

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄSSCHIRURGIE
PROFESSOR DR. MED. C. SCHMID
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**In vitro Endothelialisierung und Thrombozytenadhäsion
auf titanbeschichteten polyether- und polykarbonat-
basierten Polyurethanen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
vorgelegt von

Jing Li

2015

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄSSCHIRURGIE
PROFESSOR DR. MED. C. SCHMID
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**In vitro Endothelialisierung und Thrombozytenadhäsion
auf titanbeschichteten polyether- und polykarbonat-
basierten Polyurethanen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
vorgelegt von

Jing Li

2015

| | | |
|----------------------|--|-----------------------------------|
| Dekan: | | Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert |
| 1. Berichterstatter: | | Prof. Dr. Karla Lehle |
| 2. Berichterstatter: | | Prof. Dr. York Zausig |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Einleitung | 3 |
| 2. Zielsetzung..... | 5 |
| 3. Material und Methoden | 6 |
| 3.1 Geräte.. | 6 |
| 3.2 Verbrauchsmaterial | 7 |
| 3.3 Zellkulturmedien und Lösungen..... | 8 |
| 3.4 Isolierung humaner Endothelzellen aus Gefäßen | 9 |
| 3.5 Kultivierung humaner Endothelzellen..... | 9 |
| 3.5.1 Auftauen von Endothelzellen | 10 |
| 3.5.2 Mediumwechsel..... | 10 |
| 3.5.3 Subkultivierung/ Passagieren..... | 11 |
| 3.5.4 Vorgehen beim Passagieren | 13 |
| 3.5.5 Proliferationsverhalten der Endothelzellen unter statischen Kulturbedingungen | 13 |
| 3.6 Verwendete Testmaterialien aus Polyurethan und Titanbeschichtung.... | 15 |
| 3.6.1 Testmaterialien aus verschiedenen Polyurethanen | 15 |
| 3.6.2 Titanbeschichtung mittels PACVD..... | 15 |
| 3.7 Oberflächenanalyse – XPS und REM | 16 |
| 3.8 Zellzahlbestimmung mittels CASY..... | 17 |
| 3.9 Mitochondriale Stoffwechselaktivität - MTS-Messung | 20 |
| 3.10 Vitalitätsfärbung mit Calcein-AM | 21 |
| 3.11 Adhäsion von PBMCs an Endothelzellen | 22 |
| 3.12 Adhäsion von Thrombozyten an Biomaterialien - Hämokompatibilität . | 23 |
| 3.13 Statistik | 26 |
| 4. Ergebnisse..... | 27 |
| 4.1 Schichtzusammensetzung der titanisierten PU-Oberflächen..... | 27 |
| 4.2 Oberflächencharakterisierung von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen mittels REM | 28 |
| 4.3 Endothzelladhäsion von unbeschichteten und titanbeschichteten PU- Oberflächen | 30 |
| 4.4 Zellvitalitätbestimmung mit Calcein-AM | 31 |
| 4.5 Proliferation von Endothelzellen auf unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen | 32 |
| 4.5.1 Proliferationseigenschaften von HSVECs auf TCP | 32 |
| 4.5.2 Proliferationseigenschaften von HSVECs auf verschiedenen unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen | 34 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6 Biokompatibilität von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen – Mitochondriale Stoffwechselaktivität von Endothelzellen | 42 |
| 4.7 Hämokompatibilität von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen – Thrombozytenadhäsion..... | 43 |
| 4.7.1 Thrombozytenadhäsion auf endothelbesiedelten PU-Materialien | 43 |
| 4.7.2 Nachweis von adhärenten Thrombozyten mittels REM | 44 |
| 4.8 Inflammatorische Wirkung von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen auf humane Endothelzellen | 46 |
| 5. Diskussion..... | 47 |
| 5.1 Methodik zur Endothelialisierung von Biomaterialien | 47 |
| 5.2 Adhäsion von Endothelzellen auf Polyurethanen..... | 48 |
| 5.3 Proliferation von Endothelzellen auf Polyurethanen..... | 49 |
| 5.4 Endothelzellaktivierung nach Adhäsion auf Polyurethanen..... | 50 |
| 5.5 Thrombogenität verschiedener Polyurethane | 51 |
| 6. Fazit..... | 55 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis..... | 56 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 57 |
| 9. Tabellenverzeichnis..... | 58 |
| 10. Literaturverzeichnis..... | 59 |
| 11. Zusammenfassung..... | 63 |
| 12. Danksagung | 64 |
| 13. Lebenslauf | 66 |

1. Einleitung

In der Herzchirurgie nehmen Kunststoffe und dabei insbesondere Polyurethane heutzutage einen breiten Raum ein. Deren gute Bioverträglichkeit und die ausgezeichneten mechanischen Eigenschaften (z. B. hohe Elongationskapazität, gute Resistenz gegen Abrieb, hohe Flexibilität) erlauben den Einsatz als Prothesen (z. B. künstliche Gefäße, Herzklappen, Herzunterstützungssysteme), ebenso wie als Bestandteile der Herz-Lungen-Maschine (z. B. Schlauchsysteme, Katheter, Gasaustauschgewebe in den Membranoxygenatoren). Nach wie vor nicht gelöst ist das Problem der Thrombogenität von Kunststoffen im direkten Blutkontakt. Bei langfristigem Kontakt zwischen Blut und künstlichen Oberflächen erhöht sich das Risiko von Thrombenbildung (Bordenave et al., 2005; Sarkar et al., 2007; Teebken and Haverich, 2002) und Kalzifizierung (Schoen et al., 2005), welche den Erfolg einer Behandlung gefährden. Der Grund liegt darin, dass sich die Biomaterialien nach Kontakt mit Blut als Fremdkörper verhalten und im Organismus und an der Grenzschicht der eingebrachten Materialien eine Vielzahl von zellulären und plasmaständigen Reaktionen aktivieren. Dies beinhaltet die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems, welches die weitere Gerinnungskaskade in Gang setzt. Trotz verschiedenster Ansätze, die die Oberflächen der Kunststoffe zu modifizieren und damit hämokompatibler zu machen, gibt es bis heute beispielsweise keinen kleinlumigen Gefäßersatz für die Bypass-Chirurgie.

In der Literatur gibt es zahlreiche Strategien, um die Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien zu modifizieren. Dies beinhaltet die Herstellung von per se anti-thrombogenen Oberflächen (z. B. durch Beschichtung mit Heparin oder Phosphorylcholin) (Gore et al., 2014; Huangfu et al., 2009), wodurch die Anheftung und Aktivierung von Thrombozyten unterbunden werden soll. Weiterhin gibt es Ansätze, die die Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen erlauben (z. B. durch Anbindung spezifischer Aminosäuresequenzen-Arginin-Glycin-Asparaginsäure, RGD; Beschichtung mit Fibronectin, etc.) (Joner et al., 2012; Li et al., 2011). Die Zukunft wird der Endothelialisierung von Biomaterialien im Blutkontakt zugesprochen (Liu et al., 2014). Durch eine Endothelialisierung der mit Blut in Kontakt kommenden künstlichen Oberflächen wird eine natürliche Auskleidung von Blutgefäßen und Herz (Nachman and Jaffe, 2004) imitiert und somit eine anti-thrombogene und anti-inflammatoryische Beschichtung geschaffen (Lee et al., 1993). Eine vollständige Besiedelung der Polymeroberflächen mit Endothelzellen (ECs) würde eine Thrombozytenadhäsion,

Thrombosebildung, inflammatorische Zellinfiltration und die Bildung von Neointimazellen verhindern (Lee et al., 1993). Mit patienteneigenen Zellen/Progenitorzellen würden sogar die Immunreaktionen unterbunden. Die Bedeutung der EC-Abdeckung künstlicher Oberflächen in der Gewebe-Technologie (*engineering*) ist *in vitro* (Consigny and Vitali, 1998; Gulbins et al., 2004) gezeigt worden.

Ein Ansatz zur Verbesserung der Bioverträglichkeit von Polymeren für biomedizinische Anwendungen ist eine Beschichtung mit Titan (Ti). Titan zeichnet sich durch eine hervorragende Biokompatibilität aus, was insbesondere in der Orthopädie Anwendung findet (Schmolders et al., 2015; Reinhold et al., 2011). Titan hat ein niedriges elektrochemisches Oberflächenpotential und ist somit biologisch inert (Windecker et al., 2001). Mit Hilfe der PACVD-Technik konnten auch biologische Herzklappen (Guldner et al., 2012) und thermolabile Kunststoffe (Lehle et al., 2003) mit einer sehr dünnen Titanschicht von 30-50 nm versehen werden (Wintermantel and Ha, 2009). Das Verfahren kann je nach Schichtmaterial bei Raumtemperatur stattfinden und kombiniert die positiven Materialeigenschaften von Titan und Polymer. Damit werden weder die elastischen Eigenschaften noch die Oberflächenmikrostrukturen verändert (Lehle et al., 2003). Infolge der höheren Oberflächenenergie wird die Benetzbarkeit der Oberfläche verbessert, womit die Kriterien für biokompatible Materialen erfüllt sind (Wintermantel and Ha, 2009). Zudem können komplexe, dreidimensionale Strukturen gleichmäßig beschichtet werden (Lehle et al., 2003).

Bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine verbesserte Endothelzelladhäsion und -proliferation auf titanbeschichteten Polyurethanen nachgewiesen (Lehle et al., 2009; Riescher et al., 2014). So konnte gezeigt werden, dass auf unbeschichteten Biomaterialien zwar vereinzelt Zellen oder Zellgruppen adhärieren oder wachsen, jedoch meist keine typischen Endothelzellen (Mellander et al., 2005). Dagegen konnten auf titanisierten Biomaterialien CD31-positive Endothelzellen nachgewiesen werden (Cikirkcioglu et al., 2006). Weitere *in vitro* Studien bestätigen die verbesserte Endothelialisierbarkeit von titanbeschichteten Kunststoffoberflächen (Lehle et al., 2003; Lehle et al., 2009). Weiterhin gibt es auch Hinweise dafür, dass diese Art der Beschichtung auch die Thrombogenität des Materials verbessert (Guldner et al., 2012). Die Implantation einer titanbeschichteten Blutpumpe in die Ziege verhinderte nicht nur die Thrombenbildung, sondern es konnten auch Endothelzellen auf der blutzugewandten Innenseite der titanisierten Blutpumpe nachgewiesen

werden (Pacella et al., 1994). Bislang gibt es jedoch keine Verwendung dieses Verfahrens für kleinlumige Gefäße oder für Pumpkammern von Herzunterstützungssystemen.

2. Zielsetzung

Im Rahmen eines von der EU geförderten Verbundprojektes (EFRE, Europäische Fonds für regionale Entwicklung, gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Wirtschaft und Medien) sollte die Endothelialisierbarkeit von verschiedenen Polyurethanen mit und ohne Titanbeschichtung unter *in vitro* Bedingungen untersucht werden. Es sollten folgende Fragen untersucht werden

1. Wird durch eine Titanbeschichtung die Endothelzelladhäsion verschiedener polyether- bzw. polykarbonatbasierter Polyurethane verbessert?
2. Wie wirkt sich die Titanisierung auf die Endothelzellproliferation aus?
3. Welche Bedeutung hat die Titanisierung von verschiedenen polyether- bzw. polykarbonatbasierten Polyurethanen auf die Thrombozytenadhäsion?

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung von verwendeten Gerätschaften

| <u>Gerätschaften</u> | <u>Hersteller</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| β-Counter: WallacMicro beta® Trilux1450 Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter | PerkinElmer Life and Analytical Sciences, WallacOy, P.O.(USA) |
| Brand Transferplate®8(30-300µl) | Brand GmbH (Westheim) |
| Brstschrank CO₂-Auto-Zero | Heraeus Holdings GmbH (Hanau) |
| CASY® Cell Counter and Analyser System, TTC Einstellungen: X-Achse: 0 bis 30 µm Y-Achse: variabel Kapillarendurchmesser: 150 µm Angesaugtes Probenvolumen: 3x400 µl Verdünnungsfaktoren: variabel Smoothing | Schärfe System GmbH (Reutlingen) |
| E-max Precision Microplate Reader | Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, USA) |
| Eppendorf Multipette Plus | Eppendorf Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf) |
| Eppendorf Reference 10µl | Eppendorf Deutschland GmbH |
| Fluoreszenzmikroskop Leica DMRE Einstellungen: Lampenspannung 0,5 V Vergrößerungswechsler 1x Kondensorfrontlinse in den Strahlengang geklappt Polarisator aus dem Strahlengang geklappt Analysator aus dem Strahlengang geklappt Kondensorrevolver Position H Interferenzrevolver Position HF Fluoreszenzrevolver Position 1 Aperturblende weit zugezogen 10er-Objektiv, 40er-Objektiv | Leica Mikroskopie und System GmbH (Wetzlar) |
| Gilson Pipetten(20, 100, 200, 1000µl) | Gilson (Villiers Le Bel, Frankreich) |
| Knick Lab-pH-Meter Digital | Elscolab (Utrecht, Niederlande) |
| Kryobox | Air Liquide (Paris, Frankreich) |
| Labsystems Finnpipette®1500ul | Molecular Devices Corporation |

| | |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Pipetboy acu | Integra BiosciencesGmbH (Fernwald) |
| Rüttelplatte Typ VX7 | Janka-und-Kunkel AG (Köln) |
| Rüttler JKA Vibrax-VXR | Janka-und-Kunkel AG |
| Sterilbank Hera safe Heraeus® | Heraeus Holdings GmbH |
| Sterilbank Laminair Heraeus® | Heraeus Holdings GmbH |
| Vortex Mixer | National Laboratory® (Richland, USA) |
| Wallac 1420 Victor 3TM plate reader | PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. |
| Waage BP2215 (max. 220 g, d = 0,1mg) | Sartorius AG (Göttingen) |
| Zentrifuge Megafuge 1.0 R | Heraeus Holdings |

3.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Auflistung von Verbrauchsmaterialien

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 6-Well Platten, steril | Greiner Labortechnik (Frickenhausen) |
| 96-Well Platten, steril | Nunc (Roskilde, Dänemark) |
| 96-Well Platten, unsteril | M&B Stricker (Oberschleißheim) |
| 96-Well Platten, unsteril | Nunc (Roskilde, Dänemark) |
| Kryogefäße 2mL | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße | Eppendorf Deutschland GmbH |
| FACS-Reaktionsgefäße Falcon® Polypoplylene und Polystyrene Round Bottom Tube 5ml | Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) |
| Filtermat A, GF/C, 100 per Package | PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. |
| Pleated Dialysis Tubing, ShakeSkin® | Pierce (Rockford, USA) |
| S-Monovette®: 5,5ml und 7,5ml | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Metallringe, Gewebestanze | Physikal. Mechan.. Werkstatt der Uni Regensburg |
| Objektträger Super Frost Plus | Menzel Gmbh (Braunschweig) |
| Polypropylene Round Bottom Tube | Nunc |
| Sterile Reaktionsgefäße, 15ml und 50ml | Nunc |
| Sterilfilter Sartorius Minisart(0,22µl) | BectonDicinson GmbH |
| Kulturflaschen: T25, T175 | Cellstar, Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) |

3.3 Zellkulturmedien und Lösungen

Tabelle 3: Zellkulturmedien und Lösungen

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Calcein-AM (1mg/ml) solution in anhydrous DMSO: | MolecularProbes Inc. (Eugene, USA) |
| CASYton-Verdünnungslösung | Schärfe System GmbH |
| Citronensäuremonohydrat: | Merck (Darmstadt) |
| Gelatine: | Merck (Darmstadt) |
| Gentamycin | Roche Diagnostics (Indianapolis, USA) |
| Trypsin 2,5%, 10x | Invitrogen GmbH (Karlsruhe) |
| CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) | Promega(Madison, WI USA) |
| fötales Kälberserum, FCS (fetal calfserum) | Sigma-Aldrich |
| Kollagenase Typ 2 (0,1 U/ml) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe) |
| Paraformaldehyd | Merck (Darmstadt) |
| Hepes-Puffer Stammlösung 1M | Biochrom AG (Berlin) |
| Humanserum Blutgruppe A/B/O | Uniklinikum Regensburg Probanden der HTC |
| Fibronectin (1mg/ml) human | Millipore, Merck (Darmstadt) |
| EC-Medium (Endothelial Cell Basal Medium) * | Promocell GmbH (Heidelberg) |

*Das fertige Wachstumsmedium wurde mit Supplement-Pack (Promocell, No. C-39215) versetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung des Wachstumsmediums für Endothelzellen

| | |
|---------------------------------------------------------------|---------|
| Endothelzellmedium | 500 ml |
| FCS (fetal calfserum) | 50 ml |
| ECGS/H-2 (endothelial cell growth supplement/ heparin) | 2 ml |
| HEGF (human epidermal growth factor 0,05 µg) | 0,5 ml |
| HC-500 (Hydrocortison 500 µg) | 0,5 ml |
| Gentamycin (50 mg/ ml Stammlösung) | 500 µl |
| Amphotericin B (250 µg/ ml Stammlösung) | 1000 µl |

Zum Waschen der Zellen wurde eine sterile isotonische phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH-Wert 7,3) verwendet. Als Stammlösung wurde ein 10-faches Konzentrat hergestellt (**Tabelle 5**). Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle des pH-Wertes und ggf. eine Nachjustierung mit Salzsäure HCl bzw. Natriumhydroxid NaOH (1 N).

Tabelle 5: Zusammensetzung 10x PBS-Puffer

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 80 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 11,5 g |
| KCl | 2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g |

3.4 Isolierung humaner Endothelzellen aus Gefäßen

Humane Endothelzellen wurden aus der Vena saphena magna isoliert. Details zur Isolierung der Zellen finden sich bei Lehle et al. 2003 (Lehle et al., 2003). Für die Isolierung und Kultivierung der Vena saphena Endothelzellen (HSVECs) besteht schriftliches Einverständnis durch den Patienten entsprechend eines positiven Ethikvotums (No. 99/133) der Ethikkommission der Universität Regensburg.

An dieser Stelle wird auf die detaillierte Wiedergabe des Isolierungsprotokolls verzichtet, da nur aufgetaute Endothelzellen verwendet wurden. Hier sei auf andere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe verwiesen (Riescher et al., 2014).

3.5 Kultivierung humaner Endothelzellen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Endothelzellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% inkubiert. Wachstum und Morphologie der Zellen wurden täglich mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop untersucht. Für die Kultivierung der Endothelzellen wurde ein Wachstumsmedium (**Tabelle 4**) verwendet. Für die Kultivierung wurden verschiedene Kulturgefäße verwendet. In der Regel wurden die Zellen in Kulturflächen mit einer Kulturfläche von 25 bzw 175 cm² (T25 bzw T175) kultiviert, der

eigentliche Versuch für die Materialtestung erfolgte dann in 96-Well- Mikrotiterplatten (Kulturfläche 0,3 cm²).

3.5.1 Auftauen von Endothelzellen

Die bei -180°C (Gasphase von flüssigem Stickstoff) in Passage 1 eingelagerten Endothelzellkulturen (ca. 1x10⁶ Zellen/Portion in 1 ml Einfriermedium) wurden im Wasserbad (37°C) maximal 2 bis 3 Minuten aufgetaut und sofort mit 5 ml Wachstumsmedium versetzt und auf gelatine-beschichtete Kulturplatten (i. d. Regel T25) ausgesät. Nach 4-8 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um Restmengen an Dimethylsulfoxid (DMSO) aus dem Einfriermedium, sowie nicht-adhärente Zellen und Zellschrott zu entfernen. DMSO (10%) im Einfriermedium ist notwendig, um beim Einfrieren eine Kristallbildung in den Zellen zu verhindern. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von DMSO auf stoffwechselaktive Zellen, wurde dessen Konzentration nach dem Auftauen durch Verdünnung so schnell wie möglich reduziert.

3.5.2 Mediumwechsel

Monolayerkulturen (d. h. adhärente Zellen, die nach Aussaat zu einem einheitlichen Zellrasen auswachsen können) benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C (z. B. ist Gentamycin nur für 3 Tage bei 37°C stabil) im Verlauf der Zeit zerfallen.

Die Intervalle der Mediumerneuerung und Subkultivierung variieren in Abhängigkeit von Zelltyp, Stoffwechselaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Bei Endothelzellen erfolgt ein Mediumwechsel in der Regel dreimal wöchentlich. Dazu wird das Kulturmedium abgesaugt und vorgewärmtes frisches Medium erneut zugegeben. Bei Monolayerkulturen sollte ein Verhältnis von Medienvolumen zu Kulturoberfläche von 0,2-0,5/ cm² gewählt werden. Dies entspricht einer Medienhöhe von 2-5 mm mit der die Zellen bedeckt sind. Die Mediumhöhe- und damit das Mediumvolumen im Kulturgefäß ist ein kritischer Faktor in der Sauerstoffversorgung der Zellen.

Vor und nach jedem Mediumwechsel werden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt (**Abbildung. 1**). Dies beinhaltet die Dokumentation über die Zelldichte (Konfluenz der Kulturen), Vitalität (Ablösen der Zellen) und der Morphologie (Reinheit). Auswachsende Endothelzellen bilden in der statischen Zellkultur einen Monolayer aus (**Abbildung. 1**), wobei die Zellen ein mosaikähnliches Muster ausbilden („Kopfsteinpflasterstruktur“). Abgekugelte Zellen erscheinen als hell-leuchtende Kugeln im Kulturerstand.

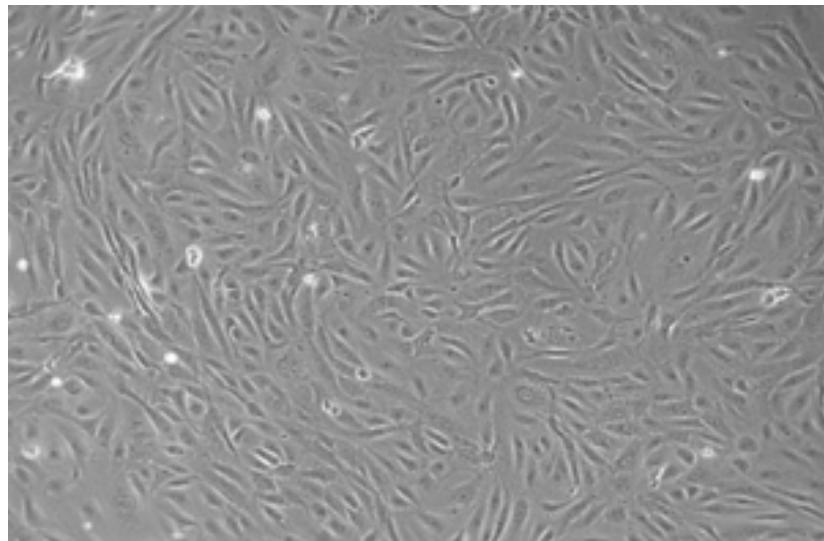


Abbildung 1: Humane Endothelzellen im Phasenkontrastmikroskop. Endothelzellen bilden einen konfluenten Monolayer aus, wobei die gesamte Kulturoberfläche bedeckt ist. Bei den abgekugelten Zellen (runde Zellen im Überstand, helle Zellgrenzen) im Überstand handelt es sich um tote Zellen, die durch einen Mediumwechsel entfernt werden können.

3.5.3 Subkultivierung/ Passagieren

Ist die gesamte Wachstumsfläche von den kultivierten Zellen bedeckt (geschlossener, konfluenter Monolayer), so wachsen strikt adhärente Zelllinien nicht mehr weiter, die Proliferationsrate sinkt. Dies kann zum Absterben der Kultur führen. Deshalb ist es notwendig, die Zellen in diesem Zustand vom Untergrund abzulösen und auf neue Kulturoberflächen wieder auszusäen (Passagieren). Der Zellverband wird durch enzymatischen Verdau (i. d. Regel Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure EDTA oder Kollagenase) aufgelöst, in Suspension gebracht und nach entsprechender Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt.

Abbildung 2 gibt einen Eindruck über den Verlauf einer Zellkultivierung.

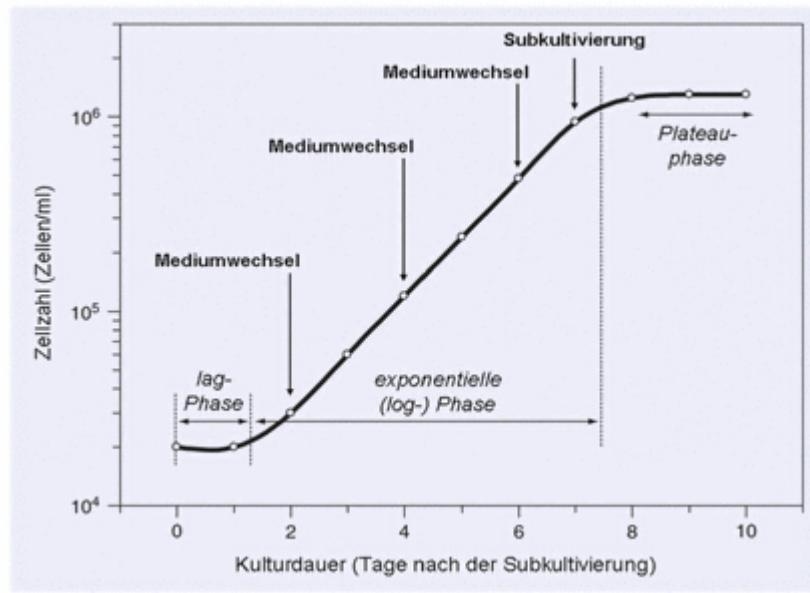


Abbildung 2: Beispiel für das Wachstum von adhärenten Zellen (Wachstumskurve). Nach Aussaat (Tag 0) erfolgt zunächst die Adhäsion und die Regenerierung der Zellen (Lag-Phase, ca. 1 Tag). Danach beginnen die Zellen zu proliferieren (Zunahme der Zellzahl, exponentielle Phase). Bei Erreichen der Konfluenz werden die Zellen gewöhnlich subkultiviert/passagiert (Gstraunthaler and Lindl, 2013). In der Plateauphase erfolgt keine weitere Zellteilung mehr.

Man unterscheidet dabei vier Phasen

1. *Lag-Phase*: Die Zellproliferation läuft nach Aussaat verzögert an, da sich die Zellen auf die neuen Wachstumsbedingungen einstellen müssen.
2. *Log-Phase*: Das Medium und die Substratoberfläche wirken nicht limitierend. Alle Zellen sind teilungsaktiv und die Verdopplungszeit ist konstant.
3. *Stationäre Phase*: Die Substratoberfläche ist erschöpft. Die Zunahme der Zellzahl kommt zum Stillstand, da sich ein Gleichgewicht zwischen Vermehrung und Zelltod einstellt.
4. *Absterbe-Phase*: Die Lebendzellzahl nimmt wieder ab. Die Abtötung der Zellen erfolgt unter anderem durch Stoffwechselprodukte, die in größeren Mengen toxisch wirken.

3.5.4 Vorgehen beim Passagieren

Das Medium wird mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Der Zellrasen wird mit warmem (Raumtemperatur) PBS einmal vorsichtig gewaschen, mit Trypsin/EDTA oder Kollagenase benetzt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 2 min wird unter dem Durchlichtmikroskop die Ablösung der Zellen untersucht. Durch vorsichtiges „Abklopfen“ lösen sich die Zellen endgültig aus dem Zellverband. Durch Zugabe von frischem Kulturmedium werden die restlichen Zellen abgewaschen und resuspendiert. Das FKS im Medium bewirkt zudem eine Hemmung der Proteaseaktivität. Nach Überführen in ein steriles Zentrifugengefäß (15 bzw. 50 ml Falcon-Röhrchen) wird die Zellsuspension zentrifugiert (1200 UpM, 5 min). Das Zellpellet wird in Wachstumsmedium resuspendiert, auf gelatinebeschichtete Kulturplatten ausgesät und im Brutschrank inkubiert. (z. B. werden alle Zellen einer T25 – ca. 1×10^6 Zellen – auf eine T175 ausgesät und können nach 3-5 Tagen geerntet werden).

Für den eigentlichen Versuch im 96-Well-Maßstab wurden Kulturen verwendet, bei denen der Zellrasen eine Konfluenz des Flaschenbodens von 70% bis 90% erreicht hatte. Je nach kalkulierter Zellmenge wurden entweder Zellen aus T175 oder T25 verwendet (Passage 3). Für T25-Kulturen: Nach Absaugen des Kulturüberstandes und Waschen des Zellrasens wurde 1 ml Kollagenase zugegeben und ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 2x 1 ml Kulturmedium resuspendiert, in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels automatischen Zellzählers (CASY) ermittelt. Zur Aussaat in 96-Well Platten wurden verschiedene Konzentrationen von Zellsuspension hergestellt. Pro Well (Fläche 0,3 cm²) wurde 150 µl Zellsuspension ausgesät. Für die Zelladhäsion wurden 20000 Zellen (=67.000 Zellen/cm²), für die Proliferationsversuche 5000 Zellen pro Well (17.000 Zellen /cm²) ausgesät und für 24 Stunden (Adhäsion) bzw. 3-7 Tage inkubiert.

3.5.5 Proliferationsverhalten der Endothelzellen unter statischen Kulturbedingungen

Das Proliferationsverhalten der Endothelzellen (HSVEC) wurde unter statischen Kulturbedingungen untersucht. Bei Aussaat von je 5000 Zellen pro Well zeigte sich lichtmikroskopisch am Tag 3 eine etwa 70%ige Konfluenz der Zellen. Um zu verhindern, dass eine Abnahme der Nährstoffkonzentration bzw. eine Zunahme toxischer

Stoffwechselprodukte Einfluss auf das Zellverhalten nehmen, wurde am Tag 3 und 5 nach Aussaat ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden die Zellzahlen am Tag 3, 5 und 7 nach Aussaat mittels CASY bestimmt. **Abbildung 3** zeigt das Beispiel einer Wachstumskurve von HSVECs. Die Zelldichte wurde lichtmikroskopisch kontrolliert (**Abbildung 4**).

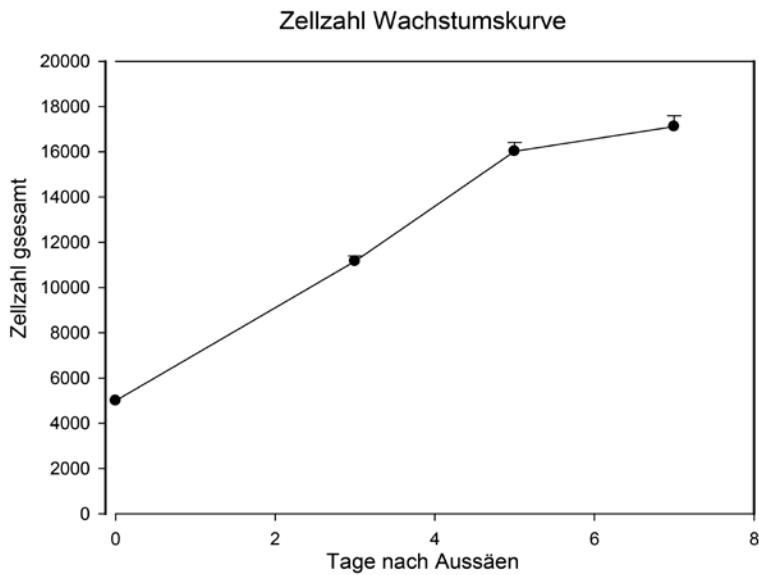


Abbildung 3: Wachstumskinetik von HSVEC. Die Zellzahlen wurden mittels CASY bestimmt und gegen die Zeit (in Tagen nach Aussaat) aufgetragen. Mittelwert und Standardabweichung (Fehlerbalken) aus einer 3-fach-Bestimmung (eine Kultur).

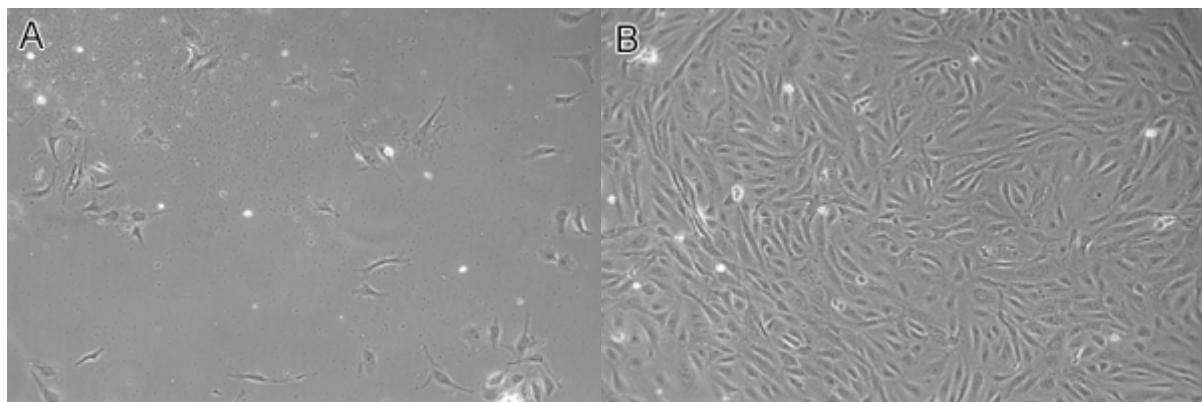


Abbildung 4a und b: Lichtmikroskopische Kontrolle des Zellrasens nach Aussaat von 5000 HSVECs am Tag 1 und 7. Während nach 1 Tag (a) lediglich vereinzelte adhärente Zellen nachweisbar waren, erreichte die Zellzahl nach 7 Tagen (b) ein Maximum (konfluenter Monolayer).

3.6 Verwendete Testmaterialien aus Polyurethan und Titanbeschichtung

3.6.1 Testmaterialien aus verschiedenen Polyurethanen

Die für die vorliegende Studie verwendeten PU-Materialien (**Tabelle 6**) wurden in Folienform (Dicke 0,5 mm) gekauft. Es handelt sich um thermoplastische PUs (TPU).

Tabelle 6: Verwendete Polyurethane (PU)

| Testmaterial | PU-Typ | Produktnname | Hersteller |
|--------------|--------|-------------------|--------------------------------|
| PU_1 | PEU | Texin® 985 | Bayer, Leverkusen, Germany |
| PU_2 | PEU | Tecothane® TT1085 | Lubrizol, Wickliffe, Ohio, USA |
| PU_3 | PEU | Elastollan® 1180A | BASF, Ludwigshafen, Germany |
| PU_4 | PCU | Desmopan® | BASF, Ludwigshafen, Germany |

PEU, polyether-basiertes PU; PCU, polykarbonate-basiertes PU.

Aus den Folien wurden mit einer speziellen Stanze (pfm medical titanium, Nürnberg) scheibenförmige Plättchen (Durchmesser 0,3 cm²) hergestellt.

3.6.2 Titanbeschichtung mittels PACVD

Die Beschichtungstechnik ist ausführlich bei Guldner et al (Guldner et al., 2009) beschrieben. Es handelt sich dabei um ein patentiertes Verfahren (Patentnummer EP 0 897 997 B1) der Firma PFM medical titanium. Sämtliche Testmaterialien wurden von PFM beschichtet (ti_PU) und analysiert (2.7). Bei diesem Verfahren wird eine flüchtige Ausgangssubstanz (Precursor, Tetrakisdimethylamidotitan, Ti [N CH₃)₂]₄) in die Gasphase überführt. Durch Zufuhr thermischer Energie in Form eines Plasmas (z. B. Stickstoffplasma) unter Vakuum wird der gasförmige Precursor in fraktionierte, radikalisierte Molekülbestandteile zerlegt und an der zu beschichtenden Substratoberfläche abgeschieden (**Abbildung 5**). Die Dichte der titanhaltigen Schicht ist abhängig von der Plasma-Aktivierungszeit.

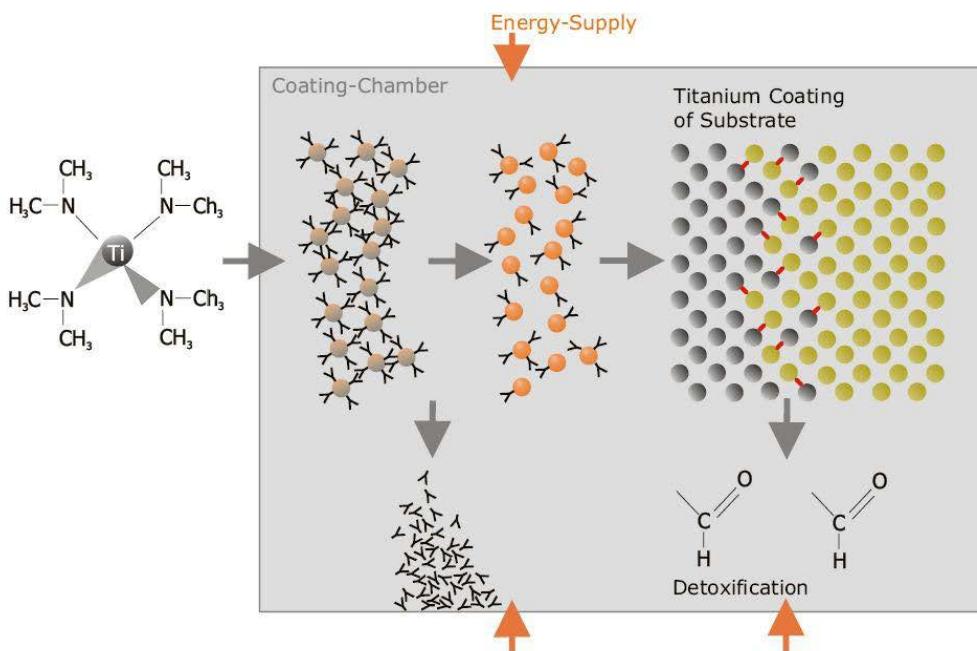


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Verfahrens „Plasma-Activated Chemical Vapor Deposition for Titanium“, wobei ein titanhaltiger Precursor Tetracisdimethylamidotitan als Ausgangssubstanz im Vakuum destruiert wird und die Bruchstücke kovalent an das Substrat gebunden werden (W. et al., 2011).

Für die biologischen Testungen wurden die unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Plättchen mit Ethanol (70%) und steriles PBS gewaschen, unter der Sterilbank in 96-Well-Mikroplatten (Flachboden, Zellsuspensionsplatte, Nunc®, Wiesbaden, Deutschland) positioniert und mit sterilen Stahlringen auf dem Boden fixiert. Normale Zellkulturoberflächen von 96-Well-Mikrotiterplatten für adhärente Kulturen aus Polystyrol (TCP, tissue-cultured polystyrole) (Nunc®) dienten der Referenz.

3.7 Oberflächenanalyse – XPS und REM

Die Eigenschaften und Zusammensetzung der titanisierten Oberflächen sind ausführlich bei Wintermantel et al (Wintermantel and Ha, 2009) beschrieben. Titanisierte Polyurethane (ti_PU) wurden anhand von X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS; Sage 100, SPECS, Berlin, Deutschland) analysiert. Durch die Kombination mit einem Sputter-Prozess erhält man zusätzlich den Verlauf der Schichtzusammensetzung durch die Schicht (Weisenberg and Mooradian, 2002). Die Analyse ist freundlicherweise von Herrn Björn Hartmann, pfm, durchgeführt worden.

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde genutzt, um die Oberflächenstrukturen der Testmaterialien (Lehle et al., 2014) und die Thrombozytenadhäsion (Form der Thrombozyten und Ausmaß der Adhäsion) zu charakterisieren. Die Analysen wurden freundlicherweise von Frau Katrin Bielenberg durchgeführt. Details zur Probenvorbereitung und Analyse siehe Lehle et al. (Lehle et al., 2014)

3.8 Zellzahlbestimmung mittels CASY

Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte durch automatisierte Zellzählung mit dem Cell Counter and Analyser System (CASY® Modell TTC, OLS Omni Life Science, Bremen, **Abbildung 6**).



Abbildung 6: Elektronisches Zellzählgerät nach dem Widerstandsprinzip (CASY® Cell Counter and Analyser System, Model TTC: Schärfe System GmbH (Reutlingen Deutschland)) (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

Das Messprinzip (**Abbildung 7**) beruht auf einer elektrischen Widerstandsmessung in Kombination mit einer Echtzeitsignalauswertung. Dabei wird die Zellsuspension in eine elektrolytgefüllte Kapillare mit einem Innendurchmesser von $150\text{ }\mu\text{m}$ gesaugt ($400\text{ }\mu\text{l}$), an der während der Messung über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt wird. Ihrem Volumen entsprechend verdrängen die in der Suspension enthaltenen Zellen beim Durchtritt durch die Messkapillare eine bestimmte Menge an Elektrolytlösung. Dies führt entlang der Kapillarstrecke zur Erhöhung des Widerstandes, über den der Zellzähler die Zellzahl und das Zellvolumen ermitteln kann.

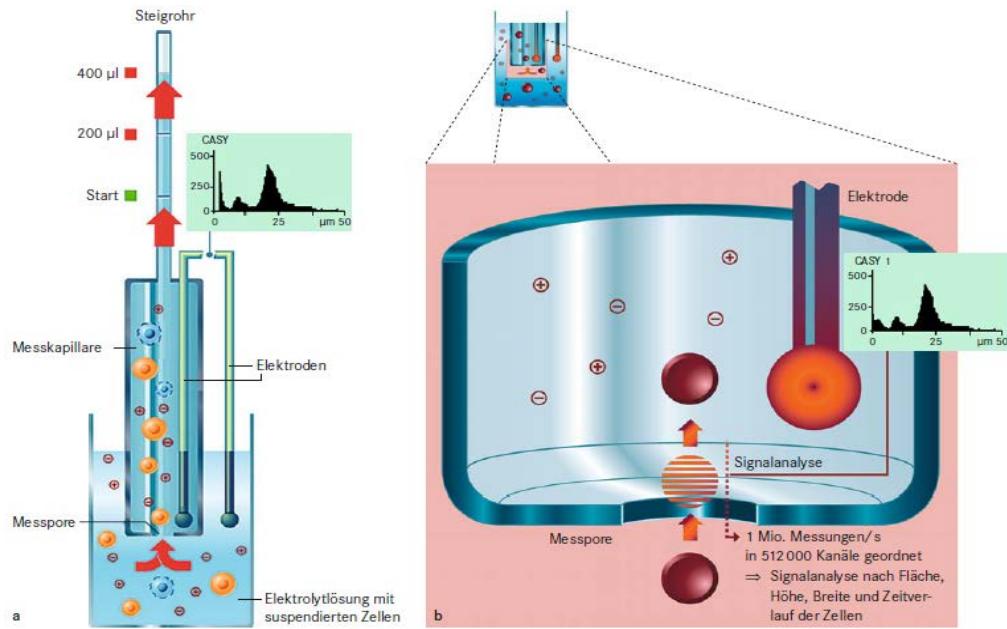


Abbildung 7 a und b: Funktionsprinzip der elektronischen Zellzählung. a Ausgangssituation mit suspendierten Zellen, b Messvorgang mit Durchtritt einer Zelle durch die Messspore (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

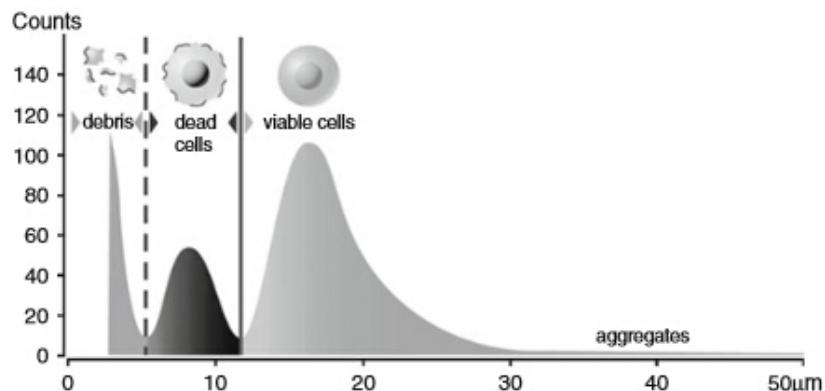


Abbildung 8: Graphische Darstellung des Messergebnisses im CASY Model TTC (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

Die jeweilige Pulsfläche ist mit dem Zellvolumen direkt proportional. Mit diesem Verfahren kann neben der Bestimmung der Zellzahl, die Größenverteilung der Zellen über einen sehr großen Messbereich hochauflösend dargestellt werden. Der große Messbereich ermöglicht die gleichzeitige Quantifizierung von Zellschrott, toten Zellen, vitalen Zellen und Zellaggregaten in der Zellprobe (**Abbildung 8**).

Die lebend/tot-Differenzierung der CASY-Systeme verwendet das Stromausschlussverfahren (**Abbildung 9**). Die vitalen Zellen schließen den Strom beim Durchtritt durch die Messspore aus und werden in der Größenverteilung mit ihrem tatsächlichen Volumen angezeigt. Einhergehend mit dem Zelltod wird die Zellmembran durchlässig für den elektrischen Strom. Tote Zellen werden deshalb in der Größenverteilung deutlich kleiner, in etwa mit der Größe ihres Zellkerns erfasst.

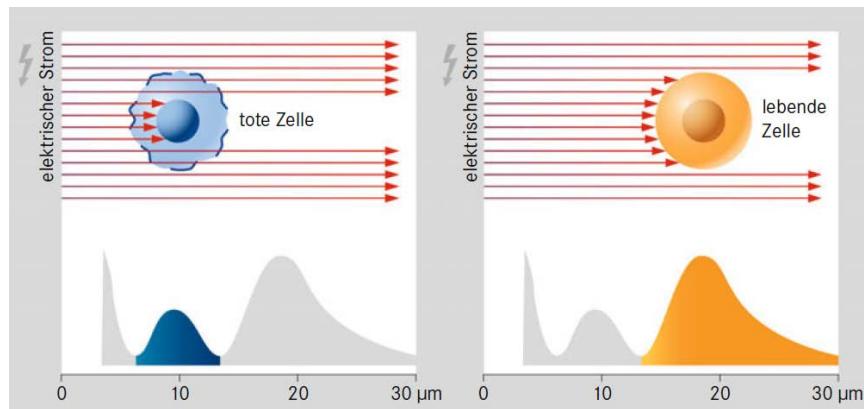


Abbildung 9: Prinzip des Stromausschlussverfahrens mit dem Histogramm der Verteilung von Zelldebris, Zellkern (tote Zellen) und lebenden Zellen (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

Durchführung:

1. Vorsichtiges Absaugen des Mediums ($150 \mu\text{l}/\text{Well}$) aus den 96-Well-Platten
2. Einmaliges Waschen mit warmem PBS ($200 \mu\text{l}/\text{Well}$)
3. Vorsichtiges Absaugen des PBS mit einer Kanüle
4. Ablösen der Zellen: Zugabe von Kollagenase (Konzentration $0,1 \text{ U/mL}$ ($50 \mu\text{l}/\text{Well}$))
5. Inkubation für 3-5 min. im Brutschrank
6. Kontrolle des Ablösevorgangs mittels Lichtmikroskop (eventuell erneute Inkubation)
7. Abstoppen der Proteaseaktivität der Kollagenase durch Zugabe von Wachstumsmedium $100 \mu\text{l}/\text{Well}$
8. Lagerung der Zellen in den 96-Well-Platten auf Eis
9. Resuspendieren der Zellen und Entnahme von $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension
10. Zugabe der Zellsuspension in 5 ml Casyton (Verdünnung 1:51), Mischen
11. Bestimmung von Zellzahl, Zelldimensionen (Durchmesser, Volumen) und Aggregationsfaktor

3.9 Mitochondriale Stoffwechselaktivität - MTS-Messung

Prinzip: Dieser Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zahl von lebenden Zellen. MTS steht für ein gelbes Tetrazoliumsalz. Das Prinzip des MTS-Tests beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Das Tetrazoliumsalz MTS wird in lebenden Zellen durch das Reduktionsäquivalent NADH + H⁺ unter Anwesenheit des Elektronenüberträgers Phenazinethosulfat (PES) zu einem Formazansalz umgewandelt. Die Absorption des Formazans wird bei 490 nm gemessen und ist ein Maß für die Stoffwechselleistung/Vitalität der Zellen (Herstellerangaben).

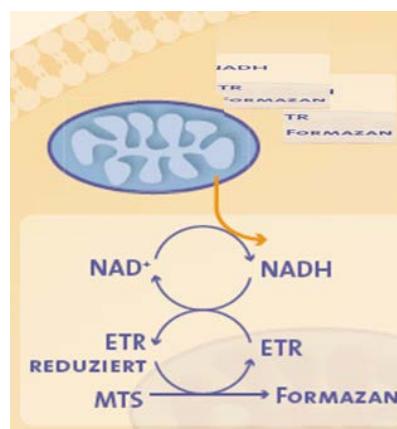


Abbildung 10: Bestimmung der Zellzahl durch Messung der metabolischen Aktivität der Zellen (MTS-Test). Dieser Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen, die das Substrat MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2H-tetrazoliumsalz) mit Hilfe des Elektronenüberträgers PES (Phenazinethosulfat) zu Formazan umwandeln. ETR: Electron Transfer Reagent Elektronenüberträger, NADH: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen = Reduktionsäquivalent. (Berridge and Tan, 1993)

Durchführung:

1. Aussaat von Endothelzellen ($5 \cdot 10^3$ Zellen/Well); Inkubationszeit: 7 Tage
2. Zellkulturüberstand abgesaugen, einmal mit PBS waschen, Zugabe von 120 µl MTS-Lösung (100µl Basalmedium + 20µl MTS), Inkubationszeit im Brutschrank 60 min.
3. Messung des MTS-Reaktionsproduktes bei 490/650 nm (ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät); Leerwert (Medium mit MTS). Vierfachbestimmung.

3.10 Vitalitätsfärbung mit Calcein-AM

Prinzip: Calcein AM dringt durch die Zellmembran in vitale Zellen ein, wo die Acetoxymethyl-Gruppe enzymatisch durch Esterasen abgespalten wird. Das hierdurch entstehende Calcein verbreitet sich in der ganzen Zelle einschließlich der Mitochondrien und des Zellkernes. Intrazellulär ist Calcein in der Lage, Calcium zu binden und führt damit zu einer leuchtend grünen Fluoreszenz (Excitation 485 nm, Emission 520 nm).

Der Reaktionsverlauf bei Calcein-AM gefärbten Endothelzellen wurde im Fluorometer (Wallac 1420 Multilabel counter) im Abstand von 15 – 20 s registriert.

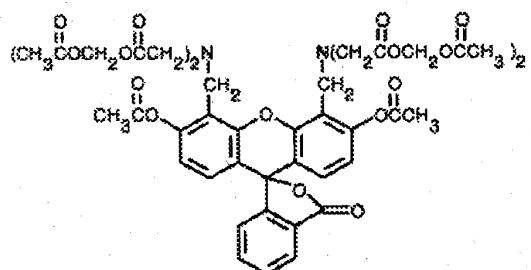


Abbildung 11: Calcein-AM (Wikipedia)

Durchführung:

1. Leere 96-Well-Platten mit 100 µl steriler PBS-Lösung füllen und im Wallac 1420 Mutilabelcounter messen (Hintergrundfluoreszenz)
2. PBS vorsichtig absaugen
3. Herstellung einer Verdünnungsreihe von HSVECs, Aussaat und Inkubation für 24 h im Brutschrank
4. 1 µM Calcein-AM-Lösung in PBS herstellen
5. Medium über Zellen entfernen, 1x mit PBS waschen, Zugabe von 100 µl PBS, Bestimmung der Fluoreszenzintensität
6. PBS-Lösung entfernen, 100 µl Calcein-AM-Lösung auf Zellen geben, für 15 min bei 37°C inkubieren und anschließend Fluoreszenzintensität messen

3.11 Adhäsion von PBMCs an Endothelzellen

Endothelzellen können im direkten Kontakt mit Biomaterialien aktiviert werden (Lehle et al., 2003). Die Aktivierung ist ein Maß für die inflammatorische Aktivität der Endothelzellen. Durch die direkte Bindung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) an Endothelzellen kann die inflammatorische Wirkung von Biomaterialien auf kultivierten Endothelzellen dargestellt werden.

Die PBMC wurden aus EDTA–Vollblut von gesunden Spendern mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Calcein–AM gefärbt und mit Endothelzellen, die auf den verschiedenen Testmaterialien kultiviert wurden (mit und ohne TNF alpha-Behandlung), koinkubiert. Im Anschluss wurde unter mikroskopischer Kontrolle mit PBS gewaschen, bis keine PBMC mehr im Überstand zu sehen waren. Die adhärenten PBMCs wurden mit Detergents (1% Triton X-100) lysiert und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Anzahl der gebundenen PBMCs.

Durchführung:

1. Aussaat von HSVECs wie oben beschrieben
2. Am Tag 7 wurde eine Hälfte der Zellen für 4 Stunden mit Tumornekrosefaktor Alpha (TNF Alpha) (10 ng/ ml, in Wachstumsmedium) inkubiert
3. Abnahme von 25 ml Vollblut in EDTA-Röhrchen, 15 min ruhen lassen
4. 15 ml Ficoll-Lösung in 50 ml-Röhrchen vorlegen und kurz zentrifugieren, sodass die Ficoll-Lösung unter die Separationsmembran gedrückt wird.
5. Vollblut 1:1 mit PBS verdünnen und in das Röhrchen über den Filter schichten
6. Zentrifugieren: Raumtemperatur, 1800 Umdrehungen pro Minute (UpM), ohne Bremse, 15 min. Dabei sacken die Erythrozyten und Granulozyten unter die Ficoll-Lösung, das Plasma und Blutzellen bleibt über der Ficoll-Lösung. Dabei bilden PBMCs eine feine Schicht zwischen Ficoll und Plasma, die Interphase.
7. Überführen der Interphase („BuffyCoat“) in ein frisches 50ml Falcon und 2x waschen mit PBS (50 ml)
8. Zentrifugieren: 4°C, 1100 UpM, mit Bremse, 10 min
9. Resuspendieren des Zellpellets in 2 ml Endothel-Basalmedium
10. Calcein-AM-Färbung der PBMCs, Zugabe von 10 µl Calcein-AM, mischen
11. Inkubieren im Brutschrank, 15 min

12. Auffüllen ca. 50 ml 1xPBS
13. Zentrifugieren: 4°C, 1100 UpM, mit Bremse, 10 min
14. Zellpellet mit 2ml Endothel-Basalmedium resuspendieren
15. Zellzahlbestimmung im CASY
16. Verdünnen der PBMC's auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml
17. Seriellen Verdünnungsreihe herstellen: $7,5 \times 10^3$ bis 2×10^5 PBMCs/150µl Medium zur Ermittlung einer Standardgeraden
18. Kulturüberstand der Endothelzellen (aktivierte und nicht-aktivierte) wird vor PBMC-Zugabe entfernt
19. Zugabe von 150 µl der PBMC Suspension zu den Endothelzellen.
20. Koinkubation mit Endothelzellen bei 37°C, 5% CO₂ für 15 min
21. 2x Waschen mit PBS
22. Zugabe 120 µl Triton X-100 (1%ig) für 1 h, Raumtemperatur, Schüttler, dunkel
23. Einfrieren der Proben über Nacht bei -18°C
24. Auftauen der Proben auf dem Schüttler im Dunkeln
25. Messen der Fluoreszenzintensität (0,1 s, 485 nm - 535 nm)

3.12 Adhäsion von Thrombozyten an Biomaterialien - Hämokompatibilität

Zunächst wurden Thrombozyten aus Zitratblut von gesunden männlichen Freiwilligen gewonnen. Die Blutspender hatten alle ihr schriftliches Einverständnis erteilt (gemäß der ethischen Richtlinien der Institution, Ethikvotum-Nr. 10-101-0159). Die Isolierung der Thrombozyten und der Thrombozytenadhäsionstest wurden im Detail in der Dissertation von S Riescher (Riescher et al., 2014) beschrieben.

Bevor die Thrombozyten-Adhäsionstests durchgeführt wurden, wurde der Aktivierungsstatus aller Thrombozyten-Proben mit Durchflusszytometrie getestet. Die Testung wurde freundlicherweise von Frau K Bielenberg durchgeführt. Vorgehen und Daten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt. Ein Aliquot der Thrombozytensuspension wurde mit spezifischen Antikörpern markiert (anti-human CD41-FITC und anti-human CD62P-APC (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien)) (24 Stunden bei 4°C) und wurde dann analysiert. Nur Thrombozyten-Präparate mit weniger als 5-10% CD41+CD62P+ Zellen wurden für die Thrombozyten-Adhäsionstests verwendet.

Durchführung des Thrombozytenadhäsionstests:

1. Ein Teil der EC wurden mit TNF alpha stimuliert: Aktivierung der Endothelzellen mit TNF alpha durch Pipettieren von 10 µl einer TNF alpha -Lösung der Konzentration 160 ng/ ml, in die dafür vorgesehenen Wells mit 150 µl Medium. Volumen pro Well ist dann also 160 µl mit einer Konzentration an TNF alpha von 10ng/ml. Ein zweiter Teil der EC wurde mit Kulturmedium 4 Stunden inkubiert
2. Inkubation der Platte mit den aktivierten und nicht aktivierten Zellen im Brutschrank für 4 Stunden bei 5% CO₂, 37°C
3. Abnahme von Vollblut in Citrat Blutröhrchen (vorher 1 EDTA- Blutröhrchen abnehmen und verwerfen um Aktivierung der Thrombozyten durch Einstich und Kunststoffberührung zu vermeiden); Blut 15 min ruhen lassen.
4. Zentrifugieren: Raumtemperatur (RT), 1100 UpM, ohne Bremse, 15 min
5. Überführen der Plasma-Thrombozyten-Fraktion (über den sedimentierten Erythrozyten und Leukozyten) in Polypropylen-Röhrchen
6. Verdünnung der Thrombozytenfraktion mit Acid-Citrate-Dextrose (ACD) auf 10%
7. Zentrifugieren: Raumtemperatur, 1400 UpM, 10 min
8. Resuspendieren des Zellpellets in 1ml RPMI+10% ACD
9. Zugabe von 5 µl Calcein-AM 1mg/ml, 37°C, 5% CO₂, 15min
10. PP-Röhrchen mit Zellkulturmedium RPMI+10% ACD auffüllen
11. Zentrifugieren: RT, 1400 Upm, 10min
12. Überstand absaugen, resuspendieren mit 1 ml RPMI ohne ACD
13. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer, aber nach Befüllen erst 5 min ruhen lassen
14. Serielle Verdünnungsreihe erstellen (mit 50 µl/well), beginnend mit der unverdünnten Konzentration
15. 50 µl/well Thrombozyten auf Endothelzellen für 30 min im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂
16. Mehrmaliges Waschen mit 1x PBS
17. Zugabe von 120 µl Triton (1%) für 1 h, RT, dunkel, auf dem Schüttler
18. Einfrieren der Proben über Nacht bei -18°C
19. Auftauen der Proben auf dem Schüttler im Dunkeln bei Raumtemperatur
20. Messen der Fluoreszenz (0,1 s, 485 nm – 535 nm)

Durchführung des Nachweises von Thrombozyten auf PU-Materialien mit REM:

1. Abnahme von Vollblut in Citrat Blutröhrchen (vorher 1 EDTA- Blutröhrchen abnehmen und verwerfen um Aktivierung der Thrombozyten durch Einstich und Kunststoffberührung zu vermeiden); Blut 15 min ruhen lassen.
2. Zentrifugieren: Raumtemperatur (RT), 1100 UpM, ohne Bremse, 15 min
3. Überführen der Plasma-Thrombozyten-Fraktion (über den sedimentierten Erythrozyten und Leukozyten) in Polypropylen-Röhrchen
4. Fluoreszenz -aktivierte Zellsortierung:
 - a) FACS-Röhrchen: 20µl CD41pe + 20µl CD62p-apc + 40µl 1x PBS vorlegen, Zugabe 20µl PRP
 - b) FACS-Röhrchen: 80µl 1x PBS vorlegen, Zugabe 20µl PRP
5. Inkubation der beiden Röhrchen im Brutschrank 5min, 5% CO₂.
6. Zugabe von 3ml 1,5% BD FACS Lysing Solution (BD-Lyse), 10min, RT, dunkel
7. Zentrifugieren: Raumtemperatur (RT), 1100 UpM, ohne Bremse, 5 min, verwerfen der ÜS bis auf 200µl
8. Proben im FACS messen
9. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer, aber nach Befüllen erst 5 min ruhen lassen
10. Vorbereitung der PU-Materialien
11. Plättchen für ca. 10sec in 70% EtOH halten, dann für ca. 10sec in dest. Wasser halten, danach in 48well Zellsuspensionsplatte legen.
12. Thrombozytenadhäsion:
13. Zellsuspension herstellen (pro well 5,2e7 Thrombos in 150µl Medium = bestimmte Menge Medium + Zugabe von bestimmter Menge an Thrombozyten)
14. 150µl Zellsuspension/ well aussäen. Blank-Plättchen: 150µl Medium zugeben oder trocken lassen (die Plättchen nur kurz mit einem kleinen Tropfen bi-dest. Wasser (Millipore) benetzt, abgesaugt und sofort ins Vakuum des Raster eingeschleust)
15. 1h, RT, auf Schüttler langsam schütteln lassen
 1. ÜS vorsichtig verwerfen, 2x Zugabe von 400µl 1x PBS,
 2. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 30% EtOH, 1h, RT
 3. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 70% EtOH, 1h, RT
 4. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 70% EtOH, ü.N. 4°C
 5. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 90% EtOH, 1h, RT

6. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 96% EtOH, 1h, RT
 7. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 1000% EtOH, 1h, RT
 8. ÜS vorsichtig verwerfen, Zugabe von 1ml 1000% EtOH, 1h, RT
16. Probe Kritisch-Punkt-Trocknung mit BALZERS CPD 030 und mit Kohle bedampfen
 17. Probe im Hochvakuum
 18. Rasterelektronenmikroskop

3.13 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur Analyse wurden der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und der Friedman-Test verwendet (SPSS-Version 20.0, IBM SPSS Statistics, USA). p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Alle Analysen in der statischen Zellkultur wurden vierfach mit 8 verschiedenen Kulturen durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine funktionelle Titanbeschichtung die Bio- bzw. Hämokompatibilität von verschiedenen PUs verbessert.

4.1 Schichtzusammensetzung der titanisierten PU-Oberflächen

Die Schichtzusammensetzung wurde mittels XPS untersucht. Wie aus **Abbildung 12** ersichtlich wird, setzt sich die Oberflächenbeschichtung der beschichteten PU (ti_PU_1-4) neben Titan (Ti) auch aus den Elementen Kohlenstoff (C), Stickstoff (N) und Sauerstoff (O) zusammen.

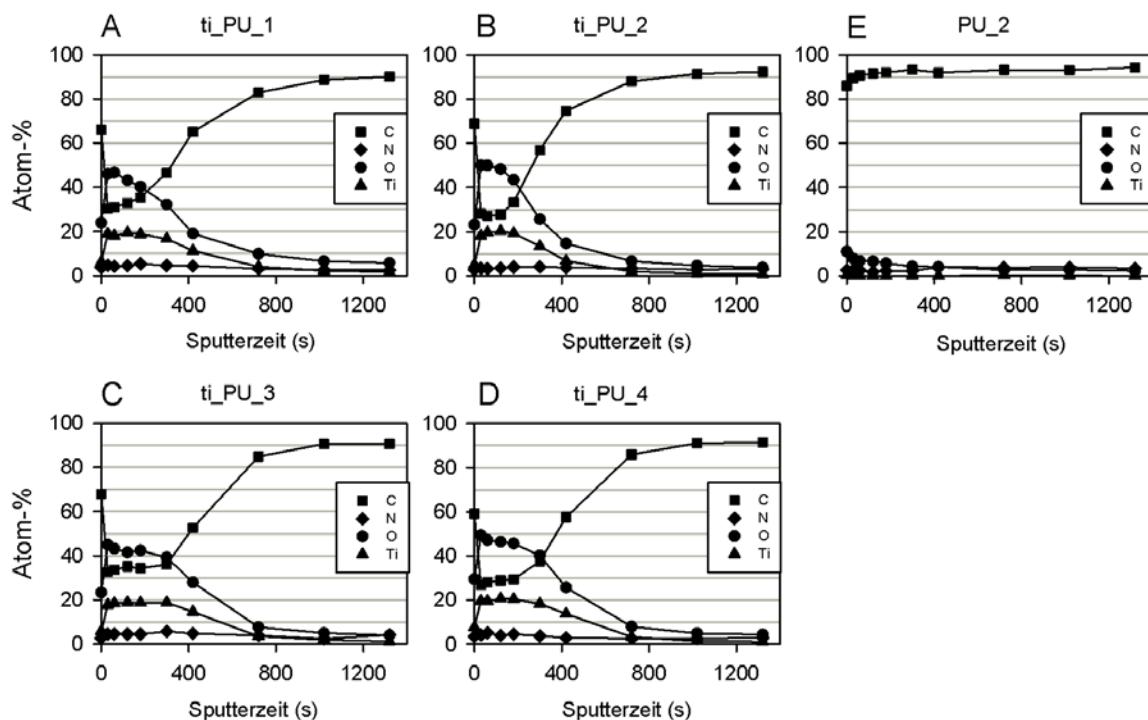


Abbildung 12: XPS-Diagramm für titanisierte Polyurethane. Die Oberflächenbeschichtung der 4 verschiedenen Polyurethane (PU_1 bis 4) setzt sich aus Titan (Ti), Kohlenstoff (C), Stickstoff (N) und Sauerstoff (O) zusammen. Während des Sputter-Prozesses (steigende Sputter-Zeit) ändert sich die Zusammensetzung der einzelnen Elemente (Details siehe Text). Die Zusammensetzung der Schicht ist für alle PUs gleich.

Während des Sputter-Prozesses stieg der Titangehalt in den ersten 30 s auf 18-20 Atom% an und blieb für bis zu 300 s stabil. Zwischen den Materialien gab es keine Unterschiede hinsichtlich Titangehalt und der Sputter-Zeit (Abb. 12 A-D). In diesem Zeitfenster lag der

Gehalt an C und O im Mittel bei 30 bzw. bei 40 Atom%, während der Gehalt an N unverändert zwischen 1 und 4 Atom% war. Mit zunehmender Sputter-Zeit nahm der Ti- und O-Gehalt allmählich ab, wohingegen die Kurven des C einen starken Anstieg verzeichneten. Dies entspricht dem Übergangsbereich zwischen Beschichtung und Grundsubstanz. Bei den unbeschichteten PU-Oberflächen war der Gehalt an C von Anfang an mit etwa 90 Atom% am höchsten, während der Anteil an O und N < 10 Atom% war. Es wurde kein Ti nachgewiesen. Die Analyse von unbeschichtetem PU_2 ist exemplarisch in Abb. 12 E dargestellt.

4.2 Oberflächencharakterisierung von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen mittels REM

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) können topographische Änderungen der PU-Oberflächen nach Titanbeschichtung untersucht werden. Aufgrund der geringen Schichtdicke und den Ergebnissen aus einer früheren Untersuchung (Lehle et al., 2004), in der gezeigt werden konnte, dass durch das PACVD-Verfahren die Topographie von verschiedenen Kunststoffoberflächen nicht verändert (Lehle et al., 2004) wird, wurden die blanken Oberflächen der beschichteten und unbeschichteten PU-Materialien nicht separat im REM charakterisiert. Bei der Untersuchung der Thrombozytenadhäsion wurden „Risse“ in der Titanschicht identifiziert. Diese Veränderungen in der Titanschicht wurden bei allen 4 PU-Materialien nachgewiesen.

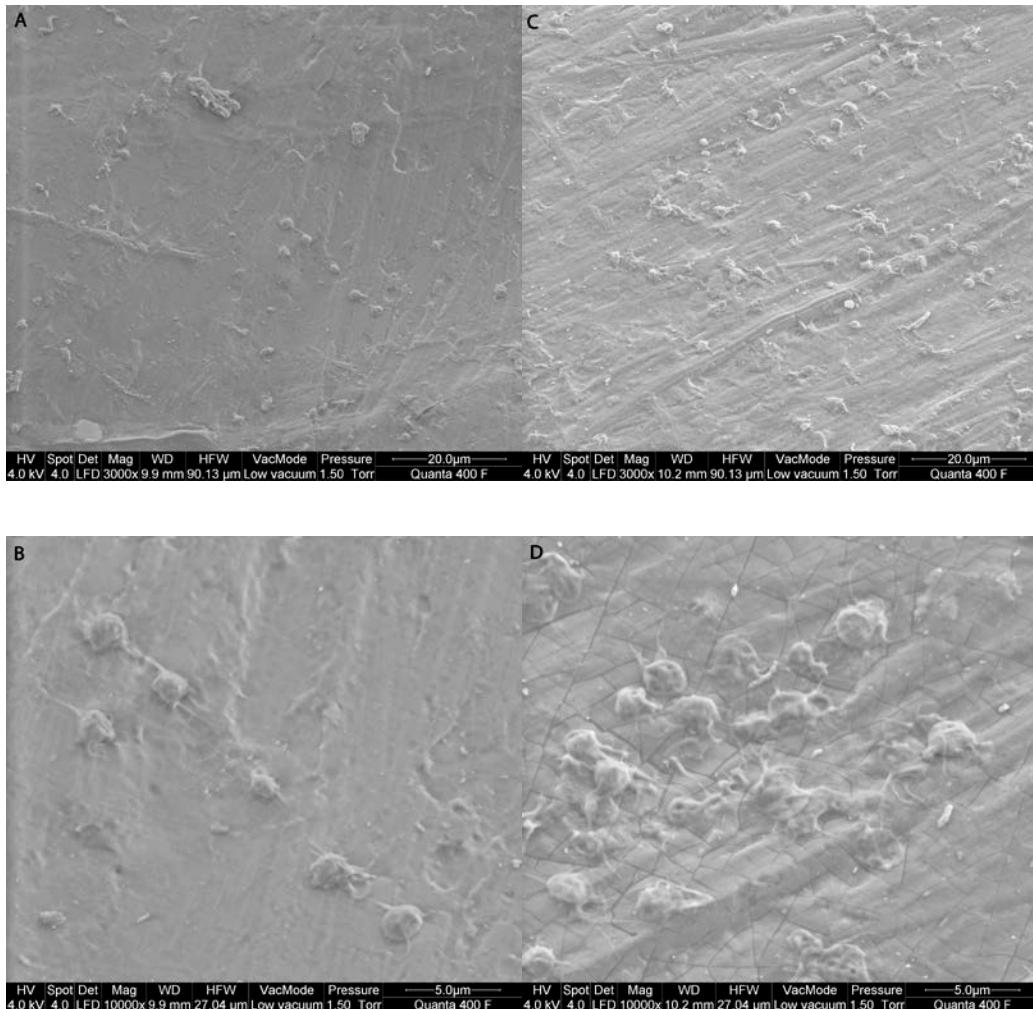


Abbildung 13a-d: Topographie von unbeschichtetem PU_3 (links) und titanisiertem PU_3 mittels REM. Die Aufnahmen stammen aus den Untersuchungen zur Thrombozytenadhäsion. Obere Reihe: Vergrößerung 1:3000; untere Reihe: Vergrößerung 1:10000. Die Topographie der PU-Oberfläche wurde durch die Titanbeschichtung nicht verändert. Jedoch traten in der Titanschicht „Risse“ auf, die insbesondere bei 10 000-facher Vergrößerung (unten) deutlich hervortraten. Die Thrombozyten überdeckten diese Risse in der Titanschicht.

4.3 Endothelzelladhäsion von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen

Um die Biokompatibilität von Biomaterialen zu testen, wurde zunächst die Endothelzelladhäsion auf die spezifischen Oberflächen analysiert (**Abbildung 14**). Ausgesät wurden 20000 Zellen pro $0,3\text{ cm}^2$ für 24 Stunden.

Die meisten Zellen adhärierten auf TCP, jedoch ließ sich nach 24 Stunden nur noch die Hälfte der ausgesäten Zellen nachweisen. Im Allgemeinen war der Grad der Endothelzelladhäsion von der Art des PU abhängig. Die Titanbeschichtung führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Zelladhäsion. Die Beschichtung von PU_3 führte zu einer Zunahme der Zelldichte, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Nur wenige Endothelzellen adhärierten auf Polycarbonat-basierten (PU_4) Materialien; bevorzugt wurden Polyether-basierte (PU_1, PU_2, PU_3) Materialien. Bei den unbeschichteten PU-Materialien zeigte im Vergleich zu TCP PU_1 ($90 \pm 1\%$) die höchste Zelldichte, gefolgt von PU_2 ($64 \pm 15\%$; *, $p \leq 0,05$) und PU_3 ($45 \pm 22\%$; *, $p \leq 0,05$).

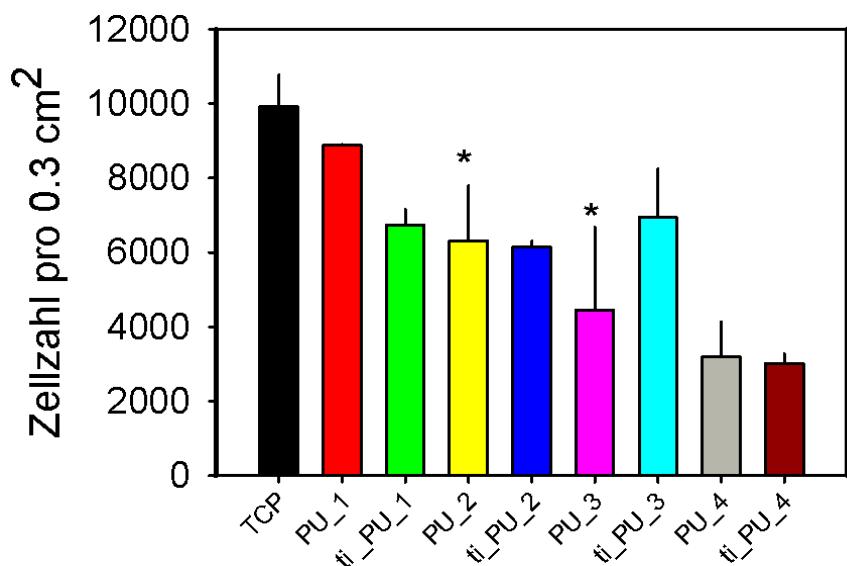


Abbildung 14: Adhäsion von Endothelzellen auf verschiedenen Biomaterialen nach 24 Stunden. Die Zellen wurden auf die getesteten Materialen PEU (PU_1, PU_2, PU_3) und PCU (PU_4) mit und ohne die Titanschichtung und tissue-culturedpolystyrole (TCP) für 24 Stunden ausgesät (20000 Zellen per $0,3\text{cm}^2$) und anschließend die Zellzahl pro Kulturoberfläche ($0,3\text{cm}^2$) mittels CASY bestimmt. *, $P \leq 0,05$ im Vergleich zu TCP

4.4 Zellvitalitätbestimmung mit Calcein-AM

Um die Vitalität von HSVECs zu untersuchen, wurden die Testmaterialien mit Endothelzellen besiedelt, für 24 Stunden inkubiert und danach mit Calcein-AM gefärbt. Die Fluoreszenzintensität gibt Auskunft über die Vitalität der Zellen.

In **Abbildung 15** ist die Fluoreszenzintensität der lebenden Endothelzellen, die auf PEU (PU_1, PU_2, PU_3) und PCU (PU_4) mit und ohne die Titanbeschichtung und tissue-cultured polystyrole (TCP) adhärierten, dargestellt. Vor der Färbung mit Calcein-AM lag die Hintergrundfluoreszenz der PU-Testmaterialien (mit und ohne Beschichtung) im Mittel um Faktor 2 höher, als TCP. Durch die Calcein-Färbung werden die vitalen Endothelzellen auf der TCP-Oberfläche sichtbar (Zunahme um Faktor 13). Während bei unbeschichteten PU-Materialien (PU_1-4) keine vitalen Zellen nachweisbar waren, wies eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei ti_PU_1, _2 und _3 auf das Vorhandensein von lebenden Zellen hin. Der Anstieg war am geringsten bei ti_PU_1. Die Titanisierung von PU_4 verhinderte die Adhäsion von vitalen Endothelzellen.

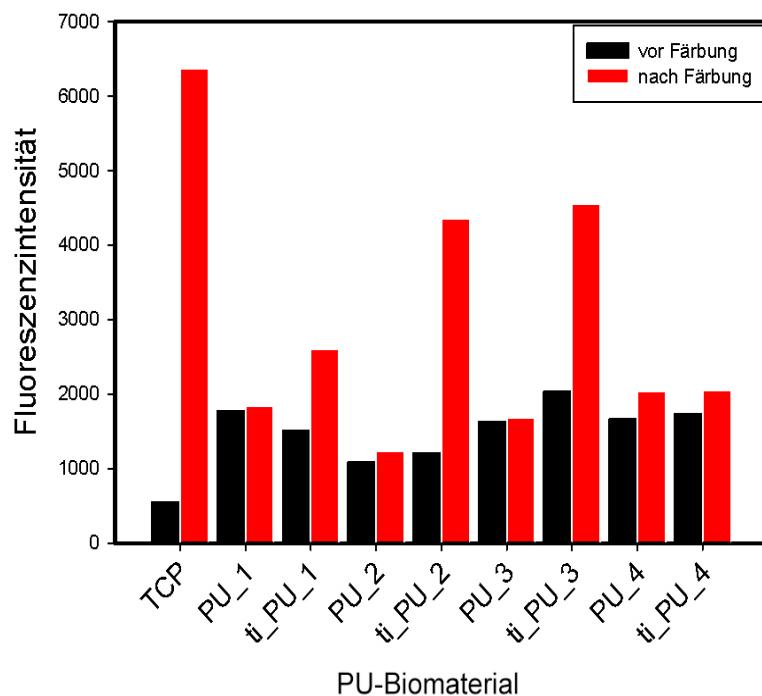


Abbildung 15: Nachweis von lebenden Endothelzellen (EC) auf verschiedenen PUs. Nach Inkubation von Endothelzellen mit PU-Biomaterialien wurde deren Vitalität mittels Calcein-AM-Färbung bestimmt (Details siehe Material und Methoden).

4.5 Proliferation von Endothelzellen auf unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen

4.5.1 Proliferationseigenschaften von HSVECs auf TCP

Zunächst wurden die Wachstumseigenschaften von 8 verschiedenen HSVEC-Kulturen (K553, K557, K563, K565, K554, K556, K682, K562) auf normaler Kulturoberfläche (TCP) über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt. Die Zellen jeder Kultur stammten aus einer portionsweise eingefrorenen Ausgangskultur. Es wurden drei Versuchsansätze unabhängig voneinander durchgeführt. Ausgehend von 5000 Zellen wurde die Zellzahl am Tag 3, 5 und 7 nach Aussaat bestimmt.

Trotz gleicher Ausgangsbedingungen (gleiche Vorkultur und gleiches Kultivierungsprotokoll) wuchsen die Zellen ein und derselben Kultur in drei unabhängigen Versuchen unterschiedlich.

Die Zellzahl war im 1. Versuch bei allen Kulturen und zu jedem Zeitpunkt niedriger als beim 2. und 3. Versuch (**Abbildung 16**). Im 1. Versuch zeigte sich erst nach dem Tag 5 eine Zunahme der Zellzahl (> 5000 Zellen). Bei einer Kultur (K553) nahm die Zellzahl vom Tag 5 auf den Tag 7 sogar noch ab.

Im 3. Versuch bot sich eine Zunahme der Zellzahl am Tag 5 und Tag 7. Bei sieben von acht Kulturen bot sich ein sigmoider Verlauf mit einer verzögerten Anfangsphase (Lag-Phase), einer exponentiellen Wachstumsphase (zwischen dem Tag 3 und Tag 5) und eine stationäre Wachstumsphase (Tag 7.).

Fasst man alle Ergebnisse zusammen (drei Versuche, je acht Kulturen), so war im Versuchszeitraum von fünf Tagen eine exponentielle Zunahme der Zellzahl zu beobachten. Die Zellzahl nahm um mehr als das Siebenfache zu. Es wurden maximal Zellzahlen von bis zu 70000 Zellen gezählt. Es ergab sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl von Tag 3 auf Tag 5 ($p \leq 0,003$) bzw. auf Tag 7 ($p \leq 0,001$). Dagegen nahm die Zellzahl von Tag 5 auf Tag 7 nicht mehr signifikant zu ($p=0,605$). Traten am Tag 3 noch große Lücken im Zellrasen auf (**Abbildung 17**), so war der Zellverband am Tag 7 geschlossen (**Abbildung 17**).

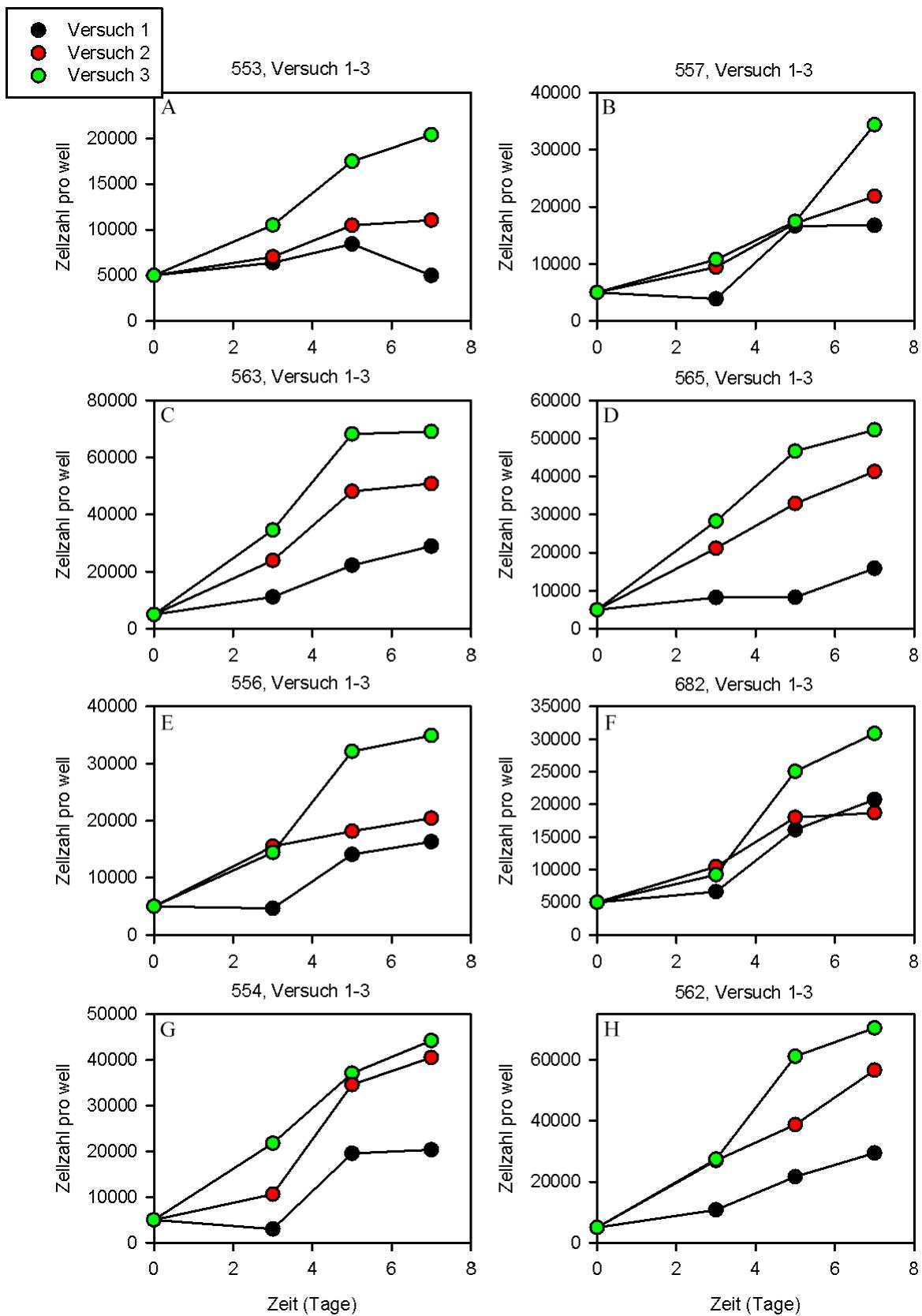


Abbildung 16: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Kulturen von HSVEC in drei unabhängigen Versuchsansätzen. Es wurden jeweils 5000 Zellen pro Well ($0,3 \text{ cm}^2$) auf 96-Well-Kulturplatten in EC-Medium ausgesät. Zu den Zeitpunkten Tag 3, 5, 7. wurde die Zellzahl mit dem CASY bestimmt.

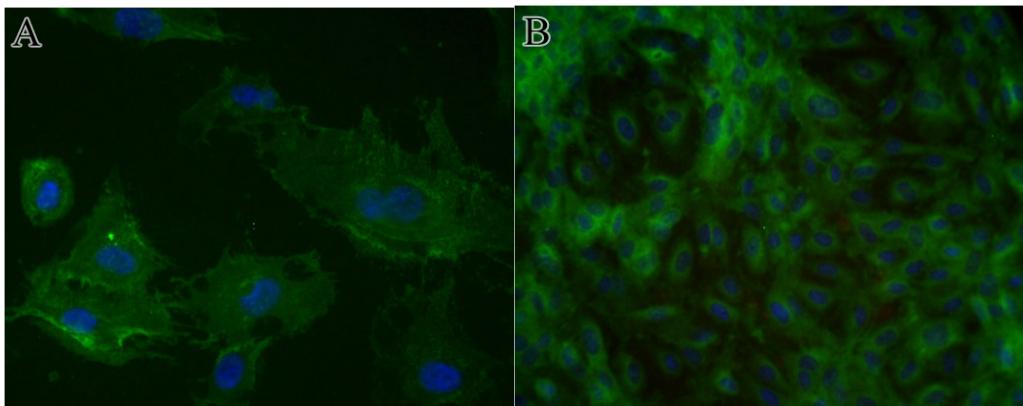


Abbildung 17: Repräsentative Fluoreszenzbilder von HSVEC. ECs wurden mit jeweils 5000 Zellen pro $0,3 \text{ cm}^2$ Kulturfläche in 96-Well-Kulturplatten mit EC-Medium ausgesät und am Tag 3 (A) und Tag 7 (B) die Konfluenz des Zellrasens im Mikroskop dokumentiert. Zur Visualisierung wurden die Zellen mit Lectin gefärbt.

4.5.2 Proliferationseigenschaften von HSVECs auf verschiedenen unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen

Die Fähigkeit von Endothelzellen zu proliferieren, war ein weiteres essentielles Kriterium für die Abschätzung der Biokompatibilität verschiedener Biomaterialien. **Abbildungen 18 - 20** zeigen den Einfluss der PU-Materialien auf die Zellzahl der einzelnen Kulturen zu den einzelnen Zeitpunkten der Wachstumskurve (Versuch 3). Für die statistische Analyse wurden alle Daten von Versuch 1-3 verwendet (Tabelle 7).

Aufgrund der hohen Variabilität der Zellzahlen von ein und derselben Kultur in unabhängigen Versuchen wurde für jeden Materialtest immer eine Positivkontrolle, nämlich die entsprechende HSVEC-Kultur auf TCP, mitgeführt. Die entsprechenden Zellzahlen auf den Testmaterialien wurde zur Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt ($\text{TCP} = 100\%$).

Am Tag 3 nach Aussaat (**Abbildung 18**) lag die Zellzahl auf den vier unbeschichteten PU-Materialien bei 5 von 8 Kulturen (63%) unterhalb der Nachweisgrenze des CASY. Auf PU_4 waren bei keinem Versuch Zellen nachweisbar. Lediglich bei drei Kulturen waren ab dem Tag 3 noch Zellen auf unbeschichteten Materialien nachweisbar. Die zusätzliche Titanisierung der PUs führte zu einer höheren Zelldichte ab dem Tag 3. Die höchsten Werte wurden für ti_PU_3 verzeichnet. Die Zelldichte lag bei 3 von 8 Kulturen sogar über den Werten von TCP.

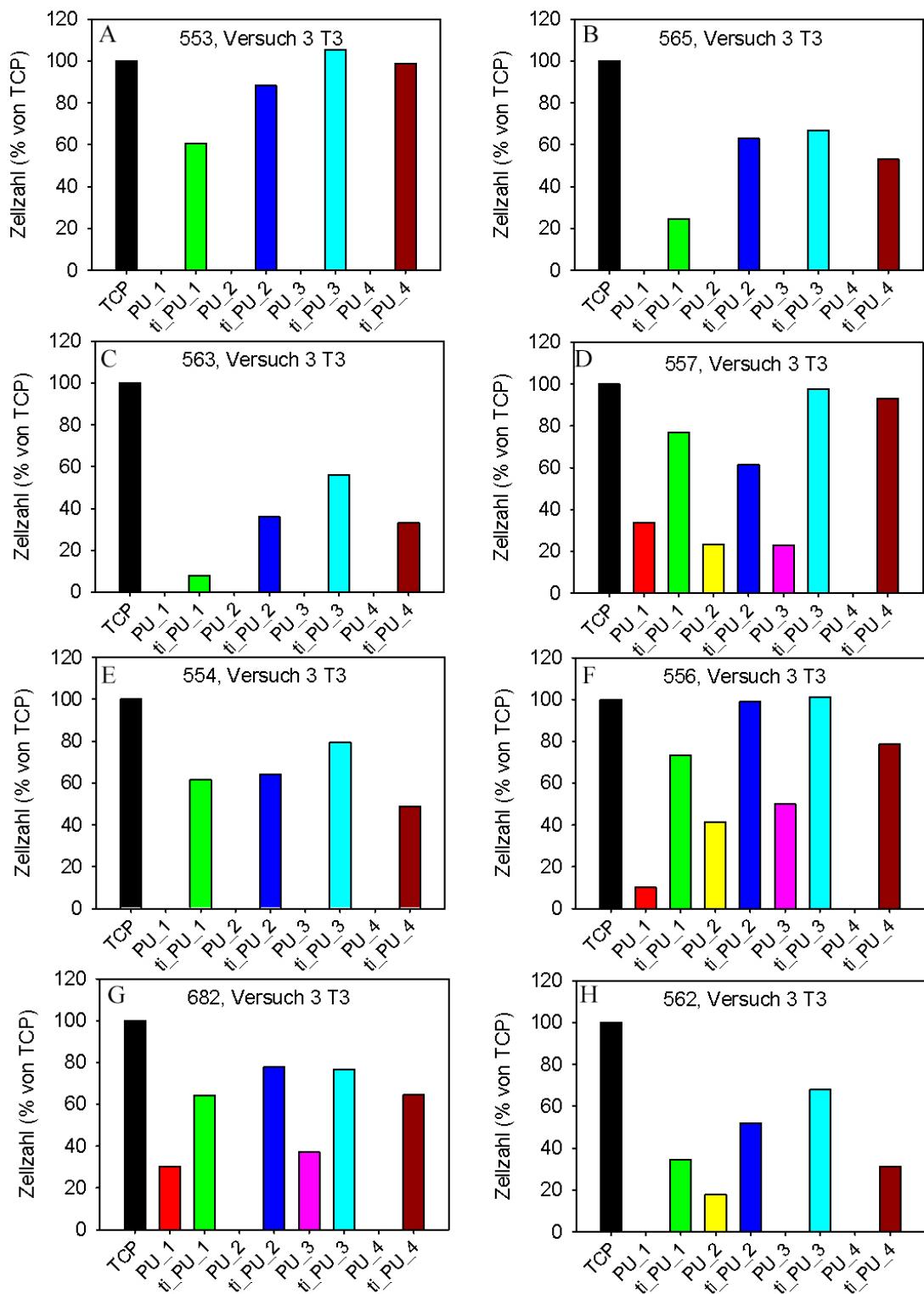


Abbildung 18: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von acht verschiedenen HSVEC-Kulturen auf verschiedenen Biomaterialien am Tag 3 nach Zellaussaat.

Am Tag 5. nach Aussaat (**Abbildung. 19**) lag die Zellzahl auf den vier unbeschichteten PU-Materialien bei 2 von 8 Kulturen (25%) (K554, K562) unterhalb der Nachweisgrenze des CASY. Auf PU_4 waren wieder keine Zellen nachweisbar. Die Zelldichte auf den unbeschichteten PU_1-3 war immer < 40% von TCP. Auf den titanisierten PUs waren dagegen immer Zellen nachweisbar. Vereinzelt wurden sogar Zelldichten erreicht, die genauso groß waren wie für TCP (für ti_PU_2 und ti_PU_3).

Am Tag 7. nach Aussaat (**Abbildung 20**) waren bei 25% der Kulturen (K554, K562) erneut keine Zellen auf unbeschichteten Materialien nachweisbar. PU_4 war wieder ohne Zellen. Die Zelldichte auf den unbeschichteten PU_1-3 war wieder < 40% im Vergleich zu TCP. Eine Ausnahme war K556: Hier war auch am Tag 7 die Zelldichte auf den titanisierten Oberflächen höher als auf den unbeschichteten PUs.

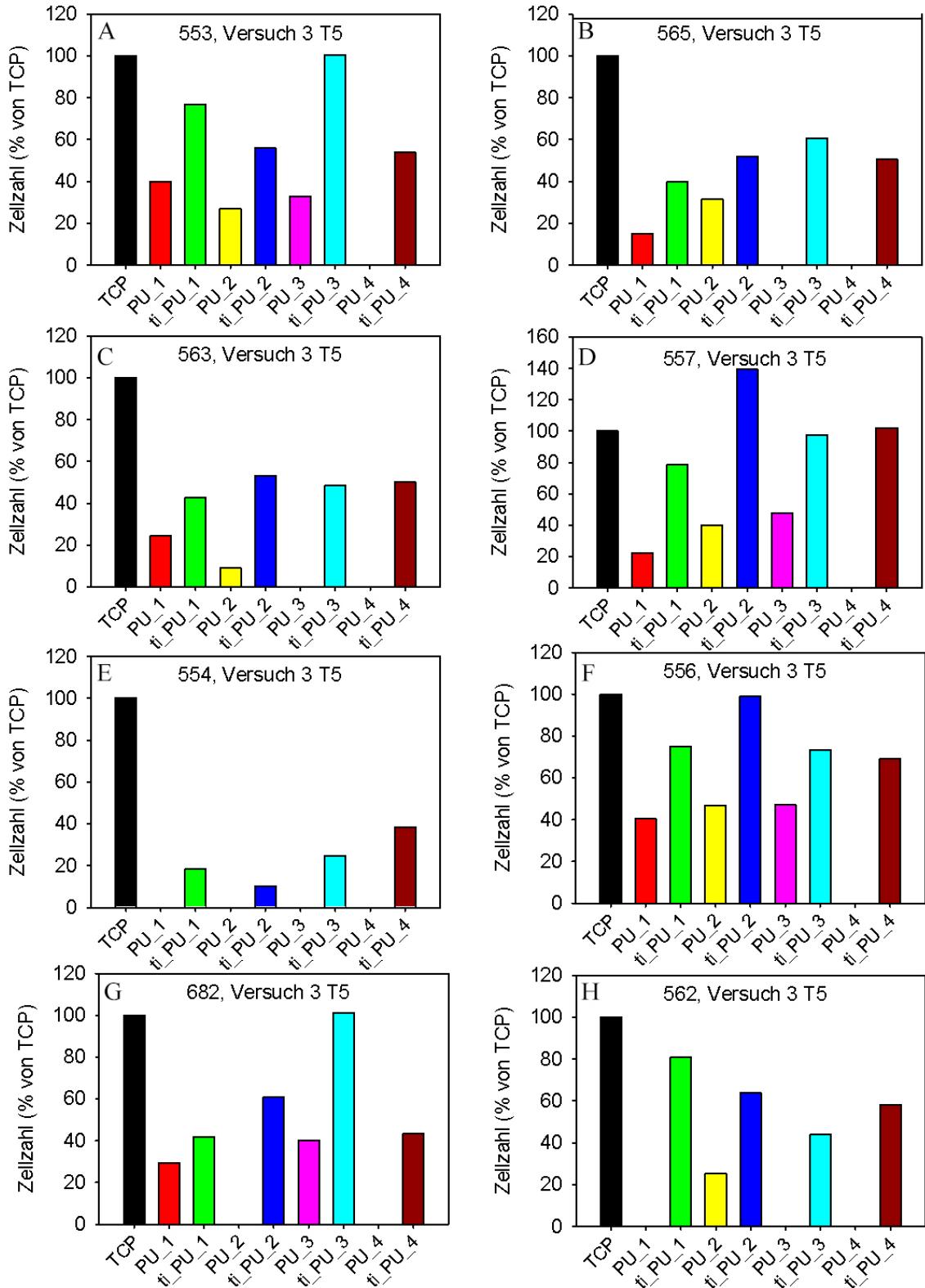


Abbildung 19: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von acht verschiedenen HSVEC-Kulturen auf verschiedenen Biomaterialen am Tag 5 nach Zellaussaat.

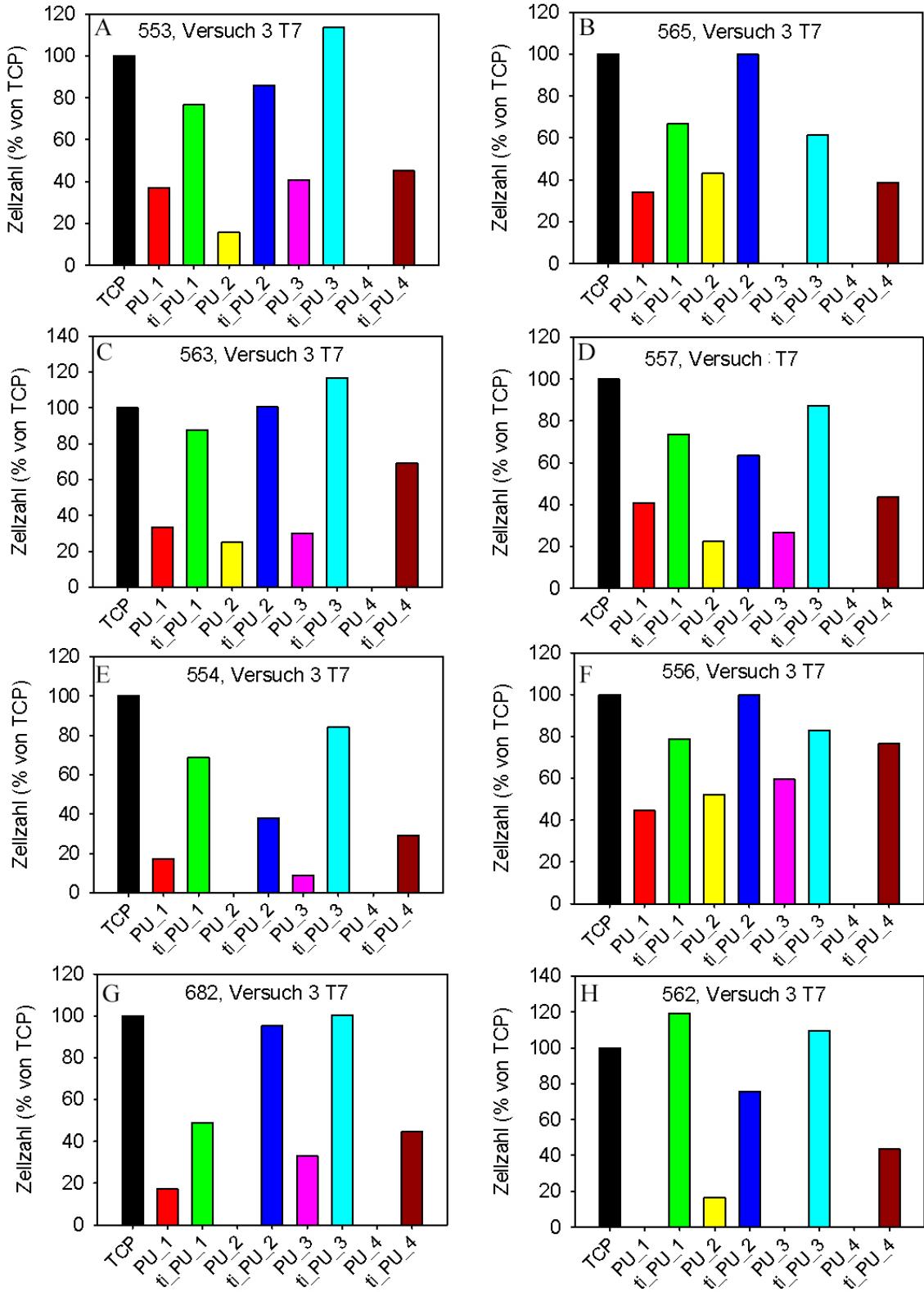


Abbildung 20: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von acht verschiedenen HSVEC-Kulturen auf verschiedenen Biomaterialen am Tag 7 nach Zellaussaat.

Die Proliferationsfähigkeit der Zellen auf TCP (normale Kulturoberfläche) wurde bereits in **Kapitel 4.5.1** gezeigt. Der Einfluss der Materialien auf die Zellproliferation ist in **Abbildung 21** wiedergegeben. Die zugehörige Statistik ist in **Tabelle 7** zusammengefasst.

Vergleicht man die Zellzahlen auf TCP mit den einzelnen Materialien, so waren auf den unbeschichteten Materialien zu jedem Zeitpunkt signifikant weniger Zellen nachweisbar ($p \leq 0,001$). Durch die Titanisierung von PU-2 und PU-3 (ti_BU_2, ti_BU_3) wurde bereits an Tag 3 annähernd die gleiche Zellzahl wie auf TCP erreicht. Dieser Effekt blieb bis Tag 7 stabil. Eine Zunahme der Zellzahl war auch auf ti_BU_1 nachweisbar. Der Effekt war jedoch verzögert, sodass erst am Tag 7 nach Aussaat annähernd gleiche Zellzahlen wie auf TCP erreicht wurden. Die Titanisierung von PU_4 (ti_BU_4) erreichte nie die Ausbeuten von Zellen TCP.

Vergleicht man die Zellzahlen auf den verschiedenen unbeschichteten PU-Materialien, so waren immer signifikant weniger Zellen auf dem polykarbonatbasiertem PU (PU_4) im Vergleich zu allen polyetherbasierten PUs (PU_1 bis PU_3) nachweisbar. Der Effekt war besonders deutlich an Tag 5 und Tag 7 mit $p \leq 0,001$. Am Tag 3 wurde das Signifikanzniveau nur knapp oder nicht (für PU_1 vs PU_4, $p=0,180$) erreicht. Zwischen den polyetherbasierten PUs gab es keine Unterschiede.

Schließlich sollte noch der Frage nachgegangen werden, ob die Titanisierung der einzelnen PUs zu einer Verbesserung der Proliferationsaktivität der Endothelzellen führt. Wie aus **Abbildung 21** und **Tabelle 7** ersichtlich, führte die Titanisierung von allen PU-Materialien zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl ($p \leq 0,001$). Dieser Effekt war bereits 3 Tage nach Aussaat hoch signifikant und blieb über 7 Tage erhalten.

| Tag | Material | TCP | PU-1 | Ti-PU-1 | PU-2 | Ti-PU-2 | PU-3 | Ti-PU-3 | PU-4 | Ti-PU-4 |
|-----|----------|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| 3 | TCP | / | $\leq 0,001$ | 0,038 | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | 0,044 |
| | PU-1 | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | |
| | Ti-PU-1 | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-2 | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | 0,032 | $\leq 0,001$ | |
| | Ti-PU-2 | | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-3 | | | | | / | $\leq 0,001$ | 0,026 | $\leq 0,001$ | |
| | Ti-PU-3 | | | | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-4 | | | | | | | / | $\leq 0,001$ | |
| | Ti-PU-4 | | | | | | | | / | |
| 5 | TCP | / | $\leq 0,001$ | 0,039 | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | 0,03 |
| | PU-1 | / | 0,002 | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | 0,001 | 0,002 | |
| | Ti-PU-1 | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | 0,026 | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-2 | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | 0,001 | |
| | Ti-PU-2 | | | | / | 0,001 | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-3 | | | | | / | $\leq 0,001$ | 0,001 | 0,033 | |
| | Ti-PU-3 | | | | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-4 | | | | | | | / | $\leq 0,001$ | |
| | Ti-PU-4 | | | | | | | | / | |
| 7 | TCP | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | 0,011 |
| | PU-1 | / | 0,003 | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | 0,005 |
| | Ti-PU-1 | | / | 0,002 | n.s. | 0,009 | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-2 | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | 0,004 | |
| | Ti-PU-2 | | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-3 | | | | | / | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ | 0,045 | |
| | Ti-PU-3 | | | | | | / | $\leq 0,001$ | n.s. | |
| | PU-4 | | | | | | | / | $\leq 0,001$ | |
| | Ti-PU-4 | | | | | | | | / | |

Tabelle 7: Zusammenfassung der statistischen Analyse; Signifikante Unterschiede (p-Wert<0,05) der Mittelwerte der Zellzahlen im Vergleich an den Messtagen 3, 5 und 7. Die Normalverteilung der einzelnen Zellzahlen je Bedingung (Kultur, Messtag und Material) wurde mittels kolmogorov-Smirnov Test festgestellt. Somit konnten die Mittelwerte der Zellzahlen auf den verschiedenen Materialien an einem Messtag mittels einfaktorieller ANOVA verglichen werden und ein signifikanter Unterschied identifiziert werden. Varianzhomogenität (Levene-Test) war dabei nicht gegeben und die durchgeföhrten post-Hoc-Test (Dunnet-T3, Signifikanzniveau 0,05) am jeweiligen signifikant ($p>0,05$)

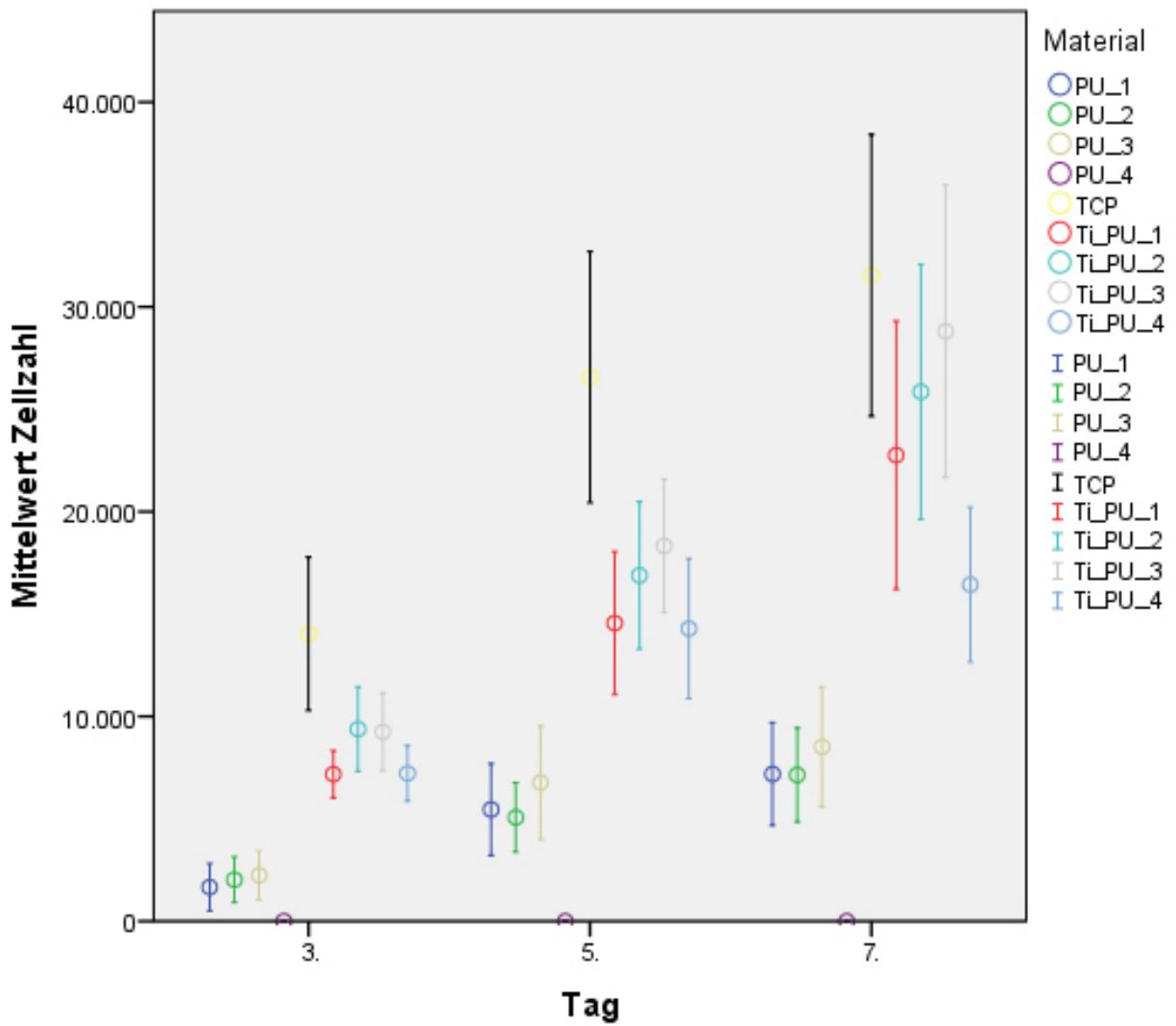


Abbildung 21: Zusammenfassung aller Daten zur Proliferation von HSVECs auf verschiedenen Biomaterialien. Die Zellen wurden auf die getesteten Materialien PEU (PU-1, PU-2, PU-3) und PCU (PU-4) mit und ohne die Titanbeschichtung und tissue-cultured polystyrole (TCP) für sieben Tage ausgesät (5000 Zellen pro $0,3 \text{ cm}^2$) und die Zellzahl mit CASY bestimmt.

4.6 Biokompatibilität von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen

– Mitochondriale Stoffwechselaktivität von Endothelzellen

Die mitochondriale Stoffwechselaktivität der Endothelzellen wurde nach siebentägiger Kultivierung bestimmt. Die Aktivität der EC auf TCP war am höchsten. Dagegen war die MTS-Absorption für die Testmaterialien (egal ob beschichtet oder unbeschichtet) im Mittel um Faktor 2 signifikant niedriger ($p \leq 0,001$). Während die Titanisierung von PU_1 und PU_2 keine Änderung der Stoffwechselleistung bewirkte, war die MTS-Reaktion für ti_PU_3 ($p=0,003$) und ti_PU_4 ($p=0,008$) signifikant höher als für die entsprechenden unbeschichteten PUs. (Abbildung 22)

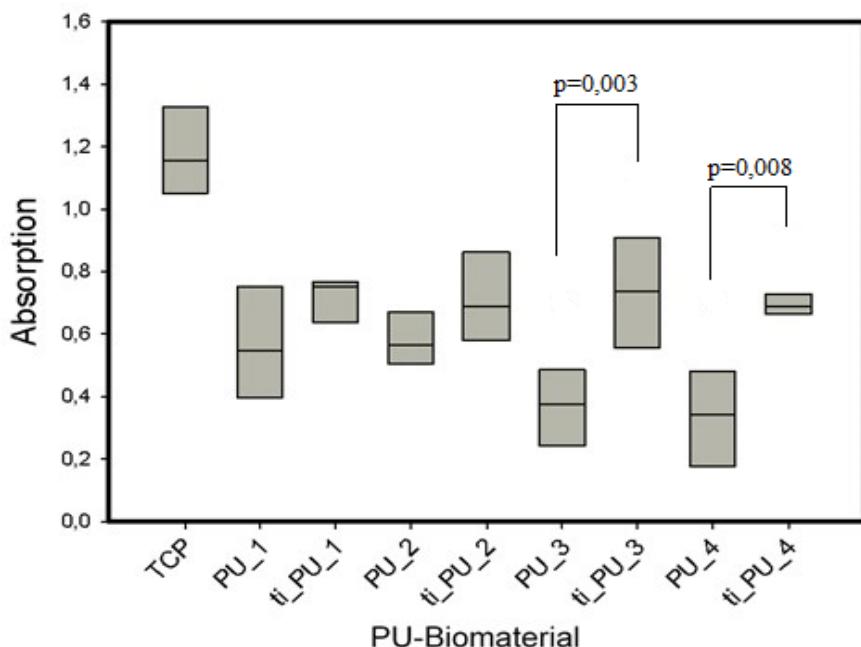


Abbildung 22: Mitochondriale Stoffwechselaktivität von HSVEC auf verschiedenen PU-Materialien. Die Zellen von 8 HSVEC-Kulturen wurden auf die getesteten Materialien PEU (PU_1, PU_2, PU_3) und PCU (PU_4) mit und ohne die Titanbeschichtung und tissue-cultured polystyrole (TCP) für sieben Tagen ausgesät (5000 Zellen pro $0,3\text{cm}^2$) und mit MTS-Lösung inkubiert. Die Absorption bei 490/650 nm gibt einen Hinweis auf die metabolische Aktivität der Zellen. P-Werte geben den Effekt der Titanisierung wider.

4.7 Hämokompatibilität von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen – Thrombozytenadhäsion

Die Thrombozytenadhäsion an Biomaterialien gibt wichtige Hinweise auf deren Hämokompatibilität. In der vorliegenden Studie wurde die Bindung von Calcein-gefärbten Thrombozyten auf endothelbesiedelte PU-Materialien (3.6.1) sowie die direkte Thrombozytenadhäsion an PU-Materialien (3.6.2) untersucht.

4.7.1 Thrombozytenadhäsion auf endothelbesiedelten PU-Materialien

Die Thrombozytenadhäsion wurde in Anlehnung an die Arbeit von Stevens (Stevens, 2004) durchgeführt. Dazu wurden Calcein-AM-gefärbte Thrombozyten mit dem Endothel beschichteten Biomaterialien für 60 min koinkubiert und die Fluoreszenzintensität der gebundenen Thrombozyten bestimmt.

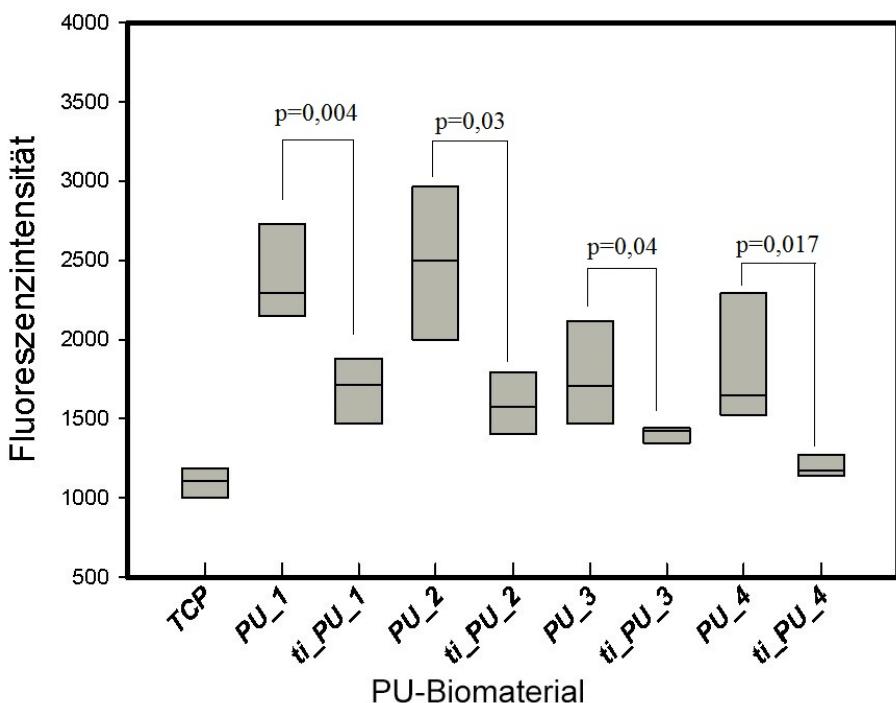


Abbildung 23: Thrombozytenadhäsionstest: Isolierte Thrombozyten wurden zunächst mit Calcein-AM gefärbt und dann mit Endothel beschichteten Biomaterialien aus PEU (PU_1, PU_2, PU_3) bzw. PCU (PU_4) mit und ohne Titanbeschichtung (ti_PU) und tissue-cultured polystyrole (TCP) koinkubiert. Die Fluoreszenzintensität dient als Maß für die Anzahl der adhärenten Thrombozyten.

Endothelialisierte TCP-Oberflächen verhinderten weitgehend die Adhäsion von Cacein-gefärbten Thrombozyten. Dagegen wurden signifikant mehr Thrombozyten auf unbeschichteten PUs detektiert. Durch Titanisierung konnte die Thrombozytenadhäsion reduziert werden (signifikant). Auf ti_PU_4 wurden vergleichbar wenig Thrombozyten gefunden, wie auf TCP (**Abbildung 23**).

4.7.2 Nachweis von adhärenten Thrombozyten mittels REM

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Testmaterialien mit isolierten, nicht-markierten Thrombozyten koinkubiert, fixiert und im REM analysiert. Repräsentative REM-Aufnahmen sind in **Abbildung 23** wiedergegeben.

Auf PCU (PU_4, unbeschichtet und beschichtet) adhärierten keine oder nur wenige Thrombozyten (**Abbildung. 24 G, H**). Unbeschichtete PEUs unterschieden sich in ihrer Hämokompatibilität: Während Thrombozyten auf PU_1 ein dichtes Fibrinnetzwerk bildeten (**Abbildung. 24 A**), adhärierten auf PU_2 und PU_3 nur einzelne Thrombozyten und kleinere Aggregate (**Abbildung. 24 C, E**). Die Titanisierung von PU_1 bewirkte eine reduzierte Thrombozytenadhäsion. Dennoch wurden kleinere Ansammlungen aggregierter Thrombozyten detektiert (**Abbildung. 24 B**) – ein Hinweis auf eine mögliche thrombogene Eigenschaft dieser Oberfläche. Die Titanisierung von PU_2 führte zu einer massiven Thrombozytenaggregation/-aktivierung und zur Ausbildung eines ausgedehnten Fibrinnetzwerks (**Abbildung. 24 D**). Im Gegensatz dazu hatte die Titanisierung von PU_3 keinen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion. Die Zelldichte und die Form der adhärenten Thrombozyten waren mit den Bedingungen auf unbeschichtetem PU_3 vergleichbar (**Abbildung. 24 F**).

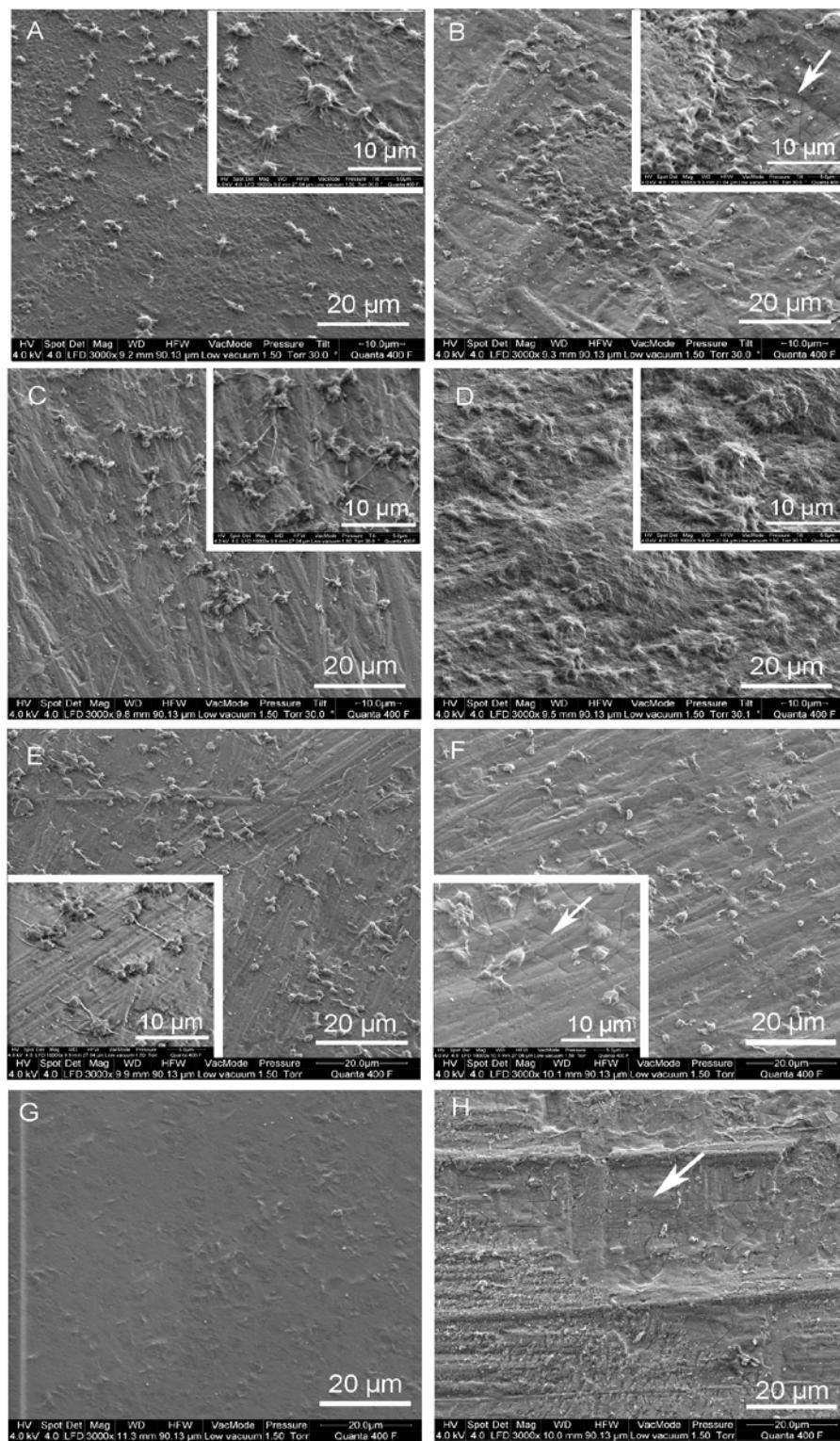


Abbildung 24: Repräsentative REM-Aufnahmen von adhärenten Thrombozyten auf (A) PU_1, (B) ti_PU_1, (C) PU_2, (D) ti_PU_2, (E) PU_3, (F) ti_PU_3, (G) PU_4, (H) ti_PU_4. Weiße Pfeile zeigen explizite Stellen mit adhärenten Thrombozyten.

4.8 Inflammatorische Wirkung von unbeschichteten und titanbeschichteten PU-Oberflächen auf humane Endothelzellen

Um die inflammatorische Wirkung von beschichteten und unbeschichteten PU-Materialien auf HSVECs zu untersuchen, wurden die Testmaterialien zunächst mit Endothelzellen besiedelt und für 7 Tage inkubiert. Ein Teil der Ansätze wurde für die Bestimmung der Zellzahl am Tag 7 verwendet. Der 2. Teil wurde mit vitalen Calcein-gefärbten PBMCs inkubiert. Bei einer Aktivierung der Endothelzellen sollten vermehrt PBMCs gebunden werden. **Abbildung 25** gibt die gemessene Fluoreszenzintensität pro Endothelzelle an, also die Anzahl der gebundenen Calcein- gefärbten PBMCs pro Endothelzelle. Nach 7 Tagen konnte auf den auf TCP ausgesäten EC nur wenig PBMCs nachgewiesen werden. Geht man davon aus, dass PBMCs nur an aktivierte EC binden und berücksichtigt man die großen Unterschiede der Zelldichten auf den unterschiedlichen PU-Materialien, so zeigte sich eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität pro EC für alle PU-Materialien. Auf PU-4 wurden keine Zellen gefunden, daher war auch die Fluoreszenzintensität pro EC gleich Null.

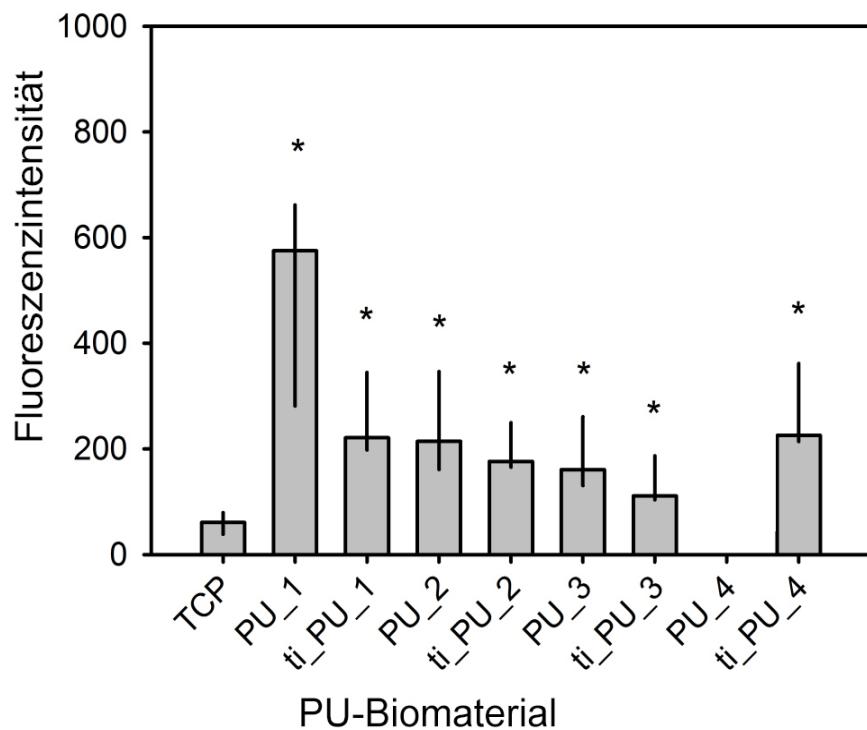


Abbildung 25: Die inflammatorische Aktivität von Endothelzellen (EC) auf verschiedenen PUs. Die Endothelzellen wurden für sieben Tage ausgesät, und anschließend mit Calcein-AM-gefärbten PBMCs inkubiert. Die Fluoreszenzintensität dient als Maß für die Anzahl der adhärenten PBMCs pro Zelle. * p≤0,05 beim Vergleich der Fluoreszenzintensität pro Zelle auf TCP.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Polyurethane schlecht endothelialisierbar sind. Während polyether-basierte Polyurethane (PEU) zwar eine Endothelzelladhäsion auf der Oberfläche erlaubten, waren nahezu keine Endothelzellen auf polycarbonat-basiertem Polyurethan (PCU) nachweisbar. Adhärente Zellen zeigten so gut wie keine proliferative Aktivität. Erst durch die Titanisierung mittels PACVD war ein Wachstum der Zellen auf PEUs möglich. Jedoch waren die Endothelzellen aktiviert, was sich in einer verstärkten PBMC-Adhäsion auf den Zellen äußerte. Weiterhin wurde gezeigt, dass Polyurethane eine unterschiedliche Hämokompatibilität aufweisen. Der Grad der Thrombozytenadhäsion nahm in der Reihe Texin > Tecothane > Elastollan > Desmopan ab. Durch die Titanisierung konnte lediglich die Hämokompatibilität von Texin verbessert werden.

5.1 Methodik zur Endothelialisierung von Biomaterialien

Aufgrund der physiologischen Funktion stellen Endothelzellen die beste anti-thrombogene Oberfläche dar (Behrendt and Ganz, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Methoden aus früheren Untersuchungen zurückgegriffen (Lehle et al., 2003; Riescher et al., 2014). Dies beinhaltete die Verwendung von patientenspezifischen Endothelzellen. Damit kommt man dem eingangs angesprochenen Ziel, der Verwendung von Patientenmaterial und damit der Reduzierung immunologischer Reaktionen, ein Stück näher. Trotz identischem Kultivierungsprotokoll und vergleichbarer Ausgangsbedingungen reagierte jede der 8 Kulturen unterschiedlich in ihrem Wachstum, was u. U. mit der Herkunft der Zellen aus arteriosklerotischen Venenpräparaten oder mit der Heterogenität von Primärzellen erklärt werden kann. Die dreimalige unabhängige Durchführung der Versuche zeigte außerdem, dass mit zunehmender Erfahrung des „Operators“ die Zellzahlen im Kulturansatz zunahmen. Während im ersten Ansatz die Zellzahlen auch nach 7 Tagen noch sehr niedrig waren, nahm die Zellzahl im dritten Versuch um Faktor 7 bis 10 signifikant zu. Diese Unterschiede spiegeln die zunehmende Erfahrung im Umgang mit den Zellen als auch mit der Messmethodik am CASY wider. Mögliche Ursachen hierfür könnten z. B. anfängliche verlängerte Ablösungszeit der Zellen mit der Trypsinlösung sein (McDowall and Hunter, 2011). Die Proteasewirkung von Trypsin löst nicht nur die

Verankerung der Zellen von der Kulturoberfläche, sondern schädigt auch die Zellmembran (McDowall and Hunter, 2011), was zur Zelllyse führen kann (McDowall and Hunter, 2011). Häufig wird bei zu langer Trypsininkubation auch eine Aggregation der Zellen beobachtet (McDowall and Hunter, 2011), wodurch sich die Zellausbeute deutlich reduziert. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass es sich um aufgetaute und keine frischen Zellen handelte. Es wäre denkbar, dass das im Einfriermedium enthaltene Zellgift DMSO nach dem Auftauen zu lange auf die Zellen wirken konnte (Da Violante et al., 2002). Aufgrund der schlechten Proliferationsaktivität der Zellen im ersten Ansatz wurde dies für die folgenden unabhängigen Versuche berücksichtigt und die Zeiten sowohl nach dem Auftauen als auch im Kontakt mit Trypsin reduziert und penibel eingehalten. Kritisch für primäre Endothelzellen ist es außerdem, wenn zu wenige Zellen ausgesät werden. Endothelzellen müssen in Kultur Kontakt zueinander aufnehmen können, nur so können sie auch proliferieren (Cleaver and Melton, 2003). Unabhängig von diesen Einschränkungen war in jedem Ansatz eine Proliferationsaktivität der Zellen auf TCP nachweisbar, weshalb alle Daten für die Analysen verwendet wurden.

5.2 Adhäsion von Endothelzellen auf unterschiedlichen Polyurethanen

Die Zelladhäsion ist ein früher und zentraler Vorgang der Interaktion von Zellen mit Biomaterialien (Wintermantel and Ha, 2009). Die Zellproliferation setzt eine Zelladhäsion voraus. Sie spielt bei zahlreichen physiologischen Prozessen (z.B. Proliferation und Differenzierung) eine wichtige Rolle und ist eine wesentliche Voraussetzung für die Gewebeintegration (Wikipedia, 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften von TCP, PCU und PEU die Adhäsion von primären Endothelzellen nachhaltig beeinflussen. Maximale Zelladhäsion war auf fibronektinbeschichtetem TCP nachweisbar, was bekanntermaßen die optimale Oberfläche für Endothelzellen in Kultur darstellt. Nichtsdestotrotz war nach 24 Stunden nur noch etwa die Hälfte der ursprünglichen Zellen nachweisbar. Auch hier könnte die zytotoxische Wirkung von Trypsin eine Rolle spielen. Bei den Testmaterialien beeinflusste die Art des PU den Grad der Endothelzelladhäsion. So adhärierten auf PCU nur etwa ein Drittel der erwarteten Zellmengen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Endothelzellen, wie auch Fibroblasten nur

ungenügend auf PU-Materialien adhärieren (Lehle et al., 2009). Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass durch eine Modifizierung der Oberflächen die Zellularisierbarkeit verbessert werden kann. So war nur durch eine kovalente Bindung von RGD-Peptiden, der funktionalen Domäne von Fibronectin, an PCU eine relativ schnelle Endothelialisierung mit endothelialen Progenitorzellen im Tiermodell möglich (Mel et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung stellt die Titanisierung der Oberfläche dar (Lehle 2003; Riescher 2014). In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Titanbeschichtung mittels PACVD-Technologie per se keine Verbesserung der Zelladhäsion. Dieses Ergebnis war abweichend zu früheren *in vitro*-Studien (Lehle et al., 2003; Riescher et al., 2014). In diesen Arbeiten wurden jedoch andere PU-Materialien verwendet. So untersuchte Riescher und Mitarbeiter die Biokompatibilität von Elastollan® (Riescher et al., 2014). Bei Lehle et al (Lehle et al., 2003) wurde der PU-Typ nicht näher klassifiziert. Aus Untersuchungen von Zdrahla et al. (Zdrahala and Zdrahala, 1999) geht hervor, dass die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise auf die hohe Variabilität des PU-Stoffes zurückzuführen sein könnte. PUs unterscheiden sich wesentlich in ihren Oberflächeneigenschaften (Zdrahala and Zdrahala, 1999). Besonders wichtig ist dabei die Oberflächenenergie, die von den Kettenstrukturen der PUs und den polaren Wechselwirkungen, Ionenimplantation und Hydrogen-Verbindungen zwischen den weichen und harten Segmenten gesteuert wird. Diese wirkt sich besonders auf die Hydrophobizität aus (Lehle et al., 2009). Letzteres mag auch den Beschichtungsprozess mittels PACVD beeinträchtigen. Laut XPS-Analysen befand sich auf jedem Testmaterial die gleiche Schichtzusammensetzung nach Beschichtung. Allerdings waren kleinste Haarrisse in der Beschichtung im REM nachweisbar, was vermuten lässt, dass die Endothelzellen den Kunststoff unter der Schicht „sehen“ und sogar diese kleinen Oberflächen ausreichen, sodass die Zellen nur bedingt adhärieren. Dafür spricht auch, dass die Risse kein Titan enthielten, was in zusätzlichen EDX-Messungen von der Herstellerfirma nachträglich gezeigt wurde. Jedoch scheint dies nur bei PU aufzutreten. Gleichzeitige Messungen mit beschichteten PTFE-Oberflächen zeigten auch Risse, jedoch befand sich darin auch Titan.

5.3 Proliferation von Endothelzellen auf unterschiedlichen Polyurethanen

Endothelzellen wie auch Fibroblasten adhärieren nicht nur schlecht auf manchen unbeschichteten Polyurethanen (Lehle et al., 2009), sondern zeigen auch eine eingeschränkte Proliferationsaktivität. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten PU-Typen hatten

ungünstige Oberflächeneigenschaften, was nicht nur die Adhäsion, sondern auch die Proliferation der Endothelzellen deutlich einschränkte. Während unbeschichtete PEUs eher eine Zunahme der Zelldichte über 7 Tage erlaubten, waren auf PCU keinerlei Zellen nachweisbar. Nicht-modifiziertes PCU ist also nicht für eine Endothelialisierung geeignet.

Analog zu früheren *in vitro* Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass eine Titanisierung von PU-Oberflächen die Endothelzellproliferation verbessert (Lehle et al., 2003; Riescher et al., 2014), war auch in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Zunahme der Endothelzellproliferation nach Beschichtung von PEUs nachweisbar. Lediglich das in der vorliegenden Arbeit untersuchte PCU (Desmopan) zeigte auch nach Titanisierung keine verbesserte Zellabdeckung. Dieses Verfahren erlaubte sogar die Zellularisierung von Teflon- und Silikonoberflächen (Lehle et al., 2003). So führte die Titanisierung der Kunststoffe in dieser Arbeit zu einer besseren Endothelzelladhäsion und ermöglichten eine Zellvermehrung, ohne dabei die Zellen zu aktivieren (Lehle et al., 2003). Darüber hinaus war auch die Stoffwechselleistung der Zellen auf titanisierten Kunststoffen signifikant erhöht, was in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Die Stoffwechselleistung der Zellen auf den titanisierten PUs war in der vorliegenden Studie nur tendenziell erhöht. Die unterschiedlichen Ergebnisse zu früheren Studien könnten auf die Risse in der Titanschicht zurückzuführen sein (siehe Diskussion 4.2). Es kann nur darüber spekuliert werden, dass die Fläche der Risse ausreicht, dass Endothelzellen schlechter adhärieren und schlechter wachsen. Andere Materialien scheinen hier besser geeignet zu sein. So wurde die PACVD-Technik auch für die Titanisierung von biologischen Herzklappen eingesetzt. Im Tiermodell zeigte sich, dass diese Oberflächen im Langzeitversuch sogar mit Endothelzellen besiedelt waren (immunhistochemische Färbung von-Willebrand-Faktor) (Guldner et al., 2009)

5.4 Endothelzellaktivierung nach Adhäsion auf verschiedenen Polyurethanen

Neben der Endothelialisierbarkeit eines Biomaterials ist auch die Funktionsfähigkeit dieser Zellen wichtig, um Thrombosierung zu vermeiden. So kann der Kontakt von Endothelzellen mit Biomaterialien zu deren Aktivierung führen. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der Freisetzung von Zytokinen wird die Blutgerinnung aktiviert, und in der Folge kann es zur Thrombenbildung kommen (Yellin et al., 1995; Sozzani et al., 2004).

Ein Funktionstest – die Adhäsion von Calcein-AM-gefärbten PBMCs (Schoen et al., 1988) – erlaubt den Nachweis von aktivierten Endothelzellen auf Testmaterialien (Lehle et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Kultivierung von HSVECs auf TCP zu keiner Aktivierung der Zellen führte. Im Gegensatz dazu wurden signifikant mehr PBMCs auf Endothelzellen nachgewiesen, die primär auf den Testmaterialien ausgesät wurden. Auffallend war die massive Adhäsion der PBMCs an Endothelzellen, die für 7 Tage auf Texin kultiviert wurden. Die Titanisierung zeigte keinen Effekt auf die PBMC-Adhäsion. Dies widerspricht dem Ergebnis einer vorangegangenen *in vitro* Studie (Lehle et al., 2003). Die Beschichtung verschiedenster Kunststoffe mit Titancarboxonitrid (PU, Silicon, Polypropylene, Polytetrafluoroethylene, Polyethyleneterephthalate) hatte keine Auswirkung auf die proinflammatorische Reaktion von adhärenten HSVECs (Lehle et al., 2003). Es bleibt offen, ob die inflammatorische Reaktion der Zellen auch auf den Kontakt mit den Rissen in der Titanschicht zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass jedes Polymer und jegliche Oberflächenmodifizierung eine individuelle Bio- und Zyro-Kompatibilitätstestung erfordert. Zusätzliche Funktionsanalysen der Endothelzellen liefern zusätzliche Informationen über die inflammatorische Reaktion der Zellen nach Kontakt mit dem Biomaterial – ein möglicher Grund für trotzdem stattfindende Thrombenbildung.

5.5 Thrombogenität verschiedener Polyurethane

Eine Abdeckung von Kunststoffoberflächen mit körpereigenen Endothelzellen ist und bleibt eine Vision für eine optimale Prothese im Blutkontakt. Eine stabile Endothelzelladhäsion reicht noch lange nicht aus. Sobald Scherkräfte auftreten, lösen sich die Zellen häufig ab (Schoen et al., 1988). Trotz vieler unterschiedlicher Strategien ist es bislang nicht gelungen, stabile Endothelzelllagen auf Kunststoffprothesen im Blutkontakt beim Menschen herzustellen, weder nach *in vitro*-Endothelialisierung im Bioreaktor und anschließender Implantation in den Körper, noch durch *in vivo* Endothelialisierung von Grafts im direkten Blutkontakt. Beides funktioniert nur im Tier (Fischlein and Fasol, 1996). Eine andere Strategie, nämlich die Modifizierung der Oberfläche, dass per se keine Zellen binden, insbesondere keine Thrombozyten, z. B. zunehmende Hydrophilie der Oberflächen (Rabinow et al., 1994), Beschichtung mit Heparin (Tayama et al., 2000), gilt als die Methode der Wahl

bei Akutsituationen, wenn keine Zeit für zeit- und materialaufwändige Endothelialisierungen im Bioreaktor zur Verfügung steht, wie z. B. bei der Notwendigkeit von Herzunterstützungssystemen.

Die Thrombenbildung beginnt mit Proteinadsorption und anschließender Thrombozytenadhäsion an das fremde Material (Arvidsson et al., 2007). Diese Eigenschaft macht man sich beim Thrombozytenadhäsionstest (Xu et al., 2014) zunutze. Mittels REM kann man sowohl die Zelldichte als auch die Morphologie der Thrombozyten, die Auskunft über den Aktivierungszustand der Thrombozyten gibt, beschreiben (Srinivasan et al., 2010). Gesucht war ein Material, an das keine Thrombozyten binden. Aus einer anderen bislang nicht veröffentlichten Studie, bei der die Oberfläche eines anderen PCUs chemisch modifiziert wurde (mit über 100 verschiedenen Variationen), war bekannt, dass Thrombozyten unter *in vitro* Bedingungen immer adhärieren, jedoch die Morphologie deutlich unterschiedlich sein kann.

Das in der vorliegenden Studie verwendete PCU (Desmopan) verhinderte eine Thrombozytenadhäsion. Eine zusätzliche Titanbeschichtung hatte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis. In einer Arbeit von Weisenberg und Mooradian (Weisenberg and Mooradian, 2002) wurde ein nicht näher charakterisiertes PCU untersucht, an das zwar Thrombozyten adhärierten, jedoch wies die runde Form mit nur geringer Pseudopodienbildung auf nicht-aktivierte Thrombozyten hin. Im ruhenden, nicht aktivierten Zustand weisen die Blutplättchen eine charakteristische diskoidale Form auf (Boles and Mackman, 2010). Werden die Thrombozyten aktiviert, führen sie einen Gestaltenwandel durch. Dabei bilden sie durch Ausstülpungen der Zytoplasmamembran kurze Pseudopodien und lange Filopodien aus, wodurch sich ihre Oberfläche vergrößern kann (Furie and Furie, 2005). Jedoch scheint die Thrombogenität vom PCU-Typ abhängig zu sein. In einer anderen *in vitro* Studie führte der direkte Blutkontakt mit spezifischen PCUs (Carbothane, ChronoflexCorethane 80A und Corethane 55D) zu einer Hämolyse (Belanger et al., 2000). Auch bei den PEUs gibt es offensichtlich große Unterschiede im Grad der Thrombozytenadhäsion. Während Texin (PU_1) komplett mit einem Kollagennetzwerk aus aggregierten und aktivierte Thrombozyten bedeckt wurde, wies Tecothane (PU_2) eine geringere Dichte adhärenter Thrombozyten auf. Jedoch wies die verzweigte Form der adhärenten Thrombozyten mit langen Pseudopodien auf eine höhere Aktivierung der Thrombozyten verglichen mit Elastollan (PU_3) hin. Tecoflex

und Tecothane zeigten auch in einem ex vivo Kreislaufmodell eine verringerte Thrombozytenadhäsion (Belanger et al., 2000). Eine zusätzliche Titanbeschichtung führte lediglich bei Texin (PU_1) zu einer signifikanten Reduzierung der Thrombozytenadhäsion. Nichtsdestotrotz blieben kleine Ansammlungen von Thrombozyten zurück, welche auf das potentielle Risiko von Thrombozytenaggregation auf dieser Oberfläche hinwiesen. Hier scheinen die beschriebenen Risse keine Bedeutung für die Thrombozytenbindung zu haben. Ähnliche Ergebnisse wurden von Riescher et al beschrieben (Riescher et al., 2014). Bei dieser Arbeit war das jedoch nur ein sekundärer Effekt, da durch die Titanisierung ein Monolayer von Endothelzellen ermöglicht wurde, auf dem keine Thrombozyten binden konnten. Auch Tierstudien bestätigten die verbesserte Hämokompatibilität von Titancarboxonitridbeschichteten Kunststoffen (Bago et al., 2013). Die Implantation von titanbeschichteten Pumpkammern aus PTFE als biomechanische Herzen in Ziegen wies auch im Langzeitversuch über 8 Wochen keine Thrombenbildung in der Pumpkammer auf (Guldner et al., 2012). Ohne Beschichtung entstand bereits nach einer Woche ein dicht gepackter Thrombus in der Pumpkammer. Die erhöhte Thrombogenität von Tecothane (PU_2) nach der Titanbeschichtung war überraschend. Der kausale Zusammenhang bei diesem Ergebnis lässt sich nicht eindeutig erklären. Man kann darüber spekulieren, dass sich durch die Titanisierung die Oberflächenbeschaffenheit dramatisch ändert und so die massive Thrombozytenadhäsion begünstigt.

Die Ergebnisse aus den REM-Untersuchungen konnten mit einer anderen Methode nur zum Teil bestätigt werden. Ein Thrombozytenadhäsionstest zeigte nicht nur für unbeschichtetes Texin eine verstärkte Adhäsion von Calcein-AM-gefärbten Thrombozyten sondern auch für Tecothane. Alle anderen Materialien waren vergleichbar in ihrer thrombogenen Eigenschaft. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt vermutlich in der Wahl der Methodik. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die zusätzliche Färbung mit Calcein-AM die isolierten Thrombozyten aktiviert wurden. Das wurde für diese Versuchsreihe nicht getestet. Dagegen wurden sämtliche Thrombozytenpräparationen für die REM-Untersuchungen vor dem Materialkontakt auf ihre Aktivierung durchflusszytometrisch untersucht (Expression von CD61, Daten nicht gezeigt). Es wurden nur Präparationen mit < 5% CD61-positiven Zellen für die REM-Untersuchungen verwendet.

Zusammenfassend lässt sich anmerken, dass die Aussagekraft von einem in vitro Test nicht genügt, um die Thrombogenität von Biomaterialien zu beschreiben. Letztendlich wird nur der direkte Blutkontakt in einem Tiermodell bezüglich einer Verbesserung der Hämokompatibilität nach einer Titanbeschichtung weiteren Aufschluss geben können.

6. Fazit

Die Titanbeschichtung von PUs unter Anwendung der PACVD-Technik ist eine angemessene Methode zur Verbesserung der Endothelialisierbarkeit dieser Polymere. Jedoch stößt diese Beschichtungsstechnik dabei an ihre Grenzen. Das Auftreten von Haarrissen in der Schicht verhindert die Komplettabdeckung der PU-Oberfläche. Endothelzellen sind offensichtlich in der Lage, diese kleinen Stellen zu erkennen, was die Proliferationsaktivität der Zellen herabsetzt und die Zellen zudem aktiviert. Beides ist für eine Endothelialisierung kontraproduktiv.

Für die Akutsituation bietet sich eine per se anti-thrombogene Oberfläche an. Am interessantesten scheint hier der Einsatz von PCU zu sein; im vorliegenden Fall könnte Desmopan das Material der Wahl sein, da es keinerlei Thrombozytenadhäsion erlaubt und damit von allen untersuchten Materialien die beste Hämokompatibilität aufweist. PCU bietet einen weiteren Vorteil. Im Gegensatz zu PEU zeigen PCUs eine reduzierte oxidative Biodegeneration (Tang et al., 2001; Salacinski et al., 2002; Chandy et al., 2009). Diese Eigenschaft erlaubt auch den Langzeiteinsatz, was für den kardiovaskulären Bypass wichtig werden könnte. Ob die beschriebene Hämokompatibilität und die elastischen Eigenschaften dieses Materials jedoch ausreichen, um für kleinlumige Gefäßprothesen oder für Pumpkammern von Herzunterstützungssystemen attraktiv zu sein, müssen weiterführende Studien zeigen und im nächsten Schritt im Tiermodell untersucht werden.

7. Abbkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| % (vol/ vol) | Volumenprozent |
| % (wt/ vol) | Gewichtsprozent |
| ACD | Acid-Citrate-Dextrose |
| AS | Aminosäure |
| CASY | Cell Counter and Analyzer System |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EC | Endothelzellen |
| ECGS/H-2 | endothelial cell growth supplement/heparin |
| ECL | Electrochemistry Laboratory |
| EDTA | Ethyldendiamintetraessigsäure |
| eNOS | Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| HC | Hydrocortison |
| HEGF | human epidermal growthfactor |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MTS | 3-(4,5-Dimethylthiozol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2H tetrazoliumsalz |
| PACVD | Plasma Assisted (Enhanced) Physical Vapour Deposition |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PCU | Polykohlenstofffurethan |
| PES | Phenazinethosulfat |
| PEU | Polyetherurethan |
| PRP | Thrombozytenreiches Plasma |
| PU | Polyurethan |
| REM | Rasterelektronen-Mikroskopie |
| SD | Standardabweichung |
| TCP | tissue-culturedpolystyrole |
| Ti | Titan |
| TNF | Tumornekrosefaktor |

8. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1: | Humane Endothelzellen im Phasenkontrastmikroskop..... | 11 |
| 2: | Beispiel für das Wachstum von adhärenten Zellen | 12 |
| 3: | Wachstumskinetik von HSVEC..... | 14 |
| 4: | Lichtmikroskopische Kontrolle des Zellrasens nach Aussaat von 5000 HSVECs am Tag 1 und 7 | 14 |
| 5: | Schematische Darstellung des Verfahrens „Plasma-Activated Chemical Vapor Deposition for Titanium“..... | 16 |
| 6: | Elektronisches Zellzählgerät nach dem Widerstandsprinzip..... | 17 |
| 7: | Funktionsprinzip der elektronischen Zellzählung..... | 18 |
| 8: | Graphische Darstellung des Messergebnisses im CASY Model TTC | 18 |
| 9: | Prinzip des Stromausschlussverfahrens mit dem Histogramm der Verteilung von toten und lebenden Zellen..... | 19 |
| 10: | Bestimmung der Zellzahl durch Messung der metabolischen Aktivität der Zellen | 20 |
| 11: | Calcein-AM | 21 |
| 12: | XPS-Diagramm für titanisierte Polyurethane | 27 |
| 13: | Topographie von unbeschichtetem PU_3 und titanisiertem PU_3 mittels REM | 29 |
| 14: | Adhäsion von Endothelzellen auf verschiedenen Biomaterialien nach 24 Stunden | 30 |
| 15: | Nachweis von lebenden Endothelzellen (EC) auf verschiedenen PUs | 31 |
| 16: | Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Kulturen von HSVEC in drei unabhängigen Versuchsansätzen..... | 33 |
| 17: | Repräsentative Fluoreszenzbilder von HSVEC | 34 |
| 18: | Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von acht verschiedenen HSVEC-Kulturen auf verschiedenen Biomaterialien am Tag 3 nach Zellaussaat..... | 35 |
| 19: | Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von acht verschiedenen HSVEC-Kulturen auf verschiedenen Biomaterialien am Tag 5 nach Zellaussaat..... | 37 |
| 20: | Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit von acht verschiedenen HSVEC-Kulturen auf verschiedenen Biomaterialien am Tag 7 nach Zellaussaat..... | 38 |
| 21: | Zusammenfassung aller Daten zur Proliferation von HSVECs auf Biomaterialien | 41 |
| 22: | Mitochondriale Stoffwechselaktivität von HSVEC auf Biomaterialien | 42 |
| 23: | Thrombozytenadhäsionstest | 43 |
| 24: | Repräsentative REM-Aufnahmen von adhärenten Thrombozyten | 45 |
| 25: | Die inflammatorische Aktivität von Endothelzellen (EC) auf Biomaterialien..... | 46 |

9. Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1: | Auflistung von verwendeten Gerätschaften..... | 6 |
| 2: | Auflistung von Verbrauchsmaterialien | 7 |
| 3: | Zellkulturmedien und Lösungen..... | 8 |
| 4: | Zusammensetzung des Wachstumsmediums für Endothelzellen..... | 8 |
| 5: | Zusammensetzung 10x PBS-Puffer | 9 |
| 6: | Verwendete Polyurethane (PU) | 15 |
| 7: | Statistischen Analyse der Proliferation von HSVECs auf verschiedenen Biomaterialien | 40 |

10. Literaturverzeichnis

- Arvidsson, S., Askendal, A., and Tengvall, P.: Blood plasma contact activation on silicon, titanium and aluminium, *Biomaterials*, 28, 1346–1354, 2007.
- Bago, J. R., Aguilar, E., Alieva, M., Soler-Botija, C., Vila, O. F., Claros, S., Andrades, J. A., Becerra, J., Rubio, N., and Blanco, J.: In vivo bioluminescence imaging of cell differentiation in biomaterials: a platform for scaffold development, *Tissue Eng Part A*, 19, 593–603, 2013.
- Behrendt, D. and Ganz, P.: Endothelial function. From vascular biology to clinical applications, *Am J Cardiol*, 90, 40L–48L, 2002.
- Belanger, M. C., Marois, Y., Roy, R., Mehri, Y., Wagner, E., Zhang, Z., King, M. W., Yang, M., Hahn, C., and Guidoin, R.: Selection of a polyurethane membrane for the manufacture of ventricles for a totally implantable artificial heart: blood compatibility and biocompatibility studies, *Artif Organs*, 24, 879–888, 2000.
- Berridge, M. V. and Tan, A. S.: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Arch Biochem Biophys*, 303, 474–482, 1993.
- Boles, J. and Mackman, N.: Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome, *Lupus*, 19, 370–378, 2010.
- Bordenave, L., Fernandez, P., Remy-Zolghadri, M., Villars, S., Daculsi, R., and Midy, D.: In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization, *Clin Hemorheol Microcirc*, 33, 227–234, 2005.
- Chandy, T., van Hee, J., Nettekoven, W., and Johnson, J.: Long-term in vitro stability assessment of polycarbonate urethane micro catheters: resistance to oxidation and stress cracking, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 89, 314–324, 2009.
- Cikirkcioglu, M., Sedelnikov, N., Osorio-Da Cruz, S., Khabiri, E., Donmez Antal, A., Tatar, T., Tille, J.-C., Hess, O. M., Kalangos, A., and Walpoth, B. H.: Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating, *Int J Artif Organs*, 29, 990–999, 2006.
- Cleaver, O. and Melton, D. A.: Endothelial signaling during development, *Nat Med*, 9, 661–668, 2003.
- Consigny, P. M. and Vitali, N. J.: Resistance of freshly adherent endothelial cells to detachment by shear stress is matrix and time dependent, *J Vasc Interv Radiol*, 9, 479–485, 1998.
- Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J. C., and Arnaud, P.: Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures, *Biol Pharm Bull*, 25, 1600–1603, 2002.
- Fischlein, T. and Fasol, R.: In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves, *J Heart Valve Dis*, 5, 58–65, 1996.
- Furie, B. and Furie, B. C.: Thrombus formation in vivo, *J Clin Invest*, 115, 3355–3362, 2005.

- Gore, S., Andersson, J., Biran, R., Underwood, C., and Riesenfeld, J.: Heparin surfaces: Impact of immobilization chemistry on hemocompatibility and protein adsorption, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 102, 1817–1824, 2014.
- Gstraunthaler, G. and Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen, 7. Aufl. [überarb. und aktual.], Springer Spektrum, Berlin, 331 pp., 2013.
- Gulbins, H., Dauner, M., Petzold, R., Goldmund, A., Anderson, I., Doser, M., Meiser, B., and Reichart, B.: Development of an artificial vessel lined with human vascular cells, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128, 372–377, 2004.
- Guldner, N. W., Bastian, F., Weigel, G., Zimmermann, H., Maleika, M., Scharfschwerdt, M., Rohde, D., and Sievers, H.-H.: 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*, 143, 1152–1159, 2012.
- Guldner, N. W., Jasmund, I., Zimmermann, H., Heinlein, M., Girndt, B., Meier, V., Fluss, F., Rohde, D., Gebert, A., and Sievers, H.-H.: Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering, *Circulation*, 119, 1653–1660, 2009.
- Huangfu, P.-b., Gong, M., Zhang, C., Yang, S., Zhao, J., and Gong, Y.-k.: Cell outer membrane mimetic modification of a cross-linked chitosan surface to improve its hemocompatibility, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 71, 268–274, 2009.
- Joner, M., Cheng, Q., Schonhofer-Merl, S., Lopez, M., Neubauer, S., Mas-Moruno, C., Laufer, B., Kolodgie, F. D., Kessler, H., and Virmani, R.: Polymer-free immobilization of a cyclic RGD peptide on a nitinol stent promotes integrin-dependent endothelial coverage of strut surfaces, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100, 637–645, 2012.
- Lee, Y. S., Park, D. K., Kim, Y. B., Seo, J. W., Lee, K. B., and Min, B. G.: Endothelial cell seeding onto the extracellular matrix of fibroblasts for the development of a small diameter polyurethane vessel, *ASAIO J*, 39, M740-5, 1993.
- Lehle, K., Buttstaedt, J., and Birnbaum, D. E.: Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitride, *J Biomed Mater Res A*, 65, 393–401, 2003.
- Lehle, K., Li, J., Zimmermann, H., Hartmann, B., Wehner, D., Schmid, T., and Schmid, C.: In vitro Endothelialization and Platelet Adhesion on Titaniferous Upgraded Polyether and Polycarbonate Polyurethanes, *Materials*, 7, 623–636, 2014.
- Lehle, K., Lohn, S., Reinerth, G. G., Schubert, T., Preuner, J G Jurgen G, and Birnbaum, D E Dietrich E: Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride in vivo, *Biomaterials*, 25, 5457–5466, 2004.
- Lehle, K., Stock, M., Schmid, T., Schopka, S., Straub, R. H., and Schmid, C.: Cell-type specific evaluation of biocompatibility of commercially available polyurethanes, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 90, 312–318, 2009.
- Li, G., Yang, P., Qin, W., Maitz, M. F., Zhou, S., and Huang, N.: The effect of coimmobilizing heparin and fibronectin on titanium on hemocompatibility and endothelialization, *Biomaterials*, 32, 4691–4703, 2011.

- Liu, T., Liu, S., Zhang, K., Chen, J., and Huang, N.: Endothelialization of implanted cardiovascular biomaterial surfaces: the development from in vitro to in vivo, *J Biomed Mater Res A*, 102, 3754–3772, 2014.
- McDowall, J. and Hunter, S.: InterPro protein classification, *Methods Mol Biol*, 694, 37–47, 2011.
- Mel, A. de, Punshon, G., Ramesh, B., Sarkar, S., Darbyshire, A., Hamilton, G., and Seifalian, A. M.: In situ endothelialization potential of a biofunctionalised nanocomposite biomaterial-based small diameter bypass graft, *Biomed Mater Eng*, 19, 317–331, doi:10.3233/BME-2009-0597, 2009.
- Mellander, S., Fogelstrand, P., Enocson, K., Johansson, B. R., and Mattsson, E.: Healing of PTFE grafts in a pig model recruit neointimal cells from different sources and do not endothelialize, *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 30, 63–70, 2005.
- Nachman, R. L. and Jaffe, E. A.: Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology, *J Clin Invest*, 114, 1037–1040, 2004.
- Pacella, J. J., Goldstein, A. H., Magovern, G. J., and Clark, R. F.: Modified fabrication techniques lead to improved centrifugal blood pump performance, *ASAIO J*, 40, M767-72, 1994.
- Rabinow, B. E., Ding, Y. S., Qin, C., McHalsky, M. L., Schneider, J. H., Ashline, K. A., Shelbourn, T. L., and Albrecht, R. M.: Biomaterials with permanent hydrophilic surfaces and low protein adsorption properties, *J Biomater Sci Polym Ed*, 6, 91–109, 1994.
- Reinhold, R., Drummer, S., and Zeiler, G.: Proximal osseous integration in THR using the cementless Vektor-Titan stem: medium- and long-term results, *Z Orthop Unfall*, 149, 526–532, 2011.
- Riescher, S., Wehner, D., Schmid, T., Zimmermann, H., Hartmann, B., Schmid, C., and Lehle, K.: Titaniumcarboxonitrile layer increased biocompatibility of medical polyetherurethanes, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 102, 141–148, 2014.
- Salacinski, H. J., Tai, N. R., Carson, R. J., Edwards, A., Hamilton, G., and Seifalian, A. M.: In vitro stability of a novel compliant poly(carbonate-urea)urethane to oxidative and hydrolytic stress, *J Biomed Mater Res*, 59, 207–218, 2002.
- Sarkar, S., Sales, K. M., Hamilton, G., and Seifalian, A. M.: Addressing thrombogenicity in vascular graft construction, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 82, 100–108, 2007.
- Schmolders, J., Friedrich, M. J., Michel, R. D., Randau, T. M., Wimmer, M. D., Strauss, A. C., Kohlhof, H., Wirtz, D. C., and Gravius, S.: Acetabular defect reconstruction in revision hip arthroplasty with a modular revision system and biological defect augmentation, *Int Orthop*, 39, 623–630, 2015.
- Schoen, F. J.: Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement, *Cardiovasc Pathol*, 14, 189–194, 2005.
- Schoen, F. J., Harasaki, H., Kim, K. M., Anderson, H. C., and Levy, R. J.: Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention, *J Biomed Mater Res*, 22, 11–36, 1988.
- Sozzani, S., Vecchi, A., Allavena, P., and Mantovani, A.: Chemotaxis and interaction with vascular or lymphatic endothelium, *Methods Mol Biol*, 239, 1–16, 2004.

- Srinivasan, R., Marchant, R. E., and Gupta, A. S.: In vitro and in vivo platelet targeting by cyclic RGD-modified liposomes, *J Biomed Mater Res A*, 93, 1004–1015, 2010.
- Stevens, J. M.: Platelet adhesion assays performed under static conditions, *Methods Mol Biol*, 272, 145–151, 2004.
- Tang, Y. W., Labow, R. S., and Santerre, J. P.: Enzyme-induced biodegradation of polycarbonate-polyurethanes: dependence on hard-segment chemistry, *J Biomed Mater Res*, 57, 597–611, 2001.
- Tayama, E., Hayashida, N., Akasu, K., Kosuga, T., Fukunaga, S., Akashi, H., Kawara, T., and Aoyagi, S.: Biocompatibility of heparin-coated extracorporeal bypass circuits: new heparin bonded bioline system, *Artif Organs*, 24, 618–623, 2000.
- Teebken, O. E. and Haverich, A.: Tissue engineering of small diameter vascular grafts, *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23, 475–485, 2002.
- W., N., Zimmermann, H., and H., H.: Nano- Coating with Titanium of Glutaraldehyde- Fixed Heart Valve Prostheses Enables a Reduced Immune Response and a Self-Seeding Within Circulation, in: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, Eberli, D. (Ed.), InTech, 2011.
- Weisenberg, B. A. and Mooradian, D. L.: Hemocompatibility of materials used in microelectromechanical systems: platelet adhesion and morphology in vitro, *J Biomed Mater Res*, 60, 283–291, 2002.
- Wikipedia: Google-Ergebnis für
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/Calcein-AM.svg/300px-Calcein-AM.svg.png>
http://www.google.de/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/Calcein-AM.svg/300px-Calcein-AM.svg.png&imrefurl=http://de.wikipedia.org/wiki/Calcein&h=428&w=300&tbnid=SxD08Ya06wXSMM:&zoom=1&tbnh=186&tbnw=130&usg=__YwHKY33SdUn73QPWUzbEPBrmbSc=&docid=0Whc-kxDRSmF-M&itg=1, last access: 28 May 2015.
- Wikipedia: Zellproliferation: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=128118421>, last access: 8 June 2015.
- Windecker, S., Mayer, I., Pasquale, G. de, Maier, W., Dirsch, O., Groot, P. de, Wu, Y. P., Noll, G., Leskosek, B., Meier, B., and Hess, O. M.: Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia, *Circulation*, 104, 928–933, 2001.
- Wintermantel, E. and Ha, S.-W.: *Medizintechnik: Life Science Engineering ; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business/ Erich Wintermantel; Suk-Woo Ha, 5., überarb. und erw. Ausg,* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Online-Ressource, 2009.
- Xu, L.-C., Bauer, J. W., and Siedlecki, C. A.: Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 124, 49–68, 2014.
- Yellin, M. J., Brett, J., Baum, D., Matsushima, A., Szabolcs, M., Stern, D., and Chess, L.: Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals, *J Exp Med*, 182, 1857–1864, 1995.
- Zdrhala, R. J. and Zdrhala, I. J.: Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future, *J Biomater Appl*, 14, 67–90, 1999.

11. Zusammenfassung

Polykarbonatbasierte Polyurethane (PCU) wie auch polyetherbasierte Polyurethane (PEU) werden als medizinische Implantate verwendet, jedoch ist deren Hämokompatibilität begrenzt. In der vorliegenden Studie wurden die Bio- und Hämokompatibilität von titanbeschichteten PCU und PEU unter *in vitro* Bedingungen (mittels Endothelzell-Adhäsion/Proliferation und Thrombozytenadhäsion unter dem REM) untersucht. Die PACVD-Technik erlaubt eine Titanisierung von Polyurethanen auch bei niedrigeren Temperaturen, wodurch sich die Oberflächeneigenschaften dahingehend verändern, dass Endothelzellen auf diesen Flächen vermehrt proliferieren im Gegensatz zu den unbeschichteten Basismaterialien. Dies trifft jedoch nur für PEU zu, nicht für das untersuchte PCU. Das Auftreten von feinen Haarrissen in der Beschichtung erhöht allerdings das Risiko, dass kein kompletter Monolayer ausgebildet werden kann und dass unter *in vivo* Bedingungen die Stabilität des Zellrasens eingeschränkt sein könnte. Die Testung unter Flussbedingungen im Bioreaktor könnte hier Klarheit schaffen. Die Verwendung als *per se* antithrombogene Oberfläche (also ohne Endothelzellen) hängt ebenfalls vom verwendeten PU-Typ ab. Bei diesen Untersuchungen kristallisierte sich titanbeschichtetes Texin als eine gute Option für ein hämokompatibles Material heraus. Jedoch waren auch hier kleinere Stellen auf der Oberfläche mit aggregierten Thrombozyten besetzt, wodurch ein erhöhtes Thrombogenitätsrisiko nicht ausgeschlossen werden kann. Von den untersuchten Materialien war das PCU Desmopan das Material mit der besten Hämokompatibilität. Ob die Hämokompatibilität und die Elastizität des Materials ausreicht, um es klinisch als Gefäßprothese oder Herzunterstützungssystem nutzen zu können, muss erst noch im Chandler-Loop-Modell oder im Tiermodell untersucht werden.

12. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines drittmittelgeförderten Verbundprojektes, EFRE, Europäische Fonds für regionale Entwicklung, gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Wirtschaft und Medien



Frau Prof. Dr Lehle möchte ich für die freundliche Überlassung des hoch interessanten Themas herzlich danken. Ich verdanke ihr darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich herzlich bedanken will.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Schmid als Direktor der Herzchirurgie, dass ich in seinem Forschungslabor die Möglichkeit bekam, meine Doktorarbeit zu erstellen.

Weiterhin gilt mein Dank den EFRE-Kooperationspartnern. Insbesondere danke ich Herrn Wehner, Dualis MedTech GmbH für die Überlassung des Materials. Weiterhin danke ich den Herren. Zimmermann und Hartmann für die Titanisierung der Polyurethane und der Materialanalysen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Bergmann und Frau Leykauf, die mich bei der Arbeit im Zellkulturlabor mit außerordentlich praktischen Neuerungen tatkräftig unterstützten. Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Frau Bielenberg danke ich für die ausgezeichnete Hilfe bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen. Vielen Dank auch für die zahlreichen konstruktiven Gespräche bei der Auswertung des untersuchten Materials. Besonders erwähnt sei, dass Ihre Unterstützung bei der Bearbeitung der rasterelektronenmikroskopischen Bilddokumentation ausnehmend hilfreich war.

Herrn Dr. Gruber, Laborleiter des Forschungslabors der Anästhesie, sei herzlich gedankt für die Unterstützung bei den statistischen Rechnungen.

Dr Sass und Dr Thurston danke ich für die orthographische und grammatischen Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Zilz. Jederzeit gewährte er mir bei der Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich wertvolle Unterstützung. Dankbar anerkennen will ich auch seine immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft, mir sein großes PC-Wissen weiterzugeben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Frau, die mir während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

13. Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|------------------------|-------------|
| Name | Jing Li |
| Geburtsdatum | 30.04.1981 |
| Geburtsort | Shaanxi |
| Familienstand | verheiratet |
| Berufserfahrung | |

Seit 01.07.2013

Assistanzärztin an der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg

Studium

| | |
|------------|---------------------------------------------------------------|
| 2006–2013 | Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg |
| 2005 -2006 | Studium der Biologie, Universität Erlangen-Nürnberg |
| 2004-2005 | Deutschkurs |
| 1999-2004 | SichuanUniversität Medizin Bachelor Universität Sichuan |

Schulbildung

| | |
|-----------------|-------------|
| 1987.09-1993.07 | Grundschule |
| 1993.09-1996.07 | Realschule |
| 1996.09-1999.07 | Gymnasium |

Sonstige Tätigkeiten

| | |
|------------------------|-------------------------------------|
| 03.2004-06.2004 | Medizinisches Hilfsprojekt in Tibet |
| und 03.2003-06.2003 | |

Besondere Kenntnisse

| | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Sprachen | Chinesisch, Deutsch, Englisch |
| EDV | Grundlegende Kenntnisse in MS-Word; MS-Excel; SPSS; Adobe Acrobat Professionale; u.a. |
| Hobby | Photographie; Teekultur; Kochen |

Regensburg, 09.09.2015