

**Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck**

Kommissarische Direktoren: PD Dr. med. K. Mortensen, PD Dr. med. M. Reppel

Thrombogenitätsuntersuchungen an titanisierten ePTFE- und Kollagenoberflächen

Grundlagen zur Entwicklung neuartiger Gefäß- und biologischer
Herzklappenprothesen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Sabrina Römer
aus Husum

Lübeck 2013

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. F. Bode
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. W. Eichler

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.10.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 KLINISCHER HINTERGRUND	1
1.1.1 Gefäße	1
1.1.2 Herzklappen	2
1.2 STAND DER WISSENSCHAFT	4
1.2.1 Gefäßprothesen aus gerecktem Polytetrafluorethylen	4
1.2.1.1 Beeinflussung der Offenheitsrate durch Thrombose und intimale Hyperplasie	4
1.2.1.2 Reduktion der Thrombogenität und intimalen Hyperplasie durch Prothesenbeschichtungen	5
1.2.1.3 Verbesserung der Offenheitsrate durch Endothelzellbesiedlung	7
1.2.1.4 Erhöhte Endotheladhäsion durch Verwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung	8
1.2.1.5 Fibrinkleber zur Versiegelung und Blutstillung	9
1.2.2 Biologische Herzklappenprothesen aus Rinderperikard	10
1.2.2.1 Dezellularisierung mit Trypsin und EDTA	10
1.2.2.2 Fixierung des Rinderperikard mit Glutaraldehyd	11
1.2.2.3 Detoxifizierung durch Aldehyd-Dehydrogenase	11
1.2.2.4 Detoxifizierung und Reduktion der Verkalkung durch Zitronensäure	12
1.2.2.5 Detoxifizierung durch Titanisierung mittels Plasma-aktivierter Gasphasenabscheidung	12
1.3 HÄMOSTASE UND FIBRINOLYSE	13
1.3.1 Primäre Hämostase	14
1.3.2 Sekundäre Hämostase	15
1.3.3 Fibrinolyse	17
1.4 MESSUNG DER GERINNUNGSAKTIVIERUNG	18
1.4.1 Plättchenfaktor 4 als Parameter der primären Hämostase	18
1.4.2 Thrombin-Antithrombin-Komplexe als Marker der sekundären Hämostase	19
1.4.3 Prothrombinfragmente F1+2 als Marker der sekundären Hämostase	19
1.5 FRAGESTELLUNG/ ZIELSETZUNG	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 MATERIAL	21
2.1.1 Verwendete Laborgeräte	21
2.1.2 Verwendete Verbrauchsgegenstände	22
2.1.3 Verwendete Testkits, Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.4 Verwendete Matrices	23

2.2 METHODEN	23
2.2.1 Präparation und Fixierung des Rinderperikards.....	24
2.2.2 Stanzen von gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) und Rinderperikard.....	24
2.2.3 Verschiedene Behandlungsstrategien für ePTFE und Rinderperikard.....	25
2.2.3.1 Dezellularisierung des Rinderperikards mit Trypsin und EDTA	25
2.2.3.2 Behandlung des Rinderperikards mit 10%iger Zitronensäure	25
2.2.3.3 Behandlung des Rinderperikards mit Aldehyd-Dehydrogenase	25
2.2.3.4 Titanisierung von ePTFE und Rinderperikards mittels Plasma-aktivierter chemischer Gasphasenabscheidung	26
2.2.3.5 Fibrinkleberbeschichtung von gerecktem Polytetrafluorethylen	26
2.2.4 Thrombogenitätsanalysen	26
2.2.4.1 Blutentnahme und Probenvorbereitung	26
2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Thrombin-Antithrombin-Komplexen.....	27
2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Prothrombinfragmenten F1+2.....	29
2.2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Plättchenfaktor 4	29
2.3 ETHIK-KOMMISSION	30
2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG	30
3. ERGEBNISSE.....	31
3.1 TITANISIERTES GERECKTES POLYTETRAFLUORETHYLEN	31
3.1.1 Plättchenfaktor 4	31
3.1.2 Thrombin-Antithrombin-Komplexe.....	32
3.1.3 Prothrombinfragmente F1+2.....	33
3.1.4 Einordnung der Ergebnisse in den Referenz-/ Normalbereich.....	33
3.1.5 Fibrinkleberbeschichtung.....	35
3.2 GLUTARALDEHYDFIXIERTES RINDERPERIKARD.....	36
3.2.1 Titanisiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard.....	36
3.2.1.1 Plättchenfaktor 4.....	36
3.2.1.2 Thrombin-Antithrombin-Komplexe	37
3.2.1.3 Prothrombinfragmente F1+2	38
3.2.1.4 Einordnung der Ergebnisse in den Referenz-/ Normalbereich.....	38
3.2.2 Detoxifiziertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard.....	40
3.2.3 Dezellularisiertes Rinderperikard	42
4. DISKUSSION	44
4.1 WAHL DES TITANISIERUNGSVERFAHREN	45
4.2 EINFLUSS VON TITANISIERTEM, GERECKTEM POLYTETRAFLUORETHYLEN AUF DIE GERINNUNGSAKTIVIERUNG.....	46
4.2.1 Beeinflussung der primären Hämostase durch Titanisierung	46
4.2.2 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Titanisierung.....	48

4.2.3 Thrombogenität der Fibrinkleberbeschichtung	50
4.3 EINFLUSS VON TITANISIERTEM, GLUTARALDEHYDFIXIERTEM RINDERPERIKARD AUF DIE GERINNUNGSAKTIVIERUNG	51
4.3.1 Einfluss der Dezellularisierung auf die Thrombogenität	52
4.3.1.1 Morphologische Veränderungen	52
4.3.1.2 Beeinflussung der primären Hämostase durch Dezellularisierung	53
4.3.1.3 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Dezellularisierung	54
4.3.2 Einfluss der Detoxifizierung auf die Thrombogenität	55
4.3.2.1 Beeinflussung der primären Hämostase durch Detoxifizierung	55
4.3.2.2 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Detoxifizierung	56
4.3.3 Beeinflussung der primären Hämostase durch Titanisierung	57
4.3.4 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Titanisierung	58
4.3.5 Beeinflussung der Oberfläche und Thrombogenität durch Titanisierung	60
4.4 KLINISCHE BEDEUTUNG EINER TITANISIERUNG VON BLUTKONTAKTOBERFLÄCHEN	61
4.4.1 Titanisiertes gerecktes Polytetrafluorethylen	61
4.4.2 Titanisiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATURVERZEICHNIS	66
7. TABELLEN	75
7.1 GERINNUNGSFAKTOREN UND REFERENZBEREICHE	75
7.2 EINZELWERTE UND STATISTISCHE DATEN FÜR ePTFE	76
7.3 EINZELWERTE UND STATISTISCHE DATEN FÜR RINDERPERIKARD	78
8. DANKSAGUNG	81
9. LEBENS LAUF	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADPase	ADP-spaltendes Enzym
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AT	Antithrombin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ca ²⁺	ionisiertes Kalzium
CA10%	zehnprozentige Zitronensäure
CTAD	Natriumzitat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked-immunosorbent assay“
ePTFE	„expanded Polytetrafluoroethylene“ (gerecktes Polytetrafluorethylen)
et al.	et alii (und andere, Maskulinum) oder et aliae (und andere, Femininum)
F	Faktor (Auflistung der einzelnen Faktoren, Tab.1)
F _a	aktivierter Faktor
F1+2	Prothrombinfragmente F1+2
FDP	Fibrinospaltprodukte
GA	Glutaraldehyd
GA-AT	titanisiertes, mit ALDH inkubiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard
GAG	Glycoaminglycane
GP	Glycoprotein
grch	griechisch
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HM(W)K	„high molecular weight Kininogen“ (hochmolekulares Kininogen)
KK	Kallikrein
lat	lateinisch
Min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
p	Wahrscheinlichkeit

PACVD	„plasma activated chemical vapor deposition“ (Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung)
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAI	„Plasminogenaktivator-inhibitor“ (Plasminogenaktivator-Inhibitor)
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankung
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	„platelet derived growth factor“ (Wachstumsfaktor aus Blutplättchen)
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenglykolterephthalat
PF4	Plättchenfaktor 4
PKK	Präkallikrein
PL	Phospholipid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP	Rinderperikard
Sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
Tab	Tabelle
TFPI	„tissue factor pathway inhibitor“ (Gewebefaktorinhibitor)
TGF- β	“transforming growth factor β “
Ti	titanbeschichtet
t-PA	„tissue plasminogen activator“ (Gewebsplasminogenaktivator)
Tryp	trypsiniert
TxA ₂	Thromboxan
U	Umdrehungen
IU	„international Units“ (internationale Einheiten)
vWF	von-Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STRUKTURFORMEL PET.....	1
ABBILDUNG 2: STRUKTURFORMEL ePTFE	2
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PLASMA-AKTIVIERTEN CHEMISCHEN GASPHASENABSCHIEDUNG (PACVD)	9
ABBILDUNG 4: STRUKTURFORMEL ZITRONENSÄURE	12
ABBILDUNG 5: TITANISIERTES UND ENDOTHELBSCHICHTETES RINDERPERIKARD.....	13
ABBILDUNG 6: THROMBOZYTENADHÄSION UND –AGGREGATION.....	14
ABBILDUNG 7: STIMULI DER THROMBOZYTENADHÄSION UND -AGGREGATION MIT INHALTEN DER THROMBOZYTÄREN SPEICHERGRANULA.....	15
ABBILDUNG 8: THROMBOZYTENAKTIVIERUNG UND AKTIVIERUNG DER SEKUNDÄREN INTRINSISCHEN UND EXTRINSISCHEN GERINNUNGSKASKADE.....	16
ABBILDUNG 9: DER INTRINSISCHE UND EXTRINSISCHE WEG DER FIBRINOLYSE	18
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PROBENVORBEREITUNG VON ePTFE UND GLUTARALDEHYDFIXIERTEM RINDERPERIKARD	23
ABBILDUNG 11: GLUTARALDEHYDFIXIERTES RINDERPERIKARD NACH DEM STANZEN.....	24
ABBILDUNG 12: GESTANZTES RINDERPERIKARD IM BLUT EINES PROBANDEN VOR UND NACH DEM ZENTRIFUGIEREN.....	27
ABBILDUNG 13: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PLÄTTCHENFAKTOR 4 (PF4) NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM ePTFE.....	32
ABBILDUNG 14: THROMBIN-ANTITHROMBIN-KONZENTRATIONEN NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM ePTFE	32
ABBILDUNG 15 : PROTHROMBINFRAGMENT F1+2-KONZENTRATIONEN NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM ePTFE.....	33
ABBILDUNG 16: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER GERINNUNGSPARAMETER PF 4, TAT UND F1+2 NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM ePTFE MIT ANGABE DES REFERENZBEREICHES	34
ABBILDUNG 17: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PLÄTTCHENFAKTOR 4 VON UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM RINDERPERIKARD	37
ABBILDUNG 18: THROMBIN-ANTITHROMBIN-KOMPLEX-KONZENTRATIONEN NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM RINDERPERIKARD.....	37
ABBILDUNG 19: F1+2-KONZENTRATIONEN NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM RINDERPERIKARD.....	38

ABBILDUNG 20: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER GERINNUNGSPARAMETER PF 4, TAT
UND F1+2 NACH INKUBATION MIT UNBEHANDELTEM UND TITANISIERTEM
RINDERPERIKARD MIT ANGABE DES REFERENZBEREICHES 39

ABBILDUNG 21: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER GERINNUNGSPARAMETER PF 4, TAT
UND F1+2 NACH INKUBATION VON VERSCHIEDEN DETOXIFIZIERTEM,
GLUTARALDEHYDFIXIERTEM RINDERPERIKARD 41

ABBILDUNG 22: KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER GERINNUNGSPARAMETER PF 4, TAT
UND F1+2 NACH INKUBATION MIT DEZELLULARISIERTEM RINDERPERIKARD 43

ABBILDUNG 23: OBERFLÄCHENRISSE BEI REHYDRIERTEM TITANISIERTEM,
GLUTARALDEHYDFIXIERTEM RINDERPERIKARD 60

1. Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

1.1.1 Gefäße

Die Arteriosklerose (von altgriechisch: artería für „Gefäß“ und sklérýnse für „Verhärtung“) ist eine Erkrankung, die zur Einengung der Gefäßöffnung (Stenosierung) führt. Hochgradige Stenosen führen zu einer Sauerstoffschuld (*grch.*: „Hypoxie“) in den abhängigen Geweben, wodurch es zu Durchblutungs- und Funktionsstörungen kommen kann [1, 2]. Tritt die Arteriosklerose in den Becken- und Beinarterien auf, so wird von der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) gesprochen. Oft resultieren eine schmerzbedingte Reduktion der Gehstrecke, Wundheilungsstörungen und auch Ruheschmerzen. Hypoxiebedingter Zelltod (*grch.*: „Nekrosen“) [1] und Amputation können die Folge sein [2]. Hochgradig stenosierte oder verschlossene Gefäße der Extremität können mit körpereigenen Venen (autolog) oder künstlichen, polymeren Gefäßprothesen operativ ersetzt werden. Als Goldstandard gilt hierbei der Einsatz autologer Venen [3], die aber bei 30-40 % der Patienten nicht zur Verfügung stehen [4]. In diesem Fall sind Kunstprothesen, zum Beispiel aus Polyethylenglykolterephthalat (PET) oder gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE), eine Alternative [5, 6].

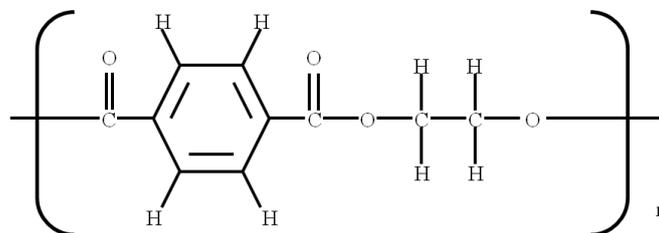


Abbildung 1: Strukturformel PET

PET ist ein Polyester, welches als Dacron® im Handel erhältlich ist (Abb.1). Es wurde erstmals 1957 von DeBakey als Gefäßersatz verwendet [7]. Gewebe aus PET werden in gewebter („waved“) oder gestrickter („knitted“) Form zum Gefäßersatz mittlerer und größerer Gefäße (z.B. Aorta und Iliakalgefäße) und als Bypass zur Umgehung von Engstellen der unteren Extremität verwendet [8].

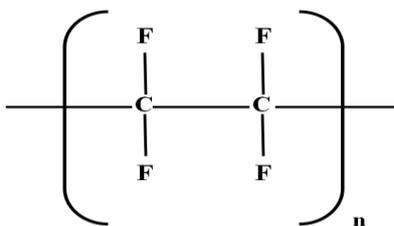


Abbildung 2: Strukturformel ePTFE

Künstliches, weiches Gewebe aus ePTFE $((\text{C}_2\text{F}_4)_n$, Abb.2) das auch als Gore-Tex® im Handel erhältlich ist, wird seit 1975 als Gefäßersatz verwendet [6]. Gerecktes PTFE-Gewebe ist aus Knoten und Fibrillen aufgebaut. Diese Grundstruktur des ePTFE und die daraus resultierende Oberflächenporosität sind bei Gefäßprothesen wichtig, um den Heilungsprozess und die Integration der Prothese in körpereigenes Gewebe zu gewährleisten. Bei porösen Oberflächen kann das Blut jedoch durch eine Leckage in der Prothesenwand in das umliegende Gewebe gelangen und, zum Beispiel durch Hämatom- und Thrombenbildung, zu einem Verschluss der Gefäßprothese führen. Als guter Kompromiss zwischen Leckage und Zellanlagerung, beziehungsweise Gewebsintegration, hat sich beim ePTFE eine Fibrillenlänge von 22 μm und eine Porengröße von 30 μm gezeigt [9, 10].

Gerecktes Polytetrafluorethylen wird, analog zum PET, zum Ersatz mittlerer und großer Gefäße mit hohen Flussraten, für Bypässe der unteren Extremität, aber auch zur Rekonstruktion von Bindegewebsdefekten verwendet. Es gab verschiedene Studien, die sowohl für das PET und als auch für das ePTFE eine Überlegenheit in der Offenheitsrate von Gefäßersatzten oder peripheren Bypässen gegenüber dem jeweils anderen Material zeigten. Aktuellere Metaanalysen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Offenheitsrate zwischen peripheren Bypässen aus PET oder ePTFE [11, 12]. Bei kleinen Gefäßen mit einem Durchmesser unter sechs Millimeter liegt jedoch die Offenheitsrate einer PET- oder ePTFE-Prothese noch deutlich unter der Offenheitsrate eines autologen Gefäßersatzes [3].

1.1.2 Herzklappen

Im menschlichen Herzen befinden sich insgesamt vier Herzklappen. Der rechte Vorhof und die rechte Kammer (Ventrikel) werden durch die Trikuspidalklappe, eine Klappe mit drei Segeln, getrennt, der linke Vorhof und der linke Ventrikel durch die Mitralklappe, eine Klappe mit zwei Segeln. Die Pulmonalklappe mit ihren Taschen trennt das Herz vom Lun-

genkreislauf, die Aortenklappe vom Körperkreislauf. Die Herzklappen garantieren einen gerichteten Blutfluss im Körper.

Mit zunehmendem Alter kommt es im Rahmen immunologischer und atherosklerotischer Prozesse an den Herzklappen zu Lipidablagerungen und Verkalkungen [1]. Immunologische Prozesse sind auch Ursache für die niedrige Haltbarkeit von biologischen Herzklappenprothesen bei Kindern und jungen Erwachsenen [13, 14]. Andere Ursachen von Klappenveränderungen, zum Beispiel Mitralklappenstenosen durch rheumatisches Fieber, werden heutzutage seltener [2]. Je nach betroffener Klappe, Schweregrad und Art der Veränderung kommt es zu Stenosen bzw. Insuffizienzen.

Ist die Aortenklappe betroffen, können bei einer Stenose Müdigkeit, eingeschränkte Belastbarkeit, Schwindel, Luftnot (Dyspnoe), kurze Bewusstlosigkeit (Synkope), supraventrikuläre und ventrikuläre Herzrhythmusstörung sowie Brustschmerzen (Angina pectoris) auftreten. Bei Insuffizienz kann es zu Leistungsminderung, Herzklopfen (Palpitationen), Flüssigkeitsansammlungen in den Lungen (Lungenödem) und Dyspnoe kommen. Synkopen, Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen und plötzlicher Herztod sind bei Aortenklappenstenosen häufiger beschrieben [15].

Ist die Mitralklappe betroffen, können bei einer Stenose Herzrhythmusstörungen, Dyspnoe, ein Rückstau des Blutes in die Venen, bläuliche Verfärbungen der Haut (Zyanose) durch Hypoxie, Leistungsminderung und Lungenödem auftreten. Beim Auftreten von Vorhofflimmern können sich Blutgerinnsel (Thromben) im Herz bilden, welche dann ins Gehirn gelangen können (Embolie) und dort gegebenenfalls einen Schlaganfall auslösen. Bei einer Mitralklappeninsuffizienz können Herzklopfen, Dyspnoe und Lungenödem auftreten [15].

Herzklappen mit fortgeschrittener Schädigung, die nicht operativ rekonstruiert werden können, werden durch mechanische oder biologische Herzklappenprothesen ersetzt. Weltweit werden pro Jahr ungefähr 250.000 Herzklappenprothesen eingesetzt. Etwa 70 Prozent dieser Herzklappenprothesen werden hierbei durch biologische Herzklappenprothesen (z.B. vom Schwein oder Rind) ersetzt. Während mechanische Herzklappen prinzipiell lebenslang halten, ist die Haltbarkeit biologischer Klappen auf durchschnittlich zehn bis zwölf Jahre beschränkt, wonach sie erneut operativ ersetzt werden müssen [16]. Mechanische Herzklappen führen jedoch im Gegensatz zu biologischen Herzklappenprothesen zu einer erhöhten Gerinnungsaktivierung mit Bildung von Blutgerinnseln (hohe Thrombogenität) und benötigen daher eine lebenslange medikamentöse, blutverdünnende Therapie (Antikoagulation).

Im Rahmen der therapeutischen Antikoagulation bei mechanischen Herzklappenprothesen traten jedoch schwere Blutungskomplikationen in 2,6 Prozent pro Jahr und Thromboembolien in 2,1 Prozent pro Jahr im ambulanten Monitoring auf [17]. Die kumulierte Zehnjahresmortalität unter therapeutischer oraler Antikoagulation mit Cumarinen nach Herzklappenersatz im ambulanten Monitoring war im Jahr 2006 mit 10,1 Prozent bei 45-jährigen und bis zu 55,9 Prozent bei 85-jährigen gegenüber der Normalbevölkerung erhöht [17].

1.2 Stand der Wissenschaft

Seit mehreren Jahren wird eine Verbesserung künstlicher Gefäßprothesen, vor allem bei kleinkalibrigen Gefäßen mit einem Durchmesser unter sechs Millimetern, angestrebt. Das Hauptziel bei den künstlichen Gefäßprothesen ist die Verbesserung der Offenheitsrate. Die Offenheitsraten von PET und ePTFE in peripheren Bypassen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander [12]. Die Fünfjahresoffenheitsrate von Bypassen zwischen Oberschenkel und Knie (femoropopliteal) lag für Gefäßprothesen aus PET bei 49,3% und für Gefäßprothesen aus ePTFE bei 38,4% [11]. Da in dieser Arbeit ePTFE verwendet wurde, beschränken sich die weiteren Abschnitte auf dieses Material.

Die Verbesserung biologischer Herzklappenprothesen ist ebenfalls Bestandteil der derzeitigen Forschung mit dem Hauptziel die Haltbarkeit zu verbessern ohne eine erhöhte Gerinnungsaktivierung zu bedingen.

1.2.1 Gefäßprothesen aus gerecktem Polytetrafluorethylen

Künstliche Gefäßprothesen aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) haben im Vergleich zu autologen Venenersätzen beim arteriellen Gefäßersatz der unteren Extremitäten niedrige Offenheitsraten [18]. So lag die Fünfjahresoffenheitsrate von ePTFE in femoropoplitealen Bypassen mit 49 Prozent signifikant unter der Fünfjahresoffenheitsrate autologer Venenbypassen mit 69 Prozent [19]. Nach vier Jahren betrug die Offenheitsrate eines Bypasses aus ePTFE unterhalb des Knies (infragenikulär) 54 Prozent [20], beim Ersatz von Mikrogefäßen (unter einem Millimeter) 20-25 Prozent [8].

1.2.1.1 Beeinflussung der Offenheitsrate durch Thrombose und intimale Hyperplasie

Eine Ursache für Stenosierungen und Thrombenbildungen mit resultierender niedriger Offenheitsrate bei Gefäßprothesen aus ePTFE ist der Kontakt mit Blut. Dieser Blutkontakt führt zur Adsorption von Proteinen aus dem Blut auf der ePTFE-Oberfläche. An die absor-

bierten Proteine lagern sich wiederum Blutplättchen an, die dann aktiviert werden [5]. Zusätzlich infiltrieren neutrophile Granulozyten und Monozyten das ePTFE, die eine Proliferation von glatten Muskelzellen, Extrazellulärmatrix und Endothelzellen bewirken. Dieser Prozess wird als intimale Hyperplasie bezeichnet [5, 6]. Die intimale Hyperplasie findet vor allem im Bereich der Übergänge zwischen nativen Gefäß und Gefäßprothese, der Anastomose, statt, wo es aufgrund der verschiedenen Materialsteifigkeiten (Compliance) von nativen Gefäß und Prothese sowie niedrigen Blutflussgeschwindigkeiten zu turbulenten Blutflüssen kommt [18, 21]. Die turbulenten Strömungen und die konsekutive intimale Hyperplasie [22] begünstigen Stenosen und Thrombosen in dem Bereich der Anastomosen, welche wiederum bis zum Verschluss des Gefäßes führen können. Die Offenheitsrate der Gefäßprothesen aus ePTFE ist daher durch intimale Hyperplasie und Thrombose vermindert [18, 23-25]. Aus diesem Grund wird versucht durch chemische, biologische und physikalische Modifikationen die intimale Hyperplasie sowie die Thrombogenität eines Gefäßersatzes aus ePTFE zu verringern und so die Offenheitsrate zu verlängern.

1.2.1.2 Reduktion der Thrombogenität und intimalen Hyperplasie durch Prothesenbeschichtungen

Um die Thrombogenität zu senken und den Prozess der intimalen Hyperplasie zu inhibieren, wurden verschiedene Beschichtungsmöglichkeiten von ePTFE-Prothesen in Studien analysiert.

Ein Verfahren war die Beschichtung von ePTFE-Gefäßprothesen mit Heparin. Heparin bildet einen Komplex mit Antithrombin. Die gerinnungshemmende Wirkung des Antithrombins, also die Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren und von Thrombin, wird durch diese Komplexbildung beschleunigt [26]. Lin et al. zeigten, dass bei heparinbeschichteten Gefäßprothesen in femorofemorale Bypässen nach 24 Stunden die Thrombozytenadhäsion um 72 Prozent sank. Zudem war die Ausbildung der intimalen Hyperplasie zusätzlich signifikant reduziert. Folglich verbesserte sich auch die Offenheitsrate der Bypässe, welche von 44 Prozent auf 89 Prozent stieg [23]. Die Offenheitsraten kleinlumiger Gefäßersatzes waren nicht heparinisierten Prothesen überlegen [27]. Auch für heparinbeschichtete infragenikuläre Bypässe gab es hinsichtlich der Offenheitsraten gute Langzeitergebnisse [28]. Heparinisierte Bypässe zeigten jedoch weiterhin Nachteile gegenüber autologen Venen [29, 30]. Darüber hinaus ergab sich eine erhöhte Rate an Spätthrombosen bei Verwendung heparinisierter Prothesen [5].

Die Leckage einer porösen Gefäßprothese in das umliegende Gewebe wird durch die gerinnungshemmende Eigenschaft von Heparin verstärkt. Eine Möglichkeit, die Durchlässigkeit poröser Gefäßprothesen zu verringern, ist die Versiegelung der Prothese. Bei dem sogenannten „preclotting“ wird die Prothese mit dem Blut des Patienten versiegelt, welches ohne Antikoagulation zu hohen Verschlussraten führt. Heparin inhibiert durch seine antikoagulatorische Wirkung das „preclotting“. Ein Gleichgewicht zwischen Leckage, Versiegelung und antikoagulatorischen Effekt des Heparins zu finden, ist schwierig [3].

Um die Leckage zu reduzieren, wurden weitere Versiegelungsstrategien entwickelt. Eine Strategie beruht auf Protein-basierten Hydrogelen, die die Gefäßprothese nach innen versiegeln und auf die mittels verschiedener Techniken Medikamente wie zum Beispiel Heparin so binden können, dass sie nicht inaktiviert werden und an der Innenseite der Prothese liegen [3]. Hydrogele binden Wasser, schwellen an und lösen sich langsam auf, sodass ein Medikament, welches über ein Hydrogel gebunden wird, langsam abgegeben wird.

Eine Beschichtung von ePTFE mit Hirudin, einem direkten Thrombinantagonisten [26], allein oder in Kombination mit Iloprost, einem Inhibitor der Thrombozytenaggregation und einem Vasodilatator, senkte in Studien ebenfalls die Thrombogenität und die intimale Hyperplasie von Gefäßprothesen aus ePTFE [3, 18, 31]. Als Versiegelungsschicht wurden hier Albumin oder Polyethylenglycol (PEG) verwendet, an welche dann das Hirudin bzw. zusätzlich das Iloprost gebunden wurde [5, 18, 31]. Ebenso wurde eine verringerte Thrombogenität und intimale Hyperplasie nach Beschichtung mit Thrombomodulin, einem antikoagulatorisch wirkendem Protein, oder durch inkorporierte Stickstoffmonoxidgruppen nachgewiesen. Stickstoffmonoxid wird normalerweise von intaktem Endothel freigesetzt und hemmt die Gerinnung und die intimale Hyperplasie [18, 32]. Ein Vorteil karbonbeschichteter ePTFE-Prothesen konnte in Studien nicht nachgewiesen werden [18, 33].

Weitere Substanzen werden in verschiedenen Studien getestet. Der schützende Effekt einer Prothesenbeschichtung mit Enzymen, Medikamenten oder Proteinen ist jedoch zeitlich limitiert. Zudem wurde eine erhöhte Rate an Spätthrombosen bei medikamentenbeschichteten Prothesen nachgewiesen [18].

1.2.1.3 Verbesserung der Offenheitsrate durch Endothelzellbesiedlung

Eine intakte Endothelschicht hemmt die Thrombozytenadhäsion kontinuierlich durch Sekretion unter anderem von Prostacyclin, Thrombomodulin, heparinähnlichen Glycoaminoglycanen, Stickstoffmonoxid und ADPase. Zusätzlich wird die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Ablagerung von Extrazellulärmatrix inhibiert, welche für die intimale Hyperplasie verantwortlich sind [5, 32]. Ziel ist es daher, die künstlichen ePTFE-Prothesen mit Endothelzellen zu besiedeln und so die Offenheitsrate zu verbessern.

Eine Kombination aus künstlichem Material und lebenden Zellen wird „Bioartifizielles Organ“ („Artificial Organ“) genannt [34]. Die Verbesserung der Offenheitsrate von künstlichen Prothesen aus ePTFE mit Endothelzellbesiedlung wurde bereits mit mehreren Studien belegt [5, 6, 21, 22]. Bordenave et al. beschrieben eine Verbesserung der Offenheitsrate endothelialisierter femoropoplitealer Bypässe nach drei Jahren von 55,4 Prozent auf 84,7 Prozent [34]. Kannan et al. zeigten eine Offenheitsrate von 76 Prozent nach fünf Jahren bei einem infrapoplitealen Gefäßersatz [8].

Die Besiedlung der Kunststoffprothesen mit Endothelzellen kann vor (in vitro) und nach (in vivo) Implantation erreicht werden. Bei der in-vitro-Besiedlung muss die Prothese aufwändig vorbesiedelt werden und ist daher schlecht verfügbar [34]. Beim Einbringen der vorbesiedelten Prothese in den Blutfluss muss zudem mit einem Zellverlust gerechnet werden [35]. Zur in-vivo-Besiedlung der ePTFE-Gefäßprothesen wird das Prinzip der gesteuerten Gewebezüchtung („guided tissue engineering“) verwendet, bei dem die Besiedlung der luminalen Prothesenseite nur mit körpereigenen Vorläuferzellen (z.B. Progenitorzellen) des Endothels, nicht aber z.B. mit Leukozyten oder Thrombozyten, begünstigt wird. Die Progenitorzellen können sich dann in ein intaktes Endothel umwandeln.

Sipehia et al. ermöglichten die Ausbildung einer dünnen Endothelschicht durch ein neuartiges Verfahren, welches Amino- und Amidgruppen sowie Stickstoff- und Sauerstoffgruppen mittels einer Plasma Reaktortechnologie in das ePTFE inkorporierte [4]. Cikirikcioglu et al. beschichteten ePTFE durch magnetische Zerstäubung mit Titan. Nach einem Monat gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Offenheitsrate zwischen einem titanbeschichteten und einem nicht beschichteten Karotidenersatz. Es zeigte sich jedoch ein nicht signifikanter Trend zu einer Verbesserung der Endothelzellbesiedlung [36].

1.2.1.4 Erhöhte Endotheladhäsion durch Verwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung

Mit der konventionellen chemischen Gasphasenabscheidung (CVD) können polymere Filme auf flexible Oberflächen aufgebracht werden [37]. Das Substrat wird hierbei makroskopisch nicht verändert, da es keine Tiefenpenetration gibt, aber die molekulare Oberflächenstruktur kann durch Einfügen von chemischen Gruppen und Ablation von Seitenketten umgewandelt werden [38]. Dazu wird ein instabiles, reaktives, thermisches Gas mit einem inerten Trägergas in einen Reaktor geleitet, wo es auf einem festen Substrat eine dünne Beschichtung bildet. Da die CVD-Prozesse meist endotherm ablaufen, werden hohe Aktivierungsenergien benötigt. Bei der konventionellen, thermischen CVD werden hohe Temperaturen über 1000 °C verwendet [37, 39, 40]. Bei diesen Temperaturen werden jedoch organische Stoffe degradiert und Proteine denaturiert [37]. Durch Hinzunahme der Vakuumverdampfung können die Gasteilchen über bis zu 30cm ohne Kollision das Substrat erreichen. Die Beschichtung ist zwar noch von der thermischen Energie abhängig, aber durch die Reduktion der Kollision wird das Substrat weniger beschädigt [37].

Zur Reduktion der benötigten thermischen Energie führt die Verwendung eines hochfrequenten Elektromagnetischen Feldes bei der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD, Gesellschaft für Elektrometallurgie GmbH, Patentnummer: EP0997997A1). Durch das hochfrequente elektromagnetische Feld entsteht mittels Anregung eines Reaktionsgemisches Plasma, fast komplett ionisierte Materie [40]. Die verwendeten Temperaturen können so auf etwa 250 °C reduziert werden. Durch die erstmalige Erzeugung nonthermaler Plasmen, welche hohe Elektronen-, aber niedrige Neutronen- und Positronentemperaturen besitzen, konnte die Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PACVD) bei 30-35 °C durchgeführt werden [41].

Bei der PACVD wird ein Ausgangsstoff (Substrat, z.B. ePTFE) mit einem anderen Material dünn (ca. 30-50 nm) beschichtet. Als Vorläufersubstanz wird für diese Arbeit Tetrakis(dimethylamido)titan in die Gasphase gebracht und mittels Transportgas in den Reaktor transportiert. Im Reaktor wird durch das hochfrequente elektromagnetische Feld die Vorläufersubstanz im Vakuum dissoziiert und auf dem Substrat abgeschieden (Abb.3) [40, 41]. Titan wird mittels Elektronenpaarbindung an die Kohlenstoffatome des ePTFE gebunden und so auf der Oberfläche fixiert [41-43].

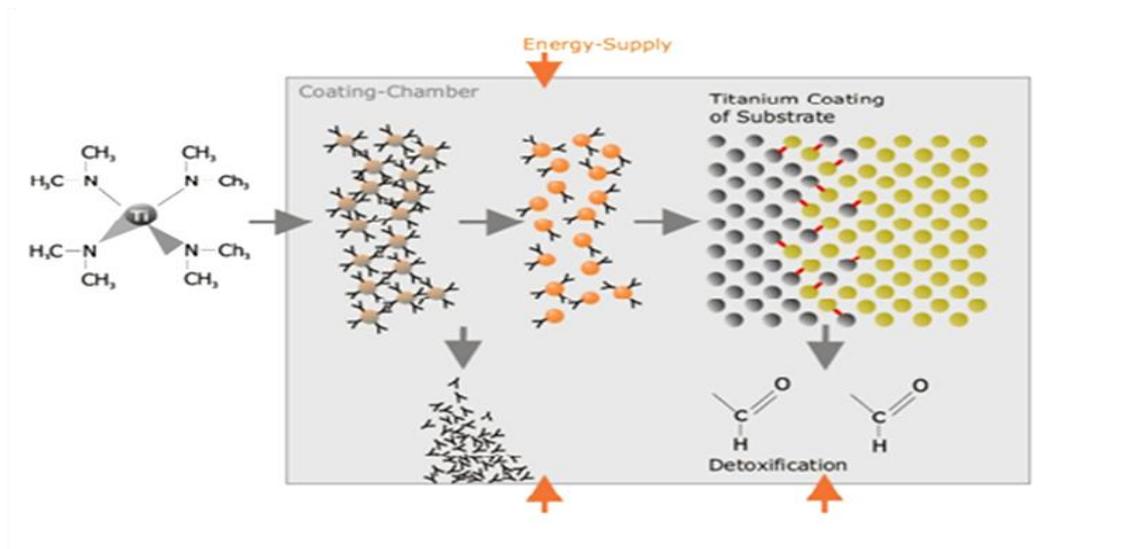


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD). Titanisierte organische Moleküle werden bei 32-35 °C durch ein hochfrequentes elektromagnetisches Feld dissoziiert und an das Substrat (hier ePTFE oder die Kollagenoberfläche des Rinderperikards) gebunden [41].

Pareta et al. konnten für ePTFE zeigen, dass es nach nanotechnologischer Beschichtung mit Titan (Titanisierung) mittels Anwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD) zu einer erhöhten Endothelzelladhäsion auf dem ePTFE kommt [44]. Durch die mögliche Ausbildung einer intakten Endothelschicht auf den Gefäßprothesen aus ePTFE könnte so die Thrombozytenadhäsion und die intimale Hyperplasie gehemmt werden.

1.2.1.5 Fibrinkleber zur Versiegelung und Blutstillung

Fibrinkleber ist ein biologischer Zweikomponentenkleber, der zum einen aus einer Humanplasmaproteinfraktion mit Fibrinogen, Blutgerinnungsfaktor XIII, Plasmafibrinectin sowie Aprotinin und zum anderen aus Thrombin sowie Kalziumchlorid besteht. Wenn diese zwei Komponenten sich verbinden, wird das Gemisch binnen weniger Sekunden fest [45]. Der Fibrinkleber bildet einen weißen, nicht transparenten „Klumpen“ („clot“), der relativ dick ist [45].

Fibrinkleber wird zur Gewebeklebung, Blutstillung und zur unterstützenden Wundheilung genutzt. Er wird zusätzlich, unter dem Aspekt der Gewebeklebung, zur Abdichtung oder Fixierung von Implantaten (z.B. ePTFE-Gefäßersatz) verwendet [46, 47]. Zilla et al. verwendeten Fibrinkleber, um eine verbesserte Endotheladhäsion auf ePTFE zu erreichen

[48]. Wird Fibrinkleber auf Gefäßprothesen aufgebracht, die in Bereichen mit hohen Blutflussraten eingebracht werden, wird zwar ein komplikationsloser Verlauf postuliert [49], jedoch zeigte sich bei Operationen, in denen Fibrinkleber verwendet wurde eine erhöhte 30-Tagesmortalität [45, 46]. Vermutet wird, dass Fibrinkleber durch die Gefäßprothese, das Gefäß sowie das umliegende Gewebe diffundiert und bei Kontakt mit Blut über die Thrombozytenaktivierung und -aggregation eine akute oder subakute Thrombose oder thrombembolische Ereignisse auslösen kann [45, 46, 49, 50]. So zeigte sich zum Beispiel bei Lappenplastiken eine Verkürzung der Überlebenszeit durch Mikrothromben, wenn Fibrinkleber verwendet wurde [49]. Die genannten Studien lassen auf ein prokoagulatorisches Potential des Fibrinklebers schließen, die direkte Thrombogenität des Klebers wurde jedoch bis jetzt in keiner Studie getestet.

1.2.2 Biologische Herzklappenprothesen aus Rinderperikard

Analog zu den Gefäßprothesen wirkt bei den biologischen Herzklappenprothesen die Ausbildung einer regenerationsfähigen Endothelschicht protektiv. Sie schützt vor artherosklerotischen und thrombotischen Veränderungen und kann daher die Haltbarkeit der Prothesen verlängern [51, 52].

Für diese Arbeit wurde Rinderperikard, welches aus kollagenen und elastischen Fasern besteht [53] und als Ausgangsmaterial zum Tissue Engineering von biologischen Herzklappenprothesen dient, verwendet.

1.2.2.1 Dezellularisierung mit Trypsin und EDTA

Ein Ansatzpunkt, der zur Verbesserung der Haltbarkeit von biologischen Herzklappenprothesen überprüft wird, ist die Zerlegung von Oberflächenproteinen und die Entfernung von Zellen auf der kollagenen Rinderperikardoberfläche (Dezellularisierung), die eine immunologische Abwehrreaktion im menschlichen Körper hervorrufen können [54]. Zudem werden dezellularisierte Bioprothesen im Vergleich zu nicht dezellularisierten schneller mit Endothelzellen besiedelt [55].

Die Dezellularisierung von biologischen Herzklappenprothesen wird durch Inkubation der Prothese mit trypsinhaltiger EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure) erreicht. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, das über eine Vorstufe aus der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Es spaltet Peptidbindungen und zerlegt so die immunogenen Oberflächenproteine des Rinderperikards. Nach der Dezellularisierung wird das Rinderperikard fixiert.

EDTA ist ein Chelator und kann unter anderem mit Kalzium Komplexe bilden. EDTA hilft dabei, Zellen aus einem Gewebematerial (*hier*: Rinderperikard) zu lösen (Azellularisierung). Der genaue Mechanismus ist dabei unbekannt. Eine zu lange Inkubation mit Trypsin-EDTA sollte jedoch vermieden werden, da sich sonst Kollagen und Elastin herauslösen und das Gewebe dadurch an mechanischer Festigkeit verliert [54, 55]. Der Einfluss dieser Methode auf die Thrombogenität wurde bislang nicht analysiert.

1.2.2.2 Fixierung des Rinderperikard mit Glutaraldehyd

Derzeit werden biologische Herzklappenprothesen mit Glutaraldehyd fixiert. Die Fixierung erfolgt hierbei durch Quervernetzung („Cross-linking“) über Bildung einer Schiff'schen Base. Die Anzahl an Quervernetzungen ist hierbei proportional zur Konzentration des verwendeten Glutaraldehyds [56-59]. Nach Implantation wird Glutaraldehyd kontinuierlich aus der Herzklappenprothese freigesetzt [60] und kann bis zu sechs Monate im Gewebe nachgewiesen werden [57]. Die Fixierung mit Glutaraldehyd bewirkt zwar einerseits einen Schutz der Bioprothese vor enzymatischen, chemischen und physikalischen Veränderungen sowie eine Verminderung der Thrombozytenaggregation [57-59, 61], andererseits hat Glutaraldehyd aber auch zytotoxische Eigenschaften. Die Zytotoxizität von Glutaraldehyd wird hauptsächlich auf die freien Aldehydgruppen, die auf der Oberfläche der Bioprothese bei der Fixierung entstehen, zurückgeführt [57, 62].

Damit es zur Ausbildung einer schützenden Endothelschicht kommen kann, müssen daher diese freien Aldehydgruppen reduziert werden. Guldner et al. gelang es mittels chemischer, enzymatischer und nanotechnologischer Verfahren erfolgreich die Zytotoxizität von bovinen Herzklappenprothesen zu senken und in vivo mit Endothelzellen zu besiedeln [41]. Die Thrombogenität des glutaraldehydfixierten Rinderperikards könnte durch diese Verfahren zur Reduktion der Zytotoxizität (Detoxifizierung) beeinflusst werden. Sollte die Thrombogenität steigen, wäre das Risiko für thrombotische Ereignisse nach Prothesenimplantation erhöht. Es ist deshalb Gegenstand dieser Arbeit, den Einfluss der detoxifizierenden Maßnahmen auf die Thrombogenität zu analysieren, weshalb diese im Folgenden kurz erläutert werden.

1.2.2.3 Detoxifizierung durch Aldehyd-Dehydrogenase

Eine Methode zur Verminderung freier Aldehydgruppen an der Oberfläche der biologischen Herzklappenprothese ist die enzymatische Behandlung der biologischen Prothese mit Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) nach der Glutaraldehyd-Fixierung [41].

Die ALDH katalysiert hauptsächlich die Reaktion von Acetaldehyd, Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) und Wasser (H₂O) zu Essigsäure, NADH und Wasserstoff [63]:



Das Enzym ALDH kann nicht nur die Reaktion von Acetaldehyd zu Essigsäure beschleunigen. Es kann auch andere Aldehydgruppen, wie die toxischen freien Aldehydgruppen auf der Oberfläche der Bioprothesen, abbauen, jedoch mit einer langsameren Geschwindigkeit [63-65].

1.2.2.4 Detoxifizierung und Reduktion der Verkalkung durch Zitronensäure

Eine weitere erfolgreiche Methode zur Reduktion der freien Aldehydgruppen, und so der Zytotoxizität, ist die Inkubation der Bioprothese mit Zitronensäure (Abb.4) nach der Fixierung mit Glutaraldehyd [41].

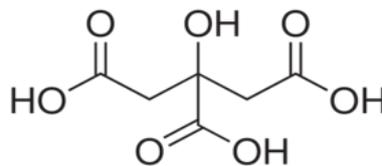


Abbildung 4: Strukturformel Zitronensäure

Zitronensäure (2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure) kann zudem mit Kalzium Komplexe bilden [66]. Die Formation von Kalzium-Phosphat-Komplexen, die proportional zu den durch Glutaraldehyd gebildeten Cross-links entsteht [67] und durch Größenprogredienz Verkalkungen bildet [68], wird so ebenfalls durch Zitronensäure gehemmt [41, 69, 70]. Verkalkte Herzklappenprothesen können zum Einen stenosieren und zum Anderen im Blutkreislauf, aufgrund der dort herrschenden hohen Scherkräfte, reißen [70, 71], wodurch ein erneuter Klappenersatz notwendig werden kann.

1.2.2.5 Detoxifizierung durch Titanisierung mittels Plasma-aktivierter Gasphasenabscheidung

Eine verbesserte Detoxifizierung glutaraldehydfixierter Rinderperikardproben gelingt mit einer Kombination aus der Postfixationsbehandlung mit zehnpromzentiger Zitronensäure, ALDH und der Beschichtung mit Titan durch die Plasma-aktivierte chemische Gasphasen-

abscheidung (PACVD, Abs.1.2.1.4) [41]. Auf dem so behandelten Material konnte in vivo eine Endothelbesiedlung nachgewiesen werden [41].

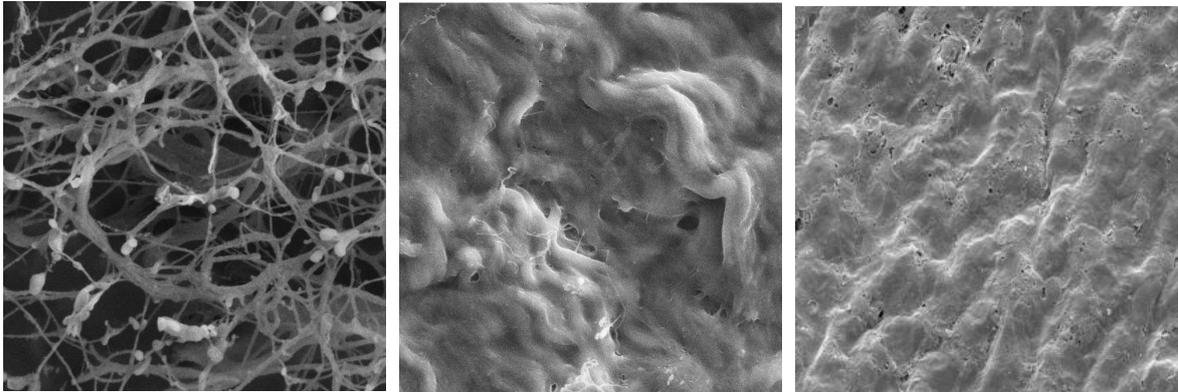


Abbildung 5: Titanisiertes und Endothelbeschichtetes Rinderperikard. REM von Glutaraldehyd-fixiertem dehydriertem Perikard mit einer Vergrößerung von 5000X (links), und mit kompletter Titanoberflächenbeschichtung (Mitte), und mit kompletter Endothelbeschichtung (rechts) [13].

Nach Implantation titanisierter Herzklappen in eine Ziege kam es nach sechs Monaten zu einer vollständigen Zellbesiedlung der Herzklappen (Abb.5). Einen makroskopischen Anhalt für Thromben gab es zudem nicht [72].

1.3 Hämostase und Fibrinolyse

Die Blutverträglichkeit (Hämokompatibilität) von Gefäßprothesen und Herzklappen wird hauptsächlich durch die Blutgerinnung beeinflusst. Es ist daher wichtig zu verstehen, wie und wo die Blutgerinnung abläuft.

Die physiologische Gerinnung befindet sich im gesunden Körper im Gleichgewicht zwischen den gerinnungsfördernden (prokoagulatorischen) und gerinnungshemmenden (antikoagulatorischen) Faktoren. Das prokoagulatorische System wird als Hämostase, das antikoagulatorische als Fibrinolyse bezeichnet. Die Hämostase beinhaltet alle Mechanismen, die zur Blutstillung führen. Die Mechanismen sind komplex, laufen z.T. parallel ab und werden durch vielfältige Faktoren beeinflusst. Klassisch wird eine primäre (thrombozytäre) und eine sekundäre Hämostase unterschieden [73-75]. Die Fibrinolyse schützt vor übermäßiger Thrombenbildung, baut Fibringerinnsel nach Blutstillung ab und ist durch Rekanalisation des Gerinnsels an der Wundheilung beteiligt.

1.3.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase umfasst die thrombozytäre Adhäsion, die Sekretion der thrombozytären Granula und die anschließende Thrombozytenaggregation. Unter Thrombozytenadhäsion wird das Anhaften von Blutplättchen (Thrombozyten) an die Gefäßwand verstanden. Unter physiologischen Bedingungen adhären Thrombozyten nicht an eine intakte Gefäßwand. Werden jedoch Plättchen-aktivierende Substanzen freigesetzt, kollagene Oberflächen oder subendotheliale Strukturen durch Gefäßverletzung freigelegt, können sich die Thrombozyten an Kollagen oder mit Hilfe ihres GPIb/IX-Komplexes an den von Willebrand-Faktor des subendothelialen Gewebes binden. Auch Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen können über Integrinrezeptoren an Thrombozyten binden.

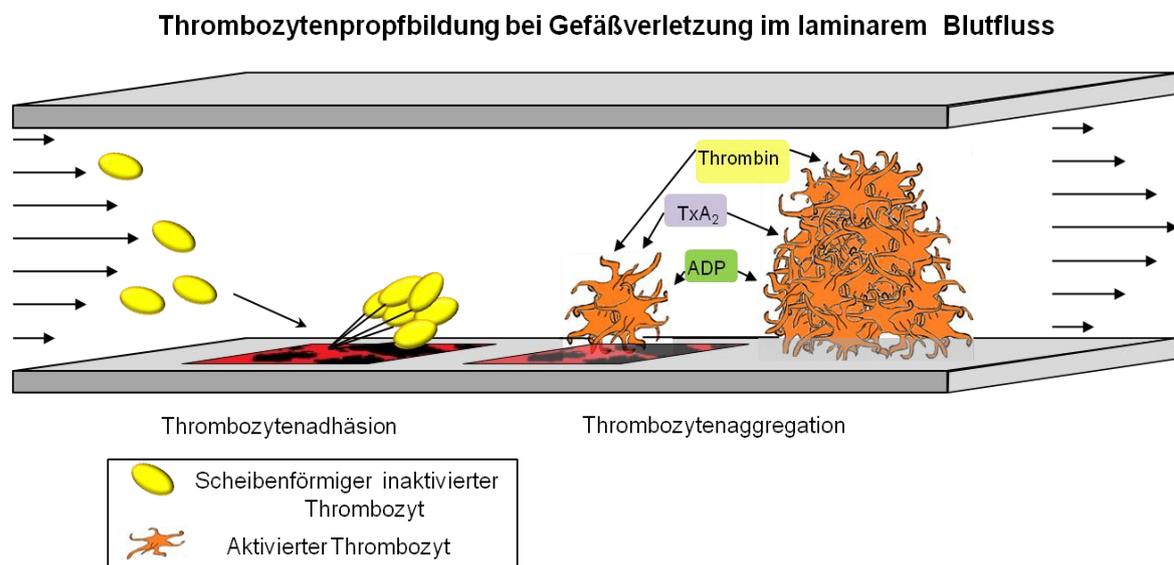


Abbildung 6: Thrombozytenadhäsion und –aggregation: Bei Gefäßverletzung heften sich die diskoidalen Thrombozyten an die Gefäßwand, werden aktiviert und bilden Pseudopodien aus. Sie sezernieren ihre Speichergranula und bilden mit Fibrinogen einen Thrombozytenpropf. Modifiziert nach Jackson et al. [76]. (TxA₂= Thromboxan, ADP= Adenosindiphosphat)

Durch Thrombozytenadhäsion werden die Thrombozyten aktiviert (Abb.6). Sie können aber auch durch einen turbulenten Blutfluss zum Beispiel an stenotischen Gefäßen aktiviert werden. Ihre Speichergranula (Abb.7) werden dann innerhalb von 10-120 Sekunden sezerniert. Die Inhaltsstoffe der Speichergranula verstärken die Vasokonstriktion sowie die weitere Thrombozytenadhäsion und -aktivierung [73].

Stimuli und Sekretion der thrombozytären Speichergranula

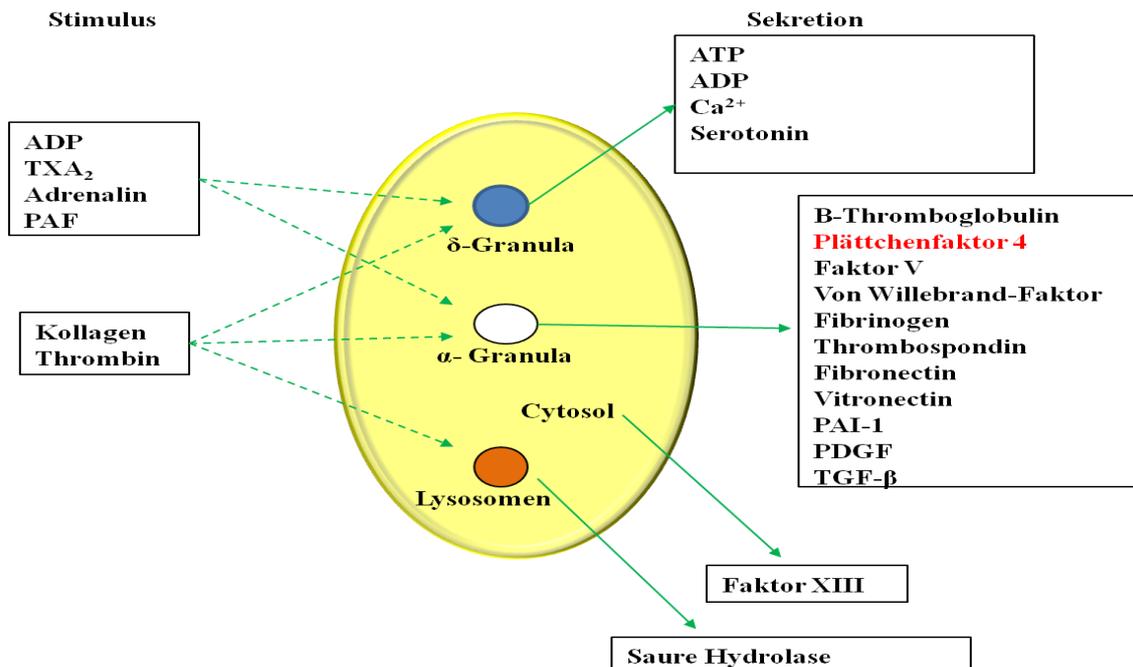


Abbildung 7: Stimuli der Thrombozytenadhäsion und -aggregation mit Inhalten der thrombozytären Speichergranula, modifiziert nach Thomas et al. [75].

Bei der Thrombozytenaggregation lagern sich Thrombozyten untereinander an. Die Formänderung der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien bei ihrer Aktivierung, ist die Grundvoraussetzung für die Thrombozytenaggregation. Es gelangen hierbei die GPIIb/IIIa-Komplexe auf die Oberfläche der Thrombozyten. Diese Komplexe binden Fibrinogen und bilden darüber Brücken mit anderen aktivierten Thrombozyten. Es entsteht ein Thrombozytenpfropf (Abb.6) [73-75, 77].

1.3.2 Sekundäre Hämostase

Bei der sekundären Gerinnung wird Fibrinogen, welches wie oben beschrieben an den Thrombozyten haftet, in unlösliches Fibrin umgewandelt und stabilisiert so den Thrombozytenpfropf. Die sekundäre Hämostase wird parallel zur primären Hämostase aktiviert. Hierfür gibt es zwei Wege: das intrinsische und das extrinsische System, in welchen kaskadenartig verschiedene Faktoren aktiviert werden (Abb.8 u. Tab.1).

Das *intrinsische (endogene) System* wird durch subendotheliale, negativ geladene Strukturen aktiviert. Faktor (F) XII wird nach subendotheliale Kontakt zu FXIIa aktiviert (Index a), welcher dann Präkallikrein (PKK) zu Kallikrein (KK) umgewandelt. Da Kallikrein

wiederum FXII aktiviert, handelt es sich hierbei um eine positive Rückkopplung. Hochmolekulares Kininogen (HK) verstärkt diese Rückkopplung [73-75, 78, 79].

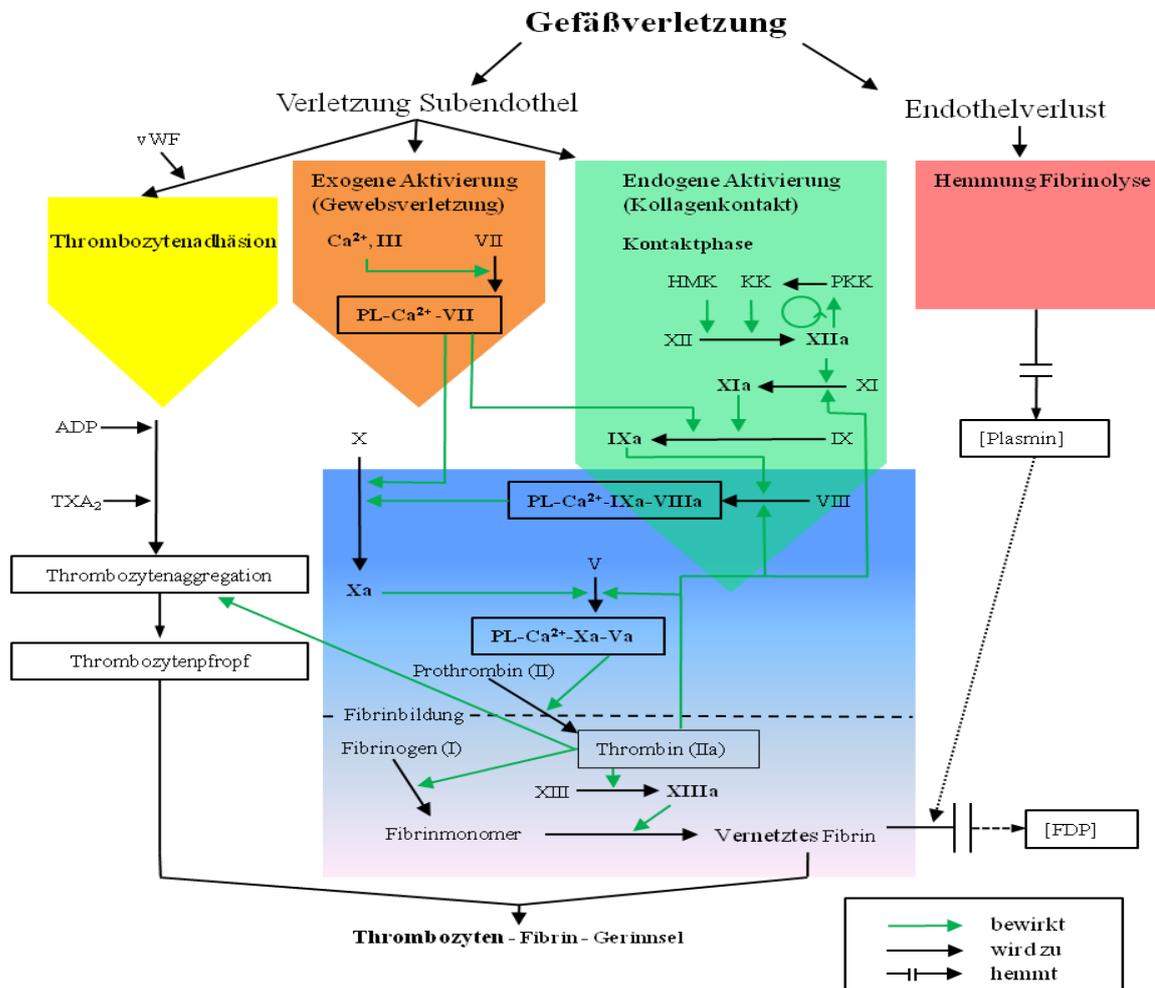


Abbildung 8: Thrombozytenaktivierung und Aktivierung der sekundären intrinsischen und extrinsischen Gerinnungskaskade, modifiziert nach Thomas und Silbernagel et al. [74, 75]. (vWF= von-Willebrandt-Faktor, Ca²⁺= Kalziumionen, PL= Phospholipid, TxA₂= Thromboxan, ADP= Adenosindiphosphat, HMK= hochmolekulares Kininogen, KK= Kallikrein, PKK= Präkallikrein, I-XII= einzelne Gerinnungsfaktoren, Index a= aktivierter Faktor, FDP= fibrinolytische Degradationsprodukte)

FXIIa aktiviert zudem FXI zu FXIa, welcher FIX zu FIXa umwandelt, und der wiederum FVIII zu FVIIIa. Zusammen mit Kalzium (Ca²⁺) und Phospholipiden (PL) bildet FVIIIa einen Komplex, der FX zu FXa aktiviert. Die Aktivierung von FX kann auch durch das extrinsische System bewirkt werden. Bei dem folgendem gemeinsamen Ablauf bewirkt FXa eine Aktivierung des FV. FVa bildet zusammen mit FXa, Phospholipiden und Ca²⁺ den *Prothrombinase*-Komplex, welcher Prothrombin zu Thrombin spaltet.

Thrombin wandelt Fibrinogen zu löslichem Fibrin um. Mit Hilfe der Transamidase, Faktor XIIIa, wird das lösliche Fibrin in unlösliches Fibrin umgewandelt und quervernetzt. Der Thrombus erhält so seine Stabilität (Abb.8) [73-75, 78, 79].

Das *extrinsische System* (exogene) wird durch Kontakt von Gewebethrombokinase (FIII), welche aus verletztem Gewebe freigesetzt wird, aktiviert. FIII aktiviert zusammen mit Ca^{2+} FVII zu FVIIa, der in einem Komplex aus Phospholipiden und Ca^{2+} sowohl die Umwandlung von FIX zu FIXa, als auch von FX zu FXa bewirkt. Dann wird wiederum der sogenannte Prothrombinase-Komplex gebildet. Die weitere Gerinnungskaskade ist wie oben beschrieben mit der intrinsischen identisch (Abb.8) [73-75, 78, 79].

Eine Reihe von Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) inhibieren die plasmatische Hämostase durch Bildung von Komplexen mit Gerinnungsfaktoren. Dazu gehören Antithrombin, Heparin-Kofaktor II, TFPI (tissue factor pathway inhibitor), α_1 -Proteinaseinhibitor, C₁-Esteraseinhibitor und α_2 -Makroglobulin [75]. Die Inhibition verhindert eine überschießende Gerinnungsaktivierung.

1.3.3 Fibrinolyse

Bei der Fibrinolyse steht der Abbau von löslichem und unlöslichem Fibrin durch die Serinprotease Plasmin im Vordergrund. Analog zur Gerinnungskaskade kann die Fibrinolyse in einen intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweg eingeteilt werden (Abb.9).

Der *intrinsische Weg* der Fibrinolyse wird, analog zur intrinsischen Gerinnungsaktivierung, durch FXIIa, Präkallikrein und Hochmolekulares Kininogen aktiviert. Der *exogene Weg* wird durch die Plasminogenaktivatoren Urokinase und tPA (Gewebs-[tissue] plasminogenaktivator) aus dem Endothel oder umliegenden Gewebe ausgelöst.

Die intrinsischen und extrinsischen Plasminogenaktivatoren fördern die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, welches dann Fibrin spaltet. Plasmin wird direkt durch α_2 -Antiplasmin gehemmt (Abb.9) [73-75].

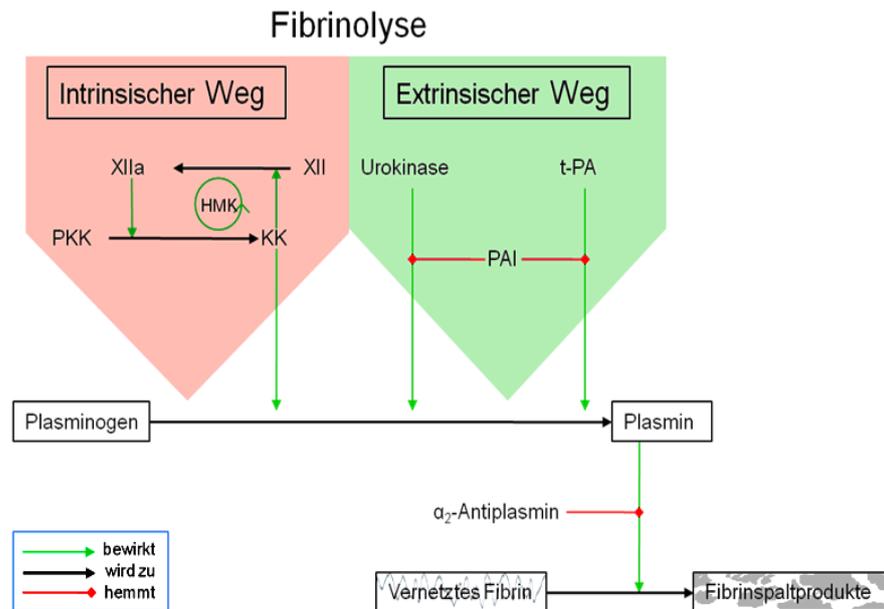


Abbildung 9: Der intrinsische und extrinsische Weg der Fibrinolyse. Analog zur sekundären Hämostase wird bei der intrinsischen Fibrinolyse Kallikrein (KK) aus Präkallikrein (PKK) gebildet. Urokinase und Gewebsplasminogenaktivator (t-PA) bewirken (extrinsische Fibrinolyse), ebenso wie KK, die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, welches dann quervernetztes Fibrin spaltet. Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) und α_2 -Antiplasmin inhibieren diese Prozesse. Modifiziert nach Thomas und Silbernagel et al. [74, 75].

1.4 Messung der Gerinnungsaktivierung

Die folgenden drei Gerinnungsparameter werden in dieser Arbeit zur Messung der Gerinnungsaktivierung durch das Prothesenmaterial verwendet. Sie dienen zum Nachweis von Zuständen mit erhöhter Gerinnungsaktivierung (hyperkoagulatorisch).

1.4.1 Plättchenfaktor 4 als Parameter der primären Hämostase

Plättchenfaktor 4 (PF4) kommt in den α -Granula der Thrombozyten (Abb.7) vor und wird bei Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt. Die PF4-Konzentration gilt daher als Maß für die Thrombozytenaktivierung und somit als indirektes Maß für die Aktivierung der primären Hämostase. Nach der Freisetzung wird PF4, bestehend aus vier Untereinheiten, an Endothelzellen gebunden. Die Halbwertszeit im Blut ist kürzer als fünf Minuten [80]. PF4 bindet mit hoher Affinität an Heparin und an die Heparin-ähnlichen Moleküle („heparin-like molecules“) auf dem Endothel und neutralisiert so dessen antikoagulative Wirkung. Zudem inhibiert PF4 Antithrombin [81]. Die Gerinnung wird hierdurch auf der einen Seite gefördert. Auf der anderen Seite aktiviert PF4 zusätzlich Protein C, welches die sekundäre Gerinnung durch Inaktivierung der Faktoren V und VIII, hemmt [74, 82]. PF4

wirkt außerdem chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten [83].

1.4.2 Thrombin-Antithrombin-Komplexe als Marker der sekundären Hämostase

Antithrombin inhibiert, durch Komplexbildung mit FIXa, FXa und Thrombin die sekundäre Gerinnung. Bindet Antithrombin an Thrombin, so entstehen Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT). Heparin gilt als konzentrationsabhängiger Katalysator dieser Reaktion [75]. Da neuentstandenes Thrombin meist direkt mit Antithrombin bindet, ist die Konzentration an TAT-Komplexen proportional zum entstandenen Thrombin und damit indirekt zur sekundären Gerinnungsaktivierung. Die Messung der TAT-Konzentrationen dient so zur Erkennung hyperkoagulatorischer Zustände wie zum Beispiel bei Thrombosen [84].

1.4.3 Prothrombinfragmente F1+2 als Marker der sekundären Hämostase

Die Prothrombinfragmente eins und zwei (F1+2) entstehen zusammen mit Thrombin aus der Spaltung von Prothrombin durch den Prothrombinase-Komplex. Die Fragmententstehung ist proportional zum entstehenden Thrombin. Während mit der TAT-Komplex-Bestimmung nur hyperkoagulatorische Zustände gemessen werden können, werden mit der Konzentrationsbestimmung der Prothrombinfragmente zusätzlich Zustände mit verminderter Gerinnungsaktivierung (hypokoagulatorisch) quantifiziert. Ursache hypokoagulatorischer Zustände ist unter anderem eine Therapie mit Heparinen oder oralen Antikoagulationen wie Cumarinen [85, 86].

1.5 Fragestellung/ Zielsetzung

Titanisierte Blutkontaktflächen aus ePTFE zur Herstellung von Gefäßprothesen sowie aus Rinderperikard zur Entwicklung biologischer Herzklappenprothesen können aus dem Blutstrom heraus Zellen anlagern, die vermutlich Progenitorzellen aus dem Knochenmark sind und sich in der Folge zu Endothelzellen umwandeln können [41, 72]. Dieser Vorgang dauert mehrere Wochen. Deshalb ist es von Interesse zu wissen, ob titanisierte Blutkontaktflächen in dem Zeitraum bis zur Endothelialisierung thrombogen sind. Thrombenbildung kann bei Kunststoffprothesen (ePTFE) zum Lumenverschluss bzw. bei biologischen Herzklappenprothesen (Kollagenoberfläche) zu thromboembolischen Ereignissen führen.

Die vorliegende Arbeit behandelt daher den Einfluss der Titanisierung von Blutkontaktflächen auf die Thrombogenese unter zwei wesentlichen Fragestellungen:

1. Wie beeinflusst die Titanisierung von Blutkontaktflächen aus ePTFE zur Herstellung von Gefäßprothesen die Gerinnungsaktivierung?
2. Welchen Einfluss hat die Titanisierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard zur Entwicklung von biologischen Herzklappenprothesen auf die Gerinnungsaktivierung?

Um diese Fragestellungen zu untersuchen, werden unter in-vitro-Bedingungen Thrombogenitätsanalysen an ePTFE- und glutaraldehydfixierten, kollagenen Oberflächen mit und ohne Titanisierung bei Kontakt mit frischem, humanem Blut von sechs gesunden Probanden vorgenommen.

2. Material und Methoden

Die folgenden Abschnitte der vorliegenden Arbeit beschreiben das verwendete Material, die jeweilige Probenvorbereitung und die Analysemethoden zur Untersuchung der Thrombogenität von titanisiertem ePTFE zur Entwicklung von Gefäßprothesen bzw. von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard zur Entwicklung biologischer Herzklappenprothesen.

2.1 Material

Es wurden für diese Arbeit nachstehende Laborgeräte, Verbrauchsgegenstände, Chemikalien und Matrices verwendet:

2.1.1 Verwendete Laborgeräte

Dampfsterilisator	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Gefrierkombination	Bosch, München, Deutschland
Inkubator	Thermo Scientific, Heraeus, Hanau, Deutschland
Plattenleser	Dynex MRX TC Revelation Microplate Reader, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland
Microtitierplattenschwenker	Schüttler Titramax 100, Heidolph GmbH, Schwabach, Deutschland
Schwenker	Hassan, Lübeck, Deutschland
Sterilbank	NuAire Inc., Plymouth, USA
Spannkasten	Universität Lübeck, Lübeck, Deutschland
Stanzzylinder	Universität Lübeck, Lübeck, Deutschland
Wasserbad	Julabo Wasserbad SW-20C, Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Biofuge Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland Heraeus Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verwendete Verbrauchsgegenstände

Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Halbmikroküvetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Kryo Aufbewahrungsbox	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, Deutschland
Mechanische Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd, Japan
Vacutainer 21G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Verwendete Testkits, Chemikalien und Reagenzien

ALDH und -Pufferlösung	Enzymatic BioAnalysis; R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland
„Asserachrom® PF4“	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (ehemals Diagnostica Stago), Düsseldorf, Deutschland
„Enzygnost F 1+2 (monoclonal)“	Dade Behring, Eschborn, Deutschland
„Enzygnost TAT micro“	Dade Behring, Eschborn, Deutschland
Fibrinkleber Tissucol S Immuno	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma, Rödermark, Deutschland
PBS-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1M Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Deutschland
Zitronensäure, 10%ig	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

Sofern Chemikalien und Reagenzien nicht einzeln aufgelistet sind, befanden sich diese in den entsprechenden Testkits.

2.1.4 Verwendete Matrices

ePTFE	Gore Tex Soft Tissue Patches, W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ, USA
Rinderperikard	Schlachtereier Thomsen, Kellinghusen, Deutschland NFZ Pronat, Bad Brahmstedt, Deutschland

Die Rinderperikarde wurden direkt am Abholungstag aus dort frisch geschlachteten Rindern gewonnen und vom betriebseigenen Tierarzt auf BSE kontrolliert. Der Transport erfolgte gekühlt und die Weiterverarbeitung geschah am selben Tag.

2.2 Methoden

EPTFE zur Erzeugung von Gefäßprothesen bzw. Rinderperikard als kollagene Matrix zur Herstellung von biologischen Herzklappenprothesen wurden entsprechend der folgenden Abschnitte vorbereitet, mit Blut von gesunden Probanden inkubiert und auf ihre Thrombogenität untersucht. Eine Übersicht über die Probenvorbereitung zeigt die nachfolgende Abbildung (Abb.10):

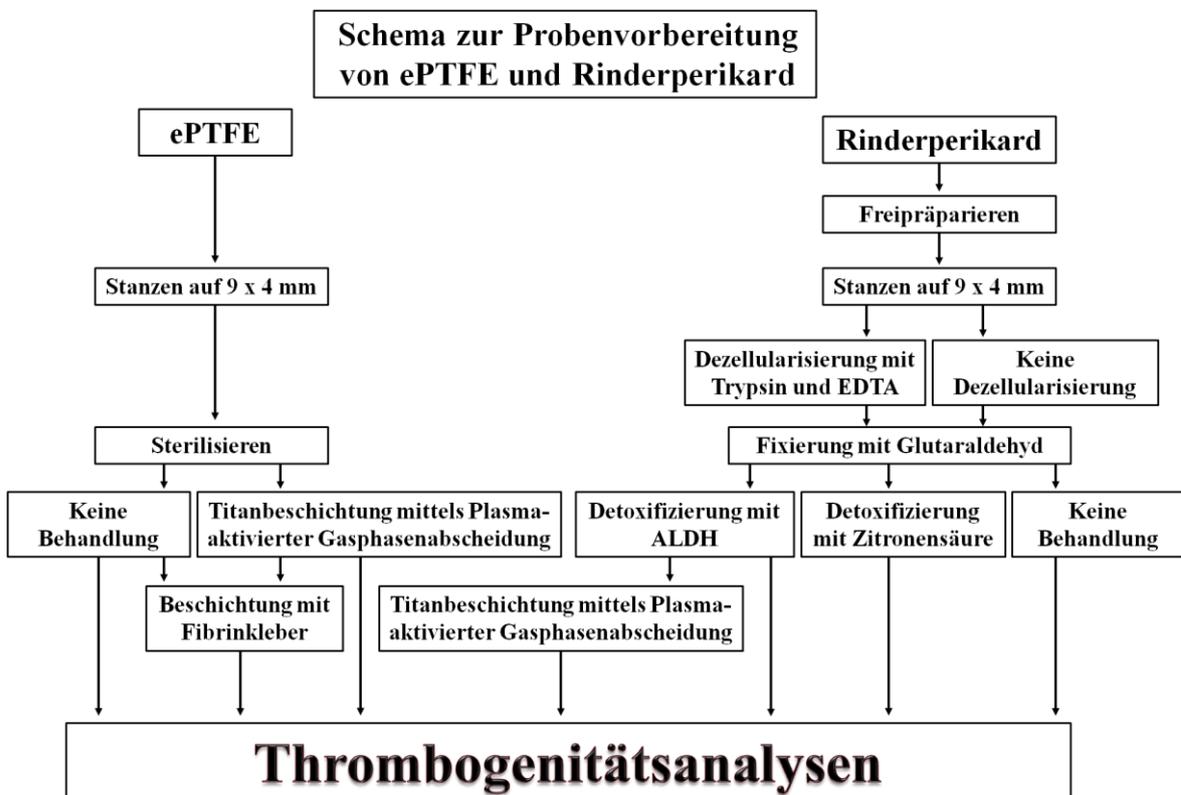


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung von ePTFE und glutaraldehydfixiertem Rinderperikard zur Analyse ihrer Thrombogenität. (ePTFE = gerecktes Polytetrafluorethylen, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, ALDH = Aldehyddehydrogenase)

2.2.1 Präparation und Fixierung des Rinderperikards

Das Rinderperikard wurde von Fett- und anderen Geweben mit einem Skalpell und einer stumpfen Pinzette vorsichtig freipräpariert. Die eine Hälfte wurde direkt, die andere nach dem Entfernen der Oberflächenproteine und dem Herauslösen von Gewebezellen (Dezellulierung, Abs.2.2.3.1), in einen extra hergestellten metallischen Spannkasten aufgespannt. Die optimale Aufspannung war durch in den Boden eingearbeitete Metallspitzen gewährleistet, die in einem Abstand von 4 cm zueinander standen. Nach dem Einspannen erfolgte die vollständige Überschichtung mit einer 0,25 %igen Glutaraldehyd-Lösung zur Fixierung. Das Rinderperikard wurde mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur darin inkubiert.

2.2.2 Stanzen von gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) und Rinderperikard

Sowohl alle ePTFE- als auch die Rinderperikardproben müssen hinsichtlich ihrer Größe, ihrem Gewicht und ihrer Oberfläche vergleichbar sein. Dazu wurden die Materialien mit Hilfe einer Stanze und einem Hammer auf die Größe von 9 x 40 mm gestanzt. Es wurde eine keimarme Stanzunterlage verwendet, um die Gefahr einer Kontamination gering zu halten. Die glutaraldehydfixierten Perikardstücke wurden aufgrund toxischer Dämpfe unter dem Abzug gestanzt. Nach dem Stanzen wurden die Perikardstücke in einer sterilen 0,9 %igen Natriumchloridlösung (NaCl-Lsg.) gewaschen und zur Aufbewahrung in eine neu angesetzte 0,25 %ige Glutaraldehyd-Lösung gegeben (Abb.11). Das ePTFE wurde nach dem Stanzen bei 121 °C im Wasserdampf mit 2 bar sterilisiert (autoklaviert).



Abbildung 11: Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard nach dem Stanzen.

2.2.3 Verschiedene Behandlungsstrategien für ePTFE und Rinderperikard

Um den Einfluss der verschiedenen Behandlungsmethoden auf die Gerinnung zu testen, wurden die ePTFE-Proben und Rinderperikardproben mit und ohne Trypsin- und EDTA-Behandlung jeweils in verschiedene Gruppen aufgeteilt und unterschiedlichen Verfahren zugeteilt. Eine Kombination an Behandlungsstrategien zur Beurteilung der Gerinnungsbeeinträchtigung fand ebenfalls statt.

2.2.3.1 Dezellularisierung des Rinderperikards mit Trypsin und EDTA

Ein Teil der Rinderperikarde wurde für die Studie vor Fixierung dezellularisiert. Zur Dezellularisierung wurde das Rinderperikard nach Präparation und vor Fixierung zweimal 10 Minuten mit 0,02 %iger PBS-EDTA-Lösung gewaschen und 48 Stunden bei 37 °C mit einer Trypsin-haltigen EDTA-Lösung auf einem Schwenker inkubiert. Nach der Inkubation wurde PBS-Puffer zum Waschen der Proben (3-mal à 10 Minuten) verwendet. Danach wurden die Proben in 0,25 %iger Glutaraldehyd-Lösung fixiert (Abs.2.2.1).

2.2.3.2 Behandlung des Rinderperikards mit 10%iger Zitronensäure

Für eine Testreihe wurde dezellularisiertes und nicht dezellularisiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard mit Zitronensäure inkubiert. Dazu wurden die glutaraldehydfixierten Proben dreimal 10 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, um sie weitgehend von der zytotoxischen Glutaraldehyd-Lösung zu reinigen. Danach wurde pro Probe 50 ml einer 10 %igen Zitronensäure unter sterilen Kautelen in ein 50 ml-Röhrchen gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen, das Röhrchen mit 50 ml PBS-Puffer gefüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt bis ein neutraler pH-Wert im Röhrchen vorherrschte.

2.2.3.3 Behandlung des Rinderperikards mit Aldehyd-Dehydrogenase

Für eine weitere Testreihe wurde ein Teil dezellularisierter und nicht dezellularisierter, glutaraldehydfixierter Rinderperikarde enzymatisch mit Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) inkubiert. Für 3,6 ml einer ALDH-Lösung wurde hierbei eine Tablette aus 0,8 mg NAD in 3 ml Kaliumdiphosphat-Puffer (pH9) und eine Flasche gefriergetrocknetes ALDH (4 Units) in 0,6 ml doppelt entionisiertem Wasser gelöst. Dann wurde das gelöste ALDH in die NAD-Lösung pipettiert und die Rinderperikardstücke vorsichtig damit beschichtet. Die Probenstücke inkubierten 24 Stunden bei Raumtemperatur. Diese Inkubationszeit war nötig, um sicherzustellen, dass die Aldehydreste ausreichend gespalten wurden.

2.2.3.4 Titanisierung von ePTFE und Rinderperikards mittels Plasma-aktivierter chemischer Gasphasenabscheidung

Die Titanisierung der ePTFE- sowie der glutaraldehydfixierten Rinderperikardproben wurde von der Pfm Medical Titanium GmbH in Nürnberg durchgeführt. Dort wurden die Oberflächen, mit Hilfe der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD), gleichmäßig im Vakuum bei 30-35 °C mit 30-50 nm Titan beschichtet. Das Titan verbindet sich hierbei fest mit dem Kollagen der biologischen Herzklappenmaterialien oder mit der polymeren Oberfläche der ePTFE-Proben (Abs.1.2.1.4 u. Abs.1.2.2.5). Zusätzlich wurden einige Rinderperikardstücke der PACVD zugeführt, ohne dass sie mit Titan beschichtet wurden.

2.2.3.5 Fibrinkleberbeschichtung von gerecktem Polytetrafluorethylen

Die Stanzstücke aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) wurden mit dem Fibrinkleber „Tissucol Duo S“ der Firma Baxter beschichtet. Bei diesen Versuchen wurde jeweils eine Seite eines ePTFE-Stückes mit drei Tropfen Kleber beschichtet, getrocknet und wie beschrieben im Blut auf die Aktivierung der Gerinnung getestet (Abs.2.2.4).

2.2.4 Thrombogenitätsanalysen

Zur Bestimmung der Thrombogenität der vorbereiteten ePTFE- und Rinderperikardproben wurden diese mit Blut inkubiert und die Konzentrationen an Plättchenfaktor 4 (PF4), an den Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) und an den Prothrombinfragmenten F1+2 (F1+2) gemessen.

2.2.4.1 Blutentnahme und Probenvorbereitung

Um die Verträglichkeit der verschiedenen ePTFE- und Rinderperikardproben in vitro testen zu können, wurde Blut von sechs gesunden Blutspendern verwendet. Die Blutproben stammten von jungen männlichen, nichtrauchenden Probanden ohne chronische Erkrankungen, die keine Medikamente einnahmen und 24 Stunden vor Probenentnahme keinen Alkohol getrunken haben. Die Probanden erhielten eine schriftliche und mündliche Aufklärung und willigten schriftlich ein. Die Ethikkommission stimmte der Studie zu.

Zur Probenvorbereitung wurde venöses Blut mit einem 21G Blutentnahmesystem aus einer Kubitalvene in die entsprechenden Kunststoffentnahmeröhrchen gegeben. Für die TAT- bzw. F1+2-Messungen wurden zittrathaltige Röhrchen (Verhältnis 9:1) verwendet, für die PF4-Messung CTAD-haltige (Natriumzitrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol) Röhr-

chen, da diese die Granulasekretion aus den Thrombozyten hemmen. Die Röhren wurden dann kurz geschwenkt, damit sich der Zusatz mit dem Blut mischen konnte.

Die gefüllten CTAD-haltigen Röhren mussten zur Stabilisation des Plasmas direkt nach Befüllung mit Vollblut 15 Minuten in Eiswasser inkubieren. Das zu testende Material (Rinderperikard oder ePTFE) wurde dann mit Hilfe steriler anatomischer Pinzetten in die entsprechenden Blutentnahmeröhren gegeben (Abb.12). Das erstabgenommene Röhren diente als Leerwert der Messreihe und wurde daher im Gegensatz zu den anderen Kunststoffröhren nicht mit ePTFE oder Rinderperikard versetzt. Der Leerwert ist der Ausgangswert des Probanden und musste bei jeder Testung im Normalbereich liegen. War dies nicht der Fall, wurde die Testung nicht gewertet.

Die gefüllten Blutentnahmeröhren und die Leerproben wurden 30 Minuten bei 37 °C im Inkubator horizontal geschwenkt. In diesen 30 Minuten konnten die ePTFE- und Rinderperikardproben mit dem Blut des Probanden interagieren. Danach wurden die Blutentnahmeröhren in einer Zentrifuge 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute und 8 °C zentrifugiert um plättchenreiches Zitratplasma zu erhalten (Abb.12). Dieses wurde zur TAT- und F1+2-Messung benötigt. Hierfür wurden 500 µl des Plasmaüberstandes in ein bereits beschriftetes Eppendorfgefäß pipettiert und bei -18 °C eingefroren. Für die PF4-Messung wurde plättchenarmes Plasma benötigt. Dafür werden ein Milliliter Überstand aus dem zentrifugierten CTAD- Röhren genommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Anschließend wurde es in der Biofuge für 20 Minuten bei 13000 U/Minute zentrifugiert. Danach wurden 500 µl vorsichtig entnommen und bei -18 °C eingefroren.



Abbildung 12: Gestanztes Rinderperikard im Blut eines Probanden vor (links) und nach (rechts) dem Zentrifugieren.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Thrombin-Antithrombin-Komplexen

Zum immunhistochemischen Nachweis der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) wurde der ELISA-(„Enzyme-linked-immunosorbent Assay“) Testkit „Enzygnost TAT

micro“ der Firma Dade Behring genutzt. Normalerweise wird der Testkit zur Diagnostik von thrombotischen Ereignissen verwendet [87]. Zur Beurteilung einer nicht symptomatischen Aktivierung der Koagulation gilt dieser Test als sensitiv [87].

Die eingefrorenen Proben wurden 30 Minuten bei Zimmertemperatur aufgetaut und 2 Minuten bei 13000 U/Minute in der Biofuge zentrifugiert. Die o.g. Testkitpackung wurde auf Raumtemperatur gebracht, das Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt und die Testplatte vorbereitet. Dann wurden die Plasmastandards 1-4 aus dem Testkit mit einer Konzentration von 2 µg/l, 6 µg/l, 20 µg/l und 60 µg/l TAT und das Kontrollplasma aus dem Testkit mit 1 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst und mindestens 30 Minuten stehen gelassen, damit sich das Trockenkonzentrat vollständig lösen konnte. Danach wurde die Waschlösung, eine 1:20 Verdünnung einer Tween-haltigen (18 g/l) Phosphat-Pufferlösung (90 mmol/l) mit Aqua dest., angesetzt. Mit der Waschlösung konnte anschließend die Waschstation vorbereitet werden. In jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte wurde jeweils 50 µl Probenpuffer pipettiert. Zusätzlich wurden entweder 50 µl Probenpuffer für den Nullwert (Blankwert), 50 µl des jeweiligen Standards zur späteren Erstellung einer Standardkurve, 50 µl der Kontrollprobe, 50 µl unseres Plasmaleerwertes oder 50 µl der Plasmaprobe gegeben. Die Platte wurde dann mit Folie abgedeckt und 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, damit sich vorhandene TAT-Komplexe an die mit Human-Thrombin-Antikörper beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten binden konnten.

Parallel zur Inkubation wurde das Konjugat bestehend aus Anti-Human-Antithrombin, konjugierter Peroxidase und Phenol, als Konservierungsmittel, mit Konjugatpuffer in Lösung gebracht. Hierfür wurden 200 µl Konjugatkonzentrat in eine 11 ml Flasche Konjugatpuffer (50 mM Tris-Pufferlösung, Serumalbumin vom Rind, Phenol als Konservierungsmittel) gegeben und durch Schwenken vermischt. Nach dem Inkubieren wurde die Flüssigkeit in den Vertiefungen der Platte abgesaugt und mit Waschlösung gefüllt. Diese wurde dann erneut abgesaugt und dieser Vorgang mindestens dreimal wiederholt. Danach wurde 100 µl Konjugatlösung in alle Vertiefungen gegeben und erneut abgedeckt 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In dieser Zeit banden die Peroxidase-konjugierten Antikörper an eine freie TAT-Bindungsstelle. Vor Ende der Inkubationszeit mit der Konjugatlösung wurde die Substrat-/Chromogenlösung angesetzt, indem 10 ml Substratpuffer zu einer Flasche Substrat-Chromogen aus dem Testkit gegeben wurde. Diese Lösung musste lichtgeschützt aufbewahrt werden. Nach der Inkubation mit Konjugatlösung wurde die Platte dreimal gewaschen (s.o.) und mit 100 µl Substrat-/Chromogenlösung versetzt. Die so behandelte Platte wurde dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, da-

mit die Substrat-/Chromogenlösung und die Peroxidase reagieren konnten. Es fand eine Farbreaktion statt, die nach Zugabe von 100 µl einer 0,5 N Schwefelsäure gestoppt und mit Hilfe des Dynex-Plattenlesers quantifiziert wurde.

Die Messung der optischen Dichte (Extinktion) mit dem Dynex-Plattenleser erfolgte innerhalb einer Stunde bei 492 nm. Mit Hilfe der Standards und des Blankwertes rechnete das Computerprogramm des Dynex-Plattenlesers die Extinktionen der Proben in Konzentrationen um, deren Einheit µg/dl war. Der Referenzbereich lag zwischen 1,0 µg/l und 4,1 µg/dl.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Prothrombinfragmenten F1+2

Der Nachweis der Prothrombinfragmente 1 und 2 (F1+2) gelang mit Hilfe des ELISA „Enzygnost F 1+2 (monoclonal)“ der Firma Dade Behring.

Die vorbereiteten Plasmaproben wurden, analog zu Absatz 2.2.4.2, aufgetaut. Die Waschlösung, das Kontrollplasma und die Plasmastandards, die jeweils 20 pmol/l; 80 pmol/l; 400 pmol/l und 1200 pmol/l an F1+2 beinhalteten, aus dem Testkit wurden nach Anleitung in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Belegung der Mikrotitrationsplatten mit jeweils 50 µl Puffer (Blankwert), Standard, Kontrolle oder Probe. Dann wurde die Platte mit Folie abgedeckt und 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Vertiefungen abgesaugt mit der vorbereiteten Waschlösung gefüllt und erneut abgesaugt. Dieser Vorgang wiederholte sich dreimal. 100 µl Konjugat wurde in die Vertiefungen gegeben und 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, woran sich ein erneuter Waschvorgang (s.o.) anschloss. Danach wurden 100 µl der Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung hinzugegeben und lichtgeschützt 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die schwefelhaltige Stopp-lösung unterbrach, nach Zugabe von 100 µl in die Vertiefungen, die Farbreaktion und die Mikrotitrationsplatte konnte mit dem Dynex-Plattenleser bei 450 nm ausgewertet werden. Der Referenzbereich lag zwischen 69 pmol/l und 229 pmol/l, der Messbereich des Plattenlesers zwischen 20 pmol/l und 1200 pmol/l.

2.2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Plättchenfaktor 4

Die Konzentration von Plättchenfaktor 4 (PF4) einer Probe wurde mit dem Elisa-Testkit „Asserachrom® PF4“ der Firma Diagnostica mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Diagnostica Stago hatte während der verschiedenen Messungen den Testkit verändert, sodass die ePT-FE-Versuche mit dem alten Testkit und die Rinderperikardversuche mit dem neuen durch-

geführt wurden. Die neuen Veränderungen sind in eckigen Klammern an den entsprechenden Durchführungsschritten gekennzeichnet. Die Probenvorbereitung hatte sich mit Einführung des neuen Testkits nicht verändert.

Für die Durchführung beider Testverfahren wurde eine Standardverdünnungsreihe angelegt, die zur Erstellung einer Standardkurve benötigt wurde. Das doppelt zentrifugierte CTAD-Plasma sowie die aufgelösten Kontrollproben wurden 1:10 [neu: 1:21] mit Puffer vorverdünnt und zusammen mit der Standardreihe und dem Blankwert (nur Puffer) auf die Mikrotitrationsplatte, die mit einem PF4-Antikörper (Anti-human PF4 F(ab')₂) beschichtet waren, aufgebracht. Nach einer sechzigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotitrationsplatte abgesaugt und mit der Waschlösung des Testkits befüllt. Dieser Vorgang wiederholt sich fünfmal. Dann wurden 200 µl eines mit Peroxidase-gekoppelten Kaninchen Anti-human-PF4-Antikörpers hinzugegeben und wiederum 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang, der fünfmal wiederholt wurde. Je Vertiefung kamen 200 µl Substratlösung, bestehend aus O-Phenyldiamin und Peroxid, hinzu, die 3 Minuten [neu: 5 Minuten] bei Raumtemperatur inkubierten. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2-3 M [neu: 1 M] Schwefelsäure gestoppt. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Minuten konnte man die Extinktion mit Hilfe den Dynex-Plattenlesers bei 492 nm [neu: 450 nm] messen. Dieser erstellte dann mit Hilfe der Standardreihe eine Standardkurve, anhand welcher die Proben einer Konzentration zugeordnet werden konnten. Der Referenzbereich lag zwischen 0-10 U/ml.

2.3 Ethik-Kommission

Die durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck am 30.03.2010 begutachtet und genehmigt (Aktenzeichen: 10-042).

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Excel Version 2003. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test für zwei unabhängige Variablen getestet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

3. Ergebnisse

Die folgenden Blutverträglichkeitsuntersuchungen in vitro zeigen, welche Auswirkungen verschiedene Behandlungsweisen von gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) oder glutaraldehydfixiertem Rinderperikard auf die Gerinnungsaktivierung haben, wenn noch kein Endothel vorhanden ist.

Es wurden nur Versuche gewertet, bei denen das jeweilige Kontrollplasma im angegebenen Kontrollbereich lag, der Ausgangswert des Probanden in einem festgelegten Referenzbereich war und die doppelbestimmten Einzelwerte nicht mehr als 15 % voneinander abwichen. Der Referenzbereich gilt im klinischen Gebrauch als festgelegter Normalbereich.

3.1 Titanisiertes gerecktes Polytetrafluorethylen

In dieser Arbeit wurde die Thrombogenität von derzeit verwendetem gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) im Vergleich zu ePTFE analysiert, welches durch die Plasmaaktivierte Gasphasenabscheidung (PACVD) mit Titan beschichtet wurde. Zusätzlich wird die Auswirkung von Fibrinkleber auf die Gerinnungsaktivierung untersucht, wenn er auf der ePTFE-Oberfläche in direkten Kontakt mit Vollblut kommt. Zur Analyse der Thrombogenität wurden die Konzentrationen an Plättchenfaktor 4, an Thrombin-Antithrombin-Komplexen und an den Prothrombinfragmenten F1+2 nach Inkubation mit unbehandeltem ePTFE, titanisierten ePTFE sowie zusätzlich mit Fibrinkleber-beschichtetem ePTFE gemessen.

3.1.1 Plättchenfaktor 4

Je höher der Gehalt an Plättchenfaktor 4 (PF4), desto mehr Thrombozyten wurden aktiviert und deren Vesikel freigesetzt. Die Konzentration von PF4 im Blutplasma nach Inkubation mit unbehandeltem ePTFE (n = 6) war deutlich höher als nach Inkubation mit titanisiertem ePTFE (n=6, Abb.13). Der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung für die unbehandelte ePTFE-Oberfläche liegt mit $35,928 \pm 12,305$ IU/ml signifikant ($p < 0,05$) über denen der titanisierten Proben mit $6,582 \pm 1,774$ IU/ml (Tab.3). Hieraus ergab sich eine Reduktion durch die Titanisierung von 82 %.

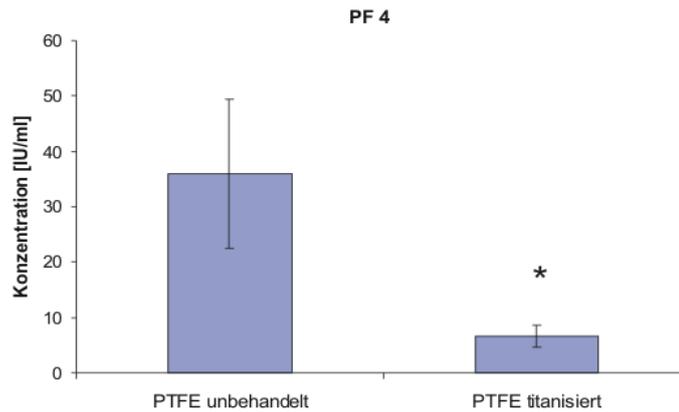


Abbildung 13: Konzentrationsbestimmung von Plättchenfaktor 4 (PF4) nach Inkubation mit unbehandeltem (n = 6) und titanisiertem (n= 6) ePTFE. Vergleich des PF4-Gehaltes anhand der Mittelwertbestimmung und der Standardabweichung im Blutplasma mit Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede (* p < 0,05).

3.1.2 Thrombin-Antithrombin-Komplexe

Die Konzentrationen an Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) des unbehandelten (n = 6) und des titanisierten (n = 6) ePTFEs wiesen keinen signifikanten Unterschied auf (Abb.14). Mittelwert und Standardabweichung der unbehandelten ePTFE-Proben lagen bei $1,919 \pm 0,147 \mu\text{g/l}$, der titanisierten Proben bei $3,035 \pm 1,266 \mu\text{g/l}$ (Tab.4).

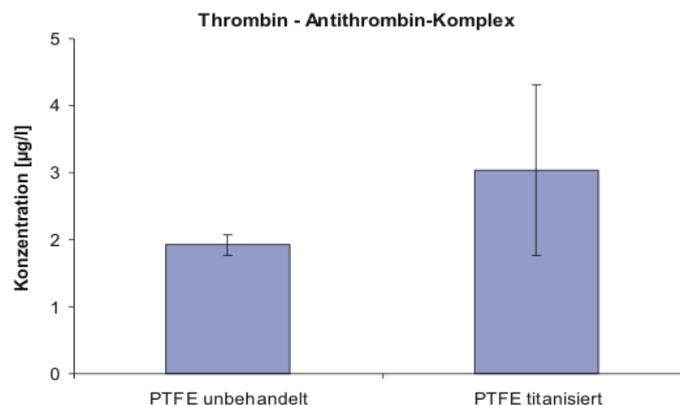


Abbildung 14: Thrombin-Antithrombin-Konzentrationen nach Inkubation mit unbehandeltem (n = 6) und titanisiertem (n = 6) ePTFE. Vergleich der TAT-Konzentrationen nach Inkubation mit unbehandeltem und titanisiertem ePTFE, anhand der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung. (TAT= Thrombin-Antithrombin-Komplex)

3.1.3 Prothrombinfragmente F1+2

Die Konzentrationen der Prothrombinfragmente F1+2 im Blutplasma, nach Inkubation von Blut mit unbehandelten ($n = 6$) oder titanisiertem ePTFE ($n = 6$), waren vergleichbar (Abb.15). Mittelwert des unbehandelten ePTFE ($167,080 \pm 8,604$ pmol/l) und des titanisierten ePTFE ($171,598 \pm 31,712$ pmol/l) lagen eng beieinander (Tab.5). Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

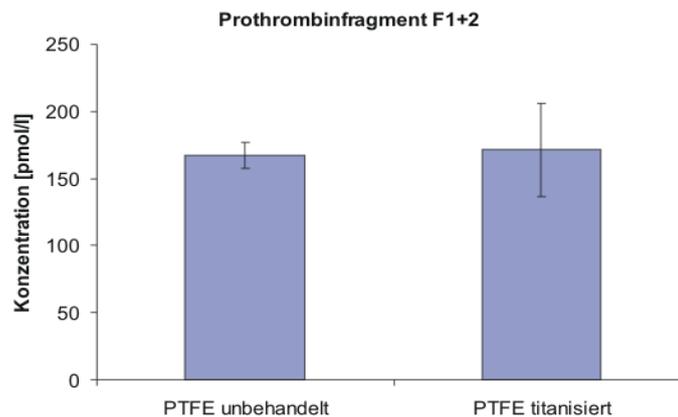


Abbildung 15 :Prothrombinfragment F1+2-Konzentrationen nach Inkubation mit unbehandeltem ($n = 6$) und titanisiertem ePTFE ($n = 6$). Vergleich der F1+2-Konzentrationen unbehandelter und titanisierter ePTFE-Proben anhand der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung im Blutplasma.

3.1.4 Einordnung der Ergebnisse in den Referenz-/ Normalbereich

Die Referenzbereiche der drei verschiedenen Gerinnungsparameter wurden spezifisch für den jeweiligen Testkit von den Herstellern vorgegeben (Tab.2). Als Referenz- oder Normalbereich wurde der Bereich der physiologisch vorkommenden Gerinnungsaktivierung definiert.

Sämtliche PF4-Messwerte und folglich Mittelwert und Standardabweichung der titanisierten ePTFE-Proben ($6,582 \pm 1,774$ IU/ml) lagen, im Gegensatz zu den unbehandelten Proben ($35,928 \pm 12,305$ IU/ml), innerhalb des Referenzbereichs von unter 10 IU/ml (Abb.16 u. Tab.3). Die TAT-Plasmakonzentrationen nach Inkubation mit unbehandelten und titanisierten ePTFE lagen unterhalb der oberen Referenzgrenze von $4,1 \mu\text{g/l}$, mit der Ausnahme eines Einzelwertes von $5,616 \mu\text{g/l}$ (Tab.2 u. 4). Der erhöhte Einzelwert ging als Ausreißer nicht in den Wilcoxon-Test ein. Die Prothrombinfragment F1+2-Konzentrationen befanden sich bei beiden ePTFE-Gruppen innerhalb des Referenzbereiches von 69-229 pmol/l (Abb.16 u. Tab.5).

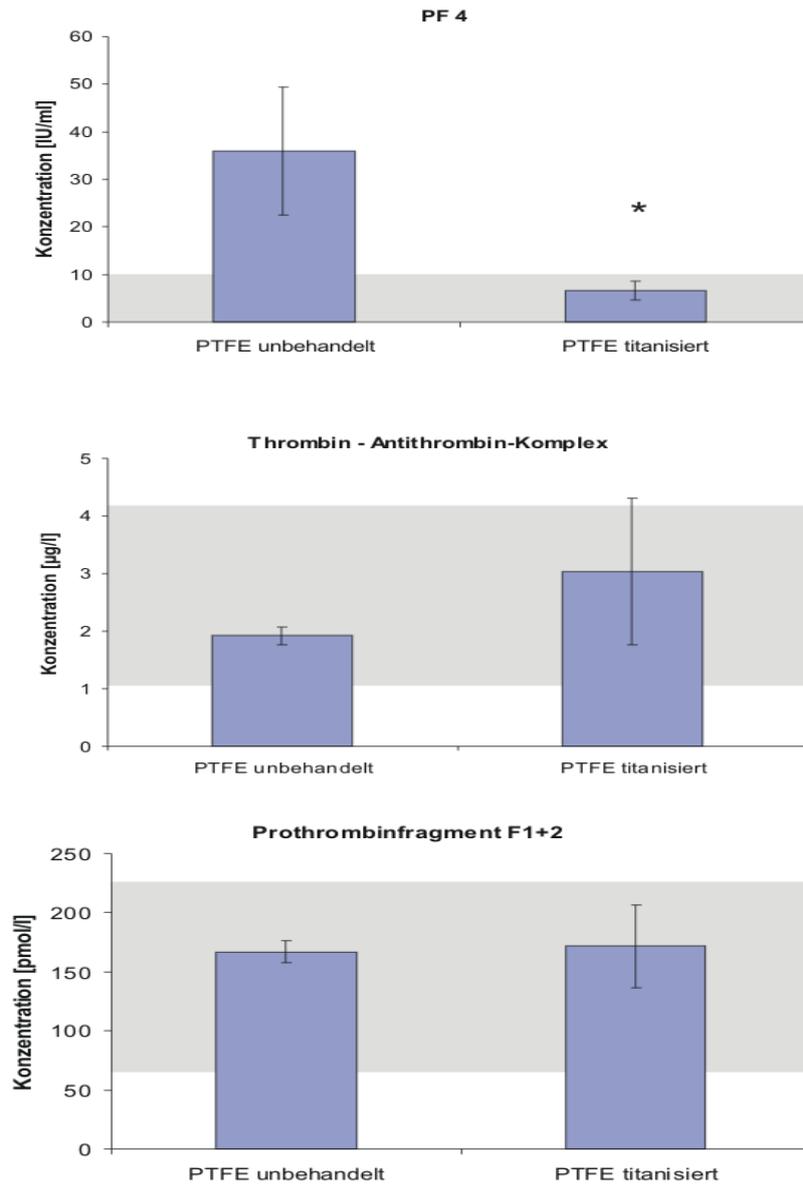


Abbildung 16: Konzentrationsbestimmung der Gerinnungsparameter PF 4, TAT und F1+2 nach Inkubation mit unbehandeltem (n = 6) und titanisiertem ePTFE (n = 6) mit farblicher Hinterlegung des Referenzbereiches. Vergleich unbehandelter und titanisierter ePTFE-Proben anhand der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung des Gehaltes an PF4, TAT und F1+2 im Blutplasma mit farblicher Hinterlegung des Referenzbereiches (grau) und mit Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede (* $p < 0,05$). (PF4= Plättchenfaktor 4, TAT= Thrombin-Antithrombin-Komplex, F1+2= Prothrombinfragmente F1+2)

3.1.5 Fibrinkleberbeschichtung

Die Verwendung von Fibrinkleber führte beim unbehandeltem und beim titanisiertem ePTFE zu einer Erhöhung der Konzentration an PF4, TAT und F1+2 (Tab.3-5). Für fibrinbeschichtetes, unbehandeltes ePTFE lagen die Blutplasmakonzentrationen an PF4 zwischen 19,844 IU/ml und 102,971 IU/ml (Tab.3). Der Mittelwert lag bei $62,627 \pm 38,166$ IU/ml. Hieraus ergab sich keine Signifikanz gegenüber dem unbehandeltem ePTFE ohne Fibrinkleberbeschichtung, aber ein signifikanter Unterschied zu den Konzentrationen ($6,582 \pm 1,774$ IU/ml) der titanisierten Proben ohne Fibrinkleberbeschichtung (Tab.3). Während sich nach der Fibrinkleberbeschichtung von unbehandeltem ePTFE die Konzentrationen an PF4 im Messbereich des ELISA-Testkit (2 bis 120 IU/ml) befanden, lagen nach Fibrinkleberbeschichtung titanisierter ePTFE-Proben einige Messwerte über den Messbereich des Testkit und wurden vom Computer aus extrapolierten Standardkurven berechnet. Die Blutplasmakonzentrationen von PF4 für titanisiertes und fibrinbeschichtetes ePTFE lagen zwischen 72,717 IU/ml und 126,331 IU/ml, mit einem Mittelwert von $104,097 \pm 21,046$ IU/ml (Tab.3) und somit oberhalb des oberen Referenzbereiches.

Nach Zusatz von Fibrinkleber waren die Konzentrationen an TAT und F1+2 nach Inkubation von unbehandeltem sowie titanisiertem ePTFE deutlich über den Messbereich erhöht, sodass das Dynex-Analysegerät die Messwerte nicht mehr aus Extrapolation errechnen konnte.

3.2 Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Thrombogenitätstestungen an glutaraldehydfixiertem Rinderperikard aufgezeigt. Zuerst wurde unbehandeltes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard untersucht, welches derzeit zur Erzeugung biologische Herzklappenprothesen verwendet wird, und mit glutaraldehydfixiertem Rinderperikard verglichen, welches zur Detoxifizierung mit Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) inkubiert und titanisiert wurde. Um den Einfluss einer Inkubation mit Zitronensäure oder ALDH als einzelne Detoxifizierungsmethoden auf die Gerinnungsaktivierung zu untersuchen, wurde jeweils das entsprechend inkubierte glutaraldehydfixierte Rinderperikard mit dem derzeit verwendeten glutaraldehydfixiertem Rinderperikard verglichen. Zuletzt wurde die Beeinflussung einer Dezellularisierung von Rinderperikard vor Fixierung mit Glutaraldehyd auf die Gerinnungsparameter überprüft.

3.2.1 Titanisiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard

Im Folgenden werden die Konzentrationen der Gerinnungsparameter für glutaraldehydfixiertes Rinderperikard ohne und mit Titanbeschichtung dargestellt.

3.2.1.1 Plättchenfaktor 4

Die Zusatzbehandlung glutaraldehydfixierter Rinderperikarde mit ALDH und Beschichtung mit Titan zur Reduktion der freien Aldehydgruppen, und somit zur Verringerung der Zytotoxizität, reduzierte den Gehalt an Plättchenfaktor 4 (PF4) signifikant ($p < 0,05$) gegenüber nur mit Glutaraldehyd fixiertem Rinderperikard (Abb.17). Mit $7,798 \pm 2,284$ IU/ml lagen die PF4-Konzentrationen nach Titanisierung signifikant ($n = 6$, $p < 0,05$) unter den Werten der Gruppe ohne Titanisierung ($n = 6$) mit $40,984 \pm 25,184$ IU/ml (Tab.6). Hieraus ergibt sich eine Reduktion der PF4-Konzentration von 81 %.

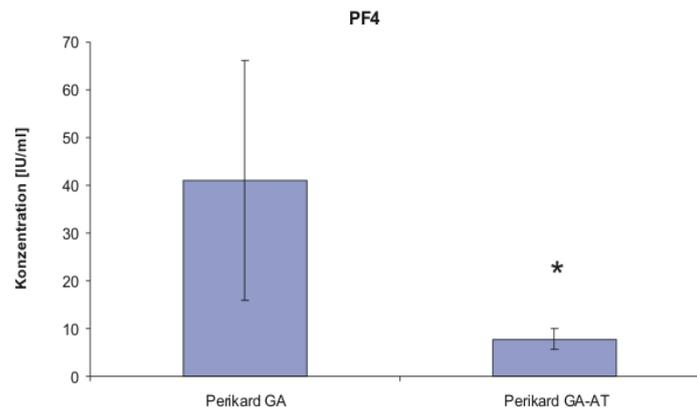


Abbildung 17: Konzentrationsbestimmung von Plättchenfaktor 4 von unbehandeltem (n = 6) und titanisiertem Rinderperikard (n = 6). Vergleich glutaraldehydfixierter Perikarde ohne (GA) und mit zusätzlicher ALDH-Behandlung und Titanbeschichtung (GA-AT) anhand der Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung im Blutplasma und mit Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede (* $p < 0,05$). (PF4= Plättchenfaktor 4, ALDH= Aldehyd-Dehydrogenase)

3.2.1.2 Thrombin-Antithrombin-Komplexe

Der Gehalt an Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) im Blutplasma unterschied sich durch eine detoxifizierende Titanisierung und ALDH-Behandlung (n = 6) nicht von dem unbehandelten glutaraldehydfixiertem Rinderperikard (n = 6, Abb.18). Die Konzentrationen an TAT bei unbehandeltem Perikards lag bei $2,237 \pm 0,263 \mu\text{g/l}$, bei titanisiertem bei $2,385 \pm 0,343 \mu\text{g/l}$ (Tab.7).

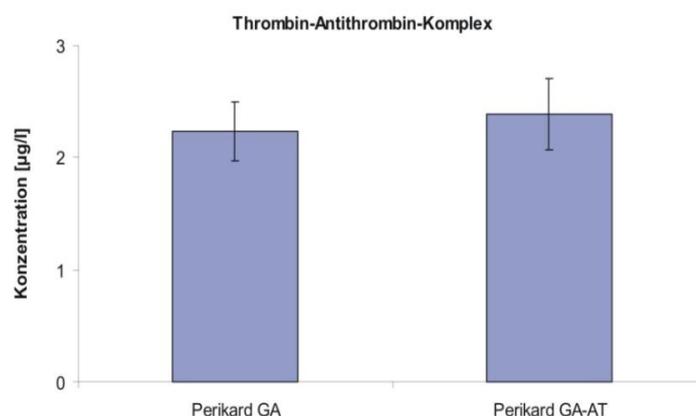


Abbildung 18: Thrombin-Antithrombin-Komplex-Konzentrationen nach Inkubation mit unbehandeltem (n=6) und titanisiertem Rinderperikard (n= 6). Vergleich glutaraldehydfixierter Perikarde (GA) ohne und mit ALDH-Behandlung und Titanbeschichtung (GA-AT) anhand der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung. (TAT= Thrombin-Antithrombin-Komplexe, ALDH= Aldehyd-Dehydrogenase)

3.2.1.3 Prothrombinfragmente F1+2

Im Blutplasma der zusätzlich mit ALDH-behandelten, titanbeschichteten, glutaraldehydfixierten Perikarde waren signifikant höhere Konzentrationen an Prothrombinfragmenten F1+2 (F1+2) nachweisbar als bei den glutaraldehydfixierten Perikarden ohne Zusatzbehandlung (Abb.19). Mit einem Mittelwert von $298,062 \pm 48,719$ pmol/l war die Konzentration an F1+2 beim Perikard mit Zusatzbehandlung signifikant höher als beim Perikard ohne Zusatzbehandlung mit $119,871 \pm 8,454$ pmol/l (Tab.8). Es wurde jeweils eine Anzahl von sechs Proben verglichen.

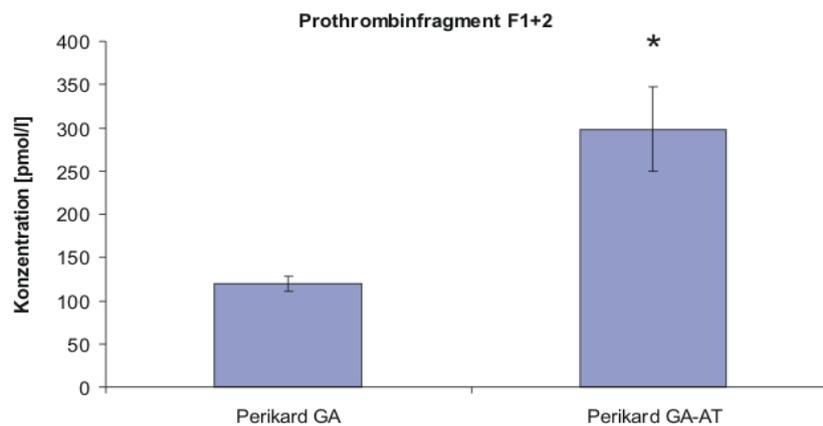


Abbildung 19: F1+2-Konzentrationen nach Inkubation mit unbehandeltem (n = 6) und titaniertem (n = 6) Rinderperikard. Vergleich glutaraldehydfixierter Perikarde (GA) ohne und mit zusätzlicher ALDH-Behandlung und Titanbeschichtung (GA-AT) anhand der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung des Gehaltes an F1+2 im Blutplasma, mit Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede (* p < 0,05). (F1+2= Prothrombinfragmente F1+2, ALDH= Aldehyd-Dehydrogenase)

3.2.1.4 Einordnung der Ergebnisse in den Referenz-/ Normalbereich

Die Inkubation des glutaraldehydfixierten Rinderperikards mit ALDH und die anschließende Titanisierung senkten den Blutplasmagehalt an PF4 signifikant. Die Konzentrationen an PF4 lagen nach dieser Zusatzbehandlung innerhalb des Referenzbereiches (Abb.20).

Die TAT-Konzentrationen beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab.7). Die Werte lagen bei beiden Gruppen innerhalb des Referenzbereiches. Die Prothrombinfragment F1+2-Konzentrationen waren nach Inkubation mit den glutaraldehydfixierten, ALDH-behandelten und titanierten Perikarden signifikant höher als bei den unbehandelten, glutaraldehydfixierten Perikarden und lagen oberhalb des Referenzbereiches (Abb.20, Tab.2 u. 8).

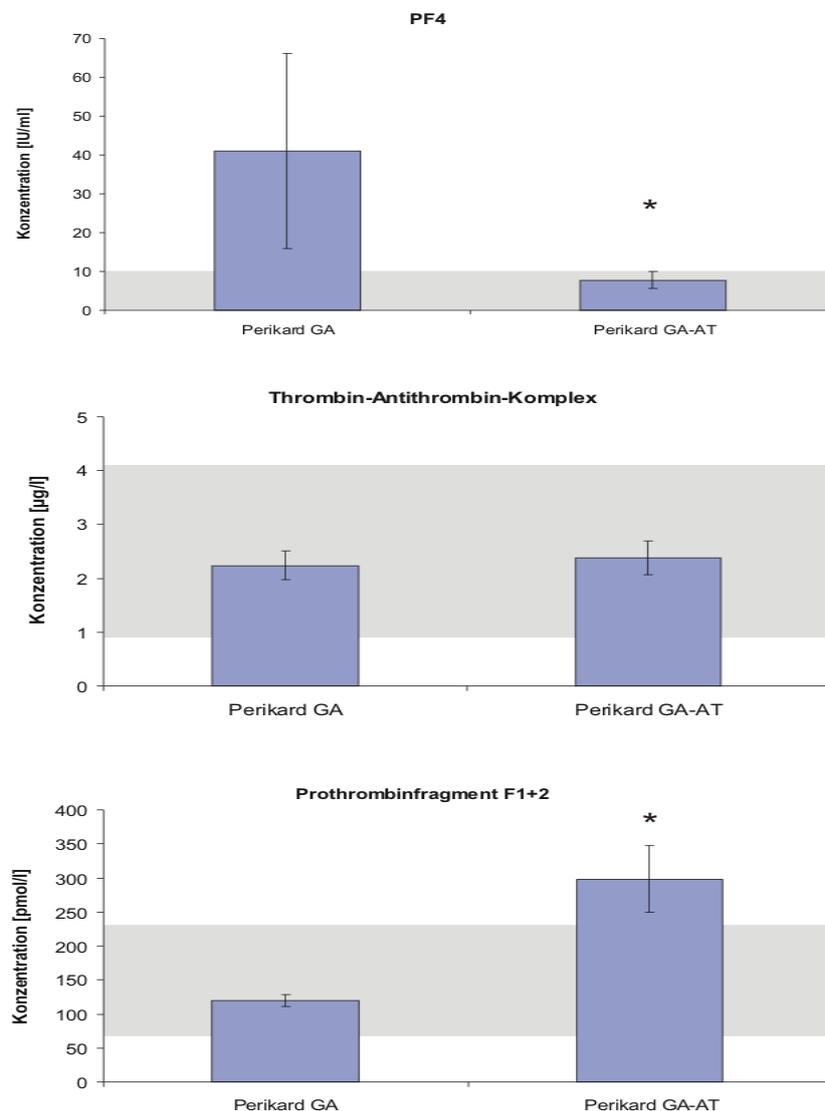


Abbildung 20: Konzentrationsbestimmung der Gerinnungsparameter PF 4, TAT und F1+2 nach Inkubation mit unbehandeltem (n = 6) und titanisiertem (n = 6) Rinderperikard mit farblicher Hinterlegung des Referenzbereiches. Vergleich glutaraldehydfixierter Rinderperikarde ohne (GA) und mit zusätzlicher ALDH-Behandlung und Titanbeschichtung (GA-AT), anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen des Gehaltes an PF4, TAT und F1+2 im Blutplasma mit farblicher Kennzeichnung des Referenzbereiches (grau hinterlegt) und statistisch signifikanter Unterschiede (* $p < 0,05$). (PF4= Plättchenfaktor 4, TAT= Thrombin-Antithrombin-Komplexe, F1+2= Prothrombinfragmente F1+2, ALDH= Aldehyd-Dehydrogenase)

3.2.2 Detoxifiziertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard

Nach Inkubation des Blutes mit glutaraldehydfixiertem Rinderperikard, welches zur Detoxifizierung mit zehnpromzentiger Zitronensäure oder mit ALDH behandelt oder zusätzlich zur ALDH-Behandlung titanisiert wurde, zeigte sich jeweils eine signifikante Reduktion der PF4-Konzentrationen im Vergleich zu glutaraldehydfixierten Perikarde ohne Zusatzbehandlung ($p < 0.05$). Nach der Postfixationsbehandlung mit ALDH (mit oder ohne Titanisierung) lagen die PF4-Konzentrationen innerhalb des Referenzbereichs, ohne Zusatzbehandlung oder nach Inkubation mit zehnpromzentiger Zitronensäure außerhalb des Referenzbereichs (Abb.21 u. Tab.6).

Die Konzentrationen an TAT-Komplexen im Blutplasma der verschieden behandelten Perikardgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander und die einzelnen Werte aller Gruppen lagen innerhalb des Referenzbereichs (Abb.21 u. Tab.7).

Eine signifikante Verminderung von F1+2 im Vergleich zu unbehandeltem, glutaraldehydfixiertem Rinderperikard war jeweils nach Behandlung mit zehnpromzentiger Zitronensäure ($92,667 \pm 6,548$ pmol/l) oder mit ALDH ($96,884 \pm 13,012$ pmol/l) nachzuweisen (Tab.8). Bei zusätzlicher Titanbeschichtung waren die Messwerte ($298,062 \pm 48,719$ pmol/l) gegenüber dem unbehandelten, glutaraldehydfixierten Rinderperikard signifikant erhöht und lagen oberhalb des oberen Referenzbereichs (Abb.21).

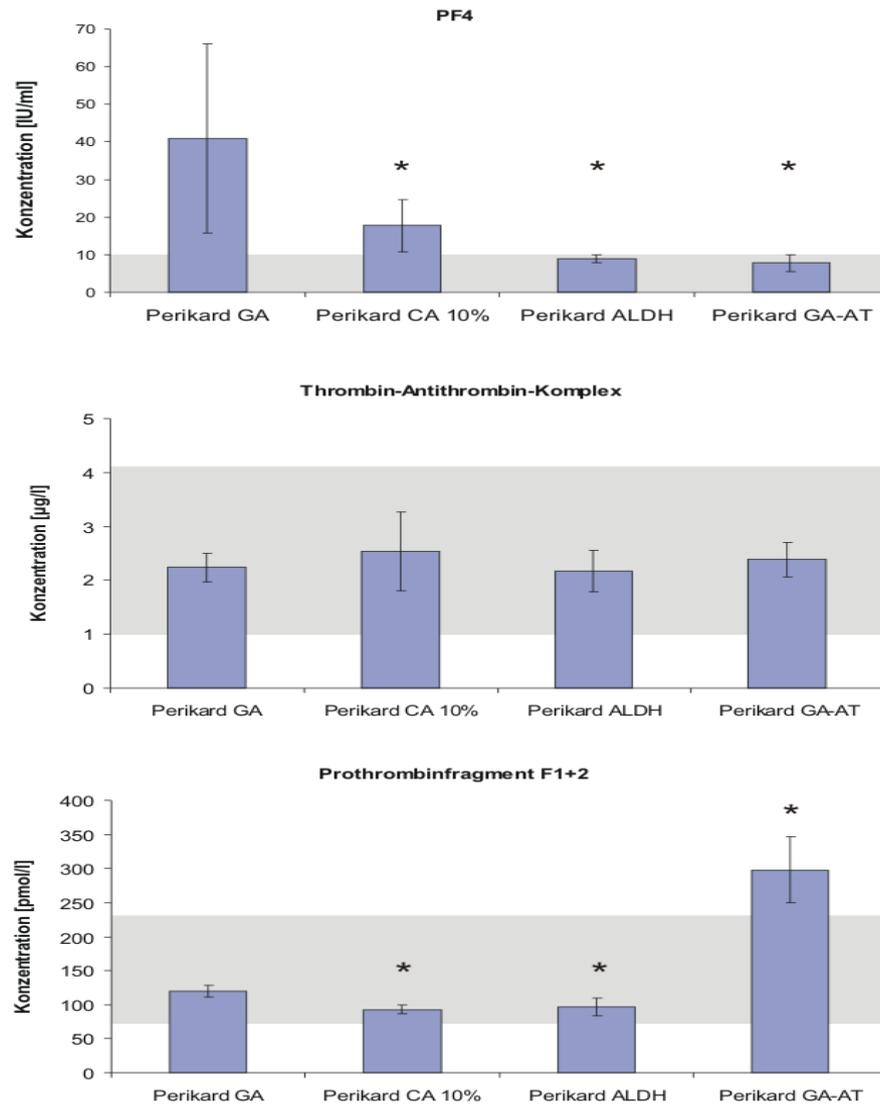


Abbildung 21: Konzentrationsbestimmung der Gerinnungsparameter PF 4, TAT und F1+2 nach Inkubation von verschieden detoxifiziertem, glutaraldehydfixiertem Rinderperikard (je Gruppe: n = 6). Vergleich verschieden behandelter Rinderperikarde anhand der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung des Gehaltes an PF4, TAT und F1+2 im Blutplasma mit farblicher Hinterlegung des Referenzbereichs und mit Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede (* $p < 0,05$) im Vergleich zu unbehandeltem, glutaraldehydfixiertem Rinderperikard (GA). (PF4= Plättchenfaktor 4, TAT= Thrombin-Antithrombin-Komplexe, F1+2= Prothrombinfragmente F1+2, GA= Glutaraldehyd-fixiertes Rinderperikard, CA 10%= mit 10%iger Zitronensäure behandelt, ALDH= mit Aldehyd-Dehydrogenase behandelt, GA-AT= mit ALDH behandelt und titanbeschichtet)

3.2.3 Dezellularisiertes Rinderperikard

In einer Testreihe wurde glutaraldehydfixiertes Rinderperikard durch Inkubation mit Trypsin und EDTA dezellularisiert und dann entweder nicht weiter modifiziert, mit zehnpromzentiger Zitronensäure oder mit ALDH inkubiert oder nach ALDH-Inkubation mit Titan beschichtet. Die Inkubation mit Zitronensäure bzw. ALDH diente zur Reduktion der freien Aldehydgruppen und somit zur Reduktion der Zytotoxizität glutaraldehydfixierter Rinderperikarde. Die so entstandenen dezellularisierten, glutaraldehydfixierten Rinderperikarde wurden mit dem jeweils nicht dezellularisierten Pendant verglichen.

Nach der Dezellularisierung glutaraldehydfixierter Rinderperikarde durch Inkubation mit Trypsin und EDTA erschien das Perikardparenchym weiß, aufgelockert, dicker und weicher. Das Gewicht war ungefähr auf das Doppelte erhöht. Zur Standardisierung der Proben wurden für die Thrombogenitätstestungen nur Rinderperikardproben mit vergleichbaren Gewichten zwischen 0,15 g und 0,4 g verwendet.

Die Dezellularisierung von glutaraldehydfixiertem und nicht weiter behandeltem Rinderperikard führte zu keinen signifikanten Unterschieden gegenüber den nicht dezellularisierten Proben bezüglich der Konzentrationen an PF4, TAT oder F1+2 (Abb.22, Tab.9-11). Bei den glutaraldehydfixierten Rinderperikarden, die zusätzlich mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiert wurden, waren die Konzentrationen an TAT bei den dezellularisierten Proben von $1,715 \pm 0,187 \mu\text{g/l}$ signifikant gegenüber den nicht dezellularisierten mit $2,543 \pm 0,730 \mu\text{g/l}$ ($p < 0,05$) vermindert (Abb.21 u. Tab.10). Die Konzentrationen an PF4 und F1+2 unterschieden sich mit und ohne Dezellularisierung sowie Inkubation mit Zitronensäure nicht signifikant voneinander.

Nach Dezellularisierung von Rinderperikard, welches mit ALDH detoxifiziert wurde, stiegen die Konzentrationen an PF4 von $10,684 \pm 4,164 \text{ U/ml}$ der nicht dezellularisierten Proben signifikant ($p < 0,05$) auf $55,016 \pm 10,275 \text{ U/ml}$ an (Abb.21, Tab.6 u. 9). Die Konzentrationen an TAT unterschieden sich nach Inkubation mit ALDH mit und ohne Dezellularisierung nicht signifikant voneinander.

Der Gehalt an F1+2 stieg signifikant von $96,884 \pm 13,012 \text{ pmol/l}$ bei nicht dezellularisierten, ALDH-behandelten Proben auf $112,965 \pm 8,702 \text{ pmol/l}$, wenn diese dezellularisiert wurden (Abb.22, Tab.8 u. 11).

Die Inkubation mit EDTA und Trypsin zur Dezellularisierung der glutaraldehydfixierten Rinderperikarde, die zusätzlich zur ALDH-Inkubation mit Titan beschichtet wurden, führte zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich der Konzentrationen an PF4 und F1+2

(Abb.22). Die Konzentrationen an TAT sanken von $2,385 \pm 0,343 \mu\text{g/l}$ bei titanisiertem, nicht dezellularisiertem Rinderperikard auf $1,981 \pm 0,304 \mu\text{g/l}$ bei titanisiertem, dezellularisiertem Rinderperikard (Abb.22, Tab.7 u. 8). Die einzelnen Trends der verschiedenen Modifikationsgruppen, wie in Absatz 3.2.2 beschrieben, blieben mit und ohne Dezellularisierung jedoch in etwa gleich (Tab.9).

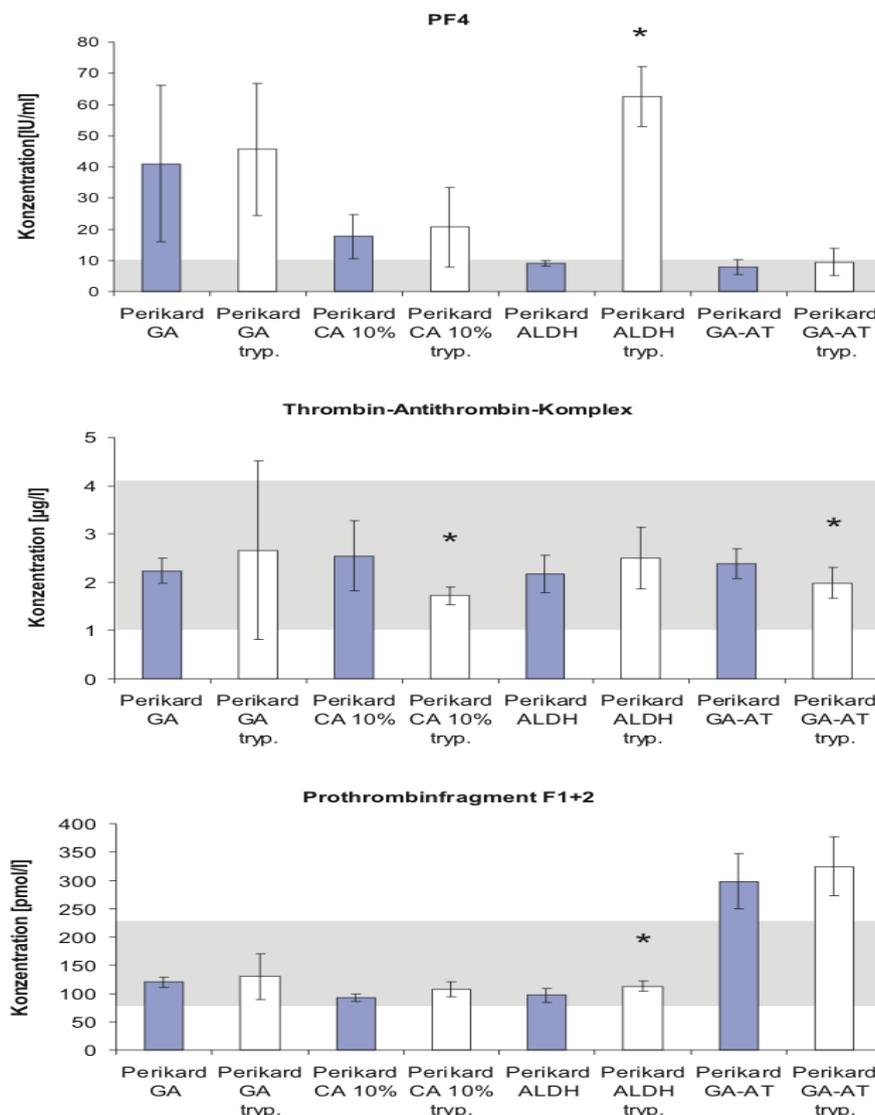


Abbildung 22: Konzentrationsbestimmung der Gerinnungsparameter PF 4, TAT und F1+2 nach Inkubation mit dezellularisiertem Rinderperikard (n = 6). Vergleich der Gerinnungsparameter mit (weiß) und ohne (blau) Trypsin und EDTA-Inkubation (tryp.) der unterschiedlich modifizierten Perikarde, anhand der Mittelwertbestimmung und der Standardabweichung des Gehaltes an PF4, TAT und F1+2 im Blutplasma mit Einordnung in den Normalbereich und mit Kennzeichnung statistisch signifikanter Unterschiede (*, $p < 0,05$) im Vergleich zur jeweiligen nicht dezellularisierten Probe. (PF4= Plättchenfaktor 4, TAT= Thrombin-Antithrombin-Komplexe, F1+2= Prothrombinfragmente F1+2, GA= Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard, tryp.= mit Trypsin und EDTA behandelt, CA 10%= mit 10%iger Zitronensäure behandelt, ALDH= mit Aldehyd-Dehydrogenase behandelt, GA-AT= mit ALDH behandelt und titanbeschichtet)

4. Diskussion

Die Oberflächenbeschaffenheit von Blutkontaktflächen spielt eine entscheidende Rolle für die Offenheitsrate von polymeren Gefäßprothesen und die Haltbarkeit von xenogenen Herzklappenprothesen. Durch den Kontakt der jeweiligen Oberfläche mit Blut können einerseits Thrombozyten aktiviert werden, die dann zu einem löslichen Thrombozytenpropf aggregieren (primäre Hämostase), und andererseits Gerinnungskaskaden ausgelöst werden, die über die Bildung von unlöslichem Fibrin den Thrombozytenpropf stabilisieren (sekundäre Hämostase). Thrombotische Ereignisse wie die Bildung von Thromben und Thrombosen sind derzeit der häufigste Grund eines Prothesenverschlusses synthetischer Gefäßprothesen [88] und können bei Herzklappenprothesen zu Embolisationen führen.

Durch den neuartigen Einsatz eines bestimmten hochfrequenten elektromagnetischen Feldes bei der Anwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD) konnten Blutkontaktflächen aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) und Kollagen bei 32-35 °C mit Titan beschichtet (titanisiert) werden[41]. Die Analyse der drei Gerinnungsparameter Plättchenfaktor 4 (PF4), der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) und der Prothrombinfragmente F1+2 (F1+2) dienten zur Ermittlung der Thrombogenität dieser neuartig veränderten ePTFE- und Kollagenoberflächen bevor sich eine schützende Endothelschicht gebildet hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Titanisierung von ePTFE nach Inkubation im Vollblut zu einer signifikanten Reduktion der Konzentrationen an Plättchenfaktor 4 und somit der primären Hämostase führte, bei nicht signifikant veränderten Konzentrationen an TAT oder F1+2. Die Thrombogenität von ePTFE wurde folglich durch eine Titanisierung verringert.

Die Titanisierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard führte ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der PF4-Konzentrationen bei nicht signifikant veränderten TAT-Konzentrationen, aber zu einer signifikanten Erhöhung der F1+2-Konzentrationen. Die Titanisierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard bewirkte so eine Reduktion der Thrombozytenaktivierung, jedoch eine übermäßige Erhöhung der sekundären Hämostase.

4.1 Wahl des Titanisierungsverfahren

Mit einer chemischen Gasphasenabscheidung kann die molekulare Oberfläche von Substraten verändert werden. Durch die Entwicklung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD) konnten die verwendeten Temperaturen von über 1000 °C bei der konventionellen chemischen Gasphasenabscheidung auf etwa 250 °C reduziert werden. Auf diese Weise konnten bereits verschiedene funktionelle Gruppen wie zum Beispiel Amine und Carboxylgruppen auf ein Substrat aufgebracht oder Biomoleküle immobilisiert werden [37]. Yeh et al. zeigten, dass eine Beschichtung von ePTFE mit Hexafluoroethylen/H₂ mittels eines Plasmaverfahrens stabil war [89]. Die Inkorporation von Stickstoff- und Aminogruppen auf einer ePTFE-Oberfläche mittels PACVD gelang Siphea et al. [4]. Nach einer Beschichtung von ePTFE durch Verwendung von Abscheidungsverfahren wie der PACVD konnten verschiedene Studien in vitro eine Verminderung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation oder der sekundären Hämostase nachweisen [38, 44, 89, 90].

Eine Oberflächenbeschichtung von biologischen Blutkontaktflächen, wie das Kollagen in dem glutaraldehydfixierten Rinderperikard, zur Verringerung des thrombogenen Potentials, ist daher von großem Interesse. Bei den bisherigen PACVD-Verfahren waren die Temperaturen jedoch zu hoch. Kollagen wäre hierbei denaturiert und konnte daher nicht als Substrat verwendet werden. Durch die Verwendung hochfrequenter elektromagnetischer Felder entstehen nonthermale Plasmen, welche hohe Elektronen-, aber niedrige Neutronen- und Positronentemperaturen besitzen, ist es nun gelungen die PACVD bei 30-35 °C durchzuführen [41-43]. Dies öffnet ein neues Feld an Möglichkeiten, unter anderem auch die Beschichtung von kollagenen Oberflächen. So konnte erstmals glutaraldehydfixiertes Rinderperikard als Substrat dienen und erfolgreich mittels PACVD mit Titan beschichtet werden [40, 41].

Titan ist biologisch inert und wird erfolgreich als Metall oder Legierung in der Endoprothetik angewendet. Aufgrund der guten Verträglichkeit wird Titan ebenfalls zur Beschichtung koronarer Stents eingesetzt, wobei nach einer Beschichtung koronarer Stents mit oxidiertem Titan eine signifikante Abnahme der Thrombozytenadhäsion nachgewiesen werden konnte [91]. Zudem inhibierte eine Titanbeschichtung koronarer Stents die intimale Hyperplasie [91] und förderte die Ausbildung einer Endothelbesiedlung beim Ersatz von Carotiden [36]. Daher ist Titan als nanotechnologisches Beschichtungsmaterial interessant für die Entwicklung von polymerer oder biologischer Blutkontaktflächen.

4.2 Einfluss von titanisiertem, gerecktem Polytetrafluorethylen auf die Gerinnungsaktivierung

Die Titanisierung von gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) führte in unseren Analysen zu einer signifikanten Abnahme der Konzentration an Plättchenfaktor 4 (PF4) nach Inkubation mit Vollblut im Vergleich zu unbehandeltem ePTFE (Abb.13). Da PF4 aus den Speichergranula der Thrombozyten ausgeschüttet wird, ist es ein indirektes Maß der primären Hämostase. Die Titanisierung von ePTFE ergab somit eine signifikante Reduzierung ($p < 0,05$) der primären Hämostase um 82 Prozent. Die Konzentrationen an gebildeten Thrombin-Antithrombin-Komplexen und Prothrombinfragmenten F1+2, als Marker der sekundären Hämostase, waren mit und ohne Titanisierung des ePTFE jedoch nicht signifikant verändert.

4.2.1 Beeinflussung der primären Hämostase durch Titanisierung

Die Konzentration an Plättchenfaktor 4 (PF4) war nach Inkubation des Vollblutes mit titanisiertem ePTFE signifikant niedriger als nach Inkubation mit unbehandeltem ePTFE. Die Höhe der PF4-Werte des titanbeschichteten ePTFE lagen, im Gegensatz zu dem nicht titanisiertem, innerhalb des physiologischen PF4-Wertebereiches (Abb.16). Hieraus ergab sich eine Verminderung der primären Hämostase durch die Titanisierung von ePTFE.

Eine Erklärung für die erhöhte Thrombogenität des unbehandelten ePTFE liefert zum einen die inhomogene, raue Oberflächenstruktur von ePTFE mit seinen Fibrillen und Knotenbereichen, da Thrombozyten an rauen Oberflächen aktiviert werden [89, 92]. Auch wenn nach Anwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PACVD) eine weitere Zunahme der Oberflächenrauheit beobachtet werden konnte [36, 38, 44], kam es wider Erwarten nicht zu einer erhöhten Aktivierung der primären Gerinnung. In dieser Arbeit konnte sogar eine Abnahme der primären Gerinnungsaktivierung durch Anwendung der PACVD nachgewiesen werden. Yeh et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen und zeigten bereits 1988 eine Reduktion der Thrombozytenadhäsion um 87 Prozent, wenn ePTFE mittels Plasmabehandlung mit Hexafluoroethylen/H₂ beschichtet wurde [89]. Auch andere Beschichtungen, die mittels PACVD, Ionen- oder Gasphasenabscheidung aufgebracht wurden, zeigten eine Reduktion der Gerinnungsaktivierung [90, 93].

Die Verwendung der PACVD, unabhängig vom Ausgangsmaterial, könnte eine Ursache für diesen Effekt sein. Die PACVD führt zu chemischen, hingegen nicht zu strukturellen, Veränderungen des Ausgangsmaterials. Polymere haben eine hohe Rotationsmobilität und

mobile Seitenketten. Die Oberflächenkonfiguration ist bei ihnen abhängig von der Umgebung. Durch das Plasmaverfahren werden Quervernetzungen stabilisiert und Rotationsbewegungen reduziert, was zu einer Stabilisierung der Oberflächenkonfiguration führt. Diese Stabilisierung der Oberflächenmoleküle des ePTFE sorgt unter anderem für die Regulation der initialen Proteinadsorption [89], die ein wichtiger Schritt in der Aktivierung von Thrombozyten ist. Dies könnte zum Einen die Reduktion der primären Gerinnung erklären. Zum Anderen führt auch die Stabilisierung der Oberflächenmoleküle selbst, trotz der Zunahme der Oberflächenrauheit, zu einer niedrigeren Interaktion mit Thrombozyten.

Hydrophilie reduziert, laut Sarkar et al., die Thrombogenität [5]. Roy et al. bieten einen gut nachvollziehbaren Erklärungsversuch für diese Beobachtung. Auf hydrophilen Oberflächen kommt es aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zur Anlagerung von Albumin. Gleichzeitig wird die Anlagerung von Fibrinogen durch den Wettbewerb mit Albumin vermindert. Albumin schützt vor Plättchenadhäsion und -aggregation, während Fibrinogen dies fördert [93]. Die Menge an adsorbiertem Fibrinogen an der Materialoberfläche korreliert zudem direkt mit dem Ausmaß der Gerinnungsaktion [94]. An hydrophoben Oberflächen wird vermehrt Fibrinogen, aber auch andere Proteine, gebunden, welche über ihre Integrinrezeptoren Thrombozyten binden und aktivieren können [5]. Bei dem PACVD-Verfahren wurden hydrophile Gruppen in das ansonsten eher hydrophobe ePTFE inkorporiert. Die Hydrophilie des ePTFE stieg, die Aktivierung der primären Hämostase nahm vermutlich konsekutiv ab. Titan verlieh der ePTFE-Oberfläche zusätzlich einen hydrophilen Charakter, der auch zur Endothelzelladhäsion wichtig ist [36, 95]. Während Titan die Endothelzelladhäsion begünstigt, hemmt es das Wachstum glatter Muskelzellen, was zu einer Verringerung der intimalen Hyperplasie führt, und in Folge weniger Re-Stenosen auslöst. Für koronare Stents konnte dies bereits belegt werden [36, 95].

Die Hydrophilie alleine erklärt jedoch die Abnahme der primären Gerinnung nicht ausreichend. Je nach Elektronegativität und der molekularen Beschaffenheit des Materials können hydrophile Oberflächen auch thrombogen sein. Intaktes Endothel und Thrombozyten haben eine leicht negativ geladene Oberfläche, beschädigtes Endothel eine positive. Eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion bei Verletzung des Endothels kann so erklärt werden [5]. Titan hat ebenfalls eine geringe bis mittlere Elektronegativität, welche bei der Titanisierung auf das ePTFE übertragen werden könnte und so zu einer verminderten Thrombozytenanlagerung und -aktivierung führen könnte. Mit Zunahme der Elektronega-

tivität von Blutkontaktflächen wird zudem die Fibrinogenadsorption, und konsekutiv die Thrombozytenaktivierung, verringert [93].

Die Kombination aus einer zunehmenden Hydrophilie, einer steigenden Elektronegativität und der Verwendung der PACVD mit Titanbeschichtung können die signifikante Reduktion der primären Hämostase in vitro bei titanisiertem ePTFE erklären.

4.2.2 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Titanisierung

Die Konzentrationen der Thrombin-Antithrombin-Komplexe und der Prothrombinfragmente F1+2, als Maß für die sekundäre Hämostase, differierten mit und ohne Titanisierung von ePTFE nicht signifikant. Die gemessenen Konzentrationen der beiden Parameter befanden sich zudem innerhalb des festgelegten physiologischen Bereiches. Die sekundäre Gerinnung wurde durch ePTFE folglich nicht über das normale, physiologische Maß hinaus aktiviert.

Faktor XII (FXII, Hagemann-Faktor), der Initiator der intrinsischen sekundären Gerinnung (Kontaktaktivierung, Abb.8) [78], wird insbesondere durch Kollagen aktiviert. Kollagen ist ein starker Aktivator der sekundären Hämostase [96], ist aber in ePTFE, im Vergleich zu den xenogenen Bioprothesen, nicht vorhanden. Titanisiertes ePTFE hat jedoch, wie auch Kollagen, eine leicht anionische Oberfläche, an welche FXII, aufgrund seiner positiven Oberflächenladung, binden könnte. Lange wurde zudem eine vermehrte Aktivierung von FXII an anionischen, hydrophilen Oberflächen postuliert [97]. Dieser Effekt kann nur für proteinhaltige Lösungen gezeigt werden. Hier kommt es aufgrund des Wettbewerbs mit anderen Proteinen auf hydrophoben Oberflächen zu einer relativen Verminderung der FXII-Adsorption („Adsorptions-Verdünnungseffekt“ [97]). Dieser Wettbewerb fehlt in hydrophilen Lösungen. Bei proteinfreien Lösungen wird FXII daher im gleichen Maße von hydrophoben und hydrophilen Oberflächen aktiviert [5, 64, 97]. Da titanisiertes ePTFE leicht anionisch und hydrophile Oberflächeneigenschaften besitzt und mit Vollblut (Proteinreiche Lösung) inkubiert wurde, müsste hier eine vermehrte Aktivierung von FXII erwartet werden, die jedoch ausblieb. Warum eine erhöhte Aktivierung der sekundären Gerinnung bei Kontakt mit titanisierten ePTFE nicht vermehrt stattgefunden hat, bleibt letztendlich unklar.

Eine mögliche Ursache für die nicht erhöhte Gerinnungsaktivierung könnte die kurze Inkubationszeit, aber auch die Verwendung von zitrathaltigem Blut sein, welches über die

Komplexierung von Kalzium die sekundäre Gerinnung hemmt [73]. Zum Anderen könnte durch die Stabilisierung der molekularen Oberfläche die Interaktion von FXII mit dem titanisierten ePTFE reduziert sein. Bei nicht titanisierten Proben wäre dann jedoch eine Erhöhung der sekundären Hämostase zu erwarten, welche ausblieb. Dies könnte einerseits an der hydrophoben Oberfläche mit verminderter FXII-Adsorption durch den Verdünnungseffekt liegen und andererseits kann es durch das Fehlen von Kollagen und anderen prokoagulatorischen Substanzen wie Laminin, Fibronectin und Thrombospondin des Subendothels bei diesem synthetischen Material, liegen. Zusätzlich könnte die verminderte Aktivierung der primären Hämostase titanisierter ePTFE-Oberflächen einer übermäßigen Aktivierung der sekundären Hämostase entgegenwirken, da die sekundäre Hämostase auch von Thrombozyten ausgelöst werden kann [75].

Zusammenfassend resultiert aus der signifikant verminderten primären Hämostase bei unveränderter sekundärer Hämostase *in vitro* eine Reduktion der Thrombogenität titanisierter ePTFE-Oberflächen. Da Thrombozyten jedoch durch verschiedene Flusseigenschaften wie die Flussgeschwindigkeit und die Scherspannung aktiviert werden können [21], sind weitere Gerinnungsanalysen an titanisierten ePTFE-Gefäßprothesen unter Flussbedingungen unumgänglich. Es gibt zahlreiche Faktoren und Interaktionen, die bei *in-vitro*-Studien nicht berücksichtigt werden können. Es ist daher sehr wichtig Ergebnisse und Voraussagen aus *in-vitro*-Versuchen, *in vivo* erneut zu analysieren [98, 99]. So kann schon die Implantation allein, zum Beispiel durch Verletzung von Gefäßen und Gewebe bei Einsatz der Prothese, durch Verwendung von Nahtmaterial im Bereich der Anastomose oder durch die Veränderung der Flussbedingungen, prokoagulatorisch wirken. Die zumeist verminderte Dehnbarkeit von einer Gefäßprothese (Compliance) gegenüber einem nativen Gefäß kann ebenfalls zur Ausbildung turbulenter Strömungen und konsekutiv zur Plättchenaktivierung führen [21].

Um auch langfristig das Risiko thrombotischer Ereignisse zu verkleinern, ist die Ausbildung einer intakten Endothelschicht auf den polymeren Gefäßprothesen von großer Bedeutung. Das Prothesenmaterial muss deshalb nicht nur hämokompatibel, sondern auch biokompatibel sein. Die Anwendung von Plasmaverfahren verbessert auch die Biokompatibilität von ePTFE. Sipehia et al. zeigten eine längere Offenheit von plasmamodifizierten ePTFE-Prothesen, die Endothelzellen auf der luminalen Seite, ohne Adhäsion von Blutzellen, aufwies [4]. Cikirikcioglu et al. konnten nach einem Monat CD31-positive Stammzellen auf der Oberfläche titanisierter Gefäßprothesen nachweisen, aus denen sich Neo-

endothel bilden könnte. Einen Unterschied in der Offenheitsrate stellte er jedoch über diesen Zeitraum nicht fest [36]. Pareta et al. gelang der Nachweis einer vermehrten Anlagerung von Endothelzellen, wenn eine Titanbeschichtung mittels Plasmaverfahren durchgeführt wurde [44]. Nabelschnurstammzellen bildeten zudem auf titanisiertem ePTFE, im Gegensatz zu nicht titanisiertem ePTFE, ihre natürliche Form und homogene Zellverbände aus [100].

Durch die Reduktion der primären Gerinnung bei unveränderter sekundärer Gerinnung und eine mögliche Verbesserung der biologischen Kompatibilität ist die Titanisierung von ePTFE ein vielversprechendes Konzept zur Verminderung von Frühthrombosen und zur langfristigen Verbesserung der Offenheitsraten von venösen und kleinkalibrigen arteriellen Gefäßprothesen.

4.2.3 Thrombogenität der Fibrinkleberbeschichtung

Die Beschichtung des ePTFE mit Fibrinkleber führte zu einem starken Anstieg aller gemessenen Gerinnungsparameter und folglich zu einer erhöhten primären und sekundären Gerinnungsaktivität. Die Beschichtung mit Fibrinkleber führte bei unbehandeltem und titanisiertem ePTFE zu einer deutlichen Zunahme der Konzentrationen an Plättchenfaktor 4 und folglich der primären Gerinnungsaktivierung. Der Blutplasmagehalt von den Thrombin-Antithrombin-Komplexen und von den Prothrombinfragmenten F1+2 war nach Fibrinkleberbeschichtung des unbehandelten ePTFE so hoch, dass sie nicht mehr vom Dynex-Analysegerät aus extrapolierten Standardkurven berechnet werden konnten, was zu der beschriebenen erhöhten Mortalität und zur Bildung von Mikrothromben bei Verwendung des Klebers bei Lappenplastiken passt [45, 46, 49].

Die hohe Thrombogenität des fibrinkleberbeschichteten ePTFE kann damit erklärt werden, dass unter anderem Thrombin und Fibrinogen Bestandteile des Fibrinklebers sind, welche die Thrombozytenaktivierung verstärken, die Freisetzungsreaktion triggern und in der Folge erneut Thrombozyten aktivieren. Gerinnungsfaktor XII ist ebenfalls ein Bestandteil des Klebers und aktiviert die intrinsische sekundäre Gerinnung [78, 97]. Die Gefahr einer Thrombenbildung bis hin zum akuten Prothesenverschluss ist bei Diffusion des Fibrinklebers in das Lumen, besonders im Anastomosenbereich, oder gar bei Beschichtung der Prothese mit Fibrinkleber zur Anheftung von Endothel [48], deutlich erhöht [50]. Dies wird durch die Beobachtungen von Lamm et al. bestätigt, die in den ersten Tagen nach

Verwendung des Fibrinklebers die höchste Anzahl an thrombogenen Ereignissen zeigten. Diese korreliert mit der Halbwertszeit des Klebers [45].

Aufgrund der Resultate dieser Arbeit und den angeführten Studien sollte daher Fibrinkleber nicht an Blutkontaktflächen angewendet werden.

4.3 Einfluss von titanisiertem, glutaraldehydfixiertem Rinderperikard auf die Gerinnungsaktivierung

Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard wird als kollagenes Grundgerüst zur Herstellung von biologischen Herzklappenprothesen verwendet. Durch eine detoxifizierende Oberflächenmodifikation, d.h. durch Reduktion der freien Aldehydgruppen auf dem Rinderperikard nach Glutaraldehydfixierung, und Titanbeschichtung mittels Plasma-aktivierter chemischer Gasphasenabscheidung (PACVD) konnte bereits eine Endothelzellbesiedlung von biologischen Herzklappen im Tierversuch nachgewiesen werden [72]. Die Endothelzellbesiedlung gilt als vielversprechende Methode durch Wachstums- und Regenerationsbereitschaft, sowie durch Regulation der Hämostase die Haltbarkeit von biologischen Herzklappenprothesen zu erhöhen. Je höher jedoch die Thrombogenität des modifizierten Rinderperikards selbst, desto höher ist das Risiko für thrombotische bzw. thromboembolische Ereignisse (z.B. Schlaganfälle mit Todesfolge) nach Implantation. Die Gerinnungsparameter Plättchenfaktor 4 (PF4), die Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) und die Prothrombinfragmente F1+2 (F1+2) wurden in dieser Arbeit als Maß für die Gerinnungsaktivierung bestimmt. Eine Erhöhung der gemessenen Konzentrationen über den physiologischen Bereich hinaus gilt als Hinweis auf eine übermäßig gesteigerte Aktivierung der Hämostase und somit auf ein erhöhtes Risiko für die Bildung von Thromben.

Bei den durchgeführten Gerinnungsanalysen nach Inkubation von titanisierten, glutaraldehydfixiertem Rinderperikard mit Vollblut zeigten sich diskrepante Ergebnisse. So war die Konzentration von PF4 als Marker der primären Hämostase durch die Titanisierung signifikant gesenkt, die Konzentration an TAT-Komplexen als ein Parameter der sekundären Hämostase unverändert, die Konzentration an F1+2 ebenfalls als ein Parameter der sekundären Hämostase jedoch signifikant erhöht.

4.3.1 Einfluss der Dezellularisierung auf die Thrombogenität

Die Dezellularisierung mit Trypsin und EDTA begünstigt eine Endothelzellbesiedlung [55] und könnte so eine längere Haltbarkeit der Bioprothesen zur Folge haben. Der Einfluss einer Dezellularisierung auf die Thrombogenität von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard wurde in dieser Arbeit erstmals geprüft.

Nach Dezellularisierung mit Trypsin und EDTA konnten zum Einen morphologische Unterschiede von dezellularisierten zu nicht dezellularisierten Rinderperikarden festgestellt werden. Zum Anderen konnten signifikante Anstiege der PF4- und F1+2-Konzentrationen nach Inkubation mit ALDH im Vergleich zu den nicht dezellularisierten, ALDH-inkubierten Rinderperikarden, nachgewiesen werden. Wenn die dezellularisierten Perikarde zur Verbesserung der Biokompatibilität mit Zitronensäure inkubiert oder mit ALDH behandelt und mit Titan beschichtet waren, war die Konzentration an TAT gegenüber den entsprechenden nicht dezellularisierten Proben signifikant reduziert. Einen signifikanten Unterschied in den anderen Untergruppen gab es bei den Thrombogenitätsanalysen nicht.

4.3.1.1 Morphologische Veränderungen

Es ergaben sich deutliche morphologische Veränderungen des Rinderperikards durch die Verwendung von Trypsin und EDTA zur Dezellularisierung. So wirkte das Gewebe nach Dezellularisierung aufgelockert und dicker, war weich und von weißlicher Farbe. Das Gewicht nahm um etwa das doppelte zu. Ohne Dezellularisierung imponierte das Rinderperikard hingegen derbe, elastisch, dünn und bräunlich. Levy et al. führten diese bräunliche Verfärbung nach Fixierung mit Glutaraldehyd auf die Bildung von cyclischen Chromophoren zurück [101]. Diese Bildung schien nach Trypsin- und EDTA-Vorbehandlung auszubleiben.

Die Zunahme des Gewichtes und die scheinbare Auflockerung des Gewebes nach Inkubation mit Trypsin und EDTA passen zu den Ergebnissen von Yang et al., welche ödematöse, aufgelockerte und gebrochene kollagene Fasern nach Inkubation mit Trypsin nachwiesen. Zudem war die mechanische Stabilität, durch Spaltung von Kollagen und Elastin durch Trypsin, reduziert [54]. Schenke-Layland et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen und beschrieben sogar das Herauslösen von Kollagen [55].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Inkubationszeit könnte mit 48 Stunden zu lang gewesen sein, sodass es bereits zum Abbau von Kollagen und Elastin, und damit zur Ver-

minderung der mechanischen Stabilität des Rinderperikards gekommen sein könnte. Die mechanische Stabilität ist jedoch ein sehr wichtiger Faktor, da biologische Herzklappen im Körper hohen Druckveränderungen und den dort herrschenden Scherkräften standhalten müssen. Eine verbesserte Thrombogenität oder Biokompatibilität darf die mechanische Stabilität deshalb nicht verschlechtern. Zukünftige Studien zur mechanischen Stabilität sind empfehlenswert.

4.3.1.2 Beeinflussung der primären Hämostase durch Dezellularisierung

Vergleicht man die Aktivierung der primären Hämostase anhand der Konzentrationen an Plättchenfaktor 4 (PF4) von dezellularisierten, glutaraldehydfixierten Rinderperikarden, die auf verschiedene Arten modifiziert wurden, mit dem nicht dezellularisierten Pendant, so konnten nur nach Inkubation mit ALDH signifikante Unterschiede in den Konzentrationen an PF4 nachgewiesen werden. Dies passt zu den Ergebnissen von Kasimir et al., die eine starke Gerinnungsaktivierung durch dezellularisierte Proben beim Kontakt mit Blut beschrieben und ebenso eine Plättchenaktivierung und -aggregation in Bereichen ohne Endothelbesiedlung [102], sowie zu den Ergebnissen von Zhou et al., die den thrombogenen Charakter dezellularisierter Grundgerüste bestätigten [103]. Nach anderen Modifikationen, wie zum Beispiel die Inkubation mit Zitronensäure oder der Titanisierung, unterschieden sich die Konzentrationen an PF4 mit und ohne Dezellularisierung jedoch nicht signifikant voneinander.

Die Erhöhung der primären Hämostase nach Dezellularisierung und Inkubation mit ALDH könnte zum Einen auf präanalytische Fehler wie zum Beispiel ungenügendes Auswaschen und eine damit verbundene vermehrte Thrombozytenaktivierung zurückgeführt werden. Zum Anderen könnte eine inhomogene Dezellularisierung stattgefunden haben. Während der Inkubation mit EDTA und Trypsin gelangten einzelne Perikardanteile an die Oberfläche der Lösung. Sie wurden deshalb in regelmäßigen Abständen vorsichtig wieder in die Lösung eingebracht. Die Trypsinierung könnte daher aber inhomogen abgelaufen sein mit Folge einer ungenügenden Spaltung der Oberflächenproteine, die dann die Thrombozyten aktivierten. Durch die inhomogene Dezellularisierung könnten auch kollagene Bindungsstellen hinzukommen oder verloren gegangen sein, welche die Thrombozytenaktivierung beeinflussen.

Eine inhomogene Dezellularisierung oder eine Veränderung kollagener und elastischer Bindungsstellen durch das Dezellularisierungsverfahren sowie präanalytische Fehler in der

ALDH-Gruppe könnten den signifikanten Unterschied der Konzentrationen an PF4 für dezellularisiertes, mit ALDH enzymatisch verändertes Perikard erklären.

4.3.1.3 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Dezellularisierung

Die Konzentrationen der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) als Marker der sekundären Gerinnung unterschieden sich in den einzelnen Gruppen, bis auf zwei Ausnahmen, nicht signifikant voneinander. Eine Ausnahme war die signifikante Verminderung an gebildeten TAT ($p < 0,05$) durch die Dezellularisierung glutaraldehydfixierter Rinderperikarde, die mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiert wurden. Die zweite Ausnahme bildete die signifikante Reduktion ($p < 0,05$) des TAT-Plasmagehaltes nach Kombination aus Dezellularisierung, ALDH-Inkubation und Titanisierung.

Durch die Dezellularisierung wurden nicht nur immunogene Oberflächenproteine gespalten, sondern auch kollagene und elastische Fasern aus dem glutaraldehydfixiertem Rinderperikard herausgelöst [54]. Da kollagene Fasern über die intrinsische Gerinnungsaktivierung der sekundären Hämostase zur Thrombenbildung führen können [96], könnte die Reduktion der kollagenen Fasern zur Abnahme der Thrombin-Antithrombin-Komplexkonzentration geführt haben. Das Herauslösen der kollagenen Fasern war möglicherweise die Ursache für die makroskopische Auflockerung der Rinderperikarde. Die Auflockerung des Rinderperikards könnte die Diffusion der Zitronensäure und der Aldehyddehydrogenase begünstigt haben, welches zu einer effektiveren Reduktion der freien Aldehydgruppen geführt haben könnte. Eine verringerte Quervernetzung bei der Fixierung von Rinderperikard mit Glutaraldehyd durch das Herauslösen kollagener Fasern wäre ebenfalls möglich. Durch die Abnahme freier Aldehydgruppen auf der Oberfläche des glutaraldehydfixierten Rinderperikards könnte die Proteinadsorption verringert werden, die eine Gerinnungsaktivierung bewirken kann. Bei derzeit verwendetem glutaraldehydfixiertem Rinderperikard und nach Inkubation mit ALDH blieb eine Verringerung der Gerinnungsaktivierung durch Dezellularisierung jedoch aus.

Bei den Prothrombinfragmenten F1+2, ebenfalls Marker der sekundären Hämostase, kam es durch Dezellularisierung ALDH-inkubierter, glutaraldehydfixierter Rinderperikarde zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen im Vergleich zu den nicht dezellularisierten, ALDH-inkubierten Proben. Dieser Anstieg passt zu den Ergebnissen der Thrombogenitätsanalyse der primären Hämostase. Die thrombozytäre Aktivierung könnte zu einer Erhöhung der sekundären Hämostase geführt haben [75]. Im Gegensatz zu den

Prothrombinfragmenten, war der Blutplasmagehalt an Thrombin-Antithrombin-Komplexen jedoch nicht signifikant erhöht, was an der niedrigeren Halbwertszeit der Thrombin-Antithrombin-Komplexe liegen könnte. Die differenten Ergebnisse könnten jedoch auch mit der inhomogenen Dezellularisierung durch Schwimmen der Rinderperikarde an der Oberfläche der Trypsinlösung und durch präanalytische Fehler erklärt werden.

Zusammenfassend ergab durch die Dezellularisierung mit Trypsin und EDTA nur nach Inkubation mit ALDH eine signifikante Erhöhung der Thrombogenität. Inwieweit dies aufgrund präanalytischer Fehler wie unzureichendes Auswaschen oder die inhomogene Dezellularisierung zurückzuführen ist, muss weiter analysiert werden. Nach Inkubation mit Zitronensäure oder nach Titanisierung zur Reduktion der freien Aldehydgruppen wiesen die Ergebnisse auf eine Reduktion der Thrombogenität durch Dezellularisierung hin.

4.3.2 Einfluss der Detoxifizierung auf die Thrombogenität

Zur Detoxifizierung durch Reduktion der freien Aldehydgruppen wurde das glutaraldehydfixierte Rinderperikard mit zehnprozentiger Zitronensäure oder mit ALDH zur weiteren Verringerung der freien Aldehydgruppen inkubiert. Nach Inkubation mit ALDH wurde ein Teil der Perikarde zusätzlich mittels Plasma-aktivierter chemischer Gasphasenabscheidung (PACVD) mit Titan beschichtet. Die Gerinnungsaktivierung der verschiedenen Gruppen wurde dann getestet und verglichen.

Hierbei zeigte sich sowohl nach Inkubation mit Zitronensäure zur Reduktion der freien Aldehydgruppen nach Fixierung mit Glutaraldehyd und zur Verringerung von Verkalkungen, als auch nach Inkubation mit ALDH zur weiteren Reduktion der freien Aldehydgruppen eine signifikante Reduktion des Plasmagehaltes von Plättchenfaktor 4, als Parameter für die primäre Gerinnungsaktivierung, und von den Prothrombinfragmenten F1+2, als Marker der sekundären Hämostase.

4.3.2.1 Beeinflussung der primären Hämostase durch Detoxifizierung

Werden die Konzentrationen von Plättchenfaktor 4, als Maß der primären Gerinnung, von glutaraldehydfixierten Perikarden, mit denen verglichen, die nach Fixation mit ALDH oder zehnprozentiger Zitronensäure behandelt wurden, so konnte auch ohne Anwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (PAVCD) eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaktivierung gegenüber dem unbehandelten Perikard festgestellt werden.

Eine Erklärung für die Reduktion der primären Hämostase ist die Verminderung der Proteinadsorption, z.B. von Fibrinogen, durch Inkubation mit ALDH oder Zitronensäure. Zitronensäure bindet zum Einen Kalzium und hemmt so die Bildung von Kalzium-Phosphatablagerungen an der Bioprothese [69], die zu einer erhöhten Proteinadsorption führen [104]. Zum Anderen werden die freien Aldehydgruppen, die bei der Fixierung mit Glutaraldehyd entstehen, durch die Inkubation mit Zitronensäure, aber auch durch die Inkubation mit ALDH, reduziert. Die freien Aldehydgruppen begünstigen wiederum Kalzium-Phosphatablagerungen [62] und so die Proteinadsorption.

Die Anwendung von ALDH führte gegenüber der Anwendung von Zitronensäure zu einer weiteren Verringerung der primären Hämostase. Dies kann mit der höheren Reduktion der freien Aldehydgruppen durch ALDH im Vergleich zu Zitronensäure erklärt werden [41]. Eine weitere Erklärung für die Reduktion der primären Hämostase kann die Abnahme avitaler Zellen sowie Zelldetritus sein, welche durch die Fixierung mit Glutaraldehyd entstehen. Bei der weiteren Behandlung von fixiertem Rinderperikard wurden die Proben insgesamt häufiger gespült und Zelldetritus und avitale Zellen entfernt, die zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen können [61]. Die Auswahl der Spüllösung könnte ebenfalls die Gerinnung beeinflussen. So konnten Magilligan et al. eine signifikante Verminderung der Thrombozytenadhäsion für frisches Rinder- und Schweineperikard nach Waschen mit Plasma, anstelle von Natriumchloridlösung nachweisen [61]. In der vorliegenden Studie wurde glutaraldehydfixiertes Rinderperikard mit Natriumchloridlösung gespült, während es nach Inkubation mit Zitronensäure mit PBS-Puffer gewaschen wurde. Die verschiedenen Spüllösungen könnten eine Reduktion der primären Gerinnung nach Inkubation mit Zitronensäure bewirkt haben.

Die Behandlung mit ALDH und Zitronensäure vermindert also nicht nur die freien Aldehydgruppen und damit die Zelltoxizität glutaraldehydfixierter Bioprothesen [41], sondern auch die Aktivierung der primären Hämostase. Die erhebliche Reduktion des Thrombogenität im Vergleich zu den bislang verwendeten Herzklappenprothesen aus glutaraldehydfixiertem Rinderperikard muss in weiteren Studien getestet werden, um einen möglichen klinischen Einsatz zu testen.

4.3.2.2 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Detoxifizierung

Die Prothrombinfragmente F1+2 waren bei Anwendung dieser Detoxifizierungsverfahren, anders als nach Anwendung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung

(PACVD), signifikant reduziert ($p < 0,05$). Die Thrombin-Antithrombin-Komplexe dieser Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander und lagen im Normalbereich.

Durch die Verminderung der primären Hämostase durch Inkubation mit Zitronensäure und ALDH wurde auch die sekundäre Hämostase verringert, da aktivierte Thrombozyten an ihren Oberflächen Bindungsstellen für Gerinnungsfaktoren, z.B. für FXII, bilden, welche dann die sekundäre Hämostase aktivieren können [75, 77]. Des Weiteren bildet Zitronensäure, wie bereits beschrieben, Chelate mit Kalzium, welches ein wichtiger Kofaktor für die sekundäre Hämostase ist. Wird das Kalzium an der Perikardoberfläche durch Zitronensäure komplexiert, steht es für die Gerinnung nicht zur Verfügung und erklärt damit eine Reduktion der sekundären Gerinnung. Es wäre denkbar, dass durch unzureichendes Waschen Zitronensäure am Rinderperikard haften blieb, welches dann zusätzlich das Kalzium aus dem Vollblut band [69]. Die Messung der sekundären Gerinnung könnte so nach Inkubation mit Zitronensäure falsch niedrig gewesen sein. Durch mehrfaches Waschen mit PBS-Puffer nach Inkubation mit Zitronensäure sollte diesem präanalytischen Fehler vorgebeugt werden.

Die Detoxifizierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard durch Inkubation mit jeweils zehnpromzentiger Zitronensäure oder ALDH ohne Titanisierung zeigte sich in den Thrombogenitätsanalysen durch die signifikant reduzierte Gerinnungsaktivierung als eine aussichtsvolle Methode das thrombogene Potenzial biologischer Herzklappenprothesen zu senken. Das Risiko thrombogener Frühkomplikationen könnte durch die Inkubation mit Zitronensäure oder ALDH möglicherweise gesenkt werden. Durch die ebenfalls geringere Zytotoxizität nach Inkubation mit Zitronensäure oder ALDH könnte sich zusätzlich eine intakte Endothelschicht auf den so veränderten Bioprothesen ausbilden und hierdurch eventuell zusätzlich das Risiko für thrombotische Spätkomplikationen senken.

4.3.3 Beeinflussung der primären Hämostase durch Titanisierung

Die zusätzliche Titanisierung durch die Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PACVD) nach Inkubation der glutaraldehydfixierten Rinderperikarde mit ALDH bewirkte eine signifikante Senkung (um 81 Prozent) der Konzentration von Plättchenfaktor 4 (PF4) im Blut. Dies bedeutet folglich eine signifikante Reduktion der Aktivierung der primären Hämostase. Die PF4-Konzentrationen lagen nach Inkubation mit den titanisierten Proben sogar im physiologischen Bereich.

Die Thrombozytenadhäsion wird vor allem von kollagenen Fasern des Rinderperikards ausgelöst. Es bilden sich periodische Brücken zwischen den Fasern und den Thrombozyten aus. Thrombozyten werden aktiviert und ihre Speichergranula sezerniert. Es folgt die Bildung eines Thrombozytenpfropfes [73-75]. Allein die Fixierung des Rinderperikards mit Glutaraldehyd führt zu einer Verminderung der Thrombozytenaktivierung gegenüber unfixiertem Perikard [61]. Als Ursache wird eine Veränderung der Tripelhelixstruktur des Kollagens und so der kollagenen Bindungsseiten durch Glutaraldehyd gesehen [61]. Dies passt zur Beobachtung, dass Thrombozyten nur an Kollagen binden, wenn dies in Form von Fibrillen aus mehreren Tripelhelices (quartäre Struktur) vorliegt [77]. Das PACVD-Verfahren könnte durch Stabilisierung der Oberflächenmoleküle [89] und Quervernetzung der kollagenen Fasern, ebenfalls die kollagenen Bindungsseiten verändern und die Interaktion mit Thrombozyten hemmen.

Die verbesserte primäre Gerinnung nach plasmavermittelter Titanbeschichtung kann, analog zu den Beobachtungen beim ePTFE, zusätzlich durch die Zunahme der Oberflächenhydrophilie [36, 44, 93], die anionische Oberflächenladung und die positiven Einflüsse von Titan auf die Hämokompatibilität erklärt werden [44].

4.3.4 Beeinflussung der sekundären Hämostase durch Titanisierung

Nach Inkubation mit ALDH und anschließender Titanisierung konnte kein Unterschied in der Konzentration an Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) festgestellt werden. Die Prothrombinfragmente F1+2 waren hingegen nach Titanisierung signifikant über den physiologischen Bereich hinaus erhöht und wiesen somit auf eine übermäßige Aktivierung der sekundären Gerinnung hin.

Die übermäßige Aktivierung der sekundären Hämostase kann durch die Aktivierung der Gerinnung bei Kontakt des Blutes mit der kollagenen Oberfläche der Bioprothese erklärt werden. Kollagen ist stark prothrombogen und aktiviert Faktor XII (FXII) [96], welcher wiederum die intrinsische sekundäre Hämostase auslöst [78]. Auf hydrophoben Oberflächen kommt es unter physiologischen Bedingungen durch den Verdünnungseffekt zu einer geringeren Adsorption von FXII als auf hydrophilen Oberflächen [64]. So könnte FXII auf den hydrophileren Oberflächen des titanisierten Rinderperikards, die durch Inkorporation polarer Gruppen entstanden ist, vermehrt zu einer Gerinnungsaktivierung führen. Die Steigerung der sekundären Gerinnung durch die Titanisierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard könnte so erklärt sein.

Bei einer Erhöhung der sekundären Hämostase müssten jedoch auch die TAT-Werte erhöht sein. Es fand sich bei unseren Ergebnissen jedoch eine Diskrepanz zwischen den Konzentrationen an Prothrombinfragmenten F1+2 und den TAT-Komplexen. Lange Stauungszeiten und hohe Stauungsdrücke bei der Blutentnahme könnten die sekundäre Gerinnung aktivieren und so zu höheren Werten bei den Prothrombinfragmenten geführt haben [75]. Eine schlechte Durchmischung des Zitrates mit dem Blut wäre eine weitere potenzielle Fehlerquelle. Die Werte für die Prothrombinfragmente und die TAT-Komplexe wurden aber aus den gleichen Blutentnahmeröhrchen bestimmt, waren reproduzierbar und müssten durch präanalytische Fehler in gleicher Weise verändert werden.

Thor et al. konnten eine signifikante Erhöhung von TAT-Komplexen im Vollblut gegenüber plättchenreichen und -armen Plasma nachweisen. Sie erklärten dies mit dem Vorhandensein von roten Blutzellen (Erythrozyten), die zum einen die Aktivierung von FXII verstärken und zum anderen über Elastase an ihrer Oberfläche zusätzlich FXII aktivieren [105]. Die Inkubation des Rinderperikards wurde mit Vollblut durchgeführt, die Messung der TAT-Komplexe erfolgte in Plättchenreichem Plasma. Eine Wechselwirkung mit Erythrozyten ist daher theoretisch, zumindest während der Inkubation, möglich. Dieser Effekt müsste dann aber auch bei den nicht titanisierten Proben aufgetreten sein.

Die plausibelste Erklärung der aufgetretenen diskrepanten Ergebnisse, bezüglich der Aktivierung der sekundären Hämostase, bieten die verschiedenen Halbwertszeiten der gemessenen Parameter. TAT hat mit 10-15 Minuten eine geringere Halbwertszeit als F1+2 mit 90 Minuten [75]. Da unsere Proben 30 Minuten mit Vollblut inkubiert wurden, könnte es sein, dass das gebildete TAT aufgrund der geringeren Halbwertszeit bereits nicht mehr in vollem Maße nachgewiesen werden konnte bzw. falsch niedrige Werte entstanden sind. Dies könnte die Diskrepanz der beiden Parameter bezüglich der sekundären Gerinnung erklären. Um diese Theorie zu bestätigen, müssten zukünftige Messungen von TAT- und F1+2-Konzentrationen in Intervallen durchgeführt werden. Die Intervallmessungen wurden im Rahmen von ähnlichen Materialtestungen bislang nicht durchgeführt und könnten Aufschluss über die Kinetik der Gerinnungsparameter und den Einfluss der Testmaterialien auf die Thrombin-Antithrombin-Komplexe geben. Anschließend sollten analog zum ePTFE zudem weitere Analysen unter Flussbedingungen und in vivo erfolgen.

4.3.5 Beeinflussung der Oberfläche und Thrombogenität durch Titanisierung

Eine weitere Erklärung für die signifikant höhere Aktivierung der sekundären Hämostase und der diskrepanten Ergebnisse im Vergleich zum ePTFE könnte die mikroskopische Oberflächenbeschaffenheit bieten [13]. Um Rinderperikard titanisieren zu können, wird es dehydriert und nach Titanbeschichtung wieder rehydriert. Elektronenmikroskopisch zeigen sich Risse, die durch die Schwellung des Perikards während der Rehydrierung gebildet werden (Abb.23) [13]. In diesen Rissen liegt kollagenes Gewebe frei und kann die sekundäre Gerinnung aktivieren. In diesen Rissen könnten auch freie Aldehydgruppen an die Oberfläche gelangen und die Gerinnungsaktivierung weiter begünstigen.

Durch neuere Trocknungsmethoden kann eine Schwellung des Kollagens, und folglich die Rissbildung in der Titanschicht potenziell verhindert werden. Eine geschlossene Titanschicht auf der kollagenen Oberfläche würde dann einer übermäßigen sekundären Gerinnungsaktivierung entgegenwirken. Unterbliebe die Interaktion mit dem Kollagen, ließen sich ähnliche Ergebnisse wie beim ePTFE erwarten. Die Änderungen am PACVD-Verfahren selbst könnten jedoch wiederum die Gerinnung beeinflussen. Da es bereits Ansätze zur Vermeidung einer Schwellung des Perikards durch De- und Rehydrierung bei der PACVD gibt, müssten die vorliegenden Ergebnisse nach Anwendung des neu veränderten Verfahrens reevaluiert werden.

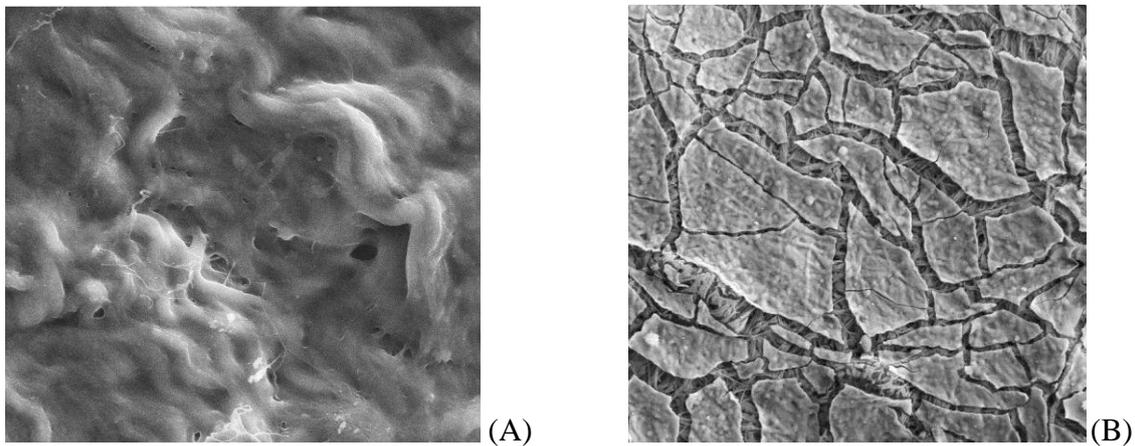


Abbildung 23: Oberflächenrisse bei rehydriertem titanisiertem, glutaraldehydfixiertem Rinderperikard. REM von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard mit einer Vergrößerung von 5000x, dehydriert mit kompletter Titanbeschichtung (A) und rehydriert, geschwellenen mit aufgebrochener Titanschicht und Einkerbungen (B) [13]. (REM = Rasterelektronenmikroskopie)

Die freiliegenden kollagenen Fasern führten jedoch nicht zu einer Erhöhung der primären Gerinnung bei Kontakt von Blut mit glutaraldehydfixiertem Rinderperikard. Die Stabilisierung der Oberflächenmoleküle und die Inkorporation polarer Gruppen durch die PACVD könnten dort der Erhöhung der primären Hämostase entgegenwirken.

4.4 Klinische Bedeutung einer Titanisierung von Blutkontaktflächen

Die Titanisierung von Blutkontaktflächen aus ePTFE und glutaraldehydfixiertem Rinderperikard ist von großer klinischer Bedeutung. In dieser Studie zeigten sich vielversprechende Ergebnisse, wenn man die verringerte Thrombogenität titanisierter ePTFE-Blutkontaktflächen betrachtet. Sollte sich die hier nachgewiesene Verbesserung der Thrombogenität von ePTFE-Gefäßprothesen in vivo bestätigen, könnten ihre Offenheitsraten steigen und erneute Durchblutungs- und Funktionsstörungen durch Thrombose und Prothesenverschlüsse verringert werden.

Die reduzierte Thrombozytenaktivierung nach Titanisierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard deutet zunächst auf eine verringerte Thrombogenität hin, die signifikant erhöhte sekundäre Gerinnungsaktivierung weist hingegen auf ein höheres Risiko für thrombotische Ereignisse und Embolien hin. Der klinische Effekt ist daher nicht klar abzuschätzen.

4.4.1 Titanisiertes gerecktes Polytetrafluorethylen

Gefäßprothesen aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) werden zum Ersatz von hochgradig stenosierte oder verschlossenen Arterien der Extremitäten verwendet, wenn keine autologen Gefäße zur Verfügung stehen. Sie können nach Implantation durch Thrombenbildung und intimale Hyperplasie Stenosieren, so dass die Offenheit der Prothese eingeschränkt wird. Hieraus resultieren dann in den abhängigen Geweben wieder Durchblutungs- und Funktionsstörungen, welche sogar zur Amputation führen können [1, 2]. Insbesondere beim Ersatz von kleinlumigen Gefäßen lagen die Vierjahresoffenheitsraten von Gefäßprothesen aus ePTFE bei nur etwa 25 Prozent in kleinlumigen Gefäßersatz und bei nur zwölf Prozent in infragenikulären Bypassen, wenn der Blutabfluss gehindert war [8].

Durch die Titanisierung von ePTFE sank die Thrombogenität von ePTFE im Vergleich zu unbehandeltem ePTFE und somit das Risiko für thrombotische Ereignisse. Durch die Reduktion der Thrombenbildung in titanisierten ePTFE-Gefäßprothesen können höhere

Offenheitsraten erwartet werden. Erneute Durchblutungs-, Funktionseinschränkungen oder Operationen bis hin zur Amputation könnten so vermindert werden. Durch die reduzierte Thrombogenität ergäbe sich möglicherweise auch eine Erweiterung des Anwendungsgebietes von ePTFE-Gefäßprothesen, zum Beispiel bei Dialyseshunt oder zum Ersatz von koronaren Mikrogefäßen.

Auf titanbeschichtetem ePTFE lagerten sich zudem autologe Zellen an, die sich in Endothelzellen umwandeln können [44]. Die Ausbildung einer intakten Endothelschicht hingegen könnte die Offenheitsrate, insbesondere über längere Zeiträume, steigern und vor allem Spätthrombosen verringern. Die Zahl an Frühthrombosen könnte durch die geringere Thrombogenität von titanisiertem ePTFE vor Ausbildung der intakten Endothelschicht gesenkt werden. Folglich könnte durch die Titanisierung von ePTFE sowohl das Risiko für Früh- als auch für Spätthrombosen gemindert sein.

Vor dem Einsatz titanisierter ePTFE-Gefäßprothesen müssen jedoch weitere Testungen unter Flussbedingungen und in vivo stattfinden. Je nach Ausmaß der Thrombogenität titanisierter ePTFE-Gefäßprothesen in vivo, kann eine gerinnungshemmende lokale oder systemische Therapie diskutiert werden bis sich das schützende Endothel gebildet hat. Die lokale gerinnungshemmende Therapie durch medikamentenbeschichtete Gefäßprothesen zeigt einerseits eine Reduktion der Thrombogenität von Gefäßprothesen [5, 18]. Andererseits werden zum Beispiel durch Heparin glatte Muskelzellen und somit die Integration der Prothese in das umliegende Gewebe gehemmt [6]. Dies könnte dazu führen, dass sich Neoendothel verzögert ausbildet. Damit übereinstimmend ist nach Beschichtung mit Heparin ein erhöhtes Risiko für Spätthrombosen beschrieben worden [5]. Auch bei einer systemischen Antikoagulation ist die Auswirkung auf die Endothelzellbesiedlung unklar und könnte zwar die Zahl an Frühthrombosen reduzieren, aber durch Hinderung der Endothelzellbesiedlung Spätthrombosen fördern.

Auf die Verwendung von Fibrinkleber sollte nach Möglichkeit verzichtet werden, da dies ein großes Risiko für thrombotische Ereignisse, schwere allergische Reaktionen und sogar plötzliche Todesfälle darstellen kann [106].

4.4.2 Titanisiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard

Biologische Herzklappenprothesen, welche im Gegensatz zu mechanischen Herzklappenprothesen keine therapeutische Antikoagulation erfordern, sind durch immunologische und

thrombotische Prozesse in ihrer Haltbarkeit beschränkt. Eine Verminderung der Thrombogenität und die Ausbildung einer regenerationsfähigen Endothelschicht könnten die Haltbarkeit biologischer Herzklappenprothesen verlängern, was insbesondere bei jüngeren Patienten relevant wird.

Durch das neuartige PACVD-Verfahren, welches durch die Verwendung niedriger Temperaturen [41] erstmalig die nanotechnologische Beschichtung biologischer Gewebe ermöglichte, konnte glutaraldehydfixiertes Rinderperikard mit Titan beschichtet werden. Durch die komplette Oberflächenbeschichtung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard mit Titan mittels PACVD war die Ausbildung eines intaktes Endothels möglich [72], welches die Haltbarkeit biologischer Herzklappenprothesen aus glutaraldehydfixiertem Rinderperikard erhöhen könnte.

Anders als beim titanisierten ePTFE zeigten sich differente Ergebnisse bei der Analyse der Gerinnungsaktivierung durch titanisiertes, glutaraldehydfixiertes Rinderperikard. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch die Titanisierung gesenkt, die sekundäre Hämostase erhöht. Ob eine Veränderung in der Durchführung der Plasma-aktivierten chemischen Gasphasenabscheidung zu einer kompletten Beschichtung des glutaraldehydfixierten Rinderperikards ohne freiliegendes Kollagen und somit zur Reduktion der sekundären Gerinnung führt, ist Gegenstand nachfolgender Forschung. Dies sollte vor weitergehenden Analysen unter Flussbedingungen oder in vivo durchgeführt werden. Sollte sich dann, analog zum ePTFE, eine Reduktion der Thrombogenität ergeben, könnte sich die Haltbarkeit biologischer Herzklappenprothesen hierdurch und durch Ausbildung eines Endothels deutlich verbessern. Biologische Herzklappenprothesen könnten dann potenziell auch bei jüngeren Patienten verwendet werden, um Blutungskomplikationen durch die therapeutische Antikoagulation bei Verwendung mechanischer Klappen zu vermeiden.

Sollte sich hingegen unerwartet eine Erhöhung der Thrombogenität der neuen, titanisierten kollagenen Blutkontaktflächen weiteren Studien ergeben, müsste eine Antikoagulation oder eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie diskutiert werden. Diese sollte dann bis zur intakten Funktion des Neoendothels durchgeführt werden, um Frühthrombosen vorzubeugen. Eine Re-Endothelialisierung von Gefäßen nach Gefäßverletzung beträgt durchschnittlich sieben bis zehn Tage, wobei die Funktionsstörung des Endothels noch vier bis zwölf Wochen andauern kann [32]. Für Herzklappenprothesen aus menschlichem Gewebe konnte eine Endothelialisierung nach sechs bis zehn Tagen nachgewiesen werden

[107], sodass sich für detoxifizierte, glutaraldehydfixierte Herzklappenprothesen ähnliche Zeiten vermuten lassen.

Eine gerinnungshemmende Therapie mit Phenprocoumon (Marcumar) wäre bei einer Erhöhung der sekundären Hämostase bei titanisierten Oberflächen denkbar. Phenprocoumon inhibiert durch Hemmung der Vitamin-K-abhängigen γ -Carboxylierung die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X [26]. Für die Einnahme von Warfarin, einem verwandten Wirkstoff des Phenprocoumons, konnte bereits eine daraus resultierende Verringerung der Prothrombinfragmente nachgewiesen werden [108]. Eine Therapie mit Aspirin (Acetylsalicylsäure), welches die Thrombozytenadhäsion und -aggregation hemmt [26], wäre aufgrund der Reduktion der primären Gerinnung *in vitro* durch die Titanbeschichtung mittels PACVD nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zielführend. Neuere Gerinnungshemmer wie der Faktor Xa-Antagonist Rivaroxaban oder der Thrombininhibitor Dabigatran wären als Alternative zur Cumarintherapie denkbar. Reduziert man durch eine gerinnungshemmende Medikation das Risiko für Frühthrombosen, könnte trotz erhöhter Thrombogenität des titanisierten, glutaraldehydfixierten Rinderperikards, die Haltbarkeit durch die Ausbildung einer intakten Endothelschicht verbessert sein. Eine endgültige Aussage über die Notwendigkeit einer Antikoagulation oder thrombozytenaggregationshemmenden Therapie kann aber erst nach weiteren Studien erfolgen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer Titanisierung von heterologen Blutkontaktflächen auf die Gerinnungsaktivierung zu untersuchen bevor sich eine körpereigene Endothelzellschicht darauf gebildet hat.

Hierzu wurden Blutkontaktflächen zum Einen aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE), als Ausgangsmaterial von polymeren Gefäßprothesen, und zum Anderen aus glutaraldehydfixiertem Rinderperikard, zur Herstellung biologischer Herzklappenprothesen, mittels Plasma-aktivierter chemischer Gasphasenabscheidung mit Titan beschichtet. Nach Inkubation des jeweiligen Materials mit Vollblut von sechs gesunden Probanden wurde durch Bestimmung der Blutplasmakonzentrationen von Plättchenfaktor 4 (PF4), der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) und der Prothrombinfragmente 1+2 (F1+2) die Thrombogenität der Blutkontaktflächen getestet. PF4 diente hierbei als Marker für die primäre Hämostase, TAT und F1+2 dienten als Parameter der sekundären Hämostase.

Die Titanisierung von ePTFE bewirkte eine signifikante Reduktion der PF4-Konzentration im Blutplasma von $35,928 \pm 12,305$ IU/ml auf $6,582 \pm 1,774$ IU/ml ($p < 0,05$). Die Plasmakonzentration an TAT ohne ($2,237 \pm 0,263$ µg/l) und mit ($2,385 \pm 0,343$ µg/l) Titanisierung von ePTFE sowie die Plasmakonzentration an F1+2 ohne ($167,080 \pm 8,604$ pmol/l) und mit Titanisierung ($171,598 \pm 31,712$ pmol/l) unterschieden sich nicht signifikant.

Bei glutaraldehydfixiertem Rinderperikard bewirkte die Titanisierung erstens eine signifikante Reduktion der Konzentration an PF4 von $40,984 \pm 25,184$ IU/ml auf $7,798 \pm 2,284$ IU/ml ($p < 0,05$), zweitens eine nicht signifikante Veränderung an TAT von $2,237 \pm 0,263$ µg/l auf $2,385 \pm 0,343$ µg/l, und drittens eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen an F1+2 von $119,871 \pm 8,454$ pmol/l auf $298,062 \pm 48,719$ pmol/l ($p < 0,05$).

In den durchgeführten Thrombogenitätsanalysen zeigte sich demnach eine erhebliche Reduktion des thrombogenen Potenzials durch Titanisierung von ePTFE durch eine verringerte Aktivierung der primären Hämostase. Die Titanisierung kann daher als potenziell wegweisender Ansatz zur Erhöhung der Offenheitsraten von polymeren Gefäßprothesen aus ePTFE gelten. Titanisiertes ePTFE sollte daher für den klinischen Einsatz weiter getestet werden.

Die Titanisierung von glutaraldehydfixiertem Rinderperikard führte hingegen zu einer übermäßigen Aktivierung der sekundären Hämostase und damit zur Zunahme des thrombogenen Potenzials biologischer Herzklappenprothesen, weshalb ein klinischer Einsatz ungeeignet erscheint. Ob Veränderungen des Titanisierungsverfahrens zu einer Abnahme der Gerinnungsaktivierung führen können, muss daher evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Böcker W, Denk H, Heitz PhU: Pathologie. München, Elsevier, 2004: p. 1289.
- 2 Müller M: *Chirurgie*. 9 edn. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste; 2008/09.
- 3 Zdrahala RJ: Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art. *J Biomater Appl*. 1996;10: 309-29.
- 4 Sipehia R, Liszkowski M, Lu A: In vivo evaluation of ammonia plasma modified ePTFE grafts for small diameter blood vessels replacement. A preliminary report. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2001;42: 537-42.
- 5 Sarkar S, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM: Addressing thrombogenicity in vascular graft construction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;82: 100-8.
- 6 Nishibe T, Kondo Y, Muto A, Dardik A: Optimal prosthetic graft design for small diameter vascular grafts. *Vascular*. 2007;15: 356-60.
- 7 Takami Y, Tajima K, Kato W, Fujii K, Hibino M, Munakata H, Uchida K, Sakai Y: Long-term size follow-up of knitted Dacron grafts (Gelseal) used in the ascending aorta. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012;14: 529-31.
- 8 Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM: Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74: 570-81.
- 9 Elliott MP, Gazzaniga AB, Thomas JM, Haiduc NJ, Rosen SM: Use of expanded polytetrafluoroethylene grafts for vascular access in hemodialysis: laboratory and clinical evaluation. *Am Surg*. 1977;43: 455-9.
- 10 Campbell CD, Brooks DH, Webster MW, Bahnson HT: The use of expanded microporous polytetrafluoroethylene for limb salvage: a preliminary report. *Surgery*. 1976;79: 485-91.
- 11 Takagi H, Goto SN, Matsui M, Manabe H, Umemoto T: A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting. *J Vasc Surg*. 2010;52: 232-6.
- 12 Roll S, Muller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, Willich SN: Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. *BMC Surg*. 2008;8: 22.
- 13 Guldner NW, MD; Bastian, Fabienne, MD; Weigel, Günther, MD; Zimmermann, Hanngörg, MS; Maleika, Markus, MS; Scharfschwerdt, Michael, MS; Rohde, Daniel, MS; Sievers, Hans-Hinrich, MD: Nano- Coating with Titanium Reduces the

- iC3b- and Granulocyte- Activating Immune Response Against Glutaraldehyde-Fixed Bovine Pericardium - A New Technique to Improve the Durability of Biologic Heart Valve Prostheses? *Thorac cardiovasc Surg* 2010. 2010;58: 16.
- 14 Schoen FJ, Levy RJ: Heart valve bioprotheses: antimineralization. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1992;6 Suppl 1: S91-3; .
- 15 Herold G: *Innere Medizin*. Köln, Gerd Herold und Mitarbeiter, 2007: p. 141-54.
- 16 Talman EA, Boughner DR: Glutaraldehyde fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue. *Ann Thorac Surg*. 1995;60: S369-73.
- 17 Nesser K, Erny-Albrecht K, Völler H, Weber C: Antikoagulation mit oralen Vitamin-K-Antagonisten bei Risikopatienten: klinischer und wirtschaftlicher Nutzen einer adäquaten Prävention. *Journal für Kardiologie*. 2006;13: 313-20.
- 18 Kapadia MR, Popowich DA, Kibbe MR: Modified prosthetic vascular conduits. *Circulation*. 2008;117: 1873-82.
- 19 Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH: Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;27: 357-62.
- 20 Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, White-Flores S, Samson RH, Scher LA, Towne JB, Bernhard VM, Bonier P, Flinn WR, et al.: Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg*. 1986;3: 104-14.
- 21 Spijker HT, Graaff R, Boonstra PW, Busscher HJ, van Oeveren W: On the influence of flow conditions and wettability on blood material interactions. *Biomaterials*. 2003;24: 4717-27.
- 22 Burkel WE: The challenge of small diameter vascular grafts. *Med Prog Technol*. 1988;14: 165-75.
- 23 Lin PH, Bush RL, Yao Q, Lumsden AB, Chen C: Evaluation of platelet deposition and neointimal hyperplasia of heparin-coated small-caliber ePTFE grafts in a canine femoral artery bypass model. *J Surg Res*. 2004;118: 45-52.
- 24 Anamelechi CC, Truskey GA, Reichert WM: Mylar and Teflon-AF as cell culture substrates for studying endothelial cell adhesion. *Biomaterials*. 2005;26: 6887-96.
- 25 Muneera R. Kapadia DAP, Melina R. Kibbe: Modified Prosthetic Vascular Conduits. *Circulation* 2008. 2008;117: 1873-82.
- 26 Aktories K, Försterling U, Hofmann F, Starke K.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München, Urban & Fischer, 2005: p. 531-44.

- 27 Begovac PC, Thomson RC, Fisher JL, Hughson A, Gallhagen A: Improvements in GORE-TEX vascular graft performance by Carmeda BioActive surface heparin immobilization. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25: 432-7.
- 28 Losel-Sadee H, Alefelder C: Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene graft for infragenicular bypass: five-year results. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2009;50: 339-43.
- 29 Dorigo W, Pulli R, Piffaretti G, Castelli P, Griselli F, Dorrucchi V, Ferilli F, Ottavi P, De Blasis G, Scalisi L, Monaca V, Battaglia G, Vecchiati E, Casali G, Pratesi C: Results from an Italian multicentric registry comparing heparin-bonded ePTFE graft and autologous saphenous vein in below-knee femoro-popliteal bypasses. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2011;53: 187-94.
- 30 Dorigo W, Pulli R, Castelli P, Dorrucchi V, Ferilli F, De Blasis G, Monaca V, Vecchiati E, Pratesi C: A multicenter comparison between autologous saphenous vein and heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft in the treatment of critical limb ischemia in diabetics. *J Vasc Surg.* 2011;54: 1332-8.
- 31 Heise M, Schmidmaier G, Husmann I, Heidenhain C, Schmidt J, Neuhaus P, Settmacher U: PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;32: 418-24.
- 32 Zilla P, von Oppell U, Deutsch M: The endothelium: a key to the future. *J Card Surg.* 1993;8: 32-60.
- 33 Kapfer X, Meichelboeck W, Groegler FM: Comparison of carbon-impregnated and standard ePTFE prostheses in extra-anatomical anterior tibial artery bypass: a prospective randomized multicenter study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;32: 155-68.
- 34 Bordenave L, Fernandez P, Remy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D: In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;33: 227-34.
- 35 Vohra RK, Thomson GJ, Sharma H, Carr HM, Walker MG: Effects of shear stress on endothelial cell monolayers on expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts using preclot and fibronectin matrices. *Eur J Vasc Surg.* 1990;4: 33-41.
- 36 Cikirikcioglu M, Sedelnikov N, Osorio-Da Cruz S, Khabiri E, Donmez Antal A, Tatar T, Tille JC, Hess OM, Kalangos A, Walpoth BH: Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating. *Int J Artif Organs.* 2006;29: 990-9.

- 37 Alf ME, Asatekin A, Barr MC, Baxamusa SH, Chelawat H, Ozaydin-Ince G, Petruczok CD, Screenivasan R, Tenhaeff WE, Trujillo NJ, Vaddiraju S, Xu J, Gleason KK: Chemical Vapor Deposition of Conformal, Functional, and Responsive Polymer Films. *Adv Mater.* 2010: 1993-2027.
- 38 Dumitrascu N, Borcia C, Borcia G: Control of the blood-polymer interface by plasma treatment. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;87: 364-73.
- 39 Hirner M: Überblick über die Terminologie der Nanotechnologie. Wien, Universität zu Wien, 2005: p. 70.
- 40 Unger E: Die Erzeugung dünner Schichten. Das PECVD- Verfahren: Gasphasenabscheidung in einem Plasma. *Chemie in unserer Zeit Wiley VCH.* 1991;25: 148-58.
- 41 Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Meier V, Fluss F, Rohde D, Gebert A, Sievers HH: Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation.* 2009;119: 1653-60.
- 42 Grill A: *Cold Plasma in Materials Fabrication: From Fundamentals to Application.* New York, IEEE Press, 1994.
- 43 Siveram S: *Chemical Vapor Deposition: Thermal and Plasma Deposition of Electronic Materials.* New York: NY: Van Nostrand Reinhold; 1995.
- 44 Pareta RA, Reising AB, Miller T, Storey D, Webster TJ: Increased endothelial cell adhesion on plasma modified nanostructured polymeric and metallic surfaces for vascular stent applications. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103: 459-71.
- 45 Lamm P, Adelhard K, Juchem G, Weitkunat R, Milz S, Kilger E, Gotz A, Reichart B: Fibrin glue in coronary artery bypass grafting operations: casting out the Devil with Beelzebub? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;32: 567-72.
- 46 Cremer J: Fibrin glue in coronary surgery. *European Journal of Cardio- Thoracic Surgery.* 2007;32: 559.
- 47 Baxter G: Fachinformation Tissucol Duo S Immuno. Baxter GmbH, 1987.
- 48 Zilla P, Fasol R, Preiss P, Kadletz M, Deutsch M, Schima H, Tsangaris S, Groscurth P: Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery.* 1989;105: 515-22.
- 49 Marek CA, Amiss LR, Jr., Morgan RF, Spotnitz WD, Drake DB: Acute thrombogenic effects of fibrin sealant on microvascular anastomoses in a rat model. *Ann Plast Surg.* 1998;41: 415-9.
- 50 Drake DB, Ferguson RE, Jr.: Fibrin sealants in microvascular surgery: current status. *J Long Term Eff Med Implants.* 2001;11: 65-72.

- 51 Leukauf C, Szeles C, Salaymeh L, Grimm M, Grabenwoger M, Losert U, Moritz A, Wolner E: In vitro and in vivo endothelialization of glutaraldehyde treated bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 1993;2: 230-5.
- 52 Valente M, Pettenazzo E, Thiene G, Molin GM, Martignago F, De Giorgi G, Gatti AM, Giaretta A, Pasquino E, Talenti E, Rinaldi S: Detoxified glutaraldehyde cross-linked pericardium: tissue preservation and mineralization mitigation in a subcutaneous rat model. *J Heart Valve Dis.* 1998;7: 283-91.
- 53 Eimer C: Experimentelle Untersuchung des in der Herzchirurgie verwendeten, bovinen NO – REACT Perikardpatches im Zusammenhang mit postoperativ beobachteten Spätkomplikationen.; Institut für chirurgische Forschung. München, Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2007: p. 114.
- 54 Yang M, Chen CZ, Wang XN, Zhu YB, Gu YJ: Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91: 354-61.
- 55 Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, Wahlers T, Stock UA: Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol.* 2003;143: 201-8.
- 56 Simionescu DT: Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4: 1971-85.
- 57 Gendler E, Gendler S, Nimni ME: Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. *J Biomed Mater Res.* 1984;18: 727-36.
- 58 Lubig K, Röper, Zahn: Zum Reaktionsmechanismus von Glutaraldehyd mit Proteinen; Monatsheft für Chemie. RWTH Aachen, Springer- Verlag, 1981: p. 1313-23.
- 59 Cheung DT, Tong D, Perelman N, Ertl D, Nimni ME: Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. IV: In vitro and in vivo stability of a crosslinked collagen matrix. *Connect Tissue Res.* 1990;25: 27-34.
- 60 Schoen FJ, Harasaki H, Kim KM, Anderson HC, Levy RJ: Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J Biomed Mater Res.* 1988;22: 11-36.
- 61 Magilligan DJ, Jr., Oyama C, Klein S, Riddle JM, Smith D: Platelet adherence to bioprosthetic cardiac valves. *Am J Cardiol.* 1984;53: 945-9.

- 62 Grabenwoger M, Sider J, Fitzal F, Zelenka C, Windberger U, Grimm M, Moritz A, Bock P, Wolner E: Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann Thorac Surg.* 1996;62: 772-7.
- 63 Lundquist F: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer, 1974: p. 1509-13, 55-59.
- 64 Zhuo R, Siedlecki CA, Vogler EA: Competitive-protein adsorption in contact activation of blood factor XII. *Biomaterials.* 2007;28: 4355-69.
- 65 Beutler HO: Methods of Enzymatic Analysis Bergmeyer, H. U.; Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel, 1984: p. 606-13.
- 66 Zeeck A, Fischer S, Grond S, Papastavrou I.: Chemie für Mediziner. München, Jena, 2003: p. 245-51.
- 67 Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ: The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol.* 1987;127: 122-30.
- 68 Schoen FJ, Levy RJ: Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79: 1072-80.
- 69 Sucu N, Tamer L, Aytacoglu B, Polat A, Dondas HA, Gul A, Dikmengil M, Atik U: Inhibition of calcification with citric acid in pericardial bioprosthetic heart valve material: a preliminary report. *J Heart Valve Dis.* 2004;13: 697-700.
- 70 Fisher AC, Bernacca GM, Mackay TG, Dimitri WR, Wilkinson R, Wheatley DJ: Calcification modelling in artificial heart valves. *Int J Artif Organs.* 1992;15: 284-8.
- 71 Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, Glancy R: A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2006;47: 711-8.
- 72 Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Großherr M, Klinger M, Sievers HH: The first self-endothelialized titanium-coated glutaraldehyde-fixed heart valve prosthesis within systemic circulation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* July 2009: 248ff.
- 73 Schmidt RF, Thews R, Lang F: Physiologie des Menschen. Springer Verlag, 2000: p. 427-34.
- 74 Silbernagel S, Despopoulos A: Taschenatlas der Physiologie. Thieme Verlag, 2003: p. 102-5.
- 75 Thomas L: Labor und Diagnose. TH books, 2005: p. 790-801.

- 76 Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E: Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1: 17-20.
- 77 Packham MA, Mustard JF: Platelet adhesion. *Prog Hemost Thromb.* 1984;7: 211-88.
- 78 Owren PA, Stormorken H: The mechanism of blood coagulation. *Ergeb Physiol.* 1973;68: 1-53.
- 79 Lammle B, Griffin JH: Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors. *Clin Haematol.* 1985;14: 281-342.
- 80 Zucker MB, Katz IR: Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991;198: 693-702.
- 81 Bolton AE, Ludlam CA, Pepper DS, Moore S, Cash JD: A radioimmunoassay for platelet factor 4. *Thromb Res.* 1976;8: 51-8.
- 82 Slungaard A, Fernandez JA, Griffin JH, Key NS, Long JR, Piegors DJ, Lentz SR: Platelet factor 4 enhances generation of activated protein C in vitro and in vivo. *Blood.* 2003;102: 146-51.
- 83 Eisman R, Surrey S, Ramachandran B, Schwartz E, Poncz M: Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood.* 1990;76: 336-44.
- 84 Blanke H, Praetorius G, Leschke M, Seitz R, Egbring R, Strauer BE: [Significance of the thrombin-antithrombin III complex in the diagnosis of pulmonary embolism and deep venous thrombosis--comparison with fibrinopeptide A, platelet factor 4 and beta-thromboglobulin]. *Klin Wochenschr.* 1987;65: 757-63.
- 85 Pelzer H, Schwarz A, Stuber W: Determination of human prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb Haemost.* 1991;65: 153-9.
- 86 Tripodi A, Cattaneo M, Molteni A, Cesana BM, Mannucci PM: Changes of prothrombin fragment 1+2 (F 1+2) as a function of increasing intensity of oral anticoagulation--considerations on the suitability of F 1+2 to monitor oral anticoagulant treatment. *Thromb Haemost.* 1998;79: 571-3.
- 87 Pelzer H, Schwarz A, Heimburger N: Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb Haemost.* 1988;59: 101-6.
- 88 Guidoin R, Chakfe N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M, Gosselin C: Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials.* 1993;14: 678-93.

- 89 Yeh Y-S, Iriyama Y, Matsuzawa Y, Hanson SR, Yasuda H: Blood compatibility of surfaces modified by plasma polymerization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1988;22: 795-818.
- 90 Rhodes NP, Wilson DJ, Williams RL: The effect of gas plasma modification on platelet and contact phase activation processes. *Biomaterials*. 2007;28: 4561-70.
- 91 Windecker S, Mayer I, De Pasquale G, Maier W, Dirsch O, De Groot P, Wu YP, Noll G, Leskosek B, Meier B, Hess OM: Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia. *Circulation*. 2001;104: 928-33.
- 92 Bolz A, Schaldach M: Artificial heart valves: improved blood compatibility by PECVD a-SiC:H coating. *Artif Organs*. 1990;14: 260-9.
- 93 Roy RK, Choi HW, Yi JW, Moon MW, Lee KR, Han DK, Shin JH, Kamijo A, Hasebe T: Hemocompatibility of surface-modified, silicon-incorporated, diamond-like carbon films. *Acta Biomater*. 2009;5: 249-56.
- 94 Ratner BD: The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials*. 2007;28: 5144-7.
- 95 Sin DC, Kei HL, Miao X: Surface coatings for ventricular assist devices. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6: 51-60.
- 96 Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, Weigel G, Simon P: Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis*. 2006;15: 278-86; .
- 97 Vogler EA, Siedlecki CA: Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*. 2009;30: 1857-69.
- 98 Kambic HE, Kiraly RJ, Nose Y: A simple in vitro screening test for blood compatibility of materials. *J Biomed Mater Res*. 1976;10: 561-70.
- 99 Sefton MV: Perspective on hemocompatibility testing. *J Biomed Mater Res*. 2001;55: 445-6.
- 100 Hollweck T, Marschmann M, Hartmann I, Akra B, Meiser B, Reichart B, Eblenkamp M, Wintermantel E, Eissner G: Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds. *Biomed Mater*. 2010;5: Artikelnr.:065004.
- 101 Levy RJ: Glutaraldehyde and the calcification mechanism of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis*. 1994;3: 101-4.

- 102 Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Simon P: The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost.* 2005;94: 562-7.
- 103 Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock UA: Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials.* 2010;31: 2549-54.
- 104 Lee CH: Physiological variables involved in heart valve substitute calcification. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9: 1031-42.
- 105 Thor A, Rasmusson L, Wennerberg A, Thomsen P, Hirsch JM, Nilsson B, Hong J: The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007;28: 966-74.
- 106 Kanchuger MS, Eide TR, Manecke GR, Hartman A, Poppers PJ: The hemodynamic effects of topical fibrin glue during cardiac operations. *J Cardiothorac Anesth.* 1989;3: 745-7.
- 107 Eberl T, Siedler S, Schumacher B, Zilla P, Schlaudraff K, Fasol R: Experimental in vitro endothelialization of cardiac valve leaflets. *Ann Thorac Surg.* 1992;53: 487-92.
- 108 Bauer KA, Barzegar S, Rosenberg RD: Influence of anticoagulants used for blood collection on plasma prothrombin fragment F1 + 2 measurements. *Thromb Res.* 1991;63: 617-28.

7. Tabellen

7.1 Gerinnungsfaktoren und Referenzbereiche

Tabelle 1: Auflistung der Gerinnungsfaktoren mit Bezeichnung und Eigenschaft, modifiziert nach Schmidt et al. [73].

Faktor (F)	Bezeichnung, Synonym	Eigenschaft, Funktion
I	Fibrinogen	lösliches Eiweiß, Vorstufe des Fibrins
II	Prothrombin	α_1 -Globulin, Proenzym des Thrombins (Protease)
III	Gewebe-thromboplastin	Phospholipoprotein, aktiv im extrinsischen Gerinnungssystem
IV	Ca^{2+} (Kalzium)	Notwendig bei der Aktivierung der meisten Gerinnungsfaktoren
V	Proakzelerin, Akzeleratorglobulin	lösliches β -Globulin, bindet an die Thrombozytenmembran; aktiviert durch Faktor II_a und Ca^{2+} Faktor V_a , ist Bestandteil des Prothrombinasekomplex
VI	Enfällt (aktivierter Faktor V)	
VII	Prokonvertin	α -Globulin, Proenzym (Protease); Faktor VII_a aktiviert mit Faktor III und Ca^{2+} den Faktor X im extrinsischen System
VIII	Antihämophiles Globulin, AHG	β_2 -Globulin, bildet Komplex mit <i>von Willebrand</i> -Faktor; aktiviert durch Faktor II_a und Ca^{2+} ; Faktor VIII_a ist Kofaktor bei der Umwandlung von Faktor X in Faktor X_a
IX	Christmas-Faktor	α -Globulin, kontaktsensibles (d.h. Formänderung bei Kontakt mit Oberflächen) Proenzym (Protease); Faktor IX_a aktiviert mit Plättchenfaktor 3, Faktor VIII_a und Ca^{2+} den Faktor X im intrinsischen System
X	Stuart-Prower-Faktor	α -Globulin, Proenzym (Protease); Faktor X_a ist Bestandteil des Prothrombinaktivators
XI	Plasmathromboplastinantecedent, PTA	γ -Globulin, kontaktsensibles Proenzym (Protease); Faktor XI_a aktiviert mit Ca^{2+} den Faktor IX
XII	Hageman-Faktor	β -Globulin, kontaktsensibles Proenzym (Protease); aktiviert durch Kontakt mit Kallikrein
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	β -Globulin, Proenzym (Transamidase); Faktor XIII_a bewirkt die Fibrinvernetzung
PKK	Präkallikrein, Fletcher-Faktor	β -Globulin, Proenzym (Protease); aktiviert durch Faktor XII_a ; Kallikrein unterstützt Aktivierung von Faktor XII und Faktor XI
HMK	Hoch molekulares Kininogen, Fitzgerald Faktor	α -Globulin; unterstützt Kontaktaktivierung von Faktor XII und Faktor XI

Tabelle 2: Referenz-/ Normalbereiche der analysierten Gerinnungsparameter Plättchenfaktor 4 (PF4), Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) und Prothrombinfragmenten (F1+2)

PF4	< 10	U/ml
TAT	1,0 - 4,1	µg/l
F1+2	69 - 229	pmol/l

7.2 Einzelwerte und statistische Daten für ePTFE

Tabelle 3: Vergleich der Blutplasmakonzentrationen von Plättchenfaktor 4 in IU/ml nach Inkubation mit unbehandeltem und titanisiertem ePTFE mit und ohne Zusatz von Fibrinkleber im Blutplasma; Vergleich statistischer Daten.

ePTFE	Unbehandelt	Titanisiert	Unbehandelt, Fibrinkleber	Titanisiert, Fibrinkleber
Leerwert	13,948	4,553	5,501	5,630
1.Probe	45,615	9,902	27,566	126,331*
2.Probe	23,262	4,385	102,971	72,717
3.Probe	22,370	6,254	97,230	98,091
4.Probe	57,333	4,977	19,844	124,751*
5.Probe	33,030	6,861	26,319	82,627
6.Probe	33,956	7,111	101,833	120,065*
Statistische Daten				
Mittelwert	35,928	6,582	62,627	104,097
Minimum	22,370	4,385	19,844	72,717
Maximum	57,333	9,902	102,971	126,331
SD	12,305	1,774	38,166	21,046

(SD = Standardabweichung; *Messwerte liegen oberhalb des oberen Messbereichs (>120 IU/ml) und wurden durch das Dynex-Analysegerät aus extrapolierten Standardkurven erreicht)

Tabelle 4: Vergleich der Plasmakonzentrationen der Thrombin-Antithrombin-Komplexe in $\mu\text{g/l}$ nach Inkubation mit unbehandeltem und titanisiertem ePTFE mit und ohne Zusatz von Fibrinkleber; Vergleich statistischer Daten

ePTFE	Unbehandelt	Titanisiert	Unbehandelt, Fibrinkleber	Titanisiert, Fibrinkleber
Leerwert	2,515	2,699	2,056	1,777
1.Probe	2,219	2,560	> 60,000*	> 60,000*
2.Probe	1,779	2,529	> 60,000*	> 60,000*
3.Probe	1,918	2,416	> 60,000*	> 60,000*
4.Probe	1,781	5,616	> 60,000*	> 60,000*
5.Probe	1,888	2,595	> 60,000*	> 60,000*
6.Probe	1,929	2,491	> 60,000*	> 60,000*
Statistische Daten				
Mittelwert	1,919	3,035	-	-
Minimum	1,779	2,416	-	-
Maximum	2,219	5,616	-	-
SD	0,147	1,266	-	-

(SD = Standardabweichung; *Messwerte oberhalb des Messbereichs (>60 $\mu\text{g/l}$) des Dynex-Analysegerätes, keine Berechnung durch Extrapolation der Standardkurven möglich)

Tabelle 5: Vergleich der Plasmakonzentrationen der Prothrombinfragmente F1+2 in pmol/l nach Inkubation mit unbehandeltem und titanisiertes ePTFE mit und ohne Zusatz von Fibrinkleber; Vergleich statistischer Daten.

	Unbehandelt	Titanisiert	Unbehandelt, Fibrinkleber	Titanisiert, Fibrinkleber
Leerwert	178,644	148,056	151,039	135,93
1.Probe	179,098	155,366	> 1200,000*	> 1200,000*
2.Probe	162,093	241,331	> 1200,000*	> 1200,000*
3.Probe	179,050	160,077	> 1200,000*	> 1200,000*
4.Probe	163,028	147,732	> 1200,000*	> 1200,000*
5.Probe	158,300	167,086	> 1200,000*	> 1200,000*
6.Probe	160,913	157,996	> 1200,000*	> 1200,000*
Statistische Daten				
Mittelwert	167,080	171,598	-	-
Minimum	158,300	147,732	-	-
Maximum	179,098	241,331	-	-
SD	8,604	31,712	-	-

(SD = Standardabweichung; * Messwerte oberhalb des Messbereichs (>1200 pmol/l) des Dynex-Analysegerätes, keine Berechnung durch Extrapolation der Standardkurven möglich)

7.3 Einzelwerte und statistische Daten für Rinderperikard

Tabelle 6: Vergleich der Blutplasmakonzentrationen von Plättchenfaktor 4 in IU/ml nach Inkubation mit verschieden behandeltem Rinderperikard; Vergleich statistischer Daten.

	GA	GA, CA 10 %	GA, ALDH	GA, ALDH, PAVCD, kein Titan	GA-AT
Leerwert	7,108	7,210	8,096	8,417	7,623
1. Probe	25,650	11,25	8,629	9,216	7,549
2. Probe	24,997	16,202	18,971	8,706	4,682
3. Probe	45,589	11,560	9,284	11,044	6,807
4. Probe	39,091	29,926	7,429	10,789	10,859
5. Probe	21,773	15,668	9,894	9,986	6,847
6. Probe	88,802	21,593	9,898	10,033	10,045
Statistische Daten					
Mittelwert	40,984	17,700	10,684	9,962	7,798
Minimum	21,773	11,250	7,429	8,706	4,682
Maximum	88,802	29,926	18,971	11,044	10,859
SD	25,184	7,075	4,164	0,894	2,284

(GA = Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard; CA 10 % = mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiertes GA; ALDH = mit Aldehyd-Dehydrogenase inkubiertes GA; PACVD = mit Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung behandeltes GA ohne Titanisierung; GA-AT = titanbeschichtetes, ALDH-inkubiertes GA; SD = Standardabweichung)

Tabelle 7: Vergleich der Konzentrationen der Thrombin-Antithrombin-Komplexe in µg/l nach Inkubation mit verschieden behandeltem Rinderperikard; Vergleich statistischer Daten.

	GA	GA, CA 10 %	GA, ALDH	GA, ALDH, PAVCD, kein Titan	GA-AT
Leerwert	1,554	3,550	2,017	2,522	2,077
1. Probe	1,987	3,301	2,188	2,450	2,212
2. Probe	2,629	2,591	1,785	2,616	2,081
3. Probe	2,314	1,507	1,944	2,613	2,901
4. Probe	2,042	2,120	1,883	4,252	2,480
5. Probe	2,432	2,309	2,782	1,976	2,540
6. Probe	2,019	3,428	2,441	7,534	2,095
Statistische Daten					
Mittelwert	2,237	2,543	2,171	3,574	2,385
Minimum	1,987	1,507	1,785	1,976	2,081
Maximum	2,629	3,428	2,782	7,534	2,901
SD	0,263	0,730	0,382	2,252	0,343

(GA = Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard; CA 10 % = mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiertes GA; ALDH = mit Aldehyd-Dehydrogenase inkubiertes GA; PACVD = mit Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung behandeltes GA ohne Titanisierung; GA-AT = titanbeschichtetes, ALDH-inkubiertes GA; SD = Standardabweichung)

Tabelle 8: Vergleich der Blutplasmakonzentration der Prothrombinfragmenten F1+2 in pmol/l nach Inkubation mit verschieden behandeltem Rinderperikard; Vergleich statistischer Daten.

	GA	GA, CA 10 %	GA, ALDH	GA, ALDH, PAVCD, kein Titan	GA-AT
Leerwert	123,408	116,943	105,036	105,842	114,240
1. Probe	130,072	103,271	103,455	127,947	246,903
2. Probe	110,023	86,003	81,781	292,493	244,042
3. Probe	109,462	90,950	83,09	118,959	306,485
4. Probe	122,078	96,891	110,328	172,109	299,125
5. Probe	121,319	86,618	92,247	124,810	374,906
6. Probe	126,272	92,270	110,404	162,451	316,912
Statistische Daten					
Mittelwert	119,871	92,667	96,884	166,462	298,062
Minimum	109,462	86,003	81,781	118,959	244,042
Maximum	130,072	103,271	110,404	292,493	374,906
SD	8,454	6,548	13,012	65,432	48,719

(GA = Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard; CA 10 % = mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiertes GA; ALDH = mit Aldehyd-Dehydrogenase inkubiertes GA; PACVD = mit Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung behandeltes GA ohne Titanisierung; GA-AT = titanbeschichtetes, ALDH-inkubiertes GA; SD = Standardabweichung)

Tabelle 9: Vergleich der Blutplasmakonzentrationen von Plättchenfaktor 4 in IU/ml nach Inkubation mit trypsinisiertem, verschieden behandeltem Rinderperikard; Vergleich statistischer Daten.

	GA, tryp.	GA, Ca 10 %, tryp.	GA, ALDH, tryp.	GA, ALDH, PACVD, kein Titan, tryp.	GA-AT, tryp.
Leerwert	9,267	7,217	9,474	7,195	7,690
1. Probe	30,076	12,145	17,443	10,722	8,056
2. Probe	16,835	18,893	75,669	9,951	18,324
3. Probe	58,293	45,853	57,337	7,427	6,699
4. Probe	70,113	18,392	55,839	17,967	8,025
5. Probe	35,515	10,241	54,281	10,016	7,180
6. Probe	62,871	18,088	69,527	11,758	8,306
Statistische Daten					
Mittelwert	45,617	20,602	55,016	11,307	9,432
Minimum	16,835	10,241	17,443	7,427	6,699
Maximum	70,113	45,853	75,669	17,967	18,324
SD	21,121	12,889	20,275	3,563	4,399

(GA = Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard; tryp. = mit Trypsin und EDTA inkubiert; CA 10 % = mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiertes GA; ALDH = mit Aldehyd-Dehydrogenase inkubiertes GA; PACVD = mit Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung behandeltes GA ohne Titanbeschichtung; GA-AT = titanbeschichtetes, ALDH-inkubiertes GA; SD = Standardabweichung)

Tabelle 10: Vergleich der Blutplasmakonzentrationen der Thrombin-Antithrombin-Komplexen in µg/l nach Inkubation mit trypsiniertem, verschieden behandeltem Rinderperikard; Vergleich statistischer Daten.

	GA, tryp.	GA, Ca 10 %, tryp.	GA, ALDH, tryp.	GA, ALDH, PACVD, kein Titan, tryp.	GA-AT, tryp.
Leerwert	1,83	1,686	2,11	2,112	1,814
1. Probe	1,963	1,688	1,970	1,882	1,652
2. Probe	2,107	1,612	2,527	2,162	1,926
3. Probe	1,813	1,693	2,225	2,015	1,822
4. Probe	1,627	1,524	2,390	2,077	2,121
5. Probe	2,043	2,071	2,131	2,031	2,546
6. Probe	6,418	1,704	3,740	1,833	1,824
Statistische Daten					
Mittelwert	2,662	1,715	2,497	2,000	1,981
Minimum	1,627	1,524	1,970	1,833	1,652
Maximum	6,418	2,071	3,740	2,162	2,546
SD	1,848	0,187	0,639	0,121	0,304

(GA = Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard; tryp. = mit Trypsin und EDTA inkubiert; CA 10 % = mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiertes GA; ALDH = mit Aldehyd-Dehydrogenase inkubiertes GA; PACVD = mit Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung behandeltes GA ohne Titanbeschichtung; GA-AT = titanbeschichtetes, ALDH-inkubiertes GA; SD. = Standardabweichung)

Tabelle 11: Vergleich der Blutplasmakonzentrationen von Prothrombinfragmenten F1+2 in pmol/l nach Inkubation mit trypsiniertem, verschieden behandeltem Rinderperikard; Vergleich statistischer Daten.

	GA, tryp.	GA, Ca 10 %, tryp.	GA, ALDH, tryp.	GA, ALDH, PACVD, kein Titan, tryp.	GA-AT, tryp.
Leerwert	113,943	106,163	108,624	102,082	86,832
1. Probe	274,701	100,727	113,272	94,807	301,68
2. Probe	187,051	107,752	103,5	101,152	274,914
3. Probe	97,901	110,079	117,163	117,732	357,812
4. Probe	93,943	132,241	104,373	100,806	387,702
5. Probe	113,683	100,284	112,34	93,152	365,216
6. Probe	156,361	93,783	127,139	101,195	261,241
Statistische Daten					
Mittelwert	153,94	107,478	112,965	101,474	324,761
Minimum	93,943	93,783	103,5	93,152	261,241
Maximum	274,701	132,241	127,139	117,732	387,702
Standabw.	69,348	13,453	8,746	8,702	52,427

(GA = Glutaraldehydfixiertes Rinderperikard; tryp. = mit Trypsin und EDTA inkubiert; CA 10 % = mit zehnpromzentiger Zitronensäure inkubiertes GA; ALDH = mit Aldehyd-Dehydrogenase inkubiertes GA; PACVD = mit Plasma-aktivierte chemische Gasphasenabscheidung behandeltes GA ohne Titanbeschichtung; GA-AT = titanbeschichtetes, ALDH-inkubiertes GA; SD = Standardabweichung)

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Frank Bode und Prof. Dr. med. Norbert Guldner für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Diskussion. Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Frank Bode für die Betreuung bis zum Abschluss dieser Arbeit. Dabei bin ich außerdem sehr dankbar für das große Entgegenkommen, das sich trotz des engen Zeitpensums nach meinen Wünschen gerichtet hat.

Frau Britta Keding und Frau Elisabeth Theißing danke ich für die Unterstützung und Betreuung bei der Herstellung und Modifikation der Rinderperikardproben, sowie Frau Dr. Inka Jasmund für die Betreuung im Kompetenzzentrum für Tissue Engineering.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wagner und Herrn Prof. Dr. med. Lehner für die Nutzung der hämatologischen Räumlichkeiten und des dortigen Materials danken. Frau Dr. med. Dörges und Frau Jurat gilt hierbei besonderer Dank für die gute hämatologische Betreuung.

Dem NFZ Pronat und der Schlachtereier Thomsen danke ich für die gute und reichliche Versorgung mit Rinderperikard.

Dr. med. Dirk Forstmeyer danke ich sehr für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen.

Ein großer Dank gilt zudem meiner Familie, Karen Schulze, Anika Hellberg und Sebastian Klein, die mich nicht nur fachlich in der Dissertation, sondern während meines ganzen Studiums unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:



Name: Sabrina Römer
Geburtsdatum/-ort: 10.11.1982 in Husum

Hochschulische Ausbildung:

10/2003 – 11/2009

Universität zu Lübeck

- 1. Staatsexamen mit der Note 2,5 (2005)
- 2. Staatsexamen mit der Note 2,5 (2009)
- Approbation: 25.11.2009

Praktisches Jahr:

05/2009 – 07/2009

Innere Medizin:

Forschungszentrum Borstel, Borstel

03/2009 – 05/2009

Allgemeine Innere Medizin und Hämatologie:

Health Science Center, St. John's, Kanada

12/2008 – 03/2009

Anästhesiologie:

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

08/2008 – 12/2008

Unfall- und Viszeralchirurgie:

Westküstenklinikum, Heide

Beruflicher Werdegang:

Seit 04/2010

Assistenzärztin in der Weiterbildung der Inneren Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie im Klinikum Braunschweig

Promotion:

01/2010 – 2013

Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit in der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck

Betreuer: PD Dr. med. F. Bode