

Aus dem Klinischen Forschungslabor der Thorax-,  
Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Verbesserung der Hämokompatibilität  
kardiovaskulärer Implantate durch  
Beschichtung mit Lubricin**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Silvia Bettina Sehr**  
Tierärztin aus Ulm

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4181







**Aus dem Klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des  
Universitätsklinikums Tübingen**

**Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

**Verbesserung der Hämokompatibilität kardiovaskulärer Implantate durch  
Beschichtung mit Lubricin**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Silvia Bettina Sehr  
Tierärztin aus Ulm**

Berlin 2020

**Journal-Nr.: 4181**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Zweiter Gutachter: PD Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

cardiovascular system, implantation, proteoglycans, blood vessels, blood,  
blood picture, endothelium, experimental surgery

Tag der Promotion: 17.02.2020

*Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://dnb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-046-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	II
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN .....	1
1.2. ATHEROSKLEROSE .....	1
1.2.1. <i>Atherogenese</i> .....	1
1.2.2. <i>Therapie</i> .....	3
1.2.2.1. Konservative Therapie .....	3
1.2.2.2. Chirurgische Intervention .....	3
1.2.2.2.1. Perkutane Transluminale (Coronare) Angioplastie (PT(C)A) .....	3
1.2.2.2.2. Koronarer arterieller Bypass .....	4
1.3. HERZKLAPPENERKRANKUNGEN .....	4
1.3.1. <i>Therapie</i> .....	5
1.3.1.1. Konservative Therapie .....	5
1.3.1.2. Chirurgische Intervention .....	5
1.3.1.2.1. Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) .....	5
1.3.1.2.2. Chirurgischer Herzklappenersatz .....	6
1.4. KOMPLIKATIONEN NACH IMPLANTATEINSATZ.....	6
1.4.1. <i>Derzeitige Verfahren zur Verminderung implantatassoziierter Komplikationen</i> .....	8
1.5. LUBRICIN / PRG4.....	10
1.6. RELEVANZ FÜR DIE VETERINÄRMEDIZIN .....	11
1.7. ZIEL DER ARBEIT .....	13
2. MATERIAL .....	15
3. METHODEN.....	22
3.1. QCM-MESSUNGEN .....	22
3.1.1. <i>Vorbereitung der Versuche</i> .....	22
3.1.2. <i>Untersuchung der Adsorption und Desorption von Lubricin auf Titan</i> .....	23
3.1.3. <i>Evaluation der Stabilität der Beschichtung</i> .....	23
3.1.4. <i>Untersuchung der antiadhäsiven Eigenschaften des Lubricins</i> .....	23
3.1.4.1. Messungen mit plättchenreichem Plasma .....	23
3.1.4.2. Messungen mit humanem Vollblut .....	24
3.1.5. <i>Reinigung der Titanquarze</i> .....	24

3.2.	BESCHICHTUNGSTECHNIKEN.....	24
3.2.1.	<i>Adsorptive Beschichtung</i> .....	24
3.2.2.	<i>Inkubationsbeschichtung</i> .....	24
3.2.3.	<i>Dip-Coating</i> .....	25
3.2.4.	<i>Kovalente Beschichtung</i> .....	25
3.3.	INKORPORATION DES LUBRICINS MITTELS ELEKTROSPINNEN .....	28
3.3.1.	<i>Vorversuch mit Rhodamin B</i> .....	29
3.3.2.	<i>Inkorporation des Lubricins</i> .....	30
3.4.	TESTUNG DER HÄMOKOMPATIBILITÄT.....	31
3.4.1.	<i>Blutentnahme</i> .....	32
3.4.2.	<i>Extrakorporale Zirkulation</i> .....	32
3.4.2.1.	Blutinkubation in der Mikrotiterplatte .....	32
3.4.2.2.	Chandler Loop .....	32
3.4.2.3.	Flow Loop .....	33
3.4.3.	<i>Analyse des Blutes</i> .....	34
3.4.4.	<i>Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Oberflächen</i> .....	36
3.5.	TEST AUF ENDOTHELIALISIERUNG.....	36
3.5.1.	<i>Auftauen und Kultivierung der Zellen (HUVECs und HEK293)</i> .....	36
3.5.2.	<i>Untersuchung der Zelladhäsion auf beschichteten Oberflächen</i> .....	36
3.6.	BAKTERIENVERSUCHE .....	37
3.6.1.	<i>Bakterienkultivierung</i> .....	37
3.6.2.	<i>QCM – Messungen mit Staphylococcus aureus</i> .....	38
3.6.2.1.	Vorbereitung der Messung.....	38
3.6.2.2.	Vorbereitung der Bakterien.....	38
3.6.2.3.	Durchführung der Messungen.....	38
3.6.2.4.	Färbung der gebundenen Bakterien.....	38
3.6.3.	<i>Agardiffusionstest</i> .....	38
3.7.	KONTAKTWINKELMESSUNGEN .....	39
3.7.1.	<i>Evaluation der Sterilisierbarkeit</i> .....	39
3.7.2.	<i>Lagerstabilitätsmessungen</i> .....	40
3.8.	NACHWEISMETHODEN.....	40
3.8.1.	<i>Bicinchoninsäure-Assay</i> .....	40
3.8.2.	<i>Antikörpernachweis</i> .....	40
3.8.3.	<i>Energiedispersive Röntgenspektroskopie mit Goldnanopartikeln</i> .....	41
3.8.4.	<i>RAMAN - Spektroskopie</i> .....	41
3.9.	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	41
4.	ERGEBNISSE .....	42
4.1.	QCM-MESSUNGEN .....	42
4.1.1.	<i>Adsorptionsfähigkeit des Lubricins</i> .....	42



4.1.2.	<i>Stabilität des gebundenen Lubricins</i> .....	43
4.1.3.	<i>Untersuchung der antithrombozytären Eigenschaft</i> .....	43
4.1.4.	<i>Messungen mit Vollblut</i> .....	44
4.2.	ANALYSE DER HÄMOKOMPATIBILITÄT .....	46
4.2.1.	<i>Vereinfachtes Inkubationsmodell in der Mikrotiterplatte</i> .....	46
4.2.2.	<i>Rotationsmodell mittels modifiziertem Chandler Loop</i> .....	48
4.2.3.	<i>Extrakorporale Zirkulation im Flow-Loop Modell</i> .....	53
4.2.4.	<i>Inkorporation des Lubricins mittels Elektrospinnen</i> .....	58
4.3.	ENDOTHELIALISIERUNG VON LUBRICINBESCHICHTETEN OBERFLÄCHEN .....	62
4.3.1.	<i>Adhäsion von HEK-Zellen</i> .....	62
4.3.2.	<i>Adhäsion von HUVECs</i> .....	63
4.4.	BAKTERIENVERSUCHE .....	65
4.4.1.	<i>QCM-Messungen mit Staphylococcus aureus</i> .....	65
4.4.2.	<i>Agardiffusionstest</i> .....	66
4.5.	KONTAKTWINKELMESSUNGEN .....	67
4.5.1.	<i>Funktionalität des Proteins</i> .....	67
4.5.2.	<i>Sterilisierbarkeit der Beschichtung</i> .....	68
4.5.3.	<i>Lagerstabilität der beschichteten Proben</i> .....	69
4.6.	NACHWEIS DES GEBUNDENEN PROTEINS .....	70
4.6.1.	<i>Antikörpernachweis</i> .....	71
4.6.2.	<i>Energiedispersive Röntgenspektroskopie mit kolloidalem Gold</i> .....	72
4.6.3.	<i>RAMAN Spektroskopie</i> .....	73
5.	DISKUSSION .....	74
5.1.	QCM-MESSUNGEN .....	74
5.1.1.	<i>Adsorptionsfähigkeit des Lubricins</i> .....	74
5.1.2.	<i>Analyse der antiadhäsiven Eigenschaften des Lubricins</i> .....	75
5.2.	HÄMOKOMPATIBILITÄTSANALYSEN.....	75
5.2.1.	<i>Vereinfachtes Inkubationsmodell in der Mikrotiterplatte</i> .....	75
5.2.2.	<i>Rotationsmodell mittels modifiziertem Chandler Loop</i> .....	75
5.2.3.	<i>Extrakorporale Zirkulation im Flow-Loop-Modell</i> .....	76
5.2.4.	<i>Inkorporation des Lubricins mittels Elektrospinnen</i> .....	77
5.3.	UNTERSUCHUNG DER ENDOTHELIALISIERBARKEIT .....	79
5.4.	ANALYSE DER ANTIBAKTERIELLEN EIGENSCHAFTEN DES LUBRICINS .....	80
5.5.	KONTAKTWINKELMESSUNGEN .....	81
5.5.1.	<i>Benetzbarkeit der beschichteten Materialien</i> .....	81
5.5.2.	<i>Sterilisierbarkeit der Beschichtung</i> .....	82
5.5.3.	<i>Lagerstabilität der beschichteten Proben</i> .....	83
5.6.	NACHWEIS DES GEBUNDENEN PROTEINS .....	83
5.7.	AUSBLICK .....	84

6. ZUSAMMENFASSUNG.....	86
7. SUMMARY.....	88
“IMPROVEMENT OF THE HEMOCOMPATIBILITY OF BLOOD-CONTACTING MATERIALS USING LUBRICIN“ .....	88
8. LITERATURVERZEICHNIS .....	90
EIGENE PUBLIKATIONEN .....	VII
DANKSAGUNG.....	VIII
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....	IX

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
BCA	Bicinchoninsäure
BMS	Bare-metal stent
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES	Drug-eluting stent
DMS	Dimethyl suberimidat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HEK	Human Embryonic Kidney Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I.E.	Internationale Einheit
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ID	Innendurchmesser
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LDLox	oxidiertes LDL
LUB	Lubricin
NaCl	Natriumchlorid
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMN	Polymorphnuklear
PNA	Arachis hypogaea (Erdnuss) Agglutinin
PRG	Proteoglykan
PRP	Plättchenreiches Plasma
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S. aureus	Staphylococcus aureus
SD	standard deviation
β-TG	β-Thromboglobulin
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
UV	ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion protein
WHO	World Health Organization

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung der Pathogenese der Atherosklerose .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Perkutane Transluminale Angioplastie mit Stentimplantation zur Erweiterung eines stenosierten Gefäßabschnittes.....	4
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung der Phasen der Biofilmbildung.....	8
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Struktur des adsorbierten Lubricins auf einer Oberfläche.....	10
<b>Abbildung 5:</b> Darstellung der Hydroxylierung der Oberfläche durch Zugabe von NaOH .....	25
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung der Silanisierung der zu beschichtenden Nitinolplättchen durch Zugabe von APTES.....	26
<b>Abbildung 7:</b> Reaktionsschema der kovalenten Immobilisierung von Lubricin an Oberflächen mittels $\text{NaBH}_3\text{CN}$ .....	27
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung der kovalenten Anbindung des Lubricins mittels DMS .....	28
<b>Abbildung 9:</b> Aufbau der Apparatur für das Elektrosplennen im Zweinadelsystem.....	30
<b>Abbildung 10:</b> Aufbau des modifizierten Chandler Loops.....	33
<b>Abbildung 11:</b> Pumpe zur Testung des Materials im Flow Loop.....	34
<b>Abbildung 12:</b> Schematische Darstellung der Bestimmung des Kontaktwinkels.....	39
<b>Abbildung 13:</b> QCM-Messung mit Lubricin.....	42
<b>Abbildung 14:</b> QCM-Messung zur Stabilitätsbestimmung des gebundenen Lubricins .....	43
<b>Abbildung 15:</b> Ergebnisse der QCM-Messungen mit plättchenreichem Plasma und Lubricin .....	44
<b>Abbildung 16:</b> QCM-Messungen mit humanem Vollblut und Lubricin.....	45
<b>Abbildung 17:</b> Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Quarze nach Perfusion von humanem Vollblut in der QCM .....	46
<b>Abbildung 18:</b> Oberfläche der Titanplättchen nach Blutkontakt in der Mikrotiterplatte bei 0,65- und 4-facher Vergrößerung .....	47
<b>Abbildung 19:</b> Nitinolplättchen nach Inkubation mit Blut in der Mikrotiterplatte (0,65- und 4-fache Vergrößerung.....	47
<b>Abbildung 20:</b> Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Titan- und Nitinolplättchen nach Blutkontakt .....	48
<b>Abbildung 21:</b> Ergebnis der Blutbildanalyse vor (0) und nach Zirkulation (1-4) im modifizierten Chandler Loop.....	49
<b>Abbildung 22:</b> Ergebnisse der ELISAs des Blutes vor (0) und nach (1-4) Rotation im Chandler Loop .....	51

<b>Abbildung 23:</b> Aufnahmen der Stents unter dem Binokular nach Durchlauf im Chandler Loop in 6,5- bzw. 40-facher Vergrößerung .....	52
<b>Abbildung 24:</b> Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Stents nach Durchlauf im Chandler Loop bei 500-facher und 1000-facher Vergrößerung.....	52
<b>Abbildung 25:</b> Blutbildanalyse nach 60-minütiger Inkubation im Flow Loop .....	54
<b>Abbildung 26:</b> Ergebnisse der ELISA-Analysen nach Inkubation im Flow Loop .....	56
<b>Abbildung 27:</b> Stents nach Durchfluss im Flow Loop bei 6,5- und 40-facher Vergrößerung	57
<b>Abbildung 28:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stents nach Inkubation im Flow Loop bei 500-facher und 1000-facher Vergrößerung.....	57
<b>Abbildung 29:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der elektrogesponnenen Proben bei 1000- und 5000-facher Vergrößerung.....	58
<b>Abbildung 30:</b> Vergleichende Darstellung der Faserdurchmesser von elektrogesponnenen Proben mit PVA88 bzw. PVA88 + Lubricin. ....	59
<b>Abbildung 31:</b> Darstellung der Rhodamin B Freisetzung nach Inkorporation des Farbstoffes mittels Elektrosponnen. ....	60
<b>Abbildung 32:</b> Blutbild nach Zirkulation von elektrogesponnenen Gefäßprothesen im modifizierten Chandler Loop.....	61
<b>Abbildung 33:</b> Vergleichende Darstellung der Blutanalyse vor (0) und nach (2-3) 60-minütiger Zirkulation im modifizierten Chandler Loop.....	62
<b>Abbildung 34:</b> Adhäsion von HEK-Zellen auf mit Lubricin beschichteten Titanplättchen ....	63
<b>Abbildung 35:</b> Adhäsion von HEK-Zellen auf mit Lubricin beschichteten Nitinolplättchen ...	63
<b>Abbildung 36:</b> Adhäsion von HUVECs auf mit Lubricin beschichteten Titanoberflächen ....	64
<b>Abbildung 37:</b> Adhäsion von HUVECs auf mit Lubricin beschichteten Nitinoloberflächen ...	64
<b>Abbildung 38:</b> QCM-Messungen mit <i>S. aureus</i> . ....	65
<b>Abbildung 39:</b> Bakterienadhäsion am Titanquarz nach QCM-Messung .....	66
<b>Abbildung 40:</b> Ergebnisse des Agardiffusionstests mit Lubricin nach 24 h Inkubation .....	67
<b>Abbildung 41:</b> Kontaktwinkel der verschiedenen Beschichtungen für Titan (A) bzw. Nitinol (B) .....	68
<b>Abbildung 42:</b> Kontaktwinkel von lubricinbeschichteten Titanplättchen vor und nach Behandlung mit UV-Licht.....	69
<b>Abbildung 43:</b> Kontaktwinkelmessungen zur Bestimmung der Lagerstabilität von adsorptiv und kovalent mit Lubricin beschichteten Titan (A)- bzw. Nitinolplättchen (B) nach Lagerung bei 4°C.....	70
<b>Abbildung 44:</b> Darstellung der Autofluoreszenz von Nitinolplättchen unter dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei verschiedenen Wellenlängen .....	71
<b>Abbildung 45:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines unbeschichteten Titanplättchens (A) und eines mit Lubricin beschichteten Plättchens (B).....	72

<b>Abbildung 46:</b> Rasterelektronenmikroskopische Bilder von Nitinolplättchen nach Inkubation mit PNA-kolloidalem Gold.....	72
<b>Abbildung 47:</b> RAMAN-Spektrum eines mit Lubricin (13,5 µg) beschichteten Titanplättchens .....	73
<b>Abbildung 48:</b> RAMAN-Spektrum eines mit Lubricin (1,5 µg) beschichteten Nitinolplättchens .....	73

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Geräte .....	15
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Chemikalien .....	17
<b>Tabelle 3:</b> Verbrauchsmaterialien .....	19
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Testkits.....	21
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung der Polycaprolactonlösung (10 wt%) .....	29
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung der Polyvinylösung .....	29
<b>Tabelle 7:</b> Testkategorien im Rahmen der Hämokompatibilitätsuntersuchung .....	31
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Menge Heparin bei den verschiedenen Versuchsaufbauten.....	32
<b>Tabelle 9:</b> Weiterbehandlung des antikoagulierten Blutes.....	35
<b>Tabelle 10:</b> Zusammensetzung der Nährmedien .....	37





# 1. Einleitung

## 1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

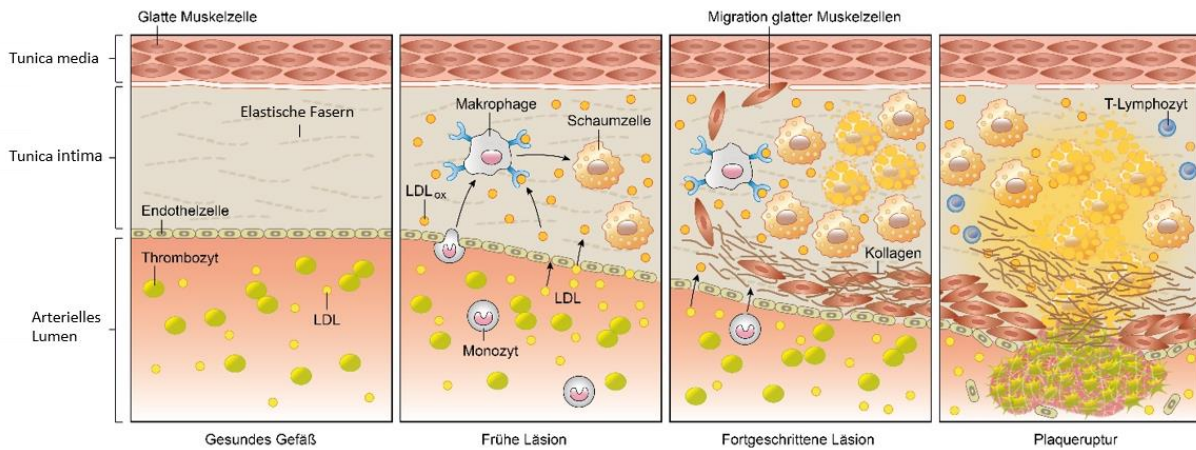
Laut World Health Organization (WHO) entfielen im Jahre 2017 mit 17,7 Millionen Toten 31 % der weltweiten Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Vergleicht man diese Zahlen mit jenen der letzten Jahre, so ist die Tendenz deutlich steigend. Ursache der von den Gefäßen ausgehenden Erkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit (KHK) oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), ist in den meisten Fällen die Atherosklerose. Hierbei handelt es sich um eine chronische, entzündliche Veränderung der Gefäßwand, die durch die Einlagerung von Cholesterin und Entzündungszellen in die Intima gekennzeichnet ist (1).

Krankheiten, die sich in einer Fehlfunktion des Herzens manifestieren, können, wie im Falle des Herzinfarkts, Folge dieser atherosklerotischen Veränderungen sein. Andererseits führen auch Erkrankungen des Herzens selbst zu klinischen Symptomen, wie es bei Herzklappenerkrankungen der Fall ist. Im Folgenden soll auf beide Bereiche näher eingegangen werden.

## 1.2. Atherosklerose

### 1.2.1. Atherogenese

Es existieren mehrere Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose. Nach heutigem Wissensstand ist die Response-to-injury-Hypothese, die 1976 von Ross und Glomset publiziert wurde, allerdings die wahrscheinlichste (2). Sie besagt, dass der Pathogenese eine initiale Verletzung des Endothels zugrunde liegt. Als Antwort auf diese Verletzung bildet sich im Folgenden schrittweise die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand aus (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Darstellung der Pathogenese der Atherosklerose.** Durch eine initiale Verletzung des Endothels kommt es zur Akkumulation von Low-Density Lipoprotein (LDL) in der Intima. Dieses wird durch Makrophagen phagozytiert, in denen es akkumuliert. Dadurch entstehen sogenannte Schaumzellen, die schließlich absterben und einen nekrotischen Kern bilden. Die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen führt zur Einengung des Gefäßlumens. Ist die Plaque instabil, kommt es zur Plaqueruptur und Thrombusbildung. Modifiziert nach (3).

Wird die Integrität des Endothels beeinträchtigt, so verliert dieses seine natürliche Barrierefunktion. Durch die Lockerung der Tight-Junctions, Zell-Zell-Verbindungen im apikal gerichteten Bereich der Seitenwände der Endothelzellen, kommt es zur Ansammlung von Low-Density-Lipoprotein (LDL) innerhalb der Intima (4). Hier wird das LDL durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oxidiert, die unter anderem von Endothelzellen gebildet werden. Darüber hinaus exprimiert das Endothel vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule) und VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein), wodurch es zur verstärkten Leukozytenmigration, d.h. zur Migration der Leukozyten durch das Endothel, kommt (5, 6). Einwandernde Makrophagen nehmen das oxidierte LDL endozytotisch auf, sind aber nicht in der Lage, es zu phagozytieren. Dadurch kommt es zur Ausbildung von Schaumzellen, die schließlich absterben und den sogenannten nekrotischen Kern bilden (4). Durch die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren werden glatte Muskelzellen der Tunica Media zur Proliferation und Migration angeregt. Diese produzieren unter anderem Kollagen und formen so eine fibröse Kappe um den nekrotischen Kern (5). Dieser Prozess führt zu einer allmählichen Verdickung der Gefäßwand. Nimmt die Größe des nekrotischen Kernes durch entzündliche Prozesse weiter zu, so kann sich aus einer stabilen Plaque eine instabile entwickeln und es kommt zur Plaqueruptur (5, 7). Durch die Freisetzung prothrombotischer Strukturen bildet sich ein Thrombus aus, welcher zu Gefäßverschlüssen führen und dadurch einen Infarkt des zu versorgenden Gewebes auslösen kann. Klinische Manifestationen können je nach Lokalisation des Defekts bis hin zu Herzrhythmusstörungen, Apoplex oder plötzlichem Herztod reichen.

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine systemische multifaktorielle Erkrankung, deren genaue Ursache noch nicht geklärt ist. Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Bluthochdruck, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht und genetische Prädisposition begünstigen den Krankheitsverlauf jedoch (8-11).

## **1.2.2. Therapie**

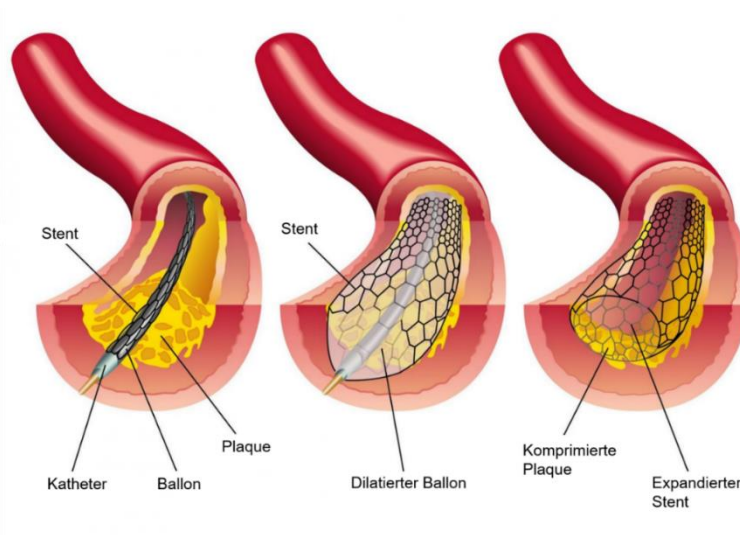
### **1.2.2.1. Konservative Therapie**

Neben der Änderung des Lebensstils zur Ausschaltung von Risikofaktoren und der Behandlung begünstigender Krankheiten gibt es verschiedene therapeutische Interventionsmöglichkeiten, um das Fortschreiten der Krankheit und lebensbedrohliche Folgen zu verhindern. Diese richten sich nach dem Ausmaß der atherosklerotischen Veränderungen. Im Anfangsstadium der Erkrankung oder zur Behandlung von Risikopatienten kann eine konservative Behandlung erfolgen. Die Einnahme von Statinen, blutdrucksenkenden Medikamenten (z.B. ACE-Hemmer) oder Gerinnungshemmern kann ein Fortschreiten der Krankheit verhindern (12, 13). In vielen Fällen ist die alleinige Therapie mit Medikamenten allerdings nicht ausreichend, um eine ausreichende Blutversorgung sicherzustellen, weshalb ein chirurgischer Eingriff unumgänglich ist.

### **1.2.2.2. Chirurgische Intervention**

#### **1.2.2.2.1. Perkutane Transluminale (Coronare) Angioplastie (PT(C)A)**

Bei der PT(C)A handelt es sich um einen minimalinvasiven Eingriff, der auf eine Erweiterung des stenosierten Gefäßabschnittes abzielt. Erstmals wurde diese Methode im Jahr 1977 von Grüntzig et al. durchgeführt (14). Unter radiologischer Kontrolle wird zunächst ein Führungskatheter zur Stenosestelle vorgeschoben, durch den anschließend ein Ballondilatationskatheter eingeführt wird (Abbildung 2). Bei der darauffolgenden Dilatation wird das Gefäß aufgeweitet und eine Revaskularisierung erreicht. Allerdings führt diese Methode in 40-50 % der Fälle zur Restenose und wird heutzutage aus diesem Grund meist durch die Implantation eines Stents erweitert (15, 16). Dieser verbleibt im Gefäß und soll durch Verhinderung der elastischen Rückstellkräfte des Gefäßes (Elastic Recoil) eine langfristige Öffnung des Gefäßes gewährleisten (16, 17).



**Abbildung 2: Perkutane Transluminale Angioplastie mit Stentimplantation zur Erweiterung eines stenosierte Gefäßabschnittes.** Der Ballondilatationskatheter inklusive Stent wird unter röntgenologischer Kontrolle über einen Führungskatheter zur Stenosestelle vorgeschoben. Bei Dilatation des Ballons bei 6-12 bar wird der Stent in die Gefäßwand gepresst und die Plaque komprimiert. Der Ballon wird zurückgezogen und der Stent verbleibt im Gefäß, um eine erneute Restenose zu verhindern. Modifiziert nach (18).

#### 1.2.2.2. Koronarer arterieller Bypass

Ist die Gefäßläsion weit vorangeschritten, sind Dilatationsversuche gescheitert oder große Gefäße betroffen, so muss der entsprechende Gefäßabschnitt bisweilen durch einen Bypass überbrückt werden. Hierbei ist aufgrund des geringen Abstoßungsrisikos das Mittel der Wahl die Verwendung körpereigener (autologer) Gefäße wie der A. mammaria interna, der V. saphena oder der A. radialis (19-21). Da es sich bei der Atherosklerose jedoch um eine systemische Erkrankung handelt, sind gesunde Gefäßabschnitte häufig limitiert und es muss auf synthetische Gefäßprothesen zurückgegriffen werden. Diese bestehen meist aus Polymeren und können wie Polycaprolacton (PCL) oder Poly(lactid-co-Glycolid) (PLGA) resorbierbar sein. Ihnen gegenüber stehen nicht resorbierbare Polymere wie Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Polyethylenterephthalat (PET).

### 1.3. Herzklappenerkrankungen

Die vier Herzklappen fungieren als Rückstromventile und lassen sich in Semilunarklappen (Aorten- und Pulmonalklappe) sowie Atrioventrikularklappen (Mitral- und Trikuspidalklappe) einteilen (22). Bei den Erkrankungen dieser Herzklappen unterscheidet man funktionell Klappeninsuffizienzen (Unfähigkeit ordnungsgemäß zu schließen), Klappenstenosen (Verengung der Herzklappenöffnung), die angeboren oder erworben sein können (23, 24). Liegt solch ein

Defekt vor, so ist die Ventilfunktion der betroffenen Klappe eingeschränkt. Durch den veränderten Blutfluss innerhalb der Kammern bzw. der zu- und abführenden Gefäße kommt es zu veränderten Druckverhältnissen (25). Im Anfangsstadium können diese Defekte durch Hypertrophie des Herzmuskels kompensiert werden (26). Bei Fortschreiten der Veränderungen kommt es allerdings je nach betroffener Klappe zu Leistungseinbußen, Ödembildung und Bluthochdruck, im Endstadium treten Herzrhythmusstörungen oder Synkopen auf (27-29).

Die häufigste Herzklappenerkrankung ist die altersbedingte Aortenklappenstenose, die in den meisten Fällen durch eine degenerative Verkalkung hervorgerufen wird, aber auch Folge rheumatischen Fiebers oder einer bakteriellen Endokarditis sein kann (30-32). Die degenerative Verkalkung, die zu einer Immobilisierung der Klappe führt, ähnelt in ihrer Pathogenese der Atherosklerose der Gefäße (33). Auch hier liegt die Ursache in inflammatorischen Prozessen, die zur Akkumulation von oxidiertem LDL im Klappengewebe führen (34).

### **1.3.1. Therapie**

#### **1.3.1.1. Konservative Therapie**

Während sich bakterielle Endokarditiden zumindest im Anfangsstadium oder bei mildem Verlauf mit mehrwöchiger Antibiotikagabe therapieren lassen, gibt es für nicht infektiös bedingte Herzklappenveränderungen keine medikamentöse Therapie (33, 35). In der asymptomatischen Phase können lediglich Medikamente wie Diuretika zur Entlastung des Herzens verabreicht werden. Dabei sollte der Patient allerdings regelmäßig beim Arzt vorstellig werden, um den richtigen Zeitpunkt für einen chirurgischen Eingriff nicht zu verpassen und irreversible Schäden am Myokard zu verhindern (36).

#### **1.3.1.2. Chirurgische Intervention**

##### **1.3.1.2.1. Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI)**

Bei der TAVI handelt es sich um ein minimalinvasives Verfahren zur Aortenklappenimplantation bei schlagendem Herzen, das vor allem bei Patienten mit erhöhtem Operationsrisiko eingesetzt wird (37). Hierbei wird der Klappenersatz über einen Katheter vorgeschoben und am Einsatzort entfaltet. Der Zugang erfolgt dabei in den meisten Fällen über die A. femoralis. Allerdings können bei diesem Verfahren nur biologische Herzklappen eingesetzt werden und die körpereigene Herzklappe wird nicht entfernt (38).

### **1.3.1.2.2. Chirurgischer Herzklappenersatz**

Bei den Klappenprothesen unterscheidet man biologische Herzklappen und mechanische Herzklappen. Biologische Herzklappen werden aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humaner Herzklappen meist aus Aortenklappen von Schweinen oder aus Rinderperikard gefertigt (39). Sie weisen jedoch eine begrenzte Haltbarkeit auf und müssen nach einigen Jahren während einer erneuten OP ersetzt werden (40).

Mechanische Herzklappen werden aus korrosionsbeständigen Materialien wie Titan oder Carbon gefertigt. Während sie dadurch zwar eine unbegrenzte Haltbarkeit aufweisen, sind sie als Fremdoberflächen durch die hohen Scherkräfte und den wechselnden Blutfluss sehr anfällig gegenüber thrombotischen Prozessen (41). Aus diesem Grund ist die lebenslange Einnahme von blutverdünnenden Medikamenten erforderlich.

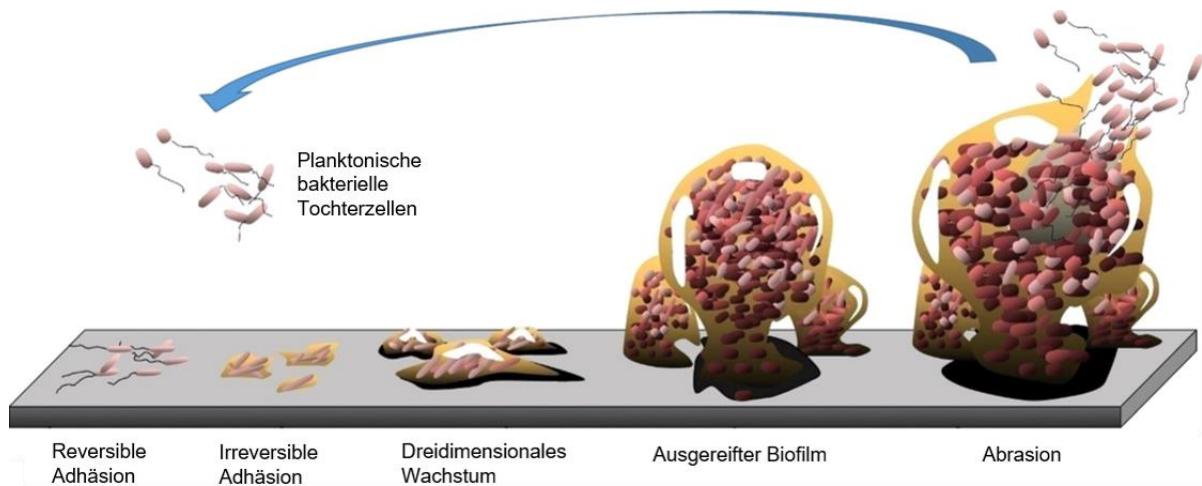
## **1.4. Komplikationen nach Implantateinsatz**

Da eine Implantation das Einbringen eines Fremdkörpers bedeutet, kann es im Zuge der Auseinandersetzung des Körpers mit diesem Material zu unerwünschten Reaktionen unterschiedlichen Ausmaßes kommen. Aus diesem Grund ist die Biokompatibilität von Implantaten von fundamentaler Bedeutung für deren medizinischen Einsatz. Nach D.F. Williams lässt sich die Biokompatibilität als „Fähigkeit eines Materials, bei angemessener Wirtsantwort in einer bestimmten Anwendungssituation zu funktionieren“ definieren (42). Da jedes Implantat, das in den Körper eingebracht wird, zwangsläufig mit dem Blut in Berührung kommt, ist eine gewisse Hämokompatibilität grundsätzlich wichtig. Besondere Bedeutung kommt allerdings blutkontaktierenden Implantaten wie Stents, Herzklappen oder Gefäßprothesen zu. Bei diesen Materialien entscheidet die Interaktion mit den Blutbestandteilen maßgeblich über Implantationserfolg oder -misserfolg.

Kommt ein Material mit dem Blut in Kontakt, so kommt es innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Adsorption von Plasmaproteinen an der Implantatoberfläche (43). Zunächst binden kleinere Proteine wie Fibrinogen, die später durch Proteine mit höherem Molekulargewicht ersetzt werden (44, 45). Diese Proteinschicht führt zur Aktivierung von Leukozyten, dem Gerinnungssystem und Thrombozyten, was zu Entzündungsreaktionen und Thrombusbildung führen kann. Mängel in der Biokompatibilität können so unter anderem zu Verschlüssen von Gefäßprothesen oder Stents führen, oder Embolien nach Herzklappenersatz hervorrufen (46, 47). Die beiden Hauptkomplikationen nach der Implantation eines Stents sind die In-Stent-Restenose sowie die Stent-Thrombose (48).

Wird durch das Einsetzen eines Stents die Gefäßwand verletzt, so kann es durch eine überschießende Gewebsreaktion zur neointimalen Hyperplasie und dadurch zu einer erneuten Verengung des Gefäßlumens kommen, was den Langzeiterfolg des Implantats verhindert (49). Des Weiteren kann es durch die körperfremde Oberfläche und prothrombotisch wirksame Strukturen zur Thrombozytenaktivierung und -aggregation kommen, wodurch eine Stentthrombose hervorgerufen wird. Deshalb stellt die schnelle Gefäßintegration und damit insbesondere die Regeneration des natürlichen Endothels das Hauptziel nach einer Implantation dar. Da das körpereigene Endothel natürlicherweise optimale hämokompatible Eigenschaften besitzt, ist die kritische Phase nach Ausbildung einer intakten Endothelschicht überwunden. Bis dies erreicht ist, muss der Patient mit der sogenannten dualen Thrombozytenaggregationshemmung behandelt werden. Hierbei ist die Kombination von Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel am geläufigsten. Da die Endothelialisierung bei der Verwendung von sogenannten Drug-eluting Stents (DES) verzögert ist, sollte die Therapie mit Clopidogrel über mindestens 12 Monate erfolgen, während nach Implantation eines bare-metal stents (BMS) ein Zeitraum von vier Wochen ausreichend sein kann (50). Die Gabe von ASS sollte hingegen lebenslang fortgeführt werden (50).

Eine weitere Komplikation, die künstliche Herzklappen oder Gefäßprothesen betrifft, stellt die bakterielle Besiedlung des Implantats dar. Werden Bakterien in den Körper eingebracht, so können sie sich am Implantat anheften, vermehren und einen Biofilm bilden. Ein Biofilm ist eine oberflächengebundene Lebensgemeinschaft von Bakterien (51). Die Mikroorganismen binden dabei irreversibel an der Oberfläche und bilden eine Extrazellulärmatrix aus, die aus Proteinen, Polysacchariden sowie DNA besteht und die Bakterien vor Umwelteinflüssen schützt (Abbildung 3) (52). So können sich die Bakterien der Wirkung antimikrobieller Stoffe oder der körpereigenen Abwehr entziehen, was insbesondere durch ein geschwächtes Immunsystem nach einer OP am offenen Herzen begünstigt wird (53, 54).



**Abbildung 3: Darstellung der Phasen der Biofilmbildung.** Während der Induktionsphase binden freischwimmende planktonische Bakterien zunächst reversibel an der Grenzfläche. Mittels verschiedener Adhäsine entsteht eine irreversible Bindung. Dabei werden Proteine, Polysaccharide und DNA sezerniert, die die Extrazellulärmatrix ausbilden. Diese schützt die Bakterien vor Umwelteinflüssen und antimikrobiellen Substanzen und ermöglicht den Stofftransport innerhalb des Verbandes. Anschließend kommt es zum dreidimensionalen Wachstum. Da die Größe des Biofilms begrenzt ist, kommt es letztendlich zur Plateau-Phase, in der zwischen Zellwachstum und Zellablösung ein Gleichgewicht herrscht. Modifiziert nach (55).

Im Bereich medizinischer Implantate spielt die Biofilmbildung eine große Rolle. Nach einem chirurgischen Herzklappenersatz steigt das Risiko der Patienten an einer bakteriellen Endokarditis zu erkranken um über 100 % an, wodurch sie zur Gruppe der am stärksten gefährdeten Menschen gehören (56, 57). Diese entzündliche Erkrankung des Endokards weist mit 20 - 30 % eine sehr hohe Mortalitätsrate auf und wird in den meisten Fällen durch *Staphylococcus aureus* verursacht (58). Auch nach der Implantation von Gefäßprothesen kommt es in 1-6 % der Fälle zur Infektion (59). Durch die ständig steigende Zahl resistenter Erreger wie Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), ist eine antibiotische Therapie oft wirkungslos. In solchen Fällen muss sich der Patient einer weiteren Operation unterziehen, in der das Implantat ausgetauscht wird.

#### 1.4.1. Derzeitige Verfahren zur Verminderung implantatassoziiertes Komplikationen

In den Anfängen der Geschichte der Stents wurden sogenannte bare-metal stents (BMS) implantiert. Diese unbeschichteten Stents aus Edelstahl konnten zwar die Restenoserate nach alleiniger PTCA reduzieren, jedoch war sie mit 20 - 30 % immer noch sehr hoch (16, 60). Anfang der Zweitausender Jahre kam mit den medikamentenfreisetzungsfähigen Stents (DES) eine neue Alternative auf den Markt. Die DES der ersten Generation bestehen aus einem BMS, auf den eine Polymerbeschichtung aufgebracht ist, die nach und nach einen antiproliferativen oder immunsuppressiven Wirkstoff freisetzt (49). Die bekanntesten und am häufigsten verwendeten



Wirkstoffe sind hierbei Sirolimus und Paclitaxel. Durch die DES konnte zwar die Restenoserate auf unter 4 % gesenkt werden, jedoch stieg die Inzidenz der Stentthrombosen (61). Während diese unter Verwendung von BMS hauptsächlich innerhalb der ersten 24 bis 28 Stunden auftraten, kam es mit den DES zu einem deutlichen Anstieg insbesondere im Bereich der späten Stentthrombose (62). Daraufhin folgten die DES der zweiten Generation, die eine verbesserte Endothelialisierung ermöglichen sollten und aus diesem Grund aus Kobalt-Chrom-Legierungen hergestellt wurden, welche die Anfertigung dünnerer Stents erlaubten (63, 64). Hier kamen Wirkstoffe wie Zotarolimus oder Everolimus zum Einsatz. Ein weiterer Ansatz zur Vermeidung stentassoziierter Komplikationen ist der Einsatz bioresorbierbarer Stents. Hierbei lassen sich zwei verschiedene Arten unterscheiden: Bioresorbierbare Metallstents, beispielsweise aus Magnesiumlegierungen, oder bioresorbierbare Polymerstents (65, 66). Diese Stents sollten nach erfolgter Gefäßregeneration vollständig vom Körper abgebaut werden und so keinen störenden Fremdkörper mehr darstellen. Jedoch stellen ungleichmäßige Korrosionsgeschwindigkeiten und dadurch verursachte Brüche innerhalb der Stents ein erhöhtes Anwendungsrisiko dar (67). Diese Bruchstellen fördern thrombotische Prozesse oder Embolien durch abgeschwemmtes Bruchmaterial.

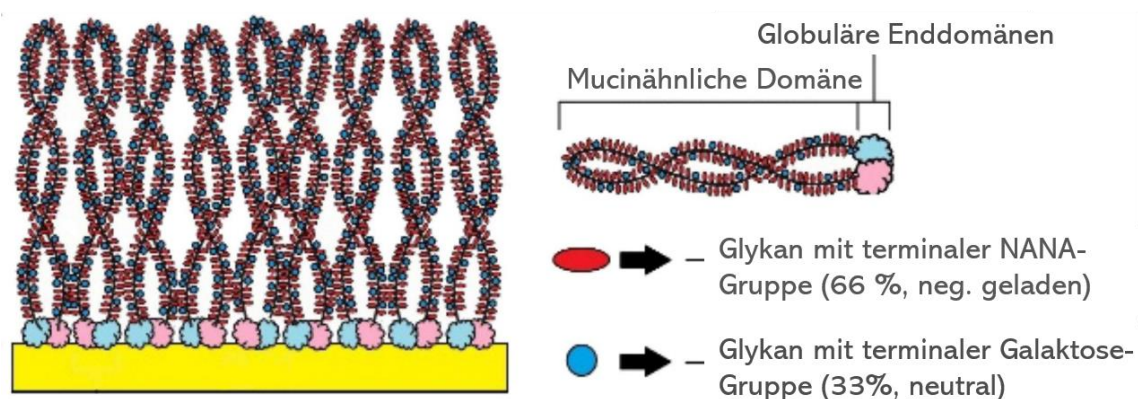
Auch im Bereich implantatassoziierter Infektionen wurden einige Lösungsansätze erprobt. So wurde bereits Ende der 90er Jahre eine Silberbeschichtung von Herzklappen entwickelt, die durch dessen nachgewiesene antibakteriellen Eigenschaften vor Infektionen schützen sollte (68). Auch bei Gefäßprothesen wurde ein solcher Ansatz verfolgt. In beiden Fällen führte die Verwendung von Silber allerdings nicht zum gewünschten Erfolg und die Infektionsrate konnte nicht zuverlässig gesenkt werden (68-70). Des Weiteren sollten antibiotikagetränkte Gefäßprothesen eingesetzt werden, um den Einsatz systemischer Antibiotikagaben zu reduzieren und die Gefahr von Resistenzen zu minimieren. Mittel der Wahl war hierbei aufgrund der guten Wirksamkeit gegen Staphylococcus und der guten Bindungsfähigkeit an kollagen- oder gelatinhaltige Dacronprothesen Rifampin (71, 72). Allerdings wird dessen prophylaktischer Einsatz stark diskutiert, nachdem Studien zeigen konnten, dass höhere Konzentrationen Rifampins zytotoxisch auf Endothelzellen wirken (73).

Trotz deutlicher Verbesserungen in verwendeten Materialien und Beschichtungen kommt es nach Implantation kardiovaskulärer Implantate weiterhin zu Komplikationen. Aus diesem Grund ist die Erforschung neuartiger Konzepte nötig, um eine erhöhte Anwendungssicherheit zu erreichen.

## 1.5. Lubricin / PRG4

Lubricin, auch Proteoglykan 4 genannt, ist ein Glykoprotein, das vom PRG4-Gen kodiert wird. Seine Isolierung aus der Synovialflüssigkeit von Rindern wurde erstmals im Jahre 1970 von Radin et al. beschrieben (74). Hier agiert es als starkes Schmiermittel und setzt dadurch die Reibung im Gelenk herab (75). Darüber hinaus verhindert es die Anheftung von Proteinen an der Knorpeloberfläche (76). Im Körper kommt es darüber hinaus in der Lunge, der Leber und dem Herzen (77, 78), auf der Oberfläche des Augapfels (79) sowie in verschiedenen Geweben des Bewegungsapparates vor (76, 80, 81).

Das Glykoprotein ist ca. 200 nm lang und weist einen Durchmesser von wenigen Nanometern auf (82). Es ist in eine stark glykosilierte mucinähnliche Zentrumsdomäne und eine nicht-glykosilierte globuläre Enddomäne unterteilt. Diese Enden enthalten eine Hämopexin- und eine Somatomedin-B-ähnliche Subdomäne, über die das Protein durch Disulfidbrückenbindungen Oligomere ausbilden kann (83). Außerdem heftet sich das Protein mittels dieser Enddomänen sowohl über kovalente, als auch über nicht-kovalente Bindungen an die Knorpeloberfläche (Abbildung 4) (84). Bei genügend hoher Dichte des adsorbierten Proteins bildet sich so eine bürstenähnliche Struktur auf der Oberfläche aus. Die negativ geladene hydrophile Zentrumsdomäne wird dabei schleifenförmig der Umgebung präsentiert und ist verantwortlich für die antiadhäsiven Eigenschaften des Proteins (85, 86). Da die Enddomänen hingegen positiv geladen sind, weist das Protein bei physiologischem Blut-pH eine schwach positive Gesamtladung auf (86). Das Molekulargewicht des Proteins wird durch den Grad der posttranslationalen Glykosylierung bestimmt, welches daher zwischen 280 - 320 kDa schwanken kann (87).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur des adsorbierten Lubricins auf einer Oberfläche.** Bei genügend hoher Dichte des gebundenen Proteins bildet sich eine bürstenähnliche Struktur aus, indem sich das Protein mittels seiner Enddomänen an der Oberfläche anheftet und die mucinähnliche Domäne dabei schleifenförmig der Umgebung präsentiert wird. Diese mucinähnliche Domäne ist durch den hohen Anteil an Glykanen mit endständiger N-Acetylneuraminsäure (NANA) negativ geladen. Modifiziert nach (88).

Der Forschungsschwerpunkt liegt momentan auf der Nutzung des Proteins zur Behandlung arthrotischer Gelenkveränderungen oder des Sicca-Syndroms des Auges. Darüber hinaus wurden Studien veröffentlicht, die sich mit den antiadhäsiven Eigenschaften oder der Wirkung auf Bakterien beschäftigen. So konnte gezeigt werden, dass lubricinbasierte Beschichtungen über ein breites pH-Spektrum vergleichbare oder bessere antiadhäsive Eigenschaften besitzt als Polyethylenglykol (88). Des Weiteren haben Experimente demonstriert, dass Lubricin die Proliferation von Bakterien hemmt. Hierbei führte eine Beschichtung mit Lubricin nicht nur zu einer Reduktion der Adhäsion durch *S. aureus*, sondern auch zu einer deutlichen Verlängerung der lag Phase des bakteriellen Wachstums (89).

### **1.6. Relevanz für die Veterinärmedizin**

Im Gegensatz zum Menschen spielen atherosklerotische Veränderungen beim Tier, insbesondere bei Herbivoren, eine untergeordnete Rolle. Trotz gelegentlicher Zufallsbefunde in der pathologischen Untersuchung, kommt es bei Säugetieren nur in Ausnahmefällen zum klinischen Erscheinungsbild der Atherosklerose (90). Beim Hund treten atherosklerotische Veränderungen meist mit Diabetes mellitus oder Hypothyreodismus auf (91). Bei Vögeln, insbesondere bei Arten mit hoher Lebenserwartung, wie dem Graupapagei, dem Nymphensittich oder den Amazonenpapageien, tritt das typische klinische Bild der Atherosklerose mit erhöhter Prävalenz auf (92, 93). Die prozentuale Anzahl der betroffenen Vögel variiert in unterschiedlichen Untersuchungen stark. So werden Veränderungen bei 1,3 % bis 92,4 % der untersuchten Vögel beschrieben (94-97). Diese starke Streuung lässt sich durch verschiedene Faktoren erklären (98). Zunächst wurden sowohl Vögel aus zoologischen Einrichtungen als auch als Haustiere gehaltene Vögel in die Untersuchungen einbezogen. Darüber hinaus erfolgte die Fütterung der Tiere nicht einheitlich. Beide Faktoren können Einfluss auf die Entstehung einer Atherosklerose haben (98). Außerdem wurden verschiedene Vogelarten unterschiedlichen Alters zur Diagnostik herangezogen und der Bewertungsmaßstab für die Läsionen war nicht einheitlich. Beaufrière et al. konnten zeigen, dass weibliches Geschlecht und fortgeschrittenes Alter, unabhängig von der Vogelart, als Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen fungieren (97). Dieser Unterschied zur Atherosklerose bei Menschen, bei denen männliches Geschlecht prädisponierend wirkt, lässt durch die unterschiedliche Wirkung von Östrogen bei Vogel und Mensch erklären. Bei geschlechtsreifen, weiblichen Vögeln führt dieses unter anderem zu einer Erhöhung an Cholesterin, Triglyceriden und Lipoproteinen im Blut, welche bei der Atherogenese eine elementare Rolle spielen (99). Beim Menschen hingegen werden dem Hormon gefäßprotective Eigenschaften zugeschrieben. So führt es unter anderem zu einer Senkung des Triglycerid- und LDL-Spiegels im Blut (100, 101).

Für in vitro Versuche werden hauptsächlich Mäuse und Kaninchen, gefolgt von Schweinen und Primaten herangezogen (102). Jedes Tiermodell hat jedoch seine Limitationen. Mäuse entwickeln, anders als Menschen, nur selten Läsionen an den Koronararterien, sondern häufiger an der Aortenwurzel (103). Darüber hinaus sind Wildstämme von Mäusen relativ resistent gegenüber Atherosklerose (104). Maßgeblich für die Verwendung von Mäusen als Modell war aus diesem Grund die Einführung von Apolipoprotein E-defizienten Mäusen, bei denen der Ligand für die hepatischen Rezeptoren zur Aufnahme von LDL fehlt (105). Im Jahr 1993 beschrieben Ishibashi et al. ein weiteres Modell. Bei den sogenannten LDL-Rezeptor Knockout-Mäusen wurde der entsprechende Rezeptor zur Aufnahme des LDL in die Hepatozyten ausgeschaltet (106). In beiden Fällen kommt es zu einer Erhöhung des Plasmacholesterinspiegels. Während bei LDL-Rezeptor Knockout-Mäusen zusätzlich eine Fütterung mit erhöhtem Fettanteil erfolgen muss, um entsprechend hohe Cholesterinspiegel zur Induktion atherosklerotischer Veränderungen hervorzurufen, wird dieser bei Apolipoprotein E-defizienten Mäusen auch bei handelsüblichem Futter erreicht (103).

Kaninchen werden für eine Vielzahl an Modellen zur Diät-induzierten Atherosklerose herangezogen, da sie am empfindlichsten auf fütterungsbedingte Cholesterinübersversorgung reagieren (107). Darüber hinaus weist diese Tierart im Gegensatz zu Nagetieren viele Gemeinsamkeiten mit dem Lipoproteinstoffwechsel des Menschen auf und ist aufgrund ihres ruhigeren Verhaltens einfacher zu händeln (107, 108). Als Modell kommen dabei Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits (WHHL-Kaninchen), Knockout-Kaninchen oder Kaninchen der Rasse „Weißer Neuseeländer“ (New Zealand White Rabbits, NZW-Rabbits) in Frage (108, 109). Während genetisch veränderte Kaninchen in ihrer Anschaffung teurer sind, stellen NZW-Kaninchen eine kostengünstigere Alternative dar (110). So kann die Ausbildung atherosklerotischer Veränderungen bereits nach acht- bis zwölfwöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät induziert werden (109, 110). Jedoch werden durch die cholesterinreiche Diät Leberschäden und massive Entzündungsreaktionen hervorgerufen und es kommt im Gegensatz zum Menschen nicht zur spontanen Plaqueruptur (102, 111, 112). WHHL-Kaninchen zeichnen sich durch einen Defekt des LDL-Rezeptors aus (113). Homozygote Individuen weisen so selbst bei normaler Fütterung von Geburt an einen erhöhten Cholesterinspiegel auf und bilden atherosklerotische Veränderungen unterschiedlichen Ausmaßes aus (102). Ein neuerer Ansatz besteht in der Verwendung von ApoE-knockout Kaninchen, die aufgrund der größeren Ähnlichkeit zum Lipoproteinstoffwechsel des Menschen eine attraktive Alternative zu Apolipoprotein E-defizienten Mäusen darstellen (114).

Obwohl die Verwendung größerer Tiere höhere Anforderungen an Haltung und Fütterung stellt und sich atherosklerotische Läsionen langsamer entwickeln, bieten sie bei bestimmten Frage-

stellungen durchaus Vorteile. So bietet das Schweinmodell aufgrund der anatomischen Ähnlichkeiten zum Menschen Vorteile bei der Erprobung operativer Techniken und aufgrund der Größe der Tiere erweiterte Möglichkeiten im Bereich der klinischen Bildgebung (115). Jedoch kommt es auch hier selten zur Plaqueruptur und die Entstehung der Plaque endet meist im Schaumzellstadium (102).

Auch nicht menschliche Primaten entwickeln bei entsprechender cholesterinreicher Diät wie Menschen atherosklerotische Plaques (116). Nichtsdestotrotz sind Versuche an Affen sehr teuer, stark reglementiert und erfordern besondere Fähigkeiten im Bereich der Versuchstierkunde (102).

Die Prävalenz klappenassoziierter Erkrankungen ist tierartabhängig. Bei Rind und Schwein überwiegen bakterielle Endokarditiden (117-120). Bei Hunden ist die in Europa am häufigsten diagnostizierte kongenitale Herzerkrankung die Aortenstenose. Allerdings handelt es sich hierbei in den meisten Fällen nicht um einen valvulären Defekt, sondern um eine subvalvuläre Aortenstenose (121). Besonders oft davon betroffen sind der Boxer und andere große Hundrassen (121, 122). Häufiger sind allerdings erworbene Herzerkrankungen, unter denen die degenerative Mitralklappenendokardiose die Spitzenposition einnimmt und besonders bei kleinen Rassen wie dem Cavalier King Charles auftritt (123). Bei Katzen überwiegen Kardiomyopathien, während Erkrankungen der Herzklappen deutlich seltener auftreten als bei Hunden. Obwohl Experimente zu Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation und insbesondere erste Versuche zum Einsatz der Herz-Lungen-Maschine an Hunden durchgeführt wurden, sind Operationen am offenen Herzen in der Veterinärmedizin nicht geläufig (124, 125). Die Therapie von Herzklappenerkrankungen beschränkt sich in der Veterinärmedizin auf eine medikamentöse Therapie zur Herauszögerung der Krankheit oder Linderung der Symptome. Die chirurgische Intervention mit Ersatz der betroffenen Herzklappe wird weltweit bisher nur in wenigen Kliniken durchgeführt. Aufgrund des stetig enger werdenden Verhältnisses zwischen Mensch und Haustier sowie dessen zunehmenden Lebenserwartung, entwickelt sich jedoch auch die veterinärmedizinische Versorgung laufend weiter. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der mechanische Herzklappenersatz auch in der Tiermedizin Einzug halten wird.

## **1.7. Ziel der Arbeit**

Wegen der stetig wachsenden Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und der wachsenden Lebenserwartung der Bevölkerung finden Implantate für das Herz-Kreislaufsystem immer häufiger Verwendung. Trotz erheblicher Verbesserungen in den verwendeten Materialien stellen implantatassoziierte Komplikationen immer noch ein großes Problem dar. Thrombotische

Prozesse, die zum Verschluss von Stents oder Gefäßprothesen oder zur Embolie nach Herzklappenersatz führen können, stellen ein nicht zu unterschätzendes Risiko für das Leben der Patienten dar. Im Bereich der Gefäßprothesen und des Herzklappenersatzes kommt die Infektionsgefahr erschwerend hinzu. Aus diesem Grund wird intensiv an neuen Materialien und Beschichtungen geforscht, die den Anforderungen eines idealen Implantates entsprechen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das antiadhäsive Protein Lubricin/PRG4 als Beschichtung blutkontaktierender Implantate zu testen. Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage (QCM) sollen dabei die selbstständige Adsorption des Proteins an Titan sowie die antiadhäsiven Eigenschaften gegenüber Thrombozyten und humanem Vollblut untersuchen. Ein weiteres Kernelement der Arbeit stellt die Erprobung verschiedener Beschichtungsverfahren dar. Die Bewertung der Hämokompatibilität soll anschließend nach Kontakt mit humanem Vollblut durch die Bestimmung verschiedener Hämokompatibilitätsmarker erfolgen. Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht in der Untersuchung der Endothelialisierbarkeit der beschichteten Materialien, um eine rasche Wiederherstellung der physiologischen Gefäßauskleidung zu gewähren. Um einen späteren medizinischen Einsatz zu ermöglichen, ist darüber hinaus die Erprobung der Sterilisierbarkeit und der Lagerstabilität nötig. Des Weiteren sollen die Einflüsse des Proteins auf Bakterienwachstum und Bakterienadhäsion getestet werden. Für die Versuche wurden die für Stent- bzw. mechanische Herzklappen üblichen Materialien Nitinol und Titan herangezogen. Als Modellbakterium wird aufgrund seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung und seiner hohen Relevanz im Bereich implantatassoziiertes Infektionen *Staphylococcus aureus* gewählt. Zusammenfassend soll die vorliegende Arbeit einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der Hämokompatibilität kardiovaskulärer Implantate leisten und zur Entwicklung zukünftiger Beschichtungen beitragen.

## 2. Material

Das folgende Kapitel informiert über die verwendeten Materialien und Geräte, nach Kategorien in Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blutbildanalysegerät	Micros 60	Axon Lab AG, Baden-Dättwil, CH
Brutschrank	Incubator TI-O	Incutec GmbH, Mössingen, DE
EDX-Elektronenmikroskop	JSM-6500F	JOEL GmbH, Freising, DE
Feinwaage	NewClassic ME403	Mettler Toledo, Columbus, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
Hybridisierungs-ofen	HB-1000 Hybridizer	Analytik Jena AG, Jena, DE
Kritisch-Punkt-Trockner	E3100	Quorum Technologies, Lewes, UK
Mikroplattenleser I	Spark	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Mikroplattenleser III	EON-Reader	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichhall, DE
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
pH-Meter	inoLab® pH 720	Xylem Analytics Germany Sales GmbH, Weilheim, DE
Pipette 100 - 1000 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette, 0,5 - 10 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Pipette, 10 - 100 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Plasmareiniger MWT	Denta Plas® PC	Diener electronic GmbH + Co. KG, Ebhausen, DE
Quarzkristallmikrowaage	qCell T	3T GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
RAMAN-Spektrometer	Horiba -JY HR800	Horiba Ltd., Kyoto, JPN
Rotator	neoLab-Rotator 2-1175	neoLab®, Heidelberg, DE
Rüttelinkubator	Shaker DRS-12	neoLab®, Leonberg, DE
Rüttler	Vortex	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Serologische Pipette	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt, DE
Sterilwerkbank	Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtech- nik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, DE
Thermoblock	Thriller	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Ultraschallgerät	Bandelin Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Ultrazentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, DE
UV-Lampe	UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Wasserbad	GFL 1083	GFL GmbH, Burgwedel, DE



Zellzählgerät	CASY	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Zentrifuge I	Rotanta 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Zentrifuge II	Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech, Hanau, DE

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	NeoFroxx, Einhausen, DE	LC-4916.2
Agar-Agar, Kobe 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	5210.3
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE	7151-5
APTES ≥ 98 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE	A3648
Argongas	Westfalen AG, Münster, DE	
CASY-Ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	5651808001
CH <sub>3</sub> COOH	PENTA, Prag, CZ	19970-11000
CHCl <sub>3</sub>	PENTA, Prag, CZ	17110-11000
DAPI	Merck KGaA Darmstadt, DE	D9542
DMEM high glucose	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	41965-039
DMS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	20700

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline w/o Ca/Mg	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	14190-094
EDC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	22980
Ethanol absolute	PanReac AppliChem, Darmstadt, DE	A1613,2500GL
Fetal Calf Serum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	08Q2061K
Gelatine	Fluka® Analytical, Buch, CH	48723
Glutaraldehyde, 50 %	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	23116.02
Hellmanex™ III Küvettenreiniger	Merck KGaA Darmstadt, DE	Z805939-1EA
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE	3029843
Lubricin	Lubris BioPharma, Weston, USA	
Methanol 99 %	Merck KGaA Darmstadt, DE	106009
Mueller Hinton Broth 2	Merck KGaA Darmstadt, DE	90922-500G
NaCl 0,9 % Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE	7152.5
Natriumcyanoborhydrid	Carbolution chemicals, St. Ingbert, DE	CC03112
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	6771.3
Polycaprolactone	Merck KGaA Darmstadt, DE	440744
S-NHS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	24510
Toluene anhydrous, 99,8 %	Merck KGaA Darmstadt, DE	244511-2L

Triethanolamine	Merck KGaA Darmstadt, DE	90279-100ml
Trizma® base (Tris Base)	Merck KGaA Darmstadt, DE	T6066-500G
VascuLife® Basal Medium	Lifeline Cell Technology®, Frederick, USA	LM-0002

**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
6-well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE	657160
96-well Platte Nunc Maxi Sorb	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	44-2404-21
Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices	Merck Millipore, Burlington, USA	Z677906-24EA
CB Tubing 1/4x1/16x185cm 5/B	Medtronic GmbH, Minneapolis, USA	M999413C
CTAD-Vacutainer 2,7 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE	367562
Einmalspritzen, 10 ml	B. Braun AG, Melsungen, DE	4606108V
Einmalspritzen, 2 ml	B. Braun AG, Melsungen, DE	4606027V
Einmalspritzen, 5 ml,	B. Braun AG, Melsungen, DE	4606051V
Nitinolstents	Admedes GmbH, Pforzheim, DE	
Protein LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE	22431081
Protein LoBind Tube 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE	22431102
Raumedic® ECC-Blood-line 1/4x1/16	Raumedic AG, Helmrechts, DE	39692

Safe-Lock tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE	30120086
Safety-Multifly® 20G	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	851.637.235
S-Monovette® 1,4 ml 9NC; Citrat: 0,106 mol/l	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	61.668.001
S-Monovette® 2,7 ml; EDTA: 0,106 mol/l	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	51.167
S-Monovette® 3 ml 9NC; Citrat: 0,106 mol/l	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	41.919
S-Monovette®; 4,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	51.104.001
S-Monovette®; 9 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	21.726.001
Stripette™ 5 ml	Corning Inc., Corning, USA	4051
Stripette™ 10 ml	Corning Inc., Corning, USA	4101
Stripette™ 25 ml	Corning Inc., Corning, USA	4251
Titanplättchen	Institut Straumann AG, Basel, CH	
Tygon LMT55, heparini- siert	Saint Gobain Performance Plastics GmbH, Bompas, FR	
Zellkulturflasche groß, 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE	660175
Zellkulturflasche klein, 75 cm <sup>2</sup>	Corning Inc., Corning, USA	430641U
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	188 261
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	227 261

**Tabelle 4:** Verwendete Testkits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Asserachrom® $\beta$ -TG	Diagnostica Stago, Parsippany, USA	00943
PMN Elastase ELISA	Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, DE	DEH3311
Enzygnost® TAT micro	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, DE	OWMG15
MicroVue SC5b-9 Plus EIA	Quidel Corporation, San Diego, USA	A029
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	23225
Lubricin/SZP Polyclonal Antibody, Cy3 Conjugated	Bioss Antibodies Inc. Woburn, USA	bs-11175R-Cy3
Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	L7012

### 3. Methoden

#### 3.1. QCM-Messungen

Quarzkristallmikrowaagen sind eine häufig verwendete Methode, um Adsorptionsvorgänge an Oberflächen zu untersuchen. Das Messprinzip beruht darauf, dass die Oszillationsfrequenz eines Schwingquarzes abnimmt, wenn es zur Adhäsion und damit zur Massenlagerung an der Quarzoberfläche kommt. Die Frequenzdifferenz ist demnach proportional zur sich anlagernden Masse (126, 127). Folgende Formel, die Sauerbrey-Gleichung, ermöglicht die Massenberechnung der adhärennten Moleküle anhand der Frequenzänderung (128):

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} \cdot \frac{\Delta m}{A}$$

Nach Umstellen der Gleichung nach  $\Delta m$  ergibt sich:

$$\Delta m = \Delta f \cdot A \cdot \frac{\sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}}{2f_0^2}$$

$\Delta m$  = Massenänderung  
 $\Delta f$  = Frequenzänderung  
 $A$  = piezoelektrisch aktive Quarzfläche  
 $\rho_q$  = Quarzdichte  
 $\mu_q$  = Schubmodul des Quarzes

Die Sauerbrey-Gleichung ist jedoch nur anwendbar, wenn sich die Moleküle als starre Schicht anlagern, weshalb vor ihrer Anwendung stets eine weitere Messgröße, die Dämpfung, beurteilt werden muss. Die Dämpfung wird durch die Struktur der sich anlagernden Masse bestimmt und lässt Aussagen über deren viskoelastischen Eigenschaften zu (129). Ihre Zunahme ist hierbei proportional zur Viskoelastizität der sich anlagernden Masse. Da es durch elastische Filme und deren Bewegung während der Schwingung zu einer erhöhten Reibung kommt, wird die Oszillationsfrequenz verringert und ein Rückschluss auf die sich anlagernde Masse mittels Sauerbrey-Gleichung ist nicht mehr zuverlässig (130).

##### 3.1.1. Vorbereitung der Versuche

Bei allen QCM-Messungen mit Lubricin wurde eine Proteinkonzentration von 27  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Dazu wurde das Protein mit PBS verdünnt und die Konzentration mittels BCA-Assay bestätigt. Um eine stabile Ausgangsfrequenz (baseline) des unbehandelten Titanquarzes zu erhalten, wurde zunächst PBS mit einer Geschwindigkeit von 60  $\mu\text{l/min}$  durch das System geleitet. Blieb die Frequenz für 20 min stabil, konnte mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Alle Messungen wurden drei Mal und im Falle der Blutversuche mit drei verschiedenen

Spendern wiederholt, um deren Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Mittels Sauerbrey-Gleichung konnte die Masse des adsorbierten Proteins bzw. der gebundenen Blutzellen zu allen Zeitpunkten bestimmt werden.

### **3.1.2. Untersuchung der Adsorption und Desorption von Lubricin auf Titan**

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine adsorptive Beschichtung mittels Lubricin auf Titanoberflächen möglich ist. Dazu wurde die Proteinlösung mit einer Geschwindigkeit von 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  über den Quarz gepumpt. Nach Abschluss des Frequenzabfalles und Erreichen der Sättigung wurde erneut PBS mit der gleichen Geschwindigkeit hinzugegeben, um das Desorptionsverhalten des Proteins zu prüfen. Auch hier wurde die Sättigung abgewartet.

### **3.1.3. Evaluation der Stabilität der Beschichtung**

Zur Untersuchung der Adhäsionsstärke des Proteins auf der Titanoberfläche wurde im nächsten Schritt die Fließgeschwindigkeit des Puffers auf 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht. Auch hier wurde auf den Eintritt der Sättigung gewartet.

### **3.1.4. Untersuchung der antiadhäsiven Eigenschaften des Lubricins**

#### **3.1.4.1. Messungen mit plättchenreichem Plasma**

Zur Verhinderung der Gerinnung während des Versuches wurde das verwendete Blut mit Heparin (1,5 I.E./ml Blut) antikoaguliert. Die Blutentnahme erfolgte unter Vermeidung jeder unnötigen Stauung mittels einer Butterflykanüle. Das Blut stammte ausschließlich von gesunden Nichtraucherinnen und -rauchern, die innerhalb der letzten 14 Tage keine Medikamente eingenommen hatten. Anschließend wurde das Blut bei RT 10 min lang mit 160 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C gelagert.

Zur Prüfung der antiadhäsiven Eigenschaften von Lubricin wurde dann das Adsorptionsvermögen von PRP an einen zuvor mit dem Protein beschichteten Titanquarz bestimmt. Hierzu wurde das Protein zunächst in gewohnter Weise mit einer Geschwindigkeit von 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  aufgebracht und lose haftendes Protein anschließend ebenfalls mit PBS (1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) gewegewaschen. Nach Erreichen der Sättigung wurde dem System PRP mit einer Geschwindigkeit von 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  zugeführt und wiederum auf das Eintreten einer konstanten Frequenz gewartet. Nachfolgend wurde zur Entfernung unspezifischer Bindungen erneut PBS hinzugegeben

(1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) bis die Sättigung erreicht war. Als Kontrolle diente ein unbeschichteter Titanquarz, der direkt mit PRP perfundiert wurde.

#### **3.1.4.2. Messungen mit humanem Vollblut**

Die Probandenauswahl, die Blutentnahme und die Antikoagulation erfolgten wie unter 3.1.4.1. beschrieben. Anschließend wurde das Blut jedoch nicht zentrifugiert, sondern ohne weitere Aufbereitung dem System zugeführt. Die weitere Durchführung der Messung entsprach derjenigen mit PRP.

#### **3.1.5. Reinigung der Titanquarze**

Um die Quarze wiederholt verwenden zu können und eine vollständige Sauberkeit zu erreichen, erfolgte eine Reinigung in zwei Schritten.

Zunächst wurden die Quarze im Ultraschallbad gereinigt. Hierzu wurden sie nacheinander für jeweils zehn min in 70 % Ethanol, 2 % Hellmanex sowie abschließend in Aqua dest. verbracht. Die zweite Reinigung stellte die Plasmareinigung mittels 100%igem Sauerstoff dar. Hierbei sollten organische Schichten entfernt sowie Oxide reduziert werden, um optimale Voraussetzungen für eine spätere Beschichtung zu schaffen. Der Quarz wurde hierfür in eine Petrischale gelegt und für 15 min bei 0,3 mbar mit 100%igem Sauerstoff begast.

### **3.2. Beschichtungstechniken**

#### **3.2.1. Adsorptive Beschichtung**

Als einfachste Form der Beschichtung wurde das Lubricin per Aufpipettieren der Proteinlösung und anschließendem Trocknen bei RT auf die Nitinol- bzw. Titanplättchen aufgebracht. In Anlehnung an die ermittelte gebundene Proteinmasse aus den QCM-Messungen wurde eine Lubricinmenge von  $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  gewählt.

#### **3.2.2. Inkubationsbeschichtung**

Als Alternative zur erstgenannten Beschichtungsart wurde eine zweite Form der adsorptiven Beschichtung verwendet. Hierzu wurden die Nitinol- bzw. Titanplättchen in eine Mikrotiterplatte verbracht und mit der Proteinlösung überschichtet. Eine anschließende Inkubation über 24 h bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf dem Kippschüttler sollte eine selbstständige Adsorption des Proteins ermöglichen.



### 3.2.3. Dip-Coating

Nitinolstents von 3,5 cm Länge und einem Durchmesser von 0,4 cm wurden per Dip-Coating mit Lubricin beschichtet. Dazu wurde die Stammlösung (45 µg/ml) in LoBind Protein Eppendorf Tubes pipettiert. Anschließend wurden die Stents mittels Pinzette in die Proteinlösung getaucht, kurz darin geschwenkt und wieder entnommen. Dies wurde 10 bzw. 20 mal wiederholt.

Zwischen den einzelnen Beschichtungsschritten wurden die Stents auf einem sterilen Faden aus Nahtmaterial, der durch das Lumen der Stents gefädelt wurde, in der Luft hängend für 15 min getrocknet. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank durchgeführt.

### 3.2.4. Kovalente Beschichtung

Die Oberflächenimmobilisierung von Lubricin an Titan bzw. Nitinol erfolgte in vier Arbeitsschritten (Abbildung 5-8). Schritt 5 erfolgte je nach Versuchsaufbau entweder mit Natriumcyanoborhydrid ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) oder mit Dimethylsuberimidat (DMS)

#### 1. Reinigung der Plättchen

Um alle Rückstände auf der Oberfläche, die den Silanisierungsprozess behindern könnten, zu entfernen, wurden die Plättchen zunächst gereinigt. Die Plättchen wurden dafür nacheinander in Schnappgläser mit 5 ml 70 % Aceton, 5 ml EtOH absol. P.A. und 5 ml Ampuwa verbracht und je 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend erfolgte eine Trocknung im Ofen für 15 min bei 80 °C in frischen Gläsern. Nach vollständiger Trocknung wurden je 10 ml PBS (pH = 4) zugegeben und die Plättchen darin für eine Stunde belassen.

#### 2. Hydroxylierung

Um eine kovalente Bindung zwischen den Silanen und dem Substrat mittels einer Kondensationsreaktion zu ermöglichen, musste die Oberfläche zunächst funktionalisiert werden (Abbildung 5). Dazu wurden je drei Plättchen in eine Schottglasflasche mit 60 ml 2,5M NaOH-Lösung verbracht und für 24 h bei 80 °C inkubiert.

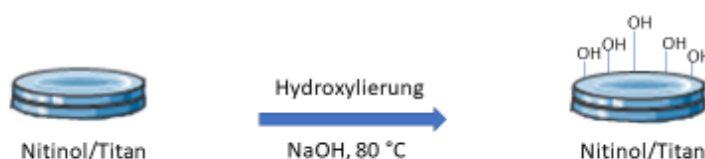


Abbildung 5: Darstellung der Hydroxylierung der Oberfläche durch Zugabe von NaOH.

### 3. Silanisierung

Nachdem die Plättchen in Ampuwa gewaschen wurden, folgte die Zugabe von 10 ml Toluol und 200 µl APTES. Anschließend wurden die Plättchen bei RT über 24 h auf einem Kipp-schüttler inkubiert.

Das Ziel hierbei war die Kondensation der Silanolreste mit den angefügten Hydroxylgruppen auf der Oberfläche der Plättchen (Abbildung 6). Diese Verbindung dient anschließend als Haft-vermittler für die Beschichtung mit Lubricin.



**Abbildung 6: Darstellung der Silanisierung der zu beschichtenden Nitinolplättchen durch Zu-gabe von APTES.**

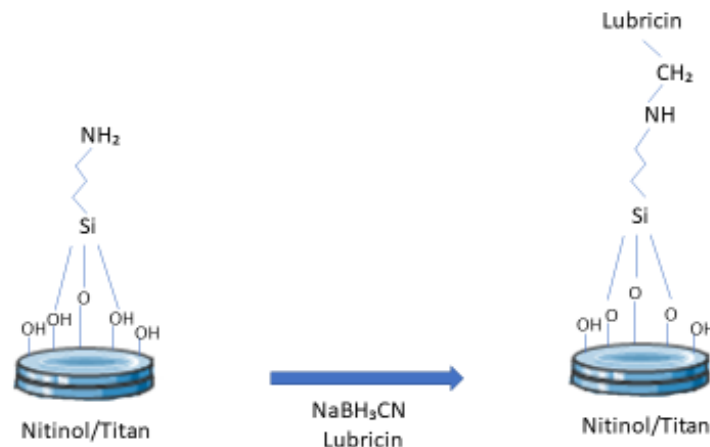
### 4. Reinigung der Plättchen

Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Ultraschallbehandlung für jeweils 30 min in Toluol. Durch mehrmaliges Eintauchen in Ethanol und Ampuwa wurden die Plättchen anschließend gewaschen.

### 5. Kovalente Anbindung

Die erste Methode, die zur kovalenten Anbindung des Proteins erprobt werden sollte, war die Verwendung des Reduktionsmittels NaBH<sub>3</sub>CN.

Zunächst wurde eine Lösung von 2 mg/ml NaBH<sub>3</sub>CN in Ampuwa (pH=5) hergestellt. Anschlie-ßend wurden die Plättchen mit 2 ml der Lösung überschichtet und 1,5 µg Lubricin zugegeben (Abbildung 7). In dieser Lösung wurden die Proben bei RT über 24 h auf dem Kippschüttler inkubiert. Durch Waschen mit Ampuwa wurden die Plättchen von allen cytotoxischen NaBH<sub>3</sub>CN-Resten befreit und mittels Argongas sorgfältig getrocknet.

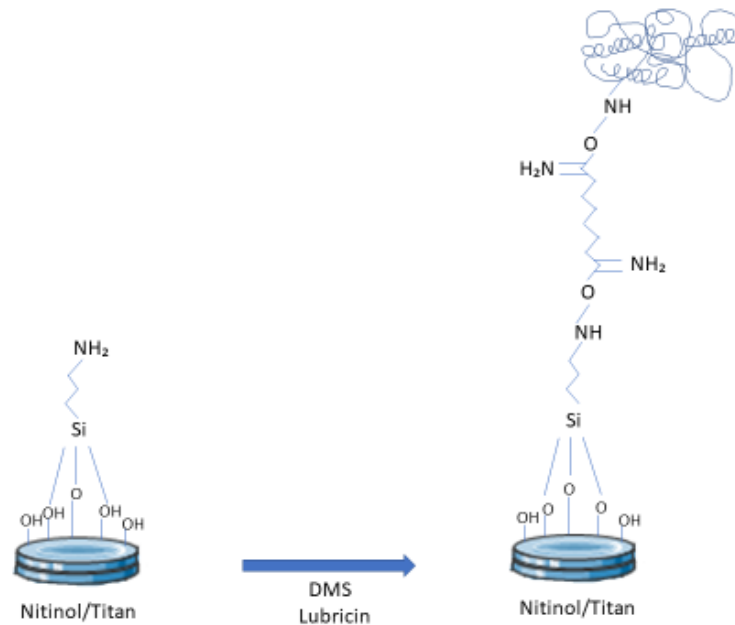


**Abbildung 7: Reaktionsschema der kovalenten Immobilisierung von Lubricin an Oberflächen mittels NaBH<sub>3</sub>CN.**

Als zweite Möglichkeit zur kovalenten Beschichtung sollte das Linkermolekül Dimethylsuberimidat getestet werden. Dabei handelt es sich um einen homobifunktionellen Imidoester, der gegenüber Aminogruppen reaktiv ist.

Zunächst wurde eine DMS-Lösung mit einer Konzentration von 1,58 mg/ml mit 0,1 M Triethanolaminpuffer (pH 8,5) hergestellt. Die Nitinolplättchen wurden mit 1 ml, die Titanplättchen mit 1,5 ml dieser Lösung überschichtet. Nach einer dreistündigen Inkubation auf dem Kippinkubator bei RT wurde der Überstand abpipettiert und die Plättchen durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml des Puffers von allen Rückständen befreit. Anschließend wurden zu jedem Plättchen 1,5 µg Lubricin/cm<sup>2</sup> und eine ausreichende Menge Triethanolaminpuffers zugegeben, um die Oberfläche vollständig zu bedecken. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2,5 h bei RT wurde erneut der Überstand abgenommen und Blockierpuffer (50 mM Tris-Puffer, pH 8,0) zugegeben, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Auch hier folgte eine Inkubationszeit von 2 h bei RT auf der Rüttelplatte.

Am Ende wurde der Überstand abgenommen, jedes Plättchen 1 mal in PBS sowie 2 mal in Ampuwa gewaschen und mit Argongas getrocknet.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der kovalenten Anbindung des Lubricins mittels DMS. Über die Aminogruppen des Proteins erfolgt die kovalente Bindung.**

### 3.3. Inkorporation des Lubricins mittels Elektrosponnen

Zur Evaluierung verschiedener Anwendungsmöglichkeiten von Lubricin sollte auch die Möglichkeit der Inkorporation des Proteins mittels Elektrosponnen untersucht werden. Bei dieser Methode werden durch Anlegen eines elektrischen Felds ultradünne Fasern aus Polymerlösungen hergestellt. Der Durchmesser der entstehenden Fasern liegt hierbei im Bereich weniger Nano- bis Mikrometer (131). Die Polymerlösung wird hierzu durch eine Kapillare bis zu einer Kanüle gepumpt. Zwischen dieser Austrittsöffnung und einem Kollektor wird eine elektrische Hochspannung angelegt (132). Durch das elektrische Feld bildet sich zunächst ein Flüssigkeitstropfen am Kanülenausgang, der kegelförmig in Richtung Gegenelektrode verformt ist (133). Diese spezifische Form wird als Taylor-Kegel bezeichnet (134). Bei Erreichen einer entsprechend hohen Spannung wird die Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfens überwunden und aus der Spitze des Taylor-Kegels tritt ein Polymerfaden aus, welcher in Richtung Gegenelektrode beschleunigt und am Kollektor aufgefangen wird (133). Während des Prozesses werden so mehr und mehr Fasern am Kollektor gesammelt, die schließlich eine Art Vlies bilden.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit kam ein Zweinadelsystem zum Einsatz, bei dem die zwei Polymerlösungen Polyvinylalkohol und Polycaprolacton simultan gesponnen wurden. Die Vorbereitungen wie auch der Elektrosponnprozess selbst erfolgten nicht unter der Sterilwerkbank. Dieser Teil der Doktorarbeit wurde während eines Auslandsaufenthaltes an der Fakultät

für Textiltechnologie der Technischen Universität in Liberec (Tschechien) unter Leitung von Dr.-Ing. Petr Mikes und RNDr. Jana Horakova durchgeführt.

### 3.3.1. Vorversuch mit Rhodamin B

In einem Vorversuch sollte zunächst getestet werden, ob ein simultanes Spinnen der Polymerlösungen, i.e. Polycaprolactonlösung (Tabelle 5) und Polyvinyl Lösung (Tabelle 6), möglich ist und wie sich dieser Prozess auf die Homogenität und die Freisetzungskinetik der entstandenen Probe auswirkt. Als Fluoreszenzmarker wurde Rhodamin B eingesetzt.

#### Zusammensetzung der Spinninglösungen

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Polycaprolactonlösung (10 wt%)

Reagenz	Menge
PCL, mw 80kDa	5 g
CHCl <sub>3</sub>	36 g
EtOH abs. p.a.	4,5 g
CH <sub>3</sub> COOH 99 %	4,5 g

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Polyvinyl Lösung

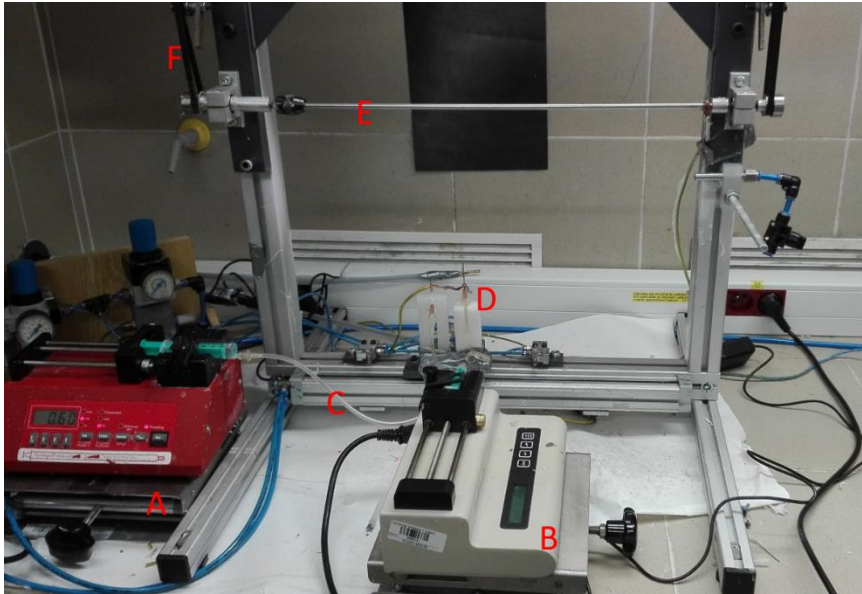
Reagenz	Menge
PVA, 98 %	0,6 g
Millipore Wasser	3,52 g
EtOH abs. p.a.	0,88 g
Rhodamin B	5 mg

Die beiden Lösungen wurden für mehrere Stunden unter Zuhilfenahme eines Rührfisches gerührt, bis ein homogenes Stoffgemisch vorlag.

#### Spinningprozess

Für das Spinnen der Lösungen wurden je 3 ml PCL bzw. PVA in eine Spritze gefüllt und zur kontinuierlichen Freigabe des Inhalts in Infusomaten fixiert. Mittels Heidelberger Verlängerung wurde die Spritze anschließend mit einer Kanüle verbunden. Diese Kanüle wurde zuvor mit einem Schleifstein geschliffen, um die angeschrägte Spitze zu entfernen und eine stumpfe Öffnung zu erhalten. Abbildung 9 zeigt den Aufbau der Apparatur. Nach Anlegen einer Spannung von 19 V und einer Fließgeschwindigkeit von 0,15 ml/h (PVA) bzw. 0,015 ml/h (PCL),

wurden die Lösungen 45 min lang gesponnen, bis sich auf dem tubulären Kollektor eine deutliche Polymerschicht abzeichnete.



**Abbildung 9: Aufbau der Apparatur für das Elektrosponnen im Zweinadelsystem.** Die Polymerlösungen befanden sich in zwei Spritzen, die in Infusomaten eingespannt waren (A&B). Über Heidelberger Verlängerungen (C) wurden sie zu den Nadeln gepumpt (D). Die Nanofasern wurden am sich rotierenden, tubulären Kollektor gesammelt (E), der über einen Keilriemen (F) mit dem Motor verbunden war.

### Validierung der Ergebnisse

Ein ca. 1 cm langes Stück der tubulären Prothese wurde zur Anfertigung rasterelektronenmikroskopischer Bilder herangezogen. Der Rest der Probe wurde in 12 Stücke von je 7cm Länge zerschnitten, in ein Eppendorfgefäß verbracht, mit Reinstwasser bedeckt und bei RT gelagert. Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik wurden nach 1 h, 24 h, 72 h bzw. 7 Tagen jeweils drei dieser Stücke entnommen und die Absorption des Überstandes photometrisch bestimmt.

### **3.3.2. Inkorporation des Lubricins**

Bei der Inkorporation des Lubricins kamen die gleichen Lösungen zum Einsatz wie bei den Vorversuchen. Zusätzlich wurden noch Proben aus 88 %igem PVA hergestellt. Statt Rhodamin B wurde hier allerdings im Falle der proteinenthaltenden Proben Lubricin in einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugefügt. Anschließend wurden, wie im Vorversuch, tubuläre Proben gesponnen. Diese wurden einerseits zur Herstellung rasterelektronenmikroskopischer Bilder und andererseits zur Testung der Hämokompatibilität im Chandler Loop herangezogen.

### 3.4. Testung der Hämokompatibilität

Die Prüfung der Hämokompatibilität wurde im Rahmen der DIN EN ISO 10994-4 durchgeführt. Untenstehende Tabelle gibt einen Überblick über die durchgeführten Tests und die Vorgehensweise.

**Tabelle 7:** Testkategorien im Rahmen der Hämokompatibilitätsuntersuchung

<b>Testkategorie</b>	<b>Ziel</b>	<b>Parameter</b>	<b>Methode</b>
Thrombogenität	Gebundene Blutbestandteile	Thrombozytenaggregation, Adhäsion von Blutzellen (v.a. Thrombozyten) sowie Fibrin	REM
Blutgerinnung	Marker für die Thrombinherstellung	Thrombin-Antithrombin-III Komplex (TAT)	ELISA
Thrombozyten	Thrombozytenzahl	Thrombozytenzahl	Automatischer Zellzähler
Thrombozyten	Thrombozytenaktivierung	$\beta$ -Thromboglobulin	ELISA
Hämatologie	Blutbild	Blutzellmessung	Automatischer Zellzähler
Leukozyten	Leukozytenaktivierung	PMN-Elastase	ELISA
Komplementsystem	Marker für die Aktivierung des Terminalen Angriffskomplexes	SC5b-9	ELISA

### 3.4.1. Blutentnahme

Zur Verhinderung der Gerinnung während des Versuches wurde das verwendete Blut, wie in Tabelle 8 aufgeführt, mit Heparin antikoaguliert.

**Tabelle 8:** Verwendete Menge Heparin bei den verschiedenen Versuchsaufbauten

1 I.E./ml	1,5 I.E./ml
Blutinkubation in der Mikrotiterplatte	Chandler Loop
	Flow Loop

Die Blutentnahme erfolgte unter Vermeidung jeder unnötigen Stauung mittels einer Butterflykanüle. Das Blut stammte ausschließlich von gesunden Nichtraucherinnen und -rauchern, die innerhalb der letzten 14 Tage keine Medikamente eingenommen hatten. Anschließend wurde das Blut eines jeden Spenders aus den Monovetten gepoolt. Aus diesem gepoolten Vollblut erfolgte direkt eine Bestimmung der Ausgangswerte.

### 3.4.2. Extrakorporale Zirkulation

Zur Simulation der extrakorporalen Blutzirkulation kamen drei verschiedene Modelle zum Einsatz.

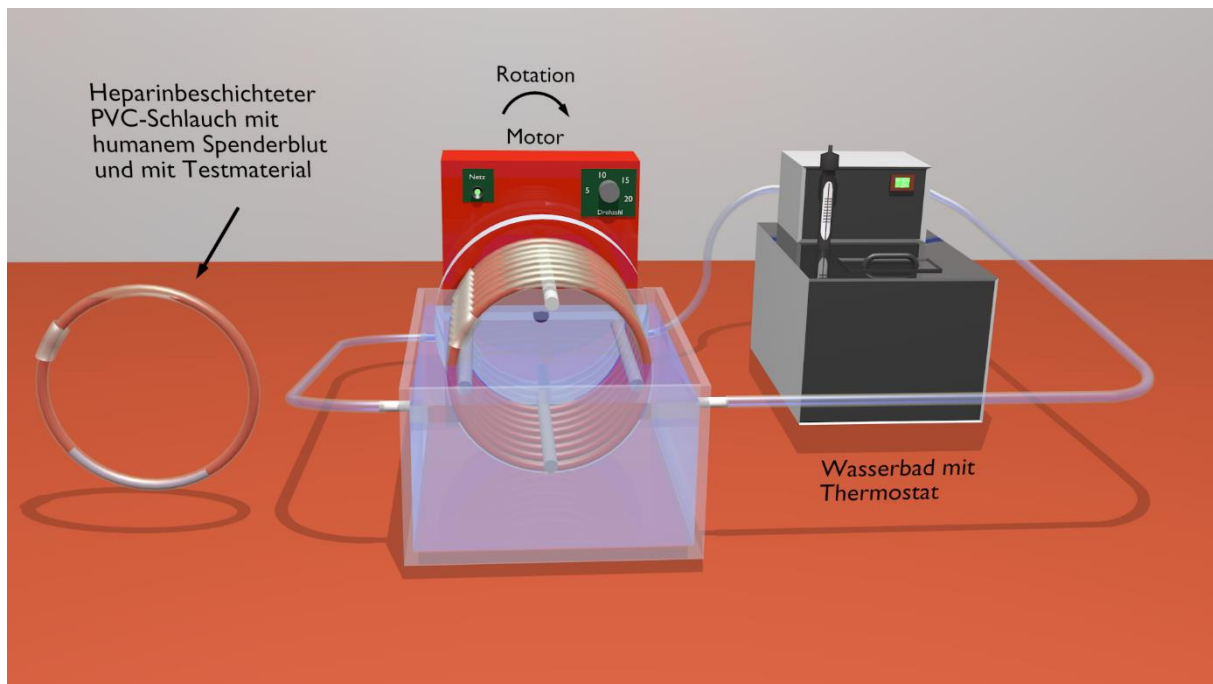
#### 3.4.2.1. Blutinkubation in der Mikrotiterplatte

Als Vorversuch wurden die beschichteten Materialien zunächst in einer Mikrotiterplatte mit humanem Vollblut in Kontakt gebracht. Hierzu wurden die Nitinol- bzw. Titanplättchen in die Vertiefungen einer 6-Wellplatte verbracht und mit 3 ml Blut überschichtet. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf dem Kippschüttler bei 37 °C für 60 min.

#### 3.4.2.2. Chandler Loop

Zur Simulation der Blutzirkulation im extrakorporalen Modell kam ein modifizierter Chandler Loop zum Einsatz (Abbildung 10). Die zu untersuchenden Stents wurden hierzu in heparinbeschichtete PVC-Schläuche (Länge: 50 cm, ID: ¼ ") eingebracht, welche anschließend mit je 12 ml Blut gefüllt wurden. Nachdem jeder Schlauch mittels Verbindungsstücke zu einem geschlossenen Ring verschlossen wurde, erfolgte eine konstante Rotation mit 30 U/min bei 37 °C über 60 min im Wasserbad.





**Abbildung 10: Aufbau des modifizierten Chandler Loops.** Ein heparinbeschichteter Schlauch wurde mit Spenderblut und dem Testmaterial gefüllt. Anschließend erfolgte eine Rotation im temperierten Wasserbad. Modifiziert nach (135).

### 3.4.2.3. Flow Loop

Zur Untersuchung der Beschichtung bei höheren Fließgeschwindigkeiten wurden die Stents in einem pumpenbetriebenen System getestet (Abbildung 11). Hierzu wurden sie in heparinbeschichtete Schläuche von 75 cm Länge und einem Innendurchmesser von 3,2 mm verbracht. Diese wurden anschließend in Pumpen gespannt und mit 6 ml Blut gefüllt. Daraufhin wurde jeder Schlauch mittels Verbindungsstück zu einem Ring verschlossen. Ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad, in das die Schläuche gelegt wurden, ermöglichte die Nachstellung der physiologischen Körpertemperatur. Schließlich erfolgte eine einstündige Inkubation im System bei einer Flussrate von 150 ml/min.



**Abbildung 11: Pumpe zur Testung des Materials im Flow Loop.** Humanes Spenderblut wurde mittels Pumpe im Schlauch rotiert, um die Stents in der extrakorporalen Zirkulation zu testen. Modifiziert nach (136).

### 3.4.3. Analyse des Blutes

Nach Ende der Rotation wurde das Blut umgehend aus den Schläuchen entnommen und in drei verschiedene Monovetten überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation und Lagerung der einzelnen Monovetten entsprechend der Angaben in Tabelle 9.

Die mit Citrat versetzte Monovette wurde direkt nach dem Befüllen bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das mit EDTA antikoagulierte Blut wurde zur Erstellung eines Großen Blutbildes herangezogen. Anschließend wurde es zusammen mit den befüllten CTAD-Monovetten für nicht weniger als 20 min und nicht mehr als 60 min auf Eis verbracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurden auch diese Proben zentrifugiert.

Aus den mit CTAD versetzten Monovetten wurden dann 700  $\mu$ l aus der mittleren Fraktion entnommen und in Neutralmonovetten pipettiert, bevor erneut zentrifugiert wurde.

Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde das Plasma aller drei Monovetten in 1,5 ml Safe-Lock Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Nach anschließendem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proben bis zur Entnahme für die ELISA-Messungen im Gefrierschrank bei -20 bzw. -80 °C gelagert.

**Tabelle 9:** Weiterbehandlung des antikoagulierten Blutes

<b>Antikoagulanz</b>	<b>Zentrifugation</b>	<b>Weiteres Vorgehen</b>	<b>Bestimmte Parameter</b>
EDTA	4 °C, 2500 rpm, 20 min	3 Aliquots à 250 µl  Lagerung bei -80°C nach Schockgefrieren	Großes Blutbild SC5b-9
Citrat	RT, 1800 rpm, 18 min	4 Aliquots à 200 µl  Lagerung bei -20°C nach Schockgefrieren	Thrombin-Antithrombin- komplex Polymorphnuklear- Elastase
CTAD	4 °C, 2500 rpm, 20 min	700 µl-Aliquot aus mittlerer Fraktion  Erneute Zentrifugation  2 Aliquots à 100 µl  Lagerung bei -20 °C nach Schockgefrieren	β-Thromboglobulin

Mit der Bestimmung des plasmatischen Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) wird die Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin detektiert, welches ein zentrales Element der Gerinnungskaskade darstellt (137). Die Quantifizierung von β-Thromboglobulin (β-TG) in den Plasmaproben ermöglicht eine Aussage über den Aktivierungsgrad der Thrombozyten, da dieses plättchenspezifische Protein im Falle einer Aktivierung aus den α-Granula freigesetzt wird (138). Durch Messung der Konzentration des Membranangriffkomplexes SC5b-9 wird die Aktivierung des Komplementsystems bestimmt (139). Als Marker für inflammatorische Prozesse kann die Konzentration der Polymorphkernigen Nuklease (PMN-Elastase) herangezogen werden. Diese Proteinase wird bei phagozytotischer Aktivität der Leukozyten partiell aus den azurophilen Granula freigesetzt (140).

#### **3.4.4. Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Oberflächen**

Nach Ende der Rotation wurden die beschichteten Prothesen entnommen und in PBS gewaschen, bevor sie zur Fixation für 24 h bei 4 °C in 2 %iges Glutaraldehyd verbracht wurden. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) für jeweils 10 min bei RT und das Zuschneiden der Proben auf einen Quadratzentimeter, um Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop zu ermöglichen.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei 4 °C in EtOH absol. gelagert. Anschließend wurden sie einer Critical Point Trocknung unterzogen und auf Probenteller aufgebracht, bevor sie zur Untersuchung unter dem Mikroskop besputtert wurden.

#### **3.5. Test auf Endothelialisierung**

##### **3.5.1. Auftauen und Kultivierung der Zellen (HUVECs und HEK293)**

Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad rasch erwärmt und anschließend mit EC-Medium (VascuLife Basalmedium) bzw. HEK-Medium (DMEM high glucose mit 10 % fetalem Kälberserum) in ein Zentrifugenröhrchen verbracht. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 g und RT. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in frisches Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Hierin erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Wurden HUVECs kultiviert, so wurde die Zellkulturflasche zuvor mit 0,1%iger Gelatine beschichtet. Bei einer Konfluenz des Zellrasens von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 5 ml Trypsin abgelöst. Anschließend wurden 5 ml des Kulturmediums zugegeben, um die Wirkung des Trypsins abzustoppen, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g und RT für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Zellen in frisches Kulturmedium wurden die Zellen auf zwei Zellkulturflaschen verteilt.

Wurden Zellen für einen Versuch benötigt, so wurde die Zellzahl nach Resuspension im Zellzähler (CASY, OMNI life science, Bremen) bestimmt.

##### **3.5.2. Untersuchung der Zelladhäsion auf beschichteten Oberflächen**

Zur Untersuchung der Endothelialisierung wurde das Wachstum von HEK- und HUVEC-Zellen auf unbeschichteten sowie beschichteten Nitinol- bzw. Titanplättchen verglichen. Die Proteinmenge von 1,5 µg/cm<sup>2</sup> Plättchen entsprach hierbei jener der Blutversuche und wurde durch

Aufpipettieren und anschließendes Trocknen aufgebracht. Die Plättchen wurden in die Vertiefungen einer 6-Wellplatte verbracht und mit 3 ml Medium beschichtet. Anschließend wurden pro Vertiefung  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der 24 h erfolgte die Färbung mittels DAPI-Farbstoff. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Methanol (-20 °C) fixiert. Danach wurde 1 ml der frischen Färbelösung (1 µg/ml in Methanol) zugegeben und für 15 min bei RT und Lichtausschluss inkubiert. Zuletzt erfolgte eine zweimalige Spülung mit Methanol (-20 °C), bevor die Proben bei ultraviolettem Licht unter 100-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Die Zellzahlen der Kontrolle wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf 100 % gesetzt.

### 3.6. Bakterienversuche

#### 3.6.1. Bakterienkultivierung

##### Herstellung der Nährmedien

Die Zusammensetzung der Nährmedien erfolgte entsprechend den Angaben in Tabelle 10. Nach Mischen der Bestandteile wurden die Lösungen autoklaviert. Für die Herstellung der Agarplatten wurde der Müller-Hinton-Agar anschließend in Petrischalen gegossen und abgekühlt.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Nährmedien

	Müller-Hinton-Medium	Müller-Hinton-Agar
Bidestilliertes Wasser	400 ml	400 ml
Müller-Hinton2-Medium	8,8 g	8,8 g
Agar-Agar		6,0 g

##### Anzüchtung der Bakterien

Für alle Versuche mit Bakterien wurde das Bakterium *Staphylococcus aureus* (S. aureus ATCC 25923) verwendet. Dieses wurde unter ständigem Schütteln bei 37 °C in Müller-Hinton-2-Medium kultiviert. Alle 24 h und vor Entnahme der Bakterien für einen Versuch wurden 200 µl der Suspension in frisches Medium überführt, um eine weitere Kultivierung zu gewährleisten.

### **3.6.2. QCM – Messungen mit Staphylococcus aureus**

#### **3.6.2.1. Vorbereitung der Messung**

Die Vorbereitung des Proteins sowie des Gerätes erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben.

#### **3.6.2.2. Vorbereitung der Bakterien**

Vor der Verwendung im QCM wurde die Bakteriensuspension für 5 min bei 3000 g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Einstellung der optischen Dichte durch schrittweise Zugabe von PBS und wiederholter Messung im Mikroplattenleser bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,3.

#### **3.6.2.3. Durchführung der Messungen**

Unter ständigem Mischen mittels Rührfisches wurde die Bakterienlösung zwei Stunden lang durch die Quarzkammer geleitet. Bei den Versuchen mit Lubricin wurde das Protein davor 30 min lang durch das System gepumpt, bis es zur Sättigung der Frequenz kam. Anschließend erfolgte auch hier eine zweistündige Messung mit Staphylococcus aureus. Beendet wurden alle Versuche nach 20-minütiger Spülung mit PBS. Die Pumpgeschwindigkeit war mit 60 µl/min bei allen Messungen und allen Flüssigkeiten gleich.

#### **3.6.2.4. Färbung der gebundenen Bakterien**

Am Ende der Messung wurde die Kammer vorsichtig mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min entleert. Anschließend wurde die Kammer zügig demontiert und der Quarz entnommen, um seine Oberfläche vorsichtig mit Ampuwa zu spülen. Direkt danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation in Lebend-/Tot-Färbung. Dazu wurde 1 ml Ampuwa mit 3 µl Lösung A (SYTO 9) und 3 µl Lösung B (Propidiumiodid) versetzt und der Quarz mit der Oberseite nach unten in die Lösung gelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Oberfläche erneut mit Ampuwa gespült und zügig unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Pro Quarz wurden insgesamt fünf Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung gemacht. Diese wurden an unterschiedlichen Stellen der Oberfläche angefertigt: am Eingang, am Ausgang, in der Mitte und an der Ober- sowie Unterseite.

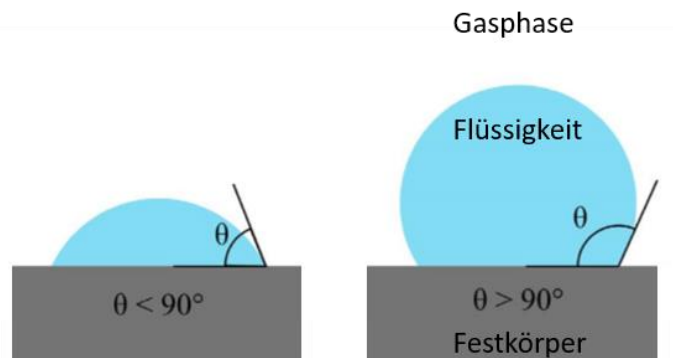
### **3.6.3. Agardiffusionstest**

Zur Untersuchung auf die Ausbildung eines Hemmhofes kam erneut Staphylococcus aureus zum Einsatz. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden 200 µl der Bakteriensuspension auf eine Agarplatte mit Müller-Hinton-Agar pipettiert und mittels steriler Glaskügelchen gleichmäßig verteilt. Zuvor mittels UV-Licht desinfiziertes Filterpapier wurde zurechtgeschnitten und mit

30 µl der jeweiligen Probe beladen. Zum Einsatz kamen drei verschiedene Proteinkonzentrationen: 45 µg/ml, 90 µg/ml und 450 µg/ml. Das Filterpapier wurde auf den Agar gelegt und leicht festgedrückt. Anschließend wurde die Platte mit dem Deckel nach unten bei 37 °C in den Inkubator gelegt. Nach 24 h erfolgte die makroskopische Untersuchung auf Ausbildung eines Hemmhofes.

### 3.7. Kontaktwinkelmessungen

Mittels Kontaktwinkelmessungen lässt sich der Grad der Benetzbarkeit einer Oberfläche mit Flüssigkeiten bestimmen. Hierzu wird mittels Dosierkanüle ein Flüssigkeitstropfen eines exakt definierten Volumens auf die zu untersuchende Oberfläche aufgebracht und mittels Kamera dokumentiert. Zur Bestimmung des Kontaktwinkels wird anschließend der Winkel  $\theta$  zwischen der Kontaktfläche und der Oberfläche des Flüssigkeitstropfens mithilfe eines Bildverarbeitungsprogrammes bestimmt. Bei einem Kontaktwinkel von über 90° ist die Benetzbarkeit schlecht und die Oberfläche demnach hydrophob (141). Bei einem Winkel unter 90° gilt die Oberfläche dagegen als hydrophil. Ist der Festkörper vollständig benetzbar und der Tropfen verläuft auf der Oberfläche, so nimmt  $\theta$  den Wert 0° an (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Bestimmung des Kontaktwinkels.**  $\theta$  bezeichnet den Winkel zwischen der Oberfläche des Festkörpers und der Oberfläche des aufgebracht Tropfens. Links: Hydrophile Oberfläche,  $\theta$  beträgt weniger als 90°. Rechts:  $\theta$  nimmt einen Wert von über 90° an. Die Oberfläche ist demnach hydrophob. Modifiziert nach (142).

#### 3.7.1. Evaluation der Sterilisierbarkeit

Zur Bestimmung der Stabilität der Beschichtung während einer Sterilisation wurden Vorversuche mit UV-Licht durchgeführt. Hierzu wurden Titanplättchen adsorptiv sowie kovalent mit

Lubricin beschichtet und anschließend deren Kontaktwinkel bestimmt. Nach einer 30-minütigen Bestrahlung mittels UV-Licht wurde die Messung wiederholt.

### **3.7.2. Lagerstabilitätsmessungen**

Um die Lagerungsfähigkeit der Beschichtung zu testen, wurden Titan- und Nitinolplättchen adsorptiv und mit DMS kovalent beschichtet. Unmittelbar nach dem Beschichtungsprozess wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C gelagert und die Messungen nach 48 h, 7 Tagen und 4 Wochen wiederholt. Bei den Kontaktwinkelmessungen wurde Aqua dest. mit einem Tropfenvolumen von 2 µl verwendet. Der eingesetzte Nadeldurchmesser lag bei 0,5 mm und die Aufnahmedauer bei 20 Sek. Nach der Messung wurden die Materialien vorsichtig mit Stickstoff getrocknet, um die Tropfen vollständig zu entfernen.

Als Kontrolle dienten unbeschichtete sowie nur mit PBS beschichtete Plättchen. Außerdem wurden zum Vergleich Plättchen herangezogen, die alle Schritte der kovalenten Beschichtung durchlaufen hatten, bei denen final allerdings kein Protein zugegeben wurde. Nach Inkubation mit DMS wurden bei diesen Plättchen freie Bindungsstellen direkt mit Blockierpuffer blockiert.

## **3.8. Nachweismethoden**

### **3.8.1. Bicinchoninsäure-Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration kam ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) zum Einsatz, welcher die quantitative Proteinbestimmung mittels photometrischer Messung ermöglicht. Durch das enthaltene Protein wird zunächst zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer reduziert, welches anschließend einen Komplex mit den BCA-Molekülen bildet. Dieser Chelatkomplex führt zu einem violetten Farbumschlag (143).

Das Ansetzen der Reagenzien und die Inkubation erfolgten nach Arbeitsanleitung in 96-Well-Platten. Anschließend wurde die Adsorption bei 562 nm mittels Photometer gemessen.

### **3.8.2. Antikörpernachweis**

Mittels Cy3-gekoppeltem polyklonalem Antikörper sollte das oberflächengebundene Lubricin nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst Titan- und Nitinolplättchen adsorptiv durch Aufpipettieren beschichtet (1,5 µg/cm<sup>2</sup>) und bei RT getrocknet. Anschließend wurde der Antikörper 1:50 mit PBS verdünnt, 50 µl der Lösung auf die beschichteten Plättchen pipettiert und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Als Kontrolle diente ein unbeschichtetes Plättchen.



### **3.8.3. Energiedispersive Röntgenspektroskopie mit Goldnanopartikeln**

In der vorliegenden Arbeit wurden Nitinolplättchen absorptiv beschichtet und anschließend mit PNA-kolloidalem Gold inkubiert, wodurch es zur Absorption des Proteins auf der Oberfläche der Nanopartikel kommt (144). Eine Detektion der Goldpartikel lässt so indirekt Rückschlüsse auf das gebundene Protein zu. Dabei wurden 10 µg kolloidales Gold in 1 ml PBS gelöst und die Plättchen für 15 min in der Lösung belassen. Anschließend wurden die Proben drei Mal mit PBS gewaschen. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit PBS behandelte Plättchen, um unspezifische Bindungen zu detektieren.

### **3.8.4. RAMAN - Spektroskopie**

Um eine Referenzkurve mit allen zu erwartenden Proteinpeaks zu erhalten, wurden zunächst Titanplättchen adsorptiv beschichtet. Um ein deutliches Proteinsignal zu erhalten, wurden 50 µl einer 450 µg/ml Lubricinlösung aufgebracht und mittels RAMAN-Spektrometer untersucht. Anschließend wurden Nitinolplättchen in gewohnter Weise mit 1,5 µg/cm<sup>2</sup> Lubricin beschichtet und die entstandenen Proteinpeaks mit denen der Referenzkurve verglichen.

### **3.9. Statistische Auswertung**

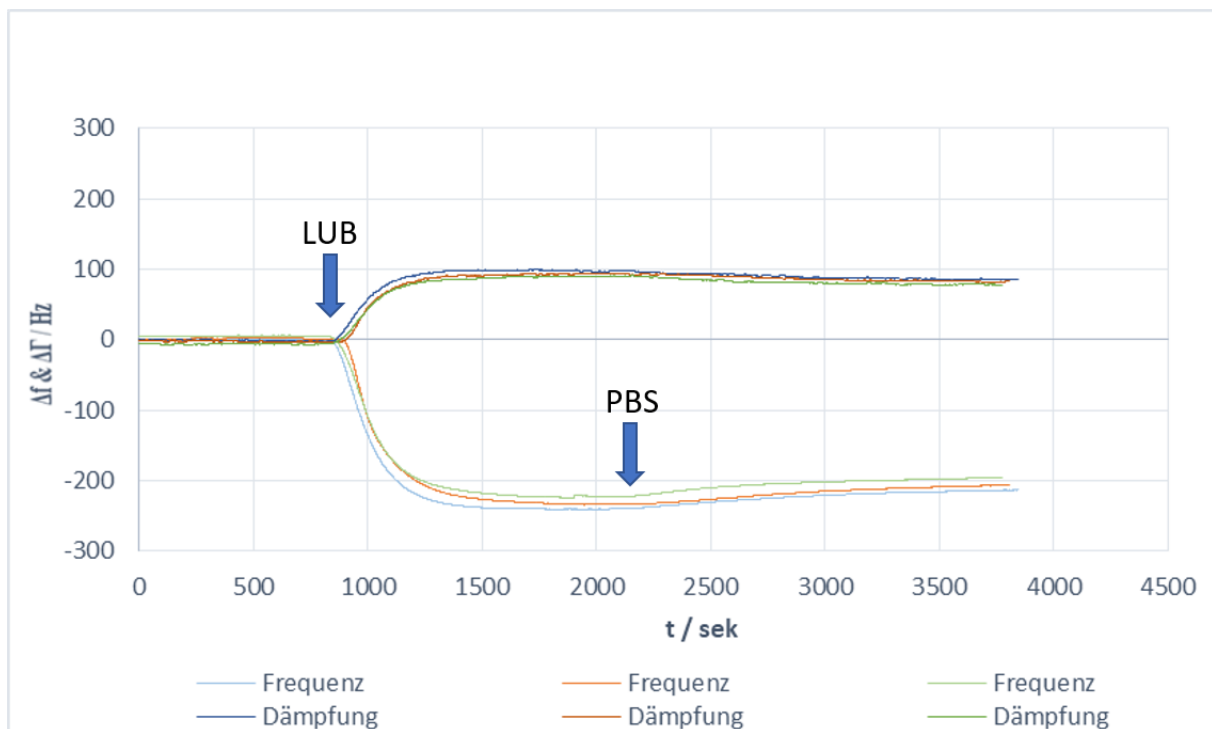
Die Ergebnisse wurden graphisch als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Normalverteilte Daten wurden mittels t-Test oder Repeated Measures (RM) one-way ANOVA auf statistische Signifikanzen überprüft. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Analyse mittels Friedman Test. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software „GraphPad Prism Version 6.01“. Die Signifikanz wurde als  $p \leq 0,05$  definiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. QCM-Messungen

#### 4.1.1. Adsorptionsfähigkeit des Lubricins

Zunächst sollten QCM-Messungen zeigen, ob das Protein Lubricin adsorptiv an der Oberfläche von Titanquarzen bindet. Hierzu wurde das Adsorptions- und Desorptionsverhalten des Proteins während einer Messung mit einer Fließgeschwindigkeit von 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  beurteilt (Abbildung 13). Etwa 3 min nach Zugabe erreicht das Lubricin die Quarzkammer, wodurch es zum typischen Bild einer Proteinanlagerung am Quarz mit starkem initialen Frequenzabfall kommt. Nach etwa 20 min kommt es zur Sättigung. Durch die Zugabe von PBS wird lose gebundenes Protein entfernt, wodurch die Frequenz wieder leicht ansteigt. Nach ca. 30 min ist erneut eine Sättigung erreicht.

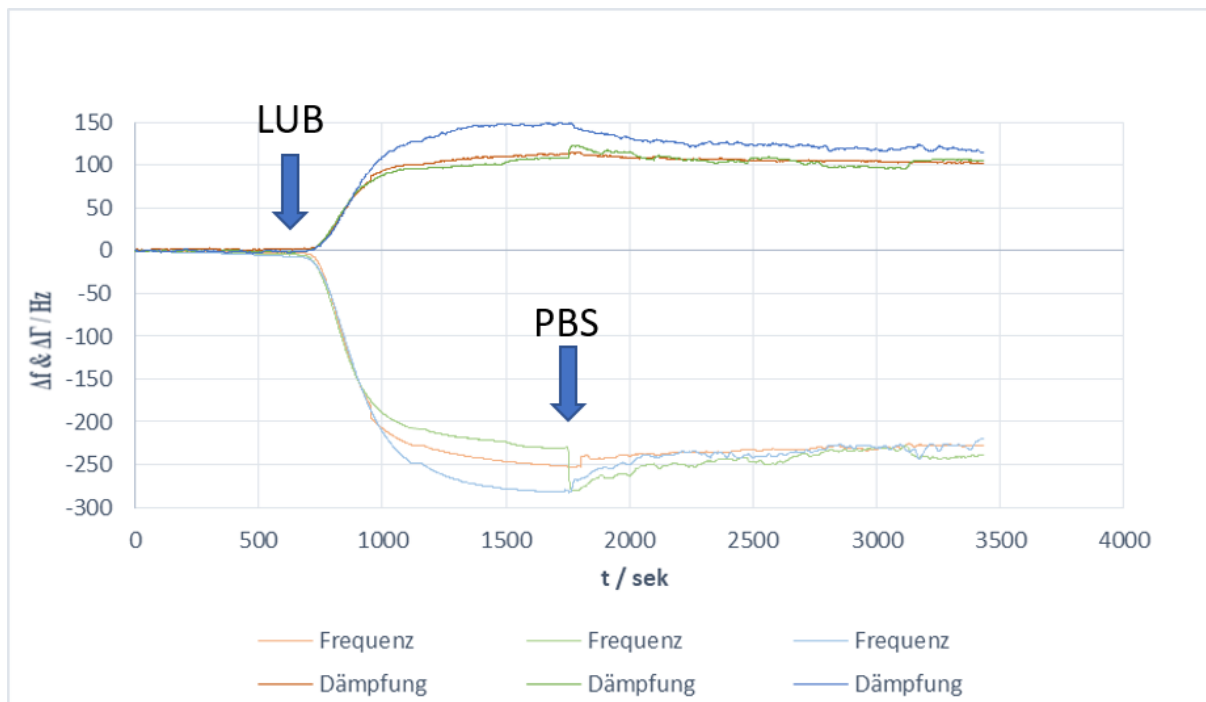


**Abbildung 13: QCM-Messung mit Lubricin (LUB).** Der Graph zeigt den Frequenz- und Dämpfungsverlauf bei einer Flussrate von 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  (verwendete LUB-Konzentration: 27  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die blauen Pfeile markieren den Eintritt der jeweiligen Lösung in die Quarzkammer. Die beiden zusammengehörigen Signalverläufe ( $\Delta f$  (Frequenzabfall) &  $\Delta \Gamma$  (Dämpfungsanstieg) pro Hertz (Hz)) der einzelnen Messungen sind in der Legende paarweise übereinander dargestellt ( $n=3$ ).  $t/\text{sek}$ : Zeit in Sekunden.

Mittels Sauerbrey-Gleichung lässt sich die gebundene Proteinmasse nach Erreichen der Sättigung am Ende der Messung bestimmen. Demnach verbleiben nach Entfernung lose gebundenen Proteins durchschnittlich 904  $\text{ng}/\text{cm}^2$  an der Oberfläche des Quarzes.

#### 4.1.2. Stabilität des gebundenen Lubricins

Da Implantatsbeschichtungen auch höheren Fließgeschwindigkeiten im Blutgefäß standhalten müssen, wurde nachfolgend die Stabilität des gebundenen Proteins während einer QCM-Messung bei erhöhter Fließgeschwindigkeit des PBS (1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) untersucht. Der entstandene Graph (Abbildung 14) zeigt einen deutlich unruhigeren Signalverlauf, als die Messungen bei niedrigerer Geschwindigkeit. Jedoch pendeln sich sowohl Frequenz als auch Dämpfung nach kurzer Zeit auf einem vergleichbaren Niveau ein, wie bei den vorangegangenen Messungen mit niedrigerer Spülgeschwindigkeit.



**Abbildung 14: QCM-Messung zur Stabilitätsbestimmung des gebundenen Lubricins.** Der Graph zeigt den Signalverlauf bei erhöhter Fließgeschwindigkeit des PBS (1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Die blauen Pfeile markieren den Eintritt der jeweiligen Lösung in die Quarzkammer. Die beiden zusammengehörigen Signalverläufe ( $\Delta f$  (Frequenzabfall) &  $\Delta \Gamma$  (Dämpfungsanstieg) pro Hertz (Hz)) der einzelnen Messungen sind in der Legende paarweise übereinander dargestellt. (n=3). t/sek: Zeit in Sekunden.

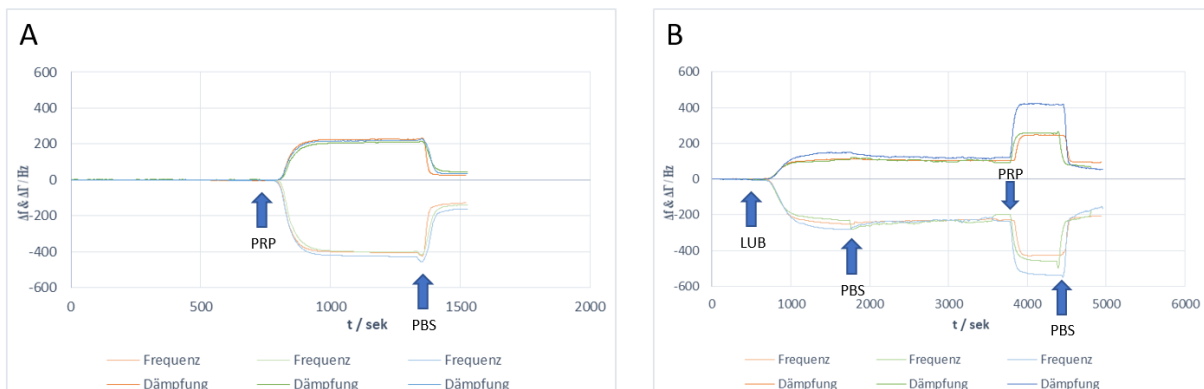
Die gebundene Proteinmasse nach Erreichen der Sättigung ist mit 844,27  $\text{ng}/\text{cm}^2$  vergleichbar mit jener bei langsamer Fließgeschwindigkeit. Die Beschichtung erscheint demnach auch bei einer stärkeren Strömungsgeschwindigkeit stabil.

#### 4.1.3. Untersuchung der antithrombozytären Eigenschaft

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle im Gerinnungsgeschehen wurden für die erste Beurteilung der antiadhäsiven Eigenschaften des Lubricins Thrombozyten als Testmaterial gewählt. Nach der Beschichtung des Quarzes mit Lubricin wurde dieser in Kontakt mit plättchenreichem Plasma

(PRP) gebracht. Vergleicht man Frequenz- und Dämpfungsverlauf der beschichteten Quarze mit jenen der Kontrollmessungen, so werden deutliche Unterschiede sichtbar (Abbildung 15). Bei den Kontrollmessungen mit unbehandelten Quarzen lassen die beiden Kurven nach Spülung mit PBS anhaftende Thrombozyten erkennen (Abbildung 15A). Die Frequenz erreicht nicht wieder die Grundlinie, sondern kommt bei  $-144,03 \pm 18,01$  Hz zur Sättigung. Berechnungen mittels Sauerbrey-Gleichung ergeben zu diesem Zeitpunkt einen Mittelwert an adhärenter Masse von  $713,67$  ng/cm<sup>2</sup>.

Wie bereits beschrieben kommt es nach Perfusion des Lubricins zu einem Frequenzabfall ( $-246,07 \pm 26,81$  Hz) sowie einem Dämpfungsanstieg ( $118,65 \pm 23,94$  Hz) (Abbildung 15B). Ein nachfolgender Waschschriff führt zu keiner Änderung der Signale. Auch hier zeigt sich wie in Abbildung 15A, dass die anschließende Perfusion mit PRP zu einem starken Frequenzabfall ( $486,52 \pm 57,24$  Hz) bzw. Dämpfungsanstieg ( $310,13 \pm 93,03$  Hz) führt. Bei erneuter Spülung mit PBS kehrt das Signal jedoch wieder zu jener Oszillation zurück, die nach Zugabe von LUB und anschließender PBS-Spülung erreicht wurde. Eine vorherige Beschichtung des Quarzes mit LUB scheint eine Zelladhäsion an der Quarzoberfläche somit vollständig zu verhindern.

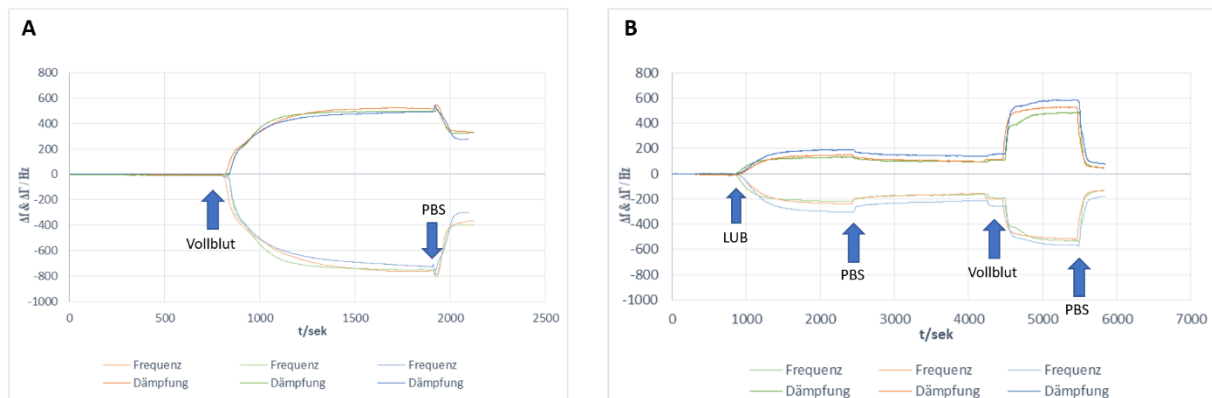


**Abbildung 15: Ergebnisse der QCM-Messungen mit plättchenreichem Plasma (PRP) und Lubricin (LUB).** Vergleichende Darstellung der Kontrollmessung (A) und der vorher mit LUB perfundierten Quarze (B). Die blauen Pfeile markieren den Eintritt der jeweiligen Lösung in die Quarzkammer. Fließgeschwindigkeit PBS: 1000  $\mu$ l/min. Fließgeschwindigkeit LUB & PRP: 60  $\mu$ l/min. Die beiden zusammengehörigen Signalverläufe ( $\Delta f$  (Frequenzabfall) &  $\Delta r$  (Dämpfungsanstieg) pro Hertz (Hz)) der einzelnen Messungen sind in der Legende paarweise übereinander dargestellt ( $n=3$ ).  $t$ /sek: Zeit in Sekunden.

#### 4.1.4. Messungen mit Vollblut

Um die antiadhäsiven Eigenschaften des Lubricins auch im komplexen Zusammenspiel der verschiedenen Blutbestandteile zu testen, wurden die vorherigen Messungen mit humanem Vollblut wiederholt. Die entstandenen Graphen (Abbildung 16) ähneln in ihrem Verlauf jenen

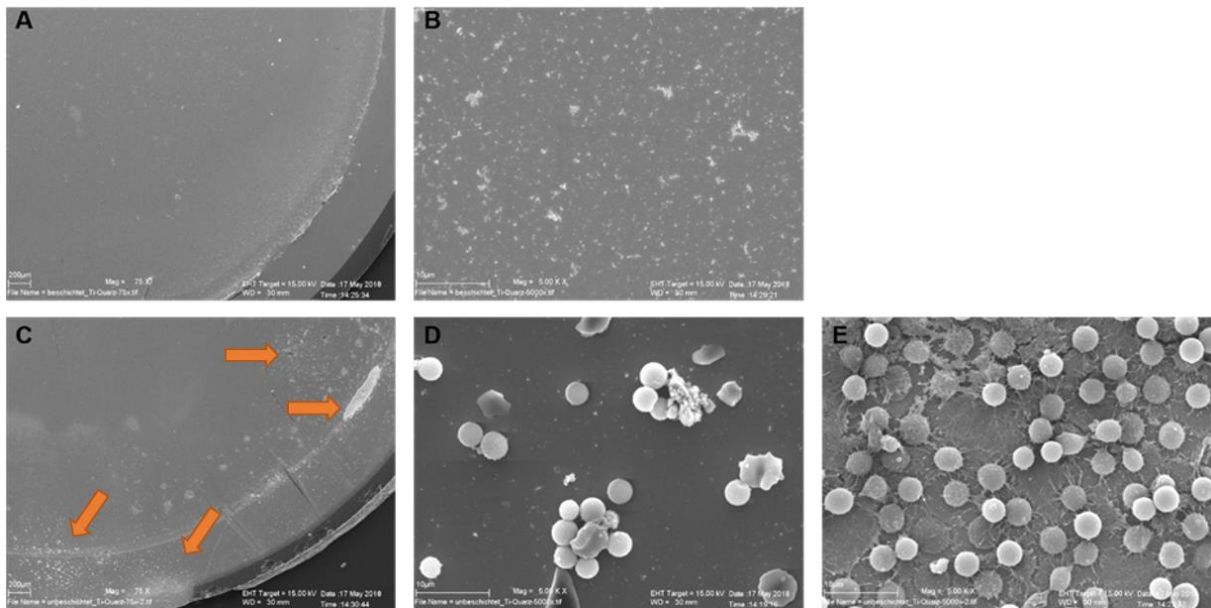
der Messungen mit PRP. Auch hier zeigt der beschichtete Quarz (Abbildung 16B) nach Kontakt mit Vollblut und anschließender Spülung mit PBS keine Frequenzdifferenz zur ersten Sättigung nach Zugabe von PBS. Alle drei Durchgänge mit unbeschichteten Quarzen zeigen jedoch auch nach der Pufferzugabe deutliche Verschiebungen in Frequenz und Dämpfung verglichen zur Grundlinie. Als Mittelwert lässt sich anhand der Kurven eine gebundene Masse von 1546,7 ng/cm<sup>2</sup> berechnen.



**Abbildung 16: QCM-Messungen mit humanem Vollblut und Lubricin (LUB).** Vergleichende Darstellung der Kontrollmessung (A) und der vorher mit LUB perfundierten Quarze (B). Die blauen Pfeile markieren den Eintritt der jeweiligen Lösung in die Quarzkammer. Fließgeschwindigkeit PBS: 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Fließgeschwindigkeit LUB & Vollblut: 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die beiden zusammengehörigen Signalverläufe ( $\Delta f$  (Frequenzabfall) &  $\Delta r$  (Dämpfungsanstieg) pro Hertz (Hz)) der einzelnen Messungen sind in der Legende paarweise übereinander dargestellt. ( $n=3$ ).  $t/sek$ : Zeit in Sekunden.

Am Ende der QCM-Messungen wurden zur Visualisierung der gebundenen Blutbestandteile rasterelektronenmikroskopische Bilder der Quarze angefertigt (Abbildung 17). Die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse entsprechen den Ergebnissen der Schwingquarzmessungen.

Bereits bei 75-facher Vergrößerung fällt eine deutliche Zelladhäsion auf der Oberfläche des unbeschichteten Quarzes auf, während der mit LUB perfundierte Quarz keine oder nur vereinzelt adhärente Zellen erkennen lässt. Bei 5000-facher Vergrößerung werden die Unterschiede noch deutlicher sichtbar. Während an überwiegenden Teilen des unbeschichteten Quarzes hauptsächlich Thrombozyten und Leukozyten zu finden sind, existieren einzelne Stellen mit dichter Fibrin- und Zellablagerung. Die Oberfläche des beschichteten Quarzes erscheint weiterhin frei von adhären Zellen. Es werden jedoch Strukturen sichtbar, die sich aufgrund ihrer Größe und ihres Erscheinungsbildes als Salzkristalle oder als Protein identifizieren lassen.

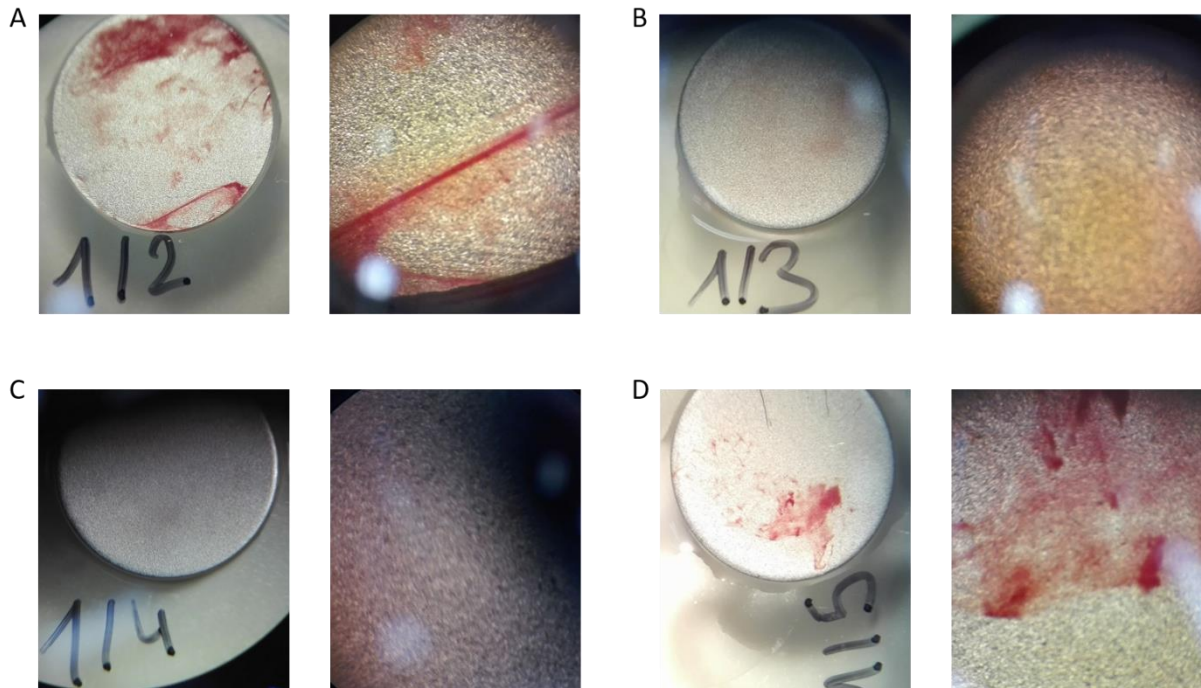


**Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Quarze nach Perfusion von humanem Vollblut in der QCM. A)** Lubricinbeschichteter Quarz (75-fach); **(B)** Lubricinbeschichteter Quarz (5000-fach); **(C)** Unbeschichtete Kontrolle (75-fach); **(D)** Unbeschichtete Kontrolle, Mitte des Quarzes (5000-fach); **(E)** Unbeschichtete Kontrolle, randständig (5000-fach). Die orangefarbenen Pfeile markieren Stellen mit deutlicher Adhäsion von Thrombozyten aus dem Vollblut.

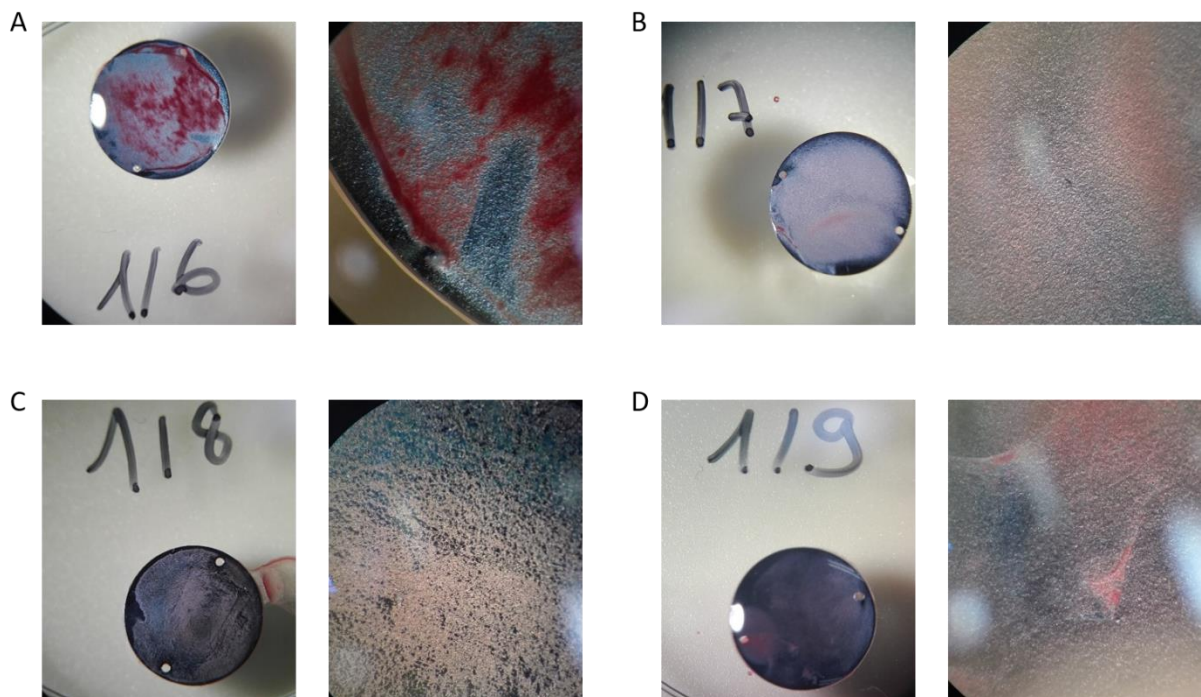
## 4.2. Analyse der Hämokompatibilität

### 4.2.1. Vereinfachtes Inkubationsmodell in der Mikrotiterplatte

Zur ersten Bewertung des Einflusses des Proteins auf die Hämokompatibilität sollten adsorptiv und mittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  kovalent beschichtete Nitinol- und Titanplättchen in einer Mikrotiterplatte mit Vollblut inkubiert werden. Anschließend sollte das Blut zur Detektion verschiedener Hämokompatibilitätmarker herangezogen und die Plättchen rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden. Da vor Ablauf der Zeit jedoch trotz Antikoagulation mit 1 I.E. Heparin/ml die Gerinnung eintrat, war das Blut für weitere Analysezwecke unbrauchbar. Die Plättchen wurden jedoch trotzdem vorsichtig aus den Vertiefungen entnommen und zunächst mittels Binokular untersucht. Abbildungen 18 und 19 zeigen die mikroskopischen Aufnahmen des ersten Spenders. Die Untersuchungen bei 0,65- und 4-facher Vergrößerung zeigen deutliche Unterschiede zwischen unbeschichteter und beschichteter Oberfläche beider Materialien. Während das adsorptiv beschichtete und das inkubierte Plättchen vollkommen frei von anhaftendem Blut erscheinen, zeigt die kovalent beschichtete Oberfläche nur eine leichte Verbesserung zur unbeschichteten Kontrolle.

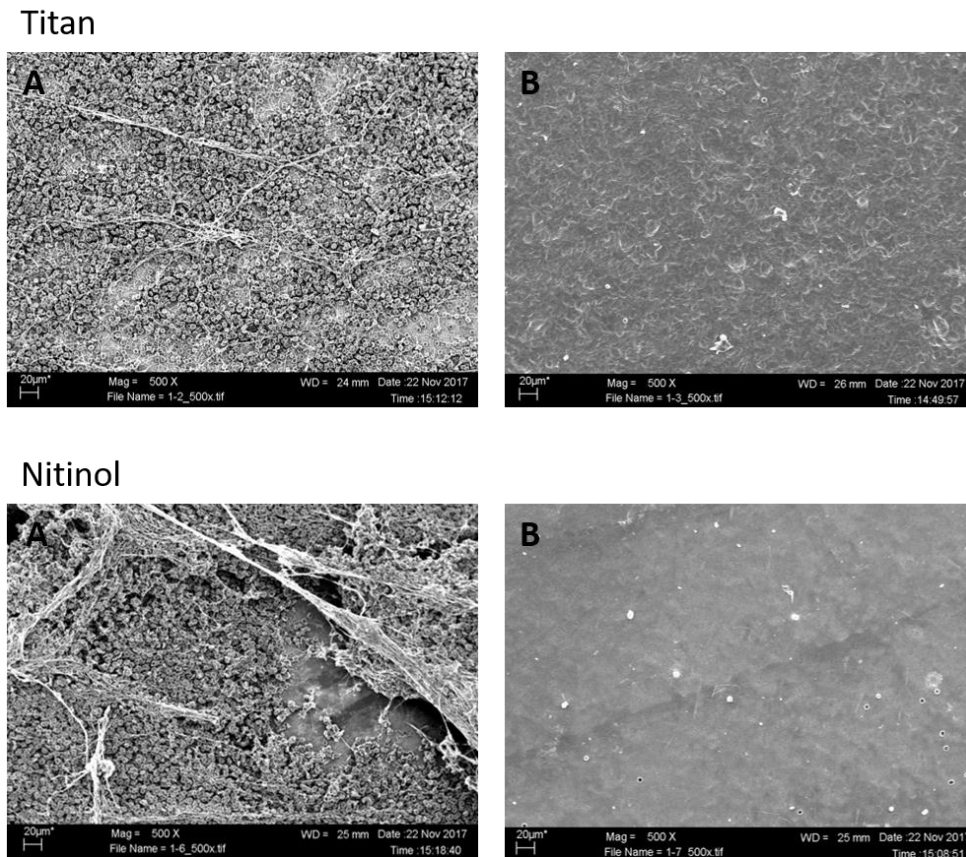


**Abbildung 18: Oberfläche der Titanplättchen nach Blutkontakt in der Mikrotiterplatte bei 0,65- und 4-facher Vergrößerung. (A) unbeschichtete Kontrolle; (B) adsorptive Beschichtung mit Lubricin ( $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); (C) inkubiertes Plättchen (24 h in einer Lubricinlösung der Konzentration  $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (D) kovalent beschichtet.**



**Abbildung 19: Nitinolplättchen nach Inkubation mit Blut in der Mikrotiterplatte (0,65- und 4-fache Vergrößerung). (A) unbeschichtete Kontrolle; (B) adsorptive Beschichtung mit Lubricin ( $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); (C) inkubiertes Plättchen (24 h in einer Lubricinlösung der Konzentration  $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (D) kovalent beschichtet.**

Darüber hinaus wurden zur Visualisierung der Blutbestandteile von beiden Materialien raster-elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Exemplarisch sind in Abbildung 20 die adsorptiv beschichteten sowie die nicht behandelten Plättchen dargestellt. Diese bestätigen die Unterschiede aus den Untersuchungen mittels Binokular. Während die unbeschichteten Oberflächen ein dichtes Fibrinnetz und flächendeckend adhärente Blutzellen aufweisen, erscheinen die mit Lubricin beschichteten Materialien nahezu frei von Blutbestandteilen. Lediglich vereinzelte Blutzellen sind erkennbar.



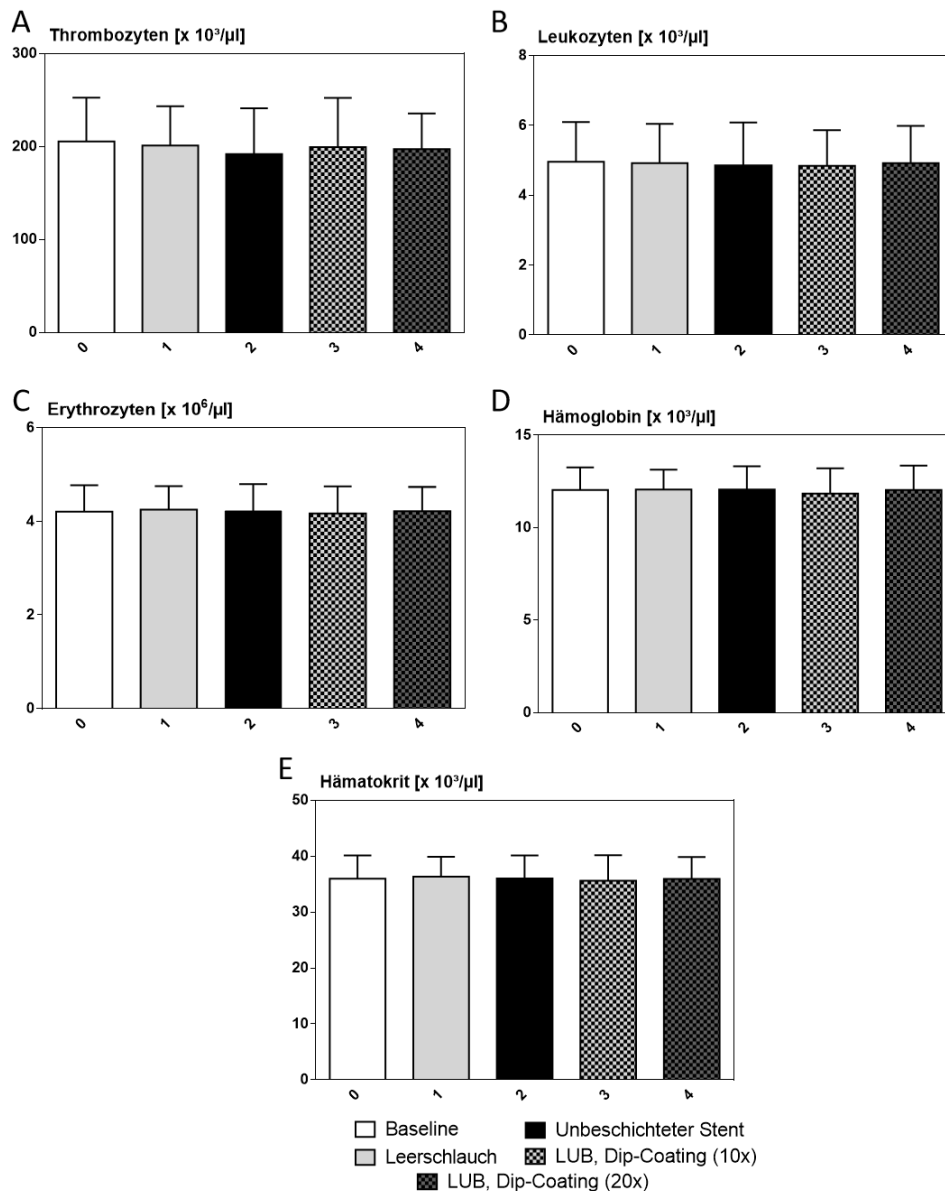
**Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Titan- und Nitinolplättchen nach Blutkontakt. (A) unbeschichtet (B) adsorptiv mit Lubricin ( $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichtet (500-fache Vergrößerung).**

#### 4.2.2. Rotationsmodell mittels modifiziertem Chandler Loop

Nach den vielversprechenden Ergebnissen der ersten Versuche sollte der Effekt der Beschichtung auf die Hämokompatibilität mittels modifiziertem Chandler Loop getestet werden. Dieses Modell ist im Labor als extrakorporale Simulation der Blutzirkulation bereits etabliert (135, 145). In vorliegendem Versuch wurden 10-fach und 20-fach in Lubricin gedippte Stents miteinander verglichen. Um eine Aussage über mögliche negative Effekte der Beschichtung treffen zu können und die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten zu detektieren, wurde das Blut nach Kontakt mit den verschiedenen Materialien im Zellzähler analysiert. Ein Leerschlauch,



der lediglich Spenderblut und keinen Probekörper (Stent) enthielt, wurde als Kontrolle mitgeführt, um potentiell aktivierende Effekte, die durch die Rotation des Blutes entstehen, zu detektieren. Ein unbeschichteter Stent diente als Kontrolle für positive oder negative Effekte der Beschichtung selbst. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Zellzählung. Das Blutbild lässt keine negativen Effekte auf die Zellzahlen erkennen. Ebenfalls fällt auf, dass weder die Rotation selbst, noch der unbeschichtete Kontrollstent zu einem Abfall der Thrombozyten- und Leukozytenzahl führen.



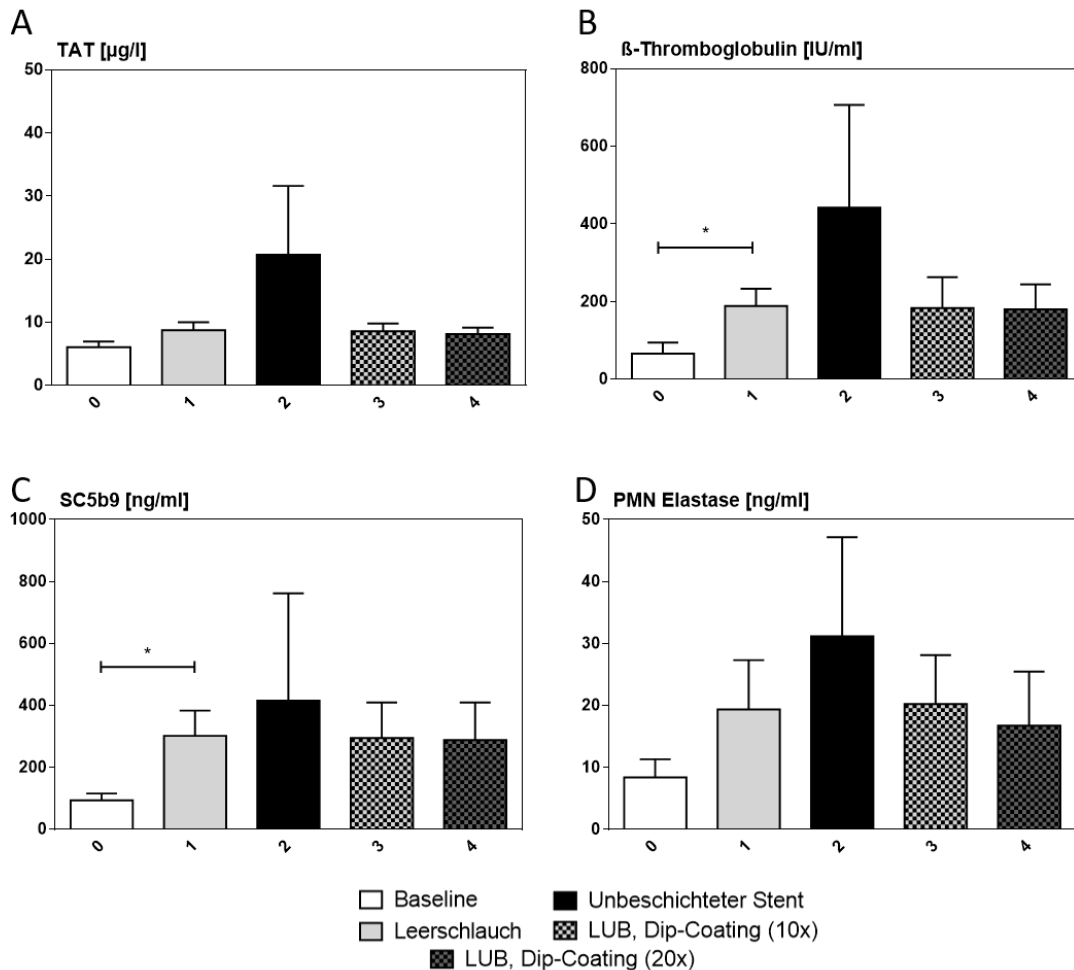
**Abbildung 21: Ergebnis der Blutbildanalyse vor (0) und nach Zirkulation (1-4) im modifizierten Chandler Loop.**

**A-E:** (0) Baseline; (1) Leerschlauch; (2) unbeschichteter Kontrollstent; (3) Dip-Coating (10x gedippt); (4) Dip-Coating (20x gedippt). (Mittelwert  $\pm$  SD, n=5).

Darüber hinaus wurden mittels ELISA verschiedene Parameter zur Aktivierung der Thrombozyten, Leukozyten und des Komplementsystems bestimmt (Abbildung 22).

Bei der Ausschüttung von  $\beta$ -TG führt die Rotation selbst zu einem signifikanten Anstieg von  $66,45 \pm 28,17$  auf  $189,30 \pm 44,27$  I.E./ml ( $p \leq 0,05$ ). Die gleiche Wirkung lässt sich durch den Rotationsvorgang auf das Komplementsystem erkennen. Hier kommt es zu einem signifikanten Anstieg von SC5b-9 von  $93,97 \pm 22,51$  auf  $302,40 \pm 81,49$  ng/ml ( $p \leq 0,05$ ). Jedoch bleibt eine weitere signifikante Aktivierung durch den unbeschichteten Kontrollstent bei beiden Markern aus.

Obwohl zwischen den Beschichtungen keine statistischen Signifikanzen ermittelt wurden, zeigt sich doch deutlich eine positive Tendenz. Beide Beschichtungen führen zu einer reduzierten Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten und des Komplementsystems. Während beide Indikatoren für die Thrombozytenaktivierung bei Einsatz des unbeschichteten Stents deutlich erhöht werden ( $\beta$ -TG:  $442,40 \pm 264,60$  I.E./ml; TAT:  $20,69 \pm 10,93$   $\mu$ g/l), führen die beschichteten Stents zu einer reduzierten Ausschüttung selbiger. Vergleicht man die Ergebnisse des Leerschlauches ( $\beta$ -TG:  $189,30 \pm 44,27$  I.E./ml; TAT:  $8,76 \pm 1,25$   $\mu$ g/l) mit jenen des Schlauches mit den beschichteten Stents ( $\beta$ -TG:  $183,50 \pm 739,59$  I.E./ml bzw.  $180,70 \pm 64,24$  I.E./ml; TAT:  $8,58 \pm 1,22$   $\mu$ g/l bzw.  $8,12 \pm 1,04$   $\mu$ g/l) so fällt auf, dass es durch Einsatz der beschichteten Stents zu keiner merklichen Thrombozytenaktivierung kommt. Die gleiche Beobachtung lässt sich für SC5b-9 (Leerschlauch:  $302,40 \pm 81,49$  ng/ml; Beschichtungen:  $295,10 \pm 114,60$  ng/ml bzw.  $288,80 \pm 120,80$  ng/ml) sowie die Leukozytenaktivierung durch Bestimmung der PMN-Elastase (Leerschlauch:  $19,37 \pm 7,95$  ng/ml; Beschichtungen:  $20,23 \pm 7,92$  ng/ml bzw.  $16,75 \pm 8,76$  ng/ml) machen.

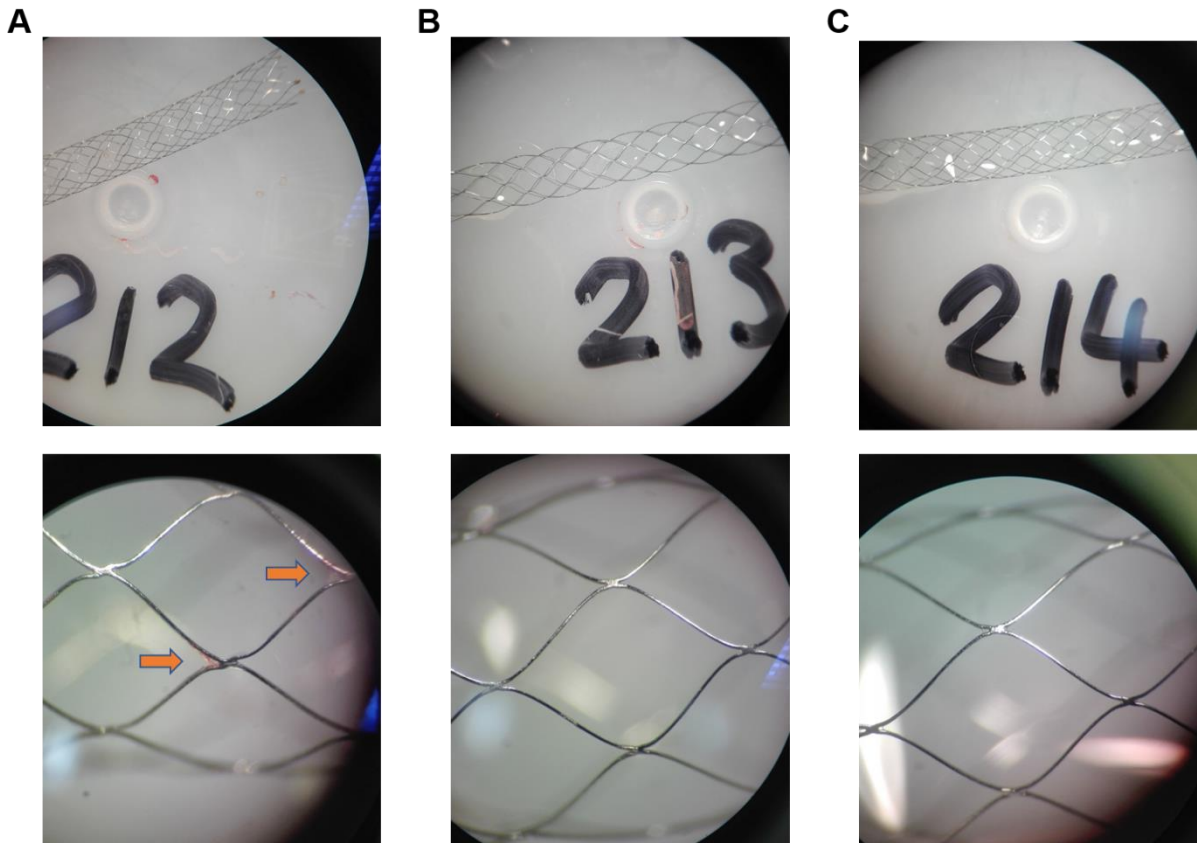


**Abbildung 22: Ergebnisse der ELISAs des Blutes vor (0) und nach (1-4) Rotation im Chandler Loop.**

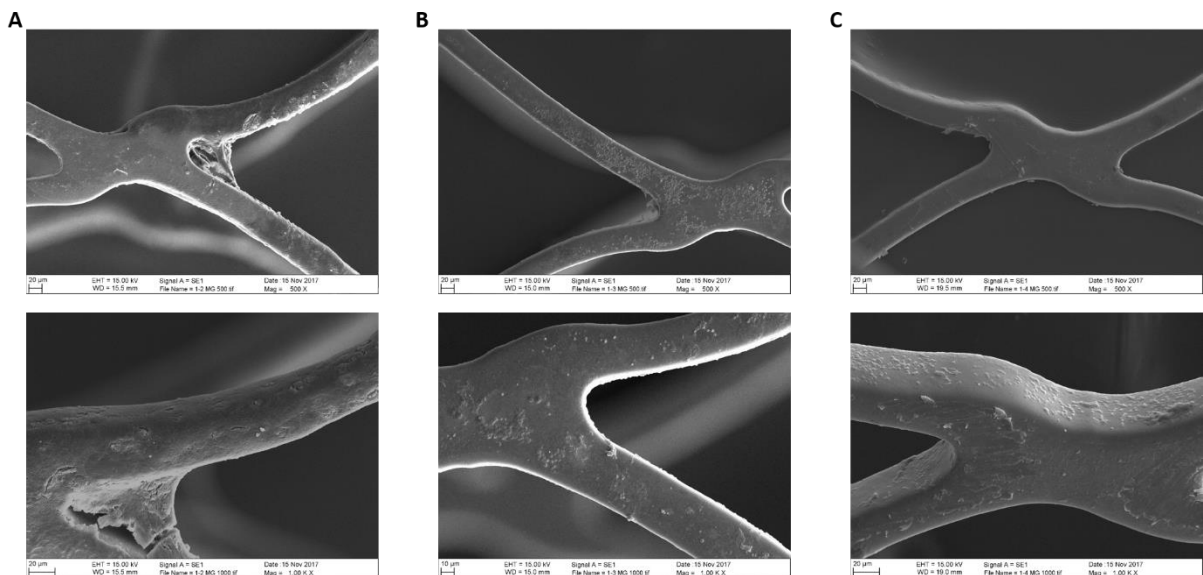
**A – D:** (0) Baseline, (1) Leerschlauch, (2) unbeschichteter Kontrollstent, (3) Dip-Coating (10x gedippt), (4) Dip-Coating (20x gedippt). (Mittelwert  $\pm$  SD, n=5).

\*  $p \leq 0,05$

Zur Visualisierung der gebundenen Blutbestandteile an der Oberfläche der Stents wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt. Exemplarisch sind in Abbildung 23 die Proben von Spender 2 bei 6,5- bzw. 40-facher Vergrößerung unter dem Binokular dargestellt. Abbildung 24 zeigt die rasterelektronenmikroskopischen Bilder von Spender 1 in 500- und 1000-facher Vergrößerung. Beide Methoden bestätigen die Ergebnisse der Blutanalyse. Bereits bei 40-facher Vergrößerung zeigen sich weißliche Ablagerungen in den Eckstreben des unbeschichteten Stents, die bei den beschichteten Proben nicht nachweisbar sind. Dieser erste Eindruck wird unter dem REM bei größerer Vergrößerung auch bei Spender 1 bestätigt. Der mit Lubricin beschichtete Stent erscheint nahezu vollkommen frei von Fibrin- und Zelladhäsion. Abweichend dazu befinden sich auf der gesamten Oberfläche des unbeschichteten Stents krustenartige Fibrinablagerungen und adhärente Thrombozyten. Insbesondere in den Ecken der Stentstreben wird dies deutlich.



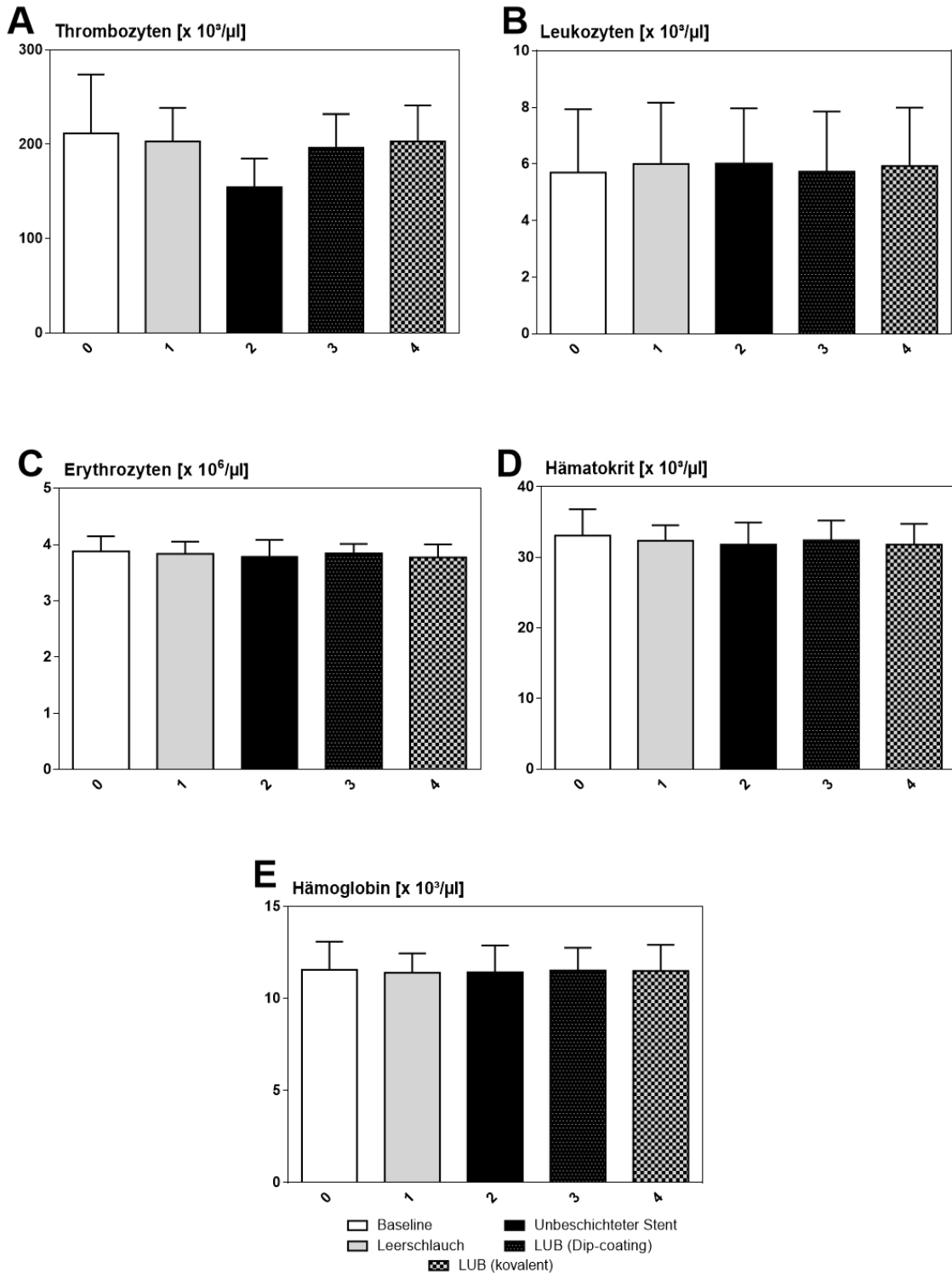
**Abbildung 23: Aufnahmen der Stents unter dem Binokular nach Durchlauf im Chandler Loop in 6,5- bzw. 40-facher Vergrößerung (Spender 2).**  
**(A)** Unbeschichtete Kontrolle; **(B)** Lubricinbeschichtung mittels Dip-Coating (10x gedippt); **(C)** Lubricinbeschichtung mittels Dip-Coating (20x gedippt). Die orangefarbenen Pfeile markieren sichtbare Fibrinablagerungen.



**Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Stents nach Durchlauf im Chandler Loop bei 500-facher und 1000-facher Vergrößerung (Spender 1).**  
**(A)** Unbeschichtete Kontrolle; **(B)** Lubricinbeschichtung mittels Dip-Coating (10x gedippt); **(C)** Lubricinbeschichtung mittels Dip-Coating (20x gedippt)

### 4.2.3. Extrakorporale Zirkulation im Flow-Loop Modell

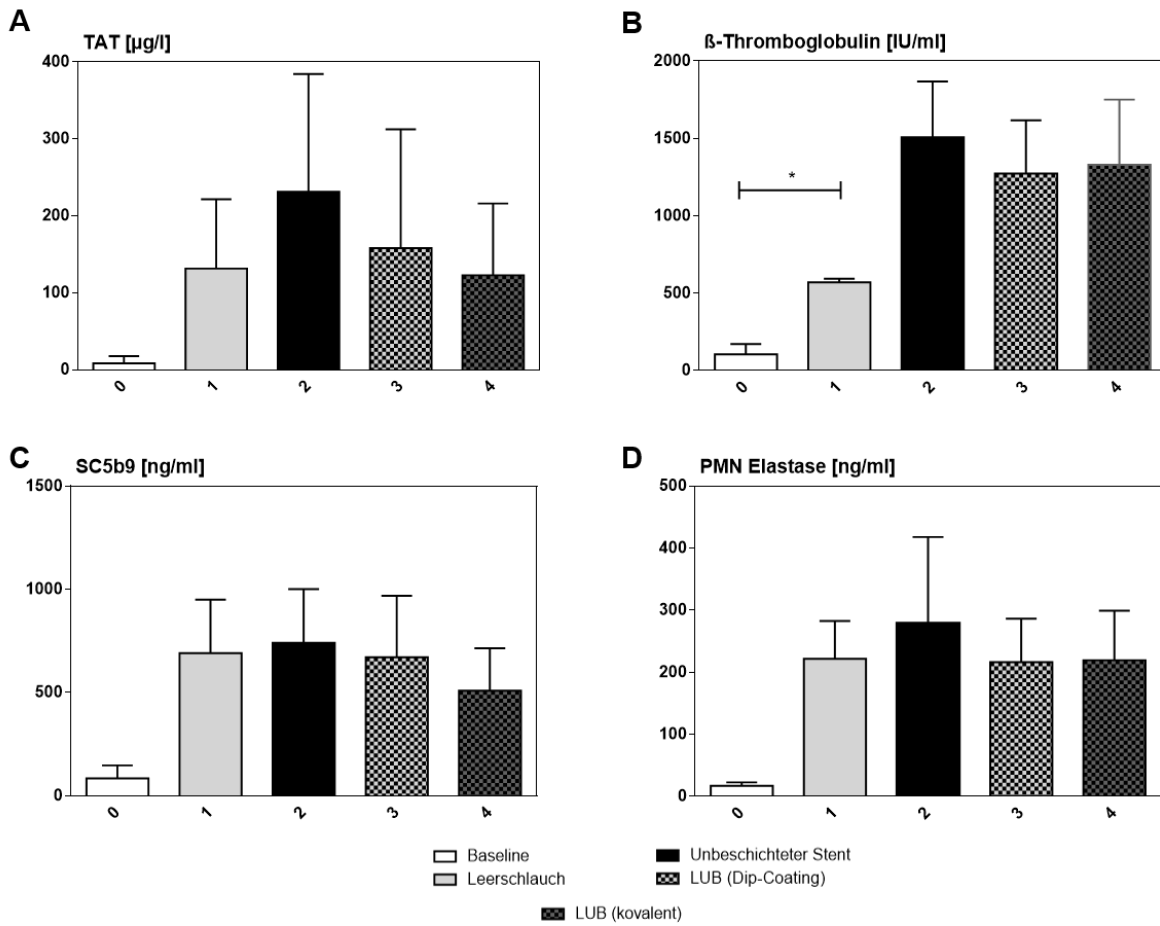
Da sich nach abgeschlossener Rotation der Proben im Chandler Loop bei den Blutanalysen weder signifikante Unterschiede zwischen unbeschichtetem und beschichtetem Stent, noch zwischen Leerschlauch und unbeschichtetem Stent darstellen ließen, sollte die Beschichtung nochmal mit einem stärker aktivierenden System getestet werden. Dazu kamen Rollerpumpen zum Einsatz, die mit 150 ml/min sehr viel höhere Fließgeschwindigkeiten ermöglichen. Aufgrund der daraus resultierenden stärkeren Kräfte, die bei diesem erhöhten Blutfluss auf den Stent wirken, sollten vergleichend zu den adsorptiv beschichteten auch kovalent beschichtete Stents getestet werden. Abbildungen 25 und 26 zeigen die Ergebnisse der Blutanalyse. Im Blutbild (Abbildung 25) lassen sich erneut keine zytotoxischen Effekte durch die Beschichtung erkennen. Die Inkubation mit dem unbeschichteten Kontrollstent führt zu einem deutlichen Thrombozytenabfall von  $203,00 \pm 35,68 \times 10^3 / \mu\text{l}$  im Leerschlauch auf  $154,5 \pm 30,41 \times 10^3 / \mu\text{l}$ . Durch die Beschichtung mit Lubricin nähert sich die Thrombozytenzahl mit  $196,3 \pm 35,70 \times 10^3 / \mu\text{l}$  für die gedippten und  $203 \pm 38,30 \times 10^3 / \mu\text{l}$  für die kovalent beschichteten Stents der des Leerschlauches an.



**Abbildung 25: Blutbildanalyse nach 60-minütiger Inkubation im Flow Loop. A-E: (0) Baseline, (1) Leerschlauch, (2) unbeschichteter Kontrollstent, (3) Dip-Coating (4) Kovalente Beschichtung (Mittelwert ± SD, n=5).**

Auch die ELISA-Analysen in Abbildung 26 lassen positive Effekte der Beschichtung erkennen, wenngleich statistisch signifikante Differenzen zwischen dem Kontrollstent und den beschichteten Proben erneut fehlen. Jedoch kommt es zur reduzierten Ausschüttung aller detektierten Parameter.

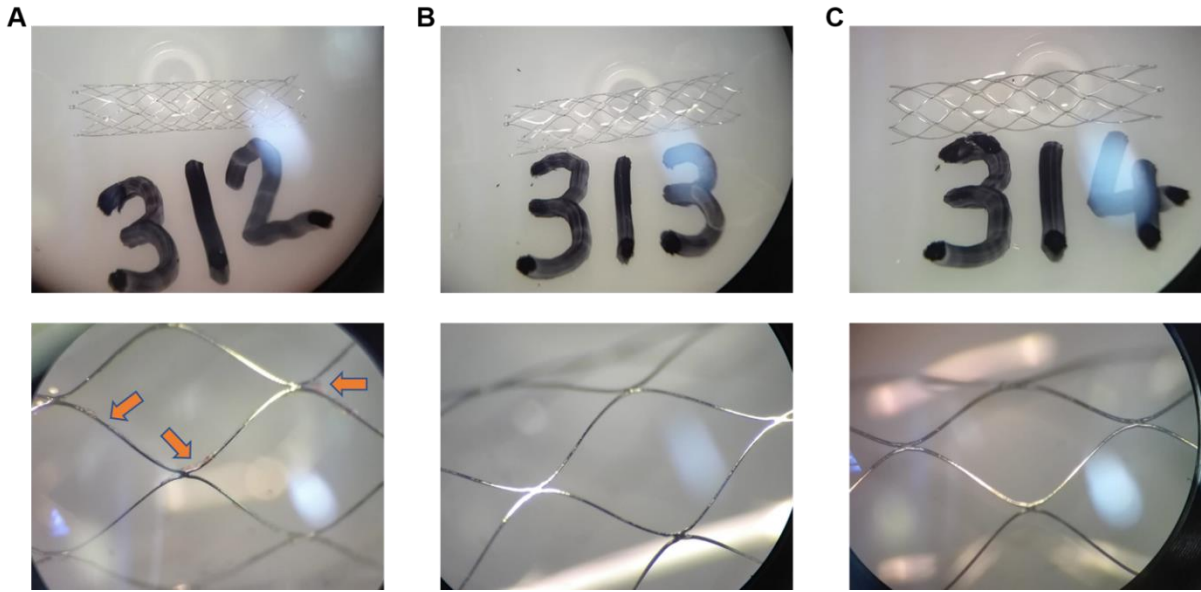
Lediglich bei der Bestimmung von  $\beta$ -TG lässt die Rotation selbst einen signifikanten Anstieg der Ausschüttung von  $105,63 \pm 66,73$  auf  $570,36 \pm 23,39$  I.E./ml ( $p \leq 0,05$ ) erkennen. Durch Zugabe des unbeschichteten Stents steigt der Wert nochmals deutlich an und erreicht  $1508,00 \pm 360,14$  I.E./ml. Das Dip-Coating bzw. die kovalente Beschichtung führen zu einer Reduktion der Ausschüttung auf  $1273,18 \pm 344,73$  bzw.  $1329,77 \pm 421,69$  I.E./ml. Derselbe Effekt kann für die detektierte Menge an TAT ausgemacht werden. Hier führt der Einsatz des unbeschichteten Stents verglichen zum Leerschlauch zu einem Anstieg von  $131,52 \pm 90,07$   $\mu\text{g/l}$  auf  $231,29 \pm 153,14$   $\mu\text{g/l}$ , während die Verwendung beschichteter Stents zu einer reduzierten Ausschüttung von  $157,95 \pm 154,60$   $\mu\text{g/l}$  bzw.  $122,87 \pm 93,16$   $\mu\text{g/l}$  führt. So kommt es durch die Beschichtung zu einer Annäherung an die Werte des Leerschlauches. Auch im Bereich der Leukozytenaktivierung lassen sich Vorteile der Beschichtungen gegenüber dem Kontrollstent ausmachen. So ist die Menge der detektierten Elastase im Leerschlauch sowie in den Schläuchen, die den gedippten und kovalent beschichteten Stent enthalten, mit  $221,77 \pm 60,81$  ng/ml,  $216,22 \pm 70,16$  ng/ml und  $219,51 \pm 79,66$  ng/ml vergleichbar, während die Verwendung des unbeschichteten Stents zu einer Erhöhung auf  $279,06 \pm 138,89$  ng/ml führt. Im Bereich des Komplementsystems lassen sich keine klaren Unterschiede ausmachen.



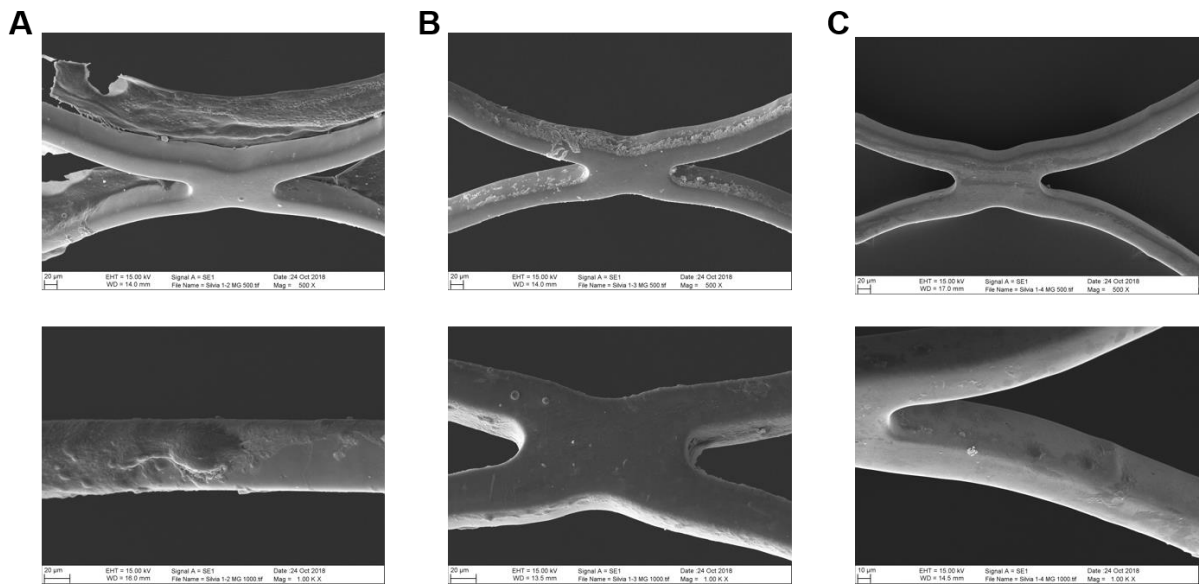
**Abbildung 26: Ergebnisse der ELISA-Analysen nach Inkubation im Flow Loop. A-E: (0) Baseline, (1) Leerschlauch, (2) unbeschichteter Kontrollstent, (3) Dip-Coating (4) Kovalente Beschichtung (Mittelwert  $\pm$  SD, n=5). (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). \*  $p \leq 0,05$**

Darüber hinaus wurden erneut mikroskopische Bilder angefertigt, um die gebundenen Blutbestandteile darzustellen. Während der unbeschichtete Stent bereits bei 40-facher Vergrößerung Fibrinablagerungen erkennen lässt, stellen sich die beiden beschichteten Stents frei von diesen dar (Abbildung 27). Dieser Eindruck bestätigt sich bei größerer Vergrößerung unter dem REM (Abbildung 28). Während der Kontrollstent krustenartiges Fibrin mit darin enthaltenen Zellen aufweist, kommt es durch die Beschichtung zu einer deutlichen (adsorptive Beschichtung) bzw. nahezu vollständigen Reduktion (kovalente Beschichtung).





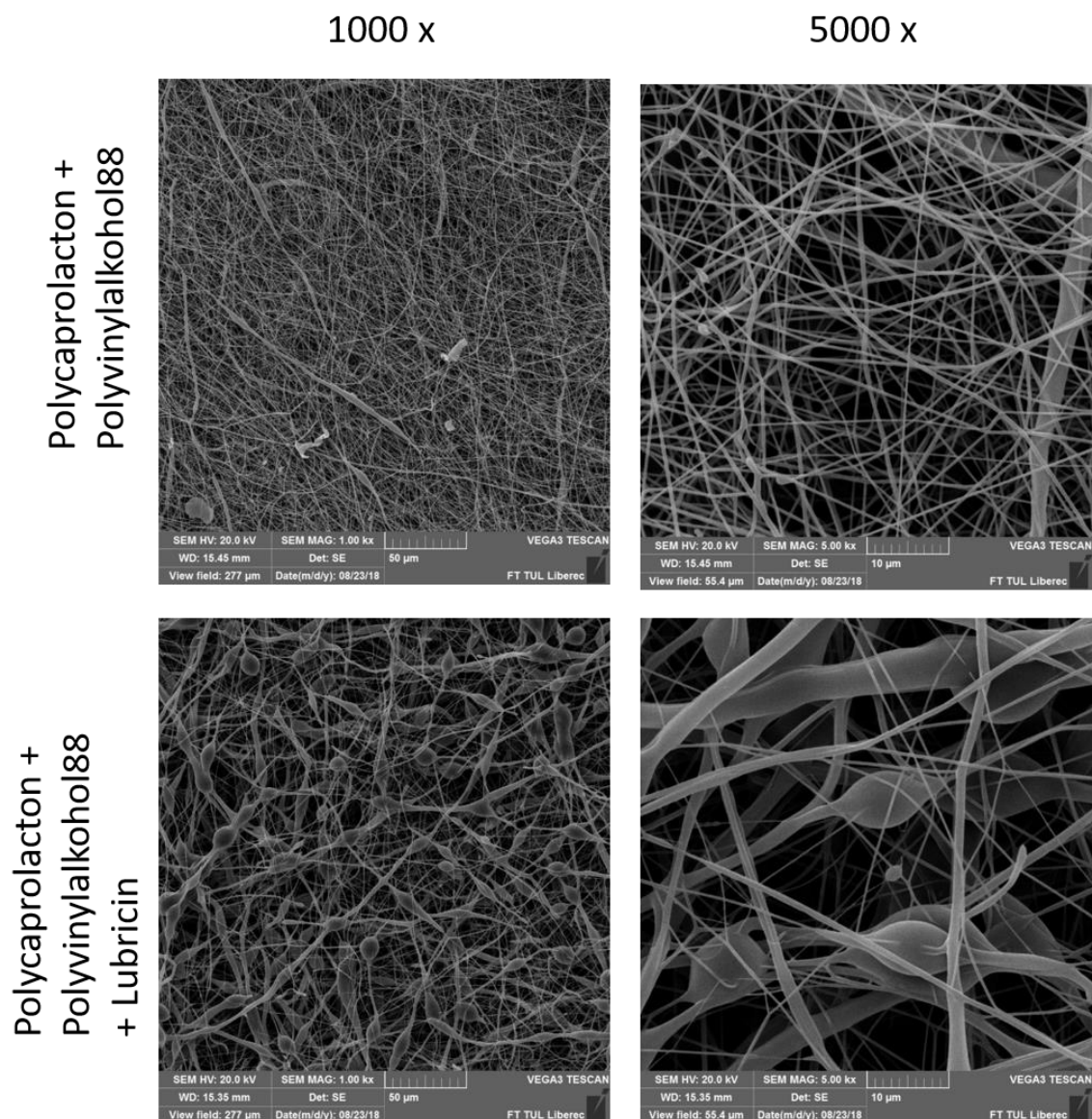
**Abbildung 27: Stents nach Durchfluss im Flow Loop bei 6,5- und 40-facher Vergrößerung (Spender 3).**  
**(A)** Unbeschichtete Kontrolle; **(B)** Lubricin (Dip-Coating) **(C)** Lubricin (kovalent). Die orangefarbenen Pfeile markieren sichtbare Fibrinablagerungen.



**Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stents nach Inkubation im Flow Loop bei 500-facher und 1000-facher Vergrößerung (Spender 1).**  
**(A)** Unbeschichtete Kontrolle; **(B)** Lubricin (Dip-Coating) **(C)** Lubricin (kovalent).

#### 4.2.4. Inkorporation des Lubricins mittels Elektrosponnen

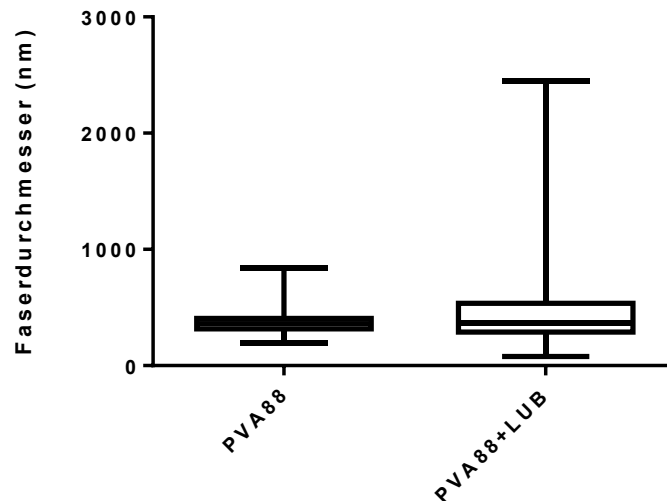
Neben den adsorptiv und kovalent beschichteten Materialien sollte auch die Möglichkeit einer Inkorporation des Lubricins mittels Elektrosponnen getestet werden. Dafür wurden Gefäßprothesen aus PCL und PVA gesponnen und das Protein als Bestandteil der PVA-Fasern in die Proben eingearbeitet. Die angefertigten rasterelektronenmikroskopischen Bilder der Proben zeigen eine veränderte Morphologie der Fasern bei enthaltenem Protein (Abbildung 29). Während die Nanofasern der Negativkontrolle einen einheitlichen Durchmesser aufweisen, erscheinen die Fasern der Probe mit Lubricin stellenweise blasenartig verdickt.



**Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der elektrosponnenen Proben bei 1000- und 5000-facher Vergrößerung.**

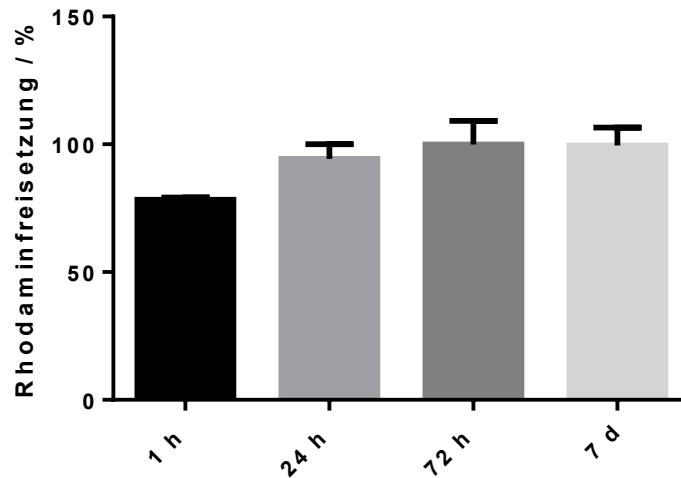
Die Nanofasern der Kontrolle (Polycaprolacton + Polyvinylalkohol) weisen einen gleichmäßigen Durchmesser auf. Dagegen erscheinen die Fasern mit inkorporiertem Lubricin heterogen und stellenweise blasenartig verdickt.

Um diesen Eindruck zu bestätigen, wurde der Durchmesser der Fasern ermittelt. Die Verteilung der Faserdurchmesser beider Proben ist in Abbildung 30 dargestellt. Während die Probe aus reinem PVA88 + PCL eine mittlere Faserstärke  $\pm$  Standardabweichung von  $374 \pm 91$  nm aufweist, ist die Streuung bei den Proben mit inkorporiertem LUB mit  $542 \pm 431$  nm deutlich größer.



**Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Faserdurchmesser von elektrogewebenen Proben mit PVA88 bzw. PVA88 + Lubricin (LUB). (n=200).**

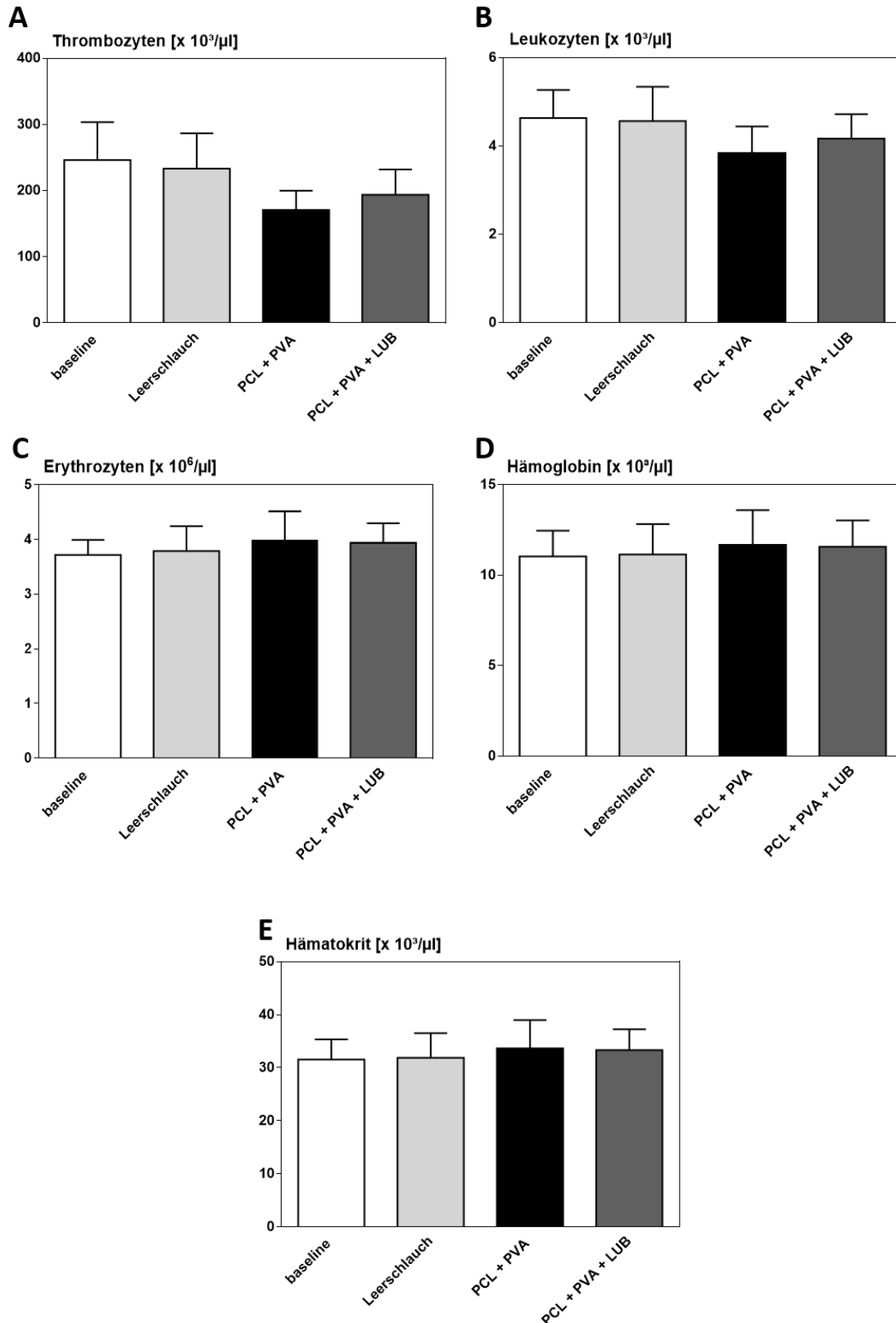
Um die Freisetzungskinetik der gewebenen Proben zu testen, wurde in einem Vorversuch der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B als Bestandteil des PVAs gewoben. Hierbei wurde PVA98 verwendet, da es aufgrund seiner langsameren Freisetzung auch in den folgenden Versuchen mit LUB verwendet werden sollte. Anschließend wurden die gewebenen Proben in destilliertem Wasser gelagert und die Rhodaminfreisetzung über photometrische Messung des Überstandes bestimmt (Abbildung 31). Es zeigt sich, dass es innerhalb der ersten Stunde zu einer starken initialen Freisetzung kommt und bereits  $78,31 \pm 0,89$  % des Farbstoffes freigesetzt werden. Nach 72 h ist die maximale Freisetzung erreicht. Eine Lagerung für weitere 4 Tage bewirkt keinen Anstieg der freigesetzten Rhodaminmenge.



**Abbildung 31: Darstellung der Rhodamin B Freisetzung nach Inkorporation des Farbstoffes mittels Elektrosponnen.**

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die maximale Freisetzung nach 72 h auf 100 % gesetzt (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3).

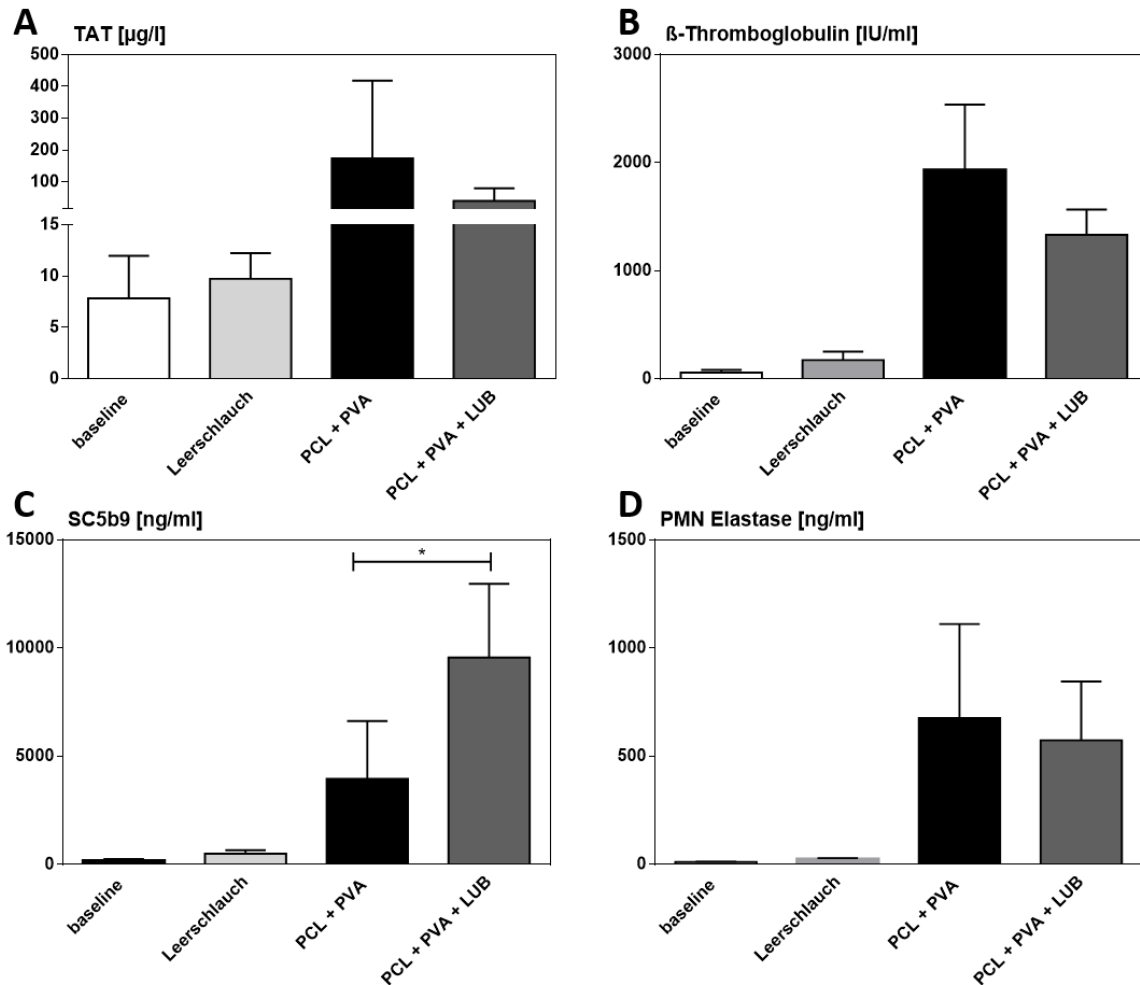
Darüber hinaus wurden die Gefäßprothesen auf ihre Hämokompatibilität getestet. Abbildung 32 zeigt das Blutbild nach 60-minütiger Inkubation im modifizierten Chandler Loop. Es zeigt sich, dass die Anzahl der Thrombozyten (A) durch den Stent von  $233.300 \pm 53.200 / \mu\text{l}$  im Leerschlauch auf  $170.700 \pm 29.370 / \mu\text{l}$  sinkt. Durch die Beschichtung kommt es zu einem Anstieg auf  $193.700 \pm 38.530 / \mu\text{l}$ . Auch bei den Leukozyten kommt es zu einem leichten Anstieg der Zellzahl. Darüber hinaus lassen sich erneut keine Auswirkungen auf das Blutbild erkennen. Auch die ELISA-Analysen des Blutes (Abbildung 33) zeigen positive Effekte der Beschichtung auf Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung sowie das Gerinnungssystem. Jedoch kommt es bei Inkorporation des Proteins zu einer statistisch signifikant stärkeren Aktivierung des Komplementsystems (\*  $p \leq 0,05$ ). Hierbei steigt die Freisetzung von SC5b-9 von  $3944 \pm 2675 \text{ ng/ml}$  beim Kontrollvlies auf  $9556 \pm 3411 \text{ ng/ml}$  bei Verwendung des Lubricins.



**Abbildung 32: Blutbild nach Zirkulation von elektrogewebenen Gefäßprothesen im modifizierten Chandler Loop.**

**A-E:** (0) Baseline; (1) Leerschlauch; (2) Kontrollvlies (Polycaprolacton (PCL) und Polyvinylalkohol (PVA)) (3) Vlies mit inkorporiertem LUB. (Mittelwert  $\pm$  SD, n=5).

\*  $p \leq 0,05$



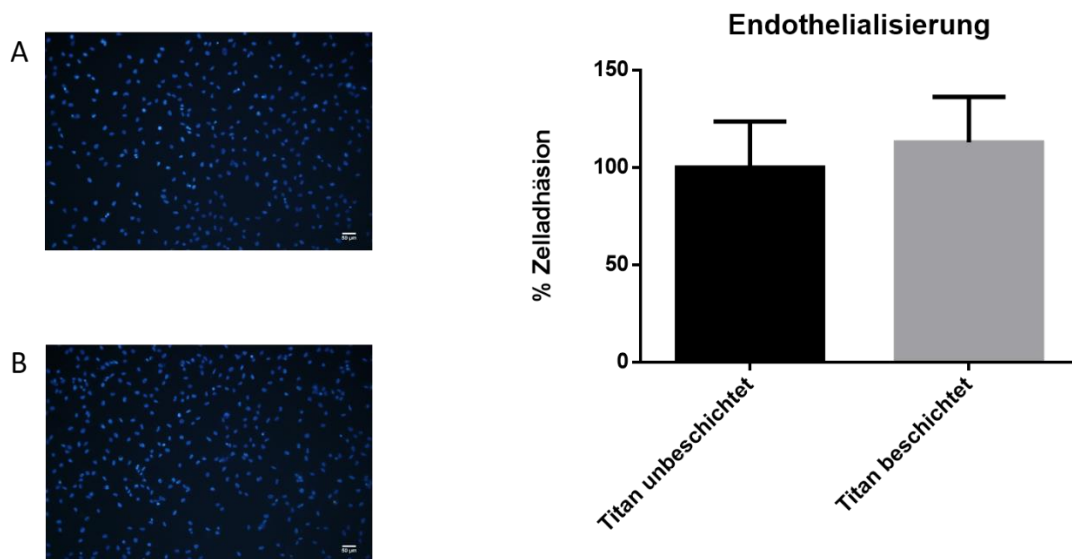
**Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der Blutanalyse vor (0) und nach (2-3) 60-minütiger Zirkulation im modifizierten Chandler Loop.**

**A-D:** (0) Baseline; (1) Leerschlauch; (2) Kontrollvlies (Polycaprolacton (PCL) + Polyvinylalkohol (PVA)) (3) Vlies mit inkorporiertem LUB. (Mittelwert  $\pm$  SD, n=5).

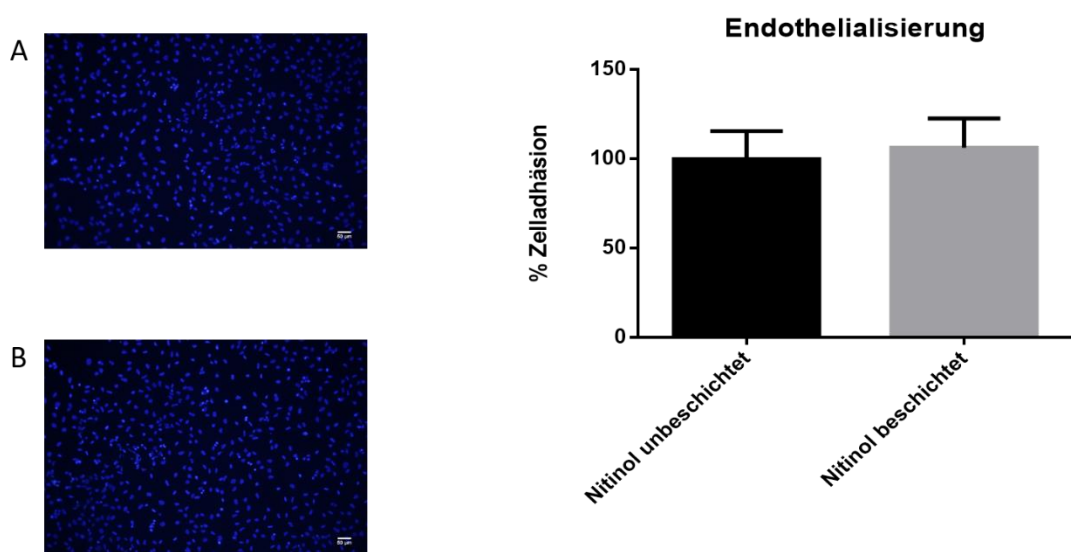
### 4.3. Endothelialisierung von lubricinbeschichteten Oberflächen

#### 4.3.1. Adhäsion von HEK-Zellen

Die Vorversuche zur Endothelialisierbarkeit wurden aufgrund der einfacheren Kultivierbarkeit mit HEK-Zellen durchgeführt. Abbildungen 34 und 35 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung und die statistische Analyse der gezählten Zellen auf Titan- bzw. Nitinol. Die Zellzählung zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Zelladhäsion der mit LUB beschichteten Plättchen im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 34: Adhäsion von HEK-Zellen auf mit Lubricin beschichteten Titanplättchen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 h Inkubation. Unbeschichtetes (A) und lubricinbeschichtetes Titanplättchen (B). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3).

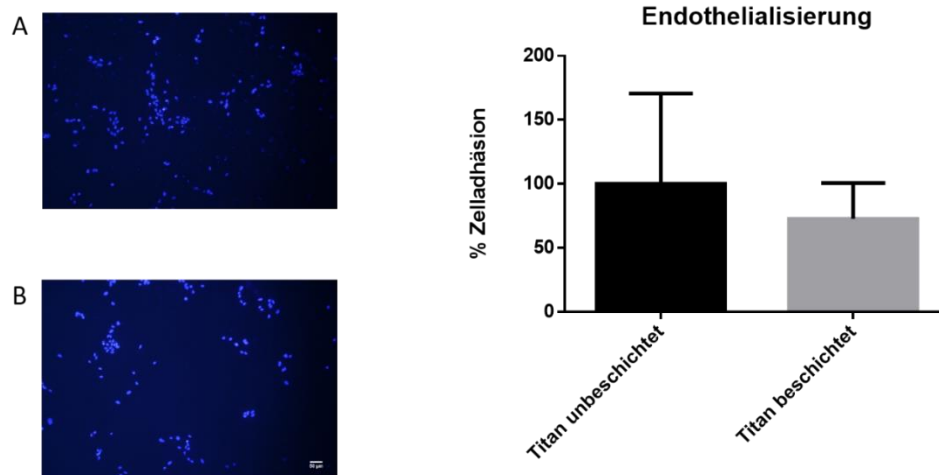


**Abbildung 35: Adhäsion von HEK-Zellen auf mit Lubricin beschichteten Nitinolplättchen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 h Inkubation. Unbeschichtetes (A) und lubricinbeschichtetes Nitinolplättchen (B). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3).

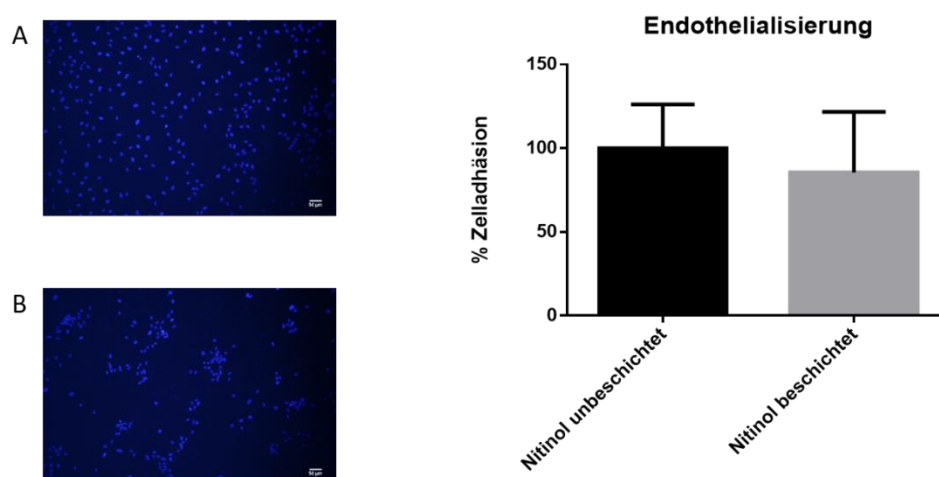
#### 4.3.2. Adhäsion von HUVECs

Nach den vielversprechenden Ergebnissen, die trotz der antiadhäsiven Eigenschaften gegenüber Blutzellen eine Adhäsion der HEK-Zellen, die vergleichbar mit der unbeschichteten Kontrolle ist, zeigten, wurden im weiteren Verlauf die Versuche mit den sensibleren HUVECs wiederholt. In den Abbildung 36 und 37 ist die Zelladhäsion an lubricinbeschichteten Plättchen

und der Kontrolle dargestellt. Auch mit dieser Zelllinie sind bei beiden Materialien keine signifikanten Unterschiede in der Zelladhäsion sichtbar. Auffällig ist allerdings, dass die adhärenenten Zellen auf dem mit LUB beschichteten Nitinol keine homogene Verteilung entlang der Oberfläche aufweisen, sondern in Gruppen angeordnet erscheinen.



**Abbildung 36: Adhäsion von HUVECs auf mit Lubricin beschichteten Titanoberflächen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 h Inkubation von HUVECs. Unbeschichtetes (A) und lubricinbeschichtetes Titanplättchen (B). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3).



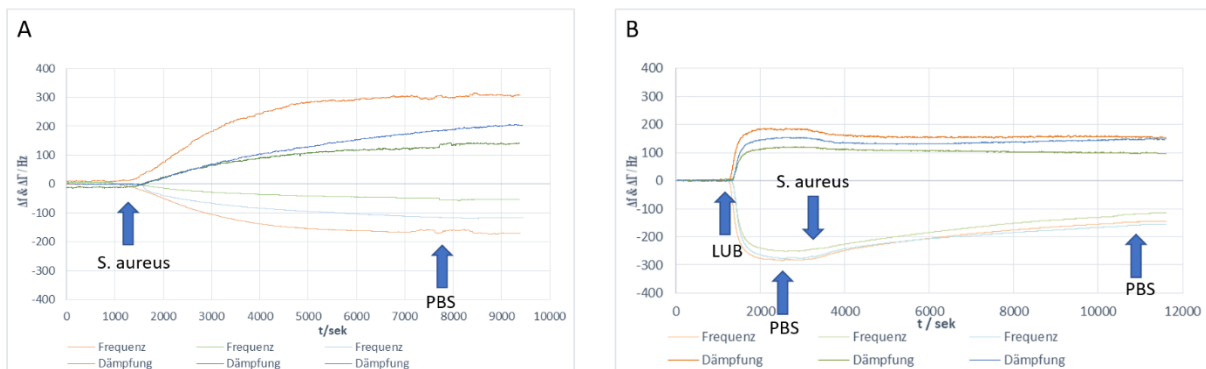
**Abbildung 37: Adhäsion von HUVECs auf mit Lubricin beschichteten Nitinoloberflächen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 24 h Inkubation von HUVECs. Unbeschichtetes (A) und lubricinbeschichtetes Nitinolplättchen (B). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (n=3).



## 4.4. Bakterienversuche

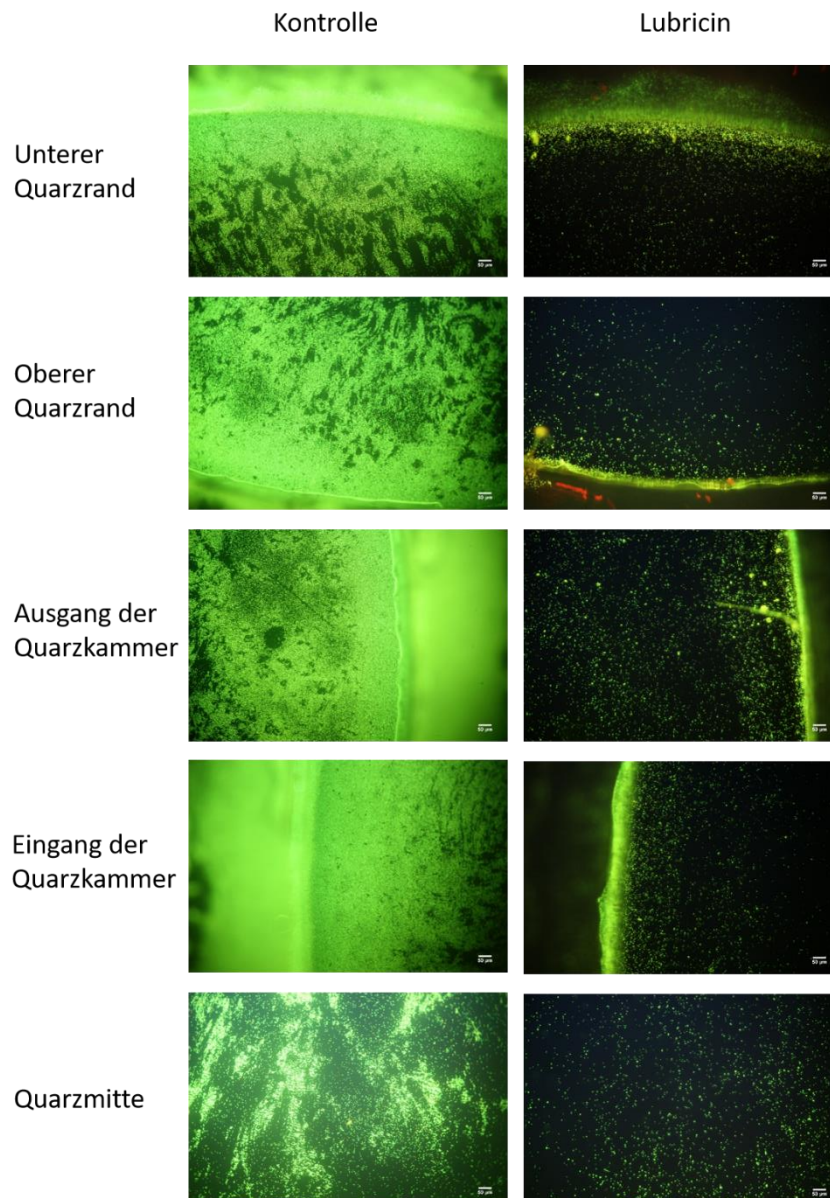
### 4.4.1. QCM-Messungen mit *Staphylococcus aureus*

Um die antiadhäsiven Eigenschaften der Lubricinbeschichtung hinsichtlich der Adhäsion von Bakterien zu untersuchen, wurden erneut QCM-Messungen durchgeführt und nach 2-stündiger Perfusion die Bakterien mittels Lebend-/Tot-Färbung untersucht. Abbildung 38 zeigt den Signalverlauf unter Perfusion mit *S. aureus* während der Messung mit und ohne Lubricin. In der Kontrollgruppe kommt es nach Zugabe der Bakterien zum stetigen Frequenzabfall bei gleichzeitigem Dämpfungsanstieg. Hierbei ist auffällig, dass die Signaldifferenz bei jeder Messung stark variiert. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen bei vorheriger Perfusion mit Lubricin, so fällt eine deutlich geringere Varianz auf. Nach Zugabe des Proteins kommt es zum gewohnten, initial starken Frequenzabfall. Nach Zugabe der Bakterien steigt die Frequenz kontinuierlich an. Die Zugabe von PBS führt anschließend zur Sättigung beider Parameter.



**Abbildung 38: QCM-Messungen mit *S. aureus*.** Der Graph zeigt den Signalverlauf ohne (A) und mit (B) vorangegangener Perfusion mit Lubricin (LUB). Die blauen Pfeile markieren den Eintritt der jeweiligen Lösung in die Quarzkammer. Fließgeschwindigkeit LUB und *S. aureus*: 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ , PBS: 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Die beiden zusammengehörigen Signalverläufe (Frequenz & Dämpfung) der einzelnen Messungen sind in der Legende paarweise übereinander dargestellt (n=3).

Bei Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop fällt ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der adhärenenten Bakterien auf (Abbildung 39). Während die Oberfläche des unbehandelten Quarzes, insbesondere an den Randbereichen, flächige Bakterienansammlungen zeigt, ist die Dichte der adhärenenten Bakterien auf der mit LUB beschichteten Oberfläche deutlich geringer. Die Vitalität der gebundenen Bakterien scheint durch das Protein jedoch nicht beeinträchtigt.

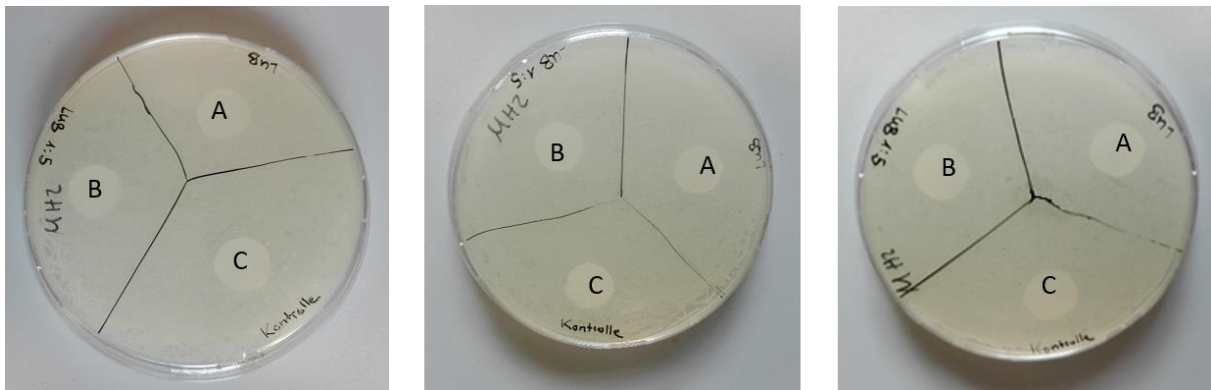


**Abbildung 39: Bakterienadhäsion am Titanquarz nach QCM-Messung.** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der adhärenenten Bakterien an der Quarzoberfläche mittels Lebend-/Tot-Färbung. Die Aufnahmen wurden an fünf verschiedenen Stellen desselben Quarzes angefertigt. Die Bezeichnungen entsprechen der Lokalisation in der Quarzkammer.

#### 4.4.2. Agardiffusionstest

Zur Detektion einer möglichen bakteriziden Wirkung des Proteins auf Bakterien wurde ein Agardiffusionstest herangezogen. Im vorliegenden Versuch wurden verschiedene Proteinkonzentrationen getestet. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse der beiden Proben mit den größten Proteinmengen (2,7 µg bzw. 13,5 µg pro Plättchen). Bei keiner der eingesetzten Proteinmengen konnte hierbei eine bakterizide Wirkung nachgewiesen werden, eine Hemmhofbildung

blieb aus. Die Oberfläche der beschichteten Filterpapiere sowie der unbeschichteten Kontrollen wies kein Bakterienwachstum auf.



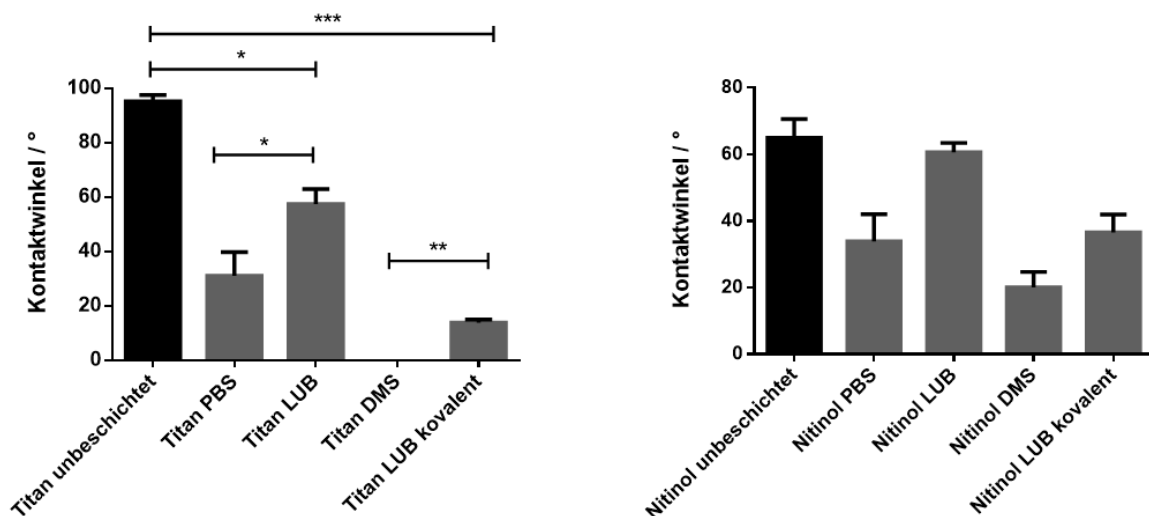
**Abbildung 40: Ergebnisse des Agardiffusionstests mit Lubricin nach 24 h Inkubation.** *S. aureus* auf Müller-Hinton-Agar. (A) 13,5 µg LUB; (B) 2,7 µg LUB; (C) Kontrolle (n=3).

## 4.5. Kontaktwinkelmessungen

### 4.5.1. Funktionalität des Proteins

Zunächst sollten Kontaktwinkelmessungen zeigen, welchen Einfluss die verschiedenen Beschichtungsarten auf die Benetzbarkeit unterschiedlicher Oberflächen haben. Dazu wurden Messungen an Nitinol- sowie Titanplättchen vor und nach der Beschichtung durchgeführt. Abbildung 41 zeigt die vergleichende Darstellung der Kontaktwinkel beider Materialien und der verschiedenen Beschichtungsarten. Bei Verwendung von Titanoberflächen führt sowohl die adsorptive als auch die kovalente Beschichtung mit LUB zu einer signifikanten Abnahme des Kontaktwinkels im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle ( $p \leq 0,05$  und  $p \leq 0,001$ ). So weisen sowohl die adsorptiv beschichteten ( $57,43 \pm 5,64^\circ$ ), als auch die kovalent beschichteten Titanplättchen ( $13,80 \pm 1,2^\circ$ ) eine hydrophile Oberfläche auf. Die unbeschichtete Kontrolle liegt mit einem Mittelwert von  $95,30 \pm 2,35^\circ$  im hydrophoben Bereich. Des Weiteren wurden Kontrollmessungen mit PBS durchgeführt, da dieses als Lösungsmittel für das Protein fungierte. Bei Beschichtung von Titan ist auch hier eine statistisch signifikante Differenz zwischen dieser Kontrolle und den mit LUB beschichteten Titanoberflächen erkennbar ( $p \leq 0,05$ ). Durch die Behandlung mit PBS nimmt der Kontaktwinkel im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle signifikant ab. Die Lubricinbeschichtung führt zu einer Verminderung dieses Effektes, jedoch erscheint der Unterschied zur unbeschichteten Oberfläche, wie oben beschrieben, weiterhin signifikant. Mit der alleinigen Anbindung von DMS, welches bei der kovalenten Beschichtung mit LUB als Crosslinker fungierte, wurde eine weitere Kontrolle aufgeführt. Vergleicht man die kovalent beschichteten Oberflächen mit dieser Kontrolle, so zeigt sich ebenfalls ein signifikan-

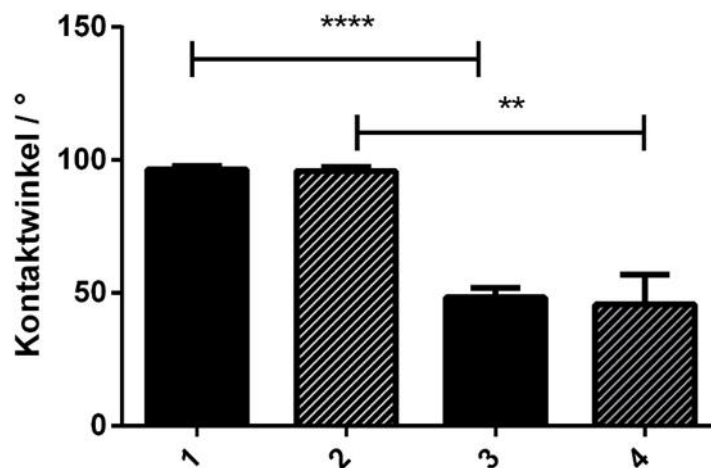
ter Anstieg der Kontaktwinkel ( $p \leq 0,01$ ). Bei Beschichtung von Nitinol fehlen statistische Signifikanzen. Vergleicht man jedoch die einzelnen Gruppen untereinander, so lassen sich die gleichen Tendenzen wie bei Verwendung von Titan erkennen. Die Kontrolle mit DMS ohne gebundenes LUB zeigt darüber hinaus, dass die Funktionalisierung selbst bei Nitinol schon zu keiner solch starken Zunahme der Hydrophilie führt wie unter Verwendung von Titan. Die Differenz zwischen dieser Kontrolle und der kovalenten Beschichtung ist jedoch bei beiden Materialien vergleichbar.



**Abbildung 41: Kontaktwinkel der verschiedenen Beschichtungen für Titan (A) bzw. Nitinol (B).** Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=4$ , \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.5.2. Sterilisierbarkeit der Beschichtung

Zur Bestimmung der Sterilisierbarkeit wurden die Kontaktwinkel der frisch beschichteten Oberflächen sowie der Kontrollgruppen bestimmt. Nach Behandlung mit UV-Licht wurden die Messungen wiederholt. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der Messungen. Die Beschichtung der Titanplättchen mit Lubricin führt zu einem signifikanten Abfall des Kontaktwinkels im Vergleich zu den unbeschichteten Plättchen ( $96,43 \pm 1,37$  auf  $48,33 \pm 3,60$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Die Behandlung mit UV-Licht hat erwartungsgemäß keinen Effekt auf den Kontaktwinkel der Kontrollen. Auch die Kontaktwinkel der beschichteten Plättchen werden durch die UV-Behandlung nicht beeinflusst.

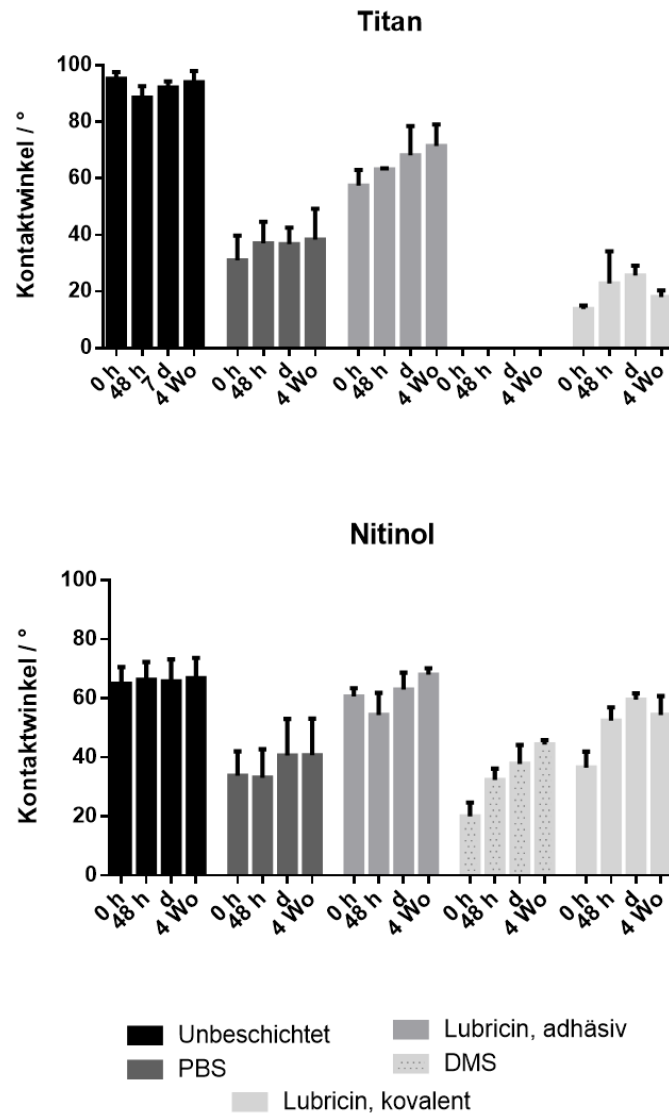


**Abbildung 42: Kontaktwinkel von lubricinbeschichteten Titanplättchen vor und nach Behandlung mit UV-Licht.**

Titan unbeschichtet vor UV-Behandlung (1); Titan unbeschichtet nach UV-Behandlung (2); Titan mit LUB vor UV-Behandlung (3); Titan mit LUB nach UV-Behandlung (4). (Mittelwert  $\pm$  SD, n=4. \*\*\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*  $p \leq 0,0001$ ).

#### 4.5.3. Lagerstabilität der beschichteten Proben

Zur Bestimmung der Stabilität der Beschichtungen kamen erneut Kontaktwinkelmessungen zum Einsatz. Hierbei wurden die Kontaktwinkel von Nitinol- und Titanplättchen unmittelbar nach deren Beschichtung sowie nach einer Lagerung von 48 h, 72 h sowie 4 Wochen bestimmt. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Abbildung 43 für beide Materialien vergleichend dargestellt. Die Lagerung über den gesamten Zeitraum führt zu keiner signifikanten Änderung der Kontaktwinkel.



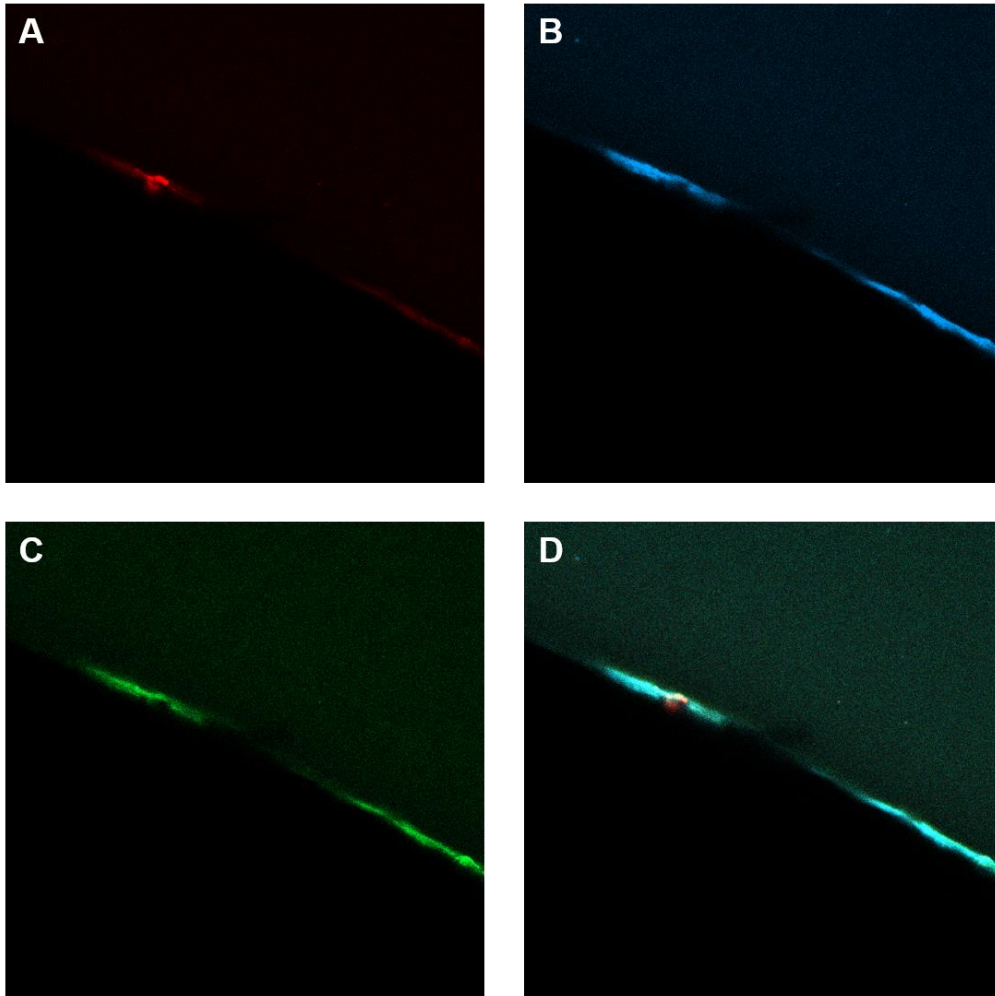
**Abbildung 43: Kontaktwinkelmessungen zur Bestimmung der Lagerstabilität von adsorptiv und kovalent mit Lubricin beschichteten Titan (A)- bzw. Nitinolplättchen (B) nach Lagerung bei 4°C.** Die Messungen von Titan mit DMS ergaben nicht detektierbare Kontaktwinkel von ca. 0°. (Mittelwert ± SD, n=3).

#### 4.6. Nachweis des gebundenen Proteins

Ziel war es, das oberflächengebundene Lubricin auf den verschiedenen Materialien qualitativ und optimalerweise quantitativ nachzuweisen. Allerdings führten die meisten der eingesetzten Methoden nicht zum gewünschten Erfolg. Folgendes Kapitel soll einen Überblick über die angewendeten Methoden und ihre Limitierungen geben.

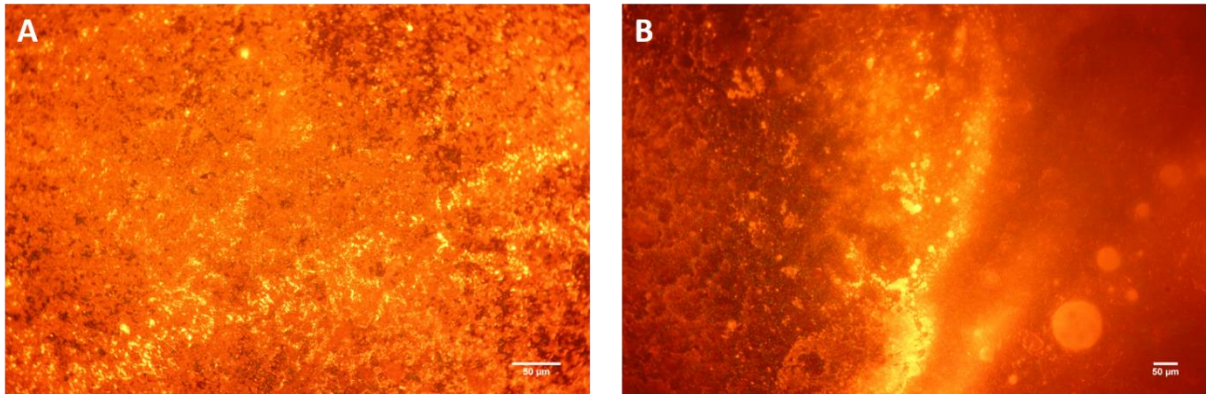
#### 4.6.1. Antikörpernachweis

Nachdem unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop eine deutliche Autofluoreszenz der Nitinolplättchen gezeigt werden konnte (Abbildung 44), konnte eine Antikörpermarkierung nur an Titanoberflächen erprobt werden.



**Abbildung 44: Darstellung der Autofluoreszenz von Nitinolplättchen unter dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei verschiedenen Wellenlängen.**

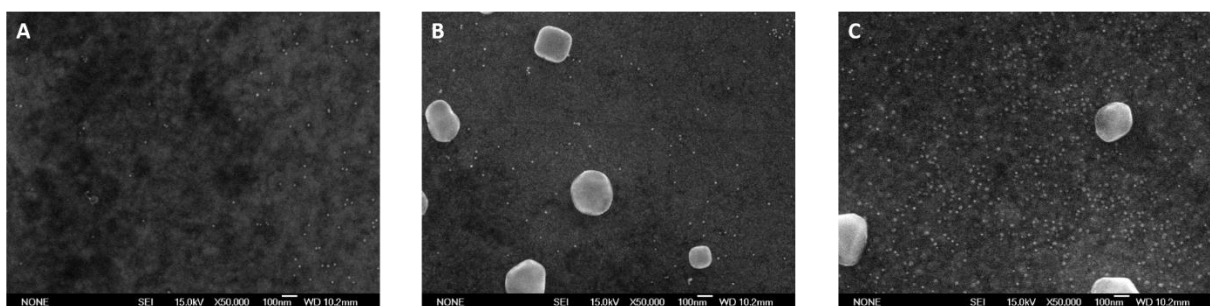
Der Nachweis des Proteins sollte dabei über einen mit dem Cyaninfarbstoff Cy3 gekoppelten Antikörper erfolgen. Abbildung 45 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Bilder nach Inkubation mit dem Antikörper. Durch unspezifische Bindung des Antikörpers lässt sich keine Aussage über das Vorhandensein des Proteins machen. Die Negativkontrolle ist nicht als solche verwertbar.



**Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines unbeschichteten Titanplättchens (A) und eines mit Lubricin beschichteten Plättchens (B).** Auch die unbeschichtete Kontrolle weist eine gelbe/orangefarbene Fluoreszenz durch unspezifische Bindung des mit Cy3-gekoppelten Antikörpers auf.

#### 4.6.2. Energiedispersive Röntgenspektroskopie mit kolloidalem Gold

Mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie sollten die vorher mit PNA-kolloidalem Gold beschichteten Nitinolplättchen untersucht werden. Abbildung 46 zeigt die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrollen (unbeschichtet sowie mit PBS behandelt) und der mit LUB beschichteten Oberflächen. Während die großen, mehrere 100 nm umfassenden, kristallartigen Strukturen als Salzurückstände einzuordnen sind, handelt es sich bei den wenigen nm großen runden Strukturen aller Wahrscheinlichkeit nach um das kolloidale Gold. Um dies zu bestätigen, wurde die Probe mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie untersucht. Allerdings konnte mit dieser Methode, vermutlich aufgrund der geringen Dichte und Dimension der Strukturen, kein Gold nachgewiesen werden. Des Weiteren führt die unspezifische Bindung zu keiner klaren Negativkontrolle, weshalb keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein des Proteins gemacht werden kann.

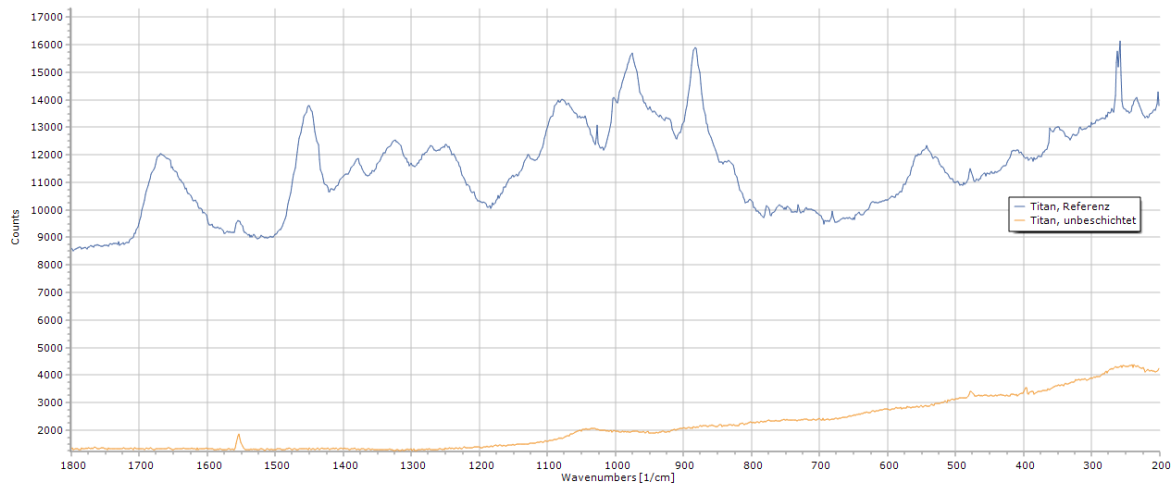


**Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Bilder von Nitinolplättchen nach Inkubation mit PNA-kolloidalem Gold. (A) Unbehandelte Kontrolle; (B) PBS; (C) LUB.**



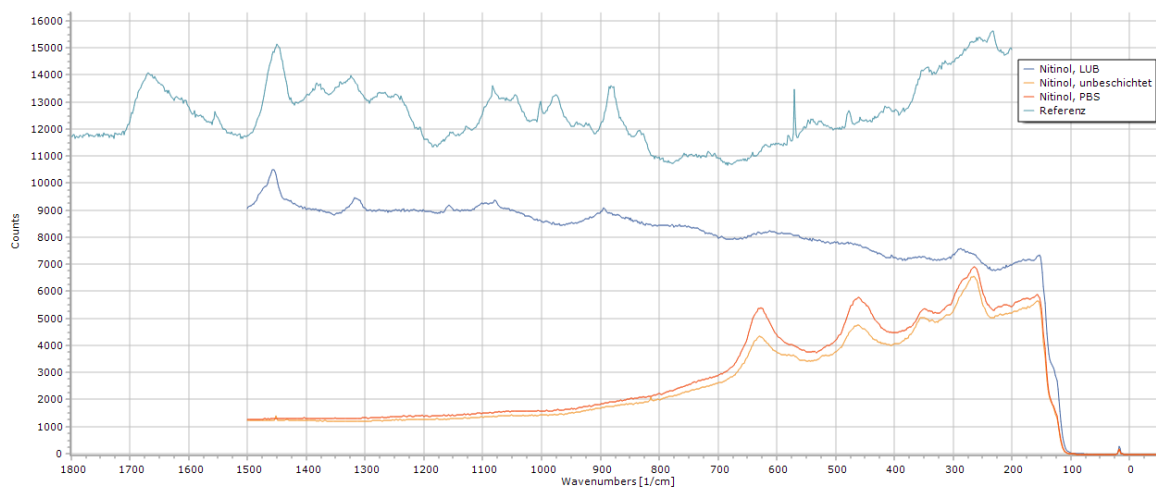
### 4.6.3. RAMAN Spektroskopie

Als Alternative sollte das oberflächengebundene Lubricin mittels Laser im RAMAN Spektrometer erfolgen. Um das zu erwartende Spektrum zu charakterisieren, wurden zunächst höher konzentrierte Proteinmengen verwendet. Abbildung 47 zeigt das erhaltene Referenzspektrum. Die klaren Peaks der mit LUB beschichteten Probe lassen sich bei der unbeschichteten Kontrolle nicht reproduzieren.



**Abbildung 47: RAMAN-Spektrum eines mit Lubricin (13,5 µg) beschichteten Titanplättchens (blau).** Vergleichend dazu ist die unbeschichtete Kontrolle (orange) dargestellt.

Dieses Referenzspektrum wurde mit dem des mit LUB beschichteten Plättchens verglichen (Abbildung 48). Die deutlichsten Peaks der Referenz sind hier ebenfalls reproduzierbar, wenn auch in verminderter Intensität.



**Abbildung 48: RAMAN-Spektrum eines mit Lubricin (1,5 µg) beschichteten Nitinolplättchens.** Spektren: LUB, 1,5 µg (blau); Referenz: LUB 13,5 µg (türkis); unbeschichtet (orange); PBS-behandelt (rot).

## 5. Diskussion

### 5.1. QCM-Messungen

Nachdem die Frequenzabnahme in den QCM-Messungen der vorliegenden Arbeit sowohl mit PRP als auch mit Blut stets stärker war als die Dämpfungszunahme, konnte die Sauerbrey-Gleichung auch hier angewandt werden. Darüber hinaus wurden allerdings mikroskopische Aufnahmen angefertigt, um die Ergebnisse zu verifizieren.

#### 5.1.1. Adsorptionsfähigkeit des Lubricins

Die Ergebnisse der QCM-Messungen konnten bestätigen, dass das Protein selbstständig adsorptiv an Titanoberflächen bindet. Dabei war die Bindung auch bei höheren Fließgeschwindigkeiten stabil. In der vorliegenden Arbeit konnte die Stabilität der Bindung bei einer Fließrate bis zu 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  nachgewiesen werden. Bei dem Innendurchmesser der eingesetzten Schläuche wurde so eine Fließgeschwindigkeit von ca. 3  $\text{cm}/\text{Sek.}$  erreicht. Die Adsorptionsfähigkeit des Lubricins an verschiedene Materialien wurde von Chang et al. (2008), Zappone et al. (2007) und Greene et al. (2015) ebenfalls beschrieben. So konnten Messungen mit einem Rasterkraftmikroskop zeigen, dass das Protein sowohl an hydrophoben als auch an hydrophilen Oberflächen bindet (146). Durch SFA-Messungen (Surface Forces Apparatus) konnte zusätzlich die Adsorption an negativen und positiven Oberflächen gezeigt werden (85). Darüber hinaus wurden QCM-Messungen durchgeführt, mit denen die Bindung des Proteins an der Quarzoberfläche demonstriert wurde (88). Hierbei kamen jedoch keine Titanquarze, sondern Goldquarze zum Einsatz. Berechnungen mittels Sauerbrey-Gleichung detektierten eine gebundene Lubricinmasse von ca. 1300  $\text{ng}/\text{cm}^2$ . Die in der vorliegenden Arbeit berechnete geringere adsorbierte Masse (904  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) kann aufgrund des abweichenden Quarzmaterials nicht direkt mit den Ergebnissen von Greene et al. verglichen werden, jedoch liegt sie in einem vergleichbaren Rahmen. Darüber hinaus wurde von allen zuvor genannten Autoren gezeigt, dass die Menge des adsorbierten Proteins stark von den chemischen Eigenschaften des Substrates abhängig ist (85, 88, 146). Generell muss bei Anwendung der Sauerbrey-Gleichung in flüssigen Phasen jedoch beachtet werden, dass sie nur eine Annäherung zur Quantifizierung der gebundenen Masse zulässt. Während eine Berechnung an Luft mit hoher Genauigkeit möglich ist, kommt es in flüssigen Phasen zur Ermittlung eines zu geringen Wertes (147). Aus diesem Grund kann die errechnete Masse in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nur als Annäherung an die tatsächlich gebundene Masse gesehen werden. Da jedoch bei allen Berechnungen die gleiche Methode angewandt wurde, sind die Ergebnisse für eine vergleichende Darstellung durchaus geeignet. Die berechnete Menge des gebundenen Lubricins

während der QCM-Messungen wurde als Grundlage für die Menge an Lubricin, die in weiteren Beschichtungsversuchen verwendet wurde, herangezogen.

### **5.1.2. Analyse der antiadhäsiven Eigenschaften des Lubricins**

In der vorliegenden Arbeit konnten QCM-Messungen mit PRP und mit Vollblut eine Verminderung bis vollständige Verhinderung der Adhäsion von Blutzellen erreichen. Da die Interpretation von Ergebnissen aus Mikrowaagenmessungen mit lebenden Zellen durch komplexe Wechselwirkungen stets schwieriger ist als mit Nanopartikeln, wurden zur Überprüfung der Ergebnisse mikroskopische Bilder angefertigt. Diese bestätigten den Signalverlauf der vorangegangenen Messungen und demonstrieren die antiadhäsiven Eigenschaften sowohl gegenüber Thrombozyten als auch gegenüber Vollblut. Auch Greene et al. (2015) konnten bereits antiadhäsive Eigenschaften des Proteins gegenüber anderen Proteinen wie IgG, BSA sowie Blutplasma bei breitem pH-Spektrum nachweisen, führten jedoch keine Versuche mit Vollblut oder isolierten Blutzellen durch (88).

## **5.2. Hämokompatibilitätsanalysen**

### **5.2.1. Vereinfachtes Inkubationsmodell in der Mikrotiterplatte**

Obwohl das vereinfachte Modell der Blutinkubation in Mikrotiterplatten im Labor der Betreuerin der vorliegenden Arbeit bereits erfolgreich durchgeführt wurde, kam es bei den Versuchen zum vorzeitigen Eintritt der Blutgerinnung. Möglicherweise ist eine abweichende Zusammensetzung der Polystyrol-Wellplatten verschiedener Hersteller in Kombination mit der niedrigen Heparinisierung die Ursache. Aus diesem Grund konnte das Blut nicht mehr für Analysezwecke herangezogen werden, wodurch die Aussagekraft des Versuches deutlich gemindert ist. Trotzdem bestätigen die nachfolgend angefertigten mikroskopischen Aufnahmen erneut die antiadhäsiven Eigenschaften der Beschichtung. Jedoch zeigte die kovalente Anbindung mittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  reduzierte Erfolge gegenüber den adsorptiv beschichteten Plättchen. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Versuchen eine alternative kovalente Beschichtung mit dem Crosslinker DMS etabliert.

### **5.2.2. Rotationsmodell mittels modifiziertem Chandler Loop**

Die Verwendung des modifizierten Chandler Loops war im Labor bereits etabliert. Sie stellt eine tierversuchsfreie Methode zur Testung der komplexen Wechselwirkungen des Blutes im Kontakt mit Fremdmaterialien dar (135, 145). Im Vergleich zur Testung der Materialien im Tier

können in vitro die Rahmenbedingungen besser kontrolliert werden. Dazu gehören bspw. die Möglichkeit zur genauen Einstellung des Blutflusses, die vereinfachte Antikoagulation sowie das Fehlen von Störfaktoren wie ein Narkosezustand oder Strömungshindernisse im Gefäß (148).

Im vorliegenden Versuch fiel auf, dass der Grad der Leukozyten- und Thrombozytenaktivierung sowie der Aktivierung des Komplementsystems bei Zugabe des unbeschichteten Stents dem des Leerschlauches entsprach. Trotz deutlicher Verbesserungen der analysierten Parameter konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beschichteten und dem unbeschichteten Stent ermittelt werden. Die erste zu beachtende Komponente stellt hierbei die Verwendung von humanem Spenderblut dar. Da spendertypische Unterschiede in der Reaktion auf den unbeschichteten Stent bestehen, lassen sich hohe Standardabweichungen erkennen. Dies erschwert die statistische Detektion von Differenzen, insbesondere bei einer relativ geringen Spenderanzahl wie im Versuch der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren lässt sich durch Einsatz des unbeschichteten Stents keine statistisch signifikant höhere Aktivierung der Blutzellen oder des Komplementsystems feststellen. Auch führt die Rotation selbst nicht in allen Fällen zu einer statistisch signifikanten Differenz verglichen zum baseline-Wert. Deshalb wurde die geringe Krafterwirkung durch die sanfte Rotation im Chandler Loop ebenfalls als Hindernis erachtet, um die Unterschiede zwischen den Gruppen klar herauszuarbeiten. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf ein stärker aktivierendes Modell zum Einsatz kommen.

### **5.2.3. Extrakorporale Zirkulation im Flow-Loop-Modell**

Um eine stärkere Aktivierung zu erreichen, kam im weiteren Verlauf der Hämokompatibilitätstestung ein Rollerpumpenmodell zum Einsatz. Da die Scherkräfte hier deutlich stärker ausfallen, wurde zusätzlich zur adsorptiven noch die kovalente Beschichtung mittels DMS getestet, um eine stabile Bindung des Proteins zu gewährleisten. Der Vergleich der analysierten Marker im Leerschlauch zwischen diesem Versuchsaufbau und dem modifizierten Chandler Loop zeigt, dass das Ziel einer stärkeren Aktivierung im Vergleich zum vorherigen Versuchsaufbau eindeutig erreicht wurde. Auch der Vergleich der Parameter mit den Referenzwerten macht dies deutlich. Im Bereich der Leukozytenaktivierung liegt der unbeschichtete Stent mit einer detektierten Menge PMN-Elastase von  $279,06 \pm 138,89$  ng/ml knapp über dem Grenzwert von 250 ng/ml, was auf ein Entzündungsgeschehen hindeutet (149). Bis zu einem Wert von 1000 ng/ml wird hierbei von einer mäßigen, bei Werten darüber von einer massiven Entzündung gesprochen. Die gemessenen Konzentrationen im Leerschlauch sowie unter Verwendung des gedippten und kovalent beschichteten Stents liegen mit  $221,77 \pm 60,81$  ng/ml,  $216,22 \pm 70,16$

ng/ml und  $219,51 \pm 79,66$  ng/ml noch im Normalbereich. Bei der Ausschüttung von  $\beta$ -TG spricht ein Wert über 300,00 I.E./ml für eine Aktivierung von Thrombozyten (150). Bezüglich dieses Parameters führt bereits die Rotation des Blutes im Leerschlauch zur Aktivierung, was sich in einer Konzentration von  $570,36 \pm 23,39$  I.E./ml bemerkbar macht. Gleiches lässt sich bei Betrachtung des TAT-Wertes erkennen, der bei einer ausbleibenden Aktivierung der Gerinnungskaskade einen Wert von 60  $\mu$ g/l nicht überschreitet (151). Auch hier liegt im vorliegenden Versuch bereits die Konzentration im Leerschlauch mit  $131,52 \pm 90,07$   $\mu$ g/l über dieser Schwelle. Darüber hinaus demonstriert eine SC5b-9-Konzentration von  $691,48 \pm 258,50$  ng/ml im Leerschlauch die Aktivierung des Komplementsystems. Beim gesunden Patienten wird bei diesem Marker ein Wert von 80 ng/ml normalerweise nicht überschritten (152).

In der vorliegenden Arbeit kommt es durch die Aktivierung von Thrombozyten und deren Adhäsion am unbeschichteten Stent zu einer deutlichen Abnahme an Thrombozyten im analysierten Blut dieser Proben.

Es fällt jedoch auch hier eine geringe Aktivierung durch den unbeschichteten Nitinolstent auf, was sich durch das Fehlen statistisch signifikanter Unterschiede im Vergleich zum Leerschlauch bemerkbar macht. Die Ursache ist dabei vermutlich in der Struktur des verwendeten Stents selbst zu finden. Dadurch, dass er verhältnismäßig wenig Streben besitzt, ist die Oberfläche zu gering, um einen stärkeren Effekt hervorzurufen. Diese Hypothese wird ebenfalls dadurch gestützt, dass sich die mittels mikroskopischer Untersuchung dargestellten Fibrin- und Thrombozytenadhäsionen hauptsächlich an den Gabelungspunkten zweier Streben darstellen lassen. Hier ist die Oberfläche des Stents deutlich größer als an anderen Stellen, was zu Verwirbelungen im Blutstrom führt und vermehrte Adhäsion von Blutkomponenten nach sich zieht. Diese ungleiche Verteilung der Beanspruchung an unterschiedlichen Stellen des Stents wurde bereits von Schüller-Ravoo et al. (2014) festgestellt (153). Aus diesem Grund ist die zusätzliche Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen umso wichtiger. Durch sie konnte gezeigt werden, dass eine Beschichtung mit Lubricin die Fibrin- und Zelladhäsion in eben jenen gefährdeten Bereichen verhindert. Eine geringere Heparinisierung sollte bei zukünftigen Versuchen ebenfalls in Betracht gezogen werden, um eine stärkere Reaktion zu erreichen.

#### **5.2.4. Inkorporation des Lubricins mittels Elektrospinnen**

Um das enthaltene Protein in den elektrogesponnenen Proben nachzuweisen, wurden raster-elektronenmikroskopische Bilder der gesponnenen Vliese angefertigt und der Durchmesser der Nanofasern bestimmt. Die Proben, in denen Protein enthalten war, zeigten eine deutliche Streuung des Faserdurchmessers und wiesen bei mikroskopischer Betrachtung blasenartig verdickte Stellen auf. Nachdem dies nur in den mit Lubricin gesponnenen Proben der Fall war,

ist es mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Effekt des Proteins. Jedoch fehlt ein eindeutiger Nachweis, da Untersuchungen mittels EDX-REM keine abweichende Zusammensetzung im Vergleich zum Kontrollvlies zeigten. Diese Methode wurde jedoch durch den geringen Faserdurchmesser limitiert, der das genaue Fokussieren und Erfassen der einzelnen Faser nicht möglich machte.

Es wurden bereits mehrere Versuche durchgeführt, in denen Polymerlösungen mit pharmakologisch wirksamen Substanzen oder Proteinen versetzt und die Lösung anschließend erfolgreich elektrogewoben wurde (154-158). Sanders et al. (2003) gelang es via Elektrogewebeprozess, mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes bovines Serumalbumin in die Fasern zu integrieren und dieses mikroskopisch nachzuweisen (159). Jedoch blieb unklar, ob die Proteinaktivität dabei erhalten blieb. Ji et al. (2010) erweiterten die Untersuchungen zur Inkorporation von Serumalbumin und demonstrierten, dass dessen biologische Aktivität zwar abnahm, aber mit 75 % der Ausgangsaktivität durchaus noch erhalten war (158). Auch Chew et al. (2005) nahmen sich dieser Fragestellung an und konnten zeigen, dass der Nervenwachstumsfaktor ( $\beta$ -NGF), der kontinuierlich aus den biologisch abbaubaren Fasern freigesetzt wurde, selbst nach drei Monaten noch biologisch aktiv war (160). Auch hier wurde die Polymerlösung wie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit direkt mit dem Protein versetzt. Elektronenmikroskopische Bilder der gewebenen Proben von Chew et al. (2005) und Sanders et al. (2003) zeigten ebenfalls Unterschiede in der Morphologie der Fasern zwischen Negativkontrollen und der proteinhaltenden Proben. In beiden Fällen waren die Proteine wie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit in PBS gelöst, auf dessen Verwendung sich diese gemeinsame Beobachtung höchstwahrscheinlich zurückführen lässt. Durch die unterschiedliche Ladungsdichte zwischen Polymerlösung und wässriger Lösung sind die elektrostatischen Kräfte, die im elektrischen Feld auf die Lösungen wirken, verschieden, wodurch es zur Störung des aus der Nadel austretenden Strahls kommt (160). Dadurch werden die einzelnen Fasern nicht so gleichmäßig gewoben wie bei Verwendung einer reinen Polymerlösung. Die enthaltenen Blasen in den Proben der vorliegenden Arbeit sprechen folglich dafür, dass das wässrige PBS in die Proben eingewoben wurde. Höchstwahrscheinlich wurde das darin enthaltene Lubricin demnach ebenfalls in die Fasern integriert.

Um dies zu zeigen, sollte das Protein mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) im Vlies nachgewiesen werden. Diese Methode findet bei der Untersuchung der Zusammensetzung elektrogewebener Proben häufig Anwendung (161, 162). Während in einem Rasterelektronenmikroskop Bilder der Probenoberfläche erzeugt werden, ist mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie die Zusammensetzung einer Probe bestimmbar. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe auf, so kommt es zur Emission von Röntgenstrahlen (163). Die Wellenlänge dieser Röntgenstrahlen wird detektiert und ist spezifisch für einzelne Elemente.

Die Höhe des so entstandenen Peaks lässt Aussagen über die enthaltene Menge des Elementes zu. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit gelang es mit dieser Methode hingegen nicht, das Protein in den Fasern nachzuweisen.

Zur Überprüfung der Freisetzungskinetik wurde während eines Vorversuchs der Farbstoff Rhodamin B eingesetzt und dessen Konzentration im Überstand nach verschiedenen Zeitpunkten photometrisch bestimmt. Die Messungen zeigten eine starke initiale Freisetzung innerhalb der ersten Stunde. Allerdings lässt sich die Freisetzungskinetik dieses Farbstoffes nur bedingt als Modell verwenden, da das Lubricin deutlich größer ist und dessen Freisetzung demnach stark von der des Rhodamins abweichen kann.

Die gesponnenen Proben zeigten im modifizierten Chandler Loop bei Inkorporation des Lubricins im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutlich reduzierte Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung, was für eine erhaltene Aktivität des Lubricins spricht. Jedoch fiel auf, dass die Negativkontrollen nach Inkubation mit dem Spenderblut deutlich fragiler erschienen als die Proben mit Lubricin. Dies kann einerseits ein Effekt des Proteins selber sein, welches nach den vorangegangenen Analysen den Faserdurchmesser erhöht, andererseits muss auch eine abweichende Qualität der Negativkontrollen als Ursache in Erwägung gezogen werden. Da der Elektrospinnprozess von sehr vielen Faktoren abhängt, ist eine vollkommen identische Einstellung aller beteiligten Parameter mitunter schwierig. So können Prozessparameter selbst, wie z.B. der Abstand zum Kollektor, als auch Umwelteinflüsse wie Temperatur oder Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf die Qualität der Fasern haben (164, 165). Des Weiteren fällt auf, dass die Inkorporation des Proteins zu einer verstärkten Aktivierung des Komplementsystems führt, was nach Durchführung der anderen Versuche unerwartet erscheint. Eine mögliche Ursache dafür könnte in einer Verunreinigung der Proteinlösung liegen. Während die Vorbereitung der restlichen Hämokompatibilitätsuntersuchungen unter der Sterilwerkbank oder mindestens mit vorher sterilisierten Instrumenten durchgeführt wurde, entfielen diese Maßnahmen beim Elektrospinnen der Proben im Labor des Kooperationspartners.

### **5.3. Untersuchung der Endothelialisierbarkeit**

Da eine frühestmögliche Endothelialisierung aufgrund der hervorragenden antithrombogenen Eigenschaften der Endothelzellen angestrebt wird, war die Analyse der Endothelialisierbarkeit ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Da einer Zellproliferation stets die Zelladhäsion vorausgehen muss, wurde diese auf Nitinol- und Titanoberflächen untersucht. Gewöhnlich erfolgt bei der Kultivierung von HUVECs eine vorherige Inkubation der Substrate mit Gelatine oder Kollagen, um einen Extrazellulärmatrixersatz zu schaffen und die Zelladhäsion zu unterstützen (166, 167). Diese Methode wurde während der Kultivierung in Zellkulturflaschen

angewandt. Beim Aussäen der Zellen auf die zu untersuchenden Oberflächen, wurde auf diesen Schritt jedoch verzichtet, um einen Kontakt zwischen dem LUB und den HUVECs zu gewährleisten und etwaige Effekte der Beschichtung sicher detektieren zu können. Bei der Untersuchung der Zelladhäsion von HEK-Zellen und HUVECs lassen sich keine Unterschiede zwischen unbeschichteten und beschichteten Proben erkennen. Während die Adhäsion von Endothelzellen an lubricinbeschichteten Oberflächen noch nicht untersucht wurde, analysierten Aninwene et al. (2014) die Viabilität von ausgesäten Fibroblasten auf Polystyrol mit und ohne Lubricin (168). Dabei zeigte sich eine deutlich verringerte Zelladhäsion für bis zu 48 h. Jedoch stellte sich ebenfalls heraus, dass von dem Protein keine zytotoxischen Effekte ausgingen und nicht-adhärenente Zellen nachfolgend problemlos weiterkultiviert werden konnten. Abweichend von den Versuchen in der vorliegenden Arbeit wurden in der aufgeführten Publikation jedoch weitaus höhere Proteinmengen verwendet. Während dort die Vertiefungen einer 96-Wellplatte mit 25 µg Lubricin beschichtet wurden (78,12 µg Protein/cm<sup>2</sup>), kamen in der vorliegenden Arbeit, entsprechend der verwendeten Proteinmenge während der Hämokompatibilitätsversuche, nur 1,5 µg LUB/cm<sup>2</sup> zum Einsatz. Jedoch sollte in weiteren Versuchen eine längerfristige Kultivierung der Zellen auf beschichteten Materialien erfolgen, um negative Effekte auf das Zellwachstum sicher ausschließen zu können.

#### **5.4. Analyse der antibakteriellen Eigenschaften des Lubricins**

Zunächst wurden erneut QCM-Messungen durchgeführt, um die antiadhäsiven Eigenschaften des Proteins gegenüber Bakterien zu analysieren. Bei Verwendung von Bakterien sind QCM-Messungen in ihrer Anwendung jedoch limitiert und die Interpretation des Signalverlaufs erschwert (169). Da die Wechselwirkungen zwischen Quarz und Bakterien sehr viel komplexer als zwischen Quarz und Nanopartikeln sind, ist die Quantifizierung der gebundenen Masse über die Sauerbrey-Gleichung nicht möglich. Diese ist nur anwendbar, sofern sich die Moleküle an der Oberfläche des Quarzes als starre Schicht anlagern (128). So kann die Bindung über die Pili der Bakterien z.B. zu einer starken Eigenbewegung der Bakterien führen und die Oszillation des Quarzes beeinflussen (170). In der Literatur werden während QCM-Messungen bei Bakterienbindung sowohl positive als auch negative Frequenzverschiebungen beschrieben (171, 172). In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen konnte ein Frequenzanstieg in der Kontrollgruppe nicht beobachtet werden. Unter Verwendung von *S. aureus* kam es bei jeder der Messungen zu einem Frequenzabfall. Jedoch variierte die Stärke der negativen Frequenzverschiebung deutlich und konnte innerhalb der Messreihe nicht reproduziert werden. Um trotzdem eine Quantifizierung der adhärenenten Bakterien zu ermöglichen, wurde der Quarz nach Durchlauf im QCM mittels Lebend-/Tot-Färbung gefärbt.



Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder am Ende der Messungen bestätigten in allen Fällen eine deutlich reduzierte Anzahl adhärenter Bakterien bei vorheriger Perfusion mit Lubricin. Diese Beobachtungen decken sich mit den Beschreibungen der antiadhäsiven Eigenschaften des Proteins gegenüber *S. aureus* und *S. epidermidis* von Aninwene et al. (89). Unter Verwendung des Lubricins stieg die Frequenz jedoch über die gesamte Dauer der Perfusion mit Bakterien an. Dies kann unter anderem für eine partielle Entfernung des Proteins im Zuge der Spülung mit der wässrigen Bakterienlösung sprechen. Andererseits fällt auf, dass diese Frequenzzunahme beendet ist, sobald das PBS den Quarz erreicht. Möglicherweise markiert dieser Frequenzanstieg also auch vereinzelte Wechselwirkungen zwischen Bakterien und der beschichteten Quarzoberfläche. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung am Ende der Messung einzelne Bakterien auf dem Quarz nachweisbar sind.

Zusätzlich zur Quantifizierung der gebundenen Bakterien sollte die nachfolgende Färbung mit Lebend-/Totfarbstoff eventuelle bakterizide Eigenschaften des Lubricins zeigen. Hierbei konnte jedoch kein Anstieg an toten Bakterien unter Verwendung des Proteins festgestellt werden. Auch die im Anschluss an diese Versuche durchgeführten Agardiffusionstests mit verschiedenen Mengen Lubricins widerlegten dieses Ergebnis nicht. Während Aninwene et al. (2015) eine Verlängerung der lag-Phase des bakteriellen Wachstums beschreibt, wurde eine mögliche bakterizide Wirkung des Proteins bisher nicht untersucht (89).

Da das initiale Stadium der Biofilmbildung eine bakterielle Adhäsion voraussetzt, sind die demonstrierten antiadhäsiven Eigenschaften des Proteins jedoch trotz fehlender bakterizider Eigenschaften von Vorteil, um Implantatsinfektionen vorzubeugen (55).

## **5.5. Kontaktwinkelmessungen**

### **5.5.1. Benetzbarkeit der beschichteten Materialien**

Die Kontaktwinkelmessungen der beschichteten Titanproben zeigen, dass das adsorptiv gebundene Lubricin zu einer signifikanten Reduktion des Kontaktwinkels im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle führt. Unter Verwendung von Nitinol führt diese Beschichtungsart zu keiner signifikanten Erhöhung der Hydrophilie. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bei den zwei verschiedenen Materialien ist vermutlich im Zusammenspiel zwischen beschichtetem Material und dem Lubricin selbst zu finden. Bei Untersuchungen der Physisorption von Lubricin an verschiedene Oberflächen durch Zappone et al. (2007; 2008) und Chang et al. (2008) zeigte sich, dass das Protein auf hydrophoben Oberflächen in seiner typischen, schleifenförmigen Struktur bindet, während es bei Adsorption an hydrophile Oberflächen vermehrt

zur Bindung kettenartiger Strukturen kommt, bei denen die Bindung nur durch eine der beiden Enddomänen erfolgt (85, 86, 146). Wie eingangs beschrieben, ist die Struktur des sich anlagernden Lubricins elementar für dessen Funktionalität. Demnach enthält die mucinähnliche Zentrumsdomäne die stark hydratisierten und negativ geladenen Zuckergruppen (88). Dieses Bindungsmuster ähnelt somit stark dem einer Polymerbürste und weist auch gleiche Wirkmechanismen auf (85). Wird diese hydratisierte Zentrumsdomäne bei schleifenförmiger Adsorption der Umgebung präsentiert, kommt es einerseits durch sterische Abstoßung zur Streckung der einzelnen Moleküle und damit zu einer höheren Dichte des gebundenen Proteins (173). Andererseits führt die Hydratationsschicht zum Aufbau repulsiver Kräfte (174). Nimmt die Zahl an kettenförmig gebundenem Protein zu, verliert die Proteinschicht demnach diese Eigenschaften und die Hydrophilie nimmt ab. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit decken sich mit diesen Beobachtungen. So lässt die Funktionalität des Proteins auf dem hydrophileren Nitinol nach, während auf dem hydrophoben Titan bessere Ergebnisse erzielt werden.

Die Immobilisation von Proteinen birgt stets das Risiko eines Funktionsverlustes des Proteins, wenn für die Aktivität wichtige Teile des Proteins durch die Bindung an die Oberfläche beeinträchtigt oder gar zerstört werden (175). Aus diesem Grund war insbesondere die Untersuchung der Funktionalität des kovalent gebundenen Proteins von großer Bedeutung.

### **5.5.2. Sterilisierbarkeit der Beschichtung**

Vor dem Einsatz eines jeden Medizinproduktes muss dessen Sterilität gewährleistet sein. In den meisten Fällen wird hierfür das Autoklavieren empfohlen (176). Jedoch kann diese Methode nur angewandt werden, wenn alle Materialien hitzebeständig sind. Für die Beschichtung mit dem Protein Lubricin ist dieses Verfahren demnach nicht zielführend. Zu den schonenderen Verfahren, die bei thermolabilen Produkten eingesetzt werden können, sind die Gassterilisationsverfahren zuzuordnen, wobei das Gas selbst eine keimabtötende Wirkung besitzt. Hierzu werden beispielsweise die Begasung mittels Ethylenoxid (EO) oder Dampf-Formaldehyd gezählt (176, 177). Auch mittels Gamma-Sterilisation ist eine Sterilität ohne nennenswerte Temperaturerhöhung zu erreichen (178). In der vorliegenden Arbeit wurden die beschichteten Proben als vereinfachtes Modell zur ersten Evaluation der Sterilisierbarkeit mit UV-Licht bestrahlt, wobei es zu keiner Beeinträchtigung der Funktionalität durch die Behandlung kam. Die Wirksamkeit von UV-C Licht gegen Viren und Bakterien wurde in mehreren Studien bestätigt (179-181). Jedoch kann aufgrund der begrenzten Eindringtiefe und möglichen Schattenbildung nur eine Desinfektion der oberflächlichen Strukturen gewährleistet werden, weshalb diese Methode nur als Vorversuch gewertet werden darf und weitere Untersuchungen mit zu-

verlässigeren Methoden angewandt werden sollten (182). Allerdings schließt auch eine negative Funktionalität nach erfolgter Sterilisation den Einsatz des Proteins als Beschichtung von Medizinprodukten keinesfalls aus, sondern erfordert nur eine angepasste Produktion. Die Beschichtung kann in diesem Fall auch unter sterilen Bedingungen erfolgen, was eine Eignung des Endproduktes in der Medizin ermöglicht.

### **5.5.3. Lagerstabilität der beschichteten Proben**

Da eine gewisse Lagerfähigkeit bei Medizinprodukten unabdingbar für deren Einsatz ist, sollte diese unter möglichst einfachen Bedingungen (4 °C, Trockenlagerung) evaluiert werden. Greene et al. (2015) führten Untersuchungen zur Stabilität von adsorptiv gebundenem Lubricin auf Gold durch. Dazu wurden Goldquarze mit der Proteinlösung inkubiert und anschließend gelagert. Daraufhin wurden diese Quarze für QCM-Messungen herangezogen, welche zeigen konnten, dass es selbst nach 180 Tagen Lagerung zu keinem signifikanten Anstieg an adsorbiertem bovinem Serumalbumin kam (88). Die Lagerbedingungen wichen jedoch von denen der vorliegenden Arbeit ab. Das beschichtete Material wurde in den beschriebenen Versuchen bei Raumtemperatur im Exsikkator unter Vakuum gelagert. Darüber hinaus wurden nur adsorptiv beschichtete Oberflächen untersucht, eine kovalente Anbindung des Proteins fand nicht statt. Trotz der Unterschiede im Versuchsaufbau lassen sowohl die Beobachtungen von Greene et al. (2015) als auch die der vorliegenden Arbeit auf eine hohe Stabilität von oberflächengebundenem Lubricin schließen. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da das Protein in seiner Funktion als Schmiermittel im Gelenk großen Belastungen ausgesetzt ist und eine feste Bindung an die Knorpeloberfläche somit von großer Wichtigkeit ist. Generell scheint eine Trockenlagerung des Proteins am erfolgversprechendsten, da das Vorhandensein von Wasser zu einer Vielzahl chemischer oder physikalischer Abbaureaktionen bei Proteinen führen kann (183). Jedoch können Entwässerungsverfahren ebenfalls zur Beeinflussung der Faltstruktur von Proteinen führen, weshalb bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet wurde (184).

### **5.6. Nachweis des gebundenen Proteins**

Da der Nachweis mittels Antikörpern aufgrund der Autofluoreszenz der verwendeten Materialien sowie unspezifischer Bindungen nicht möglich war, sollte das Lubricin mittels EDX-REM und PNA-kolloidalem Gold nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Nitinolplättchen adsorptiv beschichtet und anschließend mit PNA-kolloidalem Gold inkubiert, was

zu einer Adsorption des Proteins auf der Oberfläche der Nanopartikel führt (144). Durch Quantifizierung des Goldes sollte indirekt auch eine Quantifizierung des gebundenen Proteins erfolgen. Nanci et al. (1998) wandten diese Methode erfolgreich an, um kovalent gebundenes Albumin auf Titanoberflächen nachzuweisen (185). Jedoch kam es in den Versuchen der vorliegenden Arbeit trotz eines Waschschriffes zu unspezifischen Bindungen, die den Einsatz der Methode stark limitierten.

Letztendlich erwies sich die RAMAN-Spektroskopie als geeignetste Methode zum Nachweis des oberflächengebundenen Lubricins. Das Referenzspektrum des Lubricins wurde vorab erstellt, um das Protein anschließend zweifelsfrei identifizieren zu können. Dabei wurden Titanplättchen verwendet, da diese steril bestellt werden konnten und damit Verfälschungen des Spektrums durch Kontaminationen sicher ausgeschlossen werden konnten. Während bislang keine Untersuchungen zum RAMAN-Spektrum von Lubricin existieren, wurden jedoch Mucine mittels dieser Methode analysiert (186). Das erhaltene Spektrum, das durch die glykosylierten Strukturen der zentralen Domäne des Mucins gekennzeichnet ist, ist für die verschiedenen Mucinarten charakteristisch (187, 188). Vergleicht man dieses Spektrum mit dem der vorliegenden Arbeit, so fallen ebenfalls deutliche Parallelen auf, bei denen die größten Peaks im selben Bereich liegen. Die verminderte Intensität des Signals bei den Proben mit 1,5 µg Protein ist wahrscheinlich durch die geringere Menge des verwendeten Lubricins begründet.

Generell erschwert eine unsichere Nachweismethode das Vorhaben, Effekte der beschichteten Proben zweifelsfrei dem Lubricin zuzuordnen. Jedoch leisten auch die durchgeführten QCM- und Kontaktwinkelmessungen ihren Beitrag zum Nachweis des Proteins. So zeigen die Versuche mit der Mikrowaage eindeutig die selbstständige Bindung des Lubricins an Titan. Ergänzt werden diese Ergebnisse noch durch die veränderten Kontaktwinkel nach Proteinbeschichtung.

## **5.7. Ausblick**

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen vielversprechende Ergebnisse, die eine weitere Forschung mit Lubricin als Implantatbeschichtung lohnenswert machen. Da die Verwendung des Proteins als Beschichtung noch in den Anfängen steht, müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um die Beschichtung zu optimieren und gänzlich beurteilen zu können.

Obwohl die QCM-Messungen die Bindung des Proteins an der Quarzoberfläche nachweisen konnten, sollte weiterhin an einer sicheren Nachweismethode für beschichtete Oberflächen geforscht werden. Nachdem sich die RAMAN-Spektroskopie als vielversprechendste Nach-

weismethode erwies, sollte diese weiterentwickelt werden, um auch kleine Proteinmengen sicher nachweisen zu können. Nur so können Fehler im Beschichtungsprozess detektiert und positive Effekte während der folgenden Versuche sicher dem Protein zugeordnet werden. Zur Evaluation der Lagerstabilität sollte der Lagerungszeitraum über die durchgeführten vier Wochen hinaus ausgedehnt werden. Bleibt das Protein weiterhin funktional, so können die beschichteten Materialien ohne größeren Aufwand im Kühlschrank gelagert werden. Im Falle eines Verlusts der Funktionalität des Proteins bei längerer Lagerung sollten alternative Lagerungsbedingungen (niedrigere Temperaturen, Lagerung unter Vakuum) in Betracht gezogen werden. Die Kultivierung von Endothelzellen auf den beschichteten Materialien sollte ebenfalls über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, um negative Effekte auf die Zellviabilität sicher ausschließen zu können. Darüber hinaus sind weitere Versuche zur Sterilisierbarkeit des gebundenen Proteins durchzuführen, die eine Zulassung der beschichteten Materialien als Medizinprodukte ermöglichen. Sollte eine Sterilisierung die Funktionalität des Proteins herabsetzen, so könnte die Produktion der Implantate unter sterilen Bedingungen eine mögliche Alternative darstellen.

In den Hämokompatibilitätsversuchen der vorliegenden Arbeit führte die Beschichtung mit Lubricin zu einer deutlich reduzierten Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten sowie des Komplementsystems, auch wenn statistische Signifikanzen wiederholt fehlten. Da die Ausgangsblutwerte der verschiedenen Spender bereits starke Unterschiede und damit hohe Standardabweichungen aufwiesen, sollten die Versuche mit größerem Stichprobenumfang durchgeführt werden. Erst dann kann eindeutig beurteilt werden, ob die Beschichtung mit Lubricin zuverlässig zu einer Verbesserung der Hämokompatibilität beiträgt. Sollten diese Versuche ebenfalls zu positiven Ergebnissen führen, so ist eine weitere Analyse der Beschichtung im Tiermodell unumgänglich. Nur hier können mögliche Behandlungsansätze während der komplexen Entzündungsvorgänge im atherosklerotischen Geschehen vollumfänglich beurteilt werden.

## 6. Zusammenfassung

Laut Weltgesundheitsorganisation sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache weltweit. Häufig werden im Zuge der Therapie kardiovaskuläre Implantate wie Stents oder künstlichen Herzklappen eingesetzt. Trotz erheblicher Weiterentwicklung der verwendeten Materialien, stellen implantatassoziierte Komplikationen immer noch ein großes Problem dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung des körpereigenen antiadhäsiven Glykoproteins Lubricin als Beschichtung blutkontaktierender Implantate zu testen, um deren Hämostabilität zu verbessern und Implantat bedingte Infektionen zu reduzieren.

Hierfür wurden aufgrund ihrer chirurgischen Anwendungshäufigkeit Oberflächen aus den Materialien Titan bzw. Nitinol kovalent und adsorptiv mit dem Protein beschichtet und anschließend mit Thrombozyten oder humanem Vollblut in Kontakt gebracht, wobei eine Quarzkristallmikrowaage sowie extrakorporale Zirkulationsmodelle zum Einsatz kamen. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit der Inkorporation des Proteins in die Nanofasern elektrogewebener Vliese untersucht. Zur Evaluierung der Endothelialisierbarkeit beschichteter Materialien kamen menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) sowie Endothelzellen der humanen Nabelschnur (HUVECs) zum Einsatz. Kontaktwinkelmessungen sollten die Lagerstabilität der beschichteten Materialien untersuchen sowie erste Erkenntnisse zur Sterilisierbarkeit mittels UV-Licht liefern. Mittels Quarzkristallmikrowaage und Agardiffusionstest wurde die Wirkung des Proteins auf Bakterien untersucht.

Im Zuge der durchgeführten Versuche konnten die antiadhäsiven Eigenschaften des Proteins bestätigt werden. Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage zeigten nicht nur eine deutlich verringerte Zahl adhärenter Blutbestandteile auf der Oberfläche beschichteter Titanquarze, sondern auch die selbstständige Adsorption des Proteins an diese. Dabei erschien die Bindung des Proteins auch bei hohen Fließgeschwindigkeiten stabil. Versuche mit humanem Vollblut zeigten darüber hinaus eine verbesserte Hämostabilität der verwendeten Materialien nach Beschichtung mit Lubricin, auch wenn mitunter keine statistischen Signifikanzen ermittelt werden konnten. Diese positiven Effekte konnten für adsorptiv als auch für kovalent beschichtete Nitinolstents gezeigt werden. Während im Agardiffusionstest mit *Staphylococcus aureus* keine bakteriziden Eigenschaften des Proteins nachgewiesen werden konnten, zeigten Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage jedoch antiadhäsive Eigenschaften gegen dieses Bakterium. Darüber hinaus konnten während 24-stündiger Inkubation keine negativen Effekte der Beschichtung auf die Viabilität von Endothelzellen detektiert werden. Kontaktwinkelmessungen bestätigten die Sterilisierbarkeit des gebundenen Proteins mittels UV-Licht sowie eine Lagerungsfähigkeit der beschichteten Proben bei 4 °C über mindestens vier Wochen.

Der Nachweis des oberflächengebundenen Proteins erwies sich als sehr problematisch. Mittels RAMAN-Spektroskopie konnten größere Mengen des Lubricins auf der Oberfläche nachgewiesen werden, bei geringeren Mengen konnte diese Methode jedoch nicht zuverlässig eingesetzt werden.

Entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint die Beschichtung mit Lubricin als vielversprechende Methode zur Erhöhung der Anwendungssicherheit kardiovaskulärer Implantate, die eine weitere Forschung auf diesem Gebiet lohnenswert macht.

Diese sollte neben der weitergehenden Analyse möglicher Sterilisationsverfahren auch die Nachweismethode mittels RAMAN-Spektroskopie weiterentwickeln, um neue Ansätze zum sicheren qualitativen und quantitativen Nachweis des gebundenen Lubricins zu ermöglichen. Außerdem sollten die Hämokompatibilitätsanalysen mit stärker aktivierenden Oberflächen und einer höheren Spenderanzahl wiederholt werden, um eindeutig statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Nach Abschluss der in-vitro Versuche ist eine weitere Analyse der Beschichtung im Tiermodell unumgänglich. Nur hier können mögliche Behandlungsansätze während der komplexen Entzündungsvorgänge im atherosklerotischen Geschehen vollumfänglich beurteilt werden.

## 7. Summary

### **“Improvement of the hemocompatibility of blood-contacting materials using Lubricin“**

According to the World Health Organization, cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide. Often, patients suffering from such diseases require cardiovascular implants like stents or artificial heart valves. Although there have been significant improvements in such implants over the last years, implant failure is still a considerable problem. The aim of this thesis was to investigate the ability of the antiadhesive endogenous protein Lubricin to improve hemocompatibility of blood-contacting implants and to reduce implant infection when used as a coating for cardiovascular implants.

Due to their frequency of use in cardiovascular surgery, titanium and nitinol surfaces were tested in this study. After adsorptive and covalent coating with Lubricin, samples were incubated with thrombocytes or human full blood in extracorporeal circulation models or in a quartz crystal microbalance. Protein incorporation was examined using electrospinning and endothelialization of coated surfaces was examined using human embryonic kidney cells (HEK cells) and Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Contact angle measurements were performed as an indicator for storage stability and sterilizability of the coated materials. Additionally, quartz crystal microbalance measurements and agar diffusion tests were used to examine the protein's effects on bacterial adhesion.

Quartz crystal microbalance experiments confirmed the antiadhesive properties of the protein towards blood components. Experiments also showed the protein's autonomous adsorption to titanium, which remained stable even at high flow rates. Although not statistically significant, coated materials led to a decrease in markers for platelet activation and complement system when compared to the uncoated control. These findings did not differ between covalently and non-covalently bound protein. By using agar diffusion method no bactericidal effects against *Staphylococcus aureus* were detected but the antiadhesive properties against this bacterium were demonstrated using quartz crystal microbalance measurements.

Endothelialization experiments revealed no negative effects of the protein on cell viability in 24 hours of cultivation. Contact angle measurements showed sterilizability of the coating with UV-light as well as storage capability for a minimum of 4 weeks.

Detection of the bound protein proved challenging. Higher amounts of Lubricin were successfully detected using RAMAN spectroscopy. However, this method was unable to detect smaller amounts of bound protein in a reliable way.



All in all, Lubricin appears to be a promising candidate for the improvement of hemocompatibility of cardiovascular implants. Further research is warranted to investigate alternative sterilization methods as well as to develop a qualitative and quantitative detection technique. In addition, hemocompatibility assessments should be extended to a wider range of donors and materials, particularly in systems which activate the blood to a higher extent. After completion of in-vitro experiments, testing on animal models is imperative for detection of protein coating effects on the complex inflammatory processes existing in atherosclerotic vessels.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(10):1161-78.
2. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis *N Engl J Med.* 1976;295(7):369-77.
3. D.J. Maizels/Gyldendal Akademisk. Atherosclerosis [Internet]. 2011 [Zitiert am 08.10.2018]. Abgerufen von: <http://www.scientific-art.com/portfolio%20medicine%20pages/atherosclerosis.htm>.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
5. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-25.
6. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(2):77-86.
7. Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation.* 2002;105(8):939-43.
8. Slark J, Bentley P, Majeed A, Sharma P. Awareness of stroke symptomatology and cardiovascular risk factors amongst stroke survivors. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012;21(5):358-62.
9. Wu CY, Wu HM, Lee JD, Weng HH. Stroke risk factors and subtypes in different age groups: a hospital-based study. *Neurol India.* 2010;58(6):863-8.
10. Neutel JM. Hypertension and its management: a problem in need of new treatment strategies. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1(2 Suppl):10-3.
11. Kullo IJ, Ballantyne CM. Conditional risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(2):219-30.
12. Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris C, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley W, Teo K. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation.* 2001;103(7):919-25.
13. Smith SC, Jr., Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Cerqueira MD, Dracup K, Fuster V, Gotto A, Grundy SM, Miller NH, Jacobs A, Jones D, Kraus RM, Mosca L, Ockene I, Pasternak RC, Pearson P, Pfeffer MA, Staake RD, Taubert KA. AHA/ACC Scientific Statement: AHA/ACC guidelines for preventing heart attack and death in patients with atherosclerotic cardiovascular disease: 2001 update: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation.* 2001;104(13):1577-9.
14. Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1979;301(2):61-8.
15. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12(3):616-23.
16. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994;331(8):496-501.
17. Simard T, Hibbert B, Ramirez FD, Froeschl M, Chen YX, O'Brien ER. The evolution of coronary stents: a brief review. *Can J Cardiol.* 2014;30(1):35-45.
18. Singapore-medical-clinic. Arterial-diseases-treatment [Internet]. 2013 [Zitiert am 24.09.2018]. Abgerufen von: <http://www.singaporemedicalclinic.com/ckfinder/userfiles/images/Arteries%20Veins/Angioplasty.jpg>.
19. Weiss AJ, Zhao S, Tian DH, Taggart DP, Yan TD. A meta-analysis comparing bilateral internal mammary artery with left internal mammary artery for coronary artery bypass grafting. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013;2(4):390-400.
20. Desai ND, Cohen EA, Naylor CD, Fremes SE, Radial Artery Patency Study I. A randomized comparison of radial-artery and saphenous-vein coronary bypass grafts. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2302-9.
21. Suma H. Arterial grafts in coronary bypass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;5(3):141-5.

22. Ayoub S, Ferrari G, Gorman RC, Gorman JH, Schoen FJ, Sacks MS. Heart Valve Biomechanics and Underlying Mechanobiology. *Compr Physiol*. 2016;6(4):1743-80.
23. Mrsic Z, Hopkins SP, Antevil JL, Mullenix PS. Valvular Heart Disease. *Prim Care*. 2018;45(1):81-94.
24. Ewen S, Mahfoud F, Lauder L, Scheller B, Bohm M. Valvular heart disease in patients with chronic kidney disease. *Internist*. 2019. doi: 10.1007/s00108-019-00692-0.
25. Johnson NP, Zelis JM, Tonino PAL, Houthuizen P, Bouwman RA, Brueren GRG, Johnson DT, Koolen JJ, Korsten HHM, Wijnbergen IF, Zimmermann FM, Kirkeeide RL, Pijls NHJ, Gould KL. Pressure gradient vs. flow relationships to characterize the physiology of a severely stenotic aortic valve before and after transcatheter valve implantation. *Eur Heart J*. 2018;39(28):2646-55.
26. Li L, Xu J, He L, Peng L, Zhong Q, Chen L, Jiang Z. The role of autophagy in cardiac hypertrophy. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2016;48(6):491-500.
27. Bonios MJ, Kyrzopoulos S, Tsiapras D, Adamopoulos SN. Ultrasound guidance for volume management in patients with heart failure. *Heart Fail Rev*. 2019. doi: 10.1007/s10741-019-09863-5.
28. Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2015;29(1):1-6.
29. van der Does L, Lanter EAH, Teuwen CP, Mouws E, Yaksh A, Knops P, Kik C, Bogers AJJC, de Groot NMS. The Effects of Valvular Heart Disease on Atrial Conduction During Sinus Rhythm. *J Cardiovasc Transl Res*. 2019. doi: 10.1007/s12265-019-09936-8.
30. Akerstrom F, Barderas MG, Rodriguez-Padial L. Aortic stenosis: a general overview of clinical, pathophysiological and therapeutic aspects. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013;11(2):239-50.
31. Mol A, Smits AI, Bouten CV, Baaijens FP. Tissue engineering of heart valves: advances and current challenges. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(3):259-75.
32. Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(6):565-71.
33. Rost C, Flachskampf FA. Herzklappenerkrankungen. *CardioVasc*. 2014;14(4):29-36.
34. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(5):1218-22.
35. Iversen K, Ihlemann N, Gill SU, Madsen T, Elming H, Jensen KT, Bruun NE, Høfsten DE, Fursted K, Christensen JJ, Schultz M, Klein CF, Fosbøll EL, Rosenvinge F, Schönheyder HC, Køber L, Torp-Pedersen C, Helweg-Larsen J, Tønder N, Moser C, Bundgaard H. Partial Oral versus Intravenous Antibiotic Treatment of Endocarditis. *N Engl J Med*. 2019;380(5):415-24.
36. Ledwoch J, Thiele H. Treatment of asymptomatic aortic valve stenosis : Watchful waiting or early intervention? *Herz*. 2017;42(6):528-35.
37. Carabelleo BA. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *Curr Cardiol Rep*. 2011;13(3):173-4.
38. Goeddel LA, Serini J, Steyn JW, Evans AS, Dwarakanath S, Ramakrishna H, et al. Transcatheter Aortic Valve Replacements: Current Trends and Future Directions. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2019; 23(3)282-92.
39. Hoffmann G, Lutter G, Cremer J. Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(8):143-8.
40. Head SJ, Celik M, Kappetein AP. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. *Eur Heart J*. 2017;38(28):2183-91.
41. Zilla P, Brink J, Human P, Bezuidenhout D. Prosthetic heart valves: catering for the few. *Biomaterials*. 2008;29(4):385-406.
42. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool, Vereinigtes Königreich: Liverpool University Press; 1999.
43. Vroman L, Adams AL. Identification of absorbed protein films by exposure to antisera and water vapor. *J Biomed Mater Res*. 1969;3(4):669-71.
44. Vroman L, Adams AL. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surface Science*. 1969;16:438-46.
45. Lassen B, Malmsten M. Competitive protein adsorption at plasma polymer surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 1997;186(1):9-16.
46. Edmunds LH. Is prosthetic valve thrombogenicity related to design or material? *Tex Heart J*. 1996;23(1):24-7.
47. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681-703.
48. Lekshmi KM, Che HL, Cho CS, Park IK. Drug- and Gene-eluting Stents for Preventing Coronary Restenosis. *Chonnam Med J*. 2017;53(1):14-27.

49. Nef HM, Abdel-Wahab M, Achenbach S, Joner M, Levenson B, Mehilli J, Möllmann H, Thiele H, Zahn R, Zeus T, Elsässer A. Medikamentenfreisetzende Koronarstents/-scaffolds und medikamentenbeschichtete Ballonkatheter. *Der Kardiologe*. 2018;12(1):26-52.
50. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet J-P, Cremer J, Falk V, Filippatos G, Hamm C, Head SJ, Juni P, Kappetein AP, Kastrati A, Knuuti J, Landmesser U, Laufer G, Neumann FJ, Richter DJ, Schauerte P, Sousa Uva M, Stefanini GG, Taggart DP, Torracca L, Valgimigli M, Wijns W, Witkowski A. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*. 2014;35(37):2541-619.
51. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.
52. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr*. 2015;3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
53. Lahteenmaki M, Tenovuo J, Salo M, Perttinen J. Effects of open heart surgery on oral mucous host defence systems. *Acta Anaesth Scand*. 1997;41(7):837-42.
54. Salo M. Effects of Anesthesia and Surgery on the Immune-Response. *Acta Anaesth Scand*. 1992;36(3):201-20.
55. Chung PY, Toh YS. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis*. 2014;70(3):231-9.
56. Thornhill MH, Jones S, Prendergast B, Baddour LM, Chambers JB, Lockhart PB, Dayer MJ. Quantifying infective endocarditis risk in patients with predisposing cardiac conditions. *Eur Heart J*. 2018;39(7):586-95.
57. Cahill TJ, Prendergast BD. Risk of infective endocarditis after left-sided surgical valve replacement. *Eur Heart J*. 2018;39(28):2676-8.
58. Mostaghim AS, Lo HYA, Khardori N. A retrospective epidemiologic study to define risk factors, microbiology, and clinical outcomes of infective endocarditis in a large tertiary-care teaching hospital. *SAGE open medicine*. 2017;5. doi: 2050312117741772.
59. Erb S, Sidler JA, Elzi L, Gurke L, Battegay M, Widmer AF, Weisse M. Surgical and antimicrobial treatment of prosthetic vascular graft infections at different surgical sites: a retrospective study of treatment outcomes. *PLoS One*. 2014;9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0112947.
60. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *Benestent Study Group*. *N Engl J Med*. 1994;331(8):489-95.
61. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003;349(14):1315-23.
62. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(12):2584-91.
63. Yildiz M, Yildiz BS, Aydin E, Akin I. Stent thrombosis--myth and facts. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2014;14(3):231-4.
64. Chitkara K, Gershlick A. Second - versus First-generation Drug-eluting Stents. *J Interv Cardiol*. 2010;5(1):23-6.
65. Heublein B, Rohde R, Kaese V, Niemeyer M, Hartung W, Haverich A. Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? *Heart*. 2003;89(6):651-6.
66. Ormiston JA, Webster MW, Armstrong G. First-in-human implantation of a fully bioabsorbable drug-eluting stent: the BVS poly-L-lactic acid everolimus-eluting coronary stent. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007;69(1):128-31.
67. Wang PJ, Ferralis N, Conway C, Grossman JC, Edelman ER. Strain-induced accelerated asymmetric spatial degradation of polymeric vascular scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(11):2640-5.
68. Kjaergard HK, Tingleff J, Abildgaard U, Pettersson G. Recurrent endocarditis in silver-coated heart valve prosthesis. *J Heart Valve Dis*. 1999;8(2):140-2.

69. Hardman S, Cope A, Swann A, Bell PR, Naylor AR, Hayes PD. An in vitro model to compare the antimicrobial activity of silver-coated versus rifampicin-soaked vascular grafts. *Ann Vasc Surg.* 2004;18(3):308-13.
70. Gao H, Sandermann J, Prag J, Lund L, Lindholt JS. Prevention of primary vascular graft infection with silver-coated polyester graft in a porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39(4):472-7.
71. Lew W, Moore W. Antibiotic-impregnated grafts for aortic reconstruction. *Semin Vasc Surg.* 2011;24(4):211-9.
72. Fatima J, Duncan AA, de Grandis E, Oderich GS, Kalra M, Gloviczki P, Bower TC. Treatment strategies and outcomes in patients with infected aortic endografts. *J Vasc Surg.* 2013;58(2):371-9.
73. Herten M, Idelevich EA, Sielker S, Becker K, Scherzinger AS, Osada N, Torsello GB, Bisdas T. Vascular Graft Impregnation with Antibiotics: The Influence of High Concentrations of Rifampin, Vancomycin, Daptomycin, and Bacteriophage Endolysin HY-133 on Viability of Vascular Cells. *Med Sci Monit Basic Res.* 2017;23:250-7.
74. Radin EL, Swann DA, Weisser PA. Separation of a hyaluronate-free lubricating fraction from synovial fluid. *Nature.* 1970;228(5269):377-8.
75. Swann DA, Silver FH, Slayter HS, Stafford W, Shore E. The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem J.* 1985;225(1):195-201.
76. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, Jay GD, Stewart M, Wang H, Warman ML, Carpten JD. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest.* 2005;115(3):622-31.
77. Ikegawa S, Sano M, Koshizuka Y, Nakamura Y. Isolation, characterization and mapping of the mouse and human PRG4 (proteoglycan 4) genes. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;90(3-4):291-7.
78. Park DSJ, Regmi SC, Svystonyuk DA, Teng G, Belke D, Turnbull J, Guzzardi DG, Kang S, Cowman MK, Schmidt TA, Fedak PWM. Human pericardial proteoglycan 4 (lubricin): Implications for postcardiotomy intrathoracic adhesion formation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018.
79. Schmidt TA, Sullivan DA, Knop E, Richards SM, Knop N, Liu S, Sahin A, Darabad RR, Morrison S, Kam WR, Sullivan BD. Transcription, translation, and function of lubricin, a boundary lubricant, at the ocular surface. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(6):766-76.
80. Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL. Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res.* 2005;23(3):562-8.
81. Sun Y, Berger EJ, Zhao C, An KN, Amadio PC, Jay G. Mapping lubricin in canine musculoskeletal tissues. *Connect Tissue Res.* 2006;47(4):215-21.
82. Jay GD, Harris DA, Cha CJ. Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3)Gal-GalNAc oligosaccharides. *Glycoconjugate J.* 2001;18(10):807-15.
83. Abubacker S, Ponjevic D, Ham HO, Messersmith PB, Matyas JR, Schmidt TA. Effect of disulfide bonding and multimerization on proteoglycan 4's cartilage boundary lubricating ability and adsorption. *Connect Tissue Res.* 2016;57(2):113-23.
84. Flowers SA, Kalamajski S, Ali L, Bjorkman LI, Raj JR, Aspberg A, Karlsson NG, Jin C. Cartilage oligomeric matrix protein forms protein complexes with synovial lubricin via non-covalent and covalent interactions. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(9):1496-504.
85. Zappone B, Ruths M, Greene GW, Jay GD, Israelachvili JN. Adsorption, lubrication, and wear of lubricin on model surfaces: polymer brush-like behavior of a glycoprotein. *Biophys J.* 2007;92(5):1693-708.
86. Zappone B, Greene GW, Oroudjev E, Jay GD, Israelachvili JN. Molecular aspects of boundary lubrication by human lubricin: effect of disulfide bonds and enzymatic digestion. *Langmuir.* 2008;24(4):1495-508.
87. Greene GW, Duffy E, Shallan A, Wuethrich A, Paull B. Electrokinetic Properties of Lubricin Antiadhesive Coatings in Microfluidic Systems. *Langmuir.* 2016;32(7):1899-908.
88. Greene GW, Martin LL, Tabor RF, Michalczyk A, Ackland LM, Horn R. Lubricin: a versatile, biological anti-adhesive with properties comparable to polyethylene glycol. *Biomaterials.* 2015;53:127-36.
89. Aninwene GE, 2nd, Abadian PN, Ravi V, Taylor EN, Hall DM, Mei A, Jay GD, Goluch ED, Webster TJ. Lubricin: a novel means to decrease bacterial adhesion and proliferation. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(2):451-62.
90. Grünberg W. Arteriosklerose bei Wildtieren. *Klinische Wochenschrift.* 1965;43(9):479-88.

91. Hess RS, Kass PH, Van Winkle TJ. Association between diabetes mellitus, hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003;17(4):489-94.
92. Beaufriere H, Vet DM, Cray C, Ammersbach M, Tully TN, Jr. Association of plasma lipid levels with atherosclerosis prevalence in psittaciformes. *J Avian Med Surg*. 2014;28(3):225-31.
93. Gustavsen KA, Stanhope KL, Lin AS, Graham JL, Havel PJ, Paul-Murphy JR. Effects of Exercise on the Plasma Lipid Profile in Hispaniolan Amazon Parrots (*Amazona Ventralis*) with Naturally Occurring Hypercholesterolemia. *J Zoo Wildl Med*. 2016;47(3):760-9.
94. Bavelaar FJ, Beynen AC. Severity of atherosclerosis in parrots in relation to the intake of alpha-linolenic acid. *Avian Dis*. 2003;47(3):566-77.
95. Griner LA. Pathology of zoo animals. A review of necropsies conducted over a fourteen-year period at the San Diego Zoo and San Diego Wild Animal Park. San Diego, Kalifornien: Zoological Society of San Diego; 1983.
96. Fricke C, Schmidt V, Cramer K, Krautwald-Junghanns ME, Dorrestein GM. Characterization of Atherosclerosis by Histochemical and Immunohistochemical Methods in African Grey Parrots (*Psittacus erithacus*) and Amazon Parrots (*Amazona* spp.). *Avian Dis*. 2009;53(3):466-72.
97. Beaufriere H, Ammersbach M, Reavill DR, Garner MM, Heatley JJ, Wakamatsu N, Nevarez JG, Tully TN. Prevalence of and risk factors associated with atherosclerosis in psittacine birds. *J Am Vet Med Assoc*. 2013;242(12):1696-704.
98. Bavelaar FJ, Beynen AC. Atherosclerosis in parrots. A review. *Vet Q*. 2004;26(2):50-60.
99. Alvarenga RR, Zangeronimo MG, Pereira LJ, Rodrigues PB, Gomide EM. Lipoprotein metabolism in poultry. *World Poultry Sci J*. 2011;67(3):431-40.
100. Menazza S, Murphy E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2016;118(6):994-1007.
101. Luo F, Guo Y, Ruan GY, Peng R, Li XP. Estrogen lowers triglyceride via regulating hepatic APOA5 expression. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):72.
102. Veseli BE, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, De Mayer GRY. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816:3-13.
103. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1104-15.
104. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscl Throm Vas*. 2000;20(11):2336-45.
105. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein-E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in Es Cells. *Cell*. 1992;71(2):343-53.
106. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92(2):883-93.
107. Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases*. 2014;2(5):126-32.
108. Fan J, Kitajima S, Watanabe T, Xu J, Zhang J, Liu E, Chen YE. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol Ther*. 2015;146:104-19.
109. Baumgartner C, Brandl J, Munch G, Ungerer M. Rabbit models to study atherosclerosis and its complications - Transgenic vascular protein expression in vivo. *Prog Biophys Mol Biol*. 2016;121(2):131-41.
110. Madhumathi BG, Venkataranganna MV, Gopumadhavan S, Rafiq M, Mitra SK. Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *Indian J Exp Biol*. 2006;44(3):203-8.
111. Bocan TMA, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The Relationship between the Degree of Dietary-Induced Hypercholesterolemia in the Rabbit and Atherosclerotic Lesion Formation. *Atherosclerosis*. 1993;102(1):9-22.
112. Fuster JJ, Castillo AI, Zaragoza C, Ibanez B, Andres V. Animal Models of Atherosclerosis. *Prog Mol Biol Transl*. 2012;105:1-23.
113. Watanabe Y. Serial Inbreeding of Rabbits with Hereditary Hyperlipidemia (Whhl-Rabbit) - Incidence and Development of Atherosclerosis and Xanthoma. *Atherosclerosis*. 1980;36(2):261-8.
114. Niimi M, Yang D, Kitajima S, Ning B, Wang C, Li S, Liu E, Zhang J, Eugene Chen Y, Fan J. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2016;245:187-93.

115. Shim J, Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Bentzon JF. Large animal models of atherosclerosis--new tools for persistent problems in cardiovascular medicine. *J Pathol.* 2016;238(2):257-66.
116. Getz GS, Reardon CA. Animal Models of Atherosclerosis. *Arterioscl Throm Vas.* 2012;32(5):1104-+.
117. Karstrup CC, Jensen HE, Aalbaek B, Leifsson PS, Boye M, Agerholm JS. Endocarditis-associated brain lesions in slaughter pigs. *J Comp Pathol.* 2011;144(4):289-95.
118. Haas B, Grenier D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Med Mal Infect.* 2018;48(3):159-66.
119. Sharma A, Cote AT, Hosking MCK, Harris KC. A Systematic Review of Infective Endocarditis in Patients With Bovine Jugular Vein Valves Compared With Other Valve Types. *JACC Cardiovasc Interv.* 2017;10(14):1449-58.
120. Erol E, Jackson C, Bai Y, Sells S, Locke S, Kosoy M. *Bartonella bovis* isolated from a cow with endocarditis. *J Vet Diagn Invest.* 2013;25(2):288-90.
121. Garncarz M, Parzeniecka-Jaworska M, Szalus-Jordanow O. Congenital heart defects in dogs: A retrospective study of 301 dogs. *Med Weter.* 2017;73(10):651-6.
122. Petric AD, Cvetko S. Aortic Stenosis in Dogs: Clinical Characteristics and Survival in 80 Cases. *Slov Vet Res.* 2009;46(4):125-31.
123. Baumgartner C, Glaus TM. Erworbene Herzerkrankungen beim Hund: Eine retrospektive Analyse Schweizer Archiv für Tierheilkunde. 2004;146(9):423 - 30.
124. Dennis C, Spreng DS, Jr., Nelson GE, Karlson KE, Nelson RM, Thomas JV, Eder WP, Varco RL. Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs; an apparatus applicable to human patients, and application to one case. *Ann Surg.* 1951;134(4):709-21.
125. Gollan F, Blos P, Schuman H. Exclusion of heart and lungs from circulation in the hypothermic, closed-chest dog by means of a pump-oxygenator. *J Appl Physiol.* 1952;5(4):180-90.
126. Monemian Esfahani A, Zhao W, Chen JY, Huang C, Xi N, Xi J, Yang R. On the Measurement of Energy Dissipation of Adhered Cells with the Quartz Microbalance with Dissipation Monitoring. *Anal Chem.* 2018;90(17):10340-9.
127. Wang G, Dewilde AH, Zhang J, Pal A, Vashist M, Bello D, Marx KA, Braunhut SJ, Therrien JM. A living cell quartz crystal microbalance biosensor for continuous monitoring of cytotoxic responses of macrophages to single-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol.* 2011;8:4. doi: 10.1186/1743-8977-8-4.
128. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für physik.* 1959;155(2):206-22.
129. Tarnapolsky A, Freger V. Modeling QCM-D Response to Deposition and Attachment of Microparticles and Living Cells. *Anal Chem.* 2018;90(23):13960-8.
130. Mohan T, Spirk S, Kargl R, Doliska A, Ehmann HMA, Kostler S, Ribitsch V, Stana-Kleinschek K. Watching cellulose grow - Kinetic investigations on cellulose thin film formation at the gas-solid interface using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D). *Colloid Surface A.* 2012;400:67-72.
131. Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol.* 2003;63(15):2223-53.
132. Schiffman JD, Schauer CL. A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polym Rev.* 2008;48(2):317-52.
133. Shin YM, Hohman MM, Brenner MP, Rutledge GC. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer.* 2001;42(25):9955-67.
134. Haider A, Haider S, Kang IK. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem.* 2018;11(8):1165-88.
135. Stang K, Krajewski S, Neumann B, Kurz J, Post M, Stoppelkamp S, Fenrich S, Avci-Adali M, Armbruster D, Schlensak C, Burgener IA, Wendel HP, Walker T. Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;42:422-8.
136. Krajewski S, Neumann B, Kurz J, Perle N, Avci-Adali M, Cattaneo G, Wendel HP. Preclinical evaluation of the thrombogenicity and endothelialization of bare metal and surface-coated neurovascular stents. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36(1):133-9.
137. Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ. Molecules in focus - Thrombin. *Int J Biochem Cell B.* 1998;30(6):641-6.

138. Rinder HM, Snyder EL, Bonan JL, Napychank PA, Malkus H, Smith BR. Activation in Stored Platelet Concentrates - Correlation between Membrane Expression of P-Selectin, Glycoprotein IIb/IIIa, and Beta-Thromboglobulin Release. *Transfusion*. 1993;33(1):25-9.
139. Yasuda M, Takeuchi K, Hiruma M, Iida H, Tahara A, Itagane H, Toda I, Akioka K, Teragaki M, Oku H, Kanayama Y, Takeda T, Kolb WP, Tamerius JD. The complement system in ischemic heart disease. *Circulation*. 1990;81(1):156-63.
140. Reinhardt A, Haidl G, Schill WB. Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment. *Andrologia*. 1997;29(4):187-92.
141. Ahmad I, Kan CW. A Review on Development and Applications of Bio-Inspired Superhydrophobic Textiles. *Materials (Basel)*. 2016;9(11). doi: 10.3390/ma9110892.
142. Gundersen H, Leinaas HP, Thaulow C. Surface Structure and Wetting Characteristics of Collembola Cuticles. *Plos One*. 2014;9(2).doi: 10.1371/journal.pone.0086783.
143. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
144. Tian L, Chang A, Melancon MP. Exploring gold nanoparticle interactions with proteins and the tumor microenvironment in biological systems. *Transl Cancer Res*. 2017;6:309-12.
145. Krajewski S, Pucek R, Panacek A, Avci-Adali M, Nolte A, Straub A, Zboril R, Wendel HP, Kvitek L. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7460-8.
146. Chang DP, Abu-Lail NI, Guilak F, Jay GD, Zauscher S. Conformational mechanics, adsorption, and normal force interactions of lubricin and hyaluronic acid on model surfaces. *Langmuir*. 2008;24(4):1183-93.
147. Marx KA. Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules*. 2003;4(5):1099-120.
148. van Oeveren W. Obstacles in haemocompatibility testing. *Scientifica (Cairo)*. 2013. doi: 10.1155/2013/392584.
149. PMN Elastase ELISA [Gebrauchsinformation]. Kiel, Deutschland: Demeditec Diagnostics GmbH; 2016.
150. Asserachrom®  $\beta$ -TG [Gebrauchsinformation]. Parsippany, New Jersey: Diagnostica Stago Inc.; 2015
151. Enzygnost TAT micro [Gebrauchsinformation]. Marburg, Deutschland: Siemens Healthcare; 2015.
152. MicroVue Sc5b-9 Plus EIA [Gebrauchsinformation]. San Diego, Kalifornien: Quidel Corporation; 2015.
153. Schuller-Ravoo S, Zant E, Feijen J, Grijpma DW. Preparation of a designed poly(trimethylene carbonate) microvascular network by stereolithography. *Adv Healthc Mater*. 2014;3(12):2004-11.
154. Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J Control Release*. 2003;89(2):341-53.
155. Kenawy ER, Bowlin GL, Mansfield K, Layman J, Simpson DG, Sanders EH, Wnek GE. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J Control Release*. 2002;81(1-2):57-64.
156. Zeng J, Xu X, Chen X, Liang Q, Bian X, Yang L, Jing X. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *J Control Release*. 2003;92(3):227-31.
157. Zong XH, Kim K, Fang DF, Ran SF, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*. 2002;43(16):4403-12.
158. Ji W, Yang F, van den Beucken JJ, Bian Z, Fan M, Chen Z, Jansz JA. Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning. *Acta Biomater*. 2010;6(11):4199-207.
159. Sanders EH, Kloefkorn R, Bowlin GL, Simpson DG, Wnek GE. Two-phase electrospinning from a single electrified jet: Microencapsulation of aqueous reservoirs in poly(ethylene-co-vinyl acetate) fibers. *Macromolecules*. 2003;36(11):3803-5.
160. Chew SY, Wen J, Yim EKF, Leong KW. Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules*. 2005;6(4):2017-24.
161. Qiu YJ, Yu J. Synthesis of titanium dioxide nanotubes from electrospun fiber templates. *Solid State Commun*. 2008;148(11-12):556-8.



162. Vijayakumar GNS, Devashankar S, Rathnakumari M, Sureshkumar P. Synthesis of electrospun ZnO/CuO nanocomposite fibers and their dielectric and non-linear optic studies. *J Alloy Compd.* 2010;507(1):225-9.
163. Whitehead KA, Benson PS, Verran J. The detection of food soils on stainless steel using energy dispersive X-ray and Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling.* 2011;27(8):907-17.
164. Ahmed FE, Lalia BS, Hashaikh R. A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications. *Desalination.* 2015;356:15-30.
165. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of electrostatics.* 1995;35(2-3):151-60.
166. Nizheradze K. Concanavalin A, but not glycosylated albumin, increases subendothelial deposition of von Willebrand factor in vitro. *Endothelium.* 2006;13(4):245-8.
167. Jimenez N, Krouwer VJ, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology.* 2013;65(1):1-14.
168. Aninwene GE, 2nd, Yang Z, Ravi V, Jay GD, Webster TJ. Lubricin as a novel nanostructured protein coating to reduce fibroblast density. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3131-5.
169. Olsson ALJ, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Influence of Cell Surface Appendages on the Bacterium-Substratum Interface Measured Real-Time Using QCM-D. *Langmuir.* 2009;25(3):1627-32.
170. Olsson ALJ, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Acoustic sensing of the bacterium-substratum interface using QCM-D and the influence of extracellular polymeric substances. *J Colloid Interf Sci.* 2011;357(1):135-8.
171. van der Mei HC, Rustema-Abbing M, de Vries J, Busscher HJ. Bond strengthening in oral bacterial adhesion to salivary conditioning films. *Appl Environ Microb.* 2008;74(17):5511-5.
172. Pomorska A, Shchukin D, Hammond R, Cooper MA, Grundmeier G, Johannsmann D. Positive Frequency Shifts Observed Upon Adsorbing Micron-Sized Solid Objects to a Quartz Crystal Microbalance from the Liquid Phase. *Analytical Chemistry.* 2010;82(6):2237-42.
173. Kleshchanok D, Lang PR. Steric repulsion by adsorbed polymer layers studied with total internal reflection microscopy. *Langmuir.* 2007;23(8):4332-9.
174. Raviv U, Giasson S, Kampf N, Gohy JF, Jerome R, Klein J. Lubrication by charged polymers. *Nature.* 2003;425(6954):163-5.
175. Turkova J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;722(1-2):11-31.
176. Shintani H. Ethylene Oxide Gas Sterilization of Medical Devices. *Biocontrol Sci.* 2017;22(1):1-16.
177. Bernhardt A, Wehrl M, Paul B, Hochmuth T, Schumacher M, Schütz K, Gelinsky M. Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. *PLoS One.* 2015;10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0129205.
178. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol.* 2016;8(4):355-69.
179. McDevitt JJ, Rudnick SN, Radonovich LJ. Aerosol susceptibility of influenza virus to UV-C light. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(6):1666-9.
180. Yin R, Dai T, Avci P, Jorge AE, de Melo WC, Vecchio D, Huang YY, Gupta A, Hamblin MR. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(5):731-62.
181. Haughton PN, Lyng JG, Cronin DA, Morgan DJ, Fanning S, Whyte P. Efficacy of UV light treatment for the microbiological decontamination of chicken, associated packaging, and contact surfaces. *J Food Prot.* 2011;74(4):565-72.
182. De Reu K, Grijspeerdt K, Herman L, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, Putirulan FF, Bolder NM. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Lett Appl Microbiol.* 2006;42(2):144-8.
183. Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):307-26.
184. Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, Randolph TW. Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice. *Pharmaceut Res.* 1997;14(8):969-75.
185. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res.* 1998;40(2):324-35.
186. Davies HS, Singh P, Deckert-Gaudig T, Deckert V, Rousseau K, Ridley CE, Dowd SE, Doig AJ, Pudney PD, Thornton DJ, Blanch EW. Secondary Structure and Glycosylation of Mucus Glycoproteins by Raman Spectroscopies. *Anal Chem.* 2016;88(23):11609-15.

187. Johannessen C, Pendrill R, Widmalm G, Hecht L, Barron LD. Glycan structure of a high-mannose glycoprotein from Raman optical activity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(23):5349-51.
188. Ashton L, Pudney PD, Blanch EW, Yakubov GE. Understanding glycoprotein behaviours using Raman and Raman optical activity spectroscopies: characterising the entanglement induced conformational changes in oligosaccharide chains of mucin. *Adv Colloid Interface Sci.* 2013;199-200:66-77.

## **Eigene Publikationen**

Sehr, S. (2018, September): Improvement of the hemocompatibility of blood-contacting materials using Lubricin. Poster; 11<sup>th</sup> Doctoral Symposium "Biomedical Sciences" Veterinary Medicine, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Plendl für die Annahme als Doktorandin am Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und die umfassende Betreuung bedanken.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Wendel, der mir die Möglichkeit gab, meine Versuche im Forschungslabor der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen durchzuführen sowie für die Bereitstellung aller Materialien und Geräte.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. habil. Krajewski für die hervorragende Betreuung und die umfangreiche Unterstützung bei allen Fragen und Problemen. Ohne die wissenschaftlichen Anregungen und das stets offene Ohr wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des klinischen Forschungslabors der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie für die hervorragende Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre innerhalb des Teams.

Besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Tatjana Michl, Frau Julia Kurz, Frau Hanna Haag, Frau Sandra Bäurle und Herrn Bernd Neumann für die Einweisung und Unterstützung bei meinen Versuchen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich auf meinem Weg stets unterstützt haben.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Silvia Sehr

Berlin, den 17.02.2020













**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-046-2