemark), Best. Nr.: 167008 und 260895

Kryoröhrchen 2 ml:

Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)

Objektträger, Ground Edges Frosted

VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Spritzen steril 2ml und 20 ml

BD Discardit™ (Franklin Lakes, New Jersey, USA)

Sterilfilter 0,20 µm, Minisart®

Sartorius Stedim biotech (Göttingen, Deutschland)

Sterilfilter 0,45µm, Minisart®

Sartorius Stedim biotech (Göttingen, Deutschland)

T 25, T 75, T 175, Trippleflask Kulturflaschen:

Nunc (Roskilde, Dänemark)

Nicht einzeln gelistet wurden Pipettenspitzen, Eppendorf Reaktionsgefäße, sterile und unsterile Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml).

II.2. Zellkulturmedien und Lösungen

Das für die Versuche verwendete Medium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Medium 199 with Earle's salts without L-Glutamine

PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich), Cat Nr: E15-33

Fetales Kälber Serum (FKS)

PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

Supplement Pack for Endothelial Cell Growth Medium

PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)

L-Glutamin

Sigma-Aldrich life science (St Louis, Missouri, USA)

Gentamycin, Endkonzentration 50 µg/ml

Sigma-Aldrich life science (St Louis, Missouri, USA)

Amphotericin B, Konzentration: 250 µg/ml

BioWhittaker, Lonza (Walkersville, Maryland, USA)

Zum Waschen der Zellen wurde ein PBS-Puffer (phosphate buffered saline) nach Dulbecco mit folgender Zusammensetzung bei einem pH von 7,3-7,4 verwendet:

Inhaltsstoff	Konzentration [g/L]
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,133
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
MgCl ₂ · 2H ₂ O	0,10
NaCl	8,00
Na ₂ HPO ₄	1,15

Tab. II.1: Zusammensetzung PBS nach Dulbecco

Des Weiteren wurde verwendet:

4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid (DAPI)

Endkonzentration 5 µg/ml

Sigma-Aldrich life science (St Louis, Missouri, USA)

ACD Puffer:

Zusammensetzung: Citronensäuremonohydrat: 8g/l, D-Glucosemonohydrat: 12g/l

Collagenase A:

Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim, Deutschland), Bestellnummer: 11088793001

Cryomedium 1:

Zusammensetzung: 90% M199 mit FKS, L-Glutamin und Supplementpack + 10% HEPES Puffer (20mmolar)

Cryomedium 2:

Zusammensetzung: 70% M199 mit FKS, L-Glutamin und Supplementpack + 10% HEPES Puffer (20mmolar) + 20% DMSO

Dimethylsulfoxid (DMSO):

Merck (Darmstadt, Deutschland), Cat-Nr.: 802912

Endothelzellmedium

PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Fibronectin (Human Plasma Fibronectin)

Konzentration der Stammlösung: 1mg/ml

Konzentration der Endlösung: 10 µg/ml

Millipore™ (Temecula, California, USA)

Fluoromount-G Eindeckmedium

Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA)

Gelatine:

Merck (Darmstadt, Deutschland), verwendete Konzentration: 0,25% in HEPES (s.u.)

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethansulfonsäure-Puffer (1M):

Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Bestellnummer: L1613

MTS Reagenz:

Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

Promega (Madison, Wisconsin, USA), Bestellnummer: 245

RPMI 1640 ohne L-Glutamin, ohne Phenolrot

Pan Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)

TNF α, human rekombinant (aus E.coli, lyophilisiert, proteinträgerfrei):

Endkonzentration im Ansatz 10 ng/ml, hergestellt aus Stammlösung mit 5 µg/ml

PeptoTech Inc. (Rocky Hill, New Jersey, USA), Cat.number: 300-01A

Trypsin (1:250) 10fach, 2,5% Trypsin:

Verwendet als 1fach Trypsin

PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) Bestellnummer: L11-001

LDH Reagenz:

Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim, Deutschland), Bestellnummer: 04744934001

Paraformaldehyd:

Verwendete Konzentration: 40mg/l
Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Triton® 100fach:

Verwendete Konzentration: 1fach
Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

II.3. Testmaterial

Polyurethan Plättchen (PU):

Poly(ether)urethane; Material-Nr. 50046 (DUALIS, Seefeld), Hersteller: Mecora (Aachen)

Plättchen aus titanisiertem Polyurethan (tiPU):

Poly(ether)urethane, Material-Nr. 50046, beschichtet mit Titancarboxonitrid (pmf medical titanium, Nürnberg)

Poly(ether)urethanschläuche:

Elastollan® 1180A; BASF (Ludwigshafen); Länge: 10 cm; Innendurchmesser: 5 mm;
Wandstärke: 0,5 mm

Poly(ether)urethanschläuche titanisiert:

Elastollan® 1180A; BASF (Ludwigshafen), beschichtet mit Titancarboxonitrid (pmf medical titanium, Nürnberg)

III. Analytische und präparative Methodik

III.1. Gewinnung von Endothelzellen

Die für diese Arbeit verwendeten Endothelzellen stammen aus der Vena saphena magna von Patienten der Herz-Thorax-Chirurgie, die sich einer Bypassoperation unterziehen mussten, mit zwei Ausnahmen: Zwei Endothelzellkulturen wurden aus menschlichen Nabelschnurvenen gewonnen (HUVEC, human umbilical vene endothelial cells). Im Zuge der Aufklärung zur Operation wurde eine Einverständniserklärung zur Venenentnahme für Forschungszwecke beigefügt, ein Ethikantrag für die Gewinnung der Endothelzellen aus der Vena saphena magna und aus den Nabelschnurvenen wurde gestellt und von der Ethikkommission gebilligt (Nummer 99/130).

III.1.1. Präparation von Endothelzellen aus der Vena Saphena

Die in den Versuchen verwendeten Endothelzellen wurden im Labor nach folgendem Protokoll weiterverarbeitet (Tabelle III.1). Alle verwendeten Materialien und Lösungen waren steril, die Präparation fand unter einer Sterilbank auf einem sterilen Abdecktuch statt. Die Präparation der HUVEC erfolgte analog dazu.

Schritt	Vorgehen
1	Transfer der Vene aus dem OP in einem mit Hespuffer gefülltem sterilem 50ml-Falcongefäß; Spülung der Vene mit 1x PBS und Hespuffer (4°C)
2	Plastiknadel einer Venenverweilkanüle auf 0,5 – 1 cm kürzen und auf eine mit Hespuffer aufgezugene 20 ml Spritze aufsetzen
3	Modifizierte Venenverweilkanüle in Venenlumen einführen; vorsichtig mit Hespuffer spülen
4	Collagenaselösung in 10 ml Spritze füllen, vorsichtig in die Vene spritzen; nach Einlauf der Collagenase unteres Ende der Vene abklemmen; Vene prall füllen; obere Seite der Vene mit einer Klemme verschließen

5	Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO ₂) für 10-15 min
6	Wände der gefüllten Vene vorsichtig mit einer Pinzette „massieren“, damit sich alle Endothelzellen lösen.
7	Klemmen werden gelöst, eine Seite aufgeschnitten und der Inhalt der Vene in einem Falcon aufgefangen.
8	2 x spülen des Gewebes mit je 20 ml Hespuffer, Auffangen der Spüllösung in einem Falcon
9	Zentrifugation mit 1100 UpM, 5 min bei Raumtemperatur
10	Resuspendieren des Zellpellets mit 2 ml Medium, Überführung der Zellsuspension in eine gelatinierte T 25 Kulturflasche, in die 3ml Medium vorgelegt wurde.
11	Inkubation der Kulturflasche bei 37 °C, 5 % CO ₂ ; alle 2-3 Tage Mediumwechsel
12	Zellrasen ist nach 2-3 Wochen konfluent

Tab. III.1: Protokoll zur Präparation der Vena Saphena

III.1.2. Kryokonservierung von Endothelzellen

Zur Standardisierung der Kulturversuche (siehe unten) wurden die präparierten und vermehrten Endothelzellkulturen nach der ersten Zwischenkultur (siehe unten) in flüssigem Stickstoff eingefroren, bis sie dann für einen Versuch aufgetaut und weiter kultiviert wurden. Das Protokoll ist in Tabelle III.2 wiedergegeben.

Schritt	Vorgehen
1	Zellen von der Kulturflasche ablösen (genaues Vorgehen s.u.)
2	Zentrifugieren (1100 UpM, 5 min bei Raumtemperatur)
3	Resuspendieren des Zellpellets und Zellzahlbestimmung mit CASY (s.u.)
4	Portionierung der Zellsuspension in Portionen zu $5e^5$ oder $1e^6$ Zellen
5	Zugabe von 600µl Einfriermedium I (E I = 90% Medium, 10% Hesp)
6	Umfüllen in ein Cryoröhrchen und 10 Minuten auf Eis stellen

7	Zugaben von 600µl Einfriermedium II (E II = 70% Medium, 10 % Hepes, 20 % DMSO)
8	Proben werden 30 min auf Eis gestellt und dann bei -80°C eingefroren
9	Ein Tag später: Umsetzen in einen Stickstofftank (-196°C)

Tabelle III.2: Protokoll zur Kryokonservierung von Endothelzellen

III.2. Methodische Prinzipien bei Zellkulturen

III.2.1. Auftauen und Anzüchten einer Endothelzellkultur

Eingefrorene Endothelzellkulturen (siehe III.1.2) wurden für die Kulturversuche wie folgt aufgetaut (Tabelle III.3).

Schritt	Vorgehen
1	Eine T 25 Kulturflasche wird gelatiniert, indem 1 ml einer 0,25% Gelatinelösung auf dem Boden der Kulturflasche gleichmäßig verteilt wird.
2	Inkubation der T 25 Kulturflasche mit der Gelatinelösung für 30 Minuten bei 37° C, 5% CO ₂
3	Gelatine absaugen
4	Vorlegen von 3 ml Medium (M 199, 10% FKS, 1 Supplementpack)
5	Die Zellen werden nun aus dem Stickstofftank geholt und auf Eis zur Sterilbank transportiert.
6	Auftauen der Zellsuspension in den Cryoröhrchen im 37°C-Wasserbad
7	Sobald sich nur noch ein kleiner Eisklumpen in der Zellsuspension befindet, wird der Inhalt des Cryoröhrchens in eine gelatinierte T 25 Kulturflasche mit dem vorgelegten Medium umpipettiert.
8	Inkubation im Brutschrank bei 37° C, 5% CO ₂
9	Nach 4 Stunden: Mediumwechsel

Tabelle III.3: Protokoll zum Auftauen einer Endothelzellkultur

Bei den Kulturflaschen gibt es verschiedene Größen, von denen die maximale Zellausbeute abhängt. Die Zellausbeuten betragen im Mittel: aus T25 (25cm²): 1 x 10⁶; T75 (75cm²): 3 x

10^6 ; T175 (175cm²): 5×10^6 . Um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten, ist auf der Kulturflasche ein Schraubverschluss mit Filter angebracht. Der Filter darf nicht feucht werden, da sonst keine ausreichende CO₂ Begasung und damit keine richtige Einstellung des pH Wertes des Mediums stattfinden kann.

III.2.2. Mediumwechsel

Die Endothelzellkulturen benötigen einen regelmäßigen Mediumwechsel, da die Bestandteile des Mediums von den Zellen entweder metabolisiert werden oder bei 37° C nach einer gewissen Zeit zerfallen.¹⁷ Wie häufig das Medium gewechselt werden muss, ist allerdings von Kultur zu Kultur unterschiedlich. In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde in der Regel zweimal pro Woche das Medium gewechselt.

Beim Mediumwechsel unter der Sterilbank wird das alte Medium mit einer Pasteurpipette, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen ist, abgesaugt und die der Kulturflasche entsprechende Menge an neuem Medium (am besten bereits im Brutschrank vorgewärmt und begast) wieder zu den Zellen pipettiert.

III.2.3. Ablösen der Endothelzellen

Ist in der Kulturflasche Konfluenz erreicht, d.h. die gesamte Oberfläche der Kulturflasche ist mit Zellen bedeckt, besteht die Gefahr einer Kontaktinhibition und die Zellen hören auf, sich zu teilen. Dabei sollte man im Regelfall „bei strikt adhärenen Zelllinien die vollständige Konfluenz nicht abwarten“¹⁸, da bei zu hoher Zelldichte die Proliferationsrate stark absinkt und dies zum Absterben einer Kultur führen kann. Daher empfiehlt sich die regelmäßige Kontrolle unter dem Mikroskop. Der Wachstumsprozess und dessen Geschwindigkeit sind u.a. vom Medium (Hersteller, Proteingehalt, Wachstumsfaktoren) und der Zellkonzentration bei der Aussaat, aber auch von der Güte der aufgetauten Endothelzellen abhängig.

Nach Erreichen einer 90%igen Konfluenz werden die Zellen abgelöst (Protokoll siehe Tabelle III.4), eine Zwischenkultur (III.2.4.) angelegt und nach Erreichen der Konfluenz in den Versuch eingesetzt.

Schritt	Vorgehen
1	Medium mit einer Pasteurpipette absaugen
2	Waschen mit 5 ml 1xPBS
3	PBS absaugen
4	Zugabe von 1 ml, 0,5% Trypsin/EDTA, kurze Inkubation (< 1 min) im Brutschrank und festes Klopfen auf die Ränder der Kulturflasche, damit sich alle Zellen ablösen
5	Abstoppen der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von Medium mit 10% FKS im Verhältnis 2:1 zum eingesetzten Trypsin
6	Resuspendieren und Umpipettieren in ein 15 ml Falcon-Röhrchen
7	Zentrifugieren bei 1200 UpM, Raumtemperatur für 4 Minuten
8	In 1 ml Medium resuspendieren

Tabelle III.4: Protokoll zum Ablösen von Endothelzellen

III.2.4. Anlegen einer Zwischenkultur

Wie bereits oben unter III.2.3. erwähnt, können Endothelzellen bei Konfluenz nicht weiter wachsen. Möchte man sie dennoch weiter kultivieren, da man z.B. für einen Versuch eine höhere Zellzahl benötigt, als auf der verwendeten Kulturoberfläche erreicht werden kann, legt man eine Subkultur an, indem man die Zellen aus einer alten Kulturflasche in eine neue überführt. Man bezeichnet diesen Vorgang als Passagieren der Zellen¹⁹. Wurden Endothelzellen aufgetaut und ausgesät, befinden sie sich in Passage 2, nach einer weiteren Subkultur in Passage 3, usw. Beim Anlegen einer Subkultur geht man genau nach dem unter III.2.3. aufgeführten Protokoll zum Ablösevorgang vor und überführt die Zellsuspension in eine neue Kulturflasche benötigter bzw. geeigneter Größe mit darin vorgelegtem Medium.

III.3. Analytische Methodik

III.3.1. Zellzahlbestimmung

III.3.1.1. Zellzahlbestimmung mit CASY®

III.3.1.1.1. Messprinzip

Die Zellzahl wird mit dem CASY® **C**ell **A**ccount **S**ystem bestimmt. Es ist ein automatisiertes Verfahren, bei dem Zellen, die zuvor in einer Elektrolytlösung (Casyton®) suspendiert wurden, in eine Messpore innerhalb einer Kapillare gesaugt werden. Wenn die Zelle in die Kapillare eindringt, kommt es zu einem elektrischen Puls, der mit einer Widerstandserhöhung einhergeht, wobei die Anzahl der Pulse der Zellzahl in der Probe entspricht. CASY® kombiniert die Messprinzipien der Widerstandsmessung (ermöglicht die Zellzahlbestimmung) und der Pulsflächenanalyse. Da die jeweilige Pulsfläche mit dem Zellvolumen korreliert, kann neben der Zellzahl der Probe auch die Größenverteilung der Zellen angezeigt werden. Somit können über die Definition des Messbereichs auch Zelltrümmer, tote und vitale Zellen, Zellaggregate oder spezifische Zellarten quantifiziert werden.

Da Endothelzellen zur Bildung von Aggregaten neigen, arbeitet die Software mit dem sogenannten „aggregation factor“, ein von der Software berechneter Faktor, mit dem die gemessene Zellzahl multipliziert wird, um ein zu niedriges Messergebnis aufgrund von Aggregaten auszugleichen.

III.3.1.1.2. Vorgehen

Grundsätzlich folgt die Zellzahlbestimmung mittels CASY® immer dem gleichem Schema: Die Zellen werden nach dem in III.2.3. vorgestellten Protokoll von der Oberfläche, auf der sie wachsen, abgelöst. Danach wird in der erhaltenen Zellsuspension die Zellzahl mit CASY® bestimmt, indem **20 µl** der Zellsuspension in **5 ml** Casyton®, das in einen speziellen Messfalcon vorgelegt wurde, pipettiert werden. Anschließend stellt man diesen Messfalcon unter die Kapillare des CASY® und beginnt mit der Messung. Zur Auswertung ist dabei die Berechnung des Verdünnungsfaktors essentiell (in diesem Beispiel 51). Ist die

Zellkonzentration zu hoch, kann die Probe entsprechend verdünnt werden. Außerdem kann man sich das Ergebnis der Zellzählung mit und ohne Aggregationsfaktor darstellen lassen.

Das folgende Protokoll stellt nochmal detailliert alle Schritte vom Ablösen bis zur Zellzählung dar, wenn die Zellzahl im Well einer 96-Well-Platte bestimmt werden soll:

Schritt	Vorgehen
1	Absaugen des Mediums (150 µl/Well) mit Hilfe einer Kanüle
2	Waschen durch Zugabe von 1xPBS (200 µl/Well)
3	Absaugen des PBS mit einer Kanüle
4	Ablösen der Zellen: Zugabe von 50 µl Trypsin pro Well
5	Kontrolle des Ablösevorgangs unter dem Mikroskop
6	Abstoppen der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von 100 µl Medium
7	Lagerung auf Eis während der Zellzählung
8	Resuspendieren und 100 µl in 5 ml Casyton® pipettieren (Verdünnungsfaktor 51)
9	Mischen
10	Zellzahl mit dem CASY® bestimmen, inklusive Zellvolumen, Durchmesser und Aggregationsfaktor; Angabe der Zellzahl mit und ohne Aggregationsfaktor

Tabelle III.5: Protokoll zur Zellzahlbestimmung im 96-Well mit CASY®

III.3.1.2. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

III.3.1.2.1. Messprinzip

Die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer ist ein Verfahren, bei dem Zellen manuell unter dem Lichtmikroskop gezählt werden. Dabei handelt es sich bei der Neubauer Zählkammer um eine Glasplatte mit einer zentralen Vertiefung (0,1mm Tiefe). Durch Auflegen eines Deckglases wird ein Raum mit einem definierten Volumen geschaffen, in den eine Zellsuspension, deren Zellzahl man bestimmen möchte, pipettiert wird. Auf dem Boden

der Vertiefung sind sogenannte Zählgitter in das Glas geätzt: Sie bestehen bei der Neubauer Zählkammer aus 3x3 Großquadraten (Kantenlänge je 1 mm), wobei das zentrale Großquadrat nochmals in 5x5 Gruppenquadrate (Kantenlänge 0,2mm) unterteilt ist. Nachdem die Zellsuspension in die Zählkammer eingebracht wurde, sind unter dem Lichtmikroskop die Zellen im Zählgitter zu sehen. Je nach Zelltyp werden nun die Zellen in einem oder mehreren Groß- oder Gruppenquadranten ausgezählt und danach mit einem Faktor multipliziert. Der Faktor berechnet sich aus dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe. So erhält man die Zellzahl pro Volumeneinheit.

III.3.1.2.2. Vorgehen

Je nach Zelltyp wird eine unterschiedliche Anzahl an Gruppenquadraten ausgezählt und die ermittelte Zellzahl mit einem Faktor multipliziert. Da in den Versuchen dieser Arbeit die Neubauer Zählkammer zum Zählen von Thrombozyten verwendet wurde, bezieht sich das folgende Protokoll auf die Ermittlung der Thrombozytenzahl.

Schritt	Vorgehen
1	Vorbereitung der Neubauer Zählkammer: fuselfrei säubern, befeuchten
2	Deckglas auflegen: Beachten der Newton'schen Farbringe (erscheinen, wenn das Deckglas fest an der Neubauer Zählkammer haftet)
3	Pipettieren der Zellsuspension: Die Zellsuspension wird senkrecht in die Vertiefung vor dem Deckglas pipettiert; durch die Kapillarkräfte wird die Suspension unter das Deckglas gezogen
4	10 Minuten warten, damit sich die Zellen absetzen
5	Mikroskopische Auszählung von 5 Gruppenquadraten (20er oder 40er Objektiv)
6	Multiplikation des Zählergebnisses mit dem Faktor 1000

Tabelle III.6: Protokoll zur Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

III.3.2. MTS-Reaktion

III.3.2.1. Messprinzip

Mit der MTS Reaktion kann eine Aussage über die Stoffwechsellistung von Zellen gemacht werden. Bei der MTS-Reaktion (mitochondrial targeting sequence) werden die Zellen mit der Owen's Reagenz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(r-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium] zusammen inkubiert. Bei stoffwechselaktiven Zellen wird das Tetrazolium der Owen's Reagenz in ein orangefarbenes Formazan reduziert – unter Verbrauch von NADH und NADPH. Je stoffwechselaktiver Zellen sind, desto mehr NADH und NADPH werden von mitochondrialen Enzymen produziert und zur Verfügung gestellt und desto mehr Tetrazolium kann in Formazan umgewandelt werden, wodurch eine dementsprechend dunklere Färbung entsteht. Die Absorption wird bei 490 nm gegen 650 nm gemessen. Als Leerwert wird der Farbstoff ohne lebende Zellen bestimmt und von der Messung abgezogen (Blankkorrektur).

III.3.2.2. Vorgehen

Schritt	Vorgehen
1	Herstellung einer 1:6 Verdünnung der MTS Reagenz (Owen's Reagenz) mit Endothelzell-Basalmedium von Promocell® in benötigter Menge
2	Absaugen der Überstände in der 96-Well-Platte (150 µl) mit einer Kanüle, Waschen durch Zugabe von 1xPBS (200 µl/Well); Absaugen des PBS mit einer Kanüle
3	Pipettieren von 120 µl der verdünnten MTS Reagenz (entspricht 20 µl MTS-Reagenz und 100 µl Basalmedium) im Dunklen
4	Leerwert: je 120 µl der Owen's Reagenz in vier leere Wells pipettieren (= Blank)
5	Inkubation im Brutschrank für 1 h bei 37°C, 5% CO ₂ , dunkel
6	Messung der Absorption bei 490 nm gegen 650 nm im ELISA Reader

Tabelle III.7: Protokoll zur MTS Messung

III.3.3. Thrombozytenadhäsionstest

III.3.3.1. Messprinzip

Der Test soll die Adhäsion isolierter Thrombozyten an Endothelzellen oder verschiedenen Kunststoffen quantifizieren. Dazu werden isolierte Thrombozyten mit Calcein gefärbt und mit den Endothelzellen bzw. den Kunststoffen koinkubiert. Die Zahl der adhärenierten Thrombozyten wird über Fluoreszenzmessung mit dem Fluorimeter „Victor“ bestimmt. Dafür werden sie nach der Adhäsion lysiert. Durch Erstellen einer Verdünnungsreihe mit bekannten Zahlen calceingefärbter Thrombozyten (Zellzahlbestimmung der Thrombozyten in der Neubauerzählkammer), kann über eine Eichgerade von der relativen Fluoreszenz auf die Thrombozytenzahl pro Well geschlossen werden.

III.3.3.2. Vorgehen

Tabelle III.8 gibt detailliert das Vorgehen beim Trombozytenadhäsionstest wieder. Da in dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob sich mit TNF α aktivierte Endothelzellen hinsichtlich der Thrombozytenadhäsion anders verhalten als nicht aktivierte, werden die Schritte, die zur Aktivierung der Endothelzellen mit TNF α nötig sind, bereits hier der Vollständigkeit des Protokolls halber vorweggenommen.

Schritt	Vorgehen
1	Aktivierung der Endothelzellen mit TNF α durch Pipettieren von 10 μ l einer TNF α Lösung der Konzentration 160 ng/ml. (entspricht der 1:31,25 verdünnten Stammlösung der Konzentration 5000 ng/ml) in die dafür vorgesehenen Wells mit 150 μ l Medium. Volumen pro Well ist dann also 160 μ l mit einer Konzentration an TNF α von 10 ng/ml
2	Inkubation der Platte mit den aktivierten und nicht aktivierten Zellen im Brutschrank für 4 Stunden bei 5 % CO ₂ , 37° C
3	Während die Zellen inkubieren: Abnahme von 60 ml Vollblut im Citratröhrchen (entspricht 6 Citratröhrchen); Verwerfen der ersten 5 ml, Rest 15 min ruhen lassen

4	Zentrifugieren bei Raumtemperatur, 1100UpM, ohne Bremse für 15 Minuten
5	Überführen der Fraktion über der sedimentierten Erythrozyten-, Leukozytenfraktion (= platelet rich plasma PRP) in 5 ml Polypropylenröhrchen
6	Zugabe von ACD (10 Volumenprozent), erneute Zentrifugation bei 37°C, 1400 UpM, mit Bremse für 10 min
7	Resuspension des Zellpellets in 1 ml RPMI + 10 % ACD
8	Zugabe von 5 µl Calcein AM pro ml, Inkubation bei 37°C, 5% CO ₂ für 15 min, dunkel
9	Auffüllen der Polypropylenröhrchen auf 5 ml mit RPMI + 10 % ACD
10	Zentrifugation bei Raumtemperatur, 1400 UpM für 10 min
11	Absaugen des Überstandes, resuspendieren des Zellpellets in 1ml RPMI ohne ACD
12	Zellzählung in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop
13	Erstellen einer seriellen Verdünnungsreihe beginnend mit der unverdünnten Konzentration; Volumen: 50 µl / Well
14	4 Stunden nach der Aktivierung mit TNFα: Absaugen des Mediums von den Endothelzellen
15	Zugabe von 50 µl pro Well der unverdünnten Thrombozytensuspension auf die Endothelzellen und Koinkubation für 30 min im Brutschrank
16	3 Mal waschen mit PBS
17	Zugabe von 50 µl RPMI pro Well
17	Zugabe von 60 µl 1xTriton zu den Wells mit den Endothelzellen und zur seriellen Verdünnungsreihe → Lyse; Volumen in allen Wells: 110 µl
18	Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln für 1 h
18	Einfrieren der Proben über Nacht bei -18°C
19	Auftauen der Proben auf dem Schüttler im Dunkeln bei Raumtemperatur
20	Messung im Fluorimeter bei 485 nm – 535 nm (Fluorescein)

Tabelle III.8: Protokoll zum Trombozytenadhäsionstest

III.3.4. PBMC Adhäsionstest

III.3.4.1. Messprinzip

Der Nachweis der Adhäsion von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) verläuft nach dem gleichen Prinzip wie der Test zum Nachweis von Thrombozytenadhäsion (vgl. III.3.3.).

Statt calceingefärbter Thrombozyten werden calceingefärbte PBMCs eingesetzt. Die Isolierung, Färbung und Koinkubation mit aktivierten bzw. nicht-aktivierten Endothelzellen wird in Tabelle III.9 beschrieben. Die Quantifizierung der adhärenierten Zellen erfolgt ebenso wie bei den Thrombozyten durch die Messung der relativen Fluoreszenz nach Färbung mit Calcein und Lyse der PBMCs.

III.3.4.2. Vorgehen

Die PBMCs werden nach folgendem Schema gewonnen, aufbereitet und mit den Endothelzellen koinkubiert:

Schritt	Vorgehen
1	Abnahme von 30 ml Vollblut im EDTA Röhrchen, 15 min ruhen lassen
2	Überführen des Vollblutes in ein 50 ml Falcon Röhrchen, in das 15 ml FICOLL Lösung vorgelegt wurde. Zentrifugation bei Raumtemperatur, 1800 UpM, ohne Bremse für 15 min
3	Überführen des Buffy Coats in ein frisches 50 ml Falcon Röhrchen und zweimaliges Waschen mit 1xPBS, dabei Zentrifugation bei 4°C, 1100UpM, mit Bremse für 10 min
4	Resuspension des Zellpellets in 2 ml HSVEC Medium und Zugabe von 10 µl Calcein AM
5	Inkubation bei 37°C, 5% CO ₂ für 15 min
6	Auswaschen des Calcein-AM mit 1xPBS, Zentrifugation bei 4°C, 1100UpM, mit Bremse für 10 min
7	Zellpellet in 5 ml HSVEC Medium resuspendieren und Zellzahlbestimmung mittels CASY

8	Verdünnen der PBMC Lösung auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml
9	Erstellen einer seriellen Verdünnungsreihe von 2×10^5 bis 7500 PBMCs pro 150 μ l zur Ermittlung einer Standardgeraden
10	Zugabe von 150 μ l der PBMC Suspension (entspricht 2×10^5 Zellen) zu den Endothelzellen
11	Koinkubation mit den Endothelzellen bei 37°C, 5 %CO ₂ für 15 min
12	Mehrmaliges Waschen mit PBS (3mal)
13	Absaugen des PBS und Lyse mit 60 μ l Triton pro Well; Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln für 1 h
14	Einfrieren der Proben bei Nacht bei -18° C
15	Auftauen der Proben auf dem Schüttler im Dunkeln
16	Messung der Fluoreszenz mit dem Fluorimeter bei 485-535 nm (Fluorescein)

Tabelle III.9: Protokoll zum PBMC Adhäsionstest

III.4. Statistische Auswertung

Wie bereits aus den oben aufgeführten Protokollen ersichtlich ist, wurden alle Versuche der statischen Kultur in Vierfachbestimmung durchgeführt. Aus den gemessenen Werten wurde so für jede Kultur aus vier Werten ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Da es sich bei den Daten um miteinander verbundene Stichproben handelte, die zudem nicht einer Normalverteilung entsprachen, wurden für die statistische Auswertung nichtparametrische Tests herangezogen: Zunächst wurde ein Friedman Test durchgeführt. Falls der Friedman Test einen p-Wert von $p < 0,05$ ergab, wurde zur weiteren Auswertung der Wilcoxon Test auf die Daten angewendet. Als signifikant wurde ein p-Wert im Wilcoxon Test von $p < 0,05$ definiert.

IV. Methodik der einzelnen Versuche

IV.1. Statische Versuche im 96-Well

Ziel der statischen Zellkulturversuche war die Untersuchung des Einflusses von titanisierten und nicht-titanisierten PU-Oberflächen auf das Wachstum, die Stoffwechselaktivität und die Funktion von Endothelzellen (Thrombozyten-, PBMC-Adhäsion).

IV.1.1. Übersicht über den Versuchsaufbau

Untersuchungsmaterial (Oberfläche: 0,3 cm²):

PU:	Poly(ether)urethane; Material-Nr. 50046 (DUALIS, Seefeld), Hersteller: Mecora (Aachen)
tiPU:	PU, Material-Nr. 50046, beschichtet mit Titancarboxonitrid (pmf medical titanium, Nürnberg)* ¹⁴
PS:	Referenzmaterial, Polystyrol (tissue cultured polystyrol), übliche Zellkulturoberfläche ²⁰

* Beschreibung der Beschichtungstechnik bei Lehle et al. 2003¹⁴

Untersuchungsmethoden:

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens und der mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Endothelzellen wurden zu drei Zeitpunkten (Tag 3, 5 und 7 nach Aussaat im 96-Well) die Zellzahl mittels CASY® (III.3.1.) und die Stoffwechselaktivität der Endothelzellen per MTS Reaktion (III.3.2.) bestimmt. Um die Biokompatibilität des Untersuchungsmaterials darzustellen, wurde am Tag 7 nach Aussaat die Thrombozytenadhäsion (III.3.3.) und die PBMC-Adhäsion (III.3.4.) untersucht.

Überblick über das Versuchsprotokoll:

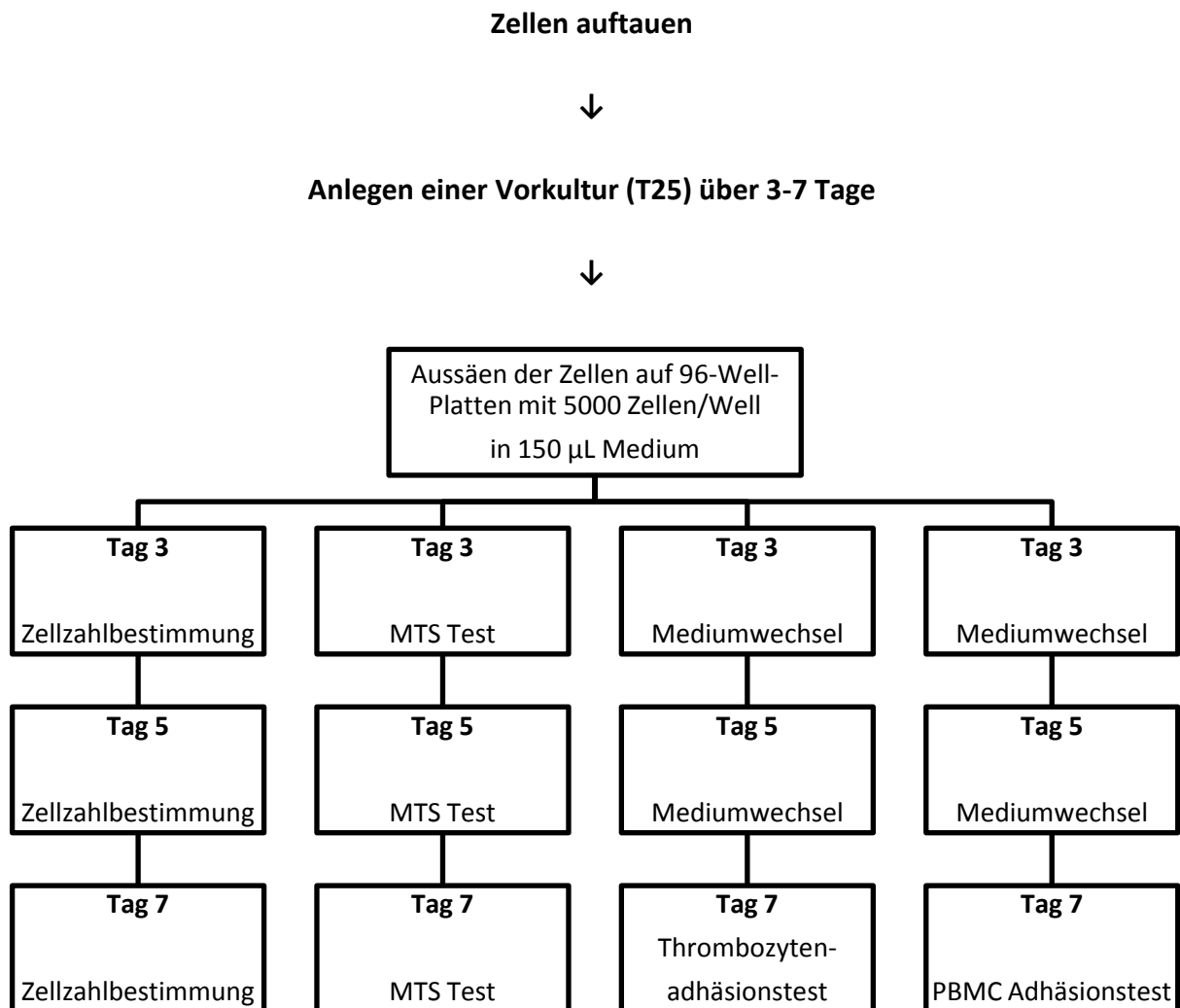


Abbildung IV.1: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

Für jede einzelne der verschiedenen Methoden, d.h. Zellzahlbestimmung, MTS Messung, Thrombozytenadhäsionstest, PBMC-Adhäsionstest, wurde eine eigene 96-Well-Platte verwendet. Dieses Versuchsprotokoll wurde insgesamt 6 Mal durchgeführt: Mit 4 verschiedenen, voneinander unabhängigen Endothelzellkulturen aus der Vena Saphena (HSVEC, human saphenous vein endothelial cells) und 2 HUVEC Kulturen (human umbilical vene endothelial cells), jeweils in Vierfach-Bestimmung. Dabei wurde immer dasselbe Medium verwendet [M 199 mit 10% FKS und einem Promocell Supplementpack (genaue Zusammensetzung siehe Materialliste)]. Da die zugrunde liegenden Prinzipien und das

Vorgehen der einzelnen Methoden bereits oben unter III.2. und III.3. vorgestellt wurden, wird im Folgenden nun auf die spezifische Durchführung der Methoden eingegangen.

IV.1.2. Protokoll zur Zellzahlbestimmung im 96-well-Maßstab

IV.1.2.1. Belegung der 96-Well-Platte

Sämtliche Plättchen wurden zunächst mit Ethanol (70%) bei einer Einwirkzeit von 12 Stunden behandelt und danach unter der Sterilbank getrocknet. Danach wurden sie mit einer Pinzette vorsichtig in die Wells der 96-Well-Platte eingepasst und mithilfe eines ebenfalls sterilen Metallrings, der von oben auf das Kunststoffplättchen gesetzt wurde, fixiert. Für jeden der drei geplanten Messzeitpunkte wurde eine eigene Platte verwendet. Durch die Vierfachbestimmung bei drei verschiedenen Materialien ergibt sich somit für jede der drei Platten folgendes Belegungsmuster:

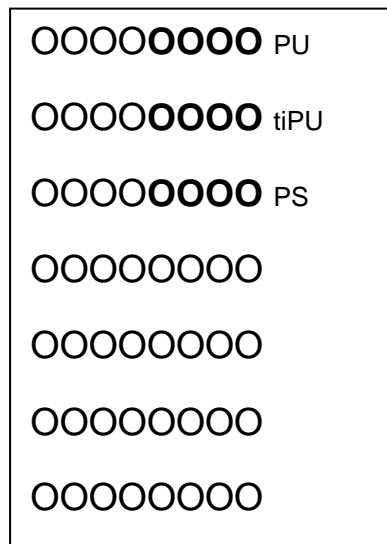


Abbildung IV.2: Belegung einer 96-Well Platte zum Zellwachstum mit Zellzählung

IV.1.2.2. Fibronectinbeschichtung

Anschließend wurden alle 12 belegten Wells mit Fibronectin beschichtet, um eine bessere Adhäsion der Endothelzellen an der Oberfläche zu gewährleisten (Tabelle IV.1).

Schritt	Vorgehen
1	Verdünnung der Fibronektinstammlösung um den Faktor 100 auf 10 µg/ml (1xPBS)
2	Pipettieren von 50 µl der verdünnten Fibronectinlösung pro Well
3	Leicht schwenken, so dass sich das Fibronectin gleichmäßig im Well verteilt
4	Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO ₂ für 30 Minuten
5	Absaugen der Fibronectinlösung mit einer Glaspipette

Tabelle IV.1: Protokoll zur Beschichtung der Wells mit Fibronectin

IV.1.2.3. Zellen aussäen

Zur Zellaussaat wurden die Zellen zuerst von der Kulturflasche (T 25) nach dem Protokoll in III.2.3. abgelöst und die Zellzahl mittels CASY® (III.3.1.) bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension entsprechend der gemessenen Zellzahl in der Suspension auf eine Konzentration 33.333 Zellen/ml verdünnt, was 5000 Zellen auf 150 µl Medium entspricht. Mit einer Mehrkanalpipette (8-Ausgänge) wurden nun 150 µl der Zellsuspension in jedes Well pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden danach im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

IV.1.2.4. Zellzahlbestimmung

Um Aufschluss über das Wachstum der Zellen auf den verschiedenen Materialien zu erhalten, wurde nun zu 3 Zeitpunkten (Tag 3, 5, 7 nach Aussaat (=Tag 1)) die Zellzahl in den Wells mittels CASY® bestimmt. Bei den verbleibenden Platten wurde das Medium gewechselt (Abb. IV.1).

IV.1.3. Protokoll zur MTS Messung im 96-well-Maßstab

Bei diesem Versuchsaufbau wurde exakt gleich vorgegangen wie bei der Zellzahlbestimmung (IV.1.2.): Die Kunststoffplättchen wurden in die Wells eingepasst und mit Fibronectin beschichtet. Danach wurden 5000 Zellen pro Well ausgesät. Ebenso wie bei der Zellzahlbestimmung wurde zu drei Zeitpunkten, an den Tagen 3, 5 und 7 nach der Aussaat die MTS Reaktion gemessen, wobei für jeden Messzeitpunkt eine eigene Platte verwendet wurde und bei den verbleibenden Platten ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die Quantifizierung der MTS Reaktion erfolgte durch Messung der Absorption im ELISA Reader. Es wurde die MTS-Absorption pro $0,3 \text{ cm}^2$ (Daten aus ELISA-Reader) und die MTS-Absorption pro Endothelzelle (ELISA-Daten geteilt durch die mit CASY bestimmte Zellzahl) dargestellt.

IV.1.4. Protokoll zum Thrombozytenadhäsionstest im 96-well-Maßstab

Die Vorbereitung des Untersuchungsmaterials erfolgte analog zu IV.1.2.1. Das Belegungsmuster der 96-Well-Platte sieht wie folgt aus (Abb. IV.3):

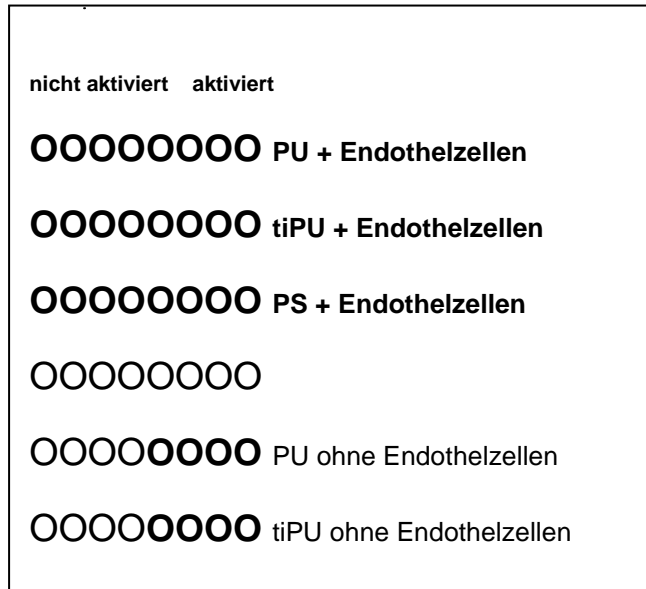


Abbildung IV.3: Belegungsmuster einer 96-Well-Platte für den Thrombozytenadhäsionstest. „Aktiviert“ bzw. „Nicht aktiviert“ bezieht sich auf die Aktivierung der ausgesäten Endothelzellen mit TNF α (10ng/ml) (siehe dazu Tabelle III.7).

Analog zur Zellzahlbestimmung wurden die Untersuchungsmaterialien mit Fibronectin beschichtet, mit 5000 Zellen pro Well bestückt und über 7 Tage im Brutschrank kultiviert (Mediumwechsel am Tag 3 und 5). Aufgrund der ermittelten Zellzahlen und der mikroskopischen Kontrolle an Tag 7 wurde postuliert, dass sich zu diesem Zeitpunkt in allen Wells, in denen Endothelzellen ausgesät wurden, ein konfluenten Monolayer gebildet hat und somit kein blankes Material den Thrombozyten für eine Adhäsion zugänglich ist. Die Quantifizierung der adhärenierten Thrombozyten erfolgte durch Fluoreszenzmessung (III.3.4.1.). Zur Umrechnung von der relativen Fluoreszenz auf die Thrombozytenzahl wurde mithilfe einer seriellen Verdünnungsreihe eine Eichgerade ermittelt. Die Steigung der Eichgeraden entspricht dem Umrechnungsfaktor ($8,97 \times 10^{-4}$). Die Eichgerade ist in Abbildung IV.4. dargestellt:

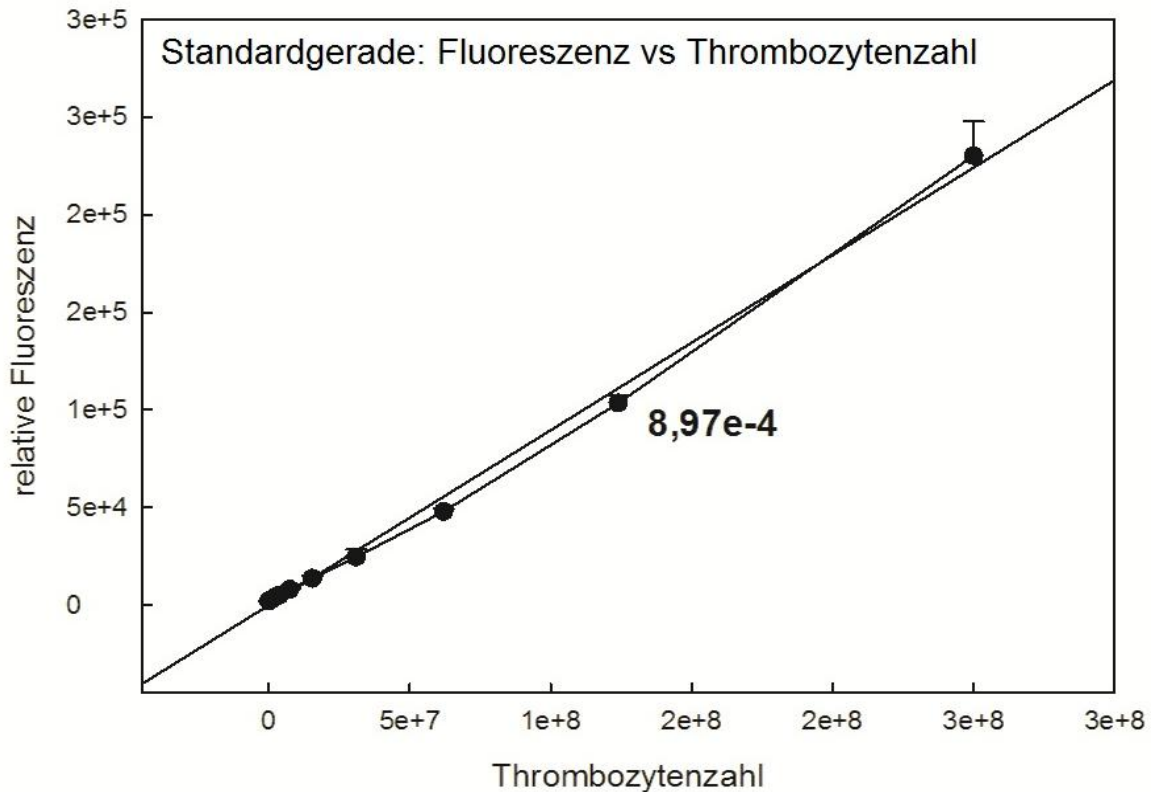


Abb. IV.4: Standardgerade zur Errechnung der Thrombozytenzahl. Werte einer seriellen Verdünnungsreihe aus einer Vierfachbestimmung. Umrechnungsfaktor von Fluoreszenz auf Thrombozytenzahl: $8,97 \times 10^{-4}$

IV.1.5. Protokoll zum PBMC-Adhäsionstest im 96-well-Maßstab

Der Nachweis der Adhäsion von PBMCs (**P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells) verlief nach dem gleichen Schema wie die Thrombozytenadhäsion, nur dass statt der calceingefärbten Thrombozyten calceingefärbte PBMCs eingesetzt wurden. Die Belegung der 96-Well-Platte sowie der gesamte weitere Versuchsaufbau entsprachen exakt dem Thrombozytenadhäsionstest, der in IV.1.4. beschrieben wurde. Auch hier wurde anhand einer seriellen Verdünnungsreihe eine Eichgerade ermittelt, deren Steigung (0,12) als Umrechnungsfaktor von der relativen Fluoreszenz auf die PBMC Zahl verwendet wird (Abb. IV.5.):

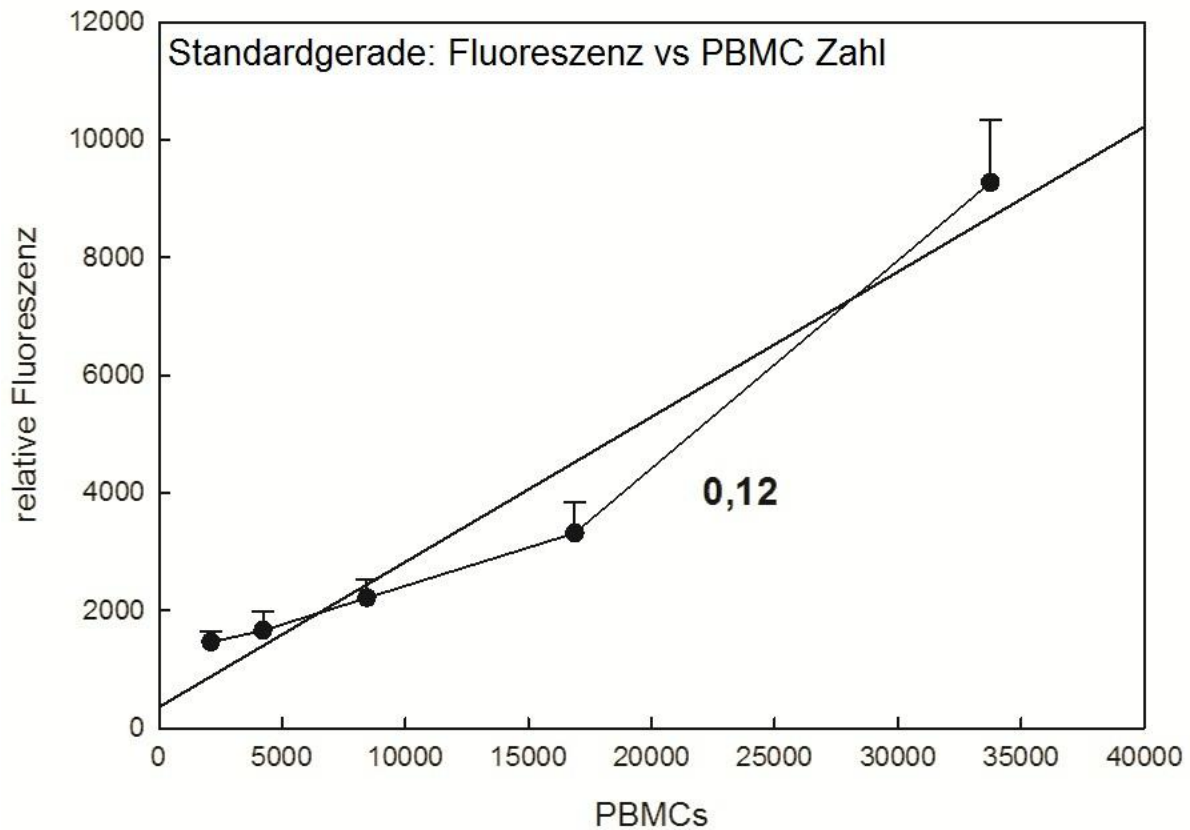


Abb. IV.5: Standardgerade zur Errechnung der PBMC Zahl. Werte einer seriellen Verdünnungsreihe aus einer Vierfachbestimmung. Umrechnungsfaktor von Fluoreszenz auf PBMC: 0,12

IV.2. Dynamische Versuche mit der Perfusionsanlage

Nachdem unter statischen Kulturbedingungen Wachstum und Funktion von Endothelzellen auf Polyurethan und titanisiertem Polyurethan untersucht wurden, stellt sich nun die Frage, ob Endothelzellen auch auf Polyurethan adhäreren, wenn sie einer pulsatilen Strömung mit den damit verbundenen Drücken und Scherkräften ausgesetzt sind.

IV.2.1. Übersicht über die Perfusionsanlage

Zu diesem Zweck wurde gemeinsam mit den Verfahrenstechnikern der Firma DUALIS Medtec (Seedorf) und des DLR (Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt, Oberpfaffenhofen) ein erster Prototyp für eine Perfusionsanlage entwickelt (Abb. IV.6).

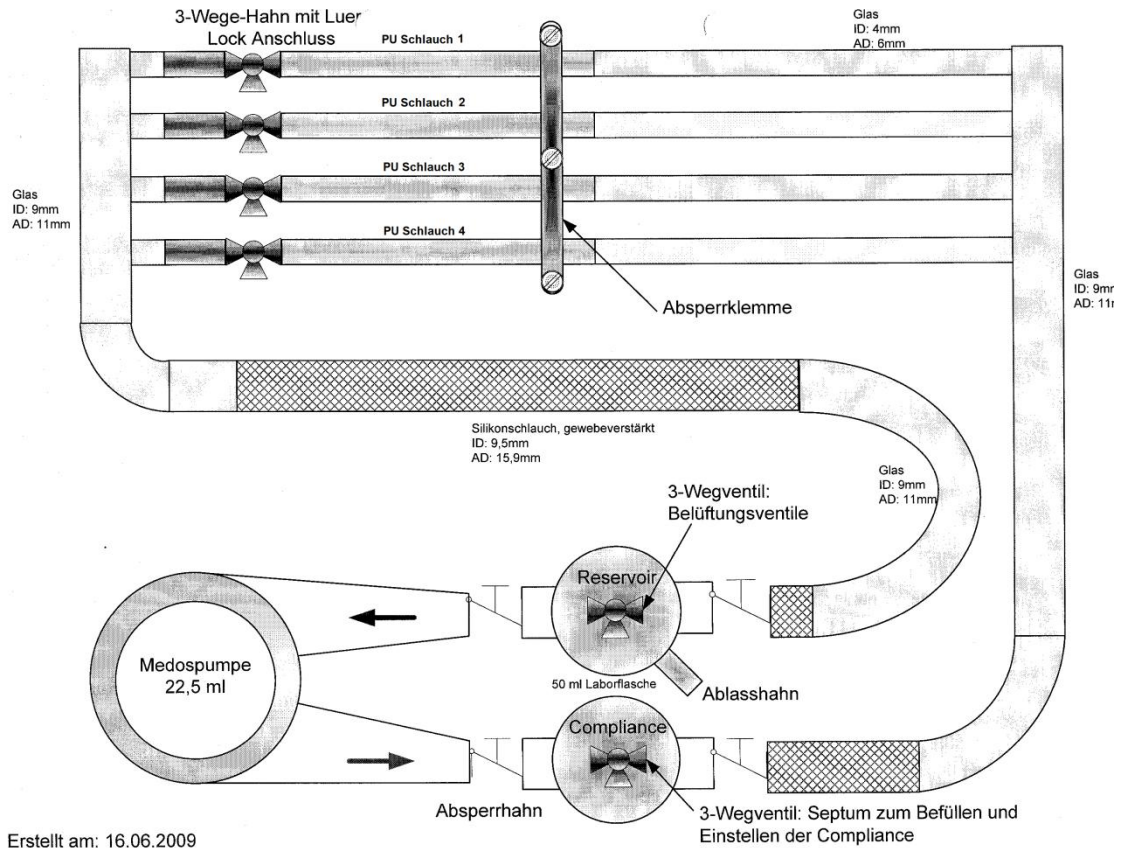


Abbildung IV.6: Bauplan der Perfusionsanlage; Dualis Medtec GmbH, Oberpfaffenhofen, 16.6.2009

Eine Medospumpe erzeugt dabei eine pulsatile Strömung, der die Endothelzellen in vier PU-Schläuchen ausgesetzt sind. Die PU-Schläuche werden über Dreiweghähne mit einer Endothelzellsuspension gefüllt. Durch anschließende definierte Rotation der Perfusionsanlage soll eine möglichst gleichmäßige Verteilung adhärenter Endothelzellen erreicht werden. Danach wird untersucht, ob der im besten Fall gleichmäßige Endothelzell-Monolayer auch einer pulsatilen Strömung standhält, indem die Pumpe angeschaltet wird. Mit der ersten Generation dieser Perfusionsanlage (siehe Bauplan) ließen sich keine Versuche durchführen. Die nötigen Modifikationen, die vorgenommen werden mussten, um

Versuche durchzuführen, sind im Kapitel V.2.1. als Teil der Ergebnisse dieser Arbeit aufgeführt. Damit der Leser die nun folgenden Methoden und Protokolle zur Arbeit mit der Perfusionsanlage besser nachvollziehen kann, werden hier - anstatt eines Bauplans - Bilder der modifizierten Perfusionsanlage präsentiert. Mit dieser Anlage wurden letztlich die Versuche zu Endothelzelladhäsion und Wachstum durchgeführt.

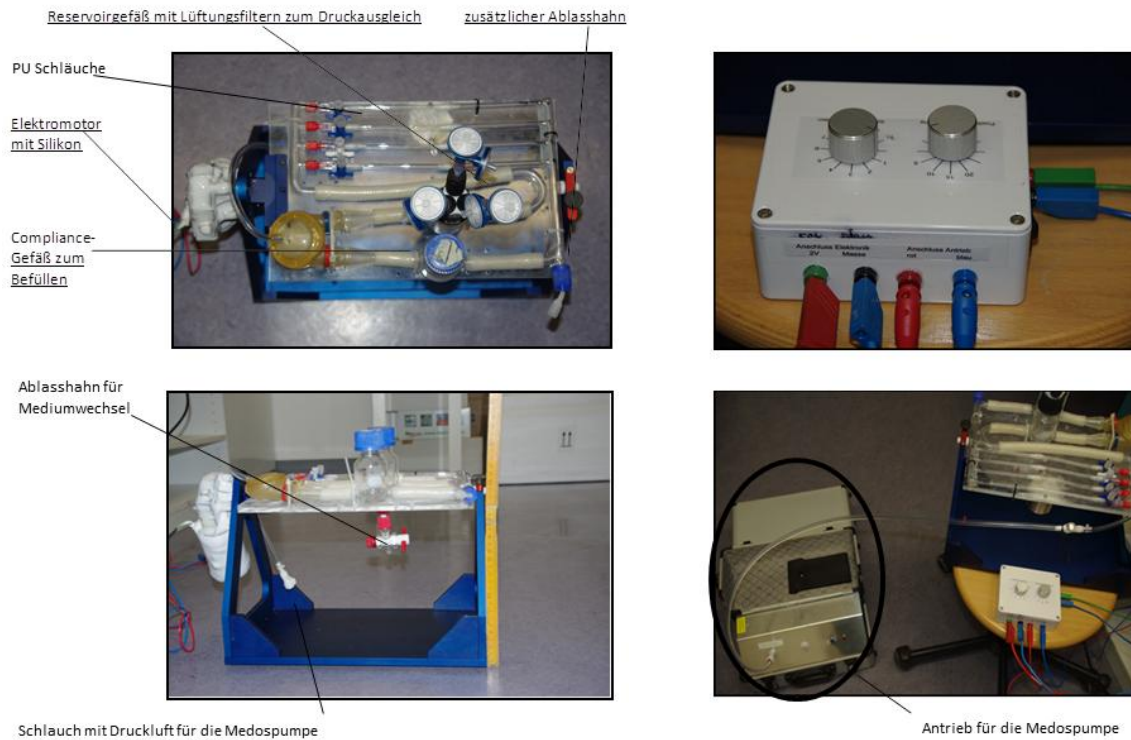


Abbildung IV.7: Modifizierte Perfusionsanlage in Bildern

IV.2.2. Methoden zum Gebrauch der Perfusionsanlage

IV.2.2.1. Messung der Volumenströme

Da die Volumenströme für die Größe der Scherkräfte verantwortlich sind, die auf die Endothelzellen wirken, mussten diese vor dem Seeding bestimmt werden. Die Volumenströme, die in den Polyurethanschläuchen herrschen, sind von der Pumpleistung

der Medospumpe abhängig, wobei sich deren Leistung durch das Einstellung der Spannung verändern lässt. In den Vorversuchen wurden die Volumenströme bei 12 Volt bestimmt. Dabei wurde auch überprüft, ob in allen vier Schläuchen das gleiche Volumen fließt.

Für die Messung wurde das Gerät „nova flow“ der Firma „Novalung“ (siehe Materialliste) verwendet. Die Messungen wurden durchgeführt, indem die Perfusionsanlage mit Wasser befüllt und an dem Netzteil für die Medospumpe eine beliebige Spannung angelegt wurde, z.B. 12 V. Die Polyurethanschläuche wurden mit Fett oder Öl befeuchtet und dann der Druckabnehmer des Volumenstrommessgeräts um den zu messenden PU-Schlauch gelegt. Danach wurde gemessen, wie viel Wasser in einer Minute durch den Schlauch geflossen ist. Dieser Wert ergibt den Volumenstrom in ml/min. Die Messungen wurden mehrmals wiederholt.

IV.2.2.2. Kultivierung der Endothelzellen

Alle Versuche wurden mit HSVEC durchgeführt. Als Medium wurde das gleiche Medium wie bei den statischen Versuchen (Kapitel IV.1.) verwendet: M 199, 10% FKS mit einem Promocell Supplementpack (Zusammensetzung siehe Materialliste). Es wurden mindestens 2×10^6 Endothelzellen aufgetaut und auf einer Kulturflasche T 175 ausplattiert. Nach 5 bis 7 Tagen war auf dieser ein konfluenter Endothelzellrasen unter dem Lichtmikroskop zu sehen, so dass die Zellen abgelöst und auf zwei weitere T 175 oder eine „Triple Flask“ Kulturflasche passagiert werden konnten. Die Endothelzellen befanden sich zum Seeding in Passage 4.

IV.2.2.3. Vorbereitung der Perfusionsanlage

Bevor die Perfusionsanlage für einen Versuch verwendet werden kann, müssen mehrere Vorkehrungen getroffen werden: Die Polyurethanschläuche müssen an den dafür vorgesehenen Stellen eingebaut werden. Ein Ende wird auf den Dreiwegehahn, das andere Ende auf das Glasröhrchen gesteckt, wobei der Schlauch bis über die „Olive“ geschoben werden muss, um Dichtigkeit zu gewährleisten. Diese Steckverbindungen werden mit Parafilm fest umwickelt und so abgedichtet. Da die Perfusionsanlage für die Versuche steril sein muss, werden alle Kappen und Verschlüsse abmontiert, die Anlage wird mit Ethylenoxid

in der Zentralsterilisation sterilisiert und direkt vor dem Versuch unter der Sterilbank unter Wahrung der Sterilität wieder zusammengesetzt.

IV.2.2.4. Vorbereitung des Mediums

Damit das Medium zum Zeitpunkt des Seedings optimale Temperatur, CO₂ Konzentration und pH-Wert hat, wurden 250 ml des Versuchsmediums am Abend vor dem Versuchstag in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Becherglas in den Brutschrank gestellt. Vorversuche haben ergeben, dass ab 6 Stunden Inkubation im Brutschrank die bestmöglichen Werte erreicht werden. Zur Überprüfung der Werte wurde eine 2 ml Probe zur Analyse mit dem Blutgasanalysegerät der Intensivstation entnommen.

IV.2.2.5. Befüllen der Perfusionsanlage

Unter der Sterilbank wird das Medium über das Compliancegefäß (siehe Abbildung IV.6) in die Perfusionsanlage gefüllt. Dabei ist es wichtig, dass sich nach dem Befüllen keine Blasen und kein Schaum im System befinden. Um dies zu gewährleisten, wird nach folgendem Protokoll vorgegangen, das in zahlreichen Vorversuchen ausgearbeitet wurde.

Schritt	Vorgehen
1	Deckel vom Compliancegefäß abnehmen
2	180 ml Medium aus einem Becherglas vorsichtig in das Compliancegefäß geben und danach den Deckel wieder verschließen
3	Anlage vorsichtig schwenken, bis sich das Medium im gesamten System gleichmäßig verteilt hat
4	Medospumpe einschalten und langsam pumpen lassen (angelegte Spannung ca. 5 V) bis das Medium blasenfrei ist. (Luftblasen müssen durch den Strom ins Reservoirgefäß geschwemmt werden und steigen dort auf)
5	Befinden sich nach mehreren Minuten immer noch Blasen im System (dies ist häufig z.B. in der Ein- und Ausstrombahn der Medospumpe der Fall), Anlage

	erneut schwenken oder auf die Blasen klopfen.
6	Medospumpe ausschalten und über das Compliancegefäß das restliche Medium bis zum gewünschten Füllstand zugeben.

Tabelle IV.2: Befüllen der Perfusionsanlage mit Medium

IV.2.2.6. Fibronectinbeschichtung

Auch das Seeding findet unter der Sterilbank statt. Damit die Endothelzellen an den PU-Schläuchen adhären können, wurden diese mit Fibronectin beschichtet:

Schritt	Vorgehen
1	In einem Becherglas werden 10 ml einer 1:100 Verdünnung der Fibronectinstammlösung mit der Endkonzentration 10 µg/ml hergestellt.
2	Fibronectinlösung wird in eine 10 ml Spritze aufgezogen
3	Dreiwegehähne der Perfusionsanlage so stellen, dass sie zum System hin geschlossen und nur zu den Schläuchen hin offen sind
4	4 Bulldog-Klemmen bereit legen
5	Spritze auf den ersten Dreiwegehahn setzen und 2 ml in den Schlauch spritzen
6	Schlauch kurz vor dem Glasröhrchen mit einer Bulldog-Klemme abklemmen, damit sich das Fibronectin nicht im System verteilt, Dreiwegehahn verschließen;
7	Mit den weiteren 3 Schläuchen genauso verfahren
8	Inkubation für 1 h im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO ₂

Tabelle IV.3: Beschichten der PU Schläuche mit Fibronectin

IV.2.2.7. Seeding und Rotation der Perfusionsanlage

Die beiden Verfahren zum Seeding und zur Rotation der Perfusionsanlage wurden im Laufe der Versuche weiterentwickelt um die Ergebnisse zu optimieren.

Aufgrund der Konstruktion der ersten Generation der modifizierten Perfusionsanlage konnte das System nicht um 360° gedreht werden, sondern ausgehend von der horizontalen Ebene nur 90° in jede Richtung gedreht werden, so dass insgesamt eine Drehung von 180° möglich war. So wurde die Anlage alle 4 Minuten per Hand um ca. 23° weitergedreht (entspricht 8 Positionen pro 180°), bis der Anschlag erreicht war, danach genau gleich in die Gegenrichtung. Dieses „Wippen“ wurde über 2 Stunden durchgeführt.

Nach folgendem Protokoll wurden die ersten Versuche durchgeführt (vgl. Ergebnisse, Kapitel V.2.4.1.):

Schritt	Vorgehen
1	Ablösen der Endothelzellen aus den Kulturflaschen (T 175 oder Triple Flask)
2	Zellzählung mit CASY®
3	Verdünnung auf 1×10^6 Zellen pro ml; d.h. 2×10^6 Zellen pro Schlauch
3	Aufziehen von 8 ml der Zellsuspension in eine 10 ml Spritze
4	Befüllen der Schläuche von Schlauch 1 bis 4 nacheinander über die Dreiwegehähne
5	Schlauchenden werden ca. 5 mm vor dem Ende des Glasröhrchens mit einer Klemme abgeklemmt, so dass sich die Zellsuspension zwischen Klemme und Dreiwegehahn befindet.
6	Anlage wird in den Brutschrank gestellt und der Elektromotor über Buchse im Brutschrank an das Netzteil angeschlossen.
7	2 Stunden Rotation: 8 Haltepunkte auf 180°, Standzeit jeweils 4 Minuten; entspricht einer Drehung um 23° alle 4 Minuten

Tabelle IV.4: Seeding und Rotation der ersten Versuche

Da die Ergebnisse nach den ersten Versuchen zeigten, dass sich die Zellen so hauptsächlich am Boden der Schläuche absetzten und die obere Seite der Probenschläuche ohne Zellen blieb (siehe Ergebnisse V.2.4.1.), wurde die Anlage noch einmal überarbeitet. Mit der

zweiten Version der Anlage wurde eine 360° Rotation möglich. Zusätzlich wurde in den Versuchsaufbau eine Zeitschaltuhr integriert, die die Anlage über 2 Stunden alle 4 Minuten um 24° weiterdreht (15 Positionen auf 360°). Dieses Rotationsschema wurde für die folgenden Versuche verwendet, deren Ergebnisse in Kapitel V.2.4.2. zu finden sind. Schließlich wurde aufgrund der Ergebnisse in V.2.4.2. das Protokoll zum Seeding und das Rotationsschema nochmals überarbeitet. Die genaue Anleitung für ein Seeding mit einer gleichmäßigen Endothelzelladhäsion ist in folgendem Protokoll Tabelle IV.5 beschrieben. Nach diesem Schema wurden die Versuche zu Endothelzelladhäsion und Wachstum durchgeführt, deren Ergebnisse in V.3. zu finden sind.

Schritt	Vorgehen
1	Ablösen der Endothelzellen aus den Kulturflaschen (T 175 oder Triple Flask)
2	Zellzählung mit CASY®
3	Verdünnung auf die gewünschte Zellzahl. Diese variiert je nach Versuch zwischen 2×10^6 und $3,5 \times 10^6$ Zellen pro ml und entspricht bei einem Schlauchvolumen von 2 ml zwischen 4 und 7 Millionen Zellen pro Probenschlauch
3	Aufziehen von 8 ml der Zellsuspension in eine 10 ml Spritze
4	Befüllen des ersten (äußersten) Schlauches: 10 ml Spritze mit der Zellsuspension wird auf den Dreiwegehahn aufgesetzt und 2 ml der Zellsuspension werden langsam in den Probenschlauch gespritzt, bis die Zellsuspension am Glasröhrchen angekommen ist.
5	Schlauchende wird ca. 5 mm vor dem Ende des Glasröhrchens mit einer Klemme abgeklemmt, so dass sich die Zellsuspension zwischen Klemme und Dreiwegehahn befindet. (Dauer des Befüllvorgangs: 1 min)
6	Anlage wird von Hand rasch auf den Kopf gedreht (= 180° Drehung) und verweilt dort 1 min
7	Anlage wird rasch zurückgedreht und der zweite Schlauch genau wie in Schritt 4 und 5 befüllt; Dauer: 1 min
8	Wiederholung von Schritt 6

9	Wiederholung von Schritt 4 und 5 mit Schlauch 3
10	Wiederholung von Schritt 6
11	Wiederholung von Schritt 4 und 5 mit Schlauch 4
12	Wiederholung von Schritt 6
13	Anlage wird auf dem Kopf stehend in den Brutschrank gestellt und der Elektromotor an die Kabel im Brutschrank angeschlossen. Nach Ablauf einer Minute wird sie wieder in die Ausgangsposition zurückgedreht.
14	2 Stunden Rotation: 5 Haltepunkte auf 360°, Standzeit jeweils 4 Minuten; entspricht einer Drehung um 72° alle 4 Minuten

Tabelle IV.5: Seeding

IV.2.2.8. Pumpbetrieb

Nachdem die Anlage zwei Stunden rotiert hat, wird davon ausgegangen, dass sich alle Endothelzellen gleichmäßig auf den PU-Schläuchen abgesetzt und adhäriert haben. Die Rotation wird eingestellt, die Klemmen/Dreiwegehähne an den PU-Schläuchen geöffnet, die Medospumpe über den Druckluftschlauch an den Antrieb angeschlossen und eine Spannung von 12 Volt angelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Segel der Medospumpe auch vollständig durchgedrückt wird. Ist das nicht der Fall, muss die Segelposition in der Medospumpe mit der Stellung des Kolbens im Antrieb synchronisiert werden. Der Pumpbetrieb findet dann im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ für beliebige Zeit statt.

IV.2.3. Analytische Methoden

IV.2.3.1. Fluoreszenzmikroskopie

Die Probenschläuche werden mikroskopisch analysiert, um die Endothelzellen, die auf dem PU adhärirt oder gewachsen sind, zu quantifizieren. Dafür werden die Proben mit Formaldehyd fixiert. Die Zellen erhalten eine Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid). Dabei bindet der Farbstoff selektiv an DNA, wodurch stark fluoreszierende DNA-DAPI Komplexe entstehen, während das Zytoplasma nicht fluoresziert. Die Proben werden unter dem Fluoreszenzmikroskop in der 10x Vergrößerung betrachtet. Repräsentative Ausschnitte werden fotografiert und können dann mit der Software ImageJ ausgewertet werden, indem der Flächenanteil der fluoreszierenden Kerne berechnet wird. Über eine zuvor erstellte Eichgerade (Abb. IV.8), bei der die Anzahl fluoreszierender Kerne gegen den berechneten Flächenanteil aufgetragen wird, ist somit die Endothelzellzahl auf den PU Schläuchen quantifizierbar.

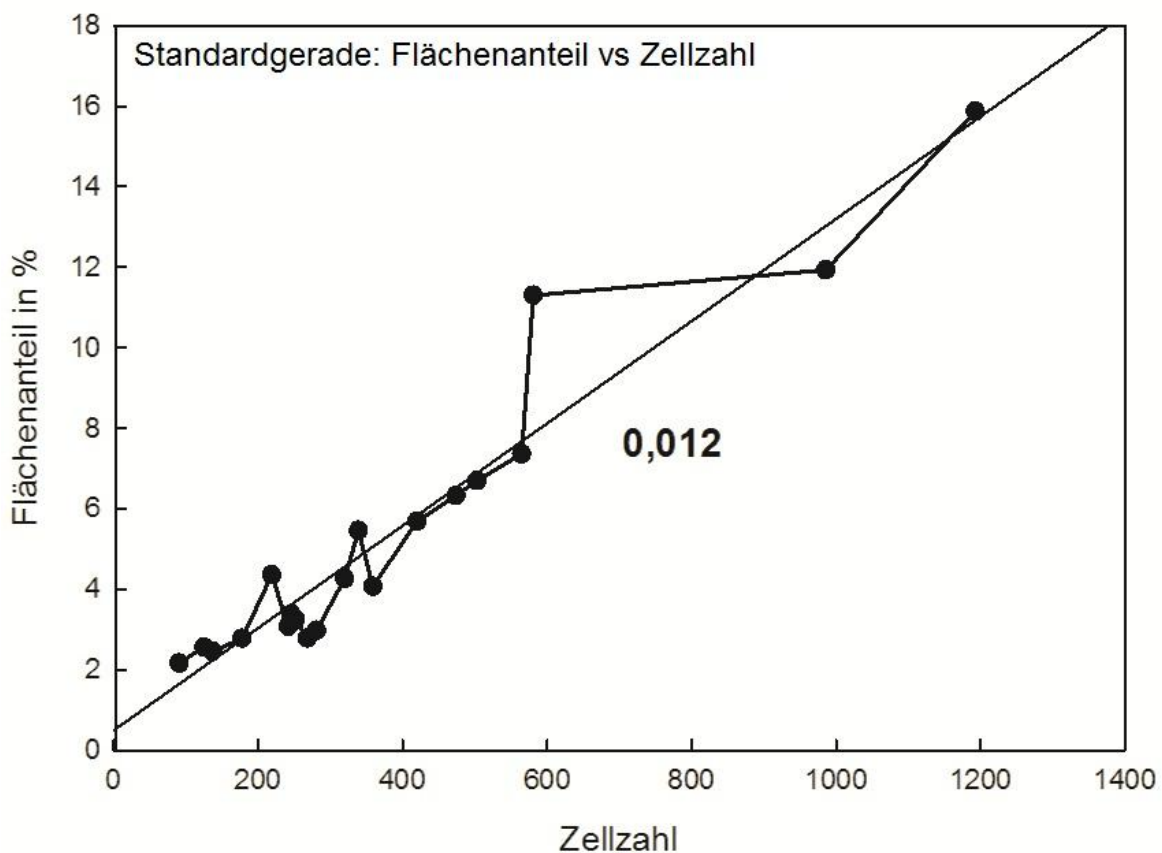


Abb. IV.8: Standardgerade zur Umrechnung des Flächenanteils fluoreszierender Kerne auf die Zellzahl pro $0,27 \text{ mm}^2$. Steigung der Geraden (= Umrechnungsfaktor): 0,012

Tabelle IV.6 beschreibt das genaue Vorgehen zum Ausbau der PU Schläuche aus der Perfusionsanlage und die einzelnen Schritte zur Fixierung und Färbung der Proben.

Schritt	Vorgehen
1	Dreiwegehahn muss so stehen, dass der Zugang zum System geschlossen ist, eine Bulldog-Klemme wird 5 mm vor dem Glasröhrchen angesetzt.
2	Anbringen einer zweiten Klemme (OP Klemme) ca. 2-3 mm hinter der Bulldog-Klemme
3	Die Schläuche werden an der Oberseite mit einem Strich markiert und mit einem wasserfesten Marker nummeriert.
4	Die Schläuche werden mit einer scharfen Schere zwischen den Klemmen und vor dem Dreiwegehahn vorsichtig durchtrennt. Der Schlauch darf dabei nicht kollabieren.
5	Waschen der Proben in PBS: Die Klemme am Schlauch wird geöffnet und der Schlauch vorsichtig in ein 25 ml Falcon mit PBS getaucht
6	Fixierung in 4% Paraformaldehyd: 8 ml Paraformaldehyd werden in ein 25 ml Falcon gefüllt und der Probenschlauch dort für 5-7-Minuten vollständig eingetaucht
7	DAPI Färbung: 12 ml einer 1:100 verdünnten DAPI Stammlösung, Konzentration 5µg/ml wird in ein 25 ml Falcon gefüllt. Die fixierten Probenschläuche werden in diese Lösung getaucht, das Falcon geschlossen und mit Aluminiumfolie als Lichtschutz umwickelt.

Tabelle IV.6: Fixierung und DAPI Färbung

Beim Mikroskopieren tritt das Problem auf, dass die PU-Schläuche eine relativ dicke Wand besitzen und somit in ihrer Krümmung steif sind. Daher ist es nicht möglich, den Schlauch einfach auf einer Seite aufzuschneiden, auszurollen und mit einem Deckglas einzudeckeln. Um die Spannung zu reduzieren, wird ein 1 cm langes Schlauchteil aus der Mitte des PU-Schlauchs mit einer scharfen Schere vorsichtig in fünf bzw. sechs etwa gleichgroße Scheiben geschnitten und diese auf einen Projektträger gelegt. Bei der Analyse der ersten dynamischen Versuche wurde der Schlauch noch in 5 Scheiben geschnitten. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine bessere Bildqualität in der Mikroskopie erzielt werden konnte,

wenn der zu analysierende Schlauch in 6 statt 5 Scheiben geschnitten wurde. Daraufhin wurden alle weiteren Versuche mit 6 Teilstücken durchgeführt. Wie in Tabelle IV.6 beschrieben, wurde bereits beim Ausbau aus der Perfusionsanlage die Oberseite des PU-Schlauchs mit einem Strich markiert. An diesem Strich wird der Schlauch aufgeschnitten, in sechs gleich große Teilstücke geteilt und dann so auf den Objektträger gelegt, dass sie von oben nach unten den aufgeklappten Schlauch darstellen. Teilstück 1 und 6 entsprechen also in etwa der Oberseite, 3 und 4 dem Boden, 2 und 5 der Wand des PU-Schlauchs. Als Eindeckmedium wird Fluromount® verwendet. Da herkömmliche Deckgläser den Druck nicht aushalten und zerspringen, wird zum Eindecken ein zweiter Objektträger verwendet, der mit Druck auf die Probe aufgelegt und mit Tesafilm fixiert wird. So wird gewährleistet, dass keine Luftblasen vorhanden sind und die Schlauchteile annähernd flach auf dem Objektträger liegen. Anschließend werden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop in der 10x Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert.

Die einzelnen Schritte sind hier noch einmal tabellarisch aufgeführt:

Schritt	Vorgehen
1	1 cm Schlauch wird aus der Mitte des Probenschlauchs herausgeschnitten
2	Der Schlauch wird an der Markierung für die Oberseite aufgeschnitten und noch einmal der Länge nach halbiert, bevor dann jede Hälfte der Länge nach in 3 gleich große Stücke geschnitten wird
3	Die 6 Einzelteile werden so auf den Projektträger gelegt, dass die Schlauch Innenseite nach oben schaut und die Schlauchstücke von oben nach unten dem aufgeklappten Schlauch entsprechen
4	Pro Einzelstück ein Tropfen Fluromount
5	Eindecken: Objektträger wird auf die Probe gedrückt und an den Enden mit Tesafilm fixiert
6	Die Proben werden mikroskopiert (10er Objektiv) und fotografiert: pro Schlauchteil mindestens 1 repräsentatives Bild; ist eine Scharfstellung aufgrund der Oberflächenwölbung nicht möglich, werden mehrere Bilder im 20 µm Abstand aufgenommen und dann im Image J aufeinander projiziert
7	Auswertung im Image J

Tabelle IV.7: Eindecken und Mikroskopieren der Proben

Tabelle IV.8 zeigt die einzelnen Schritte, die mit der Software ImageJ notwendig sind, um die Zellzahl zu ermitteln:

Schritt	Vorgehen
1	Öffnen des Bildes; wurden mehrere Bilder vom gleichen Ausschnitt aufgenommen, werden alle gleichzeitig geöffnet
2	Reduktion des Hintergrunds um 50 Pixel: Process→Subtract Background
3	Evtl. Optimierung von Helligkeit und Kontrast: Image →Adjust →Brightness/Contrast
4	Projektion der einzelnen Aufnahmen aufeinander: Image→Stacks→Images to Stack→Z-Project (max. intensity)
5	Festlegen des Schwellenwerts (Threshold): Image→Adjust→Threshold (red, dark background)
6	Bestimmung des Flächenanteils der markierten Fläche: Analyze→Measure
7	Multiplikation des Flächenanteils mit dem Faktor 1/0,012 ergibt die Zellzahl pro 1200x1600 Pixel (=269640,12 μm^2)

Tabelle IV.8: Auswertung im ImageJ

IV.2.3.2. MTS Messung

Wie in Kapitel IV.1.3. soll auch bei den Versuchen mit der Perfusionsanlage die Stoffwechselaktivität der Endothelzellen mit der MTS Reaktion und der Messung der Absorption dargestellt werden. Dabei wird grundsätzlich wie in III.3.2. vorgegangen, allerdings mit dem Unterschied, dass die Zellen sich nicht auf dem Boden einer 96-Well-Platte befinden, sondern auf den PU-Schläuchen. Vor dem Fixieren der besiedelten PU-Schläuche für die DAPI-Färbung werden Schlauchringe mit vitalen Zellen herausgenommen und in 0,5 cm lange Stücke zerteilt. Weiteres Vorgehen ist in Tabelle IV.9 beschrieben.

Schritt	Vorgehen
1	In eine 96-Well-Platte werden 200 µl MTS Reagenz pipettiert (1:6 Verdünnung der Stammlösung mit Endothelzell-Basalmedium von Promocell®) Pro Schlauch werden 4 Wells benötigt, dazu 4 Wells für den Blankwert.
2	Von dem Probenschlauch werden vier 0,5 cm lange Stücke abgeschnitten und mit einer Pinzette in die Wells mit der MTS Lösung gelegt.
3	Inkubation im Brutschrank für 1h bei 37°C, 5% CO ₂
4	Umpipettieren von je 120 µl in ein neues Well
5	Messung im ELISA Reader bei 490-650 nm

Tabelle IV.9: MTS Messung bei PU Schläuchen

V. Ergebnisse

V.1. Einfluss von Polyurethan und titanisiertem Polyurethan auf Endothelzellen in der statischen Zellkultur

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde der Einfluss von PU und tiPU auf das Proliferationsverhalten (V.1.1.), die Stoffwechselaktivität (V.1.2.) und die Funktion (Thrombozytenadhäsion, V.1.3; Adhäsion von PBMC, V.1.4) von Endothelzellen untersucht. Die entsprechenden Methoden wurden unter III. und IV. beschrieben.

V.1.1. Proliferationsverhalten

Das Proliferationsverhalten der EC wurde über sieben Tage verfolgt (Abb. V.1, V.2). EC wuchsen auf PS signifikant schneller (Wilcoxon-Test: $p = 0,028$). So lag die Zellzahl am 5. Tag um Faktor $6,1 \pm 1,0$ signifikant über der Ausgangszellzahl ($p < 0,001$). Das Wachstum der EC auf PU war bis Tag 5 in allen Kulturen verlangsamt (Tag 3: 7990 ± 2470 EC/ $0,3\text{cm}^2$; Tag 5: 10425 ± 2150 EC/ $0,3\text{cm}^2$). Nach der Durchführung von Friedmann- und Wilcoxon-Test zeigte sich, dass die Änderung der Zellzahl von Tag 3 auf Tag 5 nicht signifikant war ($p = 0,075$). Erst am Tag 7 lag die Zellzahl auf PU um Faktor $4,0 \pm 1,0$ signifikant über der Ausgangszellzahl ($p < 0,001$), erreichte jedoch nicht die Zellzahl der EC auf PS (Abb. V.3). Dies entspricht einer Zelldichte von 49% im Vergleich zur Kultivierung auf PS. Die Titanisierung der PU-Oberfläche beschleunigte das Proliferationsverhalten der EC, sodass am Tag 5 die ausgesäte Zellzahl um Faktor $3,8 \pm 0,9$ signifikant zunahm ($p < 0,001$). Am Tag 7 wurde bei 4 von 6 Kulturen eine vergleichbare Zellzahl wie bei PS erreicht (Abb. V.1), sodass sich kein signifikanter Unterschied zu PS ergab ($p = 0,116$) (Abb. V.3).

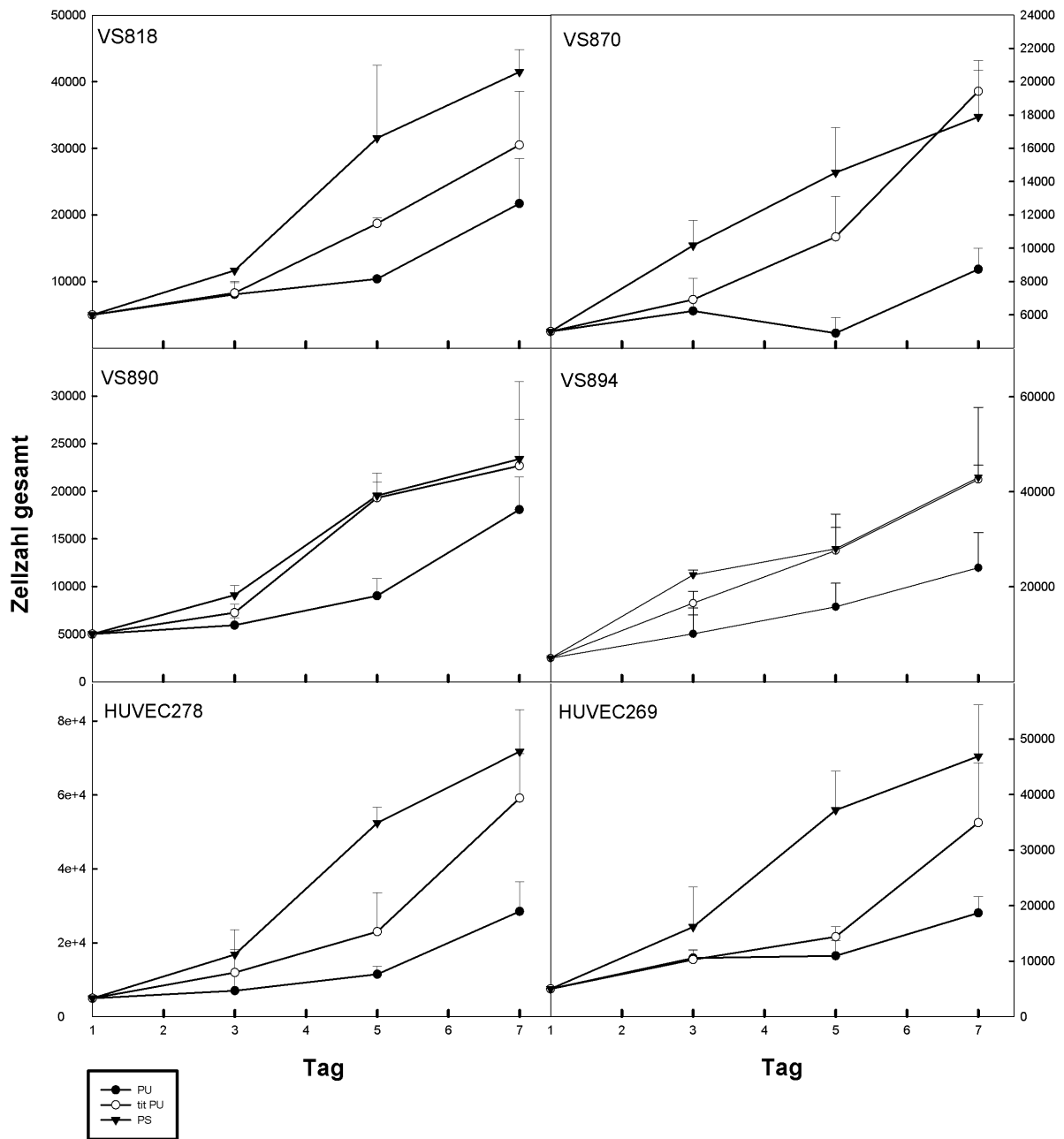


Abb. V.1: Proliferationsverhalten von sechs Einzelkulturen (MW \pm SD einer 4x-Bestimmung) auf Polyurethan (PU), titanisiertem Polyurethan (tiPU) und Polystyrol (PS) über sieben Tage. Zellzahl gesamt = Zellzahl pro 0,3 cm²

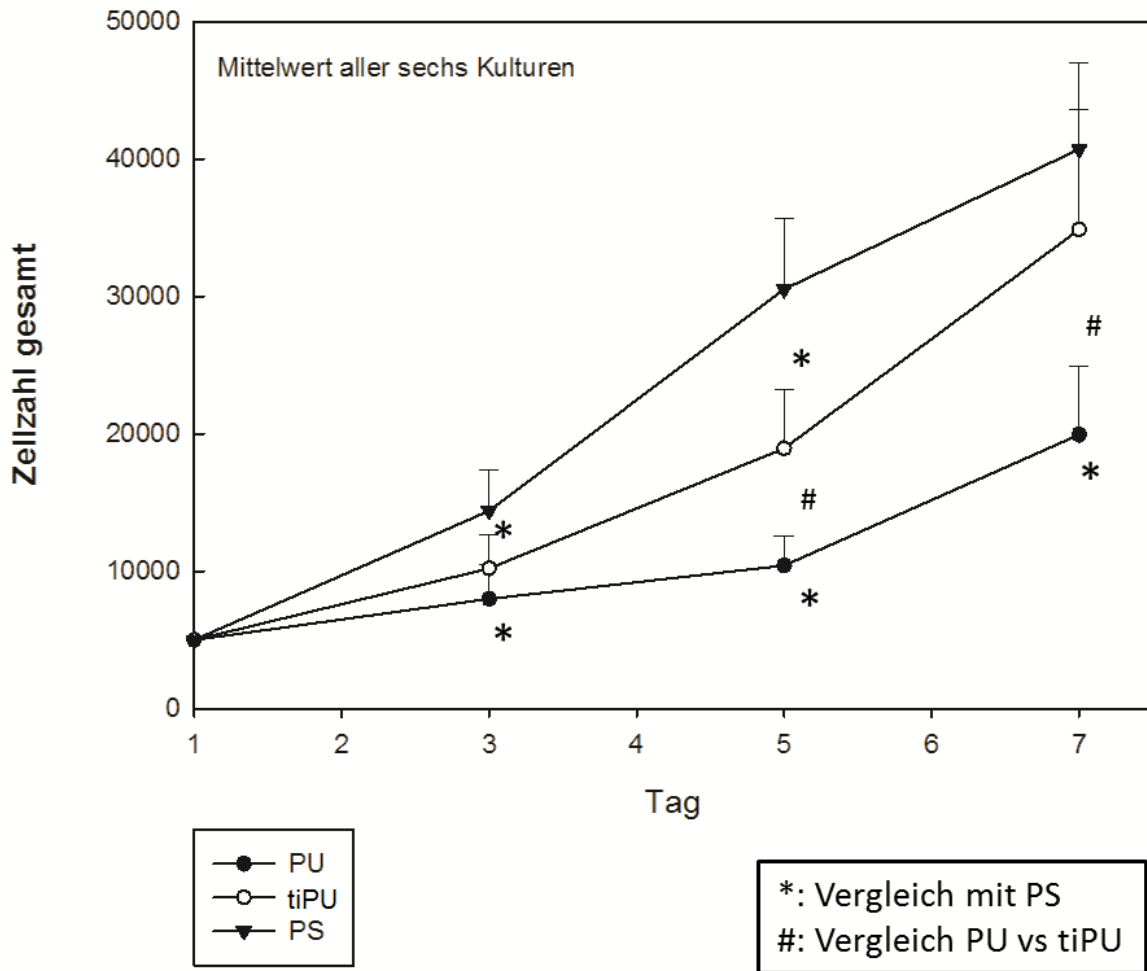


Abb. V.2: Mittelwert der Wachstumskurven aus sechs Einzelkulturen (MW ± SD) auf Polyurethan (PU), titanisiertem Polyurethan (tiPU) und Polystyrol (PS) über sieben Tage.

Zellzahl gesamt = Zellzahl pro 0,3 cm²

*: $p \leq 0,028$ signifikant

#: $p \leq 0,028$ signifikant

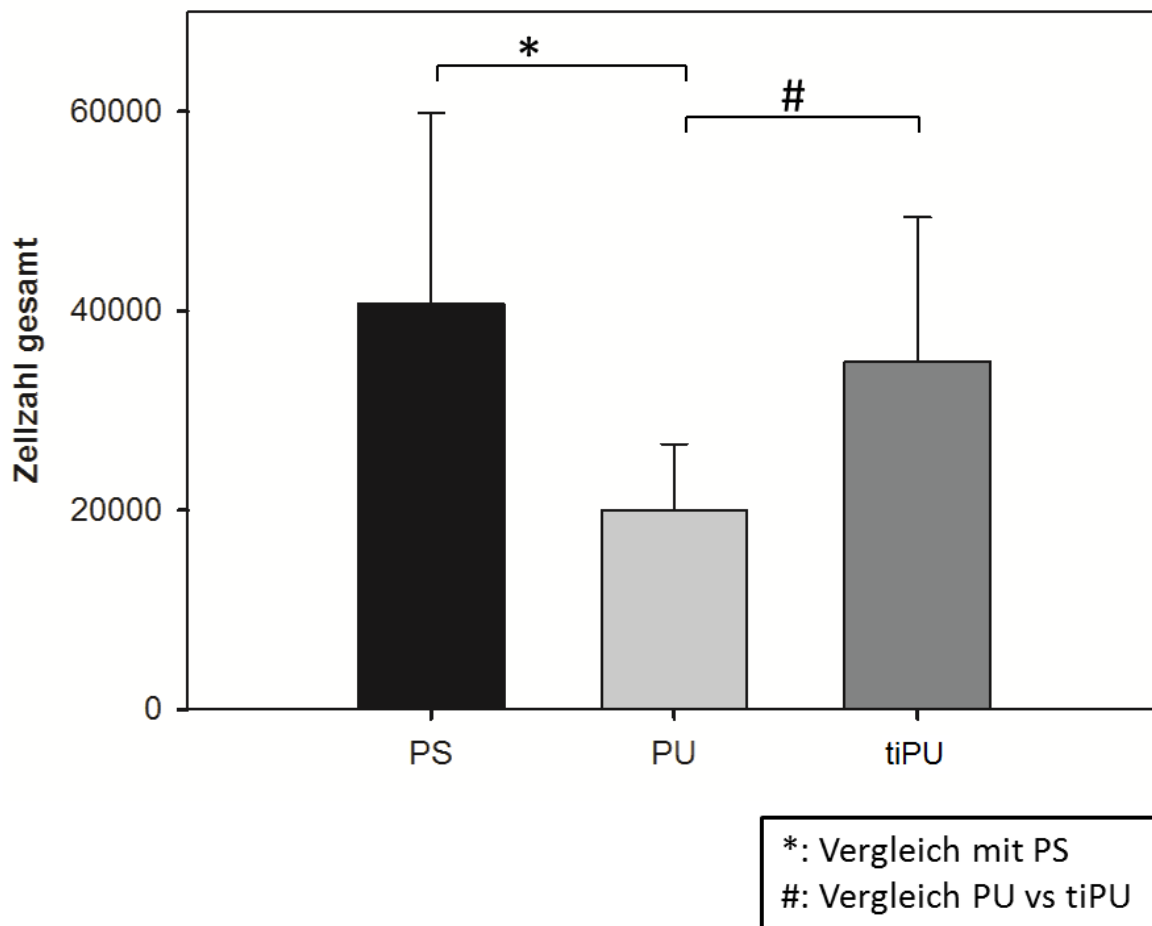


Abb. V.3: Vergleich der Zellzahlen am Tag 7 nach Aussaat (MW ± SD aus sechs Einzelkulturen) auf Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU). Zellzahl gesamt = Zellzahl pro 0,3 cm²:

*: $p \leq 0,028$ signifikant

#: $p \leq 0,028$ signifikant

V.1.2. Stoffwechselaktivität

Der MTS Test gibt Aufschluss über die mitochondriale Stoffwechselaktivität der EC, die auf den unterschiedlichen Materialien über sieben Tage kultiviert wurden. Die MTS-Absorption pro 0,3cm² gibt die Summe der mitochondrialen Aktivität aller Endothelzellen, die zum Messzeitpunkt auf der Kulturfläche (0,3 cm²) vorhanden waren, wieder (Abb. V.4-6).

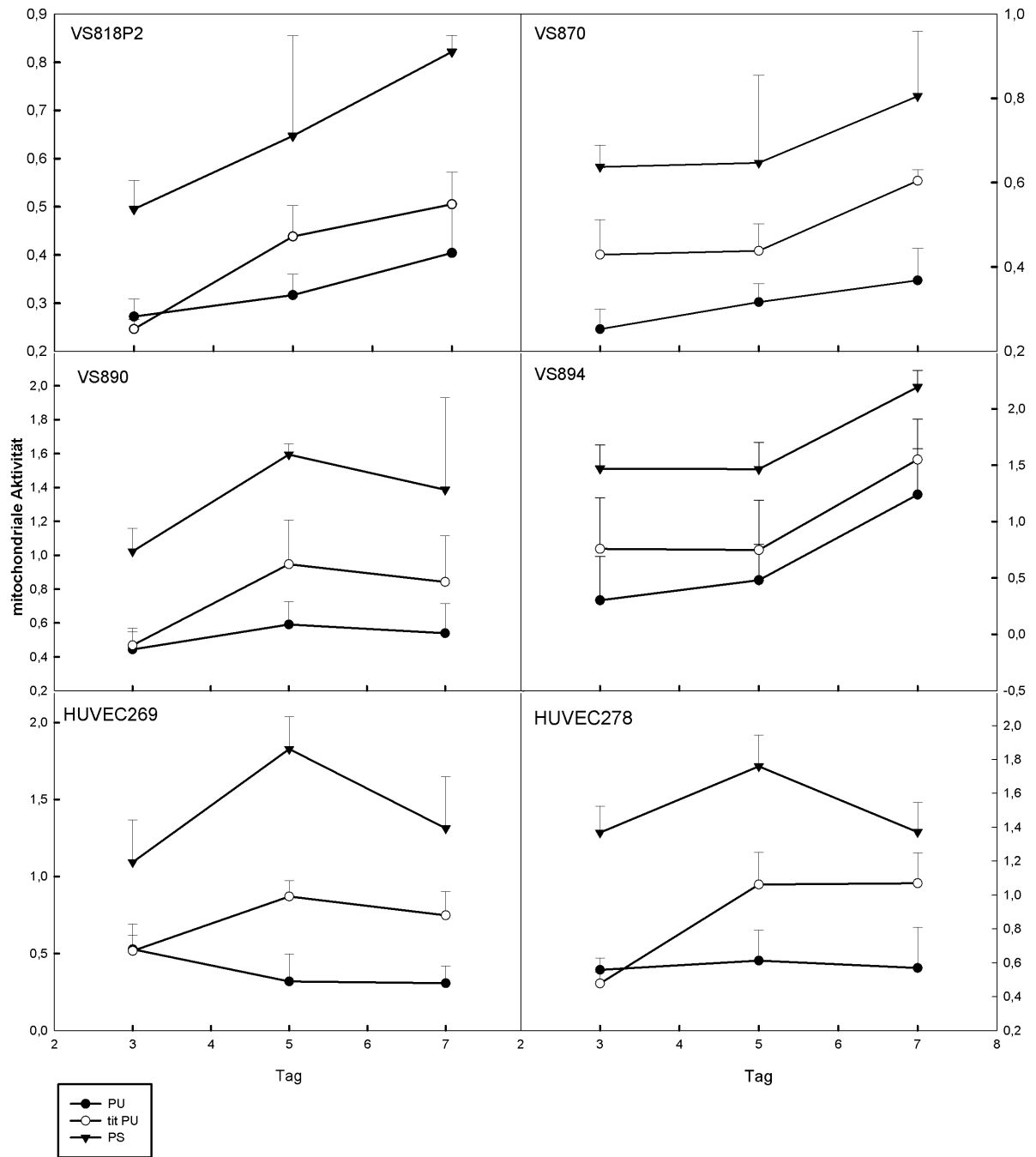


Abb. V.4: Verlauf der Stoffwechselaktivität von sechs Einzelkulturen (MW ± SD aus einer 4x-Bestimmung) auf Polyurethan (PU), titanisiertem Polyurethan (tiPU) und Polystyrol (PS) über sieben Tage; gemessen wurde die MTS-Absorption pro 0,3 cm² als Maß für die mitochondriale Aktivität.

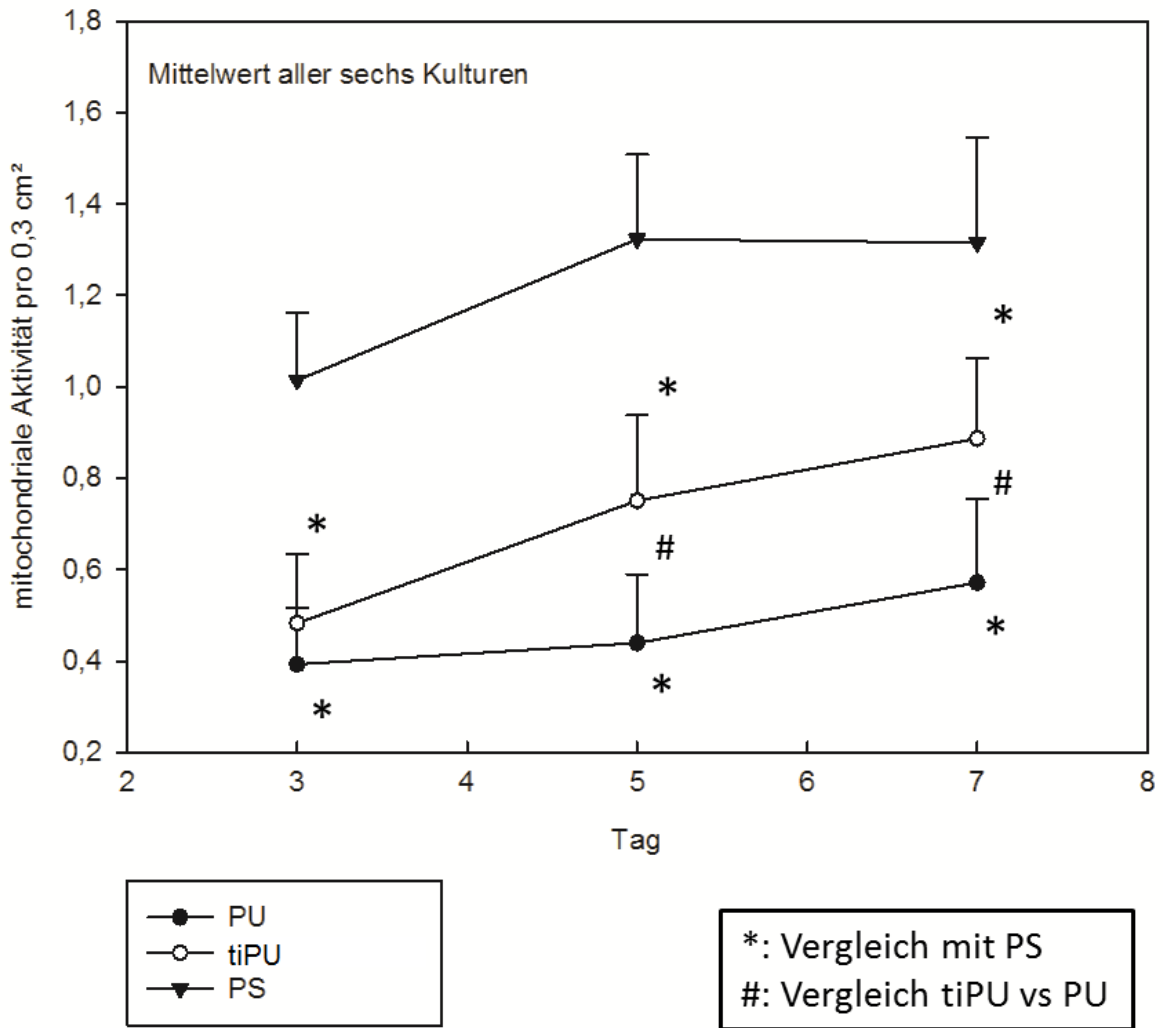


Abb. V.5: Mittelwert der mitochondrialen Aktivität aus sechs Einzelkulturen (MW ± SD) auf Polyurethan (PU), titanisiertem Polyurethan (tiPU) und Polystyrol (PS) über sieben Tage; gemessen wurde die MTS-Absorption pro 0,3 cm² als Maß für die mitochondriale Aktivität

*: $p \leq 0,028$ signifikant

#: $p \leq 0,028$ signifikant

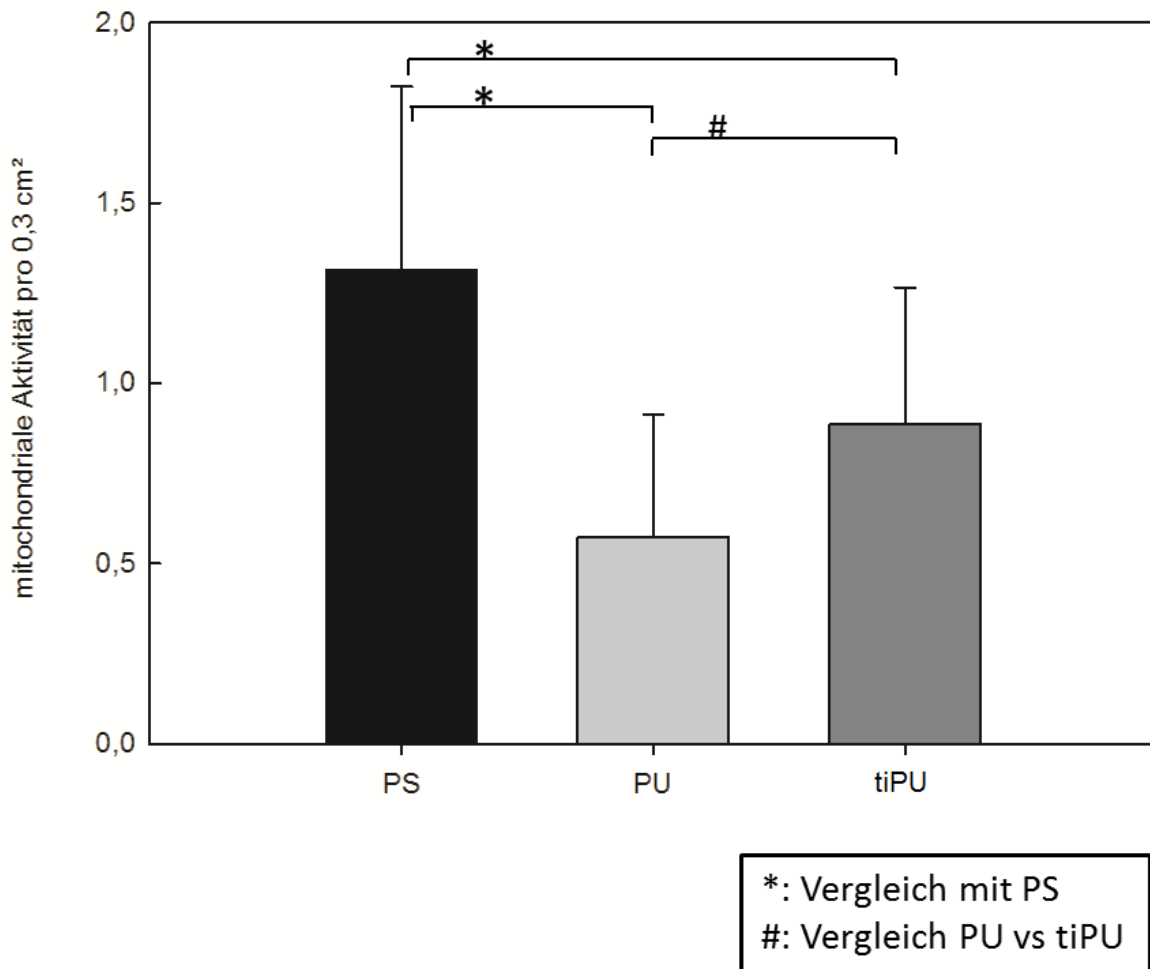


Abb. V.6: Vergleich der mitochondrialen Aktivität an Tag 7 nach Aussaat (MW ± SD aus sechs Einzelkulturen) auf Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU); gemessen wurde die MTS-Absorption pro 0,3 cm²

***: p ≤ 0,028 signifikant**

#: p ≤ 0,028 signifikant

Wie aus Abbildung V.4 ersichtlich, lag die Stoffwechsellistung der EC, die auf PS kultiviert wurden, zu jeder Zeit signifikant über den Werten von PU und tiPU (Wilcoxon-Test: p = 0,028 an Tag 3 und 7; p = 0,027 an Tag 5). Die Mittelwerte aus 6 Kulturen (Abb. V.5) geben an, dass bereits am Tag 5 die maximale Aktivität erreicht wurde, die dann bis Tag 7 unverändert blieb. Die geringste Stoffwechsellistung lieferten EC, die auf PU kultiviert wurden. Während am Tag 3 die MTS-Absorption pro 0,3 cm² für EC auf PU und tiPU annähernd gleich war, lag am Tag 5 die Aktivität von EC auf tiPU um Faktor 1,7 ± 0,3 (p=0,027) signifikant über den Werten von EC auf PU (Abb. V.5). In den folgenden zwei Tagen nahm für beide Ansätze die

Aktivität weiter zu (Abb. V.5). Nach 7 Tagen zeigten EC auf PU bzw. tiPU nur 43% bzw. 67% der Stoffwechselleistung, die Zellen auf gleicher Fläche Polystyrol erreichten (Abb. V.6).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus V1.1. wurde im Folgenden die Stoffwechselaktivität pro Zelle errechnet. Diese ergibt sich aus dem Quotienten von MTS-Absorption pro $0,3 \text{ cm}^2$ und der Zellzahl zum entsprechenden Messzeitpunkt.

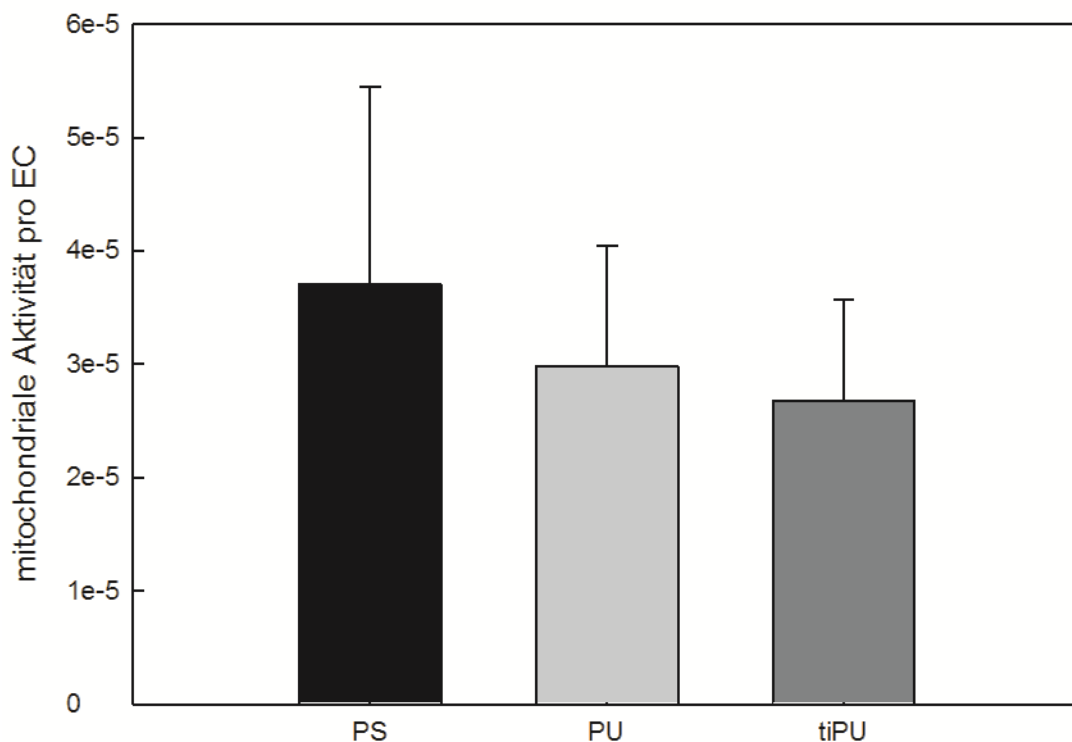


Abb. V.7: Mitochondriale Aktivität pro Endothelzelle an Tag 7 nach Aussaat in Abhängigkeit vom Material. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus sechs Kulturen am Tag 7 nach Aussaat auf Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU); Die MTS-Absorption pro Zelle wurde als Maß für die mitochondriale Aktivität pro Zelle berechnet.

Bezüglich der mitochondrialen Aktivität pro Endothelzelle ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Materialien. (Friedman: $p = 0,069$).

V.1.3. Thrombozytenadhäsion

Die Thrombozytenadhäsion wurde am Tag 7 bestimmt. Aufgrund des Messverfahrens wurde in den folgenden Abbildungen die Thrombozytenadhäsion pro $0,3 \text{ cm}^2$ angegeben. Zunächst wurde die Thrombogenität der Materialien ohne Endothelialisierung bestimmt (Abb. V.8). Es zeigte sich, dass auf blankem PU die wenigsten Thrombozyten adhären. Die Thrombozyten auf PS und tiPU waren im Vergleich dazu um Faktor $3,0 \pm 2,3$ ($3,0 \pm 1,7$ bei tiPU) erhöht. Allerdings fiel eine hohe Streuung der Einzelwerte auf. Eine statistische Aussage hinsichtlich der Signifikanz der Unterschiede ist aufgrund der zu geringen Stichprobenlänge nicht zu treffen.

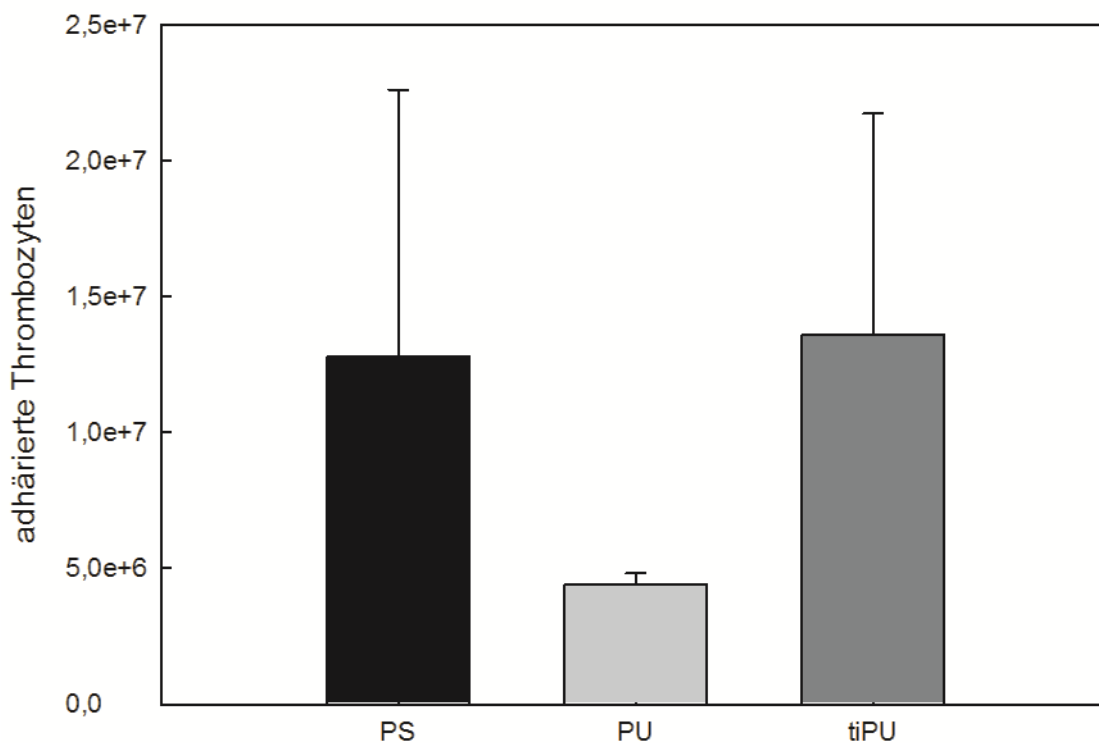


Abb. V.8: Thrombozytenadhäsion an $0,3 \text{ cm}^2$ Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) ohne Endothelzellen; Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus einer 4x-Bestimmung

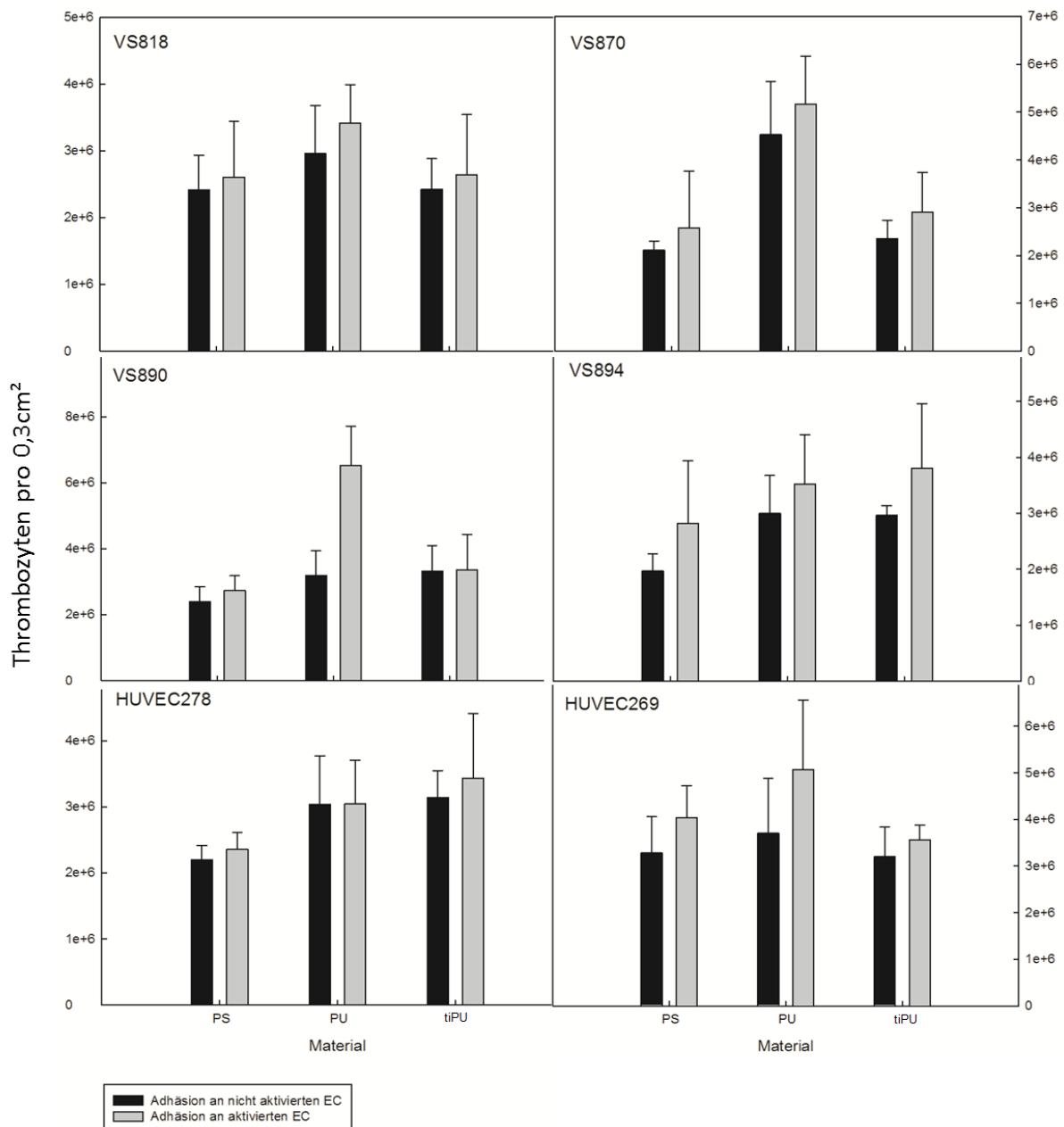


Abb. V.9: Thrombozytenadhäsion an aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen, die auf 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurden; Darstellung der sechs verwendeten Einzelkulturen (MW ± SD einer 4x-Bestimmung)

Trotz Endothelialisierung von PS, PU und tiPU konnte eine Thrombozytenadhäsion nachgewiesen werden (Abb. V.9). Dabei adhärten an aktivierten EC signifikant mehr Thrombozyten als an nicht aktivierten EC (Wilcoxon-Test: $p = 0,028$). Unabhängig vom Aktivierungszustand der EC, adhärten auf 0,3 cm² endothelialisiertem PU signifikant mehr Thrombozyten als auf 0,3 cm² endothelialisiertem PS (Wilcoxon-Test: $p = 0,028$). Dagegen waren die Unterschiede zwischen den anderen Materialien (PS vs tiPU und PU vs tiPU) nicht signifikant (Wilcoxon-Test: $p = 0,075-0,249$, siehe Abb. V.10).

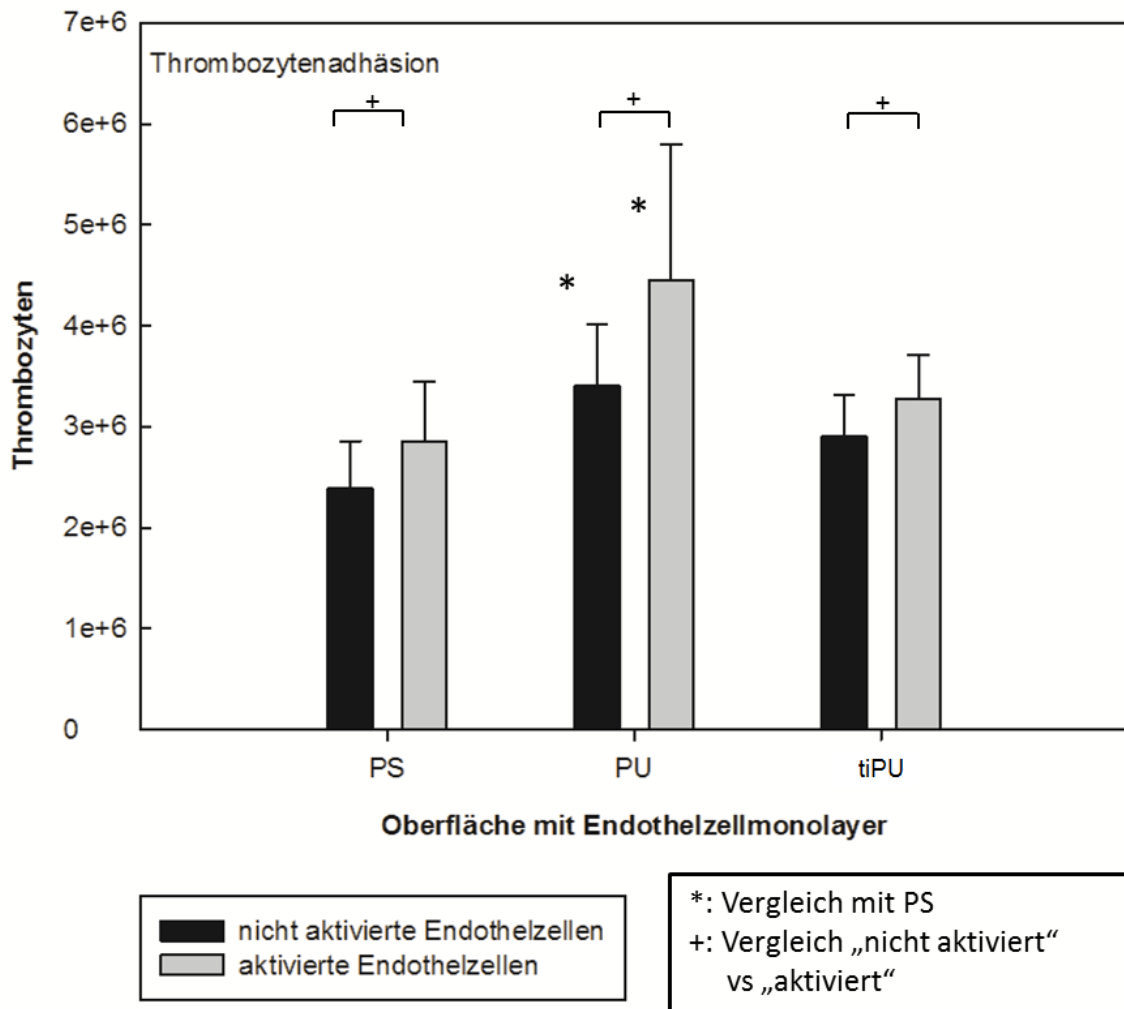


Abb.V.10: Anzahl der adhärenierten Thrombozyten (MW ± SD aus sechs Einzelkulturen) an aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen, die auf 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurden;

*: p = 0,028 signifikant

+: p = 0,028 signifikant

Durch die Endothelialisierung von PS und tiPU wurde die Thrombozytenadhäsion reduziert. Dagegen zeigte PU keine Änderung der Anzahl adhärenter Thrombozyten, egal ob mit oder ohne EC (Abb. V.10). Eine Endothelialisierung von tiPU bewirkte eine Reduktion der adhärenierten Thrombozyten um 75%. Die Endothelzellbesiedelung von PS führte letztlich zu einer Reduktion der Thrombozytenadhäsion um 78%.

Aufgrund der Daten aus V.1.1 wurde die Thrombozytenadhäsion pro EC berechnet. Trotz unterschiedlicher Zellzahlen zeigte die mikroskopische Kontrolle der Endothelzellbesiedelung in jedem Fall einen konfluenten Zellrasen. Aufgrund dieser Beobachtung gingen wir davon aus, dass die Oberflächen der Materialien komplett mit EC abgedeckt waren.

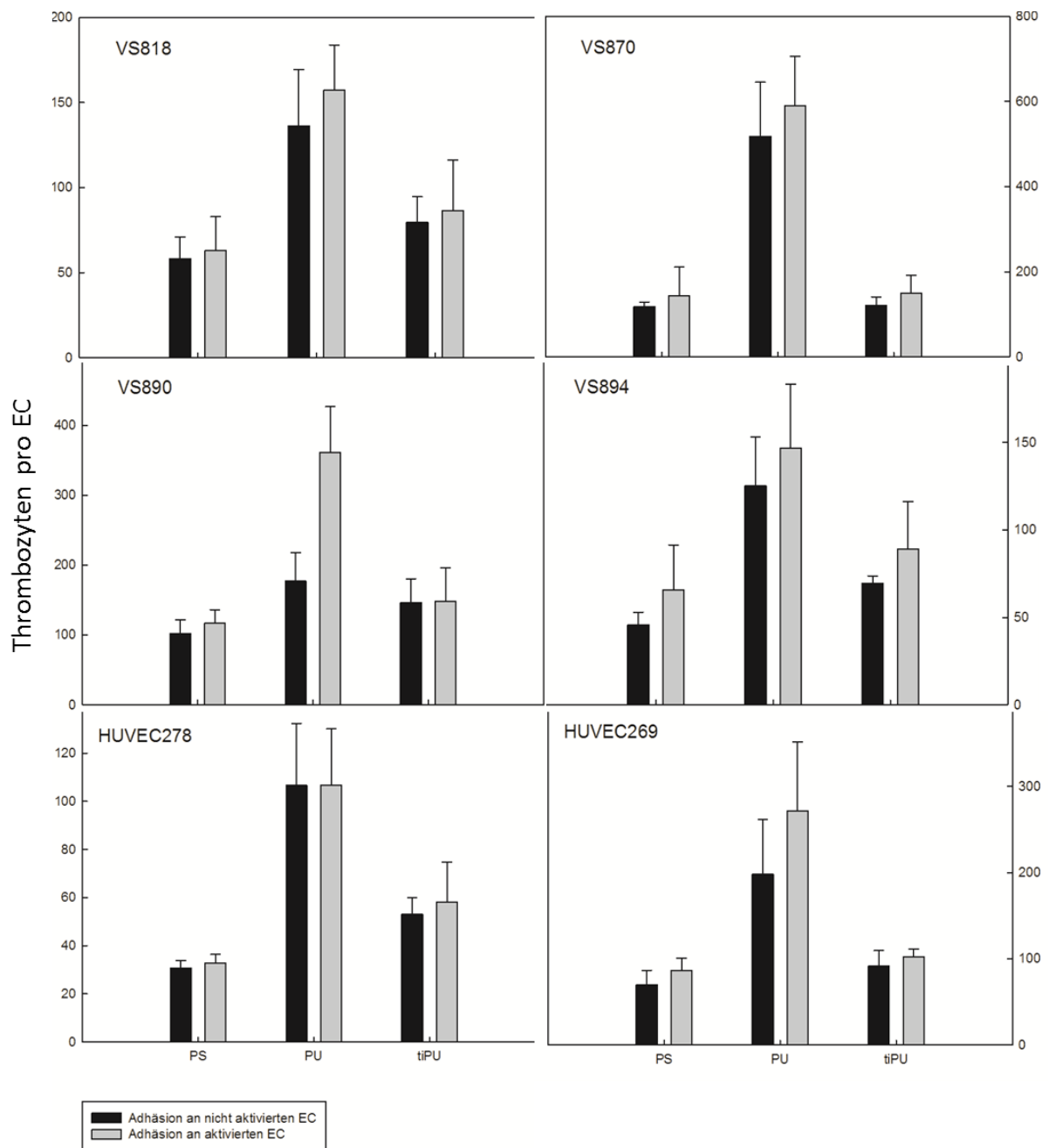


Abb. V.11: Thrombozytenadhäsion pro Endothelzelle an aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen, die auf 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurden; Darstellung der sechs verwendeten Einzelkulturen (MW ± SD einer 4x-Bestimmung)

Die Aufstellung der Einzelkulturen (Abb. V.11) zeigt, dass signifikant mehr Thrombozyten an EC adhärten, die für 7 Tage auf PU kultiviert wurden. Die Zahl der adhärten Thrombozyten an EC auf PU war im Mittel um den Faktor $2,2 \pm 1,1$ gegenüber EC auf tiPU erhöht. Im Vergleich zu EC, die auf PS kultiviert wurden, adhärten $2,9 \pm 0,9$ -mal so viele Thrombozyten. Durch eine Aktivierung der EC erhöht sich dieser Faktor auf $2,4 \pm 0,9$ (PU vs. tiPU) und auf $3,1 \pm 0,7$ (PU vs. PS). Alle gemessenen Unterschiede waren statistisch

signifikant (Wilcoxon-Test: $p = 0,028$). Durch die vorhergehende Stimulierung der EC mit TNF wurde die Zahl der adhärenen Thrombozyten pro EC um Faktor $1,2 \pm 0,2$ erhöht ($p = 0,028$)(Abb. V.12).

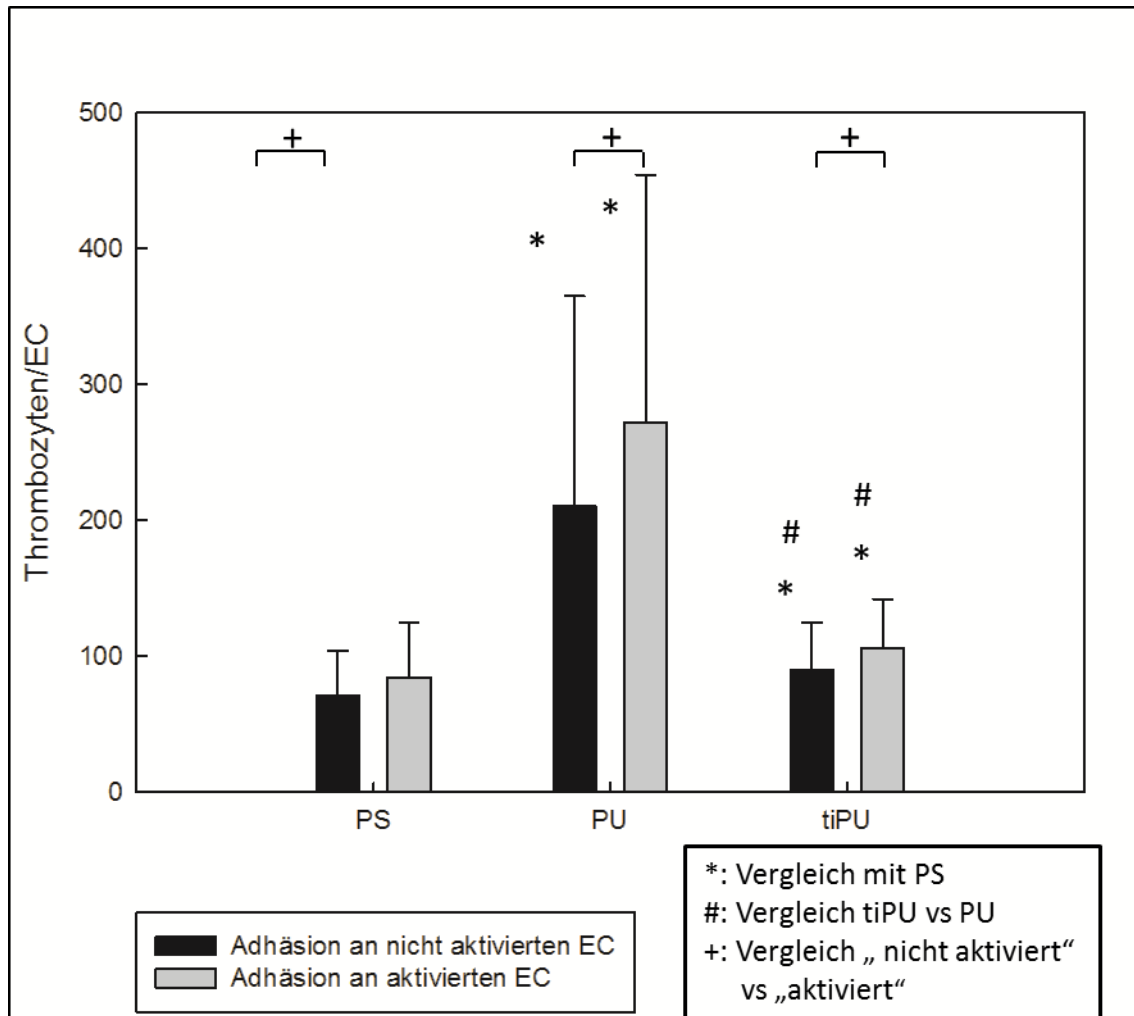


Abb. V.12: Anzahl der adhärenen Thrombozyten pro Endothelzelle (aktiviert und nicht aktiviert), die auf Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurde; Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus sechs Einzelkulturen

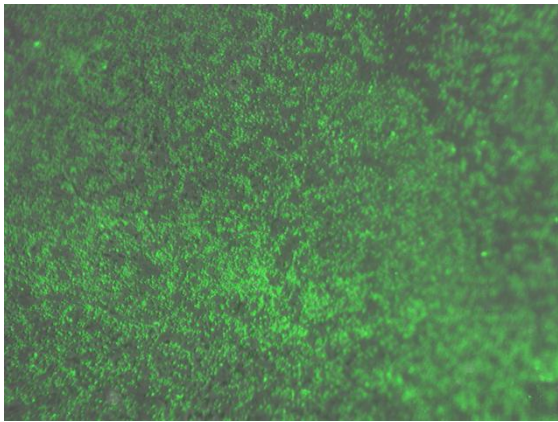
*: $p = 0,028$ signifikant

#: $p = 0,028$ signifikant

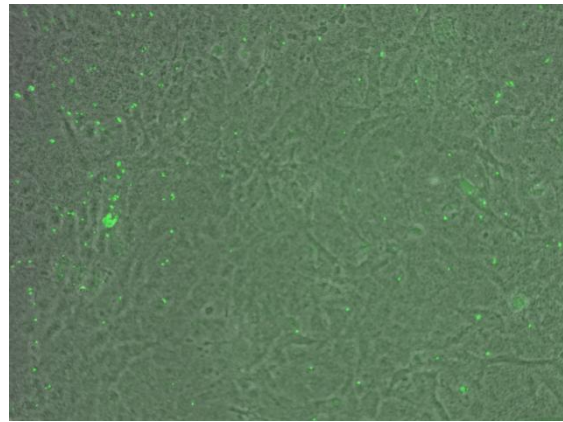
+: $p = 0,028$ signifikant

Um einen Eindruck von der Thrombozytenadhäsion zu gewinnen, wurde ein Teil der PU-Plättchen mit calceingefärbten Thrombozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. V.13). Man sieht auf den rechten Bildern das Kopfsteinpflastermuster der Endothelzellen (Phasenkontrastaufnahme) mit sehr wenigen, mit Calcein gefärbten

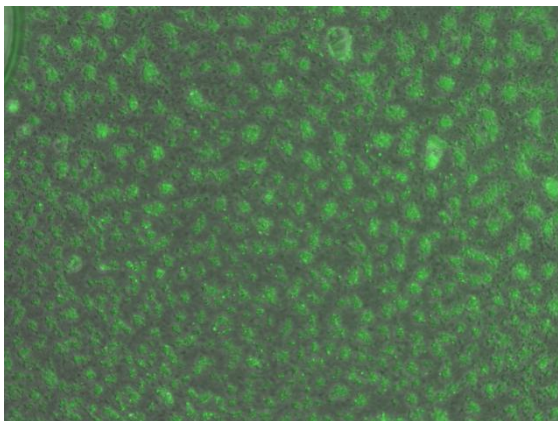
Thrombozyten (Fluoreszenzaufnahme). Auf der linken Seite leuchten großflächig aggregierte Thrombozyten (Grünfärbung).



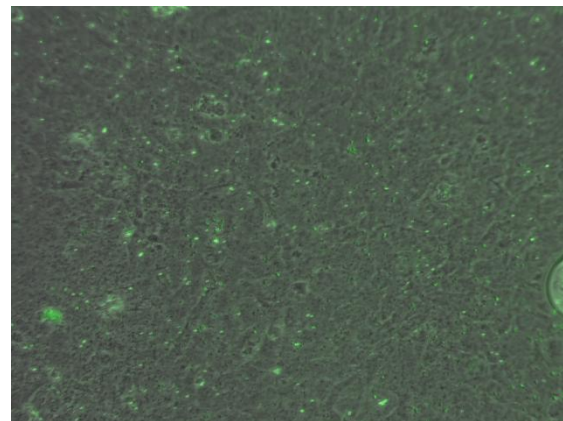
Thrombozyten auf PU ohne Endothelzellen



Thrombozyten auf PU mit Endothelzellen



Thrombozyten auf titanisiertem PU ohne Endothelzellen



Thrombozyten auf titanisiertem PU mit Endothelzellen

Abb. V.13: Adhäsion calceingefärbter Thrombozyten (grün) auf blankem PU (linke Seite) bzw. auf endothelialisiertem PU (rechte Seite). Die obere Reihe zeigt eine repräsentative Aufnahme von adhärenenten Thrombozyten auf PU, die untere Reihe zeigt adhärenente Thrombozyten auf tiPU.

V.1.4. Adhäsion von PBMCs

Die Adhäsion von PBMCs gilt wie die Thrombozytenadhäsion ebenfalls als ein Maß für die Thrombogenität von Materialien bzw. endothelialisierten Materialien.

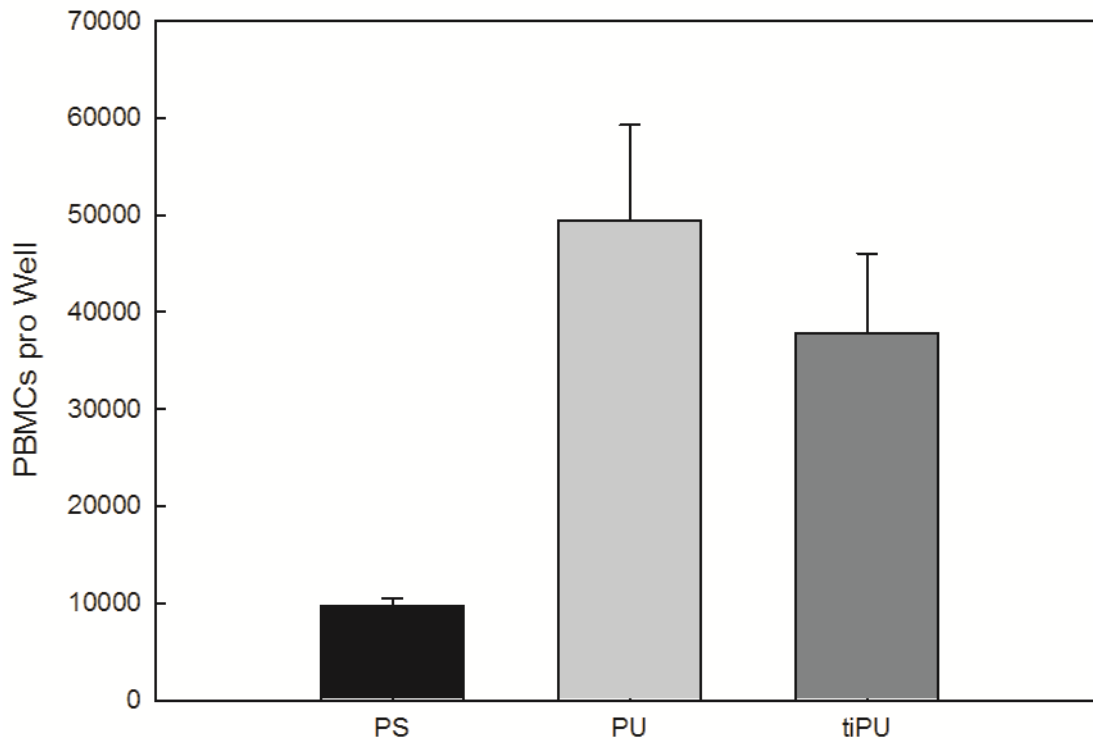


Abb.V.14: Adhäsion von PBMC an 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) ohne Endothelzellen; Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus einer 4x-Bestimmung;

Blankes PU-Material zeigte die höchste Adhäsion von PBMC. Auf blankem PS adhärten deutlich weniger PBMC. Auch auf tiPU konnten weniger adhären Thrombozyten nachgewiesen werden. Allerdings lässt sich aufgrund der geringen Stichprobenlänge keine statistische Aussage bezüglich der Signifikanz der Unterschiede treffen.

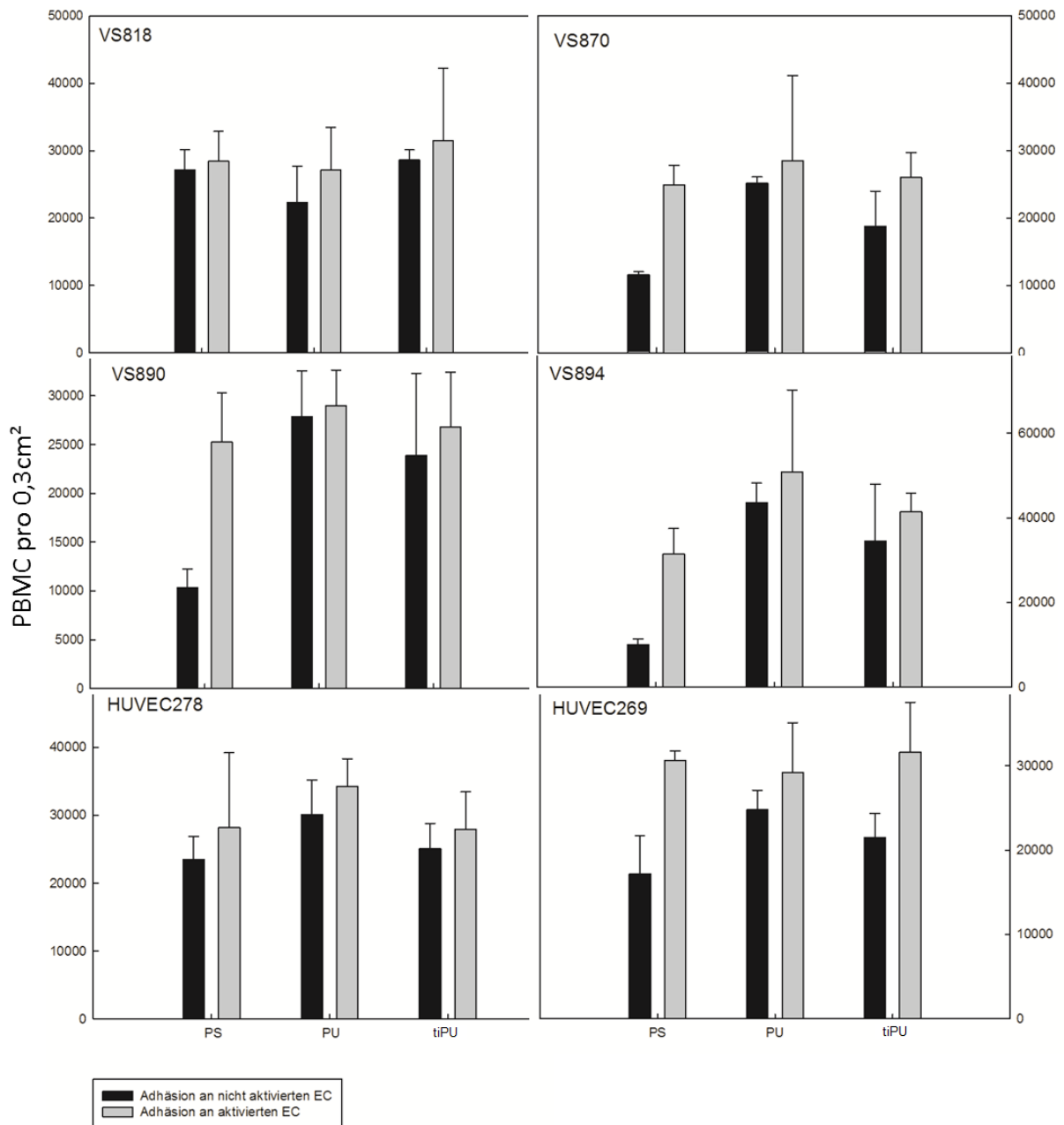


Abb. V.15: Adhäsion von PBMC an aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen auf 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU); Darstellung der sechs verwendeten Einzelkulturen (MW ± SD einer 4x-Bestimmung)

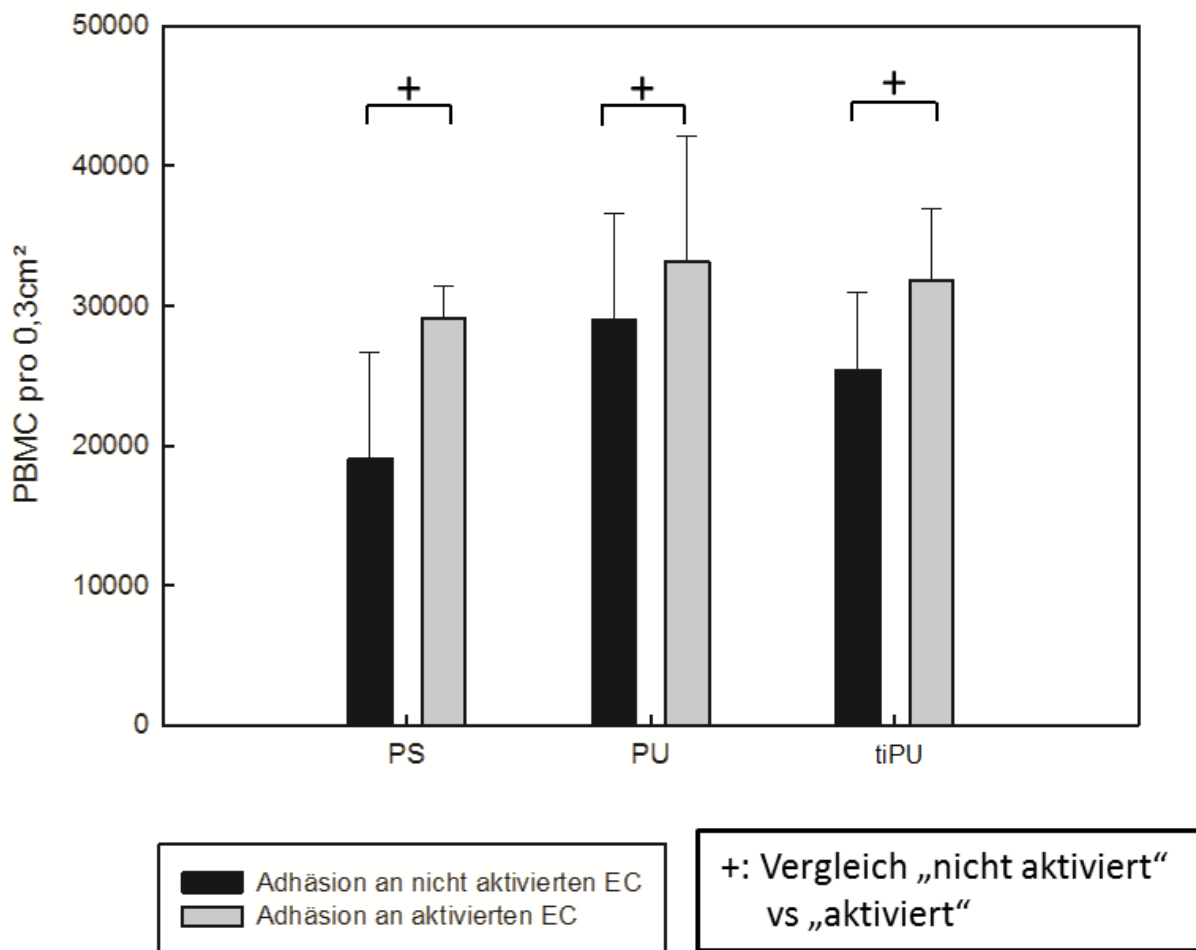


Abb.V.16: Anzahl der adhären PBMC (MW ± SD aus sechs Einzelkulturen) an aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen, die auf 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurden; +: p = 0,028 signifikant

Durch die Endothelialisierung von PU und tiPU wurde die Adhäsion von PBMC reduziert und zwar um 41% bei PU und um 33% bei tiPU. Die Endothelzellschicht auf PS (egal ob aktiviert oder nicht-aktiviert) bewirkte dagegen eine verstärkte PBMC-Adhäsion (im Vgl. zu blankem PS). Die Aktivierung der EC mit TNF führte zu einer signifikanten Steigerung der PBMC-Adhäsion um folgenden Faktor: $1,1 \pm 0,1$ bei EC auf PU; $1,3 \pm 0,2$ bei EC auf tiPU; $1,8 \pm 0,8$ bei EC auf PS (Wilcoxon-test: p = 0,028).

Wie bei den Thrombozyten, wurde auch die Anzahl der gebundenen PBMCs pro Endothelzelle überprüft (Abb. V.17).

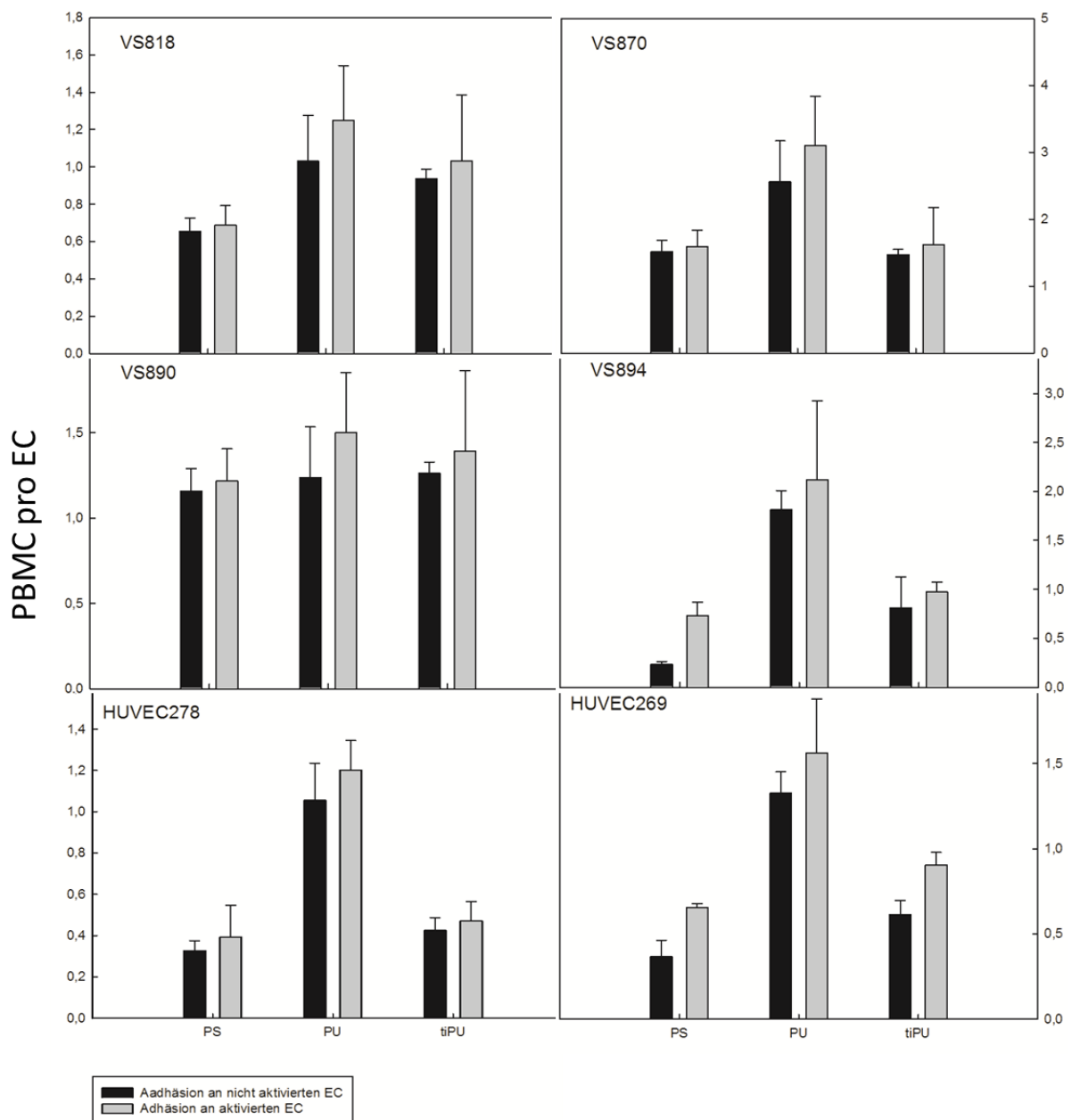


Abb. V.17: PBMC-Adhäsion pro Endothelzelle an aktivierten und nicht aktivierten Endothelzellen, die auf 0,3 cm² Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurden; Darstellung der sechs verwendeten Einzelkulturen (MW ± SD einer 4x-Bestimmung)

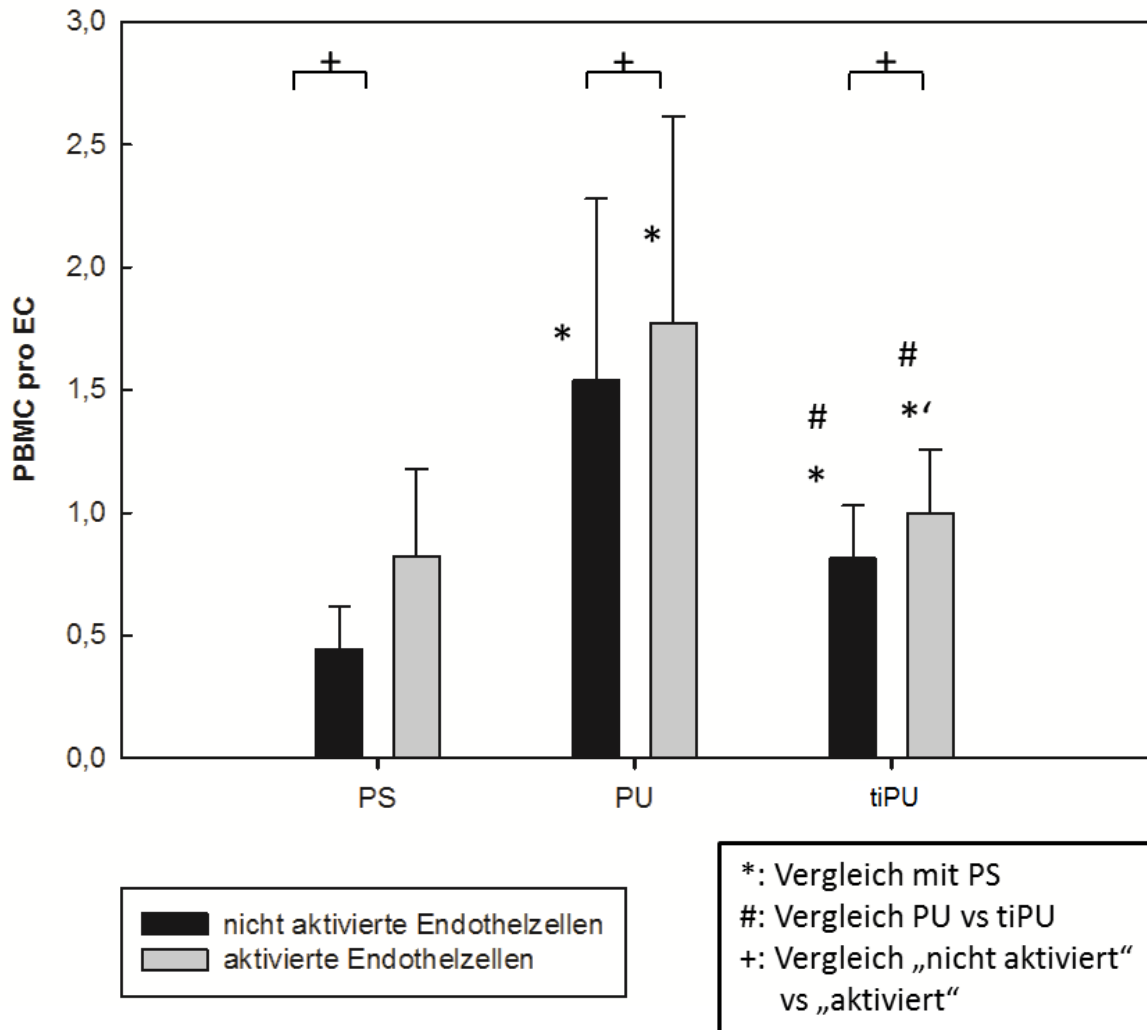


Abb. V.18: Anzahl der adhärenierten PBMC pro Endothelzelle (aktiviert und nicht aktiviert), die auf Polystyrol (PS), Polyurethan (PU) und titanisiertem Polyurethan (tiPU) kultiviert wurde; Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus sechs Einzelkulturen

*: $p = 0,028$ *': $p = 0,046$

#: $p = 0,028$

+: $p = 0,028$

Unabhängig vom Aktivierungszustand der EC wurden signifikant mehr PBMCs an Endothelzellen gebunden, die auf PU kultiviert wurden. So banden an EC auf tiPU 47% weniger PBMCs als bei EC auf PU. Bei EC, die auf dem Referenzmaterial PS gezogen wurden, ließen sich sogar 71% (bzw. 53% bei aktivierten EC) weniger gebundene PBMCs pro EC (im Vgl. zu PU) nachweisen.

V.2. Etablierung einer Perfusionsanlage

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Perfusionsanlage entwickelt, die es erlaubt, vaskuläre Kunststoffgrafts (bei uns PU-Grafts) zu endothelialisieren und diese Zellschicht auch unter Scherkräften stabil auf der Oberfläche zu halten. Die erste Generation einer derartigen Anlage wird im Folgenden vorgestellt und die notwendigen Modifikationen erläutert.

V.2.1. Modifikationen zur Inbetriebnahme der Perfusionsanlage

Der Bauplan des ersten Prototyps ist in IV.2.1. aufgeführt. Aufgrund erheblicher Mängel, waren einige Modifikationen nötig, bevor erste Versuche mit Endothelzellen durchgeführt werden konnten. Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse sind Veränderungen im Bau der Perfusionsanlage und ihrer Komponenten.

V.2.1.1. Gegossene statt geklebter PU Schläuche zur Vermeidung von Leckagen

Bei Inbetriebnahme stellte sich heraus, dass die von der Dualis Medtec GmbH[®] mitgelieferten PU-Schläuche an ihren Verbindungsstellen zu den Dreiwegehähnen und den Glasröhrchen undicht waren und weder durch Abbinden, noch mit Parafilm suffizient abzudichten waren. Der Verlust an Medium war dabei während des Pumpbetriebs so hoch, dass sich innerhalb von Minuten Schaum und Luftblasen im gesamten System bildeten. Grund für die Leckage waren die mitgelieferten PU-Schläuche. Diese wurden aus Mecorafolie geklebt. Dabei bildete der Klebefalz eine Rinne, die am Übergang zu den Glasröhrchen und zu den Dreiwegehähnen nicht abzudichten war. Die Lösung dieses Problems bestand darin, dass nur gegossene Schläuche verwendet werden können. Da gegossene Schläuche keinen Klebefalz besitzen, umschließen sie vollständig und gleichmäßig Dreiwegehahn und Glasröhrchen. Zusätzlich wurden vom Glasbläser sogenannte „Oliven“ vor die Enden der Glasröhrchen angebracht, über die der PU-Schlauch gezogen werden muss. Zur Erhöhung der Dichtigkeit wurden diese Stellen zusätzlich mit Parafilm verstärkt.

V.2.1.2. Verschluss des Compliancegefäßes: Deckel und Dreiwegehahn statt Septum

Die von den Entwicklern angedachte Methode zur Befüllung des Systems mit Kulturmedium erwies sich als nicht praktikabel. Sie sah vor, dass das Medium in die Perfusionsanlage über ein Septum, welches das Compliancegefäß verschließt, eingefüllt wird. Dafür war es nötig, das Medium in eine 200 ml Spritze aufzuziehen, das Septum mit einer Hohlneedle zu durchstechen und so das Medium ins System „einzuspritzen“. Zum einen zeigte sich diese Methode als unpraktisch und zeitaufwändig, zum anderen war das Septum nach mehreren Befüllungen aufgrund der Einstichstellen nicht mehr dicht, so dass auch hier Luft ins System gelangte. Die Anlage wurde deshalb modifiziert, indem der Deckel mit Septum durch einen Deckel mit eingebautem Dreiwegehahn ausgetauscht wurde, auf den zur Befüllung eine 200 ml Spritze aufgesetzt werden kann. Wird die Perfusionsanlage jedoch unter der Sterilbank befüllt, kann der gesamte Deckel vollständig abgenommen und das Medium direkt aus einem Becherglas in das Compliancegefäß gegeben werden. So konnte der Prozess des Befüllens deutlich vereinfacht werden.

V.2.1.3. Einbau eines zweiten Ablasshahns / Umbau des Hahns unter dem Reservoirgefäß

Es war weder in angemessener Zeit, noch unter sterilen Bedingungen und vollständig möglich, Medium für einen Mediumwechsel oder zum vollständigen Entleeren der Perfusionsanlage abzulassen, da der Ablasshahn unter dem Reservoirgefäß zu lang war. So konnte kein geeignetes Gefäß darunter gestellt werden, um das Medium aufzufangen. Zudem blieben Reste des Mediums im System und ließen sich auch durch Schwenken der Anlage und Pumpbetrieb nicht im Reservoirgefäß sammeln, um dort über den Ablasshahn abzulaufen. Daraufhin wurde zum einen der Ablasshahn unter dem Reservoirgefäß gekürzt und gebogen, sowie ein zweiter Ablauf mit Dreiwegehahn in die Krümmung des Glasrohrs hinter dem Compliancegefäß eingebaut. Damit war nun eine sterile, schnelle und vollständige Entleerung garantiert.

V.2.1.4. Druckausgleich durch Luftfilter über dem Reservoirgefäß

Bei Inbetriebnahme der Medospumpe zur Erzeugung eines pulsatilem Stroms stellte sich heraus, dass die PU-Schläuche durch den pulsatilem Strom kollabierten. Grund dafür war das Druckgefälle zwischen Einstrom- und Austreibungsphase der Medospumpe, welches nicht ausgeglichen wurde, so dass die PU-Schläuche, als flexibelste Stelle im System, im Puls kollabierten und sich wieder entfalteten. Durch die so entstehende Wandspannung und die Scherkräfte war eine Endothelzelladhäsion unmöglich. Um einen Druckausgleich zu schaffen, wurde der Deckel über dem Reservoirgefäß durch einen Deckel mit eingebauten Dreivegehähnen ersetzt. Auf den geöffneten Dreivegehähnen wurden Sterilfilter angebracht. So kommuniziert das System mit der Außenluft, ohne dass Keime in die Perfusionsanlage gelangen. Während der Füllphase der Pumpkammer wird Luft angesaugt und während der Austreibungsphase aus dem System gepumpt. Das Ergebnis war ein suffizienter Druckausgleich, so dass die PU-Schläuche nicht mehr kollabieren.

V.2.1.5. Ersatz der Absperrklemme durch vier einzelne Klemmen

Für das Seeding (Adhäsion von Endothelzellen an die Innenwand der PU-Schläuche) wurden die PU-Schläuche vom restlichen Medium der Perfusionsanlage abgetrennt. Dafür sollten die Dreivegehähne und eine Absperrklemme, die alle vier Probenschläuche auf einmal abklemmen konnte, geschlossen werden. Es zeigte sich jedoch, dass es mit der Absperrklemme nicht möglich war, die PU-Schläuche ausreichend zu schließen.

Die Absperrklemme wurde entfernt und durch Bulldog bzw. normale OP-Klemmen ersetzt, mit denen nun jeder Schlauch einzeln ausreichend abgeklemmt werden konnte.

Mangel	Beschreibung	Modifikation	Ergebnis
System undicht	Klebefalz der PU-Schläuche war undicht	gegossene Schläuche; zusätzliches Abdichten mit Parafilm	PU-Schläuche dicht
Befüllen des Systems mit Medium	Befüllen über Septum zu umständlich; Ansaugen von Luft über Löcher im Septum	Deckel mit eingebauten Dreivegehähnen über Reservoirgefäß	schnelle und sterile Befüllung des Systems mit Medium
Entleeren des Systems	Unvollständige Entleerung, zeitaufwändig, mangelnde Sterilität	Kürzen des Ablasshahns unter dem Reservoirgefäß; Einbau eines zweiten Ablaufs	Schnelle, vollständige und unkomplizierte Entleerung des Systems
Betrieb der Medospumpe	Kollabieren der PU-Schläuche	Deckel mit eingebauten Dreivegehähnen und Sterilfiltern über dem Reservoirgefäß	Druckausgleich; PU-Schläuche entspannt
Verschluss der PU-Schläuche mit Absperrklemme undicht	Absperrklemme schließt PU-Schläuche nicht vollständig ab	Entfernung der Absperrklemme; Einsatz von Bulldog bzw. großen OP-Klemmen	Komplette Einzelabklemmung der PU-Schläuche

Tabelle V.1: Mängelliste der ersten Perfusionsanlage und nötige Modifikationen

V.2.2. Volumen und Volumenstrom

Die modifizierte Perfusionsanlage fasst ein Volumen von 180 bis 250 ml. Bei 250 ml sind beide Gefäße (Reservoir- und Compliancegefäß) vollständig bis zum Deckel gefüllt, was im Versuch während der Rotationsphase seine Bedeutung hat (IV.2.2.7). Bei 180 ml ist ein Pumpbetrieb mit der Medospumpe gerade so möglich, ohne dass über das Reservoirgefäß Luft ins System gesaugt wird und somit Luftblasen im System entstehen. Als bestes Füllvolumen für den Pumpbetrieb stellte sich ein Volumen zwischen 200 und 220 ml heraus, da so auch bei Pumpbetrieb über Nacht im Brutschrank trotz Verdunstung noch genug

Volumen gehalten werden kann. Dabei befindet sich aber noch nicht zu viel Medium im System, so dass bei der Austreibungsphase der Medospumpe das Medium nicht in die Sterilfilter des Reservoirgefäßes gelangt.

Bei der Messung der Volumenströme (IV.2.2.1) zeigte sich, dass nicht in allen vier PU-Schläuchen die gleichen Volumenströme herrschten. Dies betraf vor allem Schlauch 3. Dort floss 27% weniger Volumen pro Minute als in Schlauch 4 mit dem höchsten Volumenstrom. Insgesamt wurde eine Differenz von 70ml/min zwischen dem stärksten und dem schwächsten Volumenstrom gemessen. Im Mittel errechnete sich ein Volumenstrom von 229 ± 31 ml/min (Abb. V.19).

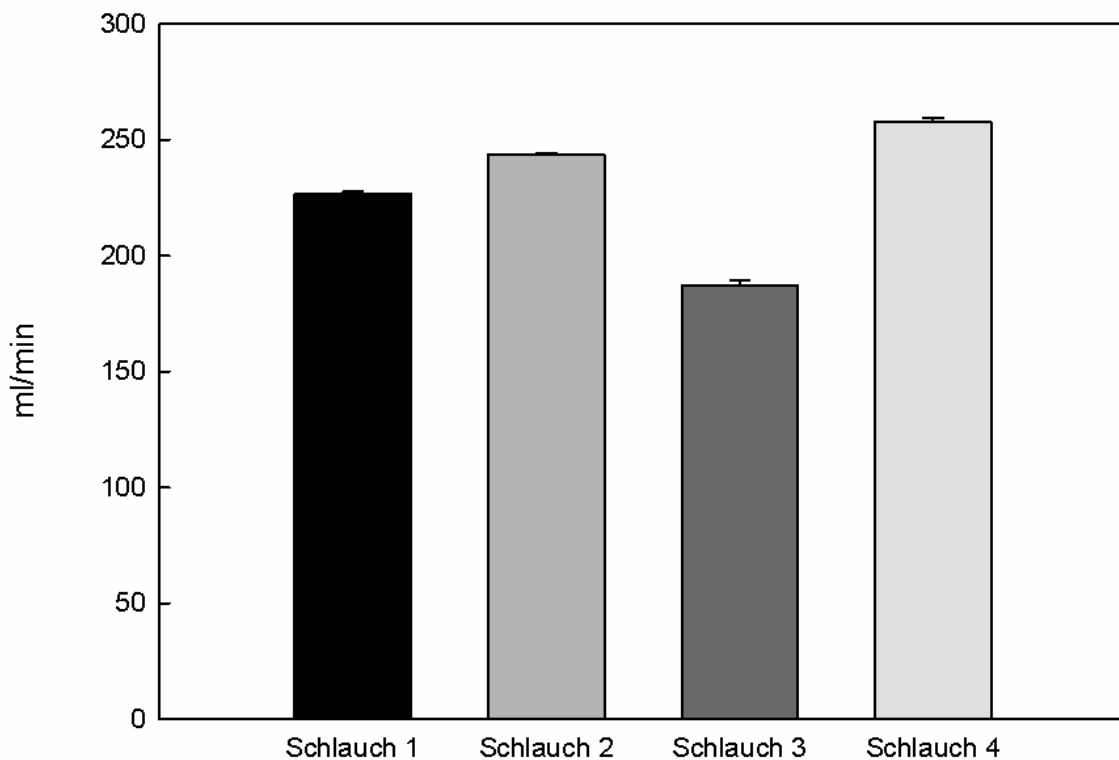


Abb. V.19: Volumenströme in den vier PU Schläuchen (siehe Bauplan); Mittelwerte mit Standardabweichung aus einer 4x-Bestimmung

Um diesen Unterschied von Schlauch 3 zu den anderen Schläuchen auszugleichen, wurde an Position 3 ein Dreiwegehahn mit größerem Innendurchmesser eingebaut. Dadurch erhöhte sich der Volumenstrom in Schlauch 3 um 71 ml/min. Der mittlere Volumenstrom der vier Schläuche betrug nun 237 ± 16 ml/min. Durch den Einbau eines größeren Dreiwegehahns an Position 3 konnten also die Volumenströme der einzelnen Schläuche angeglichen werden (Halbierung der Standardabweichung), wobei die Differenz zwischen dem stärksten und dem

schwächsten Schlauch immer noch 15% betrug. Außerdem stellte sich während der Volumenstrommessung heraus, dass die Position des Segels der Pumpkammer in der Medospumpe entscheidend ist für den Volumenstrom. War dieses nicht vollständig entfaltet, wurden Volumenströme gemessen, die um bis zu 117ml/min (51%) niedriger waren, als mit vollständig durchschlagendem Segel. Daher ist vor Versuchsbeginn unbedingt sicher zu stellen, dass das Segel entfaltet ist, indem die Position des Segels mit der Stellung des Kolbens im Antrieb der Pumpe synchronisiert wird.

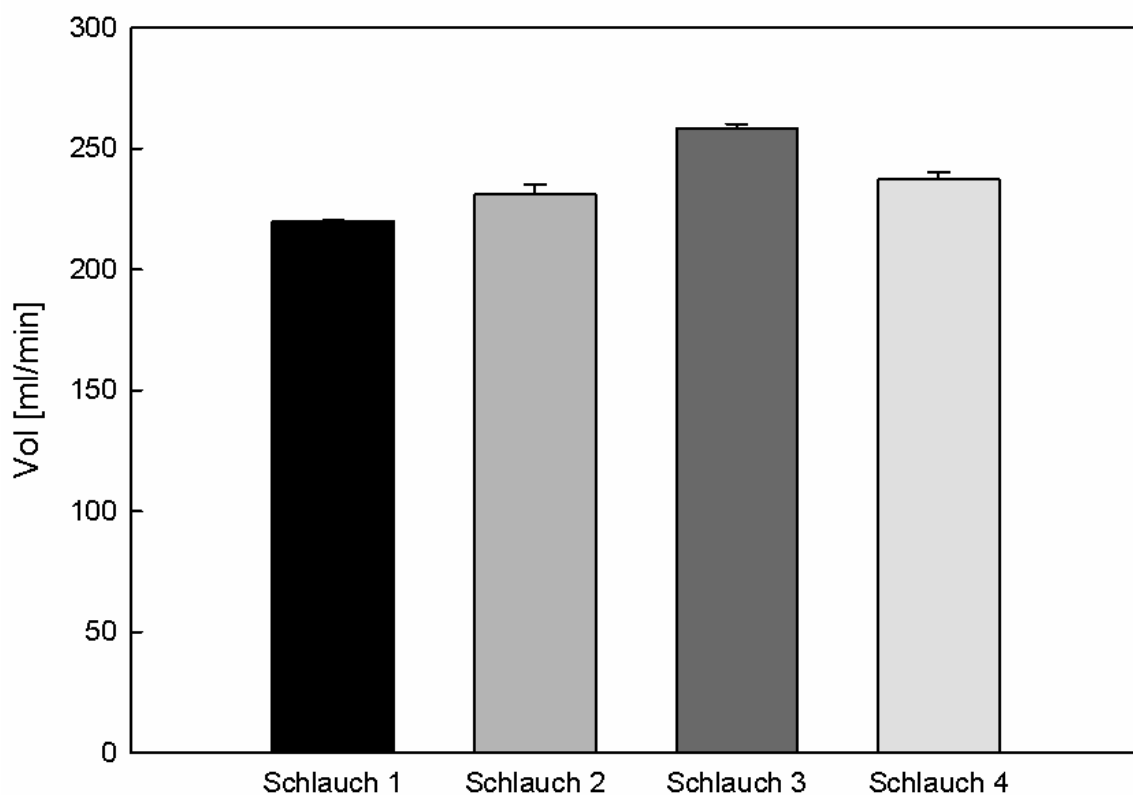


Abb. V.20: Volumenströme nach Einbau eines größeren Dreiwegehahns bei Schlauch 3, Mittelwerte mit Standardabweichung einer 4x-Bestimmung

V.2.3. Sterilitätstest

Da das Wachstum von Endothelzellen in der Perfusionsanlage untersucht werden sollte, musste Sterilität gewährleistet sein. Dafür wurde die Perfusionsanlage zunächst sterilisiert (IV.2.2.3), unter der Sterilbank mit Medium M199 (10% FKS) steril befüllt und 12 Tage lang im Brutschrank bei 37° und 5% CO₂ mit angeschalteter Medospumpe betrieben. Nach 7

Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Beurteilung der Sterilität wurden täglich Farbe des Mediums, pH Wert und Lactat (IV.2.2.4) bestimmt.

Dabei betrug der pH Wert an allen 12 Messzeitpunkten stets zwischen 7,39 und 7,40, die Lactatkonzentration 12 – 13 mg/dl. Ein Farbumschlag oder eine Trübung des Mediums, was ein Hinweis auf Verunreinigung durch Bakterien ist, ließ sich nicht beobachten.

Die Perfusionsanlage gewährte demnach über 12 Tage im Pumpbetrieb mit Mediumwechsel sterile Versuchsbedingungen.

V.2.4. Weiterentwicklung von Anlage und Methode aufgrund erster Versuchsergebnisse

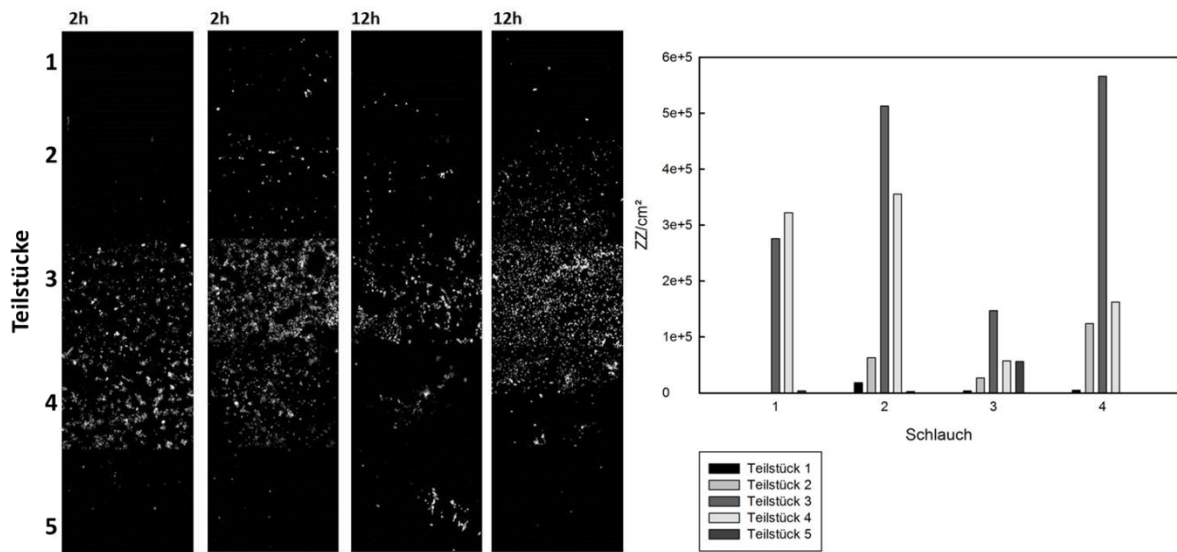
Nachdem die Perfusionsanlage modifiziert (V.2.1.), sowie Volumen und Volumenstrom gemessen wurden, konnten erste Versuche zur Endothelzelladhäsion durchgeführt werden.

V.2.4.1. Ergebnisse erster Versuche zur Endothelzelladhäsion

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Adhäsion von Endothelzellen auf unbeschichteten PU-Schläuchen erprobt (mit Wiederholung in einem 2. unabhängigen Ansatz). Von den vier Schläuchen wurden die zwei äußeren nach 2 Stunden Rotation entnommen und analysiert. Die anderen beiden Schläuche wurden für 12 Stunden einer pulsatilen Strömung durch Betrieb der Medospumpe ausgesetzt. Dabei wurde nach dem in IV.2.2.7. (Tabelle IV.5) beschriebenen Protokoll vorgegangen. Ergebnisse siehe Abbildung V.20.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 4 fibronectinbeschichtete PU-Schläuche eingesetzt. Die Versuchsbedingungen waren analog zur ersten Versuchsreihe. Ergebnisse siehe Abbildung V.21.

Versuch 1



Versuch 2

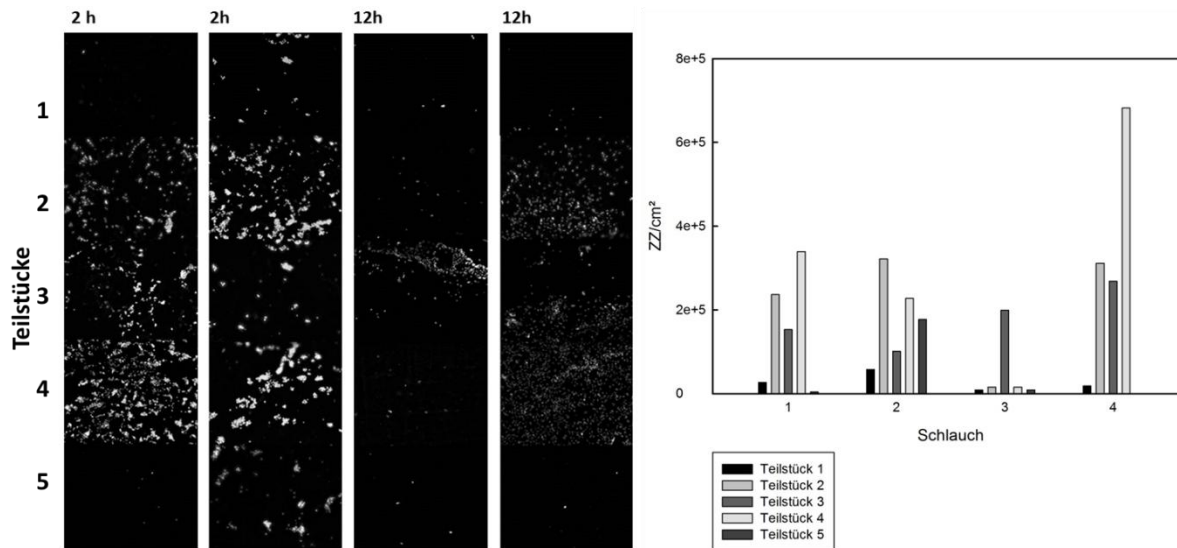
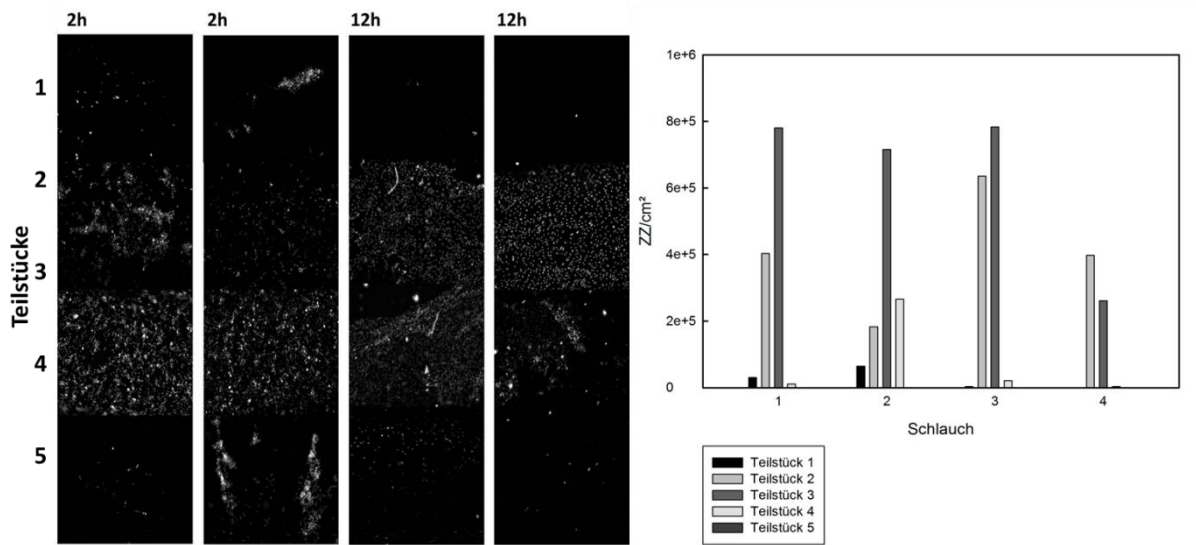


Abb. V.20: Erste Versuchsreihe: Endothelialisierung von unbeschichteten PU-Schläuchen in der modifizierten Perfusionsanlage. In 2 unabhängigen Ansätzen wurden jeweils 4 PU-Schläuche endothelialisiert (Endotheladhäsion über 2h Rotation; Perfusion der Schläuche über 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 5 Teilstücken des betroffenen Schlauchs im Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Schlauchteilstücken). In beiden Versuchen wurden 3×10^6 Zellen pro Schlauch eingesetzt (Kultur HUVEC 261P2). Rotation: 180°-Drehung mit 8 Haltepositionen (23°-Drehung, Halt für 4 min). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

Versuch 3



Versuch 4

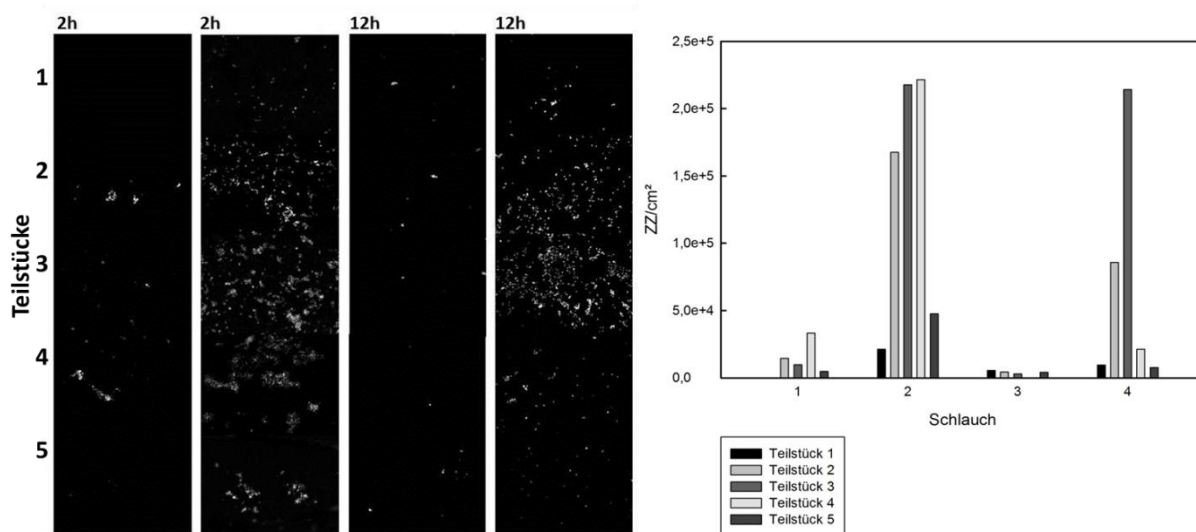


Abb. V.21: Zweite Versuchsreihe: Endothelialisierung von fibronectin-beschichteten PU-Schläuchen in der modifizierten Perfusionsanlage. In 2 unabhängigen Ansätzen wurden jeweils 4 PU-Schläuche endothelialisiert (Endotheladhäsion über 2h Rotation; Perfusion der Schläuche über 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 5 Teilstücken des betroffenen Schlauchs im Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Schlauchteilstücken). In beiden Versuchen wurden 3×10^6 Zellen pro Schlauch eingesetzt (Kultur VS271P3 und VS283P3). Rotation: 180°-Drehung mit 8 Haltepositionen (23°-Drehung, Halt für 4 min). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

Allein der optische Eindruck, den man beim Betrachten der DAPI-gefärbten PU-Schläuche gewinnt, zeigt, dass sowohl bei den Versuchen ohne, als auch bei den Versuchen mit Fibronectinbeschichtung eine Endothelzelladhäsion stattgefunden hat (Bilder der Schläuche nach zwei Stunden). Außerdem hielten die Endothelzellen den Scherkräften, die durch die pulsatile Strömung verursacht wurden, stand und konnten ohne wesentlichen Zellverlust nach 12 Stunden immer noch auf den Polyurethanschläuchen nachgewiesen werden. Auffallend war, dass die Endothelzellen ungleichmäßig verteilt waren: An den Randstücken (Teilstück 1 und 5) der aufgeklappten Schläuche, die in der Perfusionsanlage der Decke der PU-Schläuche entsprachen, finden sich deutlich weniger Zellen als in den mittleren Teilstücken, dem Boden (Teilstück 2,3 und 4). Die Zellansammlung in den Teilstücken 2-4 war dabei nicht einheitlich, sondern es bildeten sich Zellaggregate. An diesen Stellen wurde eine hohe Endothelzelldichte bestimmt.

Tabelle V.2 gibt die maximale Zelldichte im Bodenbereich bzw. die mittlere Zelldichte über den gesamten Innenumfang der Schläuche wieder.

Versuch	Beschichtung	Maximale Zelldichte (Schlauchboden) [Zellzahl pro cm ²]	Mittlere Zelldichte (gesamter Schlauch) [Zellzahl pro cm ²]
1	Ohne Fibronectin	$3,3 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$
2	Ohne Fibronectin	$3,0 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$
3	Fibronectin	$5,7 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^5$
4	Fibronectin	$1,7 \times 10^5 \pm 9,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4 \pm 8,0 \times 10^4$

Tabelle V.2: Zelldichte der Versuche 1-4

Der Versuchsaufbau aus den Versuchen 1 bis 4 war zwar vergleichbar, allerdings wurde kein direkter Vergleich von unbeschichtet und beschichtet in einem Versuch durchgeführt. Dies erschwert den direkten Vergleich, um die Bedeutung der Fibronectinbeschichtung zu ermitteln. Die Daten erlauben lediglich die Aussage, dass eine Endothelzelladhäsion sowohl auf unbeschichteten, als auch auf fibronectinbeschichteten PU-Schläuchen möglich war und die Stabilität der Adhäsion für 12 Stunden unter pulsatilem Fluss gewährleistet war. Da die Endothelzelladhäsion allerdings sehr uneinheitlich war, wurden die Rotationsbedingungen beim Seeding überarbeitet.

V.2.4.2. Weiterentwicklung der Perfusionsanlage: Einbau Zeitschaltautomatik

Wie aus V.2.4.1. hervorgeht, setzten sich am Boden der Schläuche, der Schwerkraft folgend, mehr Endothelzellen ab und bildeten dort Zellaggregate. Da dieses Phänomen bereits zwei Stunden nach der Rotation (Seeding) zu beobachten war, lag die Vermutung nahe, dass die Rotation nicht gleichmäßig durchgeführt wurde. Ein Manko war sicherlich, dass die ersten Versuche von Hand gesteuert werden mussten, indem alle vier Minuten der Motor für die Rotationsbewegung angeschaltet wurde. Auf eine Umdrehung (360°) kamen 8 Positionen, an denen die Perfusionsanlage je 4 Minuten verweilte. Da die Positionen nur per Augenmaß abgeschätzt werden konnten (23° Winkel wurde lediglich geschätzt), war eine standardisierte Durchführung des Versuchs nur bedingt gegeben.

Als Folge wurde eine Zeitschaltuhr eingebaut und vor den Rotationsantrieb geschaltet. Außerdem wurde der Antrieb so umgestaltet, dass eine 360° Rotation möglich war. Durch die Zeitschaltuhr wurden sowohl die Dauer also auch die Anzahl und damit Lage der Haltepositionen genau festgelegt. Die Einstellung für die folgenden Versuche (V.2.4.3.) war 15 Haltepositionen pro 360° Drehung, 4 Minuten Verweildauer pro Halt.

V.2.4.3. Ergebnisse der Versuche zur Endothelzelladhäsion nach Einbau der Zeitschaltuhr

Analog zu den Versuchen aus V.2.4.1. wurde die Endothelzelladhäsion erneut erprobt. Es wurde ein Versuch auf unbeschichteten PU-Schläuchen und ein Versuch mit fibronectinbeschichteten PU-Schläuchen durchgeführt. Die Perfusionsanlage wurde wieder für 2 Stunden rotiert und zwei Schläuche zur Analyse entnommen, bevor die verbleibenden zwei Schläuche 12 Stunden einem pulsatilen Fluss ausgesetzt wurden. Die Rotation erfolgte mit 15 Haltepositionen pro 360° Drehung, 4 Minuten Verweildauer pro Halt.

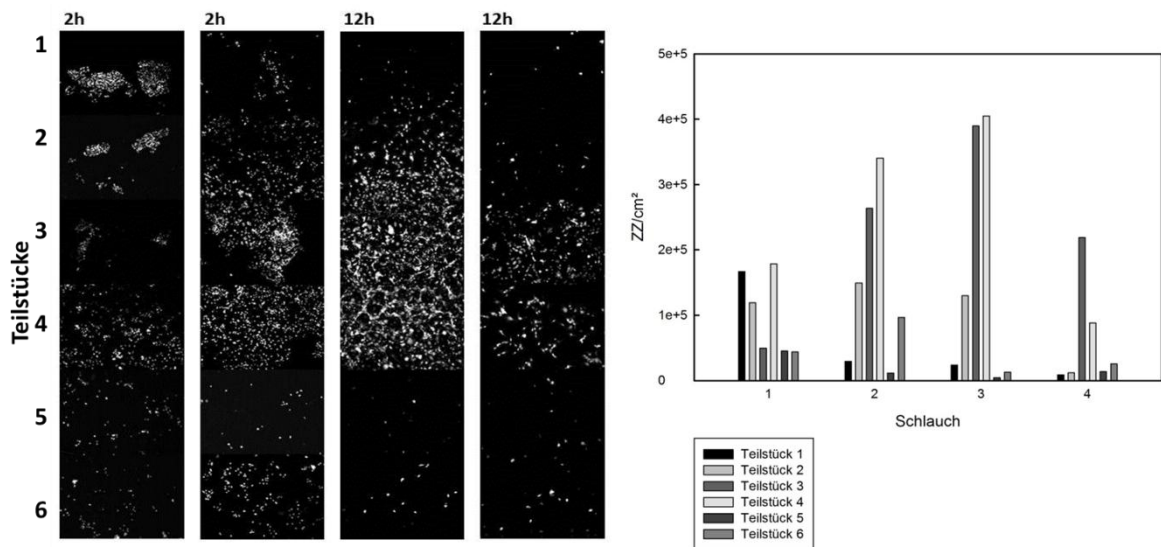


Abb. V.22: Endothelialisierung von unbeschichteten PU-Schläuchen mit veränderter Rotation. 4 PU-Schläuche wurden endothelialisiert (Endotheladhäsion 2h Rotation; Perfusion über 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken). Aussaat von 2×10^6 Zellen pro Schlauch (Kultur VS908 P3). Rotation: 360°-Drehung, 15 Haltepositionen (4 min pro Halt). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

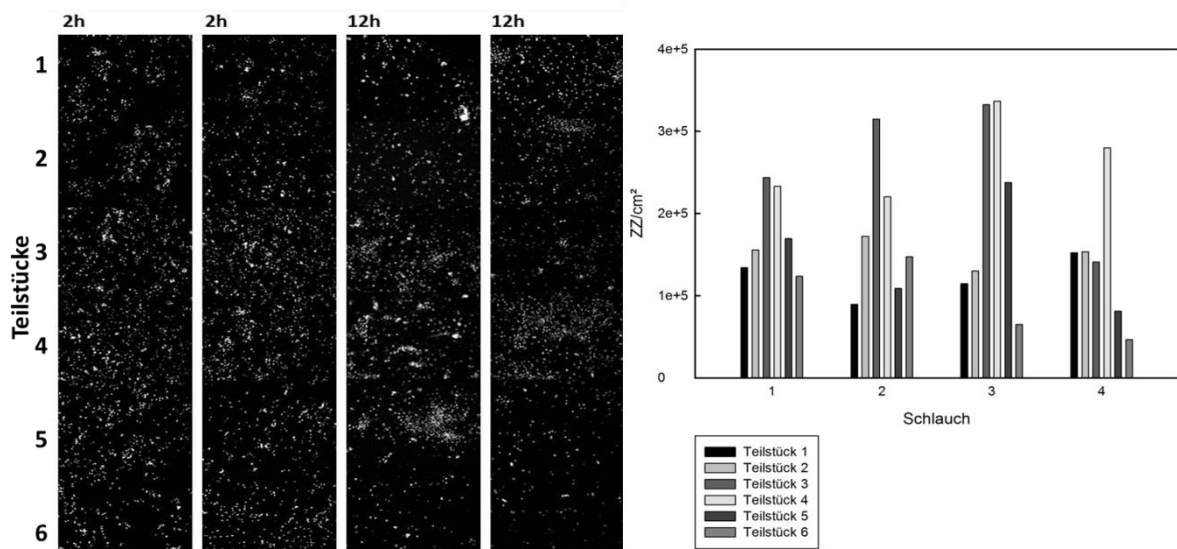


Abb. V.23: Endothelialisierung von fibronectin-beschichteten PU-Schläuchen mit veränderter Rotation. 4 PU-Schläuche wurden endothelialisiert (Endotheladhäsion 2h Rotation; Perfusion 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken). Aussaat von 2×10^6 Zellen pro Schlauch (Kultur HUVEC370 P2); Rotation: 360°-Drehung, 15 Haltepositionen (4 min pro Halt). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass die Adhäsion von Endothelzellen auf PU-Schläuchen mit und ohne Fibronectin möglich ist und die Endothelzellen auch nach 12 Stunden unter pulsativer Strömung ohne Zellverlust noch nachweisbar sind. Die Verteilung der Endothelzellen hatte sich im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen verbessert: Die Zellen waren bei den Schläuchen mit Fibronectinbeschichtung nun gleichmäßiger verteilt (Abb. V.23), auch wenn nach wie vor in der Schlauchmitte bis zu 3 mal so hohe Zellkonzentrationen gemessen werden konnten. Auf den Schläuchen ohne Fibronectinbeschichtung war eine vermehrte Bildung von Zellaggregaten im Bodenbereich der Schläuche zu sehen.

Tabelle V.3 gibt die maximale Zelldichte im Bodenbereich bzw. die mittlere Zelldichte über den gesamten Innenumfang der Schläuche wieder.

Versuch	Beschichtung	Mittlere Zelldichte nach 2h Rotation (gesamter Schlauch) [Zellzahl pro cm ²]	Maximale Zelldichte nach 12 h Perfusion (Schlauchboden) [Zellzahl pro cm ²]	Mittlere Zelldichte nach 12h Perfusion (gesamter Schlauch) [Zellzahl pro cm ²]
1	Ohne Fibronectin	$1,2 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$
2	Fibronectin	$1,7 \times 10^5 \pm 6,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$

Tabelle V.3: Zelldichte aus Versuchen V.2.4.3.

Vergleicht man die Zelldichten, so waren auf den fibronectinbeschichteten PU-Schläuchen im Mittel nach 2 h Rotation um 29% mehr Zellen adhärirt. Das Gleiche war noch nach 12 h Perfusion nachweisbar (35% mehr Zellen auf fibronectinbeschichteten PU-Schläuchen).

V.2.4.4. Weiterentwicklung der Methodik: Versuchsprotokoll zum Seeding

Wie aus V.2.4.3. hervorgeht, war die Verteilung der adhärirten Endothelzellen durch Veränderung der Rotation besser, jedoch noch nicht optimal. Daher wurde ein neuer Ansatz verfolgt. Es wurden mehr Zellen pro Schlauch eingesetzt, das Handling beim Seeding wurde verändert und schließlich wurde die Rotation erneut modifiziert.

Es wurde vermutet, dass sich bereits während des Befüllens der PU-Schläuche (siehe V.2.4.3) die ersten Endothelzellen am Boden des Schlauches absetzen. Daher wurde in dem neuen Versuchsprotokoll die Perfusionsanlage während des Befüllvorgangs mehrmals von Hand

rotiert, um die Zellen in Bewegung zu halten und damit vorzeitige Adhäsion zu unterbinden. Außerdem wurde die Zahl der Haltepunkte wieder auf 5 pro 360° Rotation verringert. Die Ergebnisse aus dieser Modifikation sind unter V.3. wiedergegeben. Sowohl dieses Seeding-Protokoll (siehe Tabelle IV.4 unter IV.2.2.7.) als auch alle bisher hergeleiteten Optimierungen im Umgang mit der Perfusionsanlage wurden den weiteren Versuchen zugrunde gelegt.

V.3. Endothelzelladhäsion und -wachstum in der Perfusionsanlage

V.3.1. Endothelzelladhäsion auf Polyurethanschläuchen nach Standardprotokoll

Nach Einführung und Optimierung der Perfusionsanlage wurde das letzte Versuchsprotokoll (Tabelle IV.4) für die weiteren Versuche verwendet.

Die Vorversuche in V.2. zeigten bereits, dass eine Fibronectinbeschichtung eine Endothelzelladhäsion begünstigt. Daher wurden die Versuche zur Endothelzelladhäsion ausschließlich auf fibronectinbeschichteten PU-Schläuchen durchgeführt. Im Folgenden wurde das Standardprotokoll bei 4 fibronectinbeschichteten PU-Schläuchen angewandt. Die Versuche wurden unter gleicher Einstellung insgesamt dreimal durchgeführt.

Die Ergebnisse des ersten Versuches sind in Abb. V.24 wiedergegeben. Bei zwei von vier Schläuchen konnten keine Endothelzellen auf der Oberfläche der PU-Schläuche nachgewiesen werden (weder nach 2 Stunden Rotation, noch nach 12 Stunden Perfusion). Der Rest zeigte nach 2 Stunden Rotation zwar adhärente Zellen auf der Oberfläche, allerdings waren diese nicht gleichmäßig verteilt, sondern bildeten großflächige Aggregate. Durch die anschließende Perfusion gingen über 90% der Zellen verloren.

Versuch 1

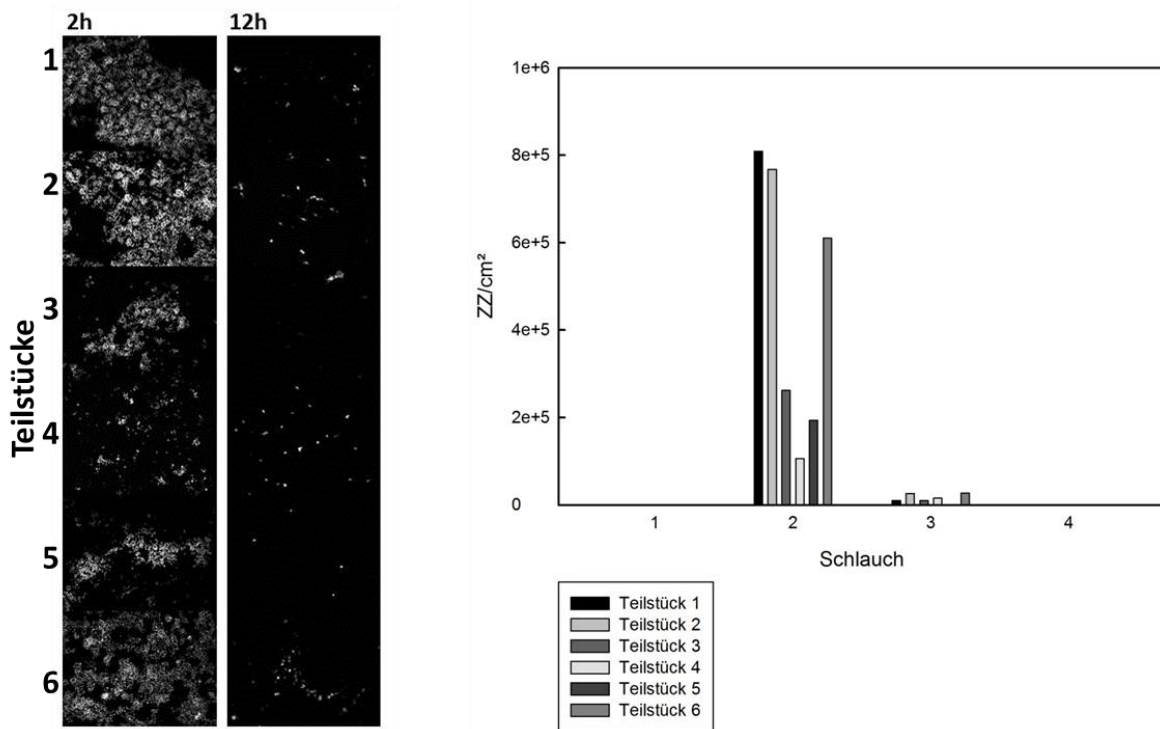


Abb. V.24: Endothelialisierung nach Standardprotokoll (Versuch 1). Vier Polyurethanschläuche mit Fibronectinbeschichtung wurden endothelialisiert (Endotheladhäsion 2h Rotation; Perfusion über 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken). Aussaat 6×10^6 Zellen pro Schlauch (Kultur VS802 P3); Drehen der Anlage während Befüllen der Schläuche mit Endothelzellen; Rotation: 360°-Drehung, 5 Haltepositionen (4 min pro Halt). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

Versuch 2:

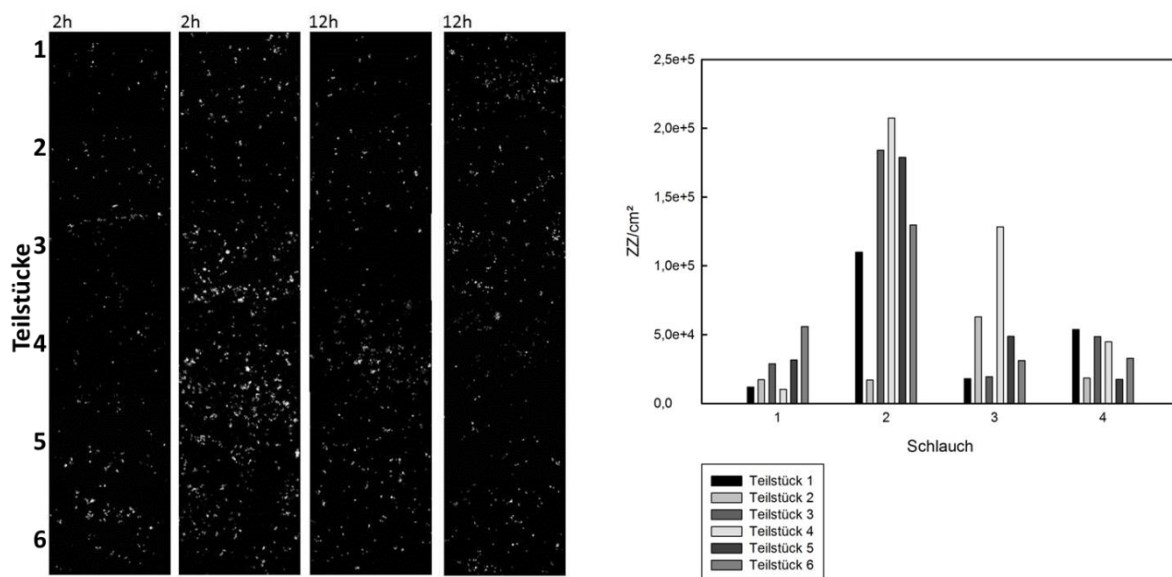


Abb. V.25: Endothelialisierung nach Standardprotokoll (Versuch 2). Vier Polyurethanschläuche mit Fibronectinbeschichtung wurden endothelialisiert (Endotheladhäsion 2h Rotation; Perfusion über 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken). Aussaat 6×10^6 Zellen pro Schlauch (Kultur VS814 P3); Drehen der Anlage während Befüllen der Schläuche mit Endothelzellen; Rotation: 360°-Drehung, 5 Haltepositionen (4 min pro Halt). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

Die Ergebnisse des zweiten Versuchs sind in Abb. V.25 wiedergegeben. Bei diesem Ansatz waren zwar in allen Schläuchen adhärenente Zellen nachweisbar (zu beiden Zeitpunkten), allerdings nur sehr wenige. Nach der Beendigung der 2stündigen Rotation waren die Verteilung und die Anzahl der Zellen in den parallel laufenden Schläuchen unterschiedlich. Im ersten Schlauch waren weniger als 5×10^4 Zellen pro cm² nachweisbar, im zweiten Schlauch waren es mehr als 1×10^5 Zellen pro cm². Nach der anschließenden 12stündigen Perfusion lag die mittlere Zelldichte bei $5,1 \times 10^4$ Zellen pro cm² auf Schlauch 3 und $3,6 \times 10^4$ Zellen pro cm² auf dem vierten Schlauch.

Die Daten des dritten Versuchs sind in Abb. V.26 dargestellt. Die Endothelzelladhäsion hat stattgefunden und auch 12 Stunden einer pulsatilen Strömung standgehalten. Die Verteilung der Endothelzellen war weitgehend homogen, abgesehen von wenigen Ausnahmen wie Teilstück 2 in Schlauch 2 oder Teilstück 4 und 5 in Schlauch 4. Die mittlere Zelldichte auf Schlauch 1 bzw. Schlauch 2 betrug $4,7 \pm 1,2 \times 10^5$ bzw. $4,3 \pm 1,6 \times 10^5$ Zellen pro cm² (nach 2 Stunden Rotation). Nach 12 Stunden Perfusion befanden sich $5,8 \pm 0,9 \times 10^5$ Zellen pro cm² (Schlauch 3) bzw. $2,2 \pm 1,1 \times 10^5$ Zellen pro cm² (Schlauch 4). Weiterhin war die Verteilung der Zellen gleichmäßig.

Versuch 3:

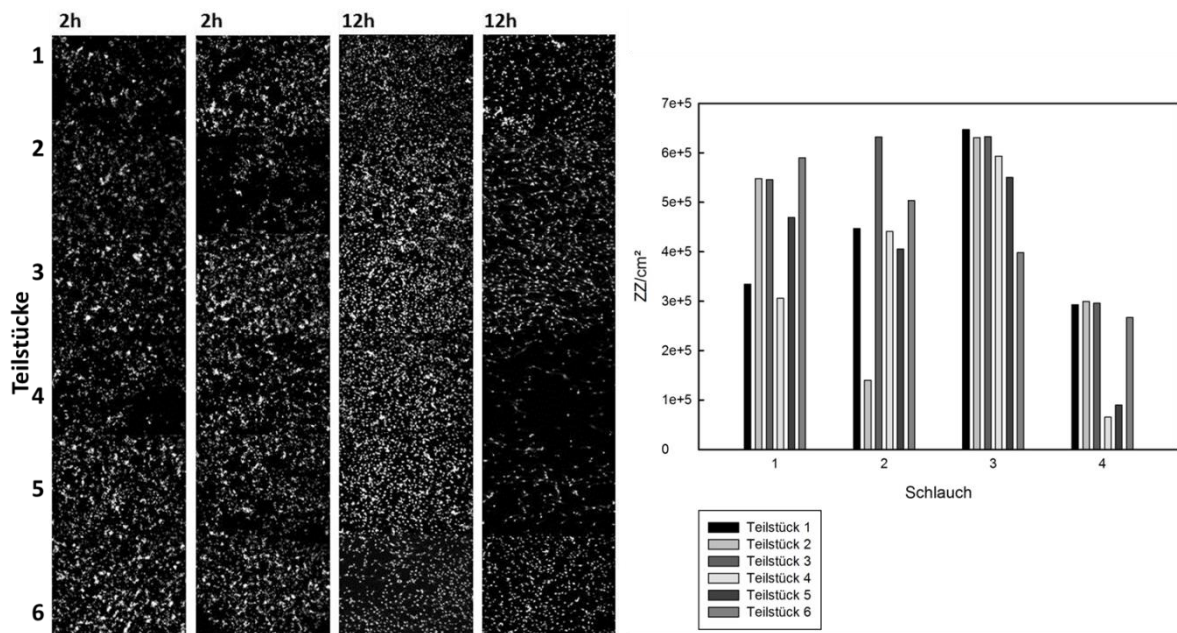


Abb. V.26: Endothelialisierung nach Standardprotokoll. Vier Polyurethanschläuche mit Fibronectinbeschichtung wurden endothelialisiert (Endotheladhäsion 2h Rotation; Perfusion über 12h) und analysiert (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken). Aussaat 6×10^6 Zellen pro Schlauch (Kultur VS802 P3); Drehen der Anlage während Befüllen der Schläuche mit Endothelzellen; Rotation: 360°-Drehung, 5 Haltepositionen (4 min pro Halt). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min).

V.3.2. Vergleich von Polyurethanschläuchen mit und ohne titanhaltiger Schicht

Im nächsten Schritt wurden in einem Versuchsansatz folgende PU-Schläuche verglichen: unbeschichtete PU-Schläuche (ohne Fibronectinbeschichtung); titanisierte PU-Schläuche (ohne Fibronectinbeschichtung); unbeschichtete PU-Schläuche (mit Fibronectinbeschichtung); titanisierte PU-Schläuche (mit Fibronectinbeschichtung). Auf die Adhäsionskontrolle nach 2 Stunden wurde verzichtet. Alle vier Schläuche blieben für 12 Stunden in der Perfusionsanlage. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Daten des ersten Versuchs sind in den Abbildungen V.27 und V.28 dargestellt. Versuch 2 ist in Abbildung V.29 und V.30 wiedergegeben.

Versuch 1:

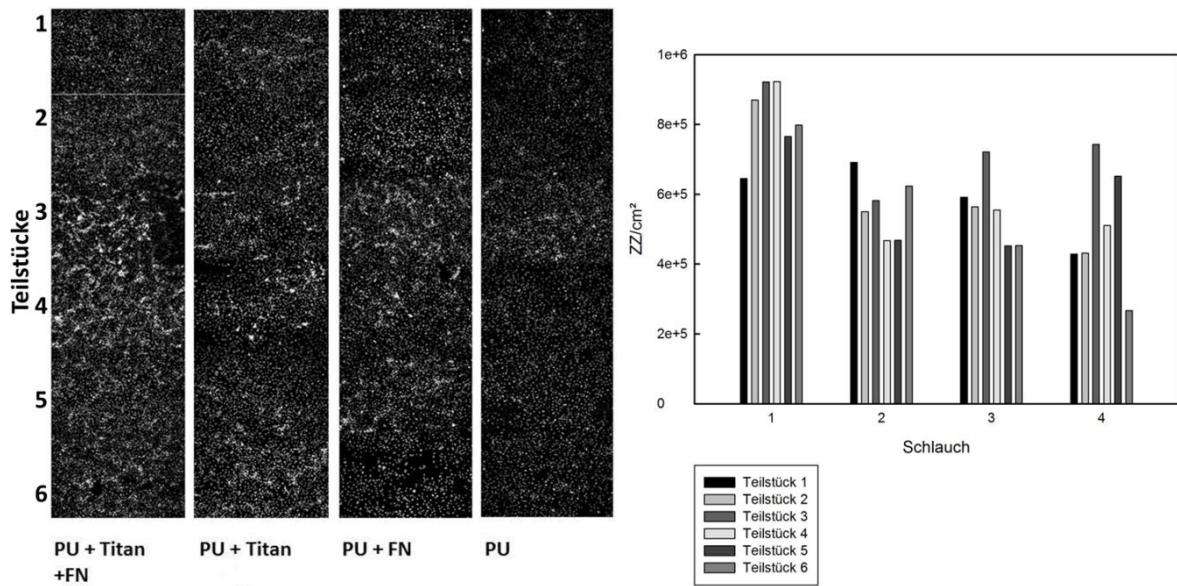


Abb. V.27: Endothelialisierung von vier unterschiedlich behandelten PU-Schläuchen (Versuch 1). Endothelialisierung, 12h Perfusion und Analyse (links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken). Aussaat 6×10^6 Zellen pro Schlauch (Kultur VS802 P3); Drehen der Anlage während Befüllen; Rotation: 360°-Drehung, 5 Haltepositionen (4 min pro Halt). Pumpbetrieb mit 12 V (Volumenstrom von 237 ml/min). PU, PU-Schlauch; Titan, titanhaltige Schicht; FN, Fibronectinbeschichtung.

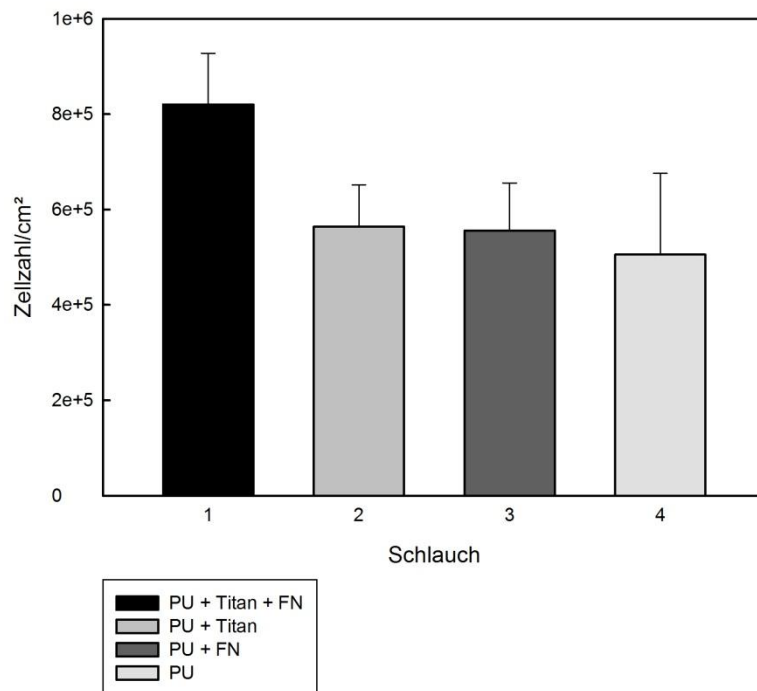


Abb. V.28: Mittlere Zelldichte (Zellzahl pro cm²) der unterschiedlich behandelten PU-Schläuche (Versuch 1); Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus 6 Teilstücken.

Versuch 2:

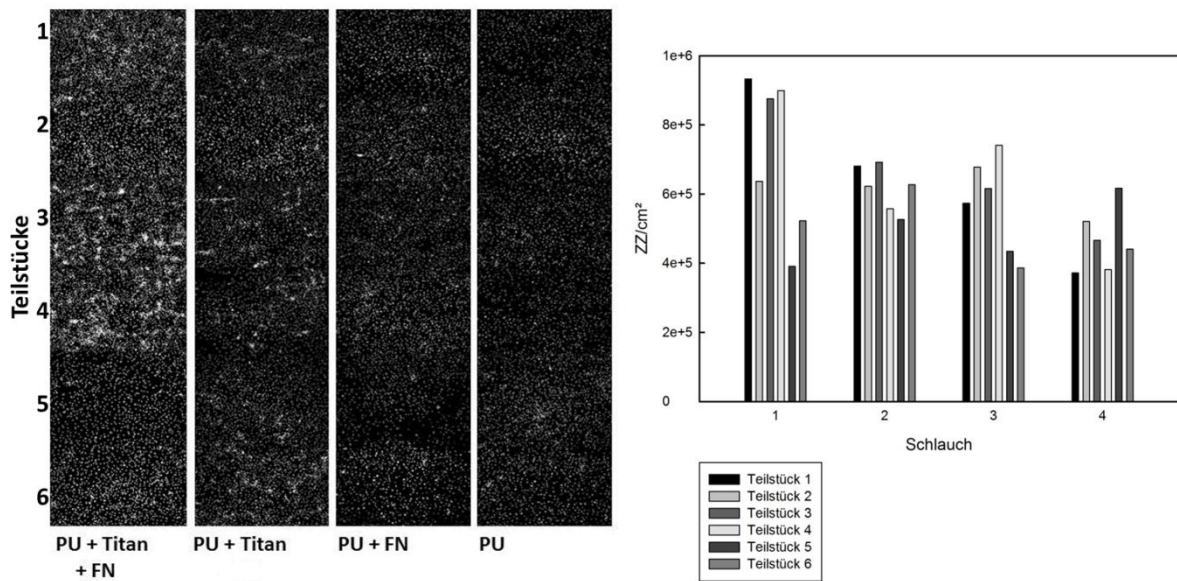


Abb. V.29: Endothelialisierung von vier unterschiedlich behandelten PU-Schläuchen (Versuch 2). Analog zu Versuch 1: von links nach rechts mit folgender Beschichtung: Titanisierung mit Fibronectin, Titanisierung ohne Fibronectin, PU ohne Titanisierung mit Fibronectin, reines PU ohne irgendeine Beschichtung. Einstellung und Versuchsdurchführung siehe Versuch 1; Verwendung einer 2. Endothelzellkultur (Kultur VS803 P3).

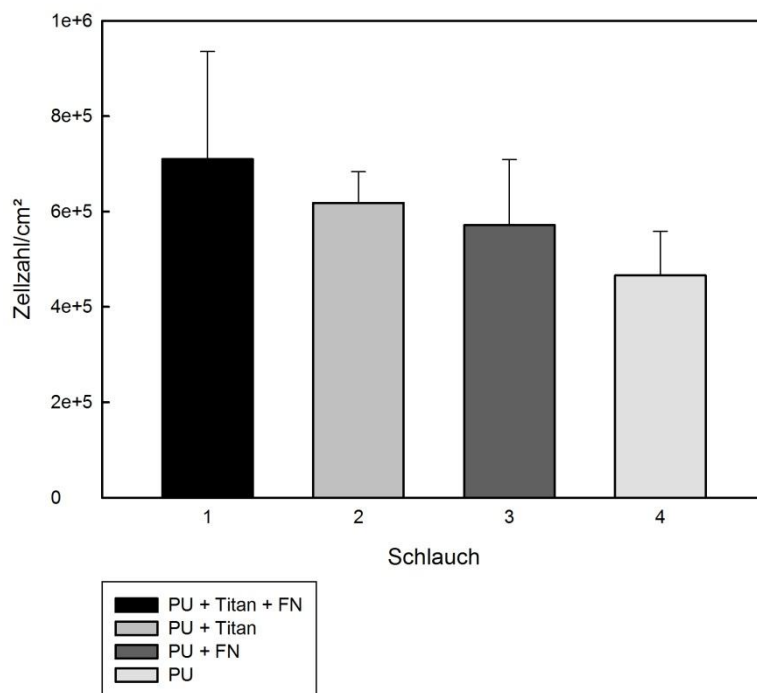


Abb. V.30: Mittlere Zelldichte (Zellzahl pro cm²) der unterschiedlich behandelten PU-Schläuche (Versuch 2). Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus 6 Teilstücken.

Der Vergleich verschiedener Beschichtungen wurde mit zwei verschiedenen Zellkulturen nach Standardprotokoll durchgeführt. Die optische Kontrolle zeigte in beiden Versuchen eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der Endothelzellen nach 12 Stunden Perfusion. Die meisten Zellen adhärten an den titanisierten PU-Schläuchen mit zusätzlicher Fibronectinbeschichtung. So adhärten auf diesen Schläuchen im Mittel $8,2 \pm 1,1 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 . Das waren $37 \pm 10 \%$ mehr Zellen als auf nicht-titanisiertem Polyurethan mit Fibronectinbeschichtung und $38 \pm 20 \%$ mehr Zellen als auf unbehandeltem Polyurethan. Auf titanisiertem Polyurethan ohne Fibronectinbeschichtung wurden im Mittel $32 \pm 14 \%$ weniger Zellen als auf titanisiertem Polyurethan mit Fibronectinbeschichtung nachgewiesen. Die Wiederholung dieses Versuchs bestätigte diese Ergebnisse: $7,1 \pm 2,3 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 bei Schläuchen mit titanhaltiger Oberfläche und Fibronectinbeschichtung und damit $21 \pm 17 \%$ mehr Zellen als auf Polyurethan ohne Titanisierung, bzw. $40 \pm 21 \%$ mehr Zellen als auf Polyurethan, bei dem auch auf eine Fibronectinbeschichtung verzichtet wurde.

V.3.3. Endothelzellwachstum auf Polyurethanschläuchen

Nachdem in V.3.1. und V.3.2. gezeigt wurde, dass eine Endothelzelladhäsion sowohl auf Polyurethan als auch auf Polyurethan mit titanhaltiger Beschichtung möglich ist, galt es nun nachzuweisen, ob adhärte Endothelzellen unter den Bedingungen eines pulsatilen Stroms auf den PU-Schläuchen auch proliferieren können. Dafür wurden 4×10^6 Endothelzellen pro PU-Schlauch ausgesät, 2 Stunden rotiert und dann für 3 Tage der pulsatilen Strömung ausgesetzt. Am Tag 3 nach Aussaat wurden die PU-Schläuche entnommen und analysiert. Der Versuch wurde 3mal durchgeführt (siehe folgende Abbildungen).

Versuch 1

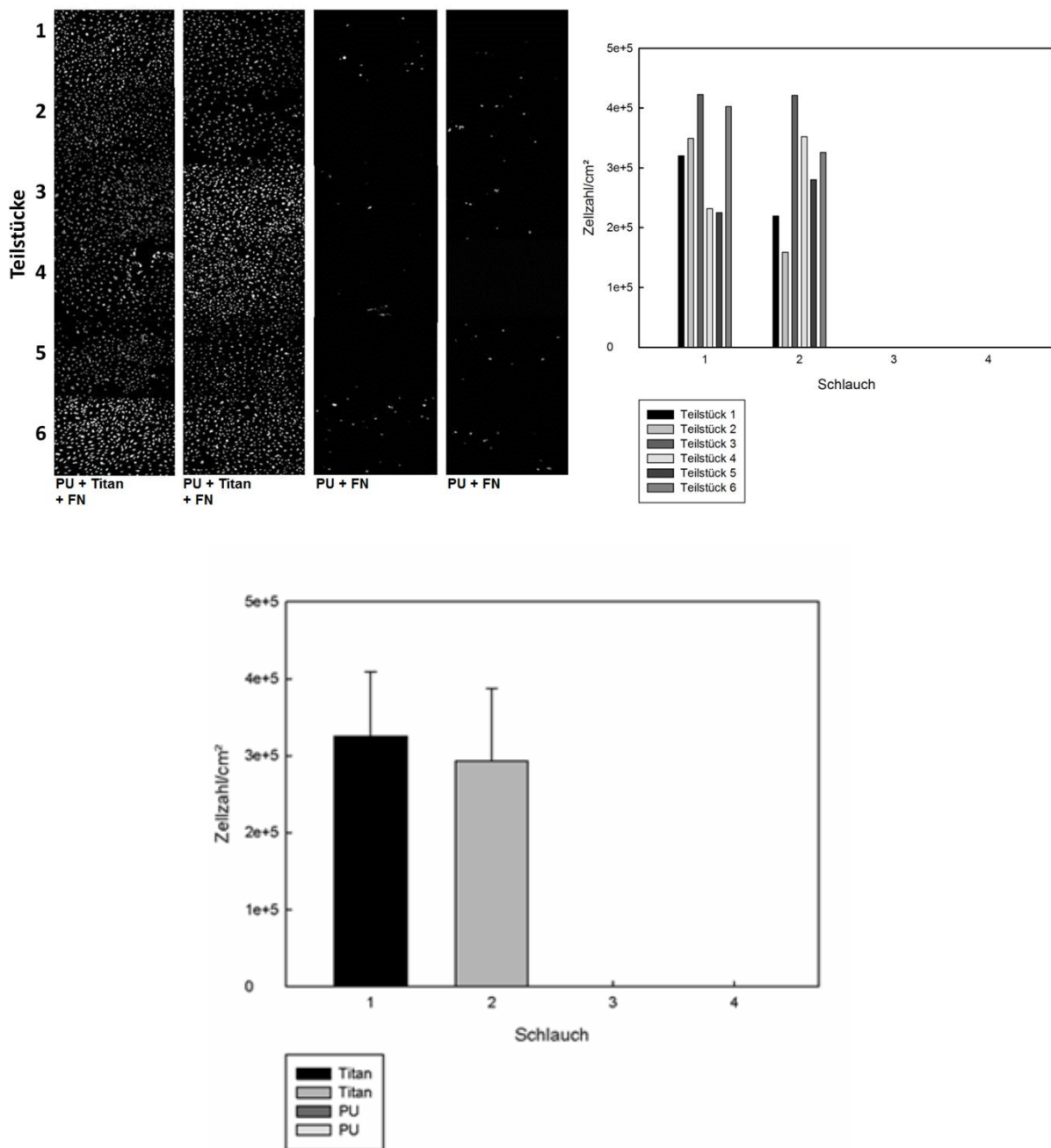


Abb. V.31: Endothelialisierung (Kultur VS1041 P3) von titanisierten und nicht titanisierten PU-Schläuchen mit Standardprotokoll. Schlauch 1 und 2 mit titanhaltiger Beschichtung, Schlauch 3 und 4 aus reinem PU, alle mit Fibronectinbeschichtung wurden nach 2 h Rotation für 72 h in der Perfusionsanlage einem pulsatilem Fluss ausgesetzt und dann analysiert (oben links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; oben rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm^2) auf den einzelnen Teilstücken; unten: mittlere Zelldichte (Zellzahl pro cm^2) der 4 Schläuche.

Versuch 2

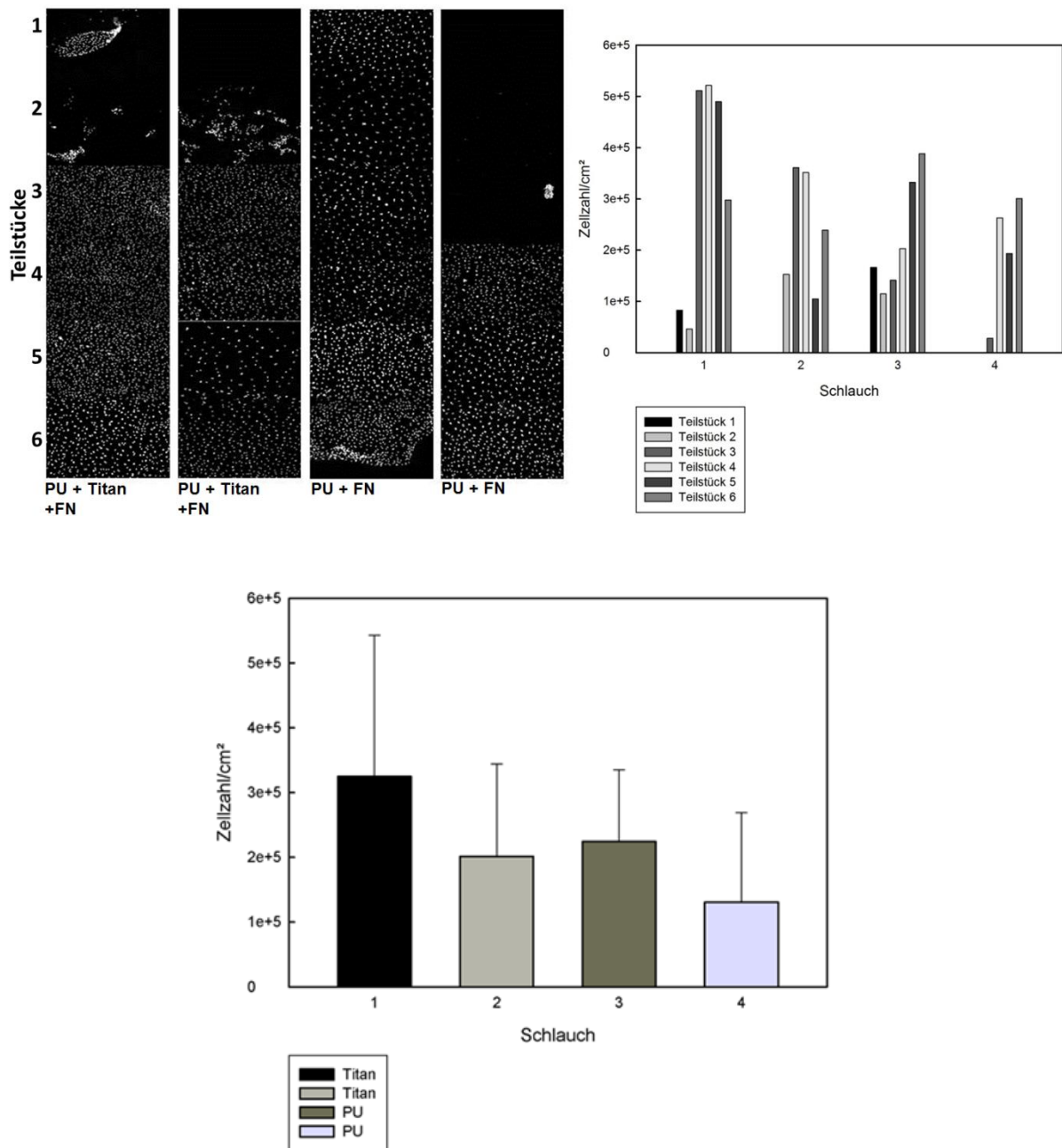


Abb. V.32: Endothelialisierung (Kultur VS1041 P3) von titanisierten und nicht-titanisierten PU-Schläuchen mit Standardprotokoll. Schlauch 1 und 2 mit Titanbeschichtung, Schlauch 3 und 4 aus reinem PU, alle mit Fibronectinbeschichtung wurden nach 2 h Rotation für 72 h in der Perfusionsanlage einem pulsatilen Fluss ausgesetzt und dann analysiert (oben links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; oben rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken; unten: mittlere Zelldichte (Zellzahl pro cm²) der 4 Schläuche.

Versuch 3

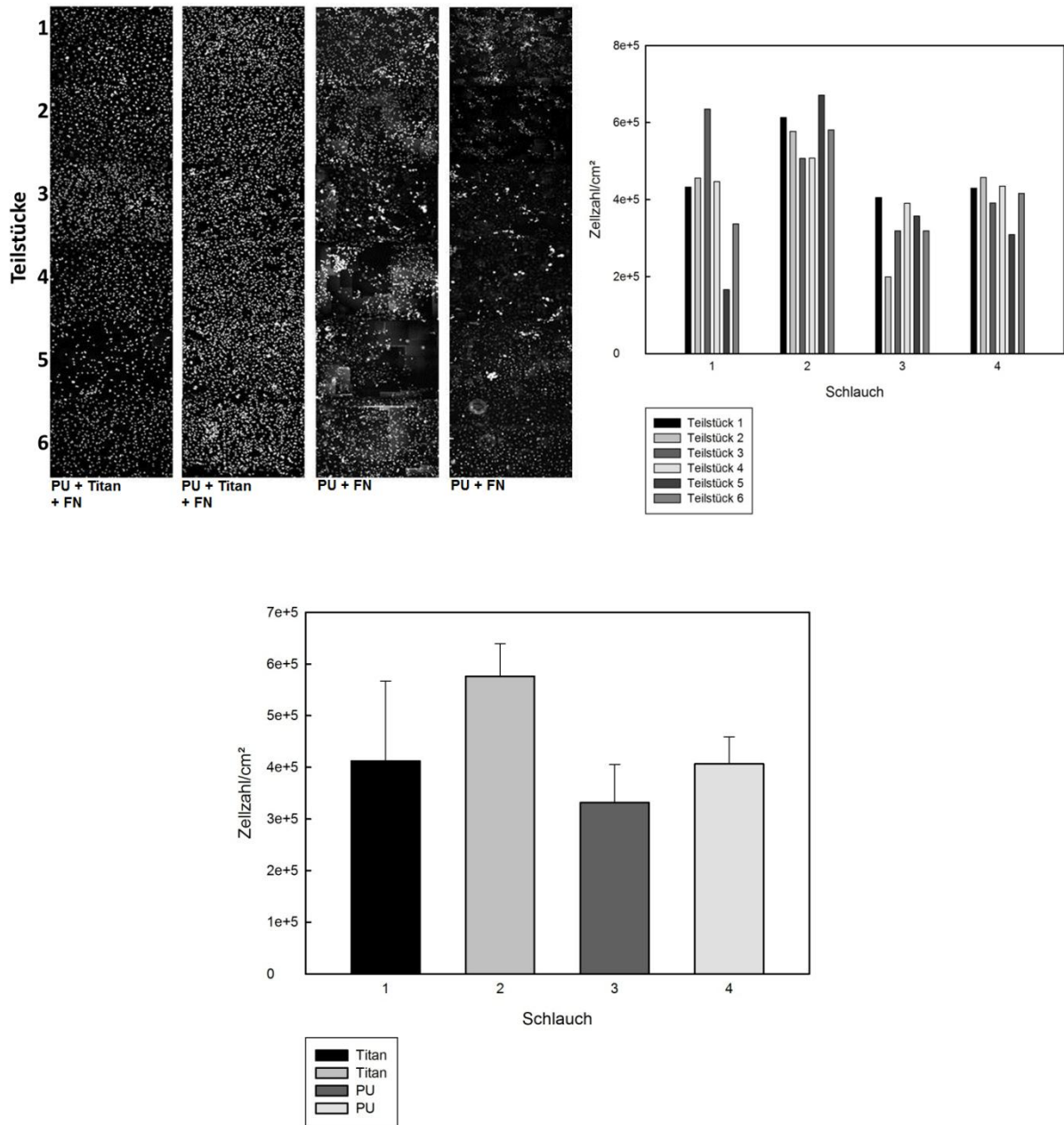


Abb. V.33: Endothelialisierung (Kultur VS944 P3) von titanisierten und nicht-titanisierten PU-Schläuchen mit Standardprotokoll. Schlauch 1 und 2 mit Titanbeschichtung, Schlauch 3 und 4 aus reinem PU, alle mit Fibronectinbeschichtung wurden nach 2 h Rotation für 72 h in der Perfusionsanlage einem pulsatilem Fluss ausgesetzt und dann analysiert (oben links: Darstellung der DAPI-gefärbten Zellkerne auf 6 Teilstücken des betroffenen Schlauchs, Fluoreszenzmikroskop; oben rechts: graphische Aufarbeitung der errechneten Zelldichte (Zellzahl, ZZ pro cm²) auf den einzelnen Teilstücken; unten: mittlere Zelldichte (Zellzahl pro cm²) der 4 Schläuche.

Die Ergebnisse aus den 3 Versuchen waren nicht einheitlich.

Versuch 1: Nach 3 Tagen war lediglich auf den titanisierten PU-Schläuchen ein konfluenter Zellrasen erkennbar. Die Zellen waren gleichmäßig verteilt. Die Zelldichte lag bei $3,3 \pm 0,8 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 auf Schlauch 1 und bei $2,9 \pm 0,9 \times 10^5$ auf Schlauch 2. Auf nicht-titanisierten PU-Schläuchen konnten nur noch vereinzelte Zellen nachgewiesen werden.

Versuch 2: Eine Endothelzellschicht war nach 3 Tagen auf allen PU-Schläuchen nachweisbar, allerdings mit großen Lücken im Zellrasen. Bei den Teilstücken 1 und 2 der titanisierten PU-Schläuche wurden großflächige zellfreie Regionen beobachtet mit aufgelagerten großen Zellaggregaten. Teilstücke 3 bis 6 zeigten mehr oder weniger eine gleichmäßige Zellverteilung. Der erste nicht titanisierte PU-Schlauch war einheitlich mit Endothelzellen bedeckt. Im 6. Teilstück ist eine großflächige Ablösung des Zellrasens erkennbar. Beim zweiten nicht titanisierten PU-Schlauch waren die ersten drei Teilstücke nicht besiedelt.

Versuch 3: Die DAPI-Färbung der fixierten Zellen zeigt, dass die adhärennten Endothelzellen auf allen Oberflächenvarianten über 3 Tage lang den Scherkräften der pulsatilen Strömung standgehalten haben. Dabei fällt auf, dass die Endothelzellen auf den titanisierten PU-Schläuchen gleichmäßiger angeordnet sind als auf den reinen PU-Schläuchen. Letztere weisen die vermehrte Bildung von Zellaggregaten auf. Lediglich Teilstück 5 des ersten Titanschlauchs weist Lücken im Endothelzellmonolayer auf. Berechnet man die mittlere Zelldichte der einzelnen Teilstücke und vergleicht so die Materialien miteinander, so lassen sich auf einem titanisierten Schlauch bis zu $42 \pm 14\%$ mehr Zellen nach 3 Tagen nachweisen als auf einem PU Schlauch ohne Titanisierung (Abb. V.33).

Aus diesem Versuch wurden neben der Zelldichtemessung (Fluoreszenzmikroskopie) ebenfalls Proben entnommen, die für eine Funktionsanalyse (MTS-Reaktion) verwendet wurden. Die Proben wurden wie unter IV.2.3.2. vorbereitet. Die Messung der Absorption der MTS Reagenz nach Inkubation mit zellularisierten PU-Schläuchen ergab folgendes Ergebnis:

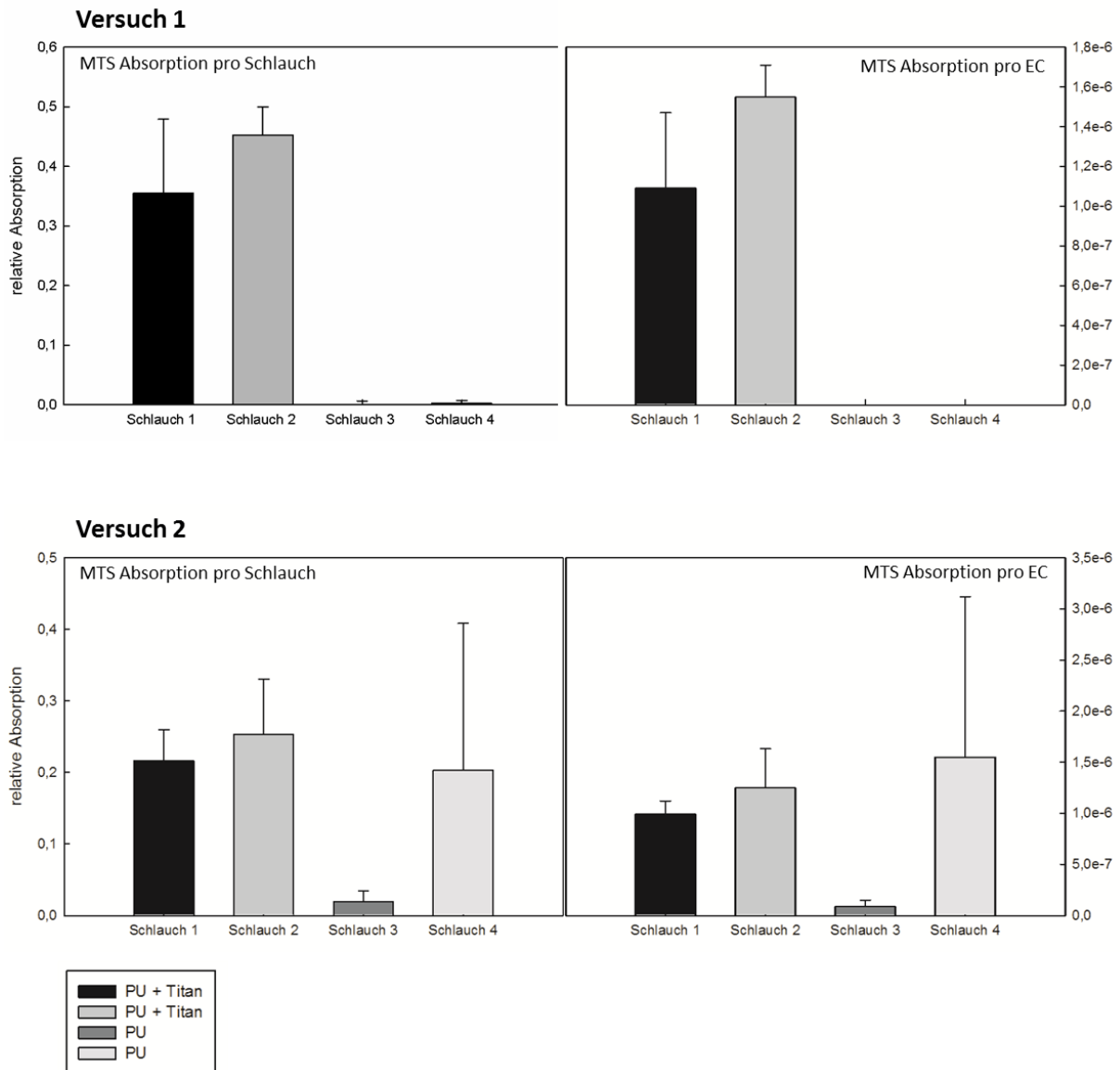


Abb. V.34: Stoffwechselaktivität der EC pro 1 cm² Schlauch (links) und pro Endothelzelle (rechts). Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus einer 4x-Bestimmung; gemessen wurde die MTS Absorption als Maß für die mitochondriale Aktivität

Die MTS-Daten aus Versuch 1 und 2 waren nicht einheitlich. Innerhalb eines Versuches war die MTS-Reaktion der Endothelzellen auf titanisierten PU-Schläuchen vergleichbar (unterschiedliche Größenordnung). Bei drei von vier nicht titanisierten PU-Schläuchen war keine bzw. nur eine sehr geringe mitochondriale Aktivität nachweisbar.

Versuch 3

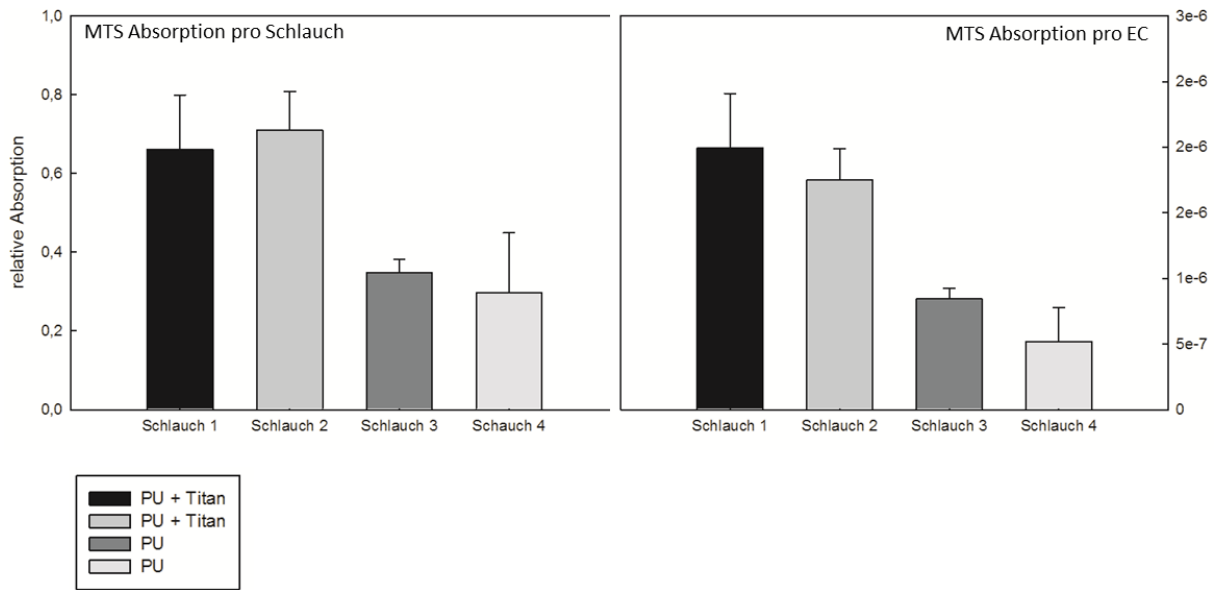


Abb. V.35: Stoffwechselaktivität der EC pro 1 cm² Schlauch (links) und pro Endothelzelle (rechts); Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung aus einer 4x-Bestimmung; gemessen wurde die MTS Absorption als Maß für die mitochondriale Aktivität

Die Daten aus Versuch 3 waren innerhalb der Doppelbestimmungen gleich. Auf titanisierten PU-Schläuchen mit einem Endothelzellmonolayer wurde eine um $52 \pm 18 \%$ höhere relative Absorption und damit Stoffwechselaktivität gemessen, als auf nicht-titanisierten PU-Schläuchen mit Endothelzellen. Die berechnete Stoffwechselleistung pro Endothelzelle war um $63 \pm 14\%$ erhöht (V.35).

VI. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine Titanisierung von Polyurethan die Biokompatibilität des Polymers verbessert. Dafür wurden sowohl statische Versuche unter Einhaltung der europäischen Norm ISO 10993-4, als auch dynamische Tests in einer eigens dafür entwickelten Perfusionsanlage durchgeführt.

VI.1. Nachweis der verbesserten Biokompatibilität nach ISO 10993-4

Entsprechend der ISO 10993-4 ist eine erfolgreiche Endothelialisierung eines Biomaterials als ein Beleg für dessen gute Biokompatibilität zu werten. Schließlich stellt eine intakte, unstimulierte Endothelzellschicht die beste antithrombogene Oberfläche dar²¹. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Titanisierung von PU die Endothelzellproliferation signifikant beschleunigt wird. Zudem konnte nach 7 Tagen eine signifikant höhere Zelldichte nachgewiesen werden als auf unbeschichtetem PU. Diese Beobachtung wird in der Literatur vielfach bestätigt: So wurde bereits von Lehle et al. das reduzierte Wachstum von EC auf PU²² sowie der proliferationsfördernde Effekt einer titanhaltigen Beschichtung von Polymeren²³ beschrieben. Auch in anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass eine Titanoberfläche die Endothelzelladhäsion und deren Wachstum begünstigen^{24,25,26}. Zudem genießt Titan allgemein den Ruf, aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften eine gute Biokompatibilität zu besitzen^{27,28,29}, weshalb der Einsatz von Titanlegierungen in der Medizin schon seit Jahren weit verbreitet ist.^{30,31} Neben der verbesserten Endothelzellproliferation sind die Vitalität und der Funktionserhalt der adhärenen Zellen ein wesentliches Kriterium für deren Biokompatibilität²⁵. Durch die Titanisierung von PU wurde die Stoffwechselaktivität (MTS-Reaktion der Zellen) - als Maß für die Vitalität von Endothelzellen - nicht beeinträchtigt: Die mitochondriale Aktivität pro Zelle war unabhängig vom getesteten Material. Allerdings war die Stoffwechselleistung pro Fläche bei einer erhöhten Zelldichte auf titanisiertem PU signifikant höher als auf unbeschichtetem PU. Anhand dieser Ergebnisse und der Literatur lässt sich damit die Aussage treffen, dass eine titanhaltige Beschichtung eine mögliche Oberflächenmodifikation von Polyurethan ist, um die Biokompatibilität im Sinne einer vermehrten Endothelzelladhäsion zu verbessern, ohne dabei Abstriche in der Vitalität der Endothelzellen in Kauf nehmen zu müssen.

Zur Darstellung der Thrombogenität des Materials selbst wurde ein Thrombozyten- und ein PBMC-Adhäsionstest eingesetzt, wie er von Stevens in der Literatur beschrieben ist³² und vielfach angewendet wird.^{33,34,35} Durch die Titanisierung konnte die Thrombozytenadhäsion an PU nicht verhindert werden, allerdings adhärten weniger PBMCs als auf unbeschichtetem PU. Auch in der Literatur ist dieses Phänomen bekannt: Zwar wird einerseits berichtet, dass die Plättchenaktivierung und die damit einhergehende Thrombenbildung in VADs und auf künstlichen Herzklappen mit Titanoberflächen weniger ausgeprägt stattfindet als auf anderen Materialien^{36,37}. Nach wie vor ist aber bei VADs trotz Titanoberfläche eine chronische Antikoagulation aufgrund thrombembolischer Komplikationen erforderlich.^{30,38,39} Es kommt also auch in vivo zur Plättchenaktivierung und -adhäsion. Darüber hinaus findet man in der Literatur sogar eine Arbeit, in der sich Titan als hochthrombogenes Material im Kontakt mit Vollblut erwies⁴⁰. Mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten wir zeigen, dass es sowohl auf reinem PU, wie auch auf titanbeschichtetem PU zur Plättchenadhäsion und Aggregation kommt. Allerdings spricht die geringere Zahl adhärter PBMCs dafür, dass eine Titanisierung möglicherweise dennoch die Thrombogenität von PU verringert, da bei der Entstehung von Thromben mehrere Mechanismen ineinander greifen: neben der Gerinnungskaskade, der Komplementkaskade und der Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten, spielen Leukozyten (vor allem Monozyten und Neutrophile) eine zentrale Rolle. Werden Leukozyten durch beschädigtes Endothel oder eben Biomaterial aktiviert, kommt es zur Ausschüttung der Entzündungsmediatoren IL-1, 6, 8 und TNF α , welche chemotaktisch auf weitere PBMCs wirken und Thrombozyten aktivieren⁴¹. Dabei bilden sich Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate^{42,43,44}. Durch Antikörper, die die Leukozytenadhäsion hemmen, ist es möglich, die Thrombenbildung insgesamt zu reduzieren.⁴¹ Auf dem Boden der Ergebnisse dieser Arbeit und der Literatur kann nun spekuliert werden, ob - trotz unveränderter Thrombozytenadhäsion - die deutlich geringere Adhäsion von PBMCs an titanisiertem PU die Thrombogenität insgesamt reduziert.

Tatsächlich aber steht derzeit kein Biomaterial zur Verfügung, das eine komplett antithrombogene Oberfläche besitzt, so dass man sich auf andere Strategien wie z.B. die bioaktive Beschichtung und Endothelialisierung von Oberflächen verlegt.⁴⁵

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Zellularisierbarkeit von PU und titanisiertem PU verglichen. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass auf der Oberfläche

mit Endothelzellmonolayer signifikant weniger Thrombozyten adhäreren als auf der Oberfläche ohne Endothelzellen (vgl. V.1.3.). Dabei konnte in der Fluoreszenzmikroskopie kein Unterschied zwischen EC auf titanisiertem oder unbeschichtetem PU festgestellt werden. Diese Arbeit bestätigt also den antithrombogenen Effekt eines Endothelzellmonolayers auf Biomaterialien, wie er auch vielfach in der Literatur beschrieben wird.^{41,46,47,48} Im Thrombozyten- und PBMC-Assay konnte zwar kein Unterschied in der Adhäsion pro Well und damit pro Fläche gemessen werden, allerdings geht aus der Berechnung der Adhäsion pro EC hervor, dass signifikant weniger Thrombozyten und PBMCs an EC adhäreren, die auf titanisiertem PU gewachsen sind. Die verminderte Thrombozyten- bzw. PBMC-Zahl pro EC auf titanisiertem PU könnte Ausdruck einer geringeren Endothelzellaktivierung sein. So könnte spekuliert werden, dass unbeschichtetes PU zu einer Aktivierung der Endothelzellen führt, was durch die Titanisierung reduziert werden kann. Aktivierte Endothelzellen setzen prothrombotische Faktoren wie TF (tissue factor) frei und exprimieren Adhäsionsmoleküle, die die Adhäsion von Leukozyten erleichtern (ICAM-1, VCAM-1, P-Selectin und E-Selectin), wodurch Gerinnung und Thrombogenese gefördert werden.⁴⁹ Dies wäre ein weiteres Indiz für eine verbesserte Biokompatibilität von PU durch eine titanhaltige Beschichtung. In einer früheren Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Titanisierung von Polymeren wie PU keine proinflammatorische Reaktion der Endothelzellen auslöst²³.

Eine Problematik bei derartigen Untersuchungen ist die Reproduzierbarkeit der Daten aus den Thrombozyten- und PBMC-Assays. Im Gegensatz zur Messung der EC Proliferation und mitochondrialen Stoffwechselaktivität wurden diese Tests nicht nach der ISO 10993-4 Norm durchgeführt. Thrombozyten können extrem leicht aktiviert werden, z.B. durch die Blutabnahme oder Aufbereitung des Vollbluts, was eine Thrombozytenaggregation noch während der Präparation zur Folge hat. Der Aktivitätszustand der Thrombozyten scheint auch spenderabhängig zu sein.⁵⁰ Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Thrombozyten von nur einem, zu diesem Zeitpunkt augenscheinlich infektfreien Spender durch vorsichtige Blutabnahme gewonnen wurden und während der Gewinnung der Thrombozyten keine Thrombozytenaggregate makroskopisch zu sehen waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Thrombozyten teilweise aggregierten. Dies würde die Messergebnisse im Spektrofluorometer verfälschen. Für zukünftige in vitro Testungen werden alle

Thrombozyten nach der Isolierung und vor Kontakt mit Endothelzellen oder Oberflächen auf ihren Aktivitätszustand hin untersucht, d. h. es wird die Expression von membranständigem P-Selektin, ein Marker für den Aktivierungszustand, in der Durchflusszytometrie ermittelt. Außerdem muss noch betont werden, dass die Thrombozyten- und PBMC-Adhäsion am blanken Material (PU, tiPU und PS jeweils ohne EC) in nur einer Vierfachbestimmung gemessen wurde, was die statistische Aussagekraft deutlich einschränkt.

Letztlich gilt es zu beachten, dass die Versuche *in vitro*, unter statischen Bedingungen und ohne Vollblut durchgeführt wurden. So wurde, wie oben bereits erwähnt, bei der Messung der Thrombogenität nicht die Interaktion von PBMCs und Thrombozyten untereinander sowie mit der Komplement- und Gerinnungskaskade berücksichtigt. *In vivo*, oder bei Einsatz von Vollblut greifen diese Komponenten der Gerinnung allerdings ineinander und wirken nie isoliert. Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass die Strömung und die damit verbundenen Scherkräfte, wie sie *in vivo* in den Blutgefäßen auftreten, maßgeblich die Gerinnung mitbeeinflussen^{51,52}. So wird beschrieben, dass erhöhte Strömung und Scherkräfte sowohl Thrombozyten⁵³, als auch das Endothel aktivieren, indem dieses die thrombotisch wirksamen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und TF exprimiert.^{43,54} Darüber hinaus ist die Strömungsgeschwindigkeit entscheidend dafür, welche Komponenten des Gerinnungssystems überwiegen: während im venösen Strombett mit geringen Flussgeschwindigkeiten der proteinabhängige Mechanismus der Gerinnungskaskade eine Rolle spielt, überwiegt im arteriellen System mit hohem Volumenstrom und großen Scherkräften die Bildung des weißen Thrombus mit Thrombozyten.⁵⁵ Da der Hintergrund dieser Arbeit der mögliche Einsatz von Polyurethan als Pumpkammer eines Kunstherzens oder als Gefäßersatz ist, spielen diese gerade genannten Faktoren natürlich eine wichtige Rolle. Gleiches gilt auch für die Endothelzelladhäsion: zwar konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen adhären und bis zu einem konfluenten Monolayer wachsen, entscheidend ist aber, ob dies auch *in vivo* unter pulsatilem Fluss von Vollblut und evtl. sogar Verwirbelungen der Fall ist.

Dies war der Grund für die Untersuchungen der Endothelialisierung von titanisierten PU-Oberflächen unter pulsatilem Fluss. Dazu wurde eine spezielle Perfusionsanlage entwickelt und optimiert.

VI.2. Entwicklung einer Perfusionsanlage zur Darstellung der Endothelialisierung unter Flussbedingungen

Die Verwendung verschiedener Perfusionsanlagen ist eine gängige Methode auf dem Gebiet des „tissue engineering“, um Zellen unterschiedlicher Gewebe (u.a. Haut, Knorpel, Muskel, Gefäße) zu kultivieren.⁵⁶ In der Literatur werden mehrere Perfusionsanlagen beschrieben, mit denen Endothelzelladhäsion und -proliferation auf vaskulären Grafts untersucht werden können.^{56,57,58,59} Wie die in der Literatur beschriebenen Perfusionsanlagen, musste auch die Anlage, die in dieser Arbeit zum Einsatz kam, folgende Anforderungen erfüllen: Um die physiologischen Bedingungen bestmöglich zu imitieren, sollte ein pulsatiler Fluss generiert werden, wobei in den Grafts konstante Flussbedingungen ohne Turbulenzen herrschen müssen. Neben der gleichmäßigen Zelladhäsion müssen ein optimaler Gasaustausch, sowie die Möglichkeit zum Wechsel des Nährmediums bei gleichzeitiger Erhaltung der Sterilität gewährleistet sein. Dabei ist eine leichte Handhabbarkeit wünschenswert. Zusätzlich sollte es möglich sein, vier vaskuläre Grafts in einem Ansatz zu testen. Sterilität muss für den Langzeiteinsatz gegeben sein, um die Proliferation der Endothelzellen über mehrere Tage hinweg untersuchen zu können. Ziel dieser Arbeit war es, Anlage und Versuchsprotokoll so zu optimieren, dass die oben genannten Anforderungen erfüllt werden.

Die ungleichmäßige Zelladhäsion nach dem Seeding stellte sich als ein Hauptproblem heraus. Zwar konnte durch die Optimierung des Seedingprotokolls die Zelladhäsion dahingehend verbessert werden, der mangelhafte Rotationsantrieb ist aber nach wie vor ein erheblicher Einflussfaktor: Obwohl Gewichte gegenüber der Reservoirflaschen angebracht wurden, um die Rotation gleichmäßig zu gestalten, sind die Haltepunkte und damit die Rotationsintervalle uneinheitlich. Dies könnte dazu führen, dass die Endothelzellen nicht vollkommen gleichmäßig an den Schlauchwänden adhären. Zudem setzt der Motor, der für die Rotation zuständig ist, die Perfusionsanlage sehr „ruckartig“ in Bewegung, so dass es aufgrund der plötzlich auftretenden Beschleunigung zur Ablösung der Endothelzellen kommen kann. Für die endgültige Lösung dieses Problems sollte also ein anderer Rotationsantrieb verwendet werden.

Die Sterilität - ein wesentliches Kriterium für die Verwendbarkeit einer Perfusionsanlage - gestaltete sich als ein weiteres Problem.

Diese konnte in einem Sterilitätstest über 12 Tage bei 37° C und 5% CO₂ gewährleistet werden. Dabei wurde auch ein Mediumwechsel durchgeführt, durch den keine

Verunreinigungen in die Anlage gelangten. Allerdings stellte sich in Vorversuchen heraus, dass die Sterilität des Mediums in der Anlage nur dann aufrechterhalten werden konnte, wenn alle vier Probenschläuche eingebaut waren. Sobald einer der vier Schläuche zur Analyse herausgenommen und das Schlauchende mit einer Klemme verschlossen wurde, drangen durch das Schlauchende Bakterien in die Perfusionsanlage ein. Dies ließ sich an einer Gelbfärbung des Mediums sowie an einem Lactatanstieg erkennen. So ist es mit dieser Perfusionsanlage nicht möglich, einen Schlauch direkt nach dem Seeding sowie an drei weiteren Zeitpunkten zu analysieren und so eine Adhäsion bzw. Wachstum oder Zellverlust nachzuweisen. Eine mögliche Lösung wäre der Einbau von Dreiwegehähnen in die Glasröhrchen vor den PU Schläuchen, da so der Schlauchrest nicht mehr mit einer OP-Klemme verschlossen werden müsste, sondern der Dreiwegehahn für einen suffizienten Verschluss sorgen würde.

Insgesamt kann dennoch festgestellt werden, dass es trotz der gerade genannten Restmängel gelungen ist, die Anlage hinsichtlich der an sie gestellten Anforderungen zu verbessern. Zusätzlich wurde eine Methodik in Form eines standardisierten Protokolls entwickelt, mit dem reproduzierbare Versuche durchgeführt werden konnten. Zwar kam es immer wieder zu Fehlversuchen (je nach Versuchsreihe misslang die Zelladhäsion in jedem vierten bzw. sogar in jedem zweiten Versuch), bei den Fehlschlägen aber waren stets keinerlei Endothelzellen nachzuweisen - es handelte sich also um eine „alles-oder-nichts-Reaktion“, so dass es mit der entwickelten Methodik grundsätzlich möglich ist, vollständige Endothelzelladhäsion zu erzielen.

Ein Grund für Erfolg oder Misserfolg der Endothelialisierung könnte zum Beispiel die Art des Sterilisationsverfahrens sein: Gulbins et al. verglichen Endothelzelladhäsion unter pulsatilem Flow auf „small diameter vascular grafts“, die vorher entweder mit Ethylenoxid oder γ -Sterilisation sterilisiert wurden.⁶⁰ Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen auf Polyurethan, das zuvor mit Ethylenoxid behandelt wurde, wesentlich schlechter adhärten und vermehrt vom Flow abgetragen wurden. Als mögliche Erklärung wird auf Ethylenoxidreste in den Probenschläuchen verwiesen. Da auch in unseren Versuchen Ethylenoxid als Sterilisationsverfahren verwendet wurde, könnte dies eine Erklärung für die Variabilität unserer Versuchsergebnisse sein: Der Verbleib von Ethylenoxidresten nach dem Spülen in den Schläuchen der Perfusionsanlage, könnte die Zelladhäsion und/oder die Vitalität der EC beeinträchtigen. Ein möglicher Ansatz für weitere Versuche könnte die Verwendung eines

anderen Sterilisationsverfahrens z.B. γ -Sterilisation oder die Entwicklung eines Protokolls zum Spülen der Anlage sein.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der den Ausgang der Versuche beeinflussen könnte, ist die Qualität/Vitalität der für den Versuch eingesetzten Endothelzellkulturen: Für die Endothelialisierung wurden patienteneigene Endothelzellen der Vena saphena verwendet. Durch die Patientenspezifität der Zellen wollten wir gewährleisten, dass im künftigen klinischen Einsatz keine zusätzliche immunologische Reaktion auftritt.^{23,52} Es handelt sich hierbei um Endothelzellen von herzchirurgischen Patienten, die bereits mit im Blut des Patienten zirkulierenden Noxen ausgesetzt waren⁶¹. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Kryokonservierung die Vitalität der Zellen beeinträchtigt wurde. Obwohl das Wachstum aller verwendeten Kulturen vorher getestet wurde, um derartige kulturspezifische Unterschiede zu eliminieren, ist es dennoch denkbar, dass manche Zellkulturen sich im Versuch besser präsentierten als andere. Zudem mussten für die Versuche sehr viele Zellen eingesetzt werden (bis zu 24 Mio!). Um so viele Zellen zu gewinnen, müssen die Endothelzellen in mehreren Passagen bis zu einem dichten konfluenten oder sogar schon hyperkonfluenten Monolayer vermehrt werden. Dabei ist aus der Literatur bekannt, dass mit steigender Passage die Expression von Adhäsionsmolekülen abnimmt⁶² und die Endothelzellen in Apoptose gehen, falls eine gewisse Dichte im Monolayer überschritten wurde⁶³.

So ist die erfolgreiche Etablierung der Perfusionsanlage ambivalent zu bewerten: Zum einen war es möglich, mit ihr reproduzierbare Versuche durchzuführen. Andererseits war auffällig, dass immer wieder „Fehlversuche“ auftraten, die evtl. Ausdruck von Mängeln in der Konstruktion oder im Protokoll sein könnten.

VI.3. Nachweis der verbesserten Biokompatibilität von titanisiertem Polyurethan unter pulsatiler Strömung

In den Versuchen dieser Arbeit konnte nach drei Tagen pulsatilem Flow immer noch ein konfluenten Endothelzellmonolayer nachgewiesen werden. Eine vorausgegangene Fibronectinbeschichtung der Grafts verbesserte das Ergebnis, die besten Ergebnisse hinsichtlich der Zelldichte und Gleichmäßigkeit des Monolayers konnten bei titanisiertem Polyurethan mit Fibronectinbeschichtung erzielt werden.

Zahlreiche Studien befassten sich bereits mit dem Verhalten von Endothelzellen, wenn diese einer pulsatischen Strömung ausgesetzt sind: so beschreiben Giudiceandrea et al. ebenso einen hervorragenden Endothelzellerhalt auf PU nach sechs Stunden pulsatilem Flow.⁶⁴ Damit verbunden ist ein Umbau des Zytoskeletts. Die Endothelzellen richten sich nach der Strömung aus, werden flacher und länger, um den Scherkräften weniger Angriffsfläche zu bieten.⁶⁵ Diese typische Ausrichtung der Endothelzellen konnte auch in den Versuchen dieser Arbeit in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Zudem scheinen Endothelzellen, die einer chronischen Exposition gegenüber Scherkräften ausgesetzt sind, besonders fest an ihrem Untergrund zu adhären⁶⁶, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass die EC auch nach 3 Tagen noch fest an den PU Grafts adhärten. Die verbesserte Adhäsion nach Fibronectinbeschichtung wird ebenso in der Literatur bestätigt: mehrere Studien beschreiben eine höhere Endothelzelladhäsion nach Fibronectin oder Vitronectinbeschichtung^{67,68}. Auch Gulbins et al. betonen die Bedeutung extrazellulärer Matrixproteine, vor allem Proteine der Basalmembran, für eine erfolgreiche Endothelzelladhäsion⁶⁹. Andere Autoren verwendeten weitere Matrixproteine (Kollagen und Heparin) zur Beschichtung von Titanoberflächen und konnten so auch eine effektivere Endothelialisierung erzielen⁷⁰. Zudem scheint eine Fibronectinbeschichtung von Biomaterialien günstige Auswirkungen auf die Inflamationsreaktion zu haben, was den Einsatz von Fibronectin auf PU umso mehr rechtfertigt.⁷¹ In der Literatur wird mehrfach bestätigt, dass eine Titanbeschichtung die Endothelzelladhäsion unter Strömung und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften fördert^{26,72,73}, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang steht: auf den titanisierten PU Grafts konnte die höchste Zelldichte nachgewiesen werden. Dennoch erstaunt es, dass die Endothelzellen derart gut adhärten. In verschiedenen Arbeiten ist beschrieben, dass sich Endothelzellen ablösen, wenn sie plötzlich einer pulsatischen Strömung ausgesetzt werden^{64,67,74}, und mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit Verfahren, den Zellverlust zu minimieren, z.B. durch eine Adaptationsphase mit geringem Volumenstrom^{74,75}. Zellkultur und Seeding unter kontinuierlichem Flow^{75,76} brachte ebenso Vorteile aufgrund der veränderten Synthese von ECM Proteinen (vor allem Kollagen III). Da die Ausbildung einer Basalmembran eine wesentliche Rolle für den Erhalt eines Endothelzelllayers spielt⁷⁷, führten Gulbins et al. ein Preseeding mit einer Kokultur aus Fibroblasten und Glattmuskelzellen durch, bevor sie Polyurethanoberflächen endothelialisierten.^{69,75} Sie erhielten dabei wesentlich bessere

Endothelzelladhäsion und –erhalt bei pulsatiler Strömung als bei einem isolierten Endothelzellseeding.⁶⁹ Dass in den Versuchen dieser Arbeit die Endothelzellen, mit Ausnahme der vorausgegangenen Fibronectinbeschichtung, ohne jegliche Unterstützung durch gerade genannte Methoden den Scherkräften standhielten und der Monolayer auch nach drei Tagen noch bestand, könnte verschiedene Ursachen haben: vielleicht war das lange Zeitintervall von 2h bevor der Flow angelegt wurde entscheidend, da in dieser Phase den Endothelzellen genug Zeit für eine feste Adhäsion und der Synthese von Matrixproteinen gegeben wurde. Es könnte aber auch sein, dass die Scherkräfte nicht so groß wie in den anderen Arbeiten waren. Leider konnte hier nur der Volumenstrom in ml/min und nicht die tatsächlich wirkende Scherkraft in dyn/cm² gemessen werden.

Die Ergebnisse zur Endothelzelladhäsion in der Perfusionsanlage sind vielversprechend für den Einsatz titanisierter Polyurethane als Gefäßersatz oder Pumpkammer ventrikulärer Unterstützungssysteme. Eine weitere Optimierung für den Einsatz könnte die Oberflächenmodifikation des Polyurethans sein: ein Fasernetzwerk, das den Kollagenfasern der Basalmembran ähnelt, wie es Gulbins et al. verwendet haben^{69,75}, kann die Endothelzelladhäsion begünstigen. Ebenso wird die in vivo Selbstbesiedelung der titanhaltigen Oberfläche durch im Blut zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPCs) ebenso eine Möglichkeit der Endothelialisierung sein.

Bei aller Euphorie muss natürlich berücksichtigt werden, dass alle Versuche in vitro durchgeführt wurden. Das verwendete Medium hat eine geringere Viskosität als Blut, ebenso fehlen die korpuskulären Anteile des Blutes, so dass die Scherkräfte, die auf die Endothelzellen in vivo wirken, deutlich höher sein dürften. Außerdem wurden die Versuche bei laminarer Strömung durchgeführt, wogegen in der Pumpkammer eines Kunstherzens turbulente Strömungen auftreten. Genauso wenig wurden die Wandspannung und die daraus resultierenden Scherkräfte, die z.B. in der Pumpkammer von VADs entstehen und auf die Endothelzelle wirken, berücksichtigt.

Erst in vivo Versuche werden uns zuverlässige Ergebnisse liefern, ob eine titanhaltige Beschichtung tatsächlich die Bedingungen für die Ausbildung eines permanenten Endothelzelllayers erfüllt und somit die Biokompatibilität von Polyurethan verbessert.

VII. Zusammenfassung

Der Einsatz von ventrikulären Unterstützungssystemen und Prothesen zum Gefäßersatz gewinnt zunehmend an Bedeutung. Poly(ether)urethan würde sich aufgrund seiner mechanischen und physikalischen Eigenschaften hervorragend als Material für die Konstruktion von VADs und vascular grafts eignen, allerdings offenbart PU als Oberfläche, die mit Blut in Kontakt steht, eine schwache Biokompatibilität. Inhalt dieser Arbeit war die Frage, ob durch eine titanhaltige Beschichtung die Biokompatibilität von PU gesteigert werden kann. Als Maß für die Biokompatibilität wurde nach der europäischen Norm ISO 10993-4 Endothelzelladhäsion, -wachstum und -stoffwechselaktivität herangezogen, zudem kamen Tests zur Adhäsion von Thrombozyten und PBMCs zum Einsatz. Dabei wurden die Versuche in statischer Kultur sowie in einer dynamischen Untersuchung in einer eigens dafür entwickelten Perfusionsanlage durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Titanisierung von PU die Proliferation von EC gefördert und deren Wachstumsverhalten beschleunigt wird, gleichzeitig wird durch die Titanisierung die Stoffwechselleistung der EC nicht beeinträchtigt. Sowohl auf reinem PU, als auch auf titanisiertem PU, adhären Thrombozyten und PBMC, allerdings konnte der in der Literatur beschriebene antithrombogene Effekt eines Endothelzellmonolayers in dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus zeigten EC, die auf titanisiertem PU kultiviert wurden, eine geringere Thrombogenität als EC auf blankem PU.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte eine Perfusionsanlage entwickelt und eine Methodik etabliert werden, mit der es gelang, dynamische Untersuchungen zur Endothelzelladhäsion unter pulsatiler Strömung durchzuführen. Hier zeigte sich, dass EC auf fibronectinbeschichteten PU Schläuchen bis zu 72 Stunden den Scherkräften einer pulsatilen Strömung standhalten konnten. Auch hier begünstigte die Titanisierung von PU Schläuchen die Adhäsion von EC und Ausbildung eines gleichmäßigen Endothelzellmonolayers.

Diese Arbeit zeigte, dass eine titanhaltige Beschichtung von PU mittels „plasma activated chemical vapour deposition“ (PACVD) die Biokompatibilität von PU verbessert und durch die erhöhte EC Adhäsion auf tiPU die Thrombogenität von PU reduziert wird. In vivo Versuche werden weiteren Aufschluss über den Einsatz von PU und titanbeschichtetem PU in biomedizinischen Anwendungen geben.

VIII. Literaturverzeichnis

¹ Lund LH, Matthews J, Aaronson K: Patient selection for left ventricular assist devices; *Eur J Heart Fail*. 2010 May;12(5):434-43

² Stehlik, Edwards, Kucheryavaya, Aurora, Christie, Kirk, Dobbel, Rahmel, Hertz: The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-seventh official adult heart transplant report—2010; *The Journal of Heart and Lung Transplantation* Volume 29, Issue 10, October 2010, Pages 1089-1103

³ Russell SD, Miller LW, Pagani FD: Advanced heart failure: a call to action; *Congest Heart Fail* 2008;14:316–321.

⁴ Slaughter, Rogers, Milano et al: Advanced Heart Failure Treatment with Continuous-Flow Left Ventricular Assist Devices; *The New England Journal of Medicine* 2009, 361:2241-51.

⁵ Deng, Marshall, Hertz et al: Mechanical Circulatory Support Device Database of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Third Annual Report—2005 *The Journal of Heart and Lung Transplantation*; Volume 24, Issue 9, September 2005, Pages 1182-1187

⁶ Tsukui, Abla, Teuteberg et al: Cerebrovascular accidents in patients with a ventricular assist device; *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:114-123

⁷ Gordon, Quagliarello, Lowy: Ventricular assist device-related infections; *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 426–37

⁸ Schmid Th, Schiller W, Liepsch D: A New Artificial Heart for Regeneration and Support of Severe Cardiac Insufficiency; PUBLIKATION DES DLR – KEINE ANGABE ZU EINER ZEITSCHRIFT ETC GEFUNDEN

⁹ Han, Park et al: In Vivo Biocompatibility of Sulfonated PEO-grafted Polyurethanes for Polymer Heart Valve and Vascular Graft; *Artificial Organs* 2006 30(12):955–968,

¹⁰ Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL: Biomaterialien —humane Toleranz und Integration. *Chirurg* 1999;70:847– 857

¹¹ Helsen JA, Breme HJ: *Metals as biomaterials*. Weinheim: Wiley; 1998

¹² Breme F, Buttstaedt J, Emig G: Coating of polymers with titanium-based layers by a novel plasma-assisted chemical vapor deposition process; *Thin Solid Films* 2000;377–378:755–759

¹³ N. Ozkucur, Wetzel, Hollstein, Richter, Funk, Monsees: Physical vapor deposition of zirconium or titanium thin films on flexible polyurethane highly support adhesion and physiology of human endothelial cells; *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008, 57-67

¹⁴ Karla Lehle, Johannes Buttstaedt, Dietrich E. Birnbaum Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitride; *J Biomed Mater* 65 A: 393-401, 2003

-
- ¹⁵ Guldner et al: The first self-endothelialized titanium-coated glutaraldehyde-fixed heart valve prosthesis within systemic circulation; *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:248-50
- ¹⁶ Guldner et al: Detoxification and Endothelialization of Glutaraldehyde-Fixed Bovine Pericardium With Titanium Coating: A New Technology for Cardiovascular Tissue Engineering; *Circulation* 2009;119;1653-1660
- ¹⁷ Toni Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; 2000; Seite 94
- ¹⁸ Toni Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; 2000; Seite 94
- ¹⁹ Toni Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; 2000; Seite 97
- ²⁰ Toni Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; 2000; Seite 97
- ²¹ Gallagher K. et al: *The Basic Science of Vascular disease*; Futura Publishing Company. Armonk, New York. 1997
- ²² Karla Lehle, Martin Stock, Thomas Schmid, Simon Schopka, Rainer H. Straub, Christof Schmid: Cell-Type Specific Evaluation of Biocompatibility of Commercially Available Polyurethanes; *Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 90B: 312–318, 2009
- ²³ Karla Lehle, Johannes Buttstaedt, Dietrich E. Birnbaum: Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitride; *J Biomed Mater* 65 A: 393-401, 2003
- ²⁴ N. Ozkucur, Wetzels, Hollstein, Richter, Funk, Monsees: Physical vapor deposition of zirconium or titanium thin films on flexible polyurethane highly support adhesion and physiology of human endothelial cells; *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008, 57-67
- ²⁵ Zeng Lin, In-Seop Lee, Yoon-Jeong Choi, In-Sup Noh, Sung-Min Chung: Characterizations of the TiO₂-x films synthesized by e-beam evaporation for endovascular applications; *Biomed. Mater.* 4 (2009) 015013
- ²⁶ Hardean E. Achneck et al: The biocompatibility of titanium cardiovascular devices seeded with autologous blood-derived endothelial progenitor cells EPC-seeded antithrombotic Ti implants; *Biomaterials* 32 (2011) 10-18
- ²⁷ Martinesi, Bruni et al: In vitro interaction between surface-treated Ti-6Al-4V titanium alloy and human peripheral blood mononuclear cells; *Wiley InterScience* 2005, 197 - 207
- ²⁸ Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL: *Biomaterialien — humane Toleranz und Integration*; *Chirurg* 1999;70:847– 857.

-
- ²⁹ Helsen JA, Breme HJ: *Metals as biomaterials*; Weinheim: Wiley; 1998.
- ³⁰ Long M, Rack HJ: Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective; *Biomaterials* 1998;19:1621–1639.
- ³¹ Ye, Johnson et al: Surface modification of a titanium alloy with a phospholipid polymer prepared by a plasma-induced grafting technique to improve surface thromboresistance; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74 (2009) 96–102
- ³² Stevens JM: Platelet Adhesion Assays under static conditions; *Methods of Molecular Biology* 2004;272:145-51
- ³³ Egan K, Crowley D, Smyth P, O’Toole S, Spillane C, et al: Platelet Adhesion and Degranulation Induce Pro-Survival and Pro-Angiogenic Signalling in Ovarian Cancer Cells; *PLoS ONE* 6(10): e26125. doi:10.1371/journal.pone.0026125 2011
- ³⁴ Schopka S. et al: Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: in vitro hemocompatibility assessment; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Jan;88(1):130-8.
- ³⁵ De Clerk LS et al: Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function; *Journal of Immunological Methods* 172 (1994) 115-124
- ³⁶ Monties JR, Dion I, Havlik P, Rouais F, Trinkl J, Baquey C: Cora rotary pump for implantable left ventricular assist device: biomaterial aspects; *Artificial Organs* 1997; 21: 730-4
- ³⁷ Yang Y, Franzen SF, Olin CL: In vivo comparison of hemocompatibility of materials used in mechanical heart valves; *J Heart Valve Dis* 1996; 5: 532-7.
- ³⁸ M.C. Deng, L.B. Edwards, et al. Annual report 2005, *J. Heart Lung Transplant.* 24 (2005) 1182.
- ³⁹ J. Jahanyar et al: Annual report 2007; *J. Heart Lung Transplant* 26 (2007) 200.
- ⁴⁰ Hong, Andersson, Nilsson, Ekdahl: Titanium Is a Highly Thrombogenic Biomaterial: Possible Implications for Osteogenesis; *Thromb Haemost* 1999; 82: 58–64
- ⁴¹ Gorbet, M.B.; Sefton, M.V: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes; *Biomaterials* 2004, 25, 5681–5703.
- ⁴² Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, Smith BR: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion;. *Blood* 1992;79:1201–5.
- ⁴³ Gawaz M, Bogner C: Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet leukocyte interactions during hemodialysis; *J Clin Invest* 1994;72:424–9.
- ⁴⁴ May, Neumann, Gavaz , Ott , Walter: Reduction of monocyte–platelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation; *Eur Heart J* 1997;18:1913–20.
- ⁴⁵ Schopka, Schmid T., Schmid C, Lehle: Current Strategies in Cardiovascular Biomaterial Functionalization; *Materials* 2010, 3, 638-655

-
- ⁴⁶ Budd JS, Allen KE, Hartley G, Bell PR: The effect of preformed confluent endothelial cell monolayers on the patency and thrombogenicity of small calibre vascular grafts; *Eur J Vasc Surg.* 1991 Aug;5(4):397-405.
- ⁴⁷ Sarkar, Sales, Hamilton, Seifalian: Addressing Thrombogenicity in Vascular Graft Construction; *Biomater* 82B: 100–108, 2007
- ⁴⁸ Sedelnikov N, Cikirikicioglu M, Osorio-Da Cruz S: Titanium coating improves neo-endothelialisation of ePTFE grafts; *Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;54(suppl 1):83–115.
- ⁴⁹ K. K. Wu, Thiagarajan: Role of Endothelium in Thrombosis and Hemostasis; *Annu. Rev. Med.* 1996. 47:315–31
- ⁵⁰ Fischer Markus: Thrombozytenassays im Vergleich; Bachelorarbeit im Labor der HTC Regensburg 2011
- ⁵¹ Vogler E.A.; Siedllecki C.A: Contact activation of blood plasma coagulation; *Biomaterials* 2009, 30, 1857–1869.
- ⁵² Alison, McGuigan A., Sefton, M: The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity; *Biomaterials* 2007, 28, 2547–2571.
- ⁵³ Nomura S, Komiyama Y: Shear stress and platelet-derived microparticles; *Rinsho Byori.* 1997 Oct;45(10): 927-33.
- ⁵⁴ Yin W, Shanmugavelayudam SK, Rubenstein DA: The effect of physiologically relevant dynamic shear stress on platelet and endothelial cell activation; 2011 Mar;127(3):235-41
- ⁵⁵ Ratner B.D: The blood compatibility catastrophe; *J. Biomed. Mater Res.* 1993, 27, 283–287.
- ⁵⁶ Huang-Chi Chen: Bioreactors for tissue engineering; *Biotechnol Lett* (2006) 28:1415–1423
- ⁵⁷ Sodian et al: Tissue-Engineering Bioreactors: A New Combined Cell-Seeding and Perfusion System for Vascular Tissue Engineering; *Tissue engineering* Volume 8, Number 5, 2002 863-70
- ⁵⁸ Engbers-Buijtenhuijs et al: Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor; *Biomaterials* 27 (2006) 2390–2397
- ⁵⁹ Hörstrup et al: Tissue engineering of small caliber vascular grafts; *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001 Jul;20(1):164-9.
- ⁶⁰ Gulbins, Dauner, Petzold, Goldemund, Anderson, Doser: Development of an artificial vessel lined with human vascular cells; *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2004, 372-77
- ⁶¹ Schreml S: Antiproliferative und antiinflammatorische Aktivität von mTOR Inhibitoren; Inaugural Dissertation, Universität Regensburg 2008; S. 78,79
- ⁶² Klein CL, Bittinger F, et al: Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3 Effects of cytokines on the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages; *Pathobiology* 1995; 63pp. 83-92

-
- ⁶³ Chen CS, Mrksich M, et al: Geometric control of cell life and death; *Science* 1997; 276:1425– 1428.
- ⁶⁴ Giudiceandrea, Seifalian, Krijgsman, Hamilton: Effect of prolonged pulsatile shear stress in vitro on endothelial cell seeded PTFE and compliant polyurethane vascular grafts; *Eur J Vascular; Endovascular Surgery* 15, 147-154, 1998
- ⁶⁵ Yi-Shuan J. Li, Jason H. Haga, Shu Chien: Review: Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells; *Journal of Biomechanics* 38 (2005) 1949–1971
- ⁶⁶ Ballerman, Dardik, et al: Shear stress and the endothelium; *Kidney International*, Vol. 54, Suppl. 67 (1998), pp. S-100 –S-108
- ⁶⁷ Consigny, Vitali: Resistance of Freshly Adherent Endothelial Cells to Detachment by Shear Stress is Matrix and Time dependent; *JVIR* 1998; 9:479-485
- ⁶⁸ Xiao L, Shi D: Role of precoating in artificial vessel endothelialization; *Chinese Journal of Traumatology*, 2004, 7: 321-6
- ⁶⁹ Gulbins, Dauner, Petzold, Goldemund, Anderson, Doser: Development of an artificial vessel lined with human vascular cells; *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2004, 372-77
- ⁷⁰ Chen Jialong et al: Collagen/heparin coating on titanium surface improves the biocompatibility of titanium applied as a blood-contacting biomaterial; *Journal of biomedical materials research* 2010 341-49
- ⁷¹ Guicai Li et al; An in vitro evaluation of inflammation response of titanium functionalized with heparin/fibronectin complex; *Cytokine* 56 (2011) 208–217
- ⁷² Jantzen, Lane et al: Autologous Endothelial Progenitor Cell-Seeding Technology and Biocompatibility Testing For Cardiovascular Devices in Large Animal Model; *Journal of Visual Experiments*. (55), e3197, DOI : 10.3791/3197; 2011
- ⁷³ Cikirikcioglu M, Sedelnikov N, et al: Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating; *Int J Artif Organs*. 2006 Oct;29(10):990-9.
- ⁷⁴ Ott MJ, Ballermann BJ: Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: Improved cell adherence in response to in vitro shear stress; *Surgery* 1995; 117:334-9
- ⁷⁵ Gulbins, Pritisanac, Petzold, Goldemund, Doser, Dauner: A Low Flow Adaptation Phase improves shear Stress resistance of artificially seeded Endothelial cells; *Thoracic Cardiovascular Surgery* 2005, 53: 96-102
- ⁷⁶ Rademacher A, Paulitschke M, Meyer R, Hetzer R: Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes; *Int J Artif Organs*. 2001 Apr;24(4):235-42.
- ⁷⁷ Grant DS, Kleinmann HK, Martin GR: The role of the basement membranes in vascular development; *Ann NY Acad Sci* 1990; 588: 61-72

IX. Veröffentlichungen

IX.1. Poster



Biofunctionalization of ventricular assist devices



Sebastian Riescher¹, Simon Schopka¹, Matthias Grzeski², Thomas Schmid², Britta Girndt³,
Christof Schmid¹, Karla Lehle¹

¹ Dept. of Cardiothoracic Surgery, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

² German Aerospace Center, Institute of Robotics and Mechatronics, Robotik und Mechatronik Robot Systems, Oberpfaffenhofen-Messling, Germany

³ GE Medical Technologies GmbH, Nürting, Germany

INTRODUCTION

Poly(ether)urethane (PUR) is main component of pump chambers of implantable ventricular assist devices (VAD). The main risk factor are thromboembolic reactions due to activation of the coagulation and fibrinolytic system. Coverage of the surfaces with vascular cells increased biofunctionalization. Therefore, *in vitro* endothelialization of PURs was used to evaluate the biocompatibility of the materials for future improvement of blood compatibility and to long-term application of the devices.

METHODS

Eight commercially available PURs were examined with regard to their mechanical flexibility. Cultures of human saphenous vein endothelial cells (HSVEC) were applied to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and thrombogenicity of the polymeric material and of a surface modified PUR coated with titaniumcarboxonitride. Tissue-cultured polystyrene (TCP) was used as a reference.

RESULTS

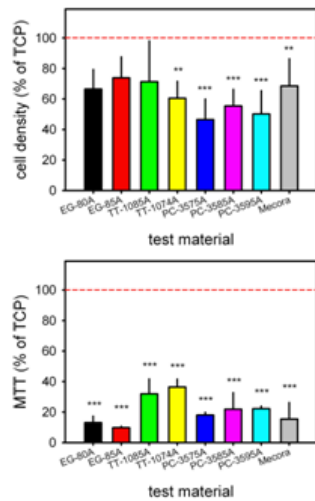


Figure 1: Incomplete coverage and limited mitochondrial activity of HSVEC seeded onto different PUR test materials. ** p<0.01, *** p<0.001 compared to TCP (red line).

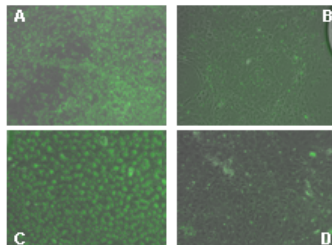


Figure 5: Adhesion of thrombocytes (stained with Calcein-AM).
(A) Aggregation of thrombocytes onto titanium-coated Meocora.
(B) Single thrombocytes bind on the surface of HSVEC seeded onto titanium-coated Meocora.
(C) Aggregation of thrombocytes onto titanium-coated Meocora.
(D) Single thrombocytes bind on the surface of HSVEC seeded onto titanium-coated Meocora.

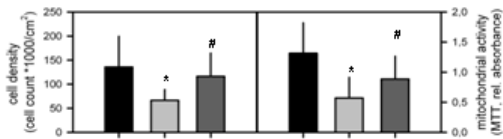


Figure 2: Titanium-coating of PUR (titanium-coated Meocora) significantly increased cell density and mitochondrial activity of HSVEC. TCP was used as a positive control. * p<0.05 compared to TCP; # p<0.05 comparing titanium-coated and titanium-coated Meocora.

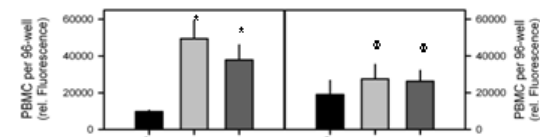


Figure 3: Adhesion of peripheral mononuclear blood cells (PBMC) was maximal on Meocora. Coverage of titanium-coated and titanium-coated Meocora significantly reduced PBMC adhesion (p<0.05). * p<0.05 compared to TCP.

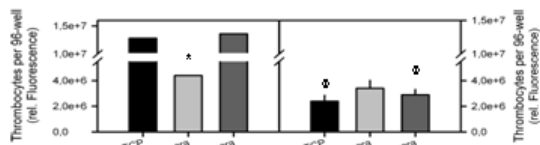


Figure 4: Adhesion of thrombocytes was maximal on TCP and titanium-coated Meocora. Coverage of TCP and titanium-coated Meocora with HSVEC significantly reduced adhesion of thrombocytes (p<0.05). * p<0.05 compared to TCP.

CONCLUSION

Medical degraded PUR impeded EC seeding. Titanium-coating might be an opportunity to reduce cytotoxicity and thrombogenicity of PUR without affecting flexibility of the materials.

IX.2. Publikation

Original Research paper:

Title: Titaniumcarboxonitride layer increased biocompatibility of medical polyetherurethanes

Authors: Sebastian Riescher^a, Daniel Wehner^b, Thomas Schmid^b, Hanngoerg Zimmermann^c, Björn Hartmann^c, Christof Schmid^a, Karla Lehle^{a*}

Affiliation:

^aDepartment of Cardiothoracic Surgery, University Medical Centre Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93042 Regensburg, Germany.

^bDualis Medtech GmbH, Am Technologiepark 8+10, 82229 Seefeld, Germany.

^cpfm medical titanium gmbh, Hoefener Str. 45, 90431 Nürnberg, Germany.

Correspondence to: * Karla Lehle, PhD
phone: +49-(0)941-944-9901
fax: +49-(0)941-944-9902
e-mail: karla.lehle@ukr.de

Support: The study was supported by EFRE, European funds for regional development, Bavarian, Germany

1

INTRODUCTION

Polyetherurethane (PEU) is widely used for biomedical applications because of its excellent mechanical properties, high elongation capacity, good abrasion resistance, high flexibility, and good biocompatibility.¹⁻⁴ Despite its successful short-term results using PEUs in different blood-contacting biomedical devices, such as vascular prosthesis, heart valves, cardiac assist devices, and the total artificial heart, the long-term biostability and induction of surface-induced thrombosis, protein fouling, and cytocompatibility are still major problems in vivo application.^{1,5,6}

In order to improve the blood compatibility of hydrophobic PEU, lots of modification strategies have been developed. (1) Creation of antithrombogenic surface modifications to suppress protein adsorption, platelet adhesion, and platelet activation.^{7,8} (2) Creation of surface modification to increase adhesion and retention of endothelial cells (EC), the natural non-thrombogenic lining of blood vessels and the heart.⁹ A recent approach to improve biocompatibility of polymers for biomedical applications is titanium (Ti) coating.¹⁰⁻¹³ Thin films of titaniumcarboxonitride on different polymer surfaces maintained flexibility of the polymer and supported EC adhesion and sustained anti-inflammatory function of the cells.¹¹

In this study, plasma-activated chemical vapor deposition (PACVD) technique was used to coat PEU surfaces with a Ti-based layer.¹⁴ Human EC were used to study cell adhesion, proliferation, metabolic activity as well as anti-inflammatory and anti-thrombogenic properties of the cells grown onto PACVD-coated PEU under static culture conditions. In addition, cell adhesion and stability of the EC monolayer under shear stress was analyzed using a pulsatile bioreactor.

3

ABSTRACT:

Polyetherurethane (PEU) is in use for blood-contacted devices due to its excellent mechanical properties. However, poor hemocompatibility of the hydrophobic material required surface modification or endothelialization. To increase the biocompatibility of PEU, the polymer was coated with a titaniumcarboxonitride (Ti(C,N,O)) layer by a plasma-activated chemical vapor deposition (PACVD) process. Biocompatibility of titaniferously coated PEU was verified using static and dynamic cell culture techniques. Titaniferous coating significantly improved proliferation and mitochondrial activity of human endothelial cells on PEU. These cells captured significantly less mononuclear cells and platelets. Under shear stress for up to 72 hours, titaniferous coating increased endothelial cell adhesion, spreading, and cell density to form an organized monolayer covering the whole luminal surface of vascular PEU grafts. In summary, coating of PEU surfaces with titaniumcarboxonitride might be a promising strategy to improve the biocompatibility of biomedical biomaterials.

Words: 138

Keywords: endothelial cell seeding, platelet adhesion, bioreactor, tissue engineering, titanium

2

MATERIALS AND METHODS

Test samples

Discs (area, 0.3 cm²) of an aromatic polyether-based thermoplastic polyurethane foil (Texin 985; Bayer, Leverkusen, Germany) were coated with a thin (50-80 nm) titaniumcarboxonitride layer (TiPEU) by plasma-activated chemical vapour deposition (PACVD) (pfm medical titanium, Nürnberg, Germany).¹¹ The composition of the Ti(C,N,O) layer was analyzed by XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy; Sage 100, SPECS, Berlin, Germany) (Figure 1). Test samples were washed with ethanol (70%) and sterile isotonic phosphate buffer saline (PBS), placed on the bottom of wells from a 96-well microplate (Nunc®, Wiesbaden, Germany), and fixed with sterile steel rings. Tissue-cultured polystyrol (TCP) (Nunc) was used as a reference.

EC proliferation

Isolation and cultivation of human saphenous vein EC (HSVEC) and human umbilical vein EC (HUVEC) was described in detail earlier.¹¹ Informed consent was obtained from cell donors and the protocol was approved by the local human ethics committee (no. 99/133). EC were seeded (5000 cells per 0.3 cm²) on fibronectin-coated (10 µg/ml; Merck, Darmstadt, Germany) test samples. Growth medium with serum (GMS, Medium 199, 10% fetal calf serum, L-Glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Austria), Supplement Pack (PromoCell, Heidelberg, Germany)) was exchanged after 1, 3 and 5 days. Cells were harvested on days 3, 5 and 7, and counted with an automatic cell counter (CASY-TTC, Roche, Mannheim, Germany).

Cytotoxicity

Mitochondrial activity of EC was measured on day 7 using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide] test (MTT, Promega,

4

Madison, WI) according to manufacturers instructions. The ratio of MTT absorbance and respective cell count described the mitochondrial activity per single cell.

Platelet adhesion

Platelet adhesion was measured according to Stevens.¹⁵ Briefly, human citrated venous blood was drawn from male healthy volunteers with written consent as per institutional ethics guidelines (no. 10-101-0159). Platelets were stained with calcein-acetomethylester (calcein-AM; stock solution: 1 mg/mL in DMSO; working concentration: 5 µg/mL; Molecular probes, Eugene, OR), counted (Neubauer Haemocytometer), resuspended in RPMI 1640 (PANBiotec, Aidenbach, Germany), and colocalized with endothelialized test samples for 30 min. Half of endothelialized test samples were additionally treated with tumor necrosis factor (TNF, 10 ng/mL; tebu-bio, Offenbach, Germany). After 4 h, test samples were washed with phosphate buffer saline (PBS), lysed with 1% triton X-100 (Biorad, Hercules, CA), and frozen overnight before the fluorescence intensity (385/535 nm) was measured using the Wallac 1420 Victor 3TM Plate Reader (PerkinElmer, Boston, MA). The amount of adherent platelets was estimated using a standard curve. In another experimental set up, calcein-AM-labeled platelets that adhered onto an EC monolayer were fixed with paraformaldehyde (40 mg/l, Merck, Darmstadt, Germany) and visualized by fluorescence microscopy (Fluovert FU; Leitz, Wetzlar, Germany).

Adhesion of PBMC

Fresh venous blood from adult healthy volunteers was collected in EDTA tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll-Paque™ (1.073 g/mL; GE Healthcare, Uppsala, Sweden),¹⁶ stained with calcein-AM and

colocalized with endothelialized test samples (see above). The fluorescence intensity of lysed cells was correlated with cell count.

Evaluation of biocompatibility using a pulsatile perfusion bioreactor

A novel bioreactor (DUALIS Medtech, Seefeld, Germany) (Figure 2) was used to evaluate the effect of shear stress on EC adhesion seeded onto synthetic vascular grafts made of PEU (Elastollan® 1180A; BASF, Ludwigshafen, Germany; length, 10 cm; inner diameter, 5 mm; wall thickness, 0.5 mm). PEU grafts were additionally coated with a Ti(C,N,O) layer (pfm medical titanium) (tiPEU). A pulsatile flow of GMS (filling volume of the bioreactor, 220-250 ml) is generated by the periodic expansion of the membrane in the blood pump which is inflated and deflated by an air pump. An outlet and an inlet valve in the medium reservoir bottle and the compliance bottle, respectively, allow sterile filling of the system and medium exchange. The whole construction is fixed onto a rotating aluminum board which allows a 360° rotation, driven by an electric motor. The construction can be sterilized with ethylene oxide. The bioreactor was located within a standard humidified incubator (5% CO₂, 37°C).

EC were propagated as described above. EC (2-6e6) were resuspended in 2 ml of GMS and added into the fibronectin-coated (10µg/ml) PEU grafts. Subsequently, the rotating aluminum board was rotated (360°; 5 arrest points; arrest time, 4 min). That means the system moves 72° every 4 minutes. In some experiments, half of the grafts were disconnected after 2 h of seeding to prove cell adhesion (see below). The remaining grafts were perfused with a pulsatile flow for 12 h (volume flow rate, 230ml/min) accompanied by approval of cell adhesion. Other experiments were done with a perfusion time of 72 hours.

5

6

EC adhesion was proven after DAPI- (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochloride) staining and verification of fluorescence intensity using a fluorescence microscopy (Fluovert FU; Leitz). Endothelialized PEU grafts and tiPEU grafts were removed from the bioreactor, fixed with paraformaldehyde (40 mg/l), and the nuclei were stained with DAPI. The grafts were separated into pieces of 1 cm of length, opened longitudinally and fixed on a glass slide. The nuclei of the adherent cells were visualized with the fluorescence microscope (10 x magnifications). The fluorescence intensity of stained nuclei was measured and verified using the open source software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). A standard curve was generated (correlation of fluorescence intensity and counted nuclei per microscopic field).

Statistics

Data were presented as mean ± standard deviation (SD), and analyzed with the Wilcoxon-Signed-Rank-Test (Sigma-Stat, SPSS, Chicago, IL) after passing the Friedman-Test (Sigma-Stat, SPSS, Chicago, IL). *p* values ≤ 0.05 were considered significant. All analyses in the static cell culture were done with six different cultures in quadruplicate. The amount of experiments in the dynamic setting was specified in the respective data presentation.

RESULTS

Biocompatibility of non-coated (PEU) and titaniferously coated (tiPEU) PEU test samples was analyzed using both static and dynamic cell culture techniques.

In vitro endothelialization under static conditions

EC proliferated on PEU and tiPEU (Figure 3). As expected for the reference material, maximum cell growth was seen on TCP. Cell growth on PEU was delayed up to day

5 accompanied by cell doubling within the next 2 days (*p*≤0.05). EC seeded onto tiPEU propagated more rapidly than the same cells adhered to PEU. Cell density on tiPEU increased significantly from day 3 to day 5 by a factor of 3.8 ± 0.9 and 6.1 ± 1.0 (*p*≤0.001), respectively. On day 7, all cultures seeded onto TCP and tiPEU presented a confluent monolayer without significant differences in cell density. In contrast, the amount of EC detected on PEU was about half of the cell count determined on tiPEU. Thus, the Ti(C,N,O) layer accelerated proliferation of EC on PEU.

The total mitochondrial activity per culture area (0.3 cm²) was shown in Figure 4. The highest turnover was documented for EC grown onto TCP. The mitochondrial activity was significantly reduced for adherent cells on PEU (*p*≤0.05). Additional titaniferous coating of PEU significantly improved mitochondrial activity (*p*≤0.05). However, despite significant differences in mitochondrial activity of the totality of adhered cells, the MTT absorbance per single cell was unchanged with respect to the underlying biomaterial (*p*=0.069) (Figure 5).

Adhesion of stained platelets and PBMC indicates increased thrombogenicity and inflammatory responsiveness of EC, respectively. As shown in Figure 6, a confluent monolayer of EC grown onto PEU as well as onto tiPEU prevented adhesion of platelets. Test material without an EC layer increased platelet adhesion and aggregation. Titaniferous coating alone could not prohibit platelet activation. EC grown onto PEU captured by a factor of 2.2 ± 1.1 significantly more platelets than adherent EC on tiPEU (*p*=0.028) (Figure 7A). Incubation of EC with TNF-α resulted in a significant increase in platelet adhesion (*p*≤0.05). Comparable data were shown in Figure 7B representing the amount of PBMC per single EC. EC grown onto PEU

captured significantly more PBMCs than adherent EC on tiPEU. Titaniferous coating reduced the number of adhered PBMC by 47%.

in vitro endothelialization under pulsatile flow

Seeding efficacy after 2 h was shown in non-coated and fibronectin-coated PEU grafts (n=6 each). Fibronectin-coating did not improve median cell density at the end of cell seeding time (median (25th/75th percentile); PEU, 1.4 (1.2/1.8) × 10⁵ EC/cm²; fibronectin-coated PEU, 1.8 (1.4/2.4) × 10⁵ EC/cm²; not significant). Independent of PEU coating, cell density remained unchanged after induction of shear stress of about 12 h of pulsatile flow (median (25th/75th percentile); PEU, 1.1 (0.6/1.6) × 10⁵ EC/cm²; fibronectin-coated PEU, 1.3 (0.7/2.0) × 10⁵ EC/cm²; not significant). However, EC seeded onto fibronectin-coated PEU grafts showed a homogeneous distribution over the inner surface of the grafts.

The next set of experiments analyzed the impact of additional coating with titaniumcarboxonitrid. As shown in Figure 8A, after 12 h of perfusion EC were uniformly distributed over the inner surface of each graft. However, after quantification of the fluorescence intensity of DAPI-stained nuclei of adherent cells (Figure 8B) lowest cell density was measured on non-coated PEU grafts. Furthermore, neither fibronectin-coating nor titaniferous coating alone improved cell density. Only the combination of titaniferous coating and fibronectin-coating significantly increased the cell density after 12 h of pulsatile flow (p<0.001). All further experiments were done with fibronectin-coated grafts.

To verify the stability of EC integrity under shear stress conditions the time of pulsatile flow was prolonged from 12 h to 72 h. Representative samples of endothelialized PEU grafts and tiPEU grafts are shown in Figure 9A. On day 3 after

9

films.²⁴ The ratio of absorbed proteins increased 7 times as the thickness of titanium oxide film was increased from several nm to 200 nm by anodic oxidation processes accompanied by a decrease in platelet adhesion.²⁵ The PACVD technology produced very thin layers¹¹ containing titanium and oxygen that were obviously too thin to prevent platelet adhesion. Nevertheless, an intact EC monolayer grown onto a titaniferously coated PEU has the best potential to prevent platelet adhesion and to suppress inflammatory responses. Comparable results were presented by Achneck and coworkers.²¹ Few platelets were observed adhering to the EPC-coated titanium surfaces, whereas >590-fold more platelets adhered to uncoated titanium surfaces. We speculated that bare PEU contributes to a higher level of EC activation that increased the expression of prothrombotic factors like tissue factor (TF) and adhesion molecules.²⁶ often prevented long-term stability.

However, the completeness and stability of the EC layer is a prerequisite for its anti-thrombogenicity. Shear stress often induced loss of EC integrity accompanied by detachment from the graft surface. Any denuded areas on the luminal surface of vascular grafts may lead to thrombus formation via platelet deposition and activation.^{27,28} To further evaluate the strength of the EC adhesion onto titaniferously coated PEUs, human EC adhered on non-coated and titaniferously coated small-diameter vascular grafts were submitted to pulsatile shear stress for long-term using a new designed bioreactor. While lowest cell density was measured on non-coated grafts, the combination of titaniferous coating and fibronectin-coating presented a synergistic effect on the stability of the adherent EC monolayer. The resistance of the EC coverage under pulsatile flow conditions remained high up to 72 hours. However, while adherent EC on titaniferously coated grafts were uniformly distributed, EC

11

seeding, inner surface of both PEU grafts and tiPEU grafts were covered with a confluent monolayer of EC. However, while adherent EC on tiPEU grafts were uniformly distributed, EC seeded onto PEU grafts partially formed cell aggregates accompanied by partial detachment of the cells. Comparing fluorescence intensity of DAPI-stained nuclei of EC seeded onto PEU grafts and tiPEU grafts presented a significant higher cell density on tiPEU grafts (p=0.031) (Figure 9B).

DISCUSSION

This study evaluated bio- and hemocompatibility of aromatically PEUs coated with titaniumcarboxonitride. Static and dynamic cell culture methods were used according to ISO requirements.¹⁹

Both, non-coated and titaniferously coated PEU fulfilled biomedical classification according to ISO requirements. However, titaniferous coating accelerated EC adhesion, proliferation and mitochondrial activity. A variety of experimental studies approved the increased proliferative capacity of EC grown onto titanium surfaces.^{11,13,20-23} The striking diagnosis of an accelerated cell adhesion onto titaniferously coated surfaces might be advantageous in the clinical setting. Achneck and coworkers²¹ speculated that accelerated adhesion of blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) onto non-functionalized titanium has the distinct advantages of avoiding activation of the coagulation cascade as well as potential sensitization of the immune system against foreign material.

While titaniferous coating of PEUs could not prevent platelet aggregation the complete coverage with human EC increased anti-thrombogenicity as shown in our *in vitro* test. Blood compatibility of titanium derives from the quality of titanium oxide

10

seeded onto bare grafts partially formed cell aggregates. Other experimental studies approved our data on the resistance to shear forces.^{29,30} Similar strong adhesion has been described for human EC and human EPCs grown on smooth muscle cells,³¹ as well as fibronectin-precoated surfaces.³² Achneck and coworkers²¹ found that the very smooth titanium surface provides for excellent EPC adhesion under physiologic and supraphysiologic shear stresses. Lin and coworkers³⁰ recently described an increase in cellular activity of porcine aortic smooth muscle cells as a function of increased oxygen content of titanium surfaces synthesized by electron-beam evaporation at different flow rates. Surface structuring as well as incorporation of EC binding molecules might improve EC integrity and accelerate *in vivo* EPC adhesion onto vascular grafts.²¹ Electrospinning was one option to increase surface/volume ratio, porosity with interconnected channels, and microstructures similar to the extracellular matrix of human tissues that allowed stable anchorage of individual EPCs.³³ Additional immobilization of an Arg-Gly-Asp-peptide promoted EC proliferation on an electrospun matrix of PU.³⁴

Our study has several limitations. We used primary human EC instead of blood-derived EPCs that might be an ideal cell type to demonstrate *in vivo* endothelialization of implantable cardiovascular devices.²¹ Furthermore, additional surface modifications might also improve stability of the EC layer.

The anti-thrombotic properties and improved biocompatibility of nanocoating with titanium using PACVD technique were already shown in different animal studies.³⁵⁻³⁹ Heavyweight titaniferously coated polypropylene meshes as well as silicone implants induced a less pronounced foreign body reaction compared to identical non-coated materials.^{35,36} Furthermore, titanium coating of clinically approved cardiovascular patches made of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) enhanced the retention

12

of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells and thus offers a potential cell delivery system for the repair of the damaged myocardium.³⁷ Finally, titanium nanocoating on glutaraldehyde-fixed bovine pericardium prevented immunorejection and created the first self-seeded glutaraldehyde-fixed biological heart valve within the circulation under arterial pressure.^{38,39} Future animal studies might prove the increased hemocompatibility of titaniferously coated PEUs as blood-contacting devices.

CONCLUSION

Titaniferous coating of commercially available biomedical-grade PEUs using PACVD technique is a suitable method to improve endothelialization of blood-contacting devices. However, non-endothelialized titaniferously coated PEU surfaces are per se not anti-thrombogenic. Only improvement of surface properties to allow strong adhesion of human EC with a high resistance to shear forces increased blood compatibility of the flexible PEUs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Sara Bergmann, Christina Leykauf and Katrin Bielenberg.

REFERENCES

- Ajili SH, Ebrahimi NG, Soleimani M. Polyurethane/polycaprolactone blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants. *Acta Biomater.* 2009;5:1519-1530.

13

- Lehle K, Buttstaedt J, Birnbaum DE. Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitride. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65:393-401.
- Lehle K, Lohn S, Reinert GG, Schubert T, Preuner JG, Birnbaum DE. Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride in vivo. *Biomaterials.* 2004;25:5457-5466.
- Ozkucur N, Wetzel C, Hollstein F, Richter E, Funk RH, Monsees TK. Physical vapor deposition of zirconium or titanium thin films on flexible polyurethane highly support adhesion and physiology of human endothelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2009;89:57-67.
- Breme F, Buttstaedt J, Emig G, Doser M, Mueller E, Planck H. Improvement of bio- and bloodcompatibility of polymers by PACVD. In: Stallforth H, editor., *Materials for medical engineering 2.* New York: Wiley-VCH; 1999. p 155
- Stevens JM. Platelet adhesion performed under static conditions. *Methods Mol Biol* 2004;272:145-151.
- Sozzani S, Vecchi A, Allavena P, Maulovani A. Chemotaxis and interaction with vascular or lymphatic endothelium. *Methods Mol Biol* 2004;239:1-16.
- Klopsch C, Steinhoff G. Tissue-engineered devices in cardiovascular surgery. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):44-52.
- Lehle K, Stock M, Schmid T, Schopka S, Straub R, Schmid C. Cell-type specific evaluation of biocompatibility of commercially available polyurethanes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90:312-318.
- Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009). Beuth Verlag, Berlin

15

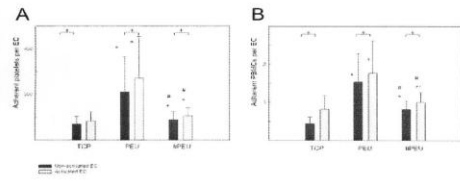
- Leiah MD, Grasel TG, Pierce JA, Cooper SL. Ex vivo interactions and surface property relationships of polyetherurethanes. *J Biomed Mater Res.* 1986;20:433-468.
- Hergenrother RW, Wabers HD, Cooper SL. Effect of hand segment chemistry and strain on the stability of polyurethanes: in vivo biostability. *Biomaterials.* 1993;14:449-458.
- Puskas JE, Chen Y. Biomedical application of commercial polymers and novel polyisobutylene-based thermoplastic elastomers for soft tissue replacement. *Biomacromolecules.* 2004;5:1141-1154.
- Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;74:570-581.
- Khandwekar AP, Patil DP, Hardikar AA, Shouche YS, Doble M. In vivo modulation of foreign body response on polyurethane by surface entrapment technique. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95:413-423.
- Olsson P, Sanchez J, Molines TE, Riesenfeld J. On the blood compatibility of end-point immobilized heparin. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2000;11:1261-1273.
- Lens JP, Terlingen JG, Engbers GH, Feijen J. Preparation of heparin-like surfaces by introducing sulfate and carboxylate groups on poly(ethylene) using an argon plasma treatment. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9:357-372.
- McGuigan AP, Sefton MV. The influence of biomaterials on endothelial cell thromboogenicity. *Biomaterials* 2007;28:2547-2571.
- Yan JY, Cooke FW, Vaskelis PS, von Recum AF. Titanium-coated Dacron velour: a study of interfacial connective tissue formation. *J Biomed Mater Res.* 1989;23:171-189.

14

- Lin Z, Lee IS, Choi YJ, Noh IS, Chung SM. Characterizations of the TiO₂(2-x) films synthesized by e-beam evaporation for endovascular applications. *Biomed Mater.* 2009;4:015013.
- Achneck HE, Jamiolkowski RM, Jantzen AE, Hasetline JM, Lane WO, Huang JK, Galinat LJ, Serpe MJ, Lin FH, Li M, Parikh A, Ma L, Chen T, Sileshi B, Milano CA, Wallace CS, Stabler TV, Allen JD, Truskey GA, Lawson JH. The biocompatibility of titanium cardiovascular devices seeded with autologous blood-derived endothelial progenitor cells: EPC-seeded antithrombotic Ti implants. *Biomaterials.* 2011;32:10-18.
- Breithaupt-Faloppa AC, de Lima WT, Oliveira-Filho RM, Kleinheinz J. In vitro behaviour of endothelial cells on a titanium surface. *Head Face Med.* 2008;4:14.
- Yeh HI, Lu SK, Tian TY, Hong RC, Lee WH, Tsai CH. Comparison of endothelial cells grown on different stent materials. *J Biomed Mater Res A.* 2006;76:835-841.
- Huang N, Yang P, Leng YX, Chen JY, Sun H, Wang J, Wang GJ, Ding PD, Xi TF, Leng Y. Hemocompatibility of titanium oxide films. *Biomaterials.* 2003;24:2177-2187.
- Sunny MC, Sharma CP. Titanium-protein interaction: changes with oxide layer thickness. *J Biomater Appl.* 1991;6:89-98.
- Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 1996;47:315-331.
- Roald HE, Barstad RM, Bakken IJ, Roald B, Lyberg T, Sakariassen KS. Initial interactions of platelets and plasma proteins in flowing non-anticoagulated human blood with the artificial surfaces Dacron and PTFE. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994;5:355-363.

16

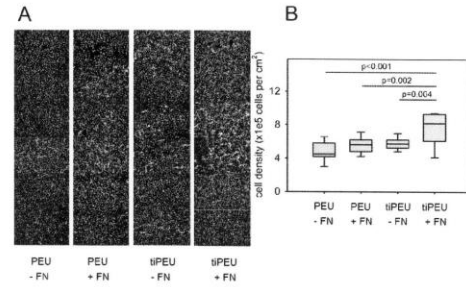
Figure 7:



Adhesion of platelets (A) and peripheral mononuclear cells (PBMC) (B) on human endothelial cells grown onto TCP, PEU and titaniferously coated PEU (tiPEU). Endothelial cells (EC) were stimulated with tumor necrosis factor (activated EC) or incubated with medium alone (non-activated EC), and then coincubated with Calcein-AM-stained platelets and PBMCs, respectively. Fluorescence intensity of adherent platelets and PBMCs was converted into real cell count (using a separate standard curve). Cell count of adherent platelets and PBMCs was divided by respective cell count of underlying EC. Data are presented as mean with standard deviation. Statistical analysis included comparison of test material (PEU or tiPEU) vs. TCP (*, $p=0.028$), and PEU vs tiPEU (#, $p=0.028$), and finally, activated vs non-activated EC (+, $p=0.028$).

25

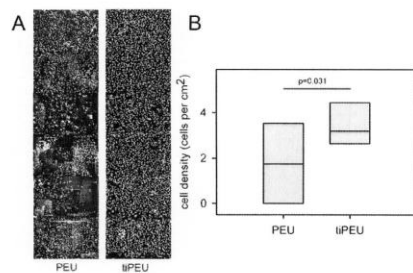
Figure 8:



EC adhesion on 4 different PEU grafts after 12h pulsatile flow (230ml/min). EC (6×10^6 EC per graft) were seeded in non-coated PEU grafts (PEU-FN), fibronectin-coated PEU grafts (PEU+FN), titaniferously coated PEU grafts (tiPEU-FN) and fibronectin-coated tiPEU grafts (tiPEU+FN) for 2 h followed by a pulsatile flow of 12 h. (A) Representative images of the inner graft surface covered with DAPI stained EC using fluorescence microscopy (above). (B) Quantification of fluorescence intensity presenting boxplots (median; box range, 25th and 75th percentile; outliers, minimum and maximal value) of calculated cell density per cm^2 of each graft ($n=4$).

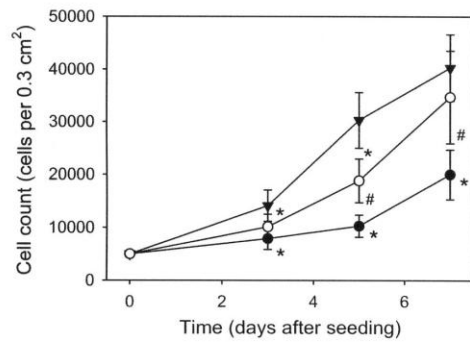
26

Figure 9:



Effect of prolongation of shear stress on EC adhesion on fibronectin-coated PEU grafts without and with additional titaniferous coating. EC (4×10^6 EC per graft) were seeded in PEU grafts, and titaniferously coated PEU grafts (tiPEU) for 2 h followed by a pulsatile flow of 72 h (volume flow rate, 237ml/min). (a) Representative images of the inner graft surface covered with DAPI-stained EC using fluorescence microscopy (above). (b) Quantification of fluorescence intensity presenting boxplots (median; box range, 25th and 75th percentile) of calculated cell density per cm^2 of each graft ($n=6$).

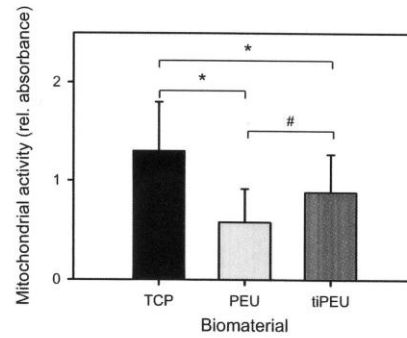
Figure 3:



Proliferation of human endothelial cells seeded onto different biomaterials. Endothelial cells (n=6) were seeded (5000 cells per 0.3cm²) onto test samples made of non-coated PEU (filled circles), titaniferously coated PEU (hollow circles) and tissue-cultured polystyrene (TCP) for 3, 5 and 7 days. Data are presented as mean with standard deviation. Statistical analysis included comparison of test material (PEU or tiPEU) vs. TCP (*, p=0.028), and PEU vs tiPEU (#, p=0.028).

21

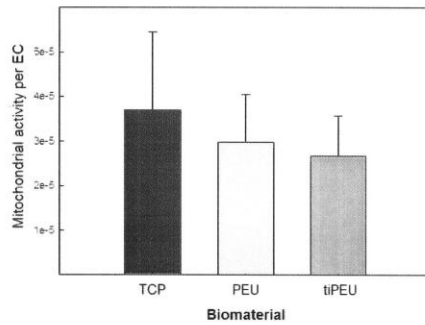
Figure 4:



Cytotoxicity of human endothelial cells on TCP, PEU and titaniferously coated PEU (tiPEU). Endothelial cells were grown on different biomaterials for 7 days and mitochondrial activity of adherent endothelial cells per culture area (0.3 cm²) was measured by MTT assay. Data are presented as mean with standard deviation. Statistical analysis included comparison of test material (PEU or tiPEU) vs. TCP (*, p=0.028), and PEU vs tiPEU (#, p=0.028).

22

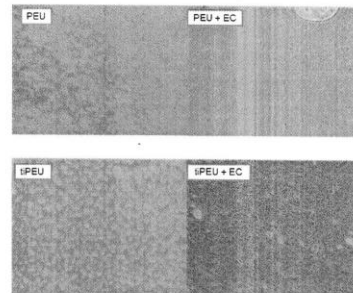
Figure 5:



Viability of the single cell grown on TCP, PEU and titaniferously coated PEU (tiPEU) measured by the MTT assay. Mitochondrial activity per endothelial cell was determined as the quotient of MTT absorbance per culture area and the respective cell count per 0.3 cm². Data (mean and standard deviation) of the different biomaterials showed no statistical difference.

23

Figure 6:



Adhesion of Calcein-AM-stained platelets on PEU test samples. Representative photographs of Calcein-AM-stained platelets after coincubation with non-endothelialized PEU and tiPEU (left part) and with endothelialized PEU and tiPEU (right part). While non-endothelialized biomaterial caused aggregation of platelets, additional endothelialization prevented platelet adhesion and aggregation. EC, endothelial cell.

24

28. Baier RE. Selected methods of investigation for blood-contact surfaces. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;516:68-77.

29. Jantzen AE, Lane WO, Gage SM, Haseltine JM, Galinat LJ, Jamiolkowski RM, Lin FH, Truskey GA, Achneck HE. Autologous endothelial progenitor cell-seeding technology and biocompatibility testing for cardiovascular devices in large animal model. *J Vis Exp.* 2011;55:1-8.

30. Cikirkioğlu M, Sedelnikov N, Osorio-Da Cruz S, Khabiri E, Donmez Antal A, Tatar T, Tille JC, Hess OM, Kalangos A, Walpoth BH. Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating. *Int J Artif Organs.* 2006;29:990-999.

31. Wallace CS, Champion JC, Truskey GA. Adhesion and function of human endothelial cells co-cultured on smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng.* 2007;35:375-386.

32. Brown MA, Wallace CS, Angelos M, Truskey GA. Characterization of umbilical cord blood-derived late outgrowth endothelial progenitor cells exposed to laminar shear stress. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:3575-3587.

33. Choi WS, Bae JW, Lim HR, Joung YK, Park JC, Kwon IK, Park KD. RGD peptide-immobilized electrospun matrix of polyurethane for enhanced endothelial cell affinity. *Biomed Mater* 2008;3(4):044104.

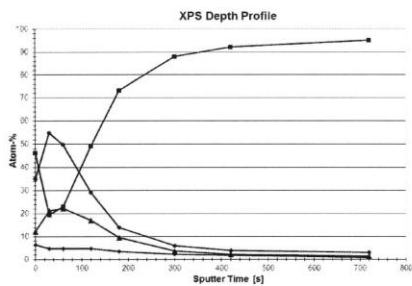
34. He W, Hu Z, Xu A, Liu R, Yin H, Wang J, Wang S. The Preparation and Performance of a New Polyurethane Vascular Prosthesis. *Cell Biochem Biophys* 2013;in press.

35. Scheidbach H, Tannapfel A, Schmidt U, Lippert H, Köckerling F. Influence of titanium coating on the biocompatibility of a heavyweight polypropylene mesh. An animal experimental model. *Eur Surg Res.* 2004;36:313-317.

17

Figure captions

Figure 1:



XPS of PEU after titaniumcarboxonitride coating. XPS analysis for titanium atoms (triangle) showed a maximal surface atom fraction of 22%, which decreased toward the inner part of the substrate (PEU), which was characterized by a high concentration of carbon atoms (square). PEU contains small amounts of nitrogen (diamond) and oxygen (circle). The integration of oxygen into the layer is caused by the exposure of the material to air after the coating process. During plasma deposition, no oxygen was present.

19

36. Bergmann PA, Lange T, Siemers F, Machens HG, Lohmeyer JA, Namdar T, Stollwerck PL, Zimmermann S, Mailänder P. Histological analysis of capsule formation around silicone implants and comparison with titanium-coated silicone implants in rats. *Eur J Plast Surg* 2012;35:19-24.

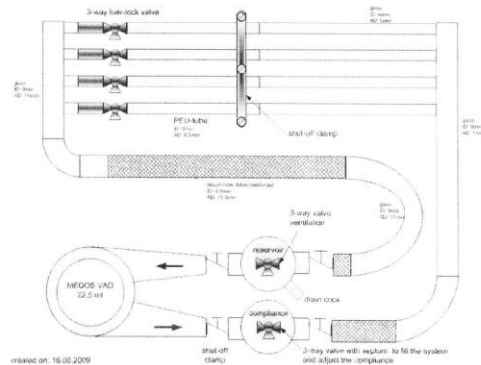
37. Hollweck T, Marschmann M, Hartmann I, Akra B, Meiser B, Reichart B, Eblenkamp M, Wintermantel E, Eissner G. Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds. *Biomed Mater.* 2010;5:065004.

38. Guldner NW, Bastian F, Weigel G, Zimmermann H, Maleika M, Scharfshwerdt M, Rohde D, Sievers HH. Nanocoating with titanium reduces iC3b- and granulocyte-activating immune response against glutaraldehyde-fixed bovine pericardium: a new technique to improve biologic heart valve prosthesis durability? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143:1152-1159.

39. Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Grossherr M, Klinger M, Sievers HH. The first self-endothelialized titanium-coated glutaraldehyde-fixed heart valve prosthesis within systemic circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138:248-250.

18

Figure 2:



Construction of a pulsatile bioreactor for endothelialization of small diameter vascular PEU grafts. Details are described in the text.

20

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei dieser Arbeit mit Wort und Tat in Form von Tipps, Ratschlägen, Denkanstößen und Ermutigung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau PD Dr. Karla Lehle. Sie war als meine Betreuerin ständig für mich erreichbar. Dank ihrer unermüdlichen Organisation und Koordination wurde dieses Projekt und damit die Durchführung dieser Arbeit erst möglich gemacht. Zudem stellte sie mir ihr enormes Know How über Zellkulturen, Zellbiologie, Biomaterialien, Methoden, etc. zur Verfügung und beantwortete noch so banale Fragen mit Verständnis und Geduld. Aus Gesprächen mit Kommilitonen weiß ich, dass ein derartiger Einsatz des Betreuers für seinen Doktoranden nicht selbstverständlich ist und sollte daher nochmal besonders hervorgehoben werden! Ohne ihre Motivation und Hartnäckigkeit wäre diese Arbeit wohl nicht zum Ende gekommen. Außerdem ermöglichte sie es mir, ein Poster zu gestalten, einen Vortrag auf einem Kongress zu halten und meine Ergebnisse zu publizieren.

Ich danke auch im Speziellen Frau Katrin Bielenberg, nicht nur für den ausgezeichneten Kaffee und die freundliche Atmosphäre im Labor, sondern vor allem für ihre jederzeit bereitwillige praktische Hilfe im Umgang mit Zellkulturen und die geteilte Freude bei jedem meiner erfolgreich abgeschlossenen Versuche. Obwohl sie nicht direkt im Projekt involviert war und mehr als genug andere Arbeit hatte, nahm sie sich stets Zeit für mich.

Außerdem danke ich Christina Leykauf und Sara Bergmann für die Anleitung im Labor und Herrn PD Dr. Otto Gleich für seine Einführung in die Mysterien der Statistik.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Regensburg, den _____

Sebastian Riescher