

Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Hans-Peter Bruch

Vergleich der in-vitro Histokompatibilität von
Gefäßersatzmaterialien hinsichtlich ihrer
Beschichtung mit Endothelzelloberflächen-
Heparansulfat und Titan

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –
vorgelegt von
Ramona Lüdemann
aus Reinbek
Lübeck 2012

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. Philipp Hildebrand

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. Gunther Weitz

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.08.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	iii
II. Abkürzungen	vii
1. Einleitung	1
1.1. Einführung.....	1
1.2. Geschichte des Gefäßersatzes	2
1.3 Einteilung der Gefäßersatzmaterialien	3
1.3.1. Autogene/AutologeMaterialien	4
1.3.2. Allogene/Homologe Materialien	4
1.3.3. Xenogene/ Heterologe Materialien	4
1.3.4. Alloplastische Materialien	5
1.3.4.1. PET (Polyethylenterephthalat)	5
1.3.4.2. PUR (Polyurethane)	6
1.3.4..3 PTFE (Polytetrafluoroethylen)	6
1.4. Anatomische und (patho)physiologische Aspekte der Arterienwand ..	7
1.5. Biokompatibilität.....	8
1.6. Einheilung der alloplastischen Prothese	9
1.6.1. Inkorporation.....	9
1.6.2. Problematik des alloplastischen Gefäßersatzes.....	10
1.7. Beschichtungskonzepte	11
1.7.1. Baumann-Keller-Konzept (ESHS)	11
1.7.2. Titanbeschichtung	12
1.8. Das in-vitro-Modell.....	13
1.8.1. Vorarbeiten.....	13
1.8.2. Zielsetzung	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Zellen.....	15

2.1.1. Endothelzellen	15
2.1.2. Glatte Gefäßmuskelzellen	15
2.1.3. Kultivierung.....	15
2.2. Gefäßersatzmaterialien	16
2.2.1. Erstes Kollektiv: (ePTFE _r , ePTFE _r + ESHS, Polymer)	16
2.2.2. Zweites Kollektiv: (ePTFE _f , ePTFE _f + Titan)	17
2.2.3. Drittes Kollektiv: Pericard, Pericard + Titan	17
2.3. Versuchsanordnungen.....	17
2.3.1. Vorbereitung der Versuchsansätze	17
2.3.2. Bestimmung des Zellwachstums	19
2.3.2.1. Grundlagen	19
2.3.2.2. Durchführung	21
2.3.3. Apoptoserate	22
2.3.3.1. Grundlagen	22
2.3.3.2. Durchführung	23
2.4. Statistik	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Zellwachstum	25
3.1.1. Endothelzellen	25
3.1.1.1. Erstes Kollektiv	26
3.1.1.2. Zweites Kollektiv	27
3.1.1.3. Drittes Kollektiv	28
3.1.2. glatte Gefäßmuskelzellen	29
3.1.2.1. Erstes Kollektiv	29
3.1.2.2. Zweites Kollektiv.....	30
3.1.2.3. Drittes Kollektiv	31
3.2. Apoptoserate	32
3.2.1. Endothelzellen	32
3.2.1.1. Erstes Kollektiv	32
3.2.1.2. Zweites Kollektiv.....	34
3.2.1.3. Drittes Kollektiv	35

3.2.2. glatte Gefäßmuskelzellen	36
3.2.2.1. Erstes Kollektiv	36
3.2.2.2. Zweites Kollektiv.....	37
3.2.2.3. Drittes Kollektiv	39
4. Diskussion	41
4.1. Relevanz des In vitro-Modells.....	41
4.2. ePTFE mit ESHS-Beschichtung	42
4.2.1. Zellwachstum.....	42
4.2.2. Apoptoserate.....	43
4.3. ePTFE mit Titan-Beschichtung	43
4.3.1. Zellwachstum.....	43
4.3.2. Apoptoserate	44
4.4. Rinderpericard mit Titanbeschichtung.....	46
4.4.1. Zellwachstum.....	46
4.4.2. Apoptoserate.....	47
4.5. Schlussfolgerungen.....	48
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	53
7. Anhang.....	62
7.1. Geräte	62
7.2. Nährmedien	63
7.3. Chemikalien und Lösungen.....	63
7.4. Einzelwerte.....	64
7.4.1. Zellwachstumsbestimmung.....	64
7.4.1.1. Endothelzellen (absolut).....	64
7.4.1.2. Endothelzellen (relativ)	67
7.4.1.3. Glatte Gefäßmuskelzellen (absolut).....	70
7.4.1.3.1. Messreihe 1	70

7.4.1.3.2. Messreihe 2	72
7.4.1.4. Glatte Gefäßmuskelzellen (relativ).....	74
7.4.1.4.1. Messreihe 1	74
7.4.1.4.2. Messreihe 2	75
7.4.2. Apoptoserate	77
7.4.2.1. Endothelzellen	77
7.4.2.2. Glatte Gefäßmuskelzellen	80
8. Danksagung	83
9. Lebenslauf.....	84
10. Publikationen	85

II. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AR	Apoptoserate
Aufl.	Auflage
BMH	Biomechanisches Herz
bzw.	beziehungsweise
CA	Kalifornien
cm	Zentimeter
Dr.	Doktor
EC	Endothelzellen
ePTFE	expandiertes Polytetrafluoroethylen
ESHS	Endothelzelloberflächen-Heparansulfat
et al.	et alia
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
gr.	griechisch
h	Stunde
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MO	Missouri
n	Probenanzahl
nm	Nanometer
ox	oxidiert
PACVD	Plasma Activated Chemical Vapour Deposition

PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Polyethylenterephthalat
PI	Propiumiodid
Prof.	Professor
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PU	Polyurethan
red	reduziert
rel.	relativ
s.	siehe
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt
u. a.	unter anderem
UK S-H	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
v. a.	vor allem
V.	Vena
VA	Virginia
VSMC	vascular smooth muscle cells (Glatte Gefäßmuskelzellen)
Vv.	Venae
WA	Washington
z. B.	zum Beispiel
ZW	Zellwachstum

1. Einleitung

1.1. Einführung

Ein Gefäßersatz wird benötigt, um pathologisch veränderte Gefäßabschnitte zu überbrücken. Eine pathologische Veränderung ist beispielsweise eine Gefäßverengung (Stenose), ein Gefäßverschluss (Okklusion), eine Gefäßaufweitung (Aneurysma) oder ein Trauma. Grundsätzlich gibt es die Möglichkeit, eine Umgehung mit einem Bypass zu schaffen oder ein Gefäß vollständig zu ersetzen. Verwendung finden auch Patchmaterialien (individuell zuschneidbare Flicker) zur Versorgung begrenzter Gefäßwanddefekte. Die Hauptursache für pathologische Veränderungen eines Gefäßes ist die Atherosklerose. Sie hat eine steigende Prävalenz in der Bevölkerung, wie auch die damit verbundenen Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheit, Myocardinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Niereninsuffizienz, Schlaganfall [5]). Nach Angaben des statistischen Bundesamtes hat sich die Diagnosehäufigkeit der Atherosklerose in Krankenhäusern von 102 im Jahr 2000 auf 218 im Jahr 2010 je 100.000 Einwohner mehr als verdoppelt (s. Abbildung 1) [9].

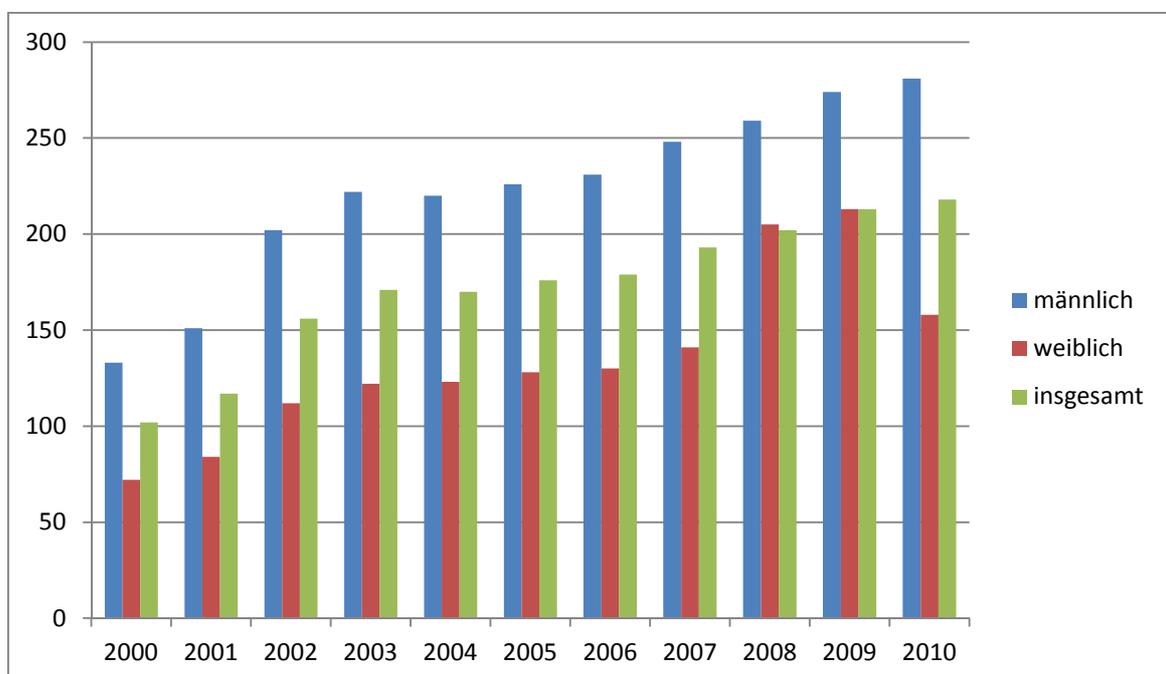


Abbildung 1: Diagnosehäufigkeit in Krankenhäusern je 100.000 Einwohner mit Diagnose I70(Atherosklerose) [9]

Für diesen Anstieg ist unter anderem die veränderte Altersstruktur der Bevölkerung verantwortlich. In der Gruppe der über 65-Jährigen stieg die Diagnosehäufigkeit der Atherosklerose in Krankenhäusern von 383 im Jahr 2000 auf 759 im Jahr 2010 je 100.000 Einwohner, also um 98% [9]. Die Situation wird sich in Zukunft noch verschärfen. Laut Aussage des statistischen Bundesamtes sind heute 25,9% der Bevölkerung 60 Jahre oder älter. Diese Zahl wird sich bis zum Jahre 2030 auf 36,8% erhöhen [69]. Die Notwendigkeit, einen adäquaten Gefäßersatz in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, wird also weiter steigen.

Die Atherosklerose ist eine degenerative Systemerkrankung, die den gesamten Körper betrifft und progredient verläuft. Ein gefäßchirurgischer Eingriff ist in der Regel nur die Beseitigung eines Symptomes. Das bedeutet auch, dass die zum Gefäßersatz bevorzugt eingesetzten körpereigenen Gefäße meist schon pathologisch verändert sind bzw. nur begrenzt zur Verfügung stehen. Die Verbesserung von Gefäßersatzmaterialien aus anderen Quellen ist daher wünschenswert.

1.2. Geschichte des Gefäßersatzes

Die Idee, pathologisch veränderte Blutgefäße zu ersetzen, um so die Vitalität der versorgten Struktur zu erhalten, ist alt. Den ersten protokollierten Versuch unternahm der flämische Anatom Andreas Vesalius (1514-1564), der die Idee hatte, Arterien durch Strohhalm zu ersetzen. Er war es auch, der als Erster die traumatische Aortenruptur beschrieb. Doch noch fehlten die geeigneten Materialien und Nähte, um den Erfolg des Gefäßersatzes zu erlauben [52]. Die moderne Gefäßchirurgie wurde 1902 von dem späteren Nobelpreisträger Alexis Carrel mit der Beschreibung der Gefäßanatomose begründet [12]. 1907 wurden bereits die Interposition kurzer homologer Venenabschnitte bei Arterienverletzungen von Erich Lexer in die Klinik eingeführt [24]. Bahnbrechend waren dann die experimentellen Arbeiten von Ernst Jäger um 1913, der zunächst den Einsatz von körpereigenem Gefäßersatz, später auch von tierischen Materialien und Kunststoffen erprobte [52].

Kriege waren immer wieder Schrittmacher in der Entwicklung des Gefäßersatzes. Um 1948 wurden sogenannte Gefäßbanken etabliert, in denen Leichengefäße gesammelt wurden. Aufgrund hoher Komplikationsraten (Aneurysmen, Infektionen) wurden diese

jedoch bald wieder aufgegeben [36]. Zunächst konzentrierte man sich wieder auf den körpereigenen Gefäßersatz. So gelang 1948 Jean Kunlin der erste femoropopliteale Venenbypass mit einem autologen Saphena-Transplantat bei einem 54-jährigen Patienten mit gangränösem Fußulcus, welches postoperativ rasch abheilte [20].

Nachdem durch den wissenschaftlichen und technischen Fortschritt in den 50er Jahren die standardisierte Herstellung von Kunststoffprothesen möglich wurde, konnten diese 1953 von Schuhmacher in die Klinik eingeführt werden. Die von ihm verwendeten Polymere PET (Polyethylenterephthalat) und PTFE (Polytetrafluoroethylen) sind bis heute der Standard für den alloplastischen Gefäßersatz. Einen bedeutenden Beitrag für den Erfolg des alloplastischen Gefäßersatzes leisteten Voorhees, Blakemore und Jaretzky im Jahr 1951 durch die Erkenntnis, dass v. a. poröse Materialien vom Körper akzeptiert werden und einheilen [20, 24].

Die Anforderungen, die heute an Gefäßprothesen gestellt werden, wurden 2007 treffend von Helmut Kogel zusammengefasst [52]:

- Vorhandensein in ausreichenden Dimensionen
- Standardisierte Fertigung (Konstanz der Qualität)
- Praktikabilität (Sterilisierbarkeit, Lagerfähigkeit, gutes Handling)
- Hohe Langzeitleitfähigkeit (chemische und physikalische Stabilität)
- Biokompatibilität (Histo- und Hämkompatibilität)
- Akanzerogenität

1.3 Einteilung der Gefäßersatzmaterialien

Die Anforderungen nach Kogel werden von den verschiedenen Prothesenmaterialien in unterschiedlichem Maße erfüllt. Es werden folgende Gruppen der Gefäßersatzmaterialien unterschieden [52]:

- Autogene/Autologe Materialien
- Allogene/Homologe Materialien
- Xenogene/Heterologe Materialien
- Alloplastische/ Synthetische Materialien

1.3.1 Autogene/AutologeMaterialien

AutologeMaterialien sind körpereigene Gefäße. Arterien wie die Aa. mammariaoderradialis werden vor allem in der coronarenBypasschirurgie verwendet [5, 29, 36]. Nachteilig ist, dass nur wenige kurze und englumige Abschnitte zur Verfügung stehen und das sich bei vorhandener, mulifokaler Arteriosklerose kaum ein gesundes, transplantierbares Gefäß finden lässt. Die autologe Vene ist erste Wahl bei einem Arterienersatz unterhalb des Leistenbandes [48, 49]. Zur Verfügung steht vor allem die V. saphena magna, alternativ auch die Vv. Saphenaparva, cephalica, und basilica. Die schwache Venenwand verbietet allerdings den Einsatz in aortaler und iliakalerPosition.Die Offenheitsrate für femoro-popliteale Bypässe betrug in einer 2003 von Klinkert et al. veröffentlichten Studie 75,6% für Venenbypässe, die von synthetischen Bypässen noch 51,9 % nach 5 Jahren [49]. Die daraufhin durchgeführte Durchsicht der Literatur zeigte, dass die synthetischen Materialien dem autologen Ersatz nach 5 Jahren mit 39% zu 74% deutlich unterlagen [48]. Nach wie vor ist das Saphena-Transplantat der Goldstandard, an dem sich andere Prothesenmaterialien messen.

1.3.2 Allogene/Homologe Materialien

Allogene Materialien sind körperfremde Gewebe derselben Spezies. Als 1948 die Gefäßbanken etabliert wurden, in denen Leichengefäße gesammelt wurden dachte man einen unerschöpflichen Pool an biologischen Gefäßersatzmaterialien gefunden zu haben. Wegen anhaltender Komplikationen (vor allem Aneurysmen und Infektionen)wurde diese Option jedoch inzwischen zugunsten der synthetischen Prothesen verlassen [36].

1.3.3 Xenogene/ Heterologe Materialien

Xenogenes Material ist biologisches Gewebe einer fremden Spezies. Die weitaus häufigste Anwendung eines Xenografts in der Medizin ist die Implantation von biologischen Herzklappen vom Schwein. Doch auch in der Gefäßchirurgie werden inzwischen Patches aus Schweine- oder Rinderpericardangewandt. Große Bedeutung hat die Vorbehandlung der tierischen Gewebe mit Glutaraldehyd.Durch Denaturierung der im Gewebe vorhandenen Proteine wird der Xenograft fixiert und stabilisiert. Die größten Probleme

der Xenografts ist die Verkalkung und Degradation, was unter anderem auf die Toxizität des Glutaraldehyd zurückzuführen ist [26, 84].

1.3.4 Alloplastische Materialien

Die alloplastischen oder synthetisch hergestellten Materialien bringen spezifische Probleme mit sich, die im Folgenden zusammengefasst sind:

- Thrombogenität
- progredienter Flexibilitätsverlust durch Degradationsprozesse
- Infektanfälligkeit (Ausschlusskriterium septische Chirurgie)
- Fehlendes Mitwachsen/Anpassen der Prothese

Die auf dem Markt etablierten Prothesenmaterialien sind PET (Polyethylenterephthalat), PTFE (Polytetrafluoroethylen) und PU (Polyurethan) mit jeweils spezifischen Einsatzgebieten.

1.3.4.1 PET (Polyethylenterephthalat)

PET ist ein Kunststoffpolymer aus der Gruppe der Polyester und wird unter dem Handelsnamen Dacron® vertrieben. Grundsätzlich ist bei diesem Material ein Kompromiss aus Porosität und primärer Blutdichtigkeit nötig. Im klinischen Einsatz sind derzeit gewebtes und gestricktes PET.

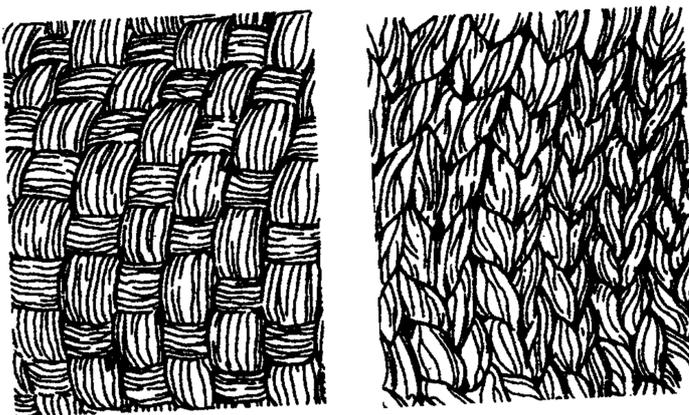


Abbildung 2: Strukturen von gewebtem PET (links), gestricktem PET (rechts) [73]

Nach Wesolowsky garantiert eine Erhöhung der Porosität eine bessere Einheilung [79]. So hat das gewebte PET eine geringe Porosität mit einer hohen Dichtigkeit und Reißfestigkeit,

doch zeigt es ein nur mangelndes Einheilungsverhalten. Nachteilig ist außerdem ein ausfransender Rand beim Zuschnitt und die Notwendigkeit einer großen Anastomosenbreite, um ein Ausreißen der Fäden zu verhindern. Die primäre Indikation für gewebtes PET ist der thorakale Einsatz (v.a. in aortaler Position) [52].

Gestricktes PET hingegen hat eine hohe Porosität, die zwar zur Blutabdichtung eine Vorgerinnung vor Implantation erfordert, doch sehr viel bessere Einheilung und Elastizität garantiert [54,].

1.3.4.2 PUR (Polyurethane)

Polyurethane entstehen durch Polymerisation von Urethanmolekülen. Von einigen Polyurethanprothesen ist bekannt, dass sie nach Implantation im Körper u. a. zu Toluylendiamin abgebaut werden, welches sich im Tierversuch als kanzerogen erwies [81]. Es konnten jedoch neue Polyurethane mit besserer Haltbarkeit und sehr guter Imitation der Compliance eines natürlichen Gefäßes entwickelt werden. Die Prothesen werden in der peripheren Bypass- und in der Dialyseshuntchirurgie eingesetzt [46, 71, 38].

1.3.4.3 PTFE (Polytetrafluoroethylen)

PTFE ist ein Polytertrafluoroethylen-Polymer, auch bekannt als Teflon® und besteht aus Fluor und Kohlenstoff. Das heute verwendete ePTFE (expandiertes PTFE), auch bekannt als GoreTex®, ist eine Weiterentwicklung um dem PTFE bessere Materialeigenschaften zu geben. ePTFE zeigt ein weitgehend biologisch inertes Verhalten. Dies ist unter anderem auf eine niedrige Oberflächenenergie, die einen hydrophoben Charakter bedingt und somit Blut und Wasser abweist, zurückzuführen [61]. ePTFE-Prothesen sind primär dicht für Blut und Wasser, zeigen aufgrund ihrer geringen Porosität allerdings ein schlechteres Einheilungsverhalten als Dacronprothesen. ePTFE ist das am häufigsten eingesetzte Material zur Anlage eines Dialyseshunts [70]. Eine weitere Indikation sind arterielle Rekonstruktionen mit geringen Durchmessern, z.B. als femoropoplitealer Bypass, wenn autologer Ersatz nicht mehr zur Verfügung steht oder für den coronaren Einsatz geschont werden soll [37, 46, 82]. Allerdings konnten die

vielversprechenden Eigenschaften des ePTFEleiderauch nicht die hohe Verschlussrate, die bei allen kleinkalibrigen (<6mm) Prothesen vorherrscht, überwinden [46, 61].

1.4 Anatomische und (patho)physiologische Aspekte der Arterienwand

Die Arterie weist typischerweise eine Dreischichtung aus Intima, Media und Adventitia auf. Jede Schicht hat charakteristische Bestandteile und Aufgaben. Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Typen von Arterien: den elastischen Typ (Aorta, herznahe Gefäße) und den muskulären Typ (periphere Gefäße).

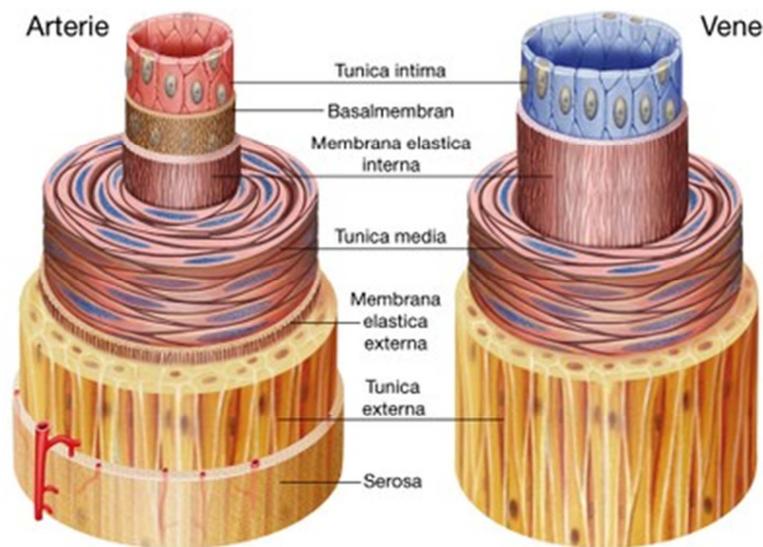


Abbildung 3: Wandaufbau der Arterie (links), Vene zum Vergleich (rechts) [22]

Die Intima besteht aus spindelförmigen Endothelzellen die sich einschichtig und mit der Längsachse in Flussrichtung auf einer Basalmembran orientieren. Die lumenseitige Oberfläche des Endothels ist besetzt mit der negativ geladenen Glykokalix. Wird sie unterbrochen (z .B. Trauma) wird die Blutgerinnungskaskade aktiviert. Veränderungen in der Beschaffenheit der Glykokalix steuern außerdem die Leukozytenmigration. Das Endothel hat weiterhin eine lumenregulierende Funktion durch die Fähigkeit zur Produktion von dilatierendem Stickstoffmonoxid (NO) und dem kontrahierenden Endothelin [55].

An das Endothel schließt sich die subendotheliale Schicht an. Dies ist der Ort der atherosklerotischen Intimaverdickung. Es kommt bei Triggerung durch Risikofaktoren (Alter, genetische Belastung, Diabetes mellitus, Hypertonus, Hyperlipidämie,

Hyperurikämie) zur Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media die vor Ort Extrazellulärmatrix (Proteoglykane, Kollagen- und elastische Fasern, Mikrofibrillen) produzieren. Im weiteren Verlauf lagern sich hier Lipide, Cholesterin und Makrophagen ab und bilden ein atheromatöses Plaque [51, 55]. Die Folge ist die Einengung des Lumens und Ischämie des abhängigen Gewebes. Da die subendotheliale Schicht bei Arterien vom elastischen Typ deutlicher ausgebildet ist, sind diese auch stärker von der Atherosklerose betroffen. Eine besondere Rolle spielen hämodynamische Turbulenzen, die physiologischerweise an Bifurkationen auftreten. So finden sich vereinzelt schon beim Kleinkind atheromatöse Veränderungen an den Nierenarterienabgängen [51].

An die Intima schließt die Membranaelastica interna an, ein Netz aus elastischen Fasern das besonders stark bei Arterien vom muskulären Typ ausgeprägt ist.

Die anschließende Media besteht aus spindelförmigen, glatten Muskelzellen, die zirkulär oder spiralförmig orientiert sind und sich innerhalb eines geordneten Netzes aus Kollagen- und elastischen Fasern befinden. Bei Arterien vom elastischen Typ ist dieses Netz kräftiger und in Schichten organisiert. Die Media hat hauptsächlich die Regulierung der Wandspannung und die Produktion von extrazellulärer Matrix zur Aufgabe.

Angrenzend befindet sich die Membranaelastica externa die wie die Membranaelastica interna aufgebaut, nur sehr viel schwächer ausgeprägt ist.

Die außen liegende Adventitia ist ein hochelastisches Netz aus kollagenen und elastischen Fasern sowie Proteoglykanen, welche von ortsständigen Fibroblasten produziert werden. Die Adventitia beherbergt die Gefäßwand versorgenden Vasavasorum und Nerven und stellt die Verbindung mit der umgebenden Gefäßscheide und dem perivaskulären Bindegewebe her [51, 55].

1.5 Biokompatibilität

Der Begriff Biokompatibilität (gr. Bios=Leben, kompatibel=verträglich) bezeichnet die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System [80].

Man unterscheidet die Strukturkompatibilität und die Oberflächenkompatibilität. Die Strukturkompatibilität ist definiert als Anpassung der Implantatstruktur an die

mechanischen Eigenschaften des Empfängergewebes (sog. „Struktur-Mimikry“). Die Oberflächenkompatibilität beschreibt die Anpassung der chemischen, physikalischen und biologischen Oberflächeneigenschaften des Implantates an das Empfängergewebe [80]. Eine Einteilung der daraus resultierenden Wechselwirkung an der Grenzfläche zwischen Implantat und Empfängergewebe wurde 1986 von Schenk für Knochenimplantate vorgestellt [65]. Diese Einteilung ist wie folgt auf Gefäßprothesen übertragbar:

- Inkompatibilität
Freisetzung von Substanzen in toxischen Konzentrationen oder von Antigenen, die Immunreaktionen (Allergie, Entzündung, Fremdkörperreaktion, Abstoßung) hervorrufen.
- Biokompatibilität
Freisetzung von Substanzen in nicht toxischen Konzentrationen, die zu Einkapselung in Bindegewebe oder schwachen Bindegewebereaktionen führen können.
- Bioinertheit
Keine Freisetzung toxischer Substanzen, keine Interaktion zwischen Implantat und Empfängergewebe.
- Bioaktivität
Positive Interaktion mit Gewebedifferenzierung des Empfängergewebes

Des Weiteren ist bei der Betrachtung der Biokompatibilität eines Materials die dynamische Komponente zu berücksichtigen. Darunter wird die Veränderung des Implantatmaterials während der Kontaktzeit mit dem Empfängergewebe verstanden und ist daher nur in Langzeitbeobachtungen verifizierbar [80].

1.6 Einheilung der alloplastischen Prothese

1.6.1 Inkorporation

Die Inkorporationsreaktion von alloplastischem Gefäßersatz entspricht einer Fremdkörperreaktion des umliegenden Gewebes, welche stark von der Biokompatibilität des Prothesenmaterials abhängt (s. 1.5). Die Inkorporationsreaktion eines Gewebes auf eine Gefäßprothese findet in drei fließend ineinander übergehenden Phasen statt.

Phase I = Frühphase

Diese Phase dauert bis zu zwei Wochen nach Implantation an. Die Prothese wird zunächst als Reaktion auf das Gewebetrauma von lockerem Granulationsgewebe umgeben. Im Verlauf durchwächst dieses reaktive Gewebe die Prothesenwand. An der luminalen Oberfläche setzen sich Proteine und Zellen aus dem Blutstrom ab.

Phase II= Organisationsphase

Diese Phase dauert bis zu einem Monat nach Implantation an. Durch Organisation des umgebenden Granulationsgewebes kommt es zur fortschreitenden bindegewebigen Einscheidung der Prothese. Eine chronische zelluläre Fremdkörperreaktion bleibt bestehen. An der luminalen Oberfläche organisiert sich aus den abgelagerten Zellen und Proteinen eine sogenannte Neointima. Die Ablagerungen werden von Makrophagen, die ebenfalls mit dem Blut eingebracht werden, phagozytiert und so in eine weiche Matrix umgewandelt bis schließlich die Besiedlung mit Endothelzellen erfolgt. Dieser stetig fortschreitende und unkontrollierbare Prozess kann schließlich zum Verschluss des Lumens führen.

Phase III = Spätphase

Diese Phase schließt sich ab 6 Monaten nach Implantation an und kann Jahre andauern. Im Regelfall wird ein bleibender Zustand der Gewebereaktion erreicht, wenn das Material eine ausreichend gute Biokompatibilität besitzt. Insbesondere die transprothetische Durchwachsung mit Bindegewebe spielt eine große Rolle, welche aber auch zum Elastizitätsverlust der Prothese und Abbau durch Biodegradation führt [25, 36, 52].

1.6.2 Problematik des alloplastischen Gefäßersatzes

Die spezifischen Probleme, die beim Einsatz von alloplastischem Gefäßersatz auftreten, lassen sich in akute und chronische Komplikationen unterteilen. Die akuten Komplikationen treten innerhalb der ersten Stunden bis wenige Tage nach Implantation auf und sind auf die fehlende Hämokompatibilität zurückzuführen. Es kommt bei Blutkontakt zur Aktivierung der Blutgerinnung, die im Extremfall den Sofortverschluss der Prothese herbeiführen kann. Diesem kann mit medikamentöser Antikoagulation und entsprechenden Beschichtungen (s. 1.7) entgegengewirkt werden. Die

chronischen Komplikationen umfassen Gewebereaktionen aufgrund fehlender Histokompatibilität, welche zum späteren Verschluss einer Gefäßprothese führen können. Zunächst ist hier die bereits erwähnte Bildung einer Neointima (s.1.6.1) im Lumen der Gefäßprothese zu nennen. Des Weiteren spielt die Entstehung einer Intimahyperplasie in den anastomosennahen Segmenten des Empfänger- und Spendergefäßes eine Rolle [61]. Die Intimahyperplasie ist zum einen die Folge einer Anpassungsreaktion der anastomosennahen Intima auf die lokal verminderte Blutflussgeschwindigkeit, zum anderen eine Reaktion auf die traumatisierende Gefäßnaht. Es kommt zur Aktivierung von subendothelialen glatten Muskelzellen, die vermehrt Extrazellulärmatrix produzieren, um eine höhere Blutflussgeschwindigkeit durch Lumenverengung zu erreichen [62].

1.7 Beschichtungskonzepte

1.7.1. Baumann-Keller-Konzept (ESHS)

Primär soll die Beschichtung von alloplastischen Gefäßersatzmaterialien die Aktivierung der Gerinnungskaskade in einer Prothese verhindern, um einem thrombotischen Sofortverschluss entgegenzuwirken (Hämokompatibilität). Sekundär sollen die Bildung einer Neointima und die anastomosennahe Intimahyperplasie (Histokompatibilität) verhindert werden (s.1.6.2). Das Konzept der Endothelzell-Besiedlung von Dilley et al. 1984 war der erstmalige Versuch, die Oberfläche der Prothesen der eines natürlichen Gefäßes so genau wie möglich anzupassen [42]. Hierfür wurde vor Implantation der Prothese die Prothesenoberfläche mit autologen oder allogenen Endothelzellen besiedelt. Die Hauptproblematik bestand durch eine unzureichende Adhärenz der Endothelzellen auf der Prothesenoberfläche und die auftretende Abwehrreaktion, wenn es sich nicht um autologe Zellen handelte. Ein weiterer Vorstoß war die Idee, die Blutgerinnung durch an der Prothesenoberfläche ortsständige Antikoagulanzen aktiv zu hemmen. Primär wurde dabei das 1918 entdeckte Heparin verwandt [41]. Dieses Konzept bot jedoch keinen Vorteil gegenüber der systemischen Gabe von Heparin hinsichtlich der Verschlussraten [45]. Die aktuell gebräuchlichste Strategie ist die gewollte Induktion einer Neointima durch die Entwicklung von mikroporösem, verstrecktem PTFE (ePTFE). Aufgrund der rauen Oberfläche kommt es zur verbesserten Anhaftung von Blutbestandteilen und rascher Ausbildung einer Neointima. Dieser Vorgang verbietet jedoch die Anwendung für

Prothesen mit einem Durchmesser, der 6 mm unterschreitet, da hier erhöhte Verschlussraten vorliegen [46]. So wurde schließlich das Baumann-Keller-Konzept entwickelt. Es basiert auf der Annahme, dass die natürliche Hämokompatibilität durch das Vorhandensein von speziellen Oberflächen-Polysacchariden der Endothelzellen gewährleistet wird, die gemeinsam die Glykokalix bilden. Es handelt sich hierbei um das Endothelzelloberflächen-Heparansulfat (ESHS) [3, 4, 17]. Darauf beruhend ist es möglich, eine künstliche Hämokompatibilität zu erzeugen, indem man Prothesenoberflächen mit ESHS beschichtet. ESHS hat genau wie Heparin ein Grundgerüst aus Copolymeren mit Uronsäure und Glukosaminen, besteht jedoch aus fünf Strukturdomänen, die sich in der Anzahl der Disacchridwiederholungen (Repeats) vom Heparin unterscheiden, ebenso wie im Grad der Sulfatierung und Acetylierung. ESHS kann sowohl aus Zellkulturen isoliert als auch in einem mehrstufigen Prozess aus Heparin gewonnen werden. ESHS kann dann unter Anwendung eines breiten Spektrums von Immobilisierungstechniken auf eine Oberfläche kovalent oder ionisch verankert werden [40].

1.7.2. Titanbeschichtung

Ein weiteres Beschichtungskonzept ist die Titanisierung von Prothesenoberflächen. Dazu werden 30-50 nm dicke Titanschichten mit dem PACVD-Verfahren (Plasma Activated Chemical Vapour Deposition) auf die Oberflächen (z.B. eine PTFE-Prothese) aufgedampft. Dabei gehen Titan und Prothesenmaterial eine kovalente Bindung ein. Titan zeichnet sich durch eine besondere biologische Inertheit und somit Körperverträglichkeit aus. Außerdem ist es besonders stabil gegen Biodegradation [43, 84]. Ziel einer Titanbeschichtung ist eine verbesserte Adhäsion von Endothelzellen auf der Prothesenoberfläche. So kann durch eine Besiedlung vor Implantation eine optimale Oberflächenkompatibilität erzeugt werden [30, 61]. Eine besondere Rolle spielt die Titanisierung von Xenografts. In dieser Arbeit wird dafür Rinderpericard verwendet. Wie bereits unter 1.3.3. erwähnt können Komplikationen unter anderem auf die Freisetzung von Glutaraldehyd-Rückständen zurückgeführt werden [26]. Aufgrund dieser Tatsache ist keine Besiedlung mit autologen Endothelzellen möglich, was den besten Schutz vor Degradation darstellt [18]. Eine Detoxifizierung ist also wünschenswert. Gulbins et al gelang es, Xenografts durch Detoxifizierung der Glutaraldehyd-Rückstände mit Zitronensäure und anschließender Besiedelung mit Fibroblasten für

autologe Endothelzellen besiedelbar zu machen [30]. Eine bessere Methode ist die Titanisierung von Xenografts mit vorangestellter enzymatischer Aldehyddehydrogenasen-Behandlung. Die so behandelten Xenografts haben im Vergleich mit unbehandelten Materialien einen um mehr als 90% reduzierten Aldehydgehalt im Gewebe. Die mit Zitronensäure behandelten Xenografts haben gerade einen um 23,7% bzw. 33,3% reduzierten Aldehydgehalt. Ein nur titanisiertes Material ohne vorhergehende Aldehyddehydrogenasen-Behandlung, wie es hier verwendet wird, hat immerhin einen um 56% reduzierten Aldehydgehalt [31, 84].

1.8 Das in-vitro-Modell

1.8.1 Vorarbeiten

Für die Bestimmung der in vitro Histokompatibilität von synthetisch hergestellten Materialien für humane Zellen gibt es eine Vielzahl von in-vitro-Modellen. Die Arbeitsgruppe um Broll und Duchrow in Lübeck untersuchte 2002 die Proliferation und Apoptose von Fibroblasten und Zervixkarzinomzellen während der Exposition mit verschiedenen Netzmaterialien. Diese werden zum Verschluss von Bauchwanddefekten, z.B. Hernien, benutzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate der Zellen bei Exposition mit einem Polypropylnetz im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht war [16]. Diese Methode wurde 2008 durch Schmidt und Wulff, ebenfalls Lübeck, um eine Zellwachstumsbestimmung, sowie um weitere Zellreihen (Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen) ergänzt und erstmals für alloplastische Gefäßersatzmaterialien angewendet [81]. Es zeigte sich, dass alle drei beobachteten Gefäßersatzmaterialien (ePTFE, PET, PUR) das Zellwachstum der Zellreihen hemmen und die Apoptoserate erhöhen. ePTFE hatte dabei den vergleichsweise geringsten Einfluss auf die Zellen. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit neben Rinderpericard ePTFE als Trägermaterial für die zu untersuchenden Beschichtungen Titan und ESHS ausgewählt.

1.8.2. Zielsetzung

Alloplastischer Gefäßersatz ist für die heutige Chirurgie in Zeiten steigender Atheroskleroseprävalenz und begrenztem autologen Gefäßersatz unverzichtbar. Es existieren zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien, welche die schlechteren

Ergebnisse des alloplastischen Materials im Vergleich mit autologem Ersatz zeigen. Ziel dieser Arbeit ist die systematische Untersuchung der in vitro Histokompatibilität von Gefäßprothesenmaterialien, insbesondere der Vergleich von beschichtetem mit unbeschichtetem Material. Der Nachteil einer in vitro Untersuchung ist dabei die eingeschränkte Nachbildung des komplexen Organismus eines Lebewesens. Deshalb sind nur sehr bedingte Aussagen über den späteren Erfolg oder Misserfolg eines Gefäßersatzmaterials möglich. Der Vorteil resultiert direkt aus diesem Problem. Die Verwendung isolierter Zellkulturen erlaubt die Konzentration auf spezielle Aspekte der Material-Zell-Interaktion ohne Störfaktoren. Die Hypothesen für diese Arbeit werden wie folgt gestellt:

1. Es ist zu erwarten, dass alle Materialien im Vergleich zur Kontrolle das Zellwachstum hemmen und die Apoptoserate erhöhen.
2. Das Zellwachstum soll durch die beschichteten Materialien (ePTFE+ESHS, ePTFE+Titan, Pericard+Titan) aufgrund besserer Histokompatibilität weniger gehemmt werden als durch die unbeschichteten Materialien (ePTFE, Pericard). Insbesondere für die titanisierten Materialien ist eine verbesserte Endothelzelladhäsion gefordert, so dass hier gegenüber der Kontrolle ein erhöhtes Zellwachstum zu erwarten ist.
3. Die Apoptoserate soll durch die beschichteten Materialien geringer erhöht werden als durch die unbeschichteten Analoga.
4. Des Weiteren wird postuliert, dass das xenogene Material Rinderpericard einen weniger stark ausgeprägten Effekt auf die Zellreihen hat als das alloplastische Material ePTFE.

2. Material und Methoden

2.1. Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei humane Zellreihen verwendet, mit denen alloplastischer Gefäßersatz bei Implantation in Kontakt kommt. Die Endothelzellen entsprechen den häufigsten Zellen der Intima eines Gefäßes, die glatten Gefäßmuskelzellen denen der Media.

2.1.1. Endothelzellen

Es handelt sich um die Zellreihe HAoEC-c (C-12271, Promocell, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen entstammen der gesunden Aorta eines Erwachsenen.

2.1.2. Glatte Gefäßmuskelzellen

Es handelt sich um die Zellreihe T/G HA-VSMC (CRL-1999, ATCC, Manassas, VA, USA). Die Zellen entstammen der gesunden Aorta eines elf Monate alten Mädchens.

2.1.3. Kultivierung

Die Zellen wurden grundsätzlich nach den in [19] beschriebenen Techniken gehandhabt. Etwaige Abweichungen entstanden nur durch Angaben des Zelllieferanten oder durch laborinterne Arbeitsmethoden und sind gegebenenfalls angegeben.

Die Zelllinien wurden ausschließlich in mit Schweinegelatinelösung beschichteten Gewebekulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland, 25, 75, 175 cm³) kultiviert. Zur Beschichtung wurde eine sterile 1% Schweinegelatinelösung hergestellt aus PBS (PAA, Pasching, Österreich) und pulverisierter Schweinegelatine (G1890, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Der gesamte Boden der Kulturflasche wurde mit der Lösung bedeckt und für 10 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank (Heraeus, Hanau, Germany) inkubiert. Im Anschluss wurde die überschüssige Lösung abgesaugt. Die Inkubation der Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in zellspezifischen Nährmedien (s.7.2.).

Die Zellkultur wurde geteilt, wenn eine konfluente Zellschicht, definiert als eine Bodendeckung von mehr als 90%, erreicht war. Dafür wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Österreich) für etwa 7 Minuten

inkubiert, bis alle Zellen vom Flaschenboden mikroskopisch sichtbar gelöst waren. Dadurch entstand eine Zellsuspension, die gleichmäßig auf zwei Kulturflaschen bzw. die nächstgrößere Flaschengröße verteilt wurde, welche dann mit einer ausreichenden Menge frischen Nährmediums (25cm³-5ml, 75cm³-20ml, 175cm³-50ml) beschickt wurden. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Endothelzellen ca. einmal pro Woche passagiert und alle 2-3 Tage mit frischem Nährmedium versorgt. Die glatten Gefäßmuskelzellen zeigten ein regeres Wachstumsverhalten und konnten alle 2-3 Tage passagiert werden, wobei der Wechsel des Nährmediums stattfand.

2.2. Gefäßersatzmaterialien

Die unterschiedlichen Gefäßersatzmaterialien, die sich derzeit auf dem Markt befinden, wurden bereits in der Einführung ausführlich beschrieben. Die in dieser Arbeit untersuchten Gefäßersatzmaterialien unterscheiden sich in ihrem Material und in ihrer Beschichtung. Sie wurden in drei Kollektive, analog zur folgenden Auflistung, eingeteilt. Zu jedem Kollektiv gehört noch eine Kontrollgruppe zum Vergleich. Da die Versuche teilweise parallel gelaufen sind, haben sie teilweise dieselben Kontrollgruppen. Die Materialien sind nur innerhalb der Kollektive miteinander vergleichbar, da die Form die Kontaktfläche mit den Zellen und somit auch das Ergebnis beeinflusst. Dies ist der Grund, warum es die Gruppe ePTFE sowohl im ersten als auch im zweiten Kollektiv gibt. Einmal liegt es als rundes Gefäßprothesenmaterial (ePTFE_r) vor, einmal als flaches Patchmaterial (ePTFE_f).

Alle Materialien wurden unter sterilen Bedingungen gehandhabt und für die Versuche vorbereitet.

2.2.1. Erstes Kollektiv: (ePTFE_r, ePTFE_r + ESHS, Polymer)

Hierbei handelt es sich um speziell für diese Arbeit angefertigte Gefäßprothesen der Firma Vascutec mit und ohne ESHS-Beschichtung. Sie sind in dieser Form nicht im Handel erhältlich. Die Beschichtung wird über einen Polymer an das ePTFE gebunden. Das isolierte Polymer wird gesondert untersucht. Die Prothesen haben einen Durchmesser von 4,5mm und eine Länge von 30 cm. Das Polymer liegt als flaches Material vor.

2.2.2. Zweites Kollektiv: (ePTFE_f, ePTFE_f + Titan)

Hierbei handelt es sich um Gefäßpatches aus ePTFE, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Norbert Guldner (Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des UK S-H, Campus Lübeck) zur Verfügung gestellt wurden. Die Hälfte des ePTFE_f wurde mit Titan bedampft, die andere Hälfte nicht behandelt.

2.2.3. Drittes Kollektiv: Pericard, Pericard + Titan

Hierbei handelt es sich um in 20% Glutaraldehydlösung denaturiertes und sterilisiertes Rinderpericard. Das Material liegt in Patchform vor. Die Hälfte des Materials wurde analog zum ePTFE mit Titan bedampft.

2.3. Versuchsanordnungen

Es wurden zwei Parameter der Zell-Material- Interaktion unter laborchemischen Bedingungen bestimmt: Zellwachstum und Apoptoserate. Diese Parameter wurden ausgewählt, weil sie sich als besonders sensibel und damit aussagekräftig erwiesen haben [2, 21, 27, 81].

2.3.1 Vorbereitung der Versuchsansätze

Zur Vorbereitung der Versuchsansätze wurden sterile 12-Well-Platten mit Deckel (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 1% Schweinegelatinelösung (siehe 2.1.3) beschichtet. Die Gefäßersatzmaterialien wurden in ca. 1cm*1cm große Stücke zerschnitten. Alle Arbeitsschritte sind unter sterilen Bedingungen durchgeführt worden, um Verunreinigungen der Zellkulturen zu vermeiden. Die 12-well-Platten wurden dann mit den Materialstücken versehen, bis auf die Platte, welche für die Leerkontrollen vorgesehen war. Es wurden $0,5 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml Nährlösung, die analog einer Passagierung hergestellt wurde (s.2.1.3.), zu den Ansätzen hinzugegeben. Die Zellzahl wurde durch Färbung mit 0,4% Trypanblaulösung (T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Zählung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt [63].



Abbildung 4: 12-well-Platte mit Rinderpericard

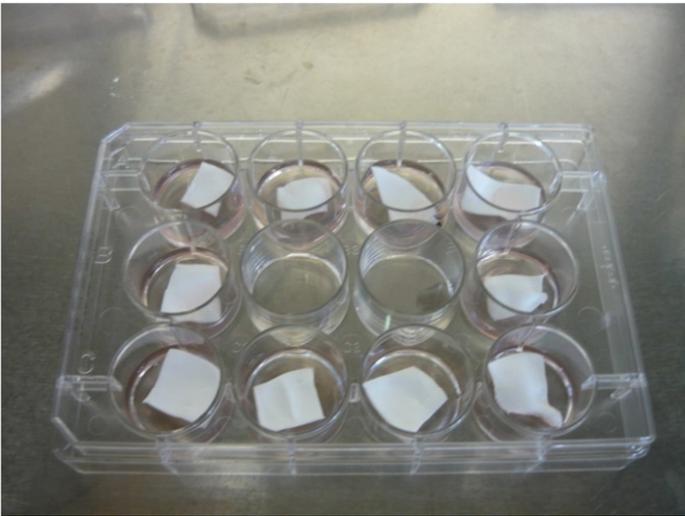


Abbildung 5: 12-well-Platte mit ePTFE+Titan

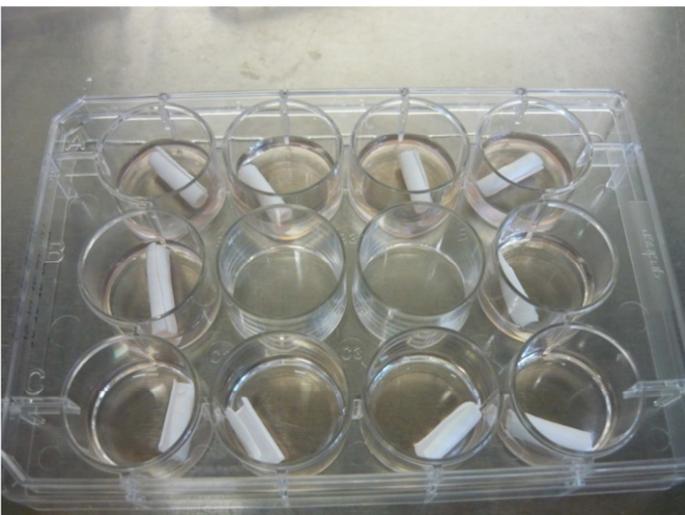


Abbildung 6: 12-well-Platte mit ePTFE+ESHS



Abbildung 7: 12-well-Platte mit Polymer (während Zellwachstumsbestimmung)

2.3.2 Bestimmung des Zellwachstums

2.3.2.1. Grundlagen

Das Zellwachstum wurde gemessen durch die Bestimmung der sich verändernden Zellzahl über die Zeit. Dazu wurde der Alamar Blue Assay (Biosource, Solingen, Deutschland) verwendet, eine verlässliche und einfache Methode um Zellviabilität zu quantifizieren [2, 6]. Alamar Blue (Resazurin) ist ein wasserlöslicher, nicht toxischer Indikator für die proliferative Aktivität von Zellen. Es handelt sich hierbei um einen dunkelblauen Farbstoff, der von den Zellen mit dem Nährmedium aufgenommen und metabolisch von NADPH/NADH-abhängigen Hydrogenasen zu dem pinkfarbenen und fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Dieser Farbumschlag kann spektrometrisch durch Extinktionsmessung bei 570/600 nm, als auch fluorometrisch bei 530/560nm gemessen werden [13].



Abbildung 8: 12-well-Platte mit ePTFE+ESHS und Alamar Blue nach 24 Stunden zum Zeitpunkt 0 Stunden

Je mehr Indikator verbraucht wird, also je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto größer ist auch der Farbumschlag, also die prozentuale AlamarBlue Reduktion (= %AB-Reduktion) [1]. Diese wird durch die Extinktionen über folgende Formel nach Herstellerangaben berechnet:

$$\%AB \text{ reduction} = \frac{(\epsilon_{ox\lambda_2})(A\lambda_1) - (\epsilon_{ox\lambda_1})(A\lambda_2)}{(\epsilon_{red\lambda_1})(A'\lambda_2) - (\epsilon_{red\lambda_2})(A'\lambda_1)} \times 100$$

$\epsilon\lambda_1$ und $\epsilon\lambda_2$ sind Konstanten und bezeichnen den molaren Extinktionskoeffizienten von AlamarBlue bei 570 und 600 nm, beziehungsweise der oxidierten (ϵ_{ox}) und reduzierten (ϵ_{red}) Form. $A\lambda_1$ und $A\lambda_2$ sind die gemessenen Extinktionen bei 570 und 600 nm, beziehungsweise die Extinktionen der Kontrollansätze ($A'\lambda_1$ und $A'\lambda_2$) [2].

Das Zellwachstum ist definiert als Änderung der Zellzahl über die Zeit. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Extinktionen in festen Intervallen zum Zeitpunkt 0, 2, 4 und 6 Stunden gemessen. Die Zellzahl für den jeweiligen Tag wurde dann als Steigung des Graphen zwischen den Zeitpunkten in der Einheit %AB-Reduktion/h abgelesen. Diese Messungen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h wiederholt, um die Änderung der Zellzahl über die Zeit festzustellen. Versuchsbedingt liegt der erste messbare Wert, also der Ausgangswert bei 24 h (bei der Apoptoserate bei 0h), weil die Zellen für eine Messung am Boden der 12-Well-Platte festgewachsen sein müssen. Um Vergleichbarkeit der Werte untereinander zu ermöglichen, wurden alle Werte auf den jeweiligen 24h Wert relativiert.

So ergibt sich ein einheitlicher Ausgangswert von 100% und die späteren Messwerte sind als prozentuale Änderung zum 24h-Wert zu verstehen.

2.3.2.2. Durchführung

Die Vorbereitung der Versuchsansätze entspricht dem in 2.3.1. beschriebenen Procedere. Nach 24 Stunden Inkubation wurde im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axioplan, Oberkochen, Deutschland) überprüft, ob die Zellen angewachsen und vital sind, da nur für diesen Fall eine Messung sinnvoll war. Das Kennzeichen vitaler Zellen war die Adhärenz an der Flaschenwand sowie die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen. Runde, in Suspension befindliche Zellen wurden als avital verworfen.

Für diese Arbeit wurde die spektrometrische Messung des Farbumschlages mit einem Microplate Reader (Tecan Safire2™ Microplatereader, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gewählt. Zur Vorbereitung der Messung wurde zunächst aus jedem Loch der 12-well-Platte das Nährmedium abgesaugt und durch 2ml eines phenolrotfreien Mediums ersetzt (D-MEM, 11880-028, invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), da der Farbstoff Phenolrot die Messung verfälscht. Zusätzlich wurde eine kleine Petrischale (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 2ml des phenolrotfreien Mediums beschickt. Diese diente der Kontrollmessung. Im Anschluss wurden die 12-well-Platten und die Petri-Schale für eine Stunde im Feuchtbrutschrank unter genannten Bedingungen inkubiert, damit die Zellen sich an das neue Medium adaptieren konnten. Dann wurden 200 µl Alamar Blue zu den Proben gegeben. Zur Messung zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden direkt jeweils 100 µl pro Loch und Petrischale entnommen und in eine 96-well-Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Diese wurde anschließend in den Card-Reader eingeführt und die Extinktionen der Proben bei 570 und 600 nm gemessen.

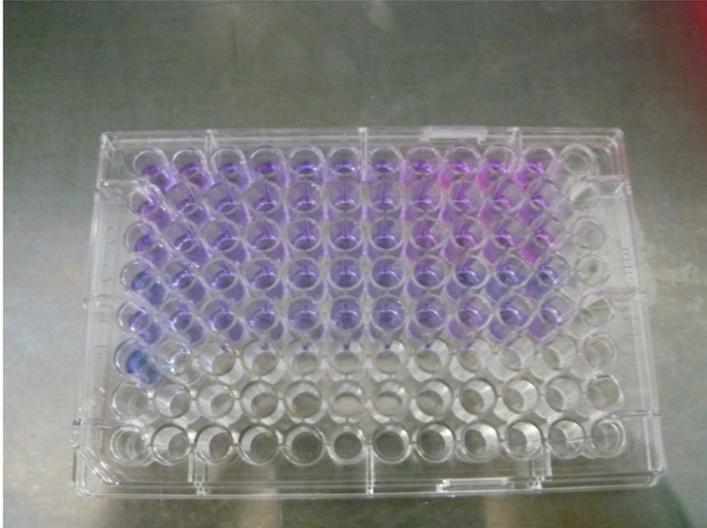


Abbildung 9: 96-well-Platte mit Proben nach 72 Stunden zum Zeitpunkt 6 Stunden. Der Farbumschlag ist in den Löchern rechts oben am deutlichsten zu erkennen.

Dieser Vorgang wurde dann zu den Zeitpunkten 2,4 und 6 Stunden wiederholt. Nach der letzten Messung wurde das Medium mit dem Alamar Blue abgesaugt, der Zellrasen auf den Böden der Löcher der 12-well-Platte mit PBS gewaschen und diese mit frischem Nährmedium versehen und zurück in den Feuchtbrutschrank gestellt, um die Vitalität der Zellen für die Messungen an den Folgetagen zu erhalten.

2.3.3. Apoptoserate

2.3.3.1. Grundlagen

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod, der nach einem genetisch festgelegten Schema abläuft. Dieses Schema kann durch verschiedene Signale (hypoxisch, toxisch, physikalisch, immunologisch, mikrobiell, physiologisch)aktiviert werden. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Das Cytochrom C ist ein Kofaktor zur Aktivierung von in der Zelle vorhandenen bis dahin inaktiven Caspasen. Diese führen das apoptotische Programm aus, indem sie Proteine und DNA an vorbestimmten Stellen spalten. In der Folge macht die apoptotische Zelle einige Veränderungen durch. Zuerst löst sie sich aus Ihrem Zellverband, weil ihre Zellverbindungen aufgelöst werden. Sie schrumpft zusammen durch Kondensation von Zytoplasma und des Nucleolus, behält aber noch ihre Zellorganellen. Dieser Zustand wird auch als Zellmumie bezeichnet. Schließlich verändert sich auch die Zellmembran, unter anderem wird Phosphatidylserin,

ein Membranphospholipid, von der inneren Zellmembran an die äußere transloziert [15]. Durch die spezifische Bindung an Phosphatidylserin können also untergehende Zellen markiert werden. Annexin V ist ein calciumabhängiges phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin. Durch Kopplung an das fluoreszierende Fluoresceinisothiocyanat(FITC) werden die so markierten Zellen detektierbar in der Durchflusszytometrie. Jedoch setzen auch nekrotische Zellen mit defekter Zellwand Phosphatidylserin aus ihrem Inneren frei. Um diese Zellen auszuschließen, erfolgt eine Parallelfärbung mit dem fluoreszierenden Propidiumiodid. Dieses bindet an Nucleinsäuren, was nur bei defekter Zellwand möglich ist, also nicht bei den frühapoptotischen Zellmumien. Es ergibt sich folgendes Spezifikationschema:

	Frühapoptotisch	Nekrotisch/Spätapoptotisch	Vital
AnnexinV-FITC	+	+	-
Propidiumiodid	-	+	-

Tabelle 1: Spezifikationschema der Annexin-FITC/PI-Färbung

Da die nekrotischen Zellen nicht von den spätapoptotischen unterschieden werden können, ist vor Allem die Veränderung des Anteils derjenigen Zellen, die positiv für Annexin/FITC und negativ für Propidiumiodid sind, von Interesse. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an allen gezählten Zellen entspricht der Apoptoserate. Die Veränderung dieses Anteils spiegelt die Entwicklung der Apoptoserate über die Zeit wieder [74].

2.3.3.2. Durchführung

Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch mit dem BD FACSCanto™ Flowcytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit dem AnnexinV/FITC ApoptosisDetection Kit I (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gefärbt, das sowohl den Marker AnnexinV/FITC als auch Propidiumiodid zur Parallelfärbung enthält. Die Vorbereitung der Versuchsansätze entspricht dem in 2.3.1. beschriebenen Procedere. Parallel zur Vorbereitung der 12-well-Platten wurde die Nullpunktmessung vorbereitet. Dazu wurde ein Milliliter der Zellsuspension, die auch zur Befüllung der Platten verwendet wurde, in ein FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt und bei 125g 5 min lang zentrifugiert. Die Zellen waren im

Anschluss als trüber Schleier am Boden des FACS-Röhrchens erkennbar. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem Waschschrift mit 0,5% Fötalem Kälberserum in PBS gereinigt. Es folgte die Resuspension in 100µl gekühltem Binding Puffer (ApoptosisDetection Kit). An diesem Punkt wurden jeweils 5µl Annexin/FITC und Propiumiodid (beides ApoptosisDetection Kit) zugefügt und die Proben für 15 min kühl und dunkel gelagert. Im Anschluss wurden weitere 400µl des Binding Puffers zugefügt. Die so vorbereiteten Ansätze wurden schließlich mit dem Durchflusszytometer ausgewertet. Diese Färbeprozedur wurde nach 24, 48 und 72 Stunden wiederholt. Hierfür wurden die Zellen aus den entsprechenden Ansätzen verwendet, nachdem das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gespült und für 7 min bis zur mikroskopisch sichtbaren Lösung der Zellen mit Trypsin behandelt wurde. Das Trypsin wurde mit zellspezifischem Nährmedium inaktiviert und die so entstandene Zellsuspension in die FACS-Röhrchen überführt. Auf diese Art konnte die Entwicklung der Apoptoserate zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden verfolgt werden.

2.4. Statistik

Zur Erhebung der deskriptiven und vergleichenden Statistik wurde das Programm SPSS Version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Beratung von Dr. Reinhardt Vonthein vom Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

Um die jeweiligen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurden die jeweiligen Mittelwerte herangezogen. Zur Signifikanztestung wurde der Mann-Whitney-U-Test (Summenrangtest) für unverbundene, nicht normalverteilte Stichproben angewandt. Zum Vergleich der Werte einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Mittelwerte verglichen und durch den Wilcoxon-Test (Vorzeichenrangtest) für verbundene, nicht normalverteilte Stichproben auf Signifikanz getestet. Zur Korrektur der Alphafehler-Kumulierung wurde schließlich die Bonferroni-Holm-Prozedur durchgeführt. Als signifikant wurden nur p-Werte unterhalb des lokalen α -Niveaus angenommen. Das globale α -Niveau wurde auf 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Zellwachstum

Das Zellwachstum wurde definiert als Änderung der Zellzahl über die Zeit. Die Zellzahl für den jeweiligen Zeitpunkt 24h, 48h und 72h wurde indirekt als Steigung des Graphen der photometrisch gemessenen AlamarBlue-Reduktion in der Einheit %AB-Reduktion/habgelesen und auf den 24h Wert relativiert (s.2.3.2.1).

Die Methode wird als indirekt bezeichnet, weil es ohne Eichung nicht möglich ist, die absolute Zellzahl zu bestimmen. Eine Eichung der Methode ist zu den Zwecken dieser Versuche nicht möglich, da davon auszugehen ist, dass die Reduktion von AlamarBlue und damit auch die Absorptionen sowohl von der Zellart als auch von der Zellpassage abhängig sind. Folglich hätte zu jeder Versuchsreihe eine umfangreiche Eichreihe durchgeführt werden müssen. Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen hätte jedoch aus wissenschaftlicher Sicht keinerlei Erkenntnisgewinn versprochen, da nur die Änderung der Zellzahl von Interesse ist. Die Vergleichbarkeit der Messreihen untereinander ist nach Relativierung gegeben. Dadurch beträgt der 24h Wert immer 1 und alle Werte sind dimensionslos.

Um deskriptive Aussagen zum Zellwachstum innerhalb einer Messreihe machen zu können (z.B. „die Zellzahl stieg über die Zeit an“), wurden jeweils die Mittelwerte einer Gruppe (Kontrolle, ePTFE_r, ...) zum Zeitpunkt 48h und 72h gegen den Mittelwert bei 24h mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben auf Signifikanz getestet.

3.1.1. Endothelzellen

Die relative Zellzahl der humanen Endothelzellen bei Inkubation ist in nachstehenden Abbildungen bzw. Tabellen mit den jeweils miteinander vergleichbaren Materialgruppen als ein Kollektiv im Vergleich zu der Kontrollgruppe dargestellt. Die p-Werte der Signifikanzanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test sind jeweils in einer zweiten Tabelle dargestellt. Die nach der Bonferroni-Holm-Prozedur signifikanten p-Werte sind der Übersichtlichkeit halber grün eingefärbt.

3.1.1.1. Erstes Kollektiv

Für das erste Kollektiv (ePTFE_r, ePTFE_r+ESHS, Polymer, Kontrolle) veränderte sich in der Kontrollgruppe und der Polymergruppe die Zellzahl über den Beobachtungszeitraum (zwischen 24 und 72 Stunden) nicht signifikant. Die Zellzahl in der ePTFE_r-Gruppe stieg leicht an (um 21, 5%), die der ePTFE_r+ESHS-Gruppe verringerte sich (um 35,5%). Im Gruppenvergleich der relativen Zellzahlen unterscheidet sich nach 48 h und 72 h lediglich die ePTFE_r+ESHS-Gruppe mit einer geringeren Zellzahl von der Kontrollgruppe. Die ePTFE_r- und die Polymergruppe unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Kontrollgruppe. Ein Unterschied zwischen ePTFE_r- und ePTFE_r+ESHS-Gruppe ist nach 48h und 72h signifikant. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich außerdem nach 48h vom Polymer, nach 72h ist diese Abweichung nur noch für das ePTFE_r nachweisbar (Tabelle 2, 3 sowie Abbildung 10).

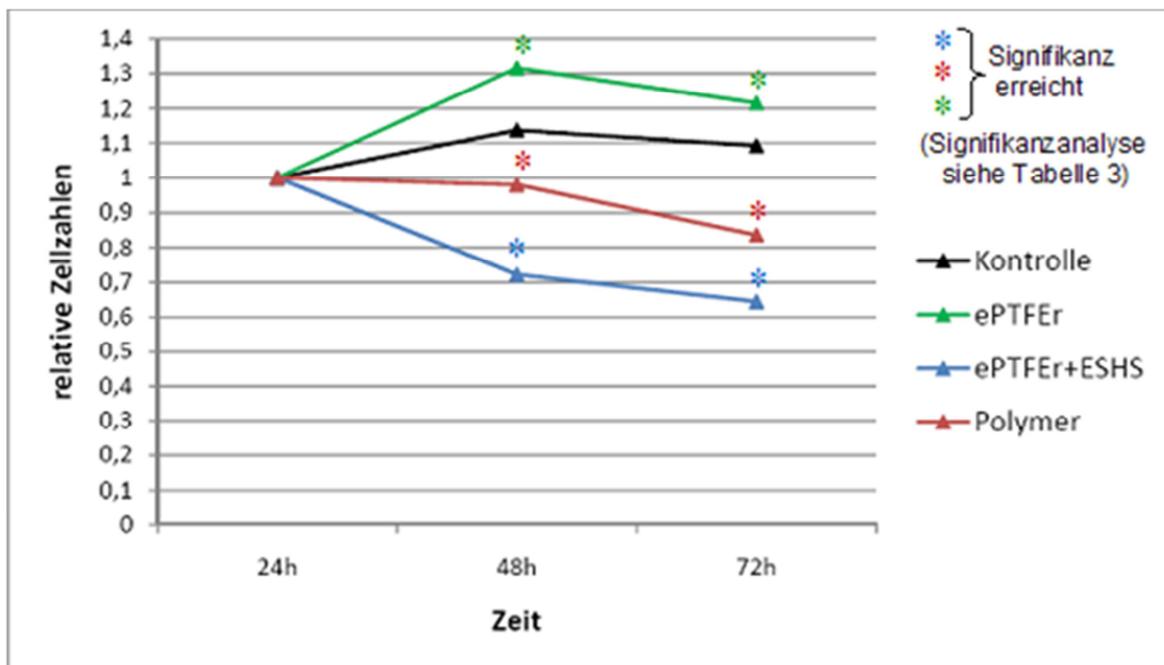


Abbildung 10 : relative Zellzahlen EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 11)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _r	ePTFE _r +ESHS	Polymer
	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)
24h	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)
48h	1,137 (0,18)	1,316 (0,41)	0,722 (0,15)	0,980 (0,13)
72h	1,092 (0,30)	1,215 (0,16)	0,645 (0,15)	0,836 (0,21)

Tabelle 2: relative Zellzahlen EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 11) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle- ePTFE _r	Kontrolle- ePTFE _r +ESHS	Kontrolle- Polymer	ePTFE _r - ePTFE _r +ESHS	ePTFE _r - Polymer	ePTFE _r +ESHS- Polymer
48h	0,401	0,000	0,028	0,000	0,000	0,002
72h	0,401	0,001	0,040	0,000	0,001	0,019

Tabelle 3: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.1.1.2. Zweites Kollektiv

Für das zweite Kollektiv (ePTFE_r, ePTFE_r+Titan, Kontrolle) veränderte sich die Zellzahl in der Kontrollgruppe und der ePTFE_r-Gruppe über den Beobachtungszeitraum (zwischen 24 und 72 Stunden) nicht signifikant. Die Zellzahl in der ePTFE_r+Titan-Gruppe stieg leicht an (um 20,2%). Im Gruppenvergleich unterscheiden sich die Materialgruppen zu keinem Zeitpunkt von der Kontrollgruppe, lediglich unterscheiden sich ePTFE_r und ePTFE_r+Titan nach 72 h signifikant voneinander (Tabelle 4, 5 sowie Abbildung11).

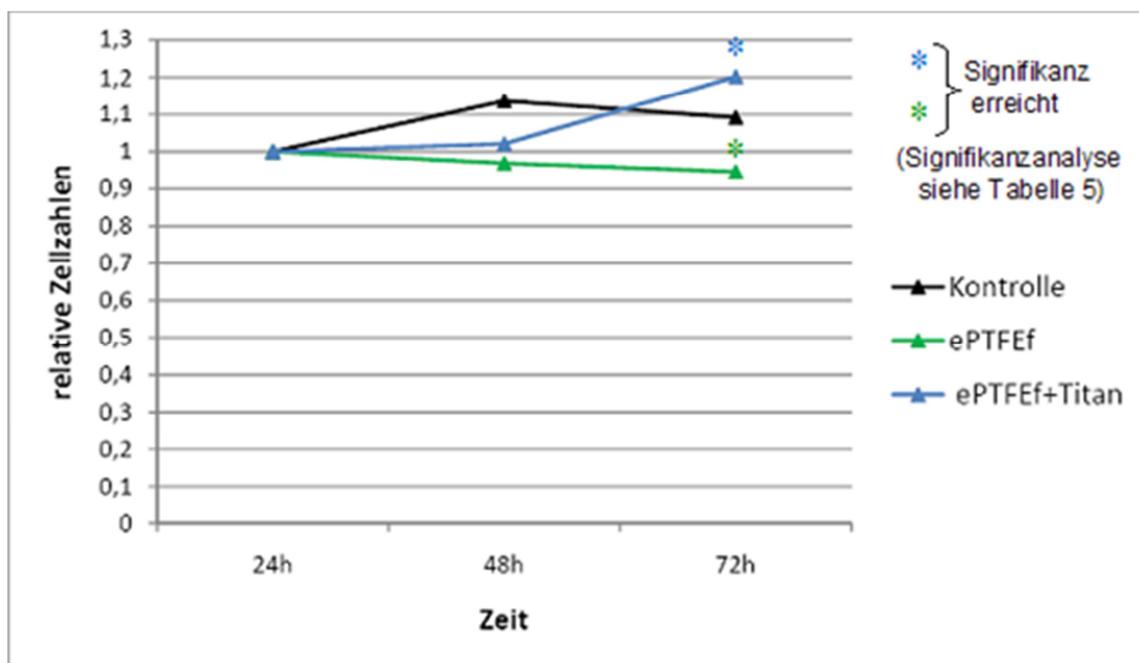


Abbildung 11: relative Zellzahlen EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 11)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _f	ePTFE _f +Titan
	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)
24h	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)
48h	1,137 (0,18)	0,969 (0,14)	1,021 (0,18)
72h	1,092 (0,30)	0,946 (0,14)	1,202 (0,12)

Tabelle 4: relative Zellzahlen EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 11) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-ePTFE _f	Kontrolle- ePTFE _f +Titan	ePTFE _f - ePTFE _f +Titan
48h	0,023	0,101	0,217
72h	0,151	0,699	0,000

Tabelle 5: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.1.1.3. Drittes Kollektiv

Im dritten Kollektiv (Pericard, Pericard+Titan, Kontrolle) veränderte sich in der Kontrollgruppe die Zellzahl über den Beobachtungszeitraum (zwischen 24 und 72 Stunden) nicht signifikant. Die Zellzahl in den Materialgruppen zeigte sich nach 72h deutlich verringert (um 48,8% für Pericard und 50,2% für Pericard+Titan). Im Gruppenvergleich unterscheiden sich die relativen Zellzahlen der Materialgruppen nach 48h und 72h von der Kontrollgruppe. Die Materialgruppen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt voneinander (Tabelle 6, 7 sowie Abbildung 12).

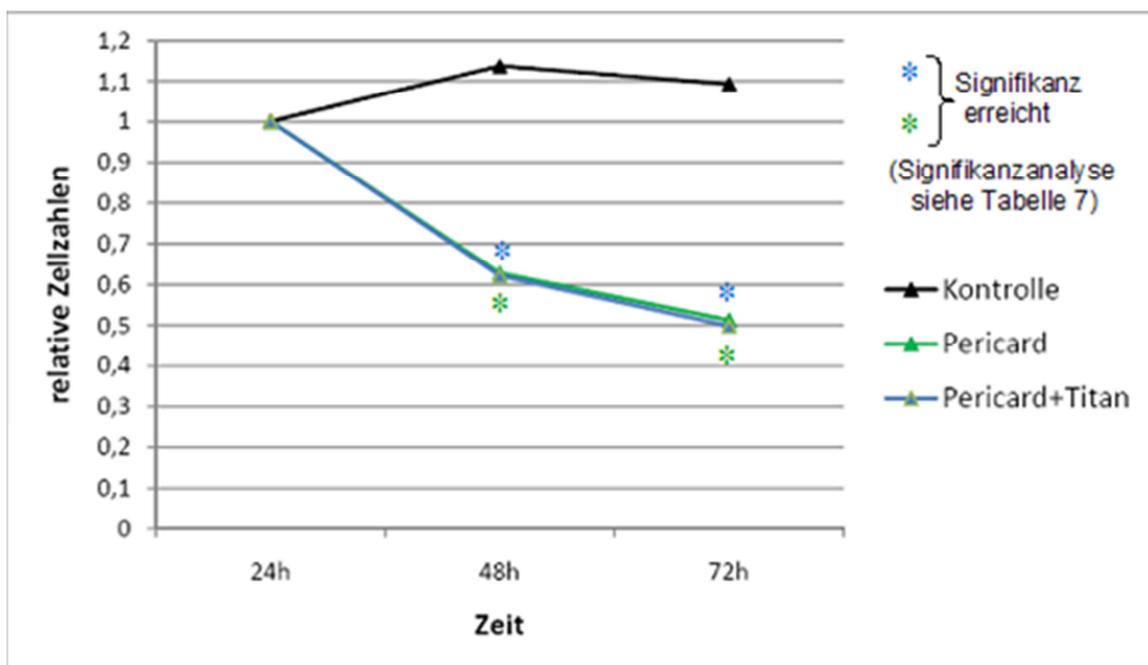


Abbildung 12: relative Zellzahlen EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 11)

Zeit	Kontrolle	Pericard	Pericard+Titan
	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)
24h	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)
48h	1,137 (0,18)	0,627 (0,13)	0,620 (0,10)
72h	1,092 (0,30)	0,512 (0,11)	0,498 (0,04)

Tabelle 6: relative Zellzahlen EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 11) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-Pericard	Kontrolle-Pericard+Titan	Pericard-Pericard+Titan
48h	0,000	0,000	0,898
72h	0,000	0,000	0,519

Tabelle 7: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.1.2. glatte Gefäßmuskelzellen

3.1.2.1. Erstes Kollektiv

In den Versuchsreihen mit den glatten Gefäßmuskelzellen zeigte sich im ersten Kollektiv eine Zunahme der Zellzahl in der Kontrollgruppe (um 79,5%) nach 72h. Die Materialgruppen wiesen keine signifikante Veränderung über die Zeit auf. Die drei Materialgruppen ePTFE_r, ePTFE_r+ESHS sowie Polymer unterschieden sich nach 72 h mit erniedrigter Zellzahl signifikant von der Kontrollgruppe. Die Materialgruppen unterschieden sich nicht voneinander (Tabelle 8, 9 sowie Abbildung13).

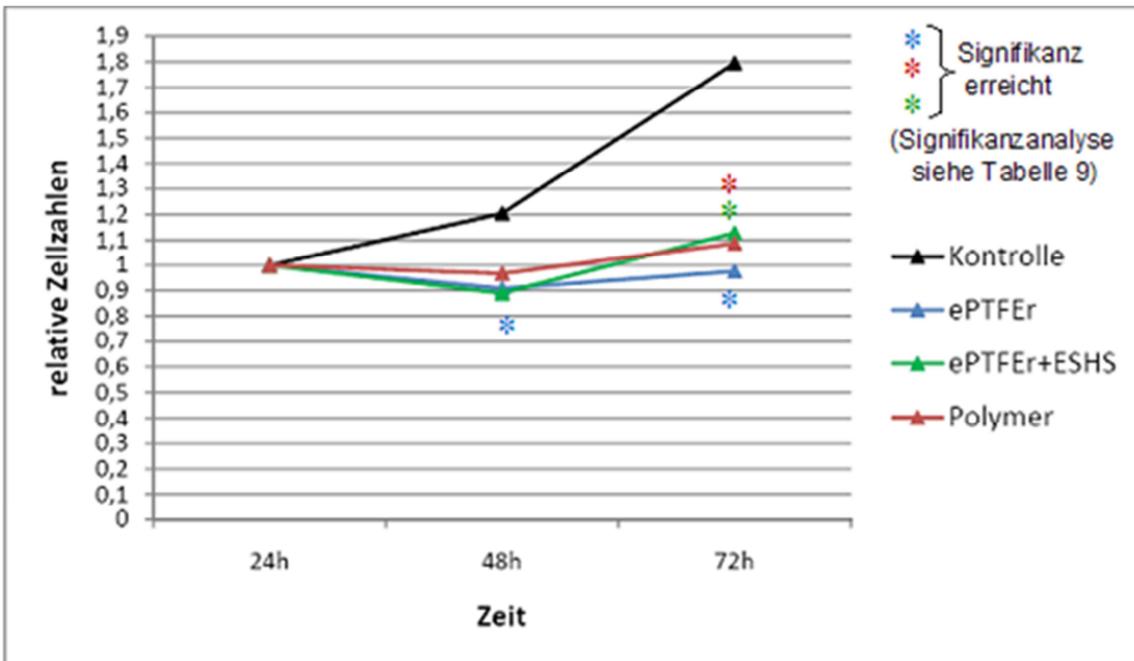


Abbildung 13: relative Zellzahlen VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9(ePTFE_r+ESHS), 11(Polymer), 12(Kontrolle, ePTFE_r))

Zeit	Kontrolle	ePTFE _r	ePTFE _r +ESHS	Polymer
	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)
24h	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)
48h	1,204 (0,30)	0,908 (0,66)	0,890 (0,23)	0,968 (0,63)
72h	1,795 (0,55)	0,976 (0,75)	1,127 (0,27)	1,086 (0,70)

Tabelle 8: relative Zellzahlen VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n= 9(ePTFE_r+ESHS), 11(Polymer), 12(Kontrolle, ePTFE_r)) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle- ePTFE _r	Kontrolle- ePTFE _r +ESHS	Kontrolle- Polymer	ePTFE _r - ePTFE _r +ESHS	ePTFE _r - Polymer	ePTFE _r +ESHS- Polymer
48h	0,007	0,041	0,044	0,277	0,976	0,710
72h	0,000	0,001	0,004	0,058	0,487	0,152

Tabelle 9: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.1.2.2. Zweites Kollektiv

Im zweiten Kollektiv ließ sich eine Abnahme der Zellzahl nach 72h für die Kontroll- und die ePTFE_r-Gruppe verzeichnen. Die ePTFE_r+Titan-Gruppe zeigte lediglich nach 48h eine signifikante Abnahme, nach 72h ist kein Unterschied zum 24h-Ausgangswert mehr nachweisbar. Die beiden Materialgruppen zeigen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe. Auch voneinander unterscheiden sich die Materialgruppen nie (Tabelle 10, 11 sowie Abbildung 14).

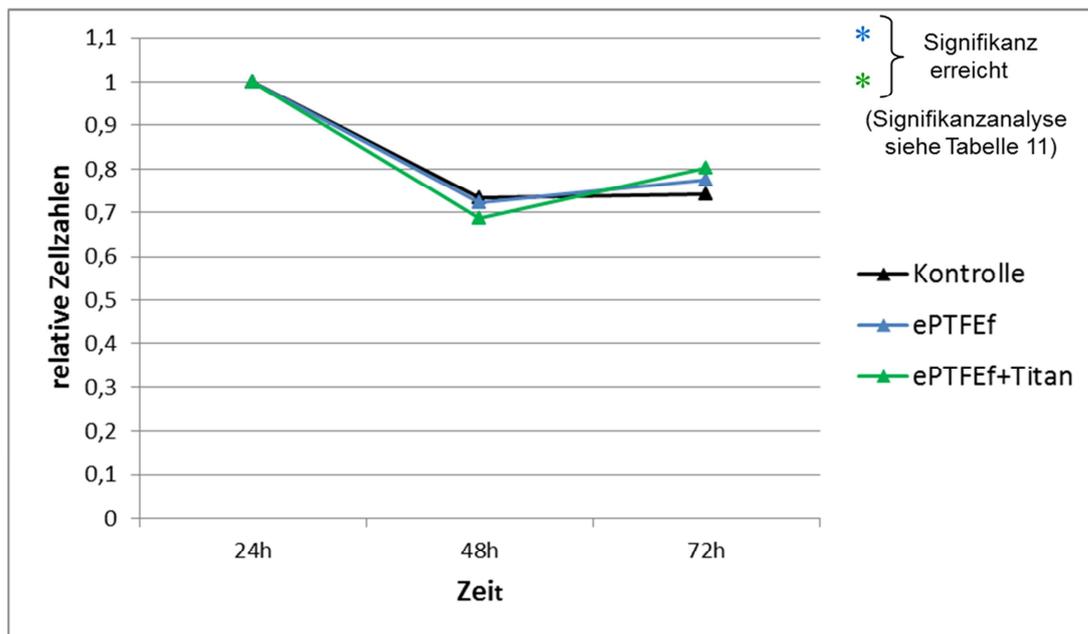


Abbildung 14: relative Zellzahlen VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 11)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _f	ePTFE _f +Titan
	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)
24h	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)
48h	0,734 (0,09)	0,723 (0,10)	0,687 (0,23)
72h	0,742 (0,08)	0,776 (0,12)	0,801 (0,34)

Tabelle 10: relative Zellzahlen VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 11) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-ePTFE _f	Kontrolle- ePTFE _f +Titan	ePTFE _f - ePTFE _f +Titan
48h	0,898	0,797	0,847
72h	0,438	0,332	0,562

Tabelle 11: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.1.2.3. Drittes Kollektiv

Im dritten Kollektiv fällt die Zellzahl der Kontrollgruppe zwischen 24h und 72h wiederum ab (um 25,8%). Ebenso fällt die Zellzahl in den beiden Materialgruppen Pericard (69,5%) und Pericard+Titan (46,8%), jedoch im stärkeren Ausmaß. Die beiden Materialgruppen zeigen gegenüber der Kontrollgruppe eine erniedrigte Zellzahl nach 48h und 72h wobei sie sich auch voneinander signifikant unterscheiden. Die Zellzahl der Pericard-Gruppe zeigt sich etwas niedriger als das der Pericard+Titan-Gruppe, sowohl nach 48h als auch nach 72h (Tabelle 12, 13 sowie Abbildung 15).

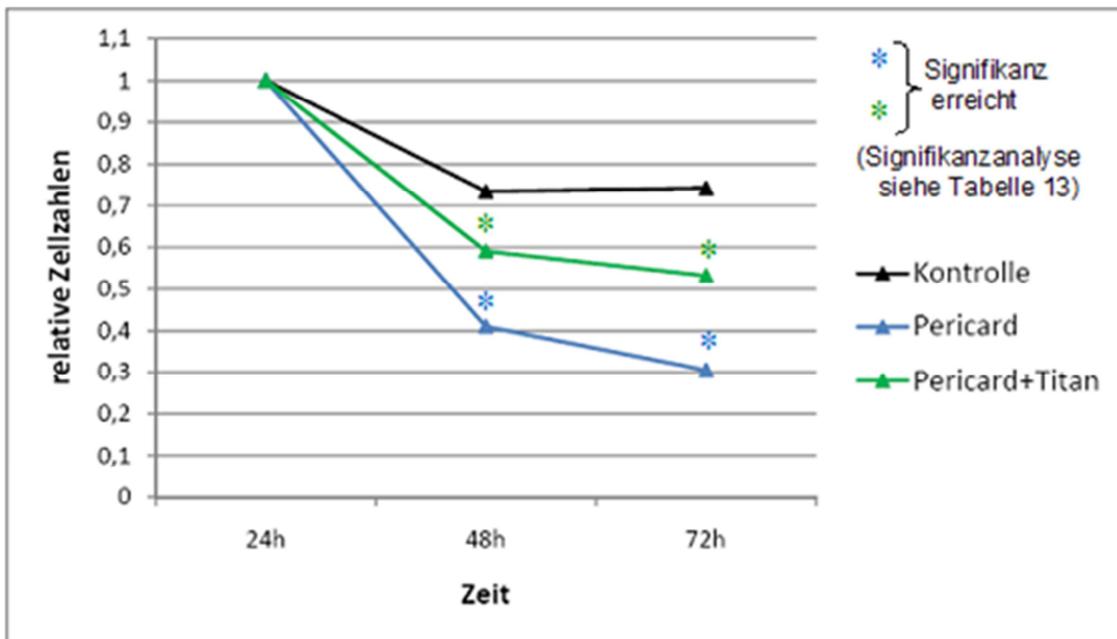


Abbildung 15: relative Zellzahlen VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 10 (Pericard), 11 (Pericard+Titan))

Zeit	Kontrolle	Pericard	Pericard+Titan
	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)	rel. Zellzahl (+/- SD)
24h	1,000 (0)	1,000 (0)	1,000 (0)
48h	0,734 (0,09)	0,410 (0,07)	0,591 (0,11)
72h	0,742 (0,08)	0,305 (0,05)	0,532 (0,10)

Tabelle 12: relative Zellzahlen VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 10 (Pericard), 11 (Pericard+Titan)) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-Pericard	Kontrolle-Pericard+Titan	Pericard-Pericard+Titan
48h	0,000	0,005	0,001
72h	0,000	0,000	0,000

Tabelle 13: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.2. Apoptoserate

Die Bestimmung der Apoptoserate wurde wie unter 2.3.3.2. beschreibend durchgeführt. Hier wurden Messungen bei 0, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt, wobei es sich bei der Nullstundenmessung um den Ausgangswert handelt. Er entspricht der natürlichen Apoptoserate der Zellreihe, die beim Ansetzen des Versuches genutzt wurde.

Verglichen wurden die Proben analog zu den obigen Versuchen mit Kontrollen, die unter identischen Bedingungen gehandhabt wurden, allerdings nicht mit Prothesenmaterialien in Kontakt waren.

3.2.1. Endothelzellen

Die Apoptoserate der humanen Endothelzellen zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten ist in nachstehenden Abbildungen bzw. Tabellen mit den jeweils miteinander vergleichbaren Materialgruppen als ein Kollektiv dargestellt. Auch hier sind die p-Werte der Signifikanzanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test in einer zweiten Tabelle dargestellt. Die nach der Bonferroni-Holm-Prozedur signifikanten p-Werte sind grün eingefärbt.

3.2.1.1. Erstes Kollektiv

Im ersten Kollektiv ist in allen Gruppen ein Anstieg der Apoptoserate im Beobachtungszeitraum zwischen 24h und 72h zu beobachten. In der Kontrollgruppe hat

sich diese nahezu verdoppelt. In den Materialgruppen hat sie sich ungefähr verdreifacht. Alle Materialgruppen zeigen nach 72h eine signifikant erhöhte Apoptoserate gegenüber der Kontrollgruppe, die Polymergruppe bereits schon nach 48h. Vergleicht man die Apoptoseraten der einzelnen Materialien untereinander, so findet sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Tabelle 14, 15 sowie Abbildung 16).

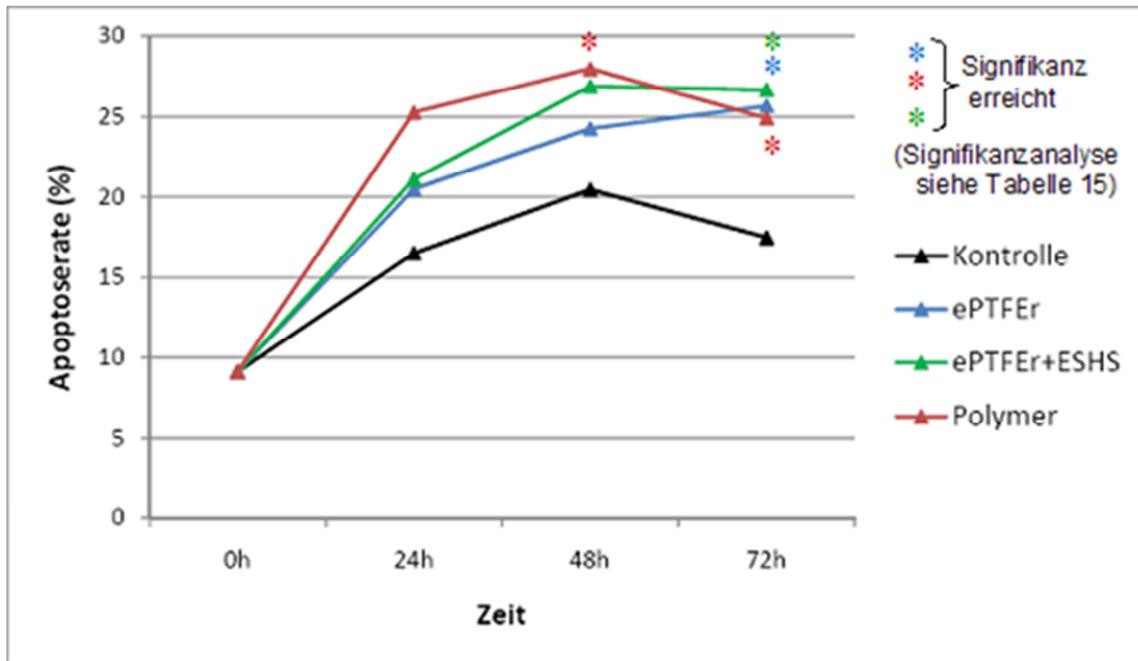


Abbildung 16: ApoptoserateEC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _r	ePTFE _r +ESHS	Polymer
	Apoptoserate (+/- SD) (%)			
0h	9,114 (0,88)	9,114 (0,88)	9,114 (0,88)	9,114 (0,88)
24h	16,508 (2,98)	20,480 (5,41)	21,098 (4,67)	25,264 (9,09)
48h	20,439 (4,70)	24,240 (6,60)	26,897 (6,93)	27,976 (5,31)
72h	17,477 (0,90)	25,659 (1,00)	26,670 (3,97)	24,902 (3,52)

Tabelle 14: Apoptoserate EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-ePTFE _r	Kontrolle-ePTFE _r +ESHS	Kontrolle-Polymer	ePTFE _r -ePTFE _r +ESHS	ePTFE _r -Polymer	ePTFE _r +ESHS-Polymer
24h	0,050	0,024	0,136	0,666	0,387	0,190
48h	0,161	0,094	0,006	0,730	0,222	0,666
72h	0,000	0,000	0,000	0,546	0,863	0,489

Tabelle 15: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.2.1.2. Zweites Kollektiv

Für das zweite Kollektiv findet sich wiederum ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate im Beobachtungszeitraum (24h-72h) in allen Gruppen. Während die Apoptoserate der Kontrollgruppe sich nach 72h wieder nahezu verdoppelt hat, verdreifacht sich auch hier die Apoptoserate der beiden Materialgruppen. Ebenso nach 72h findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und den beiden Materialgruppen. Zwischen den Materialgruppen findet sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Tabelle 16, 17 sowie Abbildung 17).

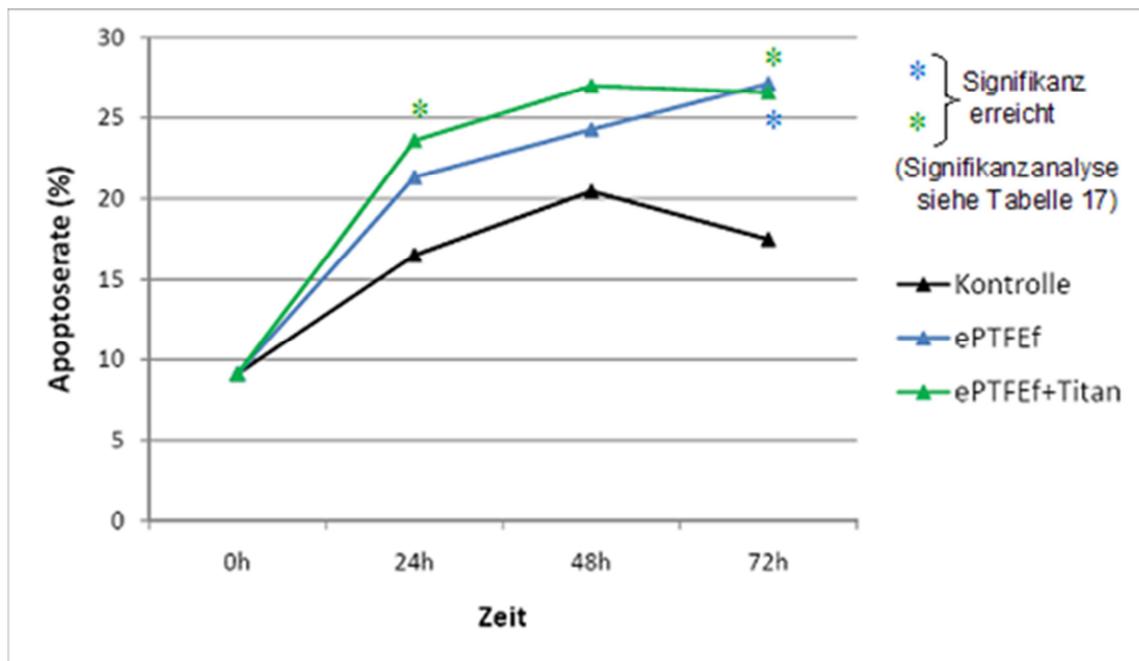


Abbildung 17: ApoptoserateEC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _f	ePTFE _f +Titan
	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)
0h	9,114 (0,88)	9,114 (0,88)	9,114 (0,88)
24h	16,508 (2,98)	21,313 (5,81)	23,600 (6,33)
48h	20,439 (4,70)	24,291 (2,53)	27,010 (5,32)
72h	17,477 (0,90)	27,151 (4,47)	26,591 (5,32)

Tabelle 16: Apoptoserate EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle- ePTFE _f	Kontrolle- ePTFE _f +Titan	ePTFE _f -ePTFE _f +Titan
24h	0,031	0,014	0,340
48h	0,063	0,031	0,730
72h	0,000	0,000	0,436

Tabelle 17: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.2.1.3. Drittes Kollektiv

Für das dritte Kollektiv findet sich ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate im Beobachtungszeitraum (24h-72h) in der Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Materialgruppen besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Hier kommt es im ersten beobachteten Intervall zum leichten Anstieg der Apoptoseraten gegenüber der Kontrollgruppe, der lediglich für Pericard+Titan signifikant ist. Im zweiten Intervall, nach 48h halbieren sich die Apoptoseraten dann nahezu und sinken damit signifikant unter das Niveau der Kontrollgruppe und auf das Niveau des Ausgangswertes (0h) ab. Daher findet sich innerhalb der Materialgruppen kein signifikanter Unterschied zwischen den 0h und 48h Werten. Im dritten Intervall setzt sich der Abwärtstrend dann abgeschwächt fort. Nach 72h besteht allerdings nur noch zwischen der Kontroll- und der Pericard-Gruppe ein signifikanter Unterschied (Tabelle 18, 19 sowie Abbildung 18).

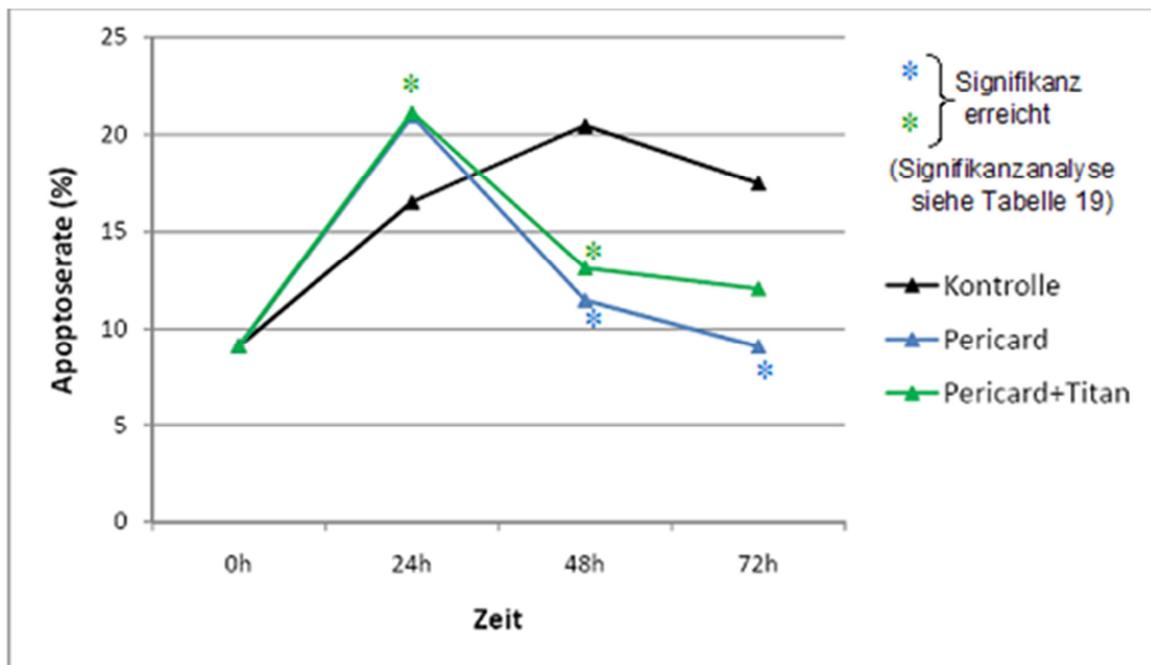


Abbildung 18: ApoptoserateEC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	Pericard	Pericard+Titan
	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)
0h	9,114	9,114	9,114
24h	16,508	20,927	21,104
48h	20,439	11,474	13,121
72h	17,477	9,082	12,054

Tabelle 18: Apoptoserate EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-Pericard	Kontrolle-Pericard+Titan	Pericard-Pericard+Titan
24h	0,297	0,004	0,489
48h	0,001	0,011	0,546
72h	0,004	0,031	0,161

Tabelle 19: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.2.2. Glatte Gefäßmuskelzellen

3.2.2.1. Erstes Kollektiv

In den Versuchsreihen zur Apoptoserate der glatten Gefäßmuskelzellen zeigte sich im ersten Kollektiv eine Zunahme der Apoptoserate in der Kontrollgruppe nach 24h und 48h mit Ausbildung eines Plateaus, nach 72h befindet sich die Apoptoserate wieder auf dem Ausgangsniveau (0h). Die Materialgruppen ePTFE_r und ePTFE_r+ESHS steigt die Apoptoserate nach 24h und 48h auf ein Vielfaches des 0h Wertes, sinkt dann im dritten Intervall nach 72h wieder ab, verbleibt jedoch beim Doppelten (ePTFE_r) bzw. nahezu Vierfachen (ePTFE_r+ESHS) des Ausgangswertes. Dabei besteht bei 24h, 48h und 72h ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Polymer-Gruppe hebt sich durch stetigen Anstieg der Apoptoserate von den restlichen Gruppen ab. Zwischen allen drei Materialgruppen findet sich nach 72h eine signifikante Differenz. Dabei zeigt ePTFE_r die niedrigste Apoptoserate, aufsteigend folgt ePTFE_r+ESHS und schließlich das Polymer mit dem größten Potential, Apoptose zu induzieren (Tabelle 20, 21 sowie Abbildung 19).

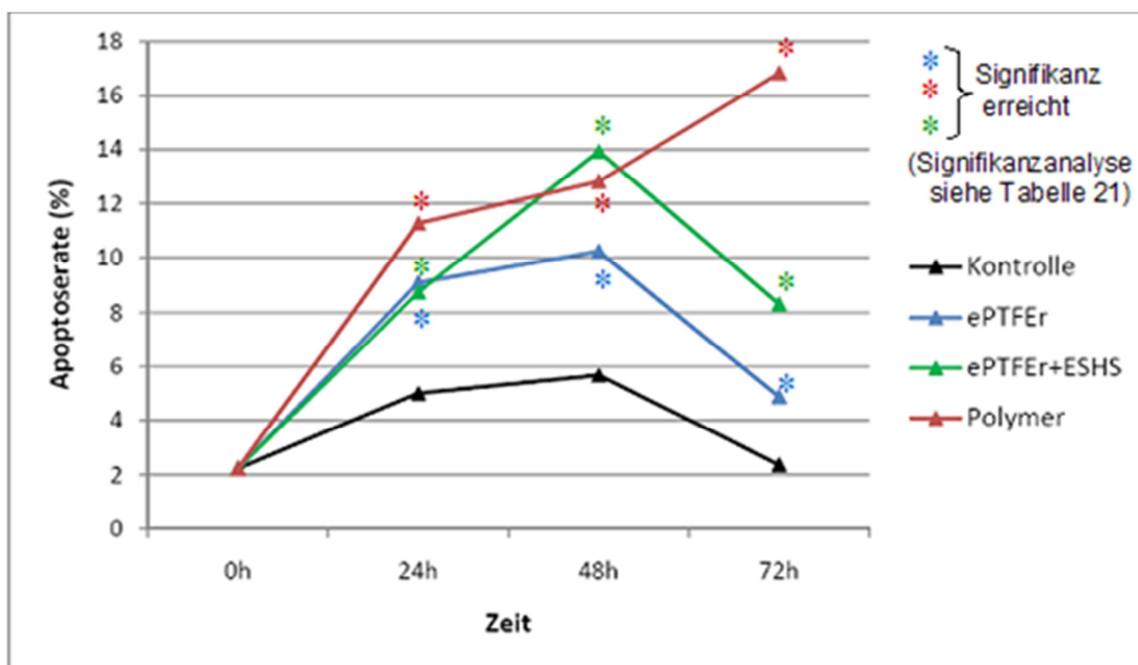


Abbildung 19: ApoptoserateEC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _r	ePTFE _r +ESHS	Polymer
	Apoptoserate (+/- SD) (%)			
0h	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)
24h	5,010 (1,59)	9,101 (2,32)	8,744 (2,86)	11,279 (2,59)
48h	5,679 (1,53)	10,246 (3,23)	13,927 (6,85)	12,814 (4,58)
72h	2,368 (1,04)	4,886 (1,99)	8,304 (6,41)	16,832 (3,56)

Tabelle 20: Apoptoserate VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle- ePTFE _r	Kontrolle- ePTFE _r +ESHS	Kontrolle- Polymer	ePTFE _r - ePTFE _r +ESHS	ePTFE _r - Polymer	ePTFE _r +ESHS- Polymer
24h	0,000	0,008	0,000	1,0	0,094	0,077
48h	0,000	0,003	0,001	0,258	0,297	0,931
72h	0,001	0,000	0,000	0,019	0,000	0,004

Tabelle 21: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant)

3.2.2.2. Zweites Kollektiv

Im zweiten Kollektiv findet sich wiederum ein Anstieg der Apoptoserate der Kontrollgruppe nach 24h und 48h mit Ausbildung eines Plateaus mit anschließendem Absinken der Apoptoserate auf das Niveau des Ausgangswertes bei 0h. Die Materialgruppen (ePTFE_f, ePTFE_f+Titan) zeigen nach 24h einen steilen Anstieg der Apoptoserate bis über das Fünffache des Ausgangswertes hinaus, um im weiteren Verlauf bis zum Ende der Beobachtung nach 72 h gemeinsam auf diesem Niveau zu verbleiben. Sie unterscheiden sich dabei zum Zeitpunkt 24h, 48h und 72h von der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ePTFE_f und ePTFE_f+Titan findet sich zu keinem Zeitpunkt (Tabelle 22, 23 sowie Abbildung 20).

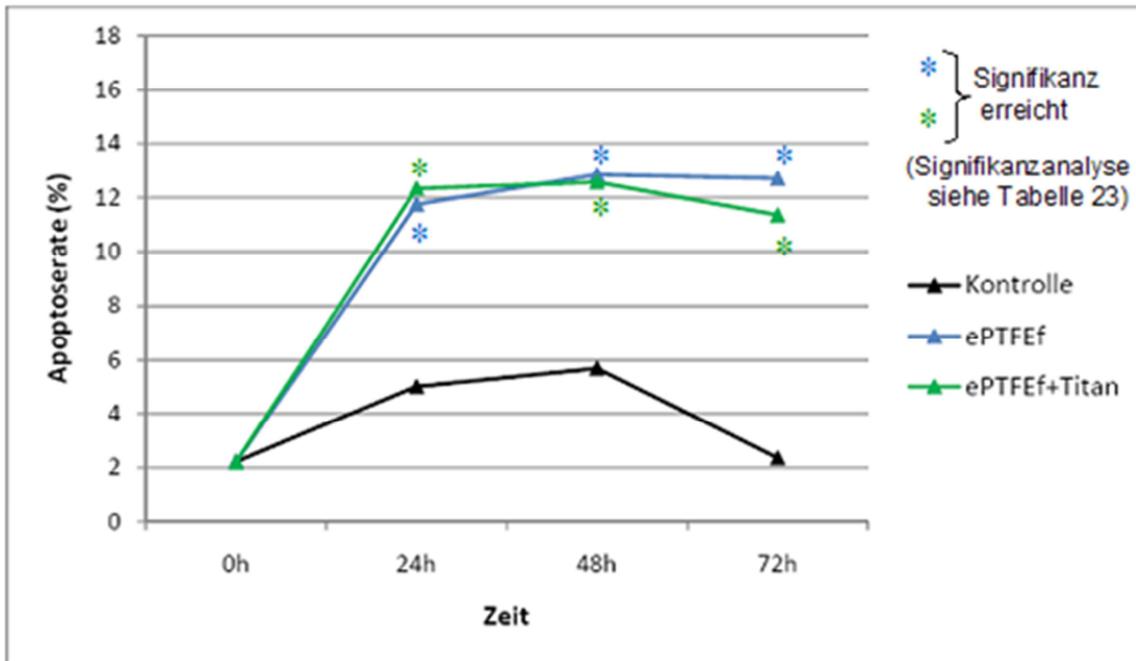


Abbildung 20: ApoptoserateEC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	ePTFE _f	ePTFE _f +Titan
	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)
0h	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)
24h	5,010 (1,59)	11,742 (2,82)	12,329 (2,98)
48h	5,679 (1,53)	12,838 (4,72)	12,564 (4,72)
72h	2,368 (1,04)	12,693 (6,72)	11,350 (5,07)

Tabelle 22: Apoptoserate VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-ePTFE _f	Kontrolle- ePTFE _f +Titan	ePTFE _f - ePTFE _f +Titan
24h	0,000	0,000	0,730
48h	0,001	0,000	1,0
72h	0,000	0,000	0,340

Tabelle 23: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant.

3.2.2.3. Drittes Kollektiv

Für das dritte Kollektiv gilt ein analoger Verlauf der Apoptoserate in der Kontrollgruppe. Die Apoptoserate der beiden Materialgruppen (Pericard, Pericard+Titan) steigt nach 24h, gipfelt bei 48h, um nach 72h schließlich wieder leicht abzusinken. Dabei ist nach 24h, 48h und 72h eine signifikante Abweichung der Apoptoserate der Materialgruppen von der der Kontrollgruppe nachzuweisen. Eine Differenz der Gruppen Pericard und Pericard+Titan findet sich zu keinem Zeitpunkt (Tabelle 24, 25 sowie Abbildung 21).

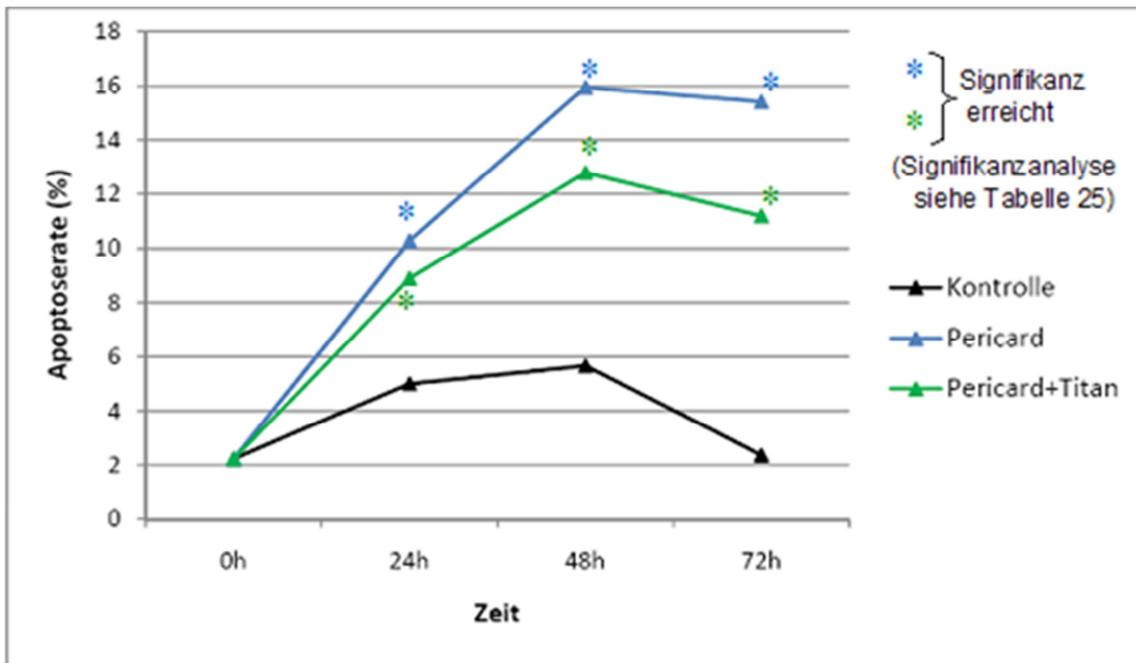


Abbildung 21: ApoptoserateEC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	Pericard	Pericard+Titan
	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)	Apoptoserate (+/- SD) (%)
0h	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)	2,224 (0,44)
24h	5,010 (1,59)	10,289 (3,87)	8,904 (3,00)
48h	5,679 (1,53)	15,956 (4,08)	12,788 (5,73)
72h	2,368 (1,04)	15,419 (4,56)	11,198 (5,40)

Tabelle 24: Apoptoserate VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD)

	Kontrolle-Pericard	Kontrolle-Pericard+Titan	Pericard-Pericard+Titan
24h	0,000	0,000	0,605
48h	0,000	0,000	0,190
72h	0,000	0,000	0,136

Tabelle 25: p-Werte der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test). Die Werte in Grün sind nach der Bonferroni-Holm Prozedur signifikant

4. Diskussion

4.1. Relevanz des In vitro-Modells

Eine Gefäßprothese ist für den dauerhaften Verbleib in einem Organismus konzipiert und muss dementsprechende Materialeigenschaften besitzen. Zum einen müssen die strukturellen Voraussetzungen gegeben sein, also eine möglichst genaue Nachbildung der natürlichen Verhältnisse hinsichtlich Compliance und Flusseigenschaften eines genuinen Gefäßes. Zum anderen sollen diese Eigenschaften lange erhalten bleiben und nicht oder nur sehr langsam der Biodegradation oder der Okklusion zum Opfer fallen. Dafür ist eine hohe Biokompatibilität unerlässlich, die die immunologische Abwehr des Organismus so gering wie möglich stimuliert und die umliegenden Zellen so gering wie möglich in ihrem natürlichen Verhalten beeinflusst [35]. Die medizinische Forschung strebt nach ständiger Verbesserung der zu implantierenden Materialien durch fortschreitende Beobachtung, Beschreibung und Erklärung der nach Implantation ablaufenden Reaktionen [44, 47, 77]. Hierzu wird vornehmlich das Tiermodell herangezogen. Es eignet sich am ehesten, um die komplexen Verhältnisse des menschlichen Körpers nachzustellen, denn auf den Erfolg einer Gefäßprothese haben unzählige und nicht abschließend geklärte Variablen Einfluss. Ein In-vitro-Modell kann hier zur Klärung einer speziellen Fragestellung, zum Beispiel die Reaktion der umliegenden Gewebe auf ein Material, dienen. Die Vorteile liegen auf der Hand: störende Einflüsse werden ausgeschaltet, das Modell ist in einem hohen Maße standardisierbar und im Vergleich zum Tiermodell können zuverlässige Ergebnisse in relativ kurzer Zeit mit geringerem Aufwand generiert werden. Das hier angewandte Modell hat sich so oder in ähnlicher Weise bereits in mehreren Vorarbeiten etabliert. Dazu gehört die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate mit dem AnnexinV Assay [6, 21, 81] und die Ermittlung des Zellwachstums durch Bestimmung der Zellzahlveränderung über die Zeit mit dem Alamar Blue Assay [1, 2, 27]. Diese Untersuchungen haben sich bereits als präzise Marker zur Untersuchung und Begründung des Einflusses von Fremdmaterialien auf humane Zelllinien erwiesen.

4.2. ePTFE mit ESHS-Beschichtung

4.2.1. Zellwachstum

Bei den Endothelzellen ist für das ePTFE_r+ESHs ein negativer Einfluss auf die Zellzahlentwicklung nachweisbar. Das unbeschichtete Analogon ePTFE_r beeinflusst das Zellwachstumsverhalten nicht, denn es verhält sich wie die Kontrolle. Der negative Einfluss des ePTFE_r+ESHs kann nicht ausschließlich vom Polymer stammen, welches die ESHs-Beschichtung an die Prothesenoberfläche bindet. Für dieses Material wurde kein negativer Einfluss im Vergleich mit der Kontrolle gefunden. Der einzige Punkt, in dem ePTFE_r und ePTFE_r+ESHs sich unterscheiden, sind die ESHs-Beschichtung und das Polymer. Möglicherweise tragen beide zur Hemmung des Zellwachstums über einen hier noch nicht zu identifizierenden Mechanismus bei. Massenspektrometrische Voruntersuchungen schließen die Freisetzung von Stoffen im Rahmen der Inkubation aus ePTFE aus [81]. Es wäre möglich, dass die genannte Beschichtung zellwirksame Stoffe freisetzt, die das Wachstum hemmen. Ein weiterer Punkt, der zur Betrachtung herangezogen werden muss, ist, dass das ePTFE_r zumindest geringfügig von EC besiedelt werden kann. In dieser Gruppe steht den EC also mehr Oberfläche zum Wachstum zur Verfügung als beim ePTFE_r+ESHs. Die Beschichtung mit ESHs, welche die natürliche Glykokalix imitiert, verhindert die Adhärenz von EC an der Prothese, was sich als geringeres Zellwachstum niederschlägt.

In den Messreihen zum Zellwachstum der glatten Gefäßmuskelzellen ist kein negativer Einfluss des ePTFE_r+ESHs im Vergleich mit ePTFE_r zu finden. Es gibt ein reges Zellwachstum in der Kontrollgruppe. In den drei Materialgruppen ePTFE_r, ePTFE_r+ESHs und Polymer hingegen findet sich keine signifikante Zellzahlveränderung. Dies erklärt bereits die signifikante Abweichung aller drei Materialgruppen von der Kontrollgruppe nach 72h. Es kann hier kein negativer Einfluss der ESHs-Beschichtung oder des mit der Prothesenoberfläche verbindenden Polymers gefunden werden sondern lediglich ein hemmender Einfluss aller Materialien.

4.2.2. Apoptoserate

In der Versuchsreihe zur Apoptoserate der glatten Gefäßmuskelzellen findet sich nach 72h für alle Materialgruppen ein apoptosestimulierender Effekt. Es besteht dabei eine signifikant erhöhte Apoptoserate der ePTFE_r+ESHS-Gruppe gegenüber dem unbeschichteten ePTFE_r. Dieser Unterschied ist allerdings nur minimal. Analog zu den Untersuchungen des Zellwachstums bei den Endothelzellen zeigte ePTFE_r+ESHS einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum der EC im Vergleich mit ePTFE_r, begründbar durch die hier gefundene signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zum ePTFE_r. Der für das Polymer gefundene fehlende Einfluss auf das Zellwachstum spiegelt sich in dieser Untersuchung nicht wider. Die Polymer-Gruppe zeigt hier nach 72 die höchste Apoptoserate aller Gruppen. Nach aufsteigendem Potential zur Induktion der Apoptose für die glatten Gefäßmuskelzellen lässt sich also die folgende Reihenfolge bilden: ePTFE_r, ePTFE_r+ESHS, Polymer.

Bei den Endothelzellen wird diese Reihenfolge jedoch nicht bestätigt. Es findet sich wiederum ein Apoptoseraten-stimulierender Effekt aller drei Materialgruppen. Die Apoptoseraten liegen 7-9% über der Apoptoserate der Kontrollgruppe nach 72h. Die Apoptoserate der Kontrolle steigt natürlicherweise über die Zeit, da Nährmedium und Platz begrenzte Güter sind und mit der Zeit die Vegetationsbedingungen immer schlechter werden. Eine signifikante Abweichung der drei Gruppen voneinander ist nicht nachweisbar, so dass hier keinerlei zusätzliche Einflüsse der ESHS-Beschichtung oder seines Polymers anzunehmen sind.

4.3. ePTFE mit Titan-Beschichtung

4.3.1. Zellwachstum

Während sich das Zellwachstum der glatten Gefäßmuskelzellen sowohl in der Kontroll- als auch in den beiden Materialgruppen gleichartig dezimiert und es hier keinerlei Gruppenunterschiede gibt, finden wir beim Zellwachstum der Endothelzellen einen kleinen Vorteil für das ePTFE_r+Titan gegenüber dem unbeschichteten ePTFE_r. Es gibt zwar keine Abweichung zwischen der Kontrolle und den beiden Materialgruppen, aber eine signifikant höhere relative Zellzahl in der ePTFE_r+Titan –als in der ePTFE_r –Gruppe

nach 72h. Eine Erklärung hierfür könnte ein besseres Adhärenzverhalten von Endothelzellen an Metalle sein. Diese Tatsache wurde bereits für Edelstahl vorbeschrieben [23]. Es konnte zwar gezeigt werden, dass unbeschichtetes PTFE grundsätzlich von Zellen besiedelt werden kann [14, 75], dennoch konnte ein verbessertes Zellwachstum speziell auf titanisierten Oberflächen nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wird zurückgeführt auf freie OH-Gruppen nach Oxidation und Hydrolisation der Titanbeschichtung. Diese freien OH-Gruppen dienen als Anker zum Andocken von zellulären Proteinen [53]. So ist es anzunehmen, dass die beschichtete Prothesenoberfläche einen besseren Vegetationsgrund für die Endothelzellen darstellt als die unbeschichtete Oberfläche und es so in der ePTFE_f+Titan-Gruppe zu zusätzlichem Zellwachstum kommt. Für die gleichartige Verringerung der relativen Zellzahlen der glatten Muskelzellen in allen Gruppen gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder sterben hier Zellen ohne erkennbaren Grund ab, oder die Zellen haben sich in einen stoffwechselträgern Zustand transformiert und dadurch weniger AlamarBlue reduziert. Dies würde dann auch als Zellzahlabnahme interpretiert, weil der AlamarBlue-Assay von gleichbleibenden Bedingungen ausgeht. Eine Zustandstransformation ist zu erklären durch einen Wechsel des Phänotypen von proliferierend zu kontraktile. Fehlt eine Stimulation zur Proliferation begibt sich die Gefäßmuskelzelle in einen reinen Funktionszustand [11, 33, 34, 64]. Es ist anzunehmen, dass die Stoffwechselaktivität im kontraktile Stadium geringer ist als im proliferierenden. Die Auslöser für die Transformation können hier nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Es wäre denkbar, dass aufgrund der Begrenzung und Verknappung des räumlichen Angebotes das Wachstum in der 12-Well-Platte nicht mehr möglich war und daher die Zustandstransformation stattfand [81]. Unter dieser Annahme ist der Vergleich der Gruppen untereinander nur bedingt aussagekräftig, da Zellen mit einem geringen Stoffwechsel auch nur gering auf äußere Einflüsse reagieren.

4.3.2. Apoptoserate

Die Apoptoseraten sowohl der Endothelzellen als auch der glatten Gefäßmuskelzellen zeigen keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Materialgruppen ePTFE_f und ePTFE_f+Titan. Es lässt sich lediglich ein stimulierender Einfluss der Materialien im Vergleich mit der Kontrolle auf die Apoptoseraten finden. Bei den Endothelzellen beträgt

dieser Unterschied ca. 9% und bei den glatten Gefäßmuskelzellen ca 10%. Bei der Zellwachstumsbestimmung der Endothelzellen wurde im entsprechenden Kollektiv ein leichter Vorteil des ePTFE_f+Titan gegenüber dem ePTFE_f gefunden. Dieser wird mit einem verbessertem Zellwachstum auf der titanisierten Oberfläche begründet. Das hier gefundene Ergebnis stützt diese These. Wenn lediglich die Fläche vergrößert wird, die den EC zum Wachstum zur Verfügung steht, kann sich die Zellzahl zwar erhöhen, aber es ändert sich nichts an dem natürlichen Gleichgewicht zwischen Wachstum und Apoptose [8]. Dafür müssten zusätzliche Apoptosestimuli von den Materialien ausgehen. Offensichtlich gehen nun von beiden Materialien gleichartige Apoptosestimuli aus, denn die Apoptoseraten sind gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Die Apoptoserate der ePTFE_f+Titan-Gruppe zeigt also keine Unterschiede zum gleichwertigen aber schwerer zu besiedelnden ePTFE_f.

Auch der Einsatz im Tiermodell hat wiederholt einen Vorteil der Titanbeschichtung gegenüber unbeschichteten Vergleichsmaterialien bewiesen. So berichten Köckerling et al von einer geringeren Fremdkörperreaktion und dadurch größeren Biokompatibilität von titanisierten Herniennetzen im Schwein [50]. Nachfolgende Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse [59, 67]. Auch Sedelnikov et al. testeten eine titanisierte ePTFE-Gefäßprothese durch Implantation in Schweine und wies bereits nach einem Monat bei Explantation eine Neoendothelialisierung der titanisierten Prothesen nach. Die unbeschichteten Prothesen zeigten dafür keinen Anhalt [66]. Trotz aller positiven Ergebnisse konnten allerdings noch keine Erfolge hinsichtlich einer geringeren Wiederverschlussrate von titanisierten Gefäßprothesen im direkten Vergleich mit unbeschichteten erreicht werden [84]. Ein weiteres Forschungsfeld, in der die Titanbeschichtung bereits Erfolge verzeichnen konnte, ist die Entwicklung des biomechanischen Herzens (BMH) durch Guldner et al. Es handelt sich dabei um eine muskuläre Blutpumpe, die parallel zum Herzen aortal in den Blutkreislauf eingefügt wird. Es gibt eine aus ePTFE bestehende Pumpkammer, um die ein Skelettmuskel gelegt wird. Dieser kann mithilfe eines Muskelschrittmachers zur Kontraktion stimuliert werden, wodurch die Pumpkammer kontrahiert und das Blutvolumen ausgeworfen wird. Zur systematischen Untersuchung wurden BMH mit und ohne Titanbeschichtung der Pumpkammer in Ziegen implantiert. Bereits nach 8 Wochen wurde eine Verschlechterung

der Pumpfunktion der untitanisierten Pumpkammern festgestellt. Bei der Explantation nach 6,5 Monaten wurde in diesen Kammern ein ca 1cm starker Appositionsthrombus gefunden. Die titanisierten Pumpkammern zeigten keinen Thrombus, sondern eine gleichmäßige Besiedlung mit einer endothelialisierten Bindegewebsschicht, durch die Hämkompatibilität gegeben war [32, 84]. Das in den genannten Untersuchungen gefundene verbesserte Wachstum von Zellen auf titanisierten Oberflächen und die verbesserte Biokompatibilität in vivo konnte durch diese Arbeit bestätigt werden. Es gibt einen Wachstumsvorteil für Zellen auf titanisierten Oberflächen ohne zusätzliche Beeinflussung der Apoptoserate im Vergleich mit einem unbeschichteten Analogon.

4.4. Rinderpericard mit Titanbeschichtung

4.4.1. Zellwachstum

Die Entwicklung des Zellwachstums für die beiden Materialgruppen Pericard und Pericard+Titan ist auffällig. Sowohl bei den Endothelzellen als auch bei den glatten Gefäßmuskelzellen finden wir ein negatives Zellwachstum, also einen Rückgang der relativen Zellzahlen signifikant im Vergleich mit den Kontrollen. Einen Unterschied zwischen den beiden Materialgruppen gibt es dabei lediglich bei den glatten Gefäßmuskelzellen mit einem leichten Vorteil für Pericard+Titan von 22,7% weniger Verlust der relativen Zellzahl gegenüber der Pericard-Gruppe nach 72h. Offensichtlich spielen hier Glutaraldehyd-Rückstände, die sich sowohl aus dem unbeschichteten als auch aus dem beschichteten Pericard herauslösen, eine Rolle. Wie bereits unter 1.3.3. erläutert ist dies das Hauptproblem der Xenografts, welches in vivo Komplikationen hervorruft. Wir hatten eine bessere Biokompatibilität des titanisierten Pericards und damit ein verbessertes Zellwachstum erwartet, da eine Aldehyd-Reduktion von 56% durch die Titanisierung gegenüber einem unbehandelten Xenograft nachgewiesen ist [31, 84]. Unter der Annahme, dass der Einfluss des Glutaraldehydes in den beiden Materialgruppen vergleichbar ist, bestätigt der geringere Verlust der relativen Zellzahl für die glatten Gefäßmuskelzellen in der Pericard+Titan- gegenüber der Pericard-Gruppe diese Erwartung. Eine wirkungsvolle Detoxifizierung und dadurch Verbesserung der Besiedelbarkeit von Xenografts ist daher anzunehmen. 2006 wurde von Manji et al. weiterführend bewiesen, dass die Titanisierung eines Xenografts nicht nur der

Detoxifizierung und Verbesserung der Besiedelbarkeit dienlich ist, sondern auch durch die Oberflächenversiegelung immunologische Abstoßungsreaktionen vermindert [57].

Parallel wurde die Endothelzellbesiedlung elektronenmikroskopisch betrachtet. Dabei fand man auf Xenografts, die mit Zitronensäure detoxifiziert wurden eine reduzierte und ungleichmäßige Besiedlung. Auf titanisierten Xenografts, die allerdings vorher mit der Aldehyddehydrogenase behandelt worden sind, fand man einen dichten Zellrasen [31]. Auch im Tiermodell fanden titanisierte Xenografts bereits erfolgreiche Anwendung. Dafür wurden Herzklappen vom Schwein in Ziegen transplantiert. Die Herzklappen wurden mit der Aldehyddehydrogenase vorbehandelt und anschließend titanisiert und mit autologen Fibroblasten von Ziegen besiedelt. Bei Explantation nach 6 Monaten wurde uneingeschränkte Funktionalität der Klappen nachgewiesen. Histologische Untersuchungen zeigten eine Besiedlung der Herzklappen mit Endothelzellen [84]. Diese Endothelzellschicht ist der wichtigste Grund für die guten Ergebnisse und entspricht der für Gefäßprothesen geforderten Neointimabildung. Die Titanbeschichtung von Xenografts ist also ein vielversprechendes Verfahren für Verbesserung der Biokompatibilität dieses Gefäßersatzmaterials.

4.4.2. Apoptoserate

Die Apoptoserate der glatten Gefäßmuskelzellen wird erwartungsgemäß von den Materialien Pericard und Pericard+Titan stimuliert und erklärt somit die Verluste des Zellwachstums durch eine verstärkte Apoptoseneigung der Zellen. Das dieser Stimulus vom Glutaraldehyd herrührt ist wahrscheinlich anzunehmen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Materialien, wie im Zellwachstum für die glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen, gibt es hier nicht. Die Entwicklung der Apoptoseraten der Materialgruppen bei den Endothelzellen mutet seltsam an. Die Apoptoseraten steigen zunächst nach 24h an, analog der Entwicklung im gleichen Versuch mit den glatten Gefäßmuskelzellen. Doch dann sinkt die Apoptoserate im Intervall zwischen 24h und 48h rapide bis auf das Ausgangsniveau ab. Nach 72h gibt es dann auch keine nennenswerte Änderung mehr. Die Apoptoseraten der Materialgruppen verbleiben deutlich unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Im entsprechenden Kollektiv zur Messung des Zellwachstums der Endothelzellen findet sich kein Korrelat. Folgerichtig sollte die Zellzahl ansteigen, wenn weniger Zellen sterben. Doch die Zellzahl nimmt ebenfalls ab. Es gibt zwei mögliche

Erklärungen für diese Beobachtung. Es gibt entweder ein bisher unbeschriebenes Phänomen, dass die Zellzahl einer Zellkultur bei gleichzeitiger Senkung der Apoptoserate abnimmt. Dies widerspräche allerdings den restlichen Beobachtungen, die für dieses Kollektiv gemacht wurden. Der wahrscheinlichere Grund für dieses Phänomen ist allerdings das Vorliegen eines methodenbedingten Prozesses, der beide Materialgruppen gleichartig betrifft. So wäre es möglich, dass im Intervall zwischen 24h und 48h massenhaft und sehr schnell Zellen abgestorben sind. Diese würden dann in der Messung bei 48h nicht mehr als frühapoptotisch markiert, weil sie bereits spätapoptotisch oder nekrotisch sind und sowohl für AnnexinV als auch für Propidiumjodid positiv sind. Eine Erklärung für ein solches Verhalten steht in der aktuellen Literaturdurchsicht nicht zur Verfügung.

4.5. Schlussfolgerungen

Trotz aller Anstrengungen der medizinischen und medizintechnischen Forschung existiert bis heute kein Gefäßersatz, der in ausreichender Menge zur Verfügung stünde und dem genuinen arteriellen Gefäß in seinen Eigenschaften vergleichbar wäre. Körperfremde Gefäßersatzmaterialien sind immer ein Kompromiss aus zu erwartenden Komplikationen und der Dringlichkeit zum Gefäßersatz. Alloplastischer Gefäßersatz ist das einzige Material, das in ausreichenden Dimensionen unter standardisierbaren Bedingungen im klinischen Alltag einsetzbar ist. Xenografts haben vor allem im Bereich des Herzklappenersatzes als biologische Materialien Bedeutung. Die für den alloplastischen Gefäßersatz verwendeten Kunststoffe haben sich seit dem Beginn ihres medizinischen Einsatzes in den 50er-Jahren kaum verändert, wurden aber ständig inonativ weiterentwickelt.

In jedem Fall gilt, dass der autologe dem alloplastischen Gefäßersatz in seinem Outcome überlegen und so vorzuziehen ist. Seine beschränkte Verfügbarkeit stellt das größte Problem dar. Die schlechten Langzeitoffenheitsraten des synthetischen Gefäßersatzes sind das Hauptmotiv für die Beobachtung und Untersuchung der Einflussfaktoren für den Wiederverschluss einer implantierten Gefäßprothese [81]. Einige der Einflussfaktoren sind bereits identifiziert [28, 54, 58, 83, 85]. Die Interaktion von Gefäßprothese und humanen Zellen auf molekularer Ebene ist bis heute wenig

beschrieben. Das hier verwendete In-vitro-Modell leitet sich von der Testung zur Biokompatibilität von Herniennetzen ab [7, 16]. Dort stellte sich vor allem die Frage nach der Kanzerogenität der Materialien, da die Kunststoffe in den allermeisten Fällen bis zum Lebensende im Körper des Patienten verbleiben. Trotz vereinzelter Fallberichte über Weichteilmalignome bei Patienten, denen eine alloplastische Gefäßprothese implantiert worden waren [10, 60, 78], stehen die Mechanismen des Wiederverschlusses im Vordergrund. Einerseits übersteigen diese Fallzahlen jede andere Komplikation um ein Vielfaches, andererseits ist die Lebenserwartung der gefäßchirurgischen Patientenklientel bereits beschränkt, da es sich bei der Atherosklerose um eine Systemerkrankung handelt. Die Gefahr einer malignen Entartung rückt also in den Hintergrund.

Diese Arbeit beweist die Einflussnahme von körperfremdem Gefäßersatzmaterial auf humane, in Gefäßen vorkommende Zellen. Das In-vitro-Modell kann nur bedingt Aussagen über das Verhalten der Zellen unter den komplexen Bedingungen des lebenden Organismus machen. Dennoch konnte diese Studie zeigen, dass die reine Material-Zell-Interaktion ausreicht, um das natürliche Verhalten von Zellen zu verändern.

Es wurde ein leicht negativer Einfluss der ESHS-Beschichtung von ePTFE hinsichtlich Hemmung des Zellwachstums und Erhöhung der Apoptoserate gefunden. In nachfolgenden Untersuchungen bliebe zu klären, auf welche Mechanismen diese Zellreaktion zurückzuführen ist. Denkbar wäre z.B. eine Freisetzung von toxischen Stoffen aus der ESHS-Beschichtung. Solche Vorgänge wurden bereits für die Kunststoffe PET und PUR nachgewiesen [81]. Ein anderer Ansatzpunkt ist die Annahme, dass auf der Glykokalix-artigen Oberfläche der ESHS keine EC-Adhäsion möglich ist, auf unbeschichtetem ePTFE zumindest geringfügig. Wird postuliert, dass diese Annahme zutrifft, ist darin die Wirksamkeit und Akzeptanz der ESHS-Beschichtung durch das Empfängergewebe bestätigt.

Die Titanbeschichtung von ePTFE erwies sich als positiver Einfluss. Sie konnte das Zellwachstum verbessern, ohne die Apoptoserate im Vergleich mit dem unbeschichteten ePTFE zu verändern. Warum trotz des Beweises der guten Eigenschaften der Titanbeschichtung hinsichtlich der Biokompatibilität noch keine Verbesserung der Langzeitoffenheitsraten erzielt werden konnte [84], müssen weitere

Studien klären. Insbesondere die Problematik der Gewebhyperplasie in der Anastomosenregion scheint hier eine Rolle zu spielen.

In der Betrachtung der xenogenen Materialien gab es von Anfang an eine andere Erwartungshaltung. Aufgrund von Voruntersuchungen wurde hier mit einem schlechten Zellwachstum bei einer erhöhten Apoptoserate gerechnet. Diese Erwartung wurde erfüllt, bis auf die ausreißende Untersuchung zur Apoptoserate der Endothelzellen, für die hier keine sichere Erklärung gegeben werden kann. Es konnte aber in einem Fall eine unterschiedliche Beeinflussung des Zellwachstums gefunden werden, welche für einen kleinen Vorteil des titanisierten Pericards spricht. In Einklang mit den hier zitierten Studien kann eine verbesserte Detoxifikation des Pericards mithilfe der Titan-Beschichtung angenommen werden. Die Studienlage scheint für die Technik der Titanisierung von Xenografts mit vorangestellter Behandlung mit der Aldehyddehydrogenase ausgezeichnet. Die Wirksamkeit dieser vielversprechenden Anwendung vor allem für den biologischen Herzklappenersatz wird man hoffnungsvollerweise in den folgenden Jahren an großen, klinisch angelegten Studien beweisen können.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines In-vitro-Modells die Histokompatibilität von verschiedenen Gefäßersatzmaterialien mit Beschichtungen im Vergleich mit unbeschichteten Vergleichsmaterialien zu beschreiben. Als Materialien wurden ePTFE mit Titanbeschichtung und Endothelzelloberflächen-Heparansulfat(ESHS)-Beschichtung untersucht. Die ESHS-Moleküle werden über ein Polymer an die ePTFE-Oberfläche gebunden, daher wurde dieses Polymer in die Untersuchung integriert. Als Vertreter eines Xenografts wurde außerdem titanbeschichtetes, in Glutaraldehyd denaturiertes Rinderpericard miteinbezogen. Zur systematischen Untersuchung wurden Proben der beschichteten und unbeschichteten Materialien separat mit Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen über einen Zeitraum von 72h inkubiert. Außerdem wurde pro Versuchsreihe eine Gruppe ohne Materialzugabe als Kontrolle inkubiert. Mit dem AlamarBlue-Assay wurde nach 48 und 72 Stunden photometrisch die relative Zellzahl ermittelt, um das Zellwachstum zu evaluieren. Mit dem AnnexinV-Assay wurde nach 0, 24, 48 und 72 Stunden durchflusszytometrisch die Apoptoserate gemessen. Im Fall des ESHS-beschichteten ePTFEs zeigte sich ein signifikant erniedrigtes Zellwachstum bei den Endothelzellen im Vergleich mit unbeschichtetem ePTFE. In der Gruppe der glatten Gefäßmuskelzellen war eine erhöhte Apoptoserate gegenüber dem unbeschichteten ePTFE nachweisbar. Das Polymer zeigte uneinheitliche Ergebnisse. In den restlichen Untersuchungen wurden keine Unterschiede zwischen den drei Materialien gefunden. Entweder hat die ESHS-Beschichtung einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum, oder die Endothelzellen akzeptieren diese synthetische Glykokalix und unterlassen das Wachstum auf der selbigen. Im Fall des Titan-beschichteten ePTFEs fand sich ein verbessertes Zellwachstum für die Endothelzellen im Vergleich zum unbeschichteten ePTFE. Das Zellwachstum der glatten Gefäßmuskelzellen wurde nicht zusätzlich verändert. Auch die Apoptoseraten erfuhren keine zusätzliche Einflussnahme. Dieses Ergebnis bestätigt das in verschiedenen Untersuchungen beschriebene verbesserte Adhärenzverhalten und damit regeres Zellwachstum von Endothelzellen auf titanisierten Oberflächen. Im Fall des titanisierten Rinderpericards wurde eine ausgeprägte Hemmung des Zellwachstums gefunden. Dies ist auf die Freisetzung von Glutaraldehydrückständen aus dem Gewebe zurückzuführen. Für das Zellwachstum der

glatten Gefäßmuskelzellen wurde für das titanisierte Pericard eine geringere Hemmwirkung als für das unbeschichtete Pericard festgestellt. Eine wirksame Detoxifizierung durch die Titanisierung kann daher angenommen werden.

Die hier berichteten Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen für das titanisierte ePTFE und Pericard. Die ESHS-Beschichtung von ePTFE ist eine Innovation, für die es noch wenig gesicherte Daten gibt. Die weitere systematische Untersuchung durch die medizinische und medizintechnische Forschung ist notwendig, um diese Ergebnisse in einen Kontext stellen zu können. In jedem Fall muss die Exploration von pathophysiologischen Hintergründen für die Interaktionen zwischen Biomaterial und Organismus weiterhin vorangetrieben werden, um in Zukunft den bestmöglichen Gefäßersatz für den klinischen Einsatz gewährleisten zu können.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Ahmed, S., Gogal, R., & Walsh, J. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Metho* (170), S. 211–224.
- [2] Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* (22), S. 1304-1309.
- [3] Baumann, H., Chun, L., & Faust, V. (2003). Regioselectively Modified Cellulose and Chitosan Derivatives for Mono- and Multilayer Surface Coatings of Hemocompatible Biomaterials. *Cellulose* (10), S. 65-74.
- [4] Baumann, H., Müller, U., & Keller, R. (1997). Which glycosaminoglycans are suitable for antithrombogenic coatings of biomaterials? Part I: Basic concepts of immobilized GAGs on partially cationized cellulose membrane. *Semin Thromb Hemost* (23 (2)), S. 203-213.
- [5] Berchtold, R. (2008, 6. Auflage). Arterien, Venen und Lymphgefäße. In H.-P. Bruch, & O. Trentz, *Chirurgie* (S. 687-736). München: Urban und Fischer Verlag.
- [6] Bethge, T. (2004). In-vitro Untersuchungen zur Interaktion implantierbarer Kunststoffnetze aus Polypropylen mit humanen Fibroblastenkulturen. Lübeck: Med. Diss.
- [7] Broll, R., Bethge, T., Windhovel, U., Schwandner, O., Markert, U., Bruch, H., et al. (2002). Influence of resterilized polypropylen meshes on growth of human fibroblasts--an experimental in vitro study. *Zentralbl Chir* (127), S. 589-593.
- [8] Bubendorf, L., Feichter, G., Obermann, E., & Dalquen, P. (2011, 3. Auflage). Funktionelle Anatomie der Zelle. In *Pathologie: Zytopathologie* (S. 1-18). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- [9] Bundesministerium für Gesundheit. (kein Datum). Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Abgerufen am 20. 12 2011 von http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/

&p_aid=3&p_aid=82981883&nummer=550&p_sprache=D&p_indsp=105&p_aid=1976850
4

[10] Burns, W., Kanhouwa, S., Tillman, L., Saini, N., & Herrmann, J. (1972). Fibrosarcoma occurring at the site of a plastic vascular graft. *Cancer* (29), S. 66-72.

[11] Campbell, G., & Chamley-Campbell, J. (1981). Smooth muscle phenotypic modulation: role in atherogenesis. *Med Hypotheses* (7), S. 729-735.

[12] Carrel, A. (1902). La technique operatoire des anastomoses vas-culaires et la transplantation des visces. *Lyon Med* (98), S. 859-865.

[13] Ciossek, T., & Fetzer, J. (2004). MTS-Anlage zur Identifizierung cytotoxischer Wirkstoffkandidaten. Abgerufen am 23. März 2010 von http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=934181

[14] Consigny, P. (2000). Endothelial cell seeding on prosthetic surfaces. *J Long Term Eff Med Implants* (10), S. 79-95.

[15] Denk, H., & Zatloukal, K. (2008, 4. Aufl.). Zell- und Gewebsreaktionen. In W. Böcker, H. Denk, & P. Heitz, *Pathologie* (S. 35-71). München: Elsevier.

[16] Duchrow M, W. U. (2002). Polypropylene synthetic mesh modifies growth of human cells in vitro. An experimental study. *Chirurg* (73), S. 154-158.

[17] Edmonds, M., Ruzicka, E., Muckel, G., Keller, R., Müller, U., & Baumann, H. (1991). ES-HS from blood vessel- a potent substance for inert nonthrombogenic polymers. *Clin. Mater.* (8), S. 47.

[18] Fischlein, T., Lehner, G., Lante, W., & Reichart, B. (1992). Endothelialization of aldehyde-fixed cardiac valve bioprotheses. *Transplant Proc.* , S. 2988.

[19] Freshney, R. (2000, 4. Auflage). Maintenance of the Culture - Cell Lines. In *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique* (S. 177-193). New York: Wiley-Liss.

[20] Friedman, S. G. (2005). *A History of Vascular Surgery*. Massachusetts / Oxford: Blackwell Publishing.

- [21] Gehrts, M. (2006). In-vitro Untersuchungen zum Einfluss von Kunststoffnetzen auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von humanen Monozyten, Med. Diss. Lübeck.
- [22] Geisler, F. www.anatomie-online.com/Seiten/anato006.html. Abgerufen am 20. 12 2011
- [23] Genée, P. (2006). Mechanische Bürstenabrasion humaner arterieller Gefäßendothelzellen und deren Adhärenzverhalten auf Endovasculären Prothesenoberflächen. Kiel: Med. Diss.
- [24] Gerabek, W., Haage, W., Keil, G., & Wegner, W. (2005). Enzyklopädie Medizingeschichte. Berlin: Walter de Gruyter Verlag.
- [25] Giessler, R. (1987, 2004). Gefäßrekonstruktionen. In G. Heberer, & R. van Dongen, Gefäßchirurgie (S. 73-88). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- [26] Glasmacher, B., & Deiwick, M. (2002). Kalzifizierung biologischer Herzklappenprothesen. In E. Wintermantel, & S. Ha, Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen (S. 1175-1188). Berlin, 3. Auflage: Springer-Verlag.
- [27] Gloeckner, H., Jonuleit, T., & Lemke, H. (2001). Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *J Immunol Methods* (252), S. 131-138.
- [28] Greenwald, S., & Berry, C. (2000). Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* (190), S. 292-299.
- [29] Grondin, C., Champeau, L., Lesperance, J., Enjalbert, M., & Bourassa, M. (1984). Comparison of late changes in internal mammary artery and saphenous vein grafts in two consecutive series of patients 10 years after operation. *Circulation* (70), S. 1208-1212.
- [30] Gulbins, H., Goldemund, A., Anderson, I., Haas, U., Uhlig, A., Meiser, B., et al. (2003). Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* (125), S. 592-601.
- [31] Guldner, N., Jasmund, I., Mayer, V., Gebert, H., Heinlein, M., & Sievers, H. (September 5th-8th, 2007). Detoxification and endothelialisation of glutaraldehyde fixed

collagen scaffolds for cardiovascular tissue engineering. XXXIV. Annual Congress of the European Society for Artificial Organs .

[32] Guldner, N., Klapproth, P., Großherr, M., Rumpel, E., Noel, R., & Sievers, H. (2001). Biomechanical Hearts: Muscular Blood Pumps, Performed in a One-Step Operation, and Trained under Support of Clenbuterol. *Circulation* 104, 717-722 .

[33] Hao, H., Gabbiani, G., & Bochaton-Piallat, M. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (23), S. 1510-1520.

[34] Hao, H., Ropraz, P., Verin, V., Camenzind, E., Geinoz, A., Pepper, M., et al. (2002). Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (22), S. 1093-1099.

[35] Hastings, G. (1992). *Cardiovascular Biomaterials*. London: Springer Verlag Limited.

[36] Heberer, & vanDongen. (1987, 2004). *Kirschnersche allgemeine und spezielle Operationslehre Band IX:Gefäßchirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

[37] Hegemeyer, T. (2001). *Aneurysmen von Gefäßprothesen- Morphologie und Pathogenese*. Ruhr Universität Bochum: Med. Diss.

[38] Henze, U., Zwadlo-Klarwasser, G., Klosterhalften, B., Höcker, H., Richter, H., & Mittermayer, C. (1999). Kunststoffe für den medizinischen Einsatz als Implantatmaterialien. *Dt. Ärzteblatt* (96), S. 979-986.

[39] Hess, S. (2005). *Endothelzellproliferation und die Identifizierung pro-angiogener Gene durch ein neuartiges Hochdurchsatz-Screen-System*. München: Med. Diss.

[40] Hoffmann, M. H. (2001). Endothelzelloberflächen-Heparansulfat (ESHS) und synthetische Heparinderivate als blutverträgliche Beschichtung für Biomaterialien. *Mat.-wiss u. Werkstofftech.* (32), S. 110-115.

[41] Howell, W., & Holt, E. (1918). Two new factors in blood antikoagulation - heparin and pro-antithrombin. *American Journal of Physiology* (47), S. 328-341.

[42] Jaffe, E. (1987). Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* (18), S. 234-239.

- [43] Jennissen, H. (2000). Verträglichkeit wird großgeschrieben - Neue Wege zur Bioverträglichkeit von Materialien durch gezielte Oberflächenmodifikation. *Essener Unikate* (13), S. 78-93.
- [44] Jordan, S., Haller, C., Sallach, R., Apkarian, R., Hanson, S., & Chaikof, E. (2007). The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt. *Biomaterials* (28), S. 1191-1197.
- [45] Jozefowicz, M. J. (1987). Heparin containing and heparin-like polymers. *Polymer Sci. Technol.* (34), S. 41.
- [46] Kannan, R., Salacinsky, H., Butler, P., Hamilton, G., & Seifalian, A. (2005). Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (74), S. 570-581.
- [47] Karapinar, K., Ulus, A., Tutun, U., Aksoyek, A., Apaydin, N., Pamuk, K., et al. (2004). Implantation of novel small-diameter polyurethane vascular prostheses interposed in canine femoral and carotid arteries. *Eur Surg Res* (36), S. 241-248.
- [48] Klinkert, P., Post, P., Breslau, P., & van Bockel, J. (2004). Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (27), S. 357-362.
- [49] Klinkert, P., Schepers, A., Burger, D., van Bockel, J., & Breslau, P. (2003). Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: five year results of a randomized controlled trial. *J Vasc Surg* (37), S. 149-155.
- [50] Köckerling, F., Scheidbach, Tannapfel, A., Schmidt, U., & Lippert, H. (2004). Influence of Titanium Coating on the Biocompatibility of a Heavyweight Polypropylene Mesh. *Eur Surg Res* (36), S. 313-317.
- [51] Kogel, H. (2007). Gefäßchirurgische Aspekte zu Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßsystems. In W. Hepp, & H. Kogel, *Gefäßchirurgie*. München: Urban & Fischer Verlag.
- [52] Kogel, H. (2007). Möglichkeiten des Gefäßersatzes und Einsatz von Nahtmaterialien. In W. Hepp, & H. Kogel, *Gefäßchirurgie*. München: Urban & Fischer Verlag.

- [53] Köppen, S., & Langel, W. (2007). Adsorption of Collagen Fragments on Titanium Oxide Surfaces: A Molecular Dynamics Study. *Phys Chem* (221), S. 3-20.
- [54] Lepidi, S., Sterpetti, A., Cucina, A., Randone, B., Palumbo, R., & Patrizi, A. (1996). The degree of porosity influences the release of growth factors by healing polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (11), S. 36-41.
- [55] Lüllmann-Rauch, R. (2006). Blutgefäße. In *Histologie* (S. 208-219). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [56] Luther, B. (2007). *Kompaktwissen Gefäßchirurgie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- [57] Manji, R., Zhu, L., & Ross, D. (2006). Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection. *Circulation* (114), S. 318-327.
- [58] Marois, Y., Sigot-Luizard, M., & Guidoin, R. (1999). Endothelial cell behavior on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment. *Asaio J* (45), S. 272-280.
- [59] Neymeyer, J., Spethmann, J., Beer, M., Al-Ansari, W., Lange, V., Haider, W., et al. (Berlin, 2007). Animal experiment-based investigation of the compatibility of titanium-coated polypropylene mesh implants for urogynecological plasties under conditions of accompanying intestine surgery. Abridged Research Report from Charité Campus Virchow-Klinikum .
- [60] O'Connell, T., Fee, H., & Golding, A. (1976). Sarcoma associated with dacron prosthetic material: case report and review of the literature. *J Thorac Cardiovasc Surg* (72), S. 94-96.
- [61] Perea, H., Methe, H., & Wintermantel, E. (2009). Vaskuläres Tissue Engineering. In E. Wintermantel, & S.-W. Ha, *Medizintechnik - Life Science Engineering* (S. 451-488). Berlin: Springer Verlag.
- [62] Rabsch, A. (2010). 2D-Korrelation von lokaler Hämodynamik im Modell und Histologie der Pseudointima der femorokruralen ePTFE-Bypassanastomose unter Verwendung der Particle Image Velocimetry. Berlin: Med. Diss.

- [63] Ratschko, K.-W. (2002, 33. Auflage). Die Arzthelferin, Medizinische Fachkunde. Hannover: Schlütersche GmbH und Co.KG Verlag.
- [64] Sasaki, Y., Suehiro, S., Becke, A., Kinoshita, H., & Ueda, M. (2000). Role of endothelial cell denudation and smooth muscle cell dedifferentiation in neointimal formation of human vein grafts after coronary artery bypass grafting: therapeutic implications. *Heart* (83), S. 69-75.
- [65] Schenk, R. (1986). Bone response to grafts and implants. In E. L. Chao, *Perspectives on biomaterials, Materials science monographs* (S. 121-136). Taipei, Taiwan: Elsevier.
- [66] Sedelnikov, N., Cikirkicioglu, M., Crus, S. O.-D., Khabiri, E., Antal, A. D., Tille, J., et al. (2006). Titanium coating improves neo-endothelialisation of ePTFE grafts. *Thorac Cardiovasc Surg* (54), S. 83-115.
- [67] Shup-Paß, C., Tamme, C., Tannapfel, A., & Köckerling, F. (2006). A lightweight polypropylene mesh (TiMesh) for laparoscopic intraperitoneal repair of abdominal wall hernias: comparison of biocompatibility with the DualMesh in an experimental study using the porcine model. *Surg Endosc* (20), S. 402-409.
- [68] Sottiurai VS, Y. J. (1983). Intimal hyperplasia and neointima: an ultrastructural analysis of thrombosed grafts in humans. *Surgery* (93), S. 809-817.
- [69] Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. 430. Abgerufen am 20. 12 1011 von http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/11/PD10__430__231,templateId=renderPrint.psml
- [70] Stöber, B. (2002). Aneurysmen in synthetischen Dialyseshunt: Morphologie und Pathogenese. Bochum: Med. Diss.
- [71] Tiwari, A., Salacinski, H., Seifalian, A., & Hamilton, G. (2002). New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg* (10), S. 191-197.
- [72] Tran-Son-Tay R, H. M. (2007). A model of vein graft intimal hyperplasia. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* (2007), S. 5807-5810.

[73] Traub, M. <http://www.matthias-traub.de/implantate.html>. Abgerufen am 20. 12 2011

[74] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* (184), S. 39-51.

[75] Vohra, R., Thomson, G., Carr, H., Sharma, H., & Walker, M. (1992). The response of rapidly formed adult human endothelial-cell monolayers to shear stress of flow: a comparison of fibronectin-coated Teflon and gelatin-impregnated Dacron grafts. *Surgery* (111), S. 210-220.

[77] Walpoth, B., Zammaretti, P., Cikirikcioglu, M., Khabiri, E., MK, M. D., Pache, J., et al. (2007). Enhanced intimal thickening of expanded polytetrafluoroethylene grafts coated with fibrin or fibrin-releasing vascular endothelial growth factor in the pig carotid artery interposition model. *J Thorac Cardiovasc Surg* (133), S. 1163-1170.

[78] Weinberg, D., & Maini, B. (1980). Primary sarcoma of the aorta associated with a vascular prosthesis: a case report. *Cancer* (46), S. 398-402.

[79] Wesolowsky, S. (1992). Evaluation of tissue and prosthetic vascular grafts. Springfield: CC Thomas.

[80] Wintermantel, E. S.-W. (2009). Biokompatibilität. In *Medizintechnik-Life Science Engineering*, 5. Auflage (S. 201-204). Berlin: Springer-Verlag.

[81] Wulff, B., Schmidt, A., Duchrow, M., & Bruch, H.-P. (2007). Alloplastisches Material zum Gefäßersatz - Gewebeverträglichkeit und Einfluss auf das Zellwachstum in vitro. *Biomaterialien-Interdisciplinary Journal of Functional Materials, Biomechanics and Tissue Engineering* (8), S. 88-89.

[82] Zdrahala, R. (1996). Small caliber vascular grafts. Part I: State of the art. *J Biomater Appl* (10), S. 309-329.

[83] Zhang, Z., Wang, Z., Liu, S., & Kodama, M. (2004). Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. *Biomaterials* (25), S. 177-187.

[84] Zimmermann, H. H. (2009). Titanisierung von Implantatoberflächen. In E. S.-W. Wintermantel, Medizintechnik- Life Science Engineering, 5. Auflage (S. 907-926). Berlin: Springer-Verlag.

[85] Zubilewicz, T., Wronski, J., Bourriez, A., Terlecki, P., Guinault, A., Muscatelli-Groux, B., et al. (2001). Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response. Med Sci Monit 7, 316-324 .

7. Anhang

7.1. Geräte und Software

BD FACS Canto™ Flowcytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Feuchtbrutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss Axioplan, Oberkochen, Deutschland
Programm Acrobat Reader	AdobeSystems Inc., San Jose, CA, USA
Programm CellQuest Version 3.2	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Programm Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Programm Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Programm SPSS Version 13.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
Tecan Safire2™ Microplatereader	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Rotanta/TR Hettich	Firma Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

7.2.Nährmedien

Endothelzellen:

Endothelial Cell Growth Medium MV (Ready-to-use) von PromoCell, Heidelberg, Deutschland

GlatteMuskelzellen:

Kaighn's Modifikation von Ham's F12 Medium (F12K) mit 2 mM L-Glutamin und 1,5 g/l Natriumbikarbonat von ATCC, Manassas, VA, USA ergänzt mit 10 % FKS, 0,01 mg/ml Insulin, 0,01 mg/ml Transferrin, 10 ng/ml Natriumselenit, 0,03 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, 0,05 mg/ml Ascorbinsäure, 10 mM HEPES, 10 mM TES und 100 i.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin

Phenolrotfreies Medium für den AlamarBlue Assay:

Dulbecco's Medium ohne Phenolrot ergänzt durch 10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Glucose und 6mM HEPES und 100 i.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin

7.3 Chemikalien und Lösungen

Alamar Blue Assay	Biosource, Solingen, Deutschland
AnnexinV/FITC Apoptosis Detecion Kit I	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FKS/PBS-Lösung	0,5% FKS gelöst in PBS
Heparin	Sigma, Rödermark, Deutschland
HEPES	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
Insulin	Sigma, Rödermark, Deutschland
L-Glutamin	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
Natriumselenit	Sigma, Rödermark, Deutschland
PBS	PAA, Pasching, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	ATCC, Manassas, Virginia, USA
Schweinegelatine	Sigma, Rödermark, Deutschland
Schweinegelatinelösung	1% Schweinegelatine gelöst in PBS
Transferrin	Sigma, Rödermark, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Rödermark, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Deutschland

7. 4. Einzelwerte

7.4.1. Zellwachstumsbestimmung

7.4.1.1. Endothelzellen (absolut)

Probe	Material	24h	48h	72h
1	Kontrolle	1,27091717	1,14824629	1,5055029
2	Kontrolle	1,09163524	1,45913873	1,67742147
3	Kontrolle	1,19154629	1,51669513	1,50911488
4	Kontrolle	1,0624242	1,21527184	1,34935931
5	Kontrolle	1,3457553	1,62464625	1,70597532
6	Kontrolle	1,13008224	1,44327111	1,39869677
7	Kontrolle	1,00802945	1,0858015	0,87969011
8	Kontrolle	1,06955764	1,37275261	1,15468781
9	Kontrolle	1,09044753	1,35269546	1,1526812
10	Kontrolle	0,97921156	0,97827573	0,81678542
11	Kontrolle	1,52648737	1,17467053	0,72549923
12	ePTFErund	1,21291293	3,01441721	1,14697908
13	ePTFErund	1,12560994	1,42945822	1,28767571
14	ePTFErund	1,02472095	1,08606121	0,94451961
15	ePTFErund	1,1646083	1,30651605	1,38020862
16	ePTFErund	1,27855182	1,73980006	1,68289292
17	ePTFErund	1,21141738	1,40650167	1,5173263
18	ePTFErund	1,13321624	1,58088774	1,65053894
19	ePTFErund	1,12836035	1,46515441	1,46286892
20	ePTFErund	1,26817212	1,41958772	1,68165233
21	ePTFErund	1,29721861	1,48977338	1,63671057
22	ePTFErund	1,3017409	1,37199248	1,63856878
23	ePTFEflach	1,08438898	1,02665899	1,04748821
24	ePTFEflach	0,93712194	1,09220515	0,97038517
25	ePTFEflach	0,90522936	0,93612651	0,97685948

Tabelle 26: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (absolut)

26	ePTFEflach	0,97254963	0,89851763	0,96567738
27	ePTFEflach	0,91335857	1,03582805	0,88667576
28	ePTFEflach	1,40969529	0,91110483	0,87397117
29	ePTFEflach	0,93426363	0,96384135	0,84926197
30	ePTFEflach	0,81768866	0,7350188	0,68882635
31	ePTFEflach	0,91779996	0,85118387	0,90403724
32	ePTFEflach	0,86774237	0,91715055	1,00480803
33	ePTFEflach	0,81768866	0,7350188	0,68882635
34	ePTFErund+ESHS	1,25637023	0,89198628	0,7858451
35	ePTFErund+ESHS	1,29919009	0,97140319	0,81162768
36	ePTFErund+ESHS	1,23787999	0,83076525	0,92330684
37	ePTFErund+ESHS	1,4114899	0,90451154	0,82109469
38	ePTFErund+ESHS	1,09799315	0,71156389	0,6857703
39	ePTFErund+ESHS	1,23880098	1,39110248	1,20844802
40	ePTFErund+ESHS	1,08780993	0,69516159	0,53751587
41	ePTFErund+ESHS	1,14965004	0,8554191	0,88682415
42	ePTFErund+ESHS	1,12918559	0,77122835	0,6220617
43	ePTFErund+ESHS	0,97058844	0,77261203	0,6512621
44	ePTFErund+ESHS	0,77567558	0,41784825	0,33428573
45	ePTFEflach+Titan	1,0140479	1,07794139	1,03286289
46	ePTFEflach+Titan	0,86342873	0,50430517	1,05128924
47	ePTFEflach+Titan	0,94659627	1,05665919	1,31369748
48	ePTFEflach+Titan	0,86538142	1,03133622	1,03980398
49	ePTFEflach+Titan	0,87482255	0,94680958	1,08576201
50	ePTFEflach+Titan	0,97118225	0,95766582	1,1822106
51	ePTFEflach+Titan	0,76611705	0,86555419	0,98267572
52	ePTFEflach+Titan	0,71467154	0,72393458	0,76370238
53	ePTFEflach+Titan	0,93635425	0,74446901	0,9975354
54	ePTFEflach+Titan	0,90981245	0,9816939	1,06723096
55	ePTFEflach+Titan	0,6302951	0,75302616	0,85257616

Tabelle 26: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (absolut)

56	Polymer	0,99544863	0,98103232	1,30996455
57	Polymer	0,8392232	0,76806017	0,53351171
58	Polymer	0,98547827	1,0426544	0,78007181
59	Polymer	1,11327338	1,12918073	0,81112073
60	Polymer	0,89730134	0,66334702	0,68566392
61	Polymer	0,61356438	0,45776549	0,53705528
62	Polymer	1,08997929	1,1929172	0,749008
63	Polymer	1,12954084	1,10953665	0,80621411
64	Polymer	0,80365051	0,85253319	0,77702282
65	Polymer	1,13250228	1,30486343	1,24492668
66	Polymer	1,14433269	1,18461126	0,70837645
67	Pericard	2,04159262	1,23479876	1,17897714
68	Pericard	2,66180742	1,78443832	1,40789819
69	Pericard	1,22810336	0,7306608	0,65436545
70	Pericard	2,88428051	1,62930601	1,41959152
71	Pericard	2,18342005	1,35735275	0,93557912
72	Pericard	2,24117825	1,49860471	1,11696817
73	Pericard	1,03233294	1,00441407	0,80725018
74	Pericard	2,07529259	1,16543096	0,98317963
75	Pericard	1,9003869	1,14541456	0,95088524
76	Pericard	3,20934217	1,33954829	1,07524741
77	Pericard	3,2037207	1,97974638	1,54573663
78	Pericard+Titan	2,43130205	1,98296788	1,42110573
79	Pericard+Titan	2,53453516	1,75597968	1,24296002
80	Pericard+Titan	2,57881865	1,07893053	1,24926393
81	Pericard+Titan	1,68273295	0,98382983	0,79545096
82	Pericard+Titan	2,04932741	1,4198123	1,16135314
83	Pericard+Titan	1,60155839	1,07211084	0,78031416
84	Pericard+Titan	1,90397334	1,0232515	0,92138123
85	Pericard+Titan	2,07994237	1,1744844	0,97271403

Tabelle 26: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (absolut)

86	Pericard+Titan	2,35510748	1,50648202	1,0936387
87	Pericard+Titan	1,69627072	1,02662154	0,89482359
89	Pericard+Titan	1,74517373	1,03769112	0,78889713

Tabelle 26: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (absolut)

7.4.1.2. Endothelzellen (relativ)

Probe	Material	ZW 24h	ZW 48h	ZW 72h
1	Kontrolle	100	90,3478463	131,985114
2	Kontrolle	100	133,66541	153,661352
3	Kontrolle	100	127,287974	126,651805
4	Kontrolle	100	114,386687	127,007585
5	Kontrolle	100	120,723748	126,767126
6	Kontrolle	100	127,713812	123,769467
7	Kontrolle	100	107,715256	87,2682952
8	Kontrolle	100	128,347699	107,959382
9	Kontrolle	100	124,049569	85,2136516
10	Kontrolle	100	99,9044294	83,4125588
11	Kontrolle	100	76,9525219	47,5273656
12	ePTFErund	100	248,527091	94,5640083
13	ePTFErund	100	126,994101	114,398041
14	ePTFErund	100	105,986045	92,1733484
15	ePTFErund	100	112,18502	118,51269
16	ePTFErund	100	136,075835	131,624929
17	ePTFErund	100	116,103805	125,252149
18	ePTFErund	100	139,504508	145,650837
19	ePTFErund	100	129,848095	129,645545
20	ePTFErund	100	111,939672	132,604423
21	ePTFErund	100	114,843663	126,170759
22	ePTFErund	100	105,39674	125,875186
23	ePTFEflach	100	94,676265	96,597091

Tabelle 27: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (relativ)

24	ePTFEflach	100	116,548883	103,549509
25	ePTFEflach	100	103,413185	107,912925
26	ePTFEflach	100	92,3878437	99,2933776
27	ePTFEflach	100	113,408696	97,0786051
28	ePTFEflach	100	64,6313308	61,997169
29	ePTFEflach	100	103,165886	90,9017471
30	ePTFEflach	100	89,8898117	84,2406631
31	ePTFEflach	100	92,7417633	98,5004658
32	ePTFEflach	100	105,693877	115,795663
33	ePTFEflach	100	89,8898117	84,2406631
34	ePTFErund+ESHS	100	70,9970877	62,5488476
35	ePTFErund+ESHS	100	74,7699047	62,4718191
36	ePTFErund+ESHS	100	67,1119381	74,5877501
37	ePTFErund+ESHS	100	64,082041	58,1721969
38	ePTFErund+ESHS	100	64,8058586	62,4567014
39	ePTFErund+ESHS	100	112,294267	97,5498111
40	ePTFErund+ESHS	100	63,9046919	49,4126644
41	ePTFErund+ESHS	100	74,4069124	77,1386179
42	ePTFErund+ESHS	100	68,2995214	55,0894117
43	ePTFErund+ESHS	100	79,602435	67,0997175
44	ePTFErund+ESHS	100	53,8689445	43,0960746
45	ePTFEflach+Titan	100	106,300835	101,855434
46	ePTFEflach+Titan	100	58,4072718	121,7575
47	ePTFEflach+Titan	100	111,627229	138,78118
48	ePTFEflach+Titan	100	119,177069	120,15557
49	ePTFEflach+Titan	100	108,228758	124,112257
50	ePTFEflach+Titan	100	98,6082498	121,729017
51	ePTFEflach+Titan	100	112,979367	128,267048
52	ePTFEflach+Titan	100	101,296126	106,860612
53	ePTFEflach+Titan	100	79,5071959	106,533975

Tabelle 27: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (relativ)

54	ePTFEflach+Titan	100	107,900688	117,302303
55	ePTFEflach+Titan	100	119,472	135,26619
56	Polymer	100	98,551777	131,595393
57	Polymer	100	91,5203692	63,5720878
58	Polymer	100	105,801866	79,1566734
59	Polymer	100	101,428881	72,8590792
60	Polymer	100	73,9268951	76,4140076
61	Polymer	100	74,6075731	87,5303877
62	Polymer	100	109,444025	68,7176359
63	Polymer	100	98,2289979	71,3753837
64	Polymer	100	106,082579	96,6866573
65	Polymer	100	115,219497	109,927079
66	Polymer	100	103,519831	61,9030163
67	Pericard	100	60,482133	57,7479135
68	Pericard	100	67,0385959	52,8925639
69	Pericard	100	59,4950571	53,282604
70	Pericard	100	56,4891662	49,2182198
71	Pericard	100	62,1663592	42,8492503
72	Pericard	100	66,8668237	49,838435
73	Pericard	100	97,2955554	78,196689
74	Pericard	100	56,1574291	47,3754707
75	Pericard	100	60,2727034	50,0364028
76	Pericard	100	41,73903	33,5036699
77	Pericard	100	61,7952241	48,2481706
78	Pericard+Titan	100	81,5599149	58,4503981
79	Pericard+Titan	100	69,2821196	49,0409463
80	Pericard+Titan	100	41,8381699	48,4432642
81	Pericard+Titan	100	58,4661891	47,2713725
82	Pericard+Titan	100	69,2818675	56,6699656
83	Pericard+Titan	100	66,9417269	48,72218

Tabelle 27: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (relativ)

84	Pericard+Titan	100	53,7429532	48,3925489
85	Pericard+Titan	100	56,4671603	46,7663933
86	Pericard+Titan	100	63,9665933	46,4368912
87	Pericard+Titan	100	60,5222697	52,7524044
89	Pericard+Titan	100	59,4606198	45,2045038

Tabelle 27: Einzelwerte Zellwachstum Endothelzellen (relativ)

7.4.1.3. Glatte Muskelzellen (absolut)

7.4.1.3.1. Messreihe 1

Probe	Material	ZW 24h	ZW 48h	ZW 72h
1	Kontrolle	5,17220177	4,32209934	7,92152153
2	Kontrolle	3,2930141	4,0342288	6,5931262
3	Kontrolle	2,68305445	4,436634	7,60375588
4	Kontrolle	3,70243692	5,51477087	6,87679137
5	Kontrolle	2,59197101	4,12950639	7,25448885
6	Kontrolle	3,46571945	5,39780298	6,23507715
7	Kontrolle	4,23671697	5,00855714	6,61747109
8	Kontrolle	4,60199633	4,84408623	6,71931041
9	Kontrolle	5,00754298	4,04562224	6,35495462
10	Kontrolle	2,23155683	2,21757643	2,56642163
11	Kontrolle	1,59114653	1,65647742	3,17620799
12	Kontrolle	1,9747947	2,00759559	2,53150614
13	ePTFErund	2,04793192	2,25833393	2,08520736
14	ePTFErund	4,4609238	3,03892171	4,82014751
15	ePTFErund	1,86338136	1,61039429	2,14604252
16	ePTFErund	2,09244438	0,62496909	0,98053183
17	ePTFErund	1,5853586	1,06456699	0,95322889
18	ePTFErund	1,92349417	1,50939171	1,50489564
19	ePTFErund	0,58370283	1,6754158	1,85673182
20	ePTFErund	1,06815038	1,06826312	1,23551432

Tabelle 28: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (absolut) Messreihe 1

21	ePTFErund	2,03859064	1,67769292	1,17638313
22	ePTFErund	0,77827071	0,68246799	0,60760765
23	ePTFErund	0,93587327	0,40015961	0,39078797
24	ePTFErund	1,09181532	0,5428687	0,53656529
25	ePTFErund+ESHS	2,08173043	1,4914021	1,72139167
26	ePTFErund+ESHS	2,16829853	1,93049991	2,13536561
27	ePTFErund+ESHS	2,31549567	1,20339412	2,87366721
28	ePTFErund+ESHS	2,12249202	2,39793301	3,4089663
29	ePTFErund+ESHS	2,01000826	1,77921916	2,65708495
30	ePTFErund+ESHS	2,02656665	2,12393817	2,52239203
31	ePTFErund+ESHS			Pilzbefall
32	ePTFErund+ESHS			Pilzbefall
33	ePTFErund+ESHS			Pilzbefall
34	ePTFErund+ESHS	0,72370553	0,90018567	0,50485079
35	ePTFErund+ESHS	0,75296	0,49284511	0,85415832
36	ePTFErund+ESHS	0,60006725	0,55602877	0,6498306
37	Polymer	2,71644198	1,13606233	1,66441143
38	Polymer	0,75406601	1,09300271	2,18711741
39	Polymer			Pilzbefall
40	Polymer	2,94993434	2,27669048	2,8615769
41	Polymer	2,99329996	2,36267163	2,04901068
42	Polymer	2,57303219	1,49079436	1,53992737
43	Polymer	0,96313949	1,47940775	1,75231304
44	Polymer	1,69979025	1,23988091	1,4937934
45	Polymer	1,77370897	4,36261309	2,05418222
46	Polymer	0,84809075	0,45268315	0,50385634
47	Polymer	0,48895099	0,17262338	0,38206024
48	Polymer	0,79468591	0,82016725	0,7577088

Tabelle 28: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (absolut) Messreihe 1

7.4.1.3.2. Messreihe 2

Probe	Material	ZW 24h	ZW 48h	ZW 72h
1	Kontrolle	6,87919477	4,38597656	5,4852475
2	Kontrolle	6,24925791	4,87798087	4,78634063
3	Kontrolle	5,61727523	3,83963427	4,24787377
4	Kontrolle	5,17635476	2,99804395	2,98482449
5	Kontrolle	4,40736296	3,64475479	3,81098456
6	Kontrolle	4,59303983	2,85615046	3,38590679
7	Kontrolle	4,53087818	3,4236302	3,45343804
8	Kontrolle	7,4658077	5,50161345	6,02105422
9	Kontrolle	8,3752559	6,9294281	6,13307098
10	Kontrolle	7,8986562	6,74993072	5,97632891
11	Kontrolle	8,08914776	6,21246286	4,93756414
12	ePTFEflach	7,11629695	4,05343864	3,54625849
13	ePTFEflach	5,32683406	3,42068191	3,66541113
14	ePTFEflach	4,88969512	3,3622816	3,61977049
15	ePTFEflach	5,47603205	4,47030818	4,80739258
16	ePTFEflach	4,25925179	3,43251639	3,68264646
17	ePTFEflach	4,28803822	3,38109538	3,76241114
18	ePTFEflach	4,19259992	2,72049871	3,12409568
19	ePTFEflach	7,50423286	5,03263311	5,03797012
20	ePTFEflach	6,05243929	5,42665041	5,77409259
21	ePTFEflach	6,82846844	4,302423	5,39628528
22	ePTFEflach	4,67848892	3,72915448	3,89632849
23	ePTFEflach+Titan	4,86293759	3,19384694	2,8179483
24	ePTFEflach+Titan	3,62305013	3,48723067	4,24498884
25	ePTFEflach+Titan	3,86074788	3,85731538	4,69339971
26	ePTFEflach+Titan	5,28731722	3,48965363	5,38461981
27	ePTFEflach+Titan	6,39678818	3,18137732	1,9432527

Tabelle 29: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (absolut) Messreihe 2

28	ePTFEflach+Titan	12,9960117	2,97580448	3,16418279
29	ePTFEflach+Titan	5,64194652	2,69142285	3,07227234
30	ePTFEflach+Titan	6,09558232	5,01965869	6,4283485
31	ePTFEflach+Titan	6,9119647	5,40924552	7,04795483
32	ePTFEflach+Titan	6,99707293	4,39971993	5,72779006
33	ePTFEflach+Titan	6,61621931	5,5595289	5,54280919
34	Pericard	5,46538257	1,16712594	1,09162901
35	Pericard	4,17895951	1,68538493	1,13632045
36	Pericard	4,06594021	1,7020373	1,12089443
37	Pericard	4,54335563	1,94476821	1,49270755
38	Pericard	3,53688141	1,32408946	1,03237633
39	Pericard	4,12257786	1,78362512	1,16623946
40	Pericard	3,25963708	1,42861183	1,08682343
41	Pericard	4,87548266	2,35654477	1,69314628
42	Pericard	3,47232773	1,62540792	1,28331116
43	Pericard	2,94928551	1,29803601	1,03405251
44	Pericard+Titan	2,4147333	1,52209775	1,45173152
45	Pericard+Titan	1,98478986	1,33205021	1,21531723
46	Pericard+Titan	2,26795005	1,64469155	1,22245924
47	Pericard+Titan	2,20083713	1,27613862	1,16192637
48	Pericard+Titan	2,79584873	1,0405302	1,2011953
49	Pericard+Titan	1,92471979	1,01648421	0,77188937
50	Pericard+Titan	2,22994206	0,99153558	0,75983505
51	Pericard+Titan	4,24571717	2,26449413	2,17988658
52	Pericard+Titan	4,73393283	2,86406544	3,09963634
53	Pericard+Titan	3,61064788	2,67120717	2,09788203
54	Pericard+Titan	3,66773402	2,46169122	2,39540607

Tabelle 29: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (absolut) Messreihe 2

7.4.1.4. Glatte Muskelzellen (relativ)

7.4.1.4.1. Messreihe 1

Probe	Material	ZW 24h	ZW 48h	ZW 72h
1	Kontrolle	100	83,5640126	153,155694
2	Kontrolle	100	122,508701	200,215547
3	Kontrolle	100	165,357584	283,399239
4	Kontrolle	100	148,949759	185,736895
5	Kontrolle	100	159,319158	279,883101
6	Kontrolle	100	155,748411	179,907152
7	Kontrolle	100	118,217884	156,193372
8	Kontrolle	100	105,260541	146,0086
9	Kontrolle	100	80,7905646	126,90764
10	Kontrolle	100	99,3735132	115,005882
11	Kontrolle	100	104,1059	199,617566
12	Kontrolle	100	101,660977	128,190851
13	ePTFErund	100	110,273877	101,82015
14	ePTFErund	100	68,1231477	108,052675
15	ePTFErund	100	86,4232263	115,16926
16	ePTFErund	100	29,867895	46,8605925
17	ePTFErund	100	67,1499174	60,1270201
18	ePTFErund	100	78,4713428	78,237598
19	ePTFErund	100	287,032326	318,095397
20	ePTFErund	100	100,010554	115,668575
21	ePTFErund	100	82,2967047	57,7057061
22	ePTFErund	100	87,6903096	78,0715042
23	ePTFErund	100	42,7578847	41,7565046
24	ePTFErund	100	49,7216598	49,1443269
25	ePTFErund+ESHS	100	71,6424223	82,6904216
26	ePTFErund+ESHS	100	89,0329391	98,4811633

Tabelle 30: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (relativ) Messreihe 1

27	ePTFErund+ESHS	100	51,9713395	124,10592
28	ePTFErund+ESHS	100	112,977245	160,611502
29	ePTFErund+ESHS	100	88,5180025	132,192738
30	ePTFErund+ESHS	100	104,804753	124,466276
31	ePTFErund+ESHS			Pilzbefall
32	ePTFErund+ESHS			Pilzbefall
33	ePTFErund+ESHS			Pilzbefall
34	ePTFErund+ESHS	100	124,385629	69,7591447
35	ePTFErund+ESHS	100	65,4543544	113,440065
36	ePTFErund+ESHS	100	92,6610758	108,292962
37	Polymer	100	41,8217043	61,2717459
38	Polymer	100	144,947883	290,043232
39	Polymer			Pilzbefall
40	Polymer	100	77,1776663	97,0047659
41	Polymer	100	78,9320036	68,4532357
42	Polymer	100	57,9392037	59,8487408
43	Polymer	100	153,602648	181,937618
44	Polymer	100	72,9431709	87,8810427
45	Polymer	100	245,959915	115,812811
46	Polymer	100	53,376735	59,4106638
47	Polymer	100	35,3048429	78,1387591
48	Polymer	100	103,206467	95,3469536

Tabelle 30: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (relativ) Messreihe 1

7.4.1.4.2. Messreihe 2

Probe	Material	ZW 24h	ZW 48h	ZW 72h
1	Kontrolle	100	63,7571213	79,7367669
2	Kontrolle	100	78,056962	76,5905441
3	Kontrolle	100	68,354035	75,6216066
4	Kontrolle	100	57,918054	57,6626723

Tabelle 31: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (relativ) Messreihe 2

5	Kontrolle	100	82,696951	86,4685888
6	Kontrolle	100	62,1843172	73,7182109
7	Kontrolle	100	75,5621772	76,2200594
8	Kontrolle	100	73,6908004	80,6483968
9	Kontrolle	100	82,7369119	73,2284608
10	Kontrolle	100	85,4566973	75,6626034
11	Kontrolle	100	76,7999677	61,0393614
12	ePTFEflach	100	56,9599423	49,8329189
13	ePTFEflach	100	64,2160404	68,8103119
14	ePTFEflach	100	68,7626021	74,0285519
15	ePTFEflach	100	81,6340763	87,7897085
16	ePTFEflach	100	80,5896566	86,462286
17	ePTFEflach	100	78,8494693	87,7420149
18	ePTFEflach	100	64,8881069	74,5145194
19	ePTFEflach	100	67,0639251	67,1350452
20	ePTFEflach	100	89,660551	95,4010823
21	ePTFEflach	100	63,0071449	79,0262901
22	ePTFEflach	100	79,7085243	83,2817722
23	ePTFEflach+Titan	100	65,677317	57,9474494
24	ePTFEflach+Titan	100	96,2512398	117,166164
25	ePTFEflach+Titan	100	99,9110924	121,567112
26	ePTFEflach+Titan	100	66,0004589	101,840302
27	ePTFEflach+Titan	100	49,7339794	30,3785688
28	ePTFEflach+Titan	100	22,8978285	24,3473371
29	ePTFEflach+Titan	100	47,7037995	54,4541202
30	ePTFEflach+Titan	100	82,3491247	105,459137
31	ePTFEflach+Titan	100	78,2591601	101,96746
32	ePTFEflach+Titan	100	62,8794351	81,8598022
33	ePTFEflach+Titan	100	84,0287879	83,77608
34	Pericard	100	21,3548809	19,9735151

Tabelle 31: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (relativ) Messreihe 2

35	Pericard	100	40,3302528	27,1914684
36	Pericard	100	41,8608542	27,5679024
37	Pericard	100	42,8046662	32,8547373
38	Pericard	100	37,4366371	29,1888873
39	Pericard	100	43,2648014	28,2890828
40	Pericard	100	43,8273278	33,3418538
41	Pericard	100	48,3345945	34,7277675
42	Pericard	100	46,8103256	36,9582383
43	Pericard	100	44,0118804	35,0611195
44	Pericard+Titan	100	63,0337829	60,1197457
45	Pericard+Titan	100	67,112909	61,2315315
46	Pericard+Titan	100	72,5188613	53,9015062
47	Pericard+Titan	100	57,9842374	52,7947459
48	Pericard+Titan	100	37,2169706	42,9635299
49	Pericard+Titan	100	52,8120619	40,1039868
50	Pericard+Titan	100	44,4646341	34,0742059
51	Pericard+Titan	100	53,3359629	51,3431887
52	Pericard+Titan	100	60,5007621	65,4769818
53	Pericard+Titan	100	73,981381	58,102648
54	Pericard+Titan	100	67,1174957	65,3102449

Tabelle 31: Einzelwerte Zellwachstum glatte Muskelzellen (relativ) Messreihe 2

7.4.2. Apoptoserate

7.4.2.1. Endothelzellen

Probe	Material	AR 0h	AR 24h	AR 48h	AR 72h
1	Kontrolle	8,8	16,9	24,9	16,69
2	Kontrolle	7,36	23,95	27,85	19,16
3	Kontrolle	9,92	16,27	21,88	16,65
4	Kontrolle	10,4	14,36	18,82	16,42
5	Kontrolle	8,91	13,71	18,34	17,72

Tabelle 32: Einzelwerte Apoptoserate Endothelzellen

6	Kontrolle	9,31	16,56	12,27	17,14
7	Kontrolle	9,51	15,82	15,85	17,97
8	Kontrolle	9,33	14,94	22,34	17,18
9	Kontrolle	8,49	16,06	21,7	18,36
10	ePTFErund	8,8	16,23	33,43	24,5
11	ePTFErund	7,36	27,82	29,29	25,68
12	ePTFErund	9,92	28,62	31,5	28,25
13	ePTFErund	10,4	22,6	12,44	21,81
14	ePTFErund	8,91	17,36	22,05	26,18
15	ePTFErund	9,31	12,17	21,73	25,69
16	ePTFErund	9,51	18,28	18,47	25,73
17	ePTFErund	9,33	18,69	23,68	28,44
18	ePTFErund	8,49	22,55	25,57	24,65
19	ePTFEflach	8,8	25,13	24,98	34,72
20	ePTFEflach	7,36	24,4	27,69	33,92
21	ePTFEflach	9,92	33,67	25,06	22,18
22	ePTFEflach	10,4	20,71	23,88	27,18
23	ePTFEflach	8,91	15,64	26,41	23,13
24	ePTFEflach	9,31	15,19	20,89	24,69
25	ePTFEflach	9,51	20,78	23,1	24,02
26	ePTFEflach	9,33	16,99	26,4	27,5
27	ePTFEflach	8,49	19,31	20,21	27,02
28	ePTFErund+ESHS	8,8	26,88	19,57	33,07
29	ePTFErund+ESHS	7,36	21,72	30,31	31,37
30	ePTFErund+ESHS	9,92	23,72	38,55	28,71
31	ePTFErund+ESHS	10,4	20,32	20,36	21,66
32	ePTFErund+ESHS	8,91	10,32	21,44	27,33
33	ePTFErund+ESHS	9,31	21,65	20,69	25,93
34	ePTFErund+ESHS	9,51	19,87	29,1	23,83
35	ePTFErund+ESHS	9,33	20,48	26,94	26,44

Tabelle 32: Einzelwerte Apoptoserate Endothelzellen

36	ePTFErund+ESHS	8,49	24,92	35,11	21,69
37	ePTFEflach+Titan	8,8	31,31	24,24	31,72
38	ePTFEflach+Titan	7,36	27,56	37,51	33,92
39	ePTFEflach+Titan	9,92	23,45	23,9	34,84
40	ePTFEflach+Titan	10,4	26,26	22,9	20,42
41	ePTFEflach+Titan	8,91	21,44	29,75	27,71
42	ePTFEflach+Titan	9,31	14,79	24,19	25,41
43	ePTFEflach+Titan	9,51	22,76	27,75	30,62
44	ePTFEflach+Titan	9,33	28,36	19,42	25,32
45	ePTFEflach+Titan	8,49	16,47	24,5	25,24
46	Polymer	8,8	27,55	36,25	23,71
47	Polymer	7,36	38,19	28,01	17,86
48	Polymer	9,92	27,56	25,7	22,32
49	Polymer	10,4	14,77	23,08	25,14
50	Polymer	8,91	13,52	19,6	27,74
51	Polymer	9,31	14,36	24,36	23,49
52	Polymer	9,51	25,61	29,85	26,42
53	Polymer	9,33	32,96	31,86	28,57
54	Polymer	8,49	32,86	33,07	28,87
55	Pericard	8,8	28,31	15,71	8,08
56	Pericard	7,36	26,1	11,8	21,24
57	Pericard	9,92	27	13	8,87
58	Pericard	10,4	11,13	13,47	6,3
59	Pericard	8,91	12,8	7,54	7,69
60	Pericard	9,31	9,06	12,34	7,55
61	Pericard	9,51	20,61	16,26	7,62
62	Pericard	9,33	26,63	5,72	8,09
63	Pericard	8,49	26,7	7,43	6,3
64	Pericard+Titan	8,8	24,7	13,38	5,75
65	Pericard+Titan	7,36	24,16	12,92	6,55

Tabelle 32: Einzelwerte Apoptoserate Endothelzellen

66	Pericard+Titan	9,92	16,45	9,64	10,83
67	Pericard+Titan	10,4	17,87	4,89	12,95
68	Pericard+Titan	8,91	19,63	7,56	8,65
69	Pericard+Titan	9,31	17,8	12,01	10,21
70	Pericard+Titan	9,51	23,31	17,5	16,34
71	Pericard+Titan	9,33	22,7	20,97	18,02
72	Pericard+Titan	8,49	23,32	19,22	19,19

Tabelle 32: Einzelwerte Apoptoserate Endothelzellen

7.4.2.2. Glatte Muskelzellen

Probe	Material	AR 0h	AR 24h	AR 48h	AR 72h
1	Kontrolle	2,68	4,1	6,83	1,94
2	Kontrolle	1,77	4,74	7,52	1,64
3	Kontrolle	1,71	5,98	5,92	1,82
4	Kontrolle	2,28	6,09	7,43	1,63
5	Kontrolle	1,7	5,06	3,4	1,6
6	Kontrolle	2,8	4,54	3,73	3,21
7	Kontrolle	2	6,52	4,91	1,78
8	Kontrolle	2,55	1,49	6,46	4,58
9	Kontrolle	2,53	6,57	4,91	3,11
10	ePTFErund	2,68	9,87	7,28	5,03
11	ePTFErund	1,77	7,48	7,63	3,69
12	ePTFErund	1,71	9,3	8,28	3,65
13	ePTFErund	2,28	8,92	9,52	3,54
14	ePTFErund	1,7	7,81	7,71	3,18
15	ePTFErund	2,8	8,54	9,32	9,75
16	ePTFErund	2	9,68	14,83	4,65
17	ePTFErund	2,55	14,36	11,61	5,01
18	ePTFErund	2,53	5,95	16,03	5,47
19	ePTFEflach	2,68	10,71	18,61	5,21

Tabelle 33: Einzelwerte Apoptoserate glatte Muskelzellen

20	ePTFEflach	1,77	15,04	6,66	17,28
21	ePTFEflach	1,71	10,07	7,01	7,48
22	ePTFEflach	2,28	14,43	14,96	7,04
23	ePTFEflach	1,7	11,61	7,99	23,19
24	ePTFEflach	2,8	6,94	13,34	19,9
25	ePTFEflach	2	9,08	17,44	8,18
26	ePTFEflach	2,55	14,89	17,6	8,38
27	ePTFEflach	2,53	12,91	11,93	17,58
28	ePTFErund+ESHS	2,68	9,67	13,02	7,64
29	ePTFErund+ESHS	1,77	10,43	9,53	4,38
30	ePTFErund+ESHS	1,71	12,43	11,64	6,52
31	ePTFErund+ESHS	2,28	11,88	6,39	7,87
32	ePTFErund+ESHS	1,7	10,42	12,17	5,03
33	ePTFErund+ESHS	2,8	6,97	22,3	6,73
34	ePTFErund+ESHS	2	4,26	17,99	25,1
35	ePTFErund+ESHS	2,55	6,7	26	5,21
36	ePTFErund+ESHS	2,53	5,94	6,3	6,26
37	ePTFEflach+Titan	2,68	9,56	11,81	6,71
38	ePTFEflach+Titan	1,77	10,78	7,04	5,1
39	ePTFEflach+Titan	1,71	13,76	8,64	7,23
40	ePTFEflach+Titan	2,28	13,23	14,69	15,49
41	ePTFEflach+Titan	1,7	9,71	7,64	5,26
42	ePTFEflach+Titan	2,8	17,21	19,03	16,71
43	ePTFEflach+Titan	2	15,31	11,32	15,16
44	ePTFEflach+Titan	2,55	8,11	15,4	15,32
45	ePTFEflach+Titan	2,53	13,29	17,51	15,17
46	Polymer	2,68	13,29	8,66	12,22
47	Polymer	1,77	9,71	6,49	16,7
48	Polymer	1,71	10,79	16,81	12,01
49	Polymer	2,28	11,97	14,95	19,57

Tabelle 33: Einzelwerte Apoptoserate glatte Muskelzellen

50	Polymer	1,7	8,48	11,41	17,22
51	Polymer	2,8	14,54	6,59	15,58
52	Polymer	2	6,91	16,94	15,28
53	Polymer	2,55	11,58	15,96	20,31
54	Polymer	2,53	14,24	17,52	22,6
55	Pericard	2,68	7,09	9,6	14,06
56	Pericard	1,77	9,32	11,62	18,39
57	Pericard	1,71	10,81	13,32	6,55
58	Pericard	2,28	6,96	15,7	12,8
59	Pericard	1,7	8,16	14,22	11,75
60	Pericard	2,8	7,11	18,15	17,45
61	Pericard	2	17,21	19,34	18,18
62	Pericard	2,55	16,16	20,7	17,94
63	Pericard	2,53	9,78	20,95	21,65
64	Pericard+Titan	2,68	7,35	8,04	14,23
65	Pericard+Titan	1,77	7,74	7,32	6,87
66	Pericard+Titan	1,71	6,68	7,37	8,67
67	Pericard+Titan	2,28	7,68	8,36	14,01
68	Pericard+Titan	1,7	7,64	8,87	4,29
69	Pericard+Titan	2,8	16,17	17,7	6,86
70	Pericard+Titan	2	8,49	19,6	13,44
71	Pericard+Titan	2,55	11,08	19,42	22,08
72	Pericard+Titan	2,53	7,31	18,41	10,33

Tabelle 33: Einzelwerte Apoptoserate glatte Muskelzellen

8. Danksagung

Ich danke allen Menschen, die zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Phillip Hildebrand dafür, dass er wie selbstverständlich und unkompliziert nach dem Weggang Frau Dr. Wulffs vom UK S-H die Doktorvaterschaft für diese Arbeit übernahm. Mit seinen konstruktiven und kompetenten Ratschlägen war er mir in der finalen Entstehungsphase eine große und geschätzte Hilfe.

Ebenfalls vielen Dank an Frau Dr. Birgit Wulff für die Entwicklung der Idee zu dieser Arbeit und die Unterstützung während der ersten zwei Jahre. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. Andreas Schmidt für die Betreuung über die gesamte Zeit, in der dieses Werk zustande gekommen ist. Meinen herzlichsten Dank dafür, dass er stets zu erreichen war, wenn es Schwierigkeiten gab und nie den Kontakt abreißen ließ. Auch seine zahllosen praktischen Tipps haben die Versuchsreihen erst möglich gemacht. Ich wünsche ihm und seiner Frau alles Gute für ihr bald beginnendes Leben als Eltern.

Des Weiteren danke ich Frau Claudia Killaitis für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten. Mögen noch viele weitere Studentengenerationen von Ihren Fähigkeiten profitieren !

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Jens Habermann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im chirurgischen Forschungslabor sowie allen seinen Mitarbeitern für die Anleitung zum praktischen Arbeiten.

Großer Dank gilt auch Frau Dr. Stephanie Stölting aus der Medizinischen Klinik I für die schnelle und unbürokratische Bereitstellung des Durchflusszytometers und die Unterstützung bei den Messreihen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Norbert Guldner aus der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie für die Bereitstellung der titanisierten Materialien aus ePTFE und Pericard.

9. Lebenslauf

Name: Ramona Lüdemann

Geburtsdatum/-ort: 18. September 1985 in Reinbek

Schulbildung: 1992-1996 Grundschule Breitenfelde

1996-2002 A.-Paul-Weber-Realschule Mölln

2002-2005 Fachgymnasium Technik der Beruflichen Schulen des
KreisesHerzogtum Lauenburg in Mölln

2005 allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung: 2005-2011 Studium der Humanmedizin an der Universität
Lübeck

2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2010-2011 Praktisches Jahr:

Sana Kliniken Lübeck, Medizinische Kliniken

DRK Krankenhaus Ratzeburg, Chirurgische Klinik

UK S-H Campus Lübeck, Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie

Oktober 2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Laufbahn: November 2011 Approbation als Ärztin

Seit 01/2012 Assistenzärztin der Klinik für Gefäß- und
Thoraxchirurgie an den Sana Kliniken Lübeck (Chefarzt: Dr.
Matthias Lenk)



10. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als:

(Poster)

Lüdemann R, Wulff B, Schmidt A, Guldner N, Stölting S: Gewebeverträglichkeit von Gefäßprothesen im Vergleich. Dritter Lübecker Doktorandentag 2009, 11.06.2009

(Abstract)

Wulff B, Schmidt A, Sigler M, Lüdemann R, Bruch H-P: Die Beschichtung von ePTFE-Prothesen mit Glykokalix-ähnlichen Glykosaminoglykanen reduziert die Protein- und Zelladhäsion und die In-graft-Neointimahyperplasie im Tiermodell. Gefäßchirurgie 2009: 5, S. 423