

# DISSERTATION

Biosynthetische Cellulose - Neuartige Barriere gegen Biofilmbildung auf Ventricular Assist Device – Drivelines / Biosynthetic Cellulose – Novel barrier against biofilm formation on ventricular assist device drivelines

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julius Elias Kaemmel

Erstbetreuer: Herr Prof. Dr. med. Christoph Starck

Datum der Promotion: 30.06.2024



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	1
Einleitung.....	1
Methoden.....	1
Ergebnisse.....	2
Schlussfolgerung.....	2
Abstract.....	3
Introduction.....	3
Methods.....	3
Results.....	3
Conclusion.....	4
1 Einleitung.....	5
1.1 Epidemiologie und Kosten der Herzinsuffizienz.....	5
1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz.....	5
1.3 Diagnostik und Klassifikation der Herzinsuffizienz.....	5
1.4 Therapie der Herzinsuffizienz.....	8
1.5 Herzunterstützungssysteme (Ventricular assist device, VAD).....	8
1.6 VAD spezifische Infektionen und Driveline-Infektionen.....	10
1.7 Bildung von Biofilm auf LVAD-Drivelines.....	16
1.8 Fremdkörperreaktion - Foreign body reaction.....	18
1.9 Zusammenspiel zwischen Implantat-Infektionen und der Fremdkörperreaktion.....	20
1.10 Biosynthetische Cellulose – Reduktion der Fremdkörperreaktion.....	20
1.11 Fragestellung.....	21
2 Methodik.....	22

2.1 Mikrostrukturierte biosynthetische Cellulose (BC).....	22
2.2 In-vitro-Permeationsversuch .....	22
2.3 Tierversuch (in-vivo-Experiment) .....	23
2.4 Versuchstiere.....	23
2.5 Postoperative Wundkontrollen .....	25
2.6 Perioperatives Management .....	26
2.7 Durchführung der Implantation .....	27
2.8 Explantation der Implantate und Gewinnung von mikrobiologischen Proben.....	30
2.9 Mikrobiologische Untersuchungen .....	31
2.10 Statistik und genutzte Software.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 In-vitro-Permeationsversuch .....	33
3.2 In-vivo-Versuch (Tierversuch).....	33
4 Diskussion .....	37
4.1 Relevanz der Ergebnisse für klinische Praxis und zukünftige Forschung.....	40
4.2 Stärken und Schwächen der Studie .....	41
5 Schlussfolgerungen .....	44
Literaturverzeichnis.....	45
Eidesstattliche Versicherung .....	50
Anteilerklärung an der erfolgten Publikation .....	51
Druckexemplar der Publikation - On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines.....	53
Lebenslauf .....	63
Komplette Publikationsliste .....	66
Danksagung .....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 INTERMACS-Klassifikation zur Einteilung der physischen Beeinträchtigung von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz .....	7
--	---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Stadien ascendierender Driveline-Infektionen.....	13
Abbildung 2 Darstellung einer Driveline-Infektion im PET-CT. ....	14
Abbildung 3 Beschichtung der Driveline-Außenhülle mit biosynthetischer Cellulose. ....	28
Abbildung 4 Implantationsstelle. ....	29
Abbildung 5 Probenaufteilung in den Versuchsgruppen.....	35
Abbildung 6 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung. ....	36
Abbildung 7 In-vitro-Permeationsversuch. ....	39

## Abkürzungsverzeichnis

EF: ejection fraction, Ejektionsfraktion

NYHA-Klassifikation: New York Heart Association classification, New York Heart Association Klassifikation

VAD: ventricular assist device, Ventrikuläres Herzunterstützungssystem

LVAD: left ventricular assist device, linksventrikuläres Herzunterstützungssystem

CF: continuous flow, kontinuierlicher Blutfluss

DT: destination therapy, dauerhafte Therapie

FBR: foreign body reaction, Fremdkörperreaktion

BC: biosynthesized cellulose, biosynthetische Cellulose

s.d.m.: silicone driveline mantle, Silikon-Driveline-Mantel

B-s.d.m.: bare-s.d.m, Kontroll-s.d.m. ohne biosynthetische Cellulose

BC-s.d.m.: biosynthetic cellulose-s.d.m., mit biosynthetischer Cellulose beschichteter s.d.m.

BCB-s.d.m.: BC-deprived bare-s.d.m., s.d.m. nachdem die Celluloseummantelung abgelöst wurde

## Zusammenfassung

### Einleitung

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit und geht in fortgeschrittenen Stadien mit einer schlechten Prognose einher. Die Ultima-Ratio bleibt weiterhin eine Herztransplantation. Aufgrund des anhaltenden Mangels von Spenderorganen, stellen linksventrikuläre Unterstützungssysteme eine wichtige Alternative dar. Aktuell verfügbare Geräte sind für einen gesicherten Energie- und Informationstransfer auf ein Verbindungskabel zur Controller-Einheit – eine sog. Driveline – angewiesen. Infektionen der Driveline, welche sich entlang des subkutanen Tunnels bis zum Mediastinum und damit zur Pumpeneinheit ausbreiten, sind weiterhin eine Hauptkomplikation während der Unterstützung mit diesen Systemen. Biosynthetische Cellulose zeichnet sich durch seine hohe Biokompatibilität aus und stellt aufgrund seiner geringen Porosität eine theoretische Barriere gegenüber der Durchwanderung von Pathogenen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Barriere für eine bakterielle Durchwanderung einer oberflächenveränderten biosynthetischen Cellulose und deren Bedeutung in der Prävention einer Driveline-Kontamination durch Pathogene in einem Tiermodell untersucht.

### Methoden

Primär wurde *in vitro* die Durchlässigkeit der Cellulose für fluoreszierende Mikropartikel in einem Zwei-Kammer-System untersucht, gefolgt von der Evaluation der Barriere gegenüber bakterieller Permeation. Nach Charakterisierung der Barrierefunktion *in vitro*, wurden die Außenhüllen von Drivelines mittels derselben Cellulose-Membranen ummantelt und anschließend die *in-vivo*-Barrierefunktion getestet. Insgesamt wurden 16 Kontrollen und 16 Cellulose-ummantelte Driveline-Außenhüllen in 8 Ziegen implantiert. Nach einer Implantationsdauer von 6 Wochen (4 Tiere) und 12 Wochen (4 Tiere) wurden die implantierten Driveline-Außenhüllen mitsamt umgebendem Gewebe explantiert. Die Driveline-Oberfläche wurde anschließend mittels Sonikation auf bakterielle Kontamination hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie wurden mittels deskriptiver Statistik ausgewertet.



## **Ergebnisse**

Die untersuchte Cellulose stellt eine Barriere für Mikropartikel von 2 µm Größe dar und ist auch für Staph. aureus impermeabel. Auch in-vivo konnte diese Barrierefunktion reproduziert werden. Obwohl die Cellulose-beschichteten Implantate insgesamt häufiger infiziert waren als die Kontrollen, verhinderte die Cellulose-Membran in einer relevanten Anzahl der Fälle die Kolonisation der darunterliegenden Driveline-Außenhülle.

## **Schlussfolgerung**

Die durchgeführte Studie liefert erste Hinweise darauf, dass die verwendete oberflächenmodifizierte Cellulose-Membran eine Barrierefunktion gegenüber der bakteriellen Kolonisation der Driveline-Oberfläche besitzt. Zusammen mit der Möglichkeit, die biosynthetische Cellulose mit antibiotischen Wirkstoffen zu beladen, stellt die Barrierefunktion der untersuchten Cellulose eine neuartige Möglichkeit dar, in der Zukunft die Infektion von Herzunterstützungssystemen zu verhindern.

## Abstract

### Introduction

Chronic heart failure is one of the most common health conditions worldwide and is accompanied by a poor prognosis in a more advanced state. Heart transplantation remains the gold standard therapy in patients with terminal heart failure despite optimal medical and device therapy. Due to the ongoing organ donor shortage the use of left ventricular assist devices has been established as a bridge-to-transplant or as an alternative in the treatment of end stage heart failure. Available and approved state of the art systems rely on a continuous power and information transfer via an electrical cable to the controller unit – the so called driveline. Infection of the driveline are a main complication during the support with these systems and continuously endanger the life of the patient, since the pathogens are able to ascend along the driveline to the pump and therefore into the mediastinum. Biosynthesized cellulose is characterized as highly biocompatible and due to its low porosity as impermeable for bacteria. This study evaluates the barrier function against bacterial permeation and furthermore the prevention of driveline contamination in an animal trial.

### Methods

In a first experiment the permeability of the cellulose for fluorescing microparticles was evaluated with a custom designed two chamber system, followed by evaluation of the barrier against bacterial permeation. After evaluation of the barrier function in vitro, the outer sheaths of drivelines were wrapped with the cellulose membranes and afterwards the in-vivo barrier function tested. In total 16 cellulose covered driveline mantles and 16 control driveline mantles were implanted in 8 goats. After being left in situ for 6- (4 animals) and 12-weeks, the implants and surrounding tissue were explanted. Sonication was used to evaluate the driveline surface for bacterial contamination. Results were analyzed using descriptive statistics.

### Results

The evaluated biosynthetic cellulose presented to behave as a barrier for microparticles with a size of at least 2  $\mu\text{m}$  and is also impermeable upon inoculation with *Staph. aureus*.

This function as a barrier could be reproduced in-vivo. Despite higher colonization rates upon cellulose-covered driveline mantles, in a relevant number of cases the underlying driveline surface was colonization free while the cellulose was contaminated.

## **Conclusion**

The performed study represents first evidence that the surface-modified cellulose acts as an impermeable barrier against bacteria and prevents the colonization of the driveline surface. Taken together with the possibility of loading the biosynthesized cellulose with antibiotic substances, the barrier function evaluated in this study presents a novel strategy to reduce the rate of ventricular assist device infections caused by driveline contamination in the future.

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Kosten der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz betrifft circa 65 Millionen Menschen weltweit.<sup>1</sup> In westlichen Gesellschaften wie den USA oder Deutschland, befindet sich die Prävalenz dieser Krankheit in einem Bereich von 1-2%.<sup>2,3</sup> Mit zunehmendem Alter der Menschen wird die Prävalenz dieses Krankheitsbildes weiter zunehmen. Zusätzlich sind die hohen Kosten für die Versorgung der betroffenen Patienten eine große ökonomische Last für Gesundheitssysteme weltweit. Die jährlichen direkten und indirekten Kosten dieser Erkrankung werden auf 108 Mrd. Dollar geschätzt.<sup>4</sup> In Deutschland kostet die Versorgung eines Patienten mit Herzinsuffizienz jährlich circa 25 000 Euro.<sup>5</sup>

## 1.2 Ätiologie der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz resultiert aus der Schädigung des Herzmuskels und dem damit verbundenen Verlust an Myozyten. In der Folge kommt es zu einer eingeschränkten Funktion des Herzmuskels und damit zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzens. Häufige Ursachen für Herzinsuffizienz sind die Koronare Herzerkrankung und die arterielle Hypertonie. Darüber hinaus kann die Herzschwäche die Folge von Kardiomyopathien, Myokarditiden, Herzklappenerkrankungen, Arrhythmien oder Toxinen sein.<sup>6</sup>

## 1.3 Diagnostik und Klassifikation der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, welches durch eine inadäquate Pumpfunktion des Herzens bedingt ist. Je nach betroffener Herzkammer wird die Herzinsuffizienz in eine Linksherz-, Rechtsherz- oder Globalherzinsuffizienz eingeteilt. Im Falle der Globalherzinsuffizienz sind beide Kammern gleichzeitig betroffen. Am häufigsten manifestiert sich die Herzinsuffizienz primär am linken Ventrikel. Die Rechtsherzinsuffizienz ist dann meist eine Folgeerscheinung der Erkrankung des linken Herzens.

Klinisch wird die Linksherzinsuffizienz sowohl mittels der subjektiven NYHA-Klassifikation in die Kategorien I (objektiver Nachweis einer kardialen Dysfunktion ohne Symptome) bis Kategorie IV (klinische Symptome der Herzinsuffizienz bereits in Ruhe) eingeteilt als auch anhand der in der Echokardiographie gemessenen Herzleistung (Ejektionsfraktion, EF).

Je nach linksventrikulärer EF werden entsprechend der 2021 Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) drei unterschiedliche Typen der Linksherzinsuffizienz klassifiziert: Herzinsuffizienz mit reduzierter EF ( $\leq 40\%$ ) (heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF), Herzinsuffizienz mit mäßig eingeschränkter EF (41-49%) (heart failure with mildly reduced ejection fraction, HFmrEF) und Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer EF ( $\geq 50\%$ ), aber zusätzlichen klinischen Herzinsuffizienzsymptomen, objektiver kardialer Dysfunktion und pathologischen Laborwerten typisch für eine Herzinsuffizienz (heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF).<sup>2</sup>

Darüber hinaus können Patienten mit hochgradiger Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) weiter in sieben unterschiedliche Patientenkohorten unterteilt werden – entsprechend der sogenannten INTERMACS-Klassifikation (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support), wie in Tabelle 1 dargestellt. Diese Klassifikation ist ein wichtiges Instrument bei der Entscheidung, welche Patienten mit einem mechanischen Kreislaufsystem therapiert werden sollten.<sup>7</sup>

Tabelle 1 INTERMACS-Klassifikation zur Einteilung der physischen Beeinträchtigung von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz

INTER-MACS Profil	Kurzbeschreibung	Definition
1	„Crash and Burn“	Kritischer kardiogener Schock
2	„Sliding on inotropes“	Verschlechterung des Zustandes trotz inotroper Unterstützung
3	„Dependent stability“	Hämodynamische Stabilität mit inotroper Unterstützung und/oder temporärer mechanischer Kreislaufunterstützung, Weaning nicht möglich
4	„Frequent flyer“	Phasen ohne inotrope Unterstützung möglich, fluktuierende hohe Dosen an Diuretika, es kommt ohne Unterstützung zu Phasen kardialer Dekompensation, in Ruhe symptomatisch
5	„Housebound“	Keine physische Anstrengung möglich, jedoch in Ruhe stabil
6	„Walking wounded“	Nur leichte physische Belastung möglich, keine Symptomatik in Ruhe
7	„Placeholder“	NYHA III ohne akute kardiale Dekompensationen

**INTERMACS: Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support; adaptiert von Stevenson et al.<sup>7</sup> und 2021 ESC Guidelines<sup>2</sup>**

Der diagnostische Algorithmus, der in den Leitlinien 2021 der ESC vorgesehen ist, besteht aus einer Kombination der Beurteilung der Klinik des Patienten, einem abnormalen EKG, Laborergebnissen der natriuretischen Peptide (NT-pro BNP oder BNP) und dem Ergebnis einer echokardiographischen Untersuchung.<sup>2</sup> Diese diagnostische Vorgehensweise erlaubt die sichere Zuordnung der Patienten zu einer der drei zuvor dargestellten

Patientengruppen mit Linksherzinsuffizienz oder den Ausschluss der Differenzialdiagnose Herzinsuffizienz. Typischerweise präsentieren sich die Patienten mit einer Kombination aus Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, typischen Symptomen der Herzschwäche wie Atemnot, Unterschenkelödemen, Nykturie oder anderen klinischen Auffälligkeiten wie gestaute Jugularvenen und pulmonalen Rasselgeräuschen. Im Anschluss an die korrekte klinische Diagnose der Patienten muss die Ursache der Herzinsuffizienz genauer untersucht werden, um den korrekten Therapieansatz zu wählen.

#### **1.4 Therapie der Herzinsuffizienz**

Die Standardbehandlung einer Herzinsuffizienz besteht aus einer Kombination der Behandlung der Ursache der Herzinsuffizienz (z.B. Koronarrevaskularisation bei ischämischer Kardiomyopathie) und der optimalen medikamentösen Behandlung der Herzschwäche. Die medikamentöse Standardtherapie der chronischen Herzinsuffizienz besteht aus einer Kombinationstherapie mit  $\beta$ -Blockern, Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor, Aldosteronantagonisten und SGLT2-Hemmern. Darüber hinaus kann in bestimmten Fällen eine invasive Therapie mittels kardialer Resynchronisationstherapie (cardiac resynchronization therapy, CRT) eingeleitet und damit die Herzleistung gesteigert werden. Eine Herztransplantation stellt die Ultima Ratio der Therapie der Herzinsuffizienz dar. Aufgrund der Organknappheit, kommen nur hochgradig selektierte Patienten für eine Transplantation in Frage. Um die Wartezeit zu überbrücken oder um Patienten ausreichend für eine Organ-Anwärterschaft zu stabilisieren, werden zunehmend mehr linksventrikuläre Unterstützungssysteme (left ventricular assist devices; L-VADs) genutzt.

#### **1.5 Herzunterstützungssysteme (Ventricular assist device, VAD)**

Herzunterstützungssysteme (VADs) sind medizinische Geräte, die in der Lage sind, die Pumpfunktion des Herzens zu unterstützen. Je nachdem welcher Ventrikel unterstützt wird, unterscheidet man zwischen linksventrikulären-, rechtsventrikulären oder in seltenen Fällen biventrikulären VADs. Durch die hohe Prävalenz der Linksherzinsuffizienz werden die meisten VADs als linksventrikuläre Herzunterstützungssysteme (left ventricular assist device, LVAD) implantiert, um die zu schwache linke Herzkammer zu unterstützen. Indikationen für die Therapie mit LVADs reichen von „Bridge to Recovery“ - mit dem Ziel, dass das Unterstützungssystem nach Erholung der Pumpleistung des Ventrikels

wieder zu explantieren - über „Bridge to Transplantation“ bis hin zur „Destination Therapy“ (DT) für Patienten, die einer Herztransplantation nicht zugeführt werden können. Entsprechend der aktuellen ESC Leitlinie für die Therapie der Herzinsuffizienz kommt eine Therapie mit LVADs für Patienten in Frage, die trotz optimaler medikamentöser Therapie an einer schweren, symptomatischen Herzinsuffizienz leiden, keine schwere rechtsventrikuläre Dysfunktion aufweisen, einen stabilen sozialen Rückhalt haben und es keine Kontraindikationen für die Therapie gibt. Darüber hinaus müssen die Patienten ein weiteres Charakteristikum aufweisen, wie beispielsweise eine hochgradig eingeschränkte EF, Unfähigkeit zu physischer Anstrengung, multiple Hospitalisierung für kardiale Dekompensationen, Abhängigkeit von inotropen Substanzen, Therapie mit einem temporären Kreislaufunterstützungssystem, zunehmender Dysfunktion von Endorganen durch ein manifestes low cardiac output Syndrom und die damit einhergehende Malperfusion der Endorgane. Typische Kontraindikationen für die Implantation von LVADs sind die Unmöglichkeit einer dauerhaften Antikoagulation, schwere Nierendysfunktion, ventrikulären Arrhythmien und aktive Infektionen.<sup>2</sup>

Typischerweise werden LVADs bei Patienten implantiert, die eine schwere Herzinsuffizienz aufweisen und sich in den Profilen 2-3 der INTERMACS Klassifikation (siehe Tabelle 1) wiederfinden. Patienten im akuten, kritischen kardiogenen Schock (INTERMACS Profil 1) sind in diesem Zustand keine guten Kandidaten für die Implantation von permanenten VAD-Systemen. In der klinischen Praxis werden diese Patienten mittels temporären Kreislaufunterstützungssystemen stabilisiert und erst nach klinischer Stabilisierung gelten diese Patienten als potenzielle Kandidaten für permanente VAD-Systeme.

Bei der aktuellen dritten Generation der handelsüblichen VAD-Systeme handelt es sich um zentrifugale, continuous flow (CF, kontinuierlicher Fluss) Pumpen. Die Systeme bestehen aus der Pumpeneinheit mit integriertem Einlassstutzen, mit dem Blut aus dem Ventrikel angesaugt wird, und einem hinter der Pumpe befindlichen Blutausslass im Sinne einer Rohrprothese, die im Falle von LVAD-Systemen meist mit der Aorta ascendens verbunden ist. Für die Pumpensteuerung und die Energieversorgung besitzen die Systeme eine extrakorporale Batterie- und Kontrolleinheit. Das aktuell einzige am Markt verfügbare „State of the Art“-System stellt das HeartMate III (Abbott, Chicago, IL, USA) dar, nachdem das HeartWare HVAD (Medtronic, MN, USA) 2021 nach einem FDA-Recall vom



Markt genommen wurde. Die HeartMate III Pumpe basiert auf einer magnetischen Lagerung des Rotors, der sogenannten magnetischen Levitation.<sup>8</sup> Entsprechend kommt es durch dieses Design zu keinem direkten Kontakt zwischen Blut und der Motorlagerung, ein wichtiger Aspekt, um fatale Pumpenthrombosen zu verhindern, welche eine gefürchtete Komplikation während der Therapie mit LVADs darstellt. Die aktuelle Generation der Herzunterstützungssysteme ist auf einen Energie- und Informationstransfer zwischen der extrakorporalen Batterie, dem Kontroll-Computer und der intrakorporalen Pumpe über ein elektrisches Kabel – der sogenannten Driveline – angewiesen.

Meist werden LVAD-Systeme über eine mediane Sternotomie unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine implantiert. Nach der Eröffnung des Brustkorbs wird der Patient zentral an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Anschließend wird die optimale Position des Einlassstutzens am linken Ventrikel in der Nähe des linksventrikulären Apex festgelegt. Die Positionierung wird mittels simultaner transösophagealer Echokardiographie unterstützt, um akzidentielle Verletzungen des interventrikulären Septums zu vermeiden und zukünftigen Ansaugphänomenen vorzubeugen. Vor der Eröffnung des linken Ventrikels wird ein Konnektionsring auf dem linksventrikulären Apex aufgenäht. Dieser dient später als Verbindung zwischen dem linken Ventrikel und dem Pumpengehäuse. Nachdem der Einflusssutzen in die eröffnete linke Herzkammer eingeführt wurde, wird das Pumpengehäuse am Konnektionsring befestigt und die Driveline durch die Haut nach außen getunnelt. Die Austrittsstelle befindet sich typischerweise oberhalb des Bauchnabels. Zuletzt wird die Rohrprothese an der Aorta ascendens End-zu-Seit aufgenäht. Dazu wird die Aorta tangential ausgeklemmt. In der klinischen Realität sind auch noch komplexere Implantationsstrategien möglich: beispielsweise die minimalinvasive Implantation ohne Durchführung einer medianen Sternotomie oder die Implantation ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine.<sup>9</sup>

## **1.6 VAD spezifische Infektionen und Driveline-Infektionen**

Trotz deutlicher Fortschritte im Design der neuesten CF-Pumpen, optimierter Implantationstechniken und verbesserten Protokollen zur postoperativen Wundversorgung bleiben Driveline-Infektionen eine Hauptkomplikation während der Therapie mit Herzunterstützungssystemen.

Da die Drivelines als Verbindungselement zwischen der implantierten Pumpe und der externalen Stromquelle fungieren, stellt die Driveline-Austrittsstelle eine konstante Unterbrechung der Hautbarriere dar und dementsprechend eine Eintrittsstelle für Pathogene.

Wie auch bei anderen medizinischen Implantaten, wie zentralen Venenkathetern oder Peritonealdialysekathetern, können bei einer Kontamination Pathogene an die Oberfläche der Implantate anhaften und sich anschließend entlang des Implantats ausbreiten. Im Falle von VAD-Drivelines kann dies durch die empfindliche Position zu einer vital bedrohlichen Mediastinitis führen. Jede lokale Infektion an der Driveline-Austrittsstelle kann potenziell eine lebensbedrohliche Mediastinitis oder Sepsis nach sich ziehen. Diese schwerwiegenden Komplikationen sind klinisch höchst relevant, da circa 13-26% der Patienten mindestens eine Driveline-Infektion während des ersten Therapiejahres entwickeln und es sich um die häufigste VAD spezifische Infektion (VAD specific infections) handelt.<sup>10-12</sup> Mit zunehmender Therapiedauer steigen diese Prävalenzen weiter an.<sup>10</sup> VAD-Infektionen stellen eine Hauptursache für wiederkehrende Krankenhausaufnahmen im Verlauf der Therapie dar.<sup>13,14</sup>

Entsprechend eines ISHLT-Dokuments von Hannan et al.<sup>15</sup> werden alle Infektionen, die die Driveline, Einfluss- und Ausflusskanüle, Pumpengehäuse und umgebendes Gewebe betreffen als VAD-spezifische Infektionen klassifiziert. Infektionen, die nur die Driveline betreffen, machen den größten Anteil unter den VAD-spezifischen Infektionen aus.<sup>10,12</sup> Der Großteil der Infektionen wird durch Bakterien ausgelöst – im Gegensatz dazu stellen Pilze, Viren und Protozoen nur in 2% die Ursache dar.<sup>10</sup> Typische bakterielle Erreger sind meist *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. und *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>16</sup>

Neben der zuvor erwähnten und bekannten Korrelation zwischen einer Zunahme der Driveline-Infektionsrate und der Dauer der VAD-Unterstützung, existieren weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von Driveline-Infektionen. Wichtige Risikofaktoren sind: hoher BMI, Diabetes mellitus, Trauma an der Driveline-Austrittsstelle, Velour oberhalb des Hautniveaus und niedrigere Implantationsvolumen des implantierenden Zentrums.<sup>17-21</sup>

Die Diagnostik von Driveline-Infektionen als spezielle Entität der VAD-spezifischen Infektionen ist eine schwierige klinische Aufgabe. Typischerweise ist die Kombination klini-

scher Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Schmerz, erhöhte Temperatur oder eitrige Sekretion) der erste Hinweis für eine sich entwickelnde Driveline-Infektion. Für die korrekte Diagnosestellung müssen diese klinischen Zeichen im Kontext von Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen (e.g. Wundabstriche, Blutkulturen) und der bildgebenden Verfahren (e.g. Sonographie, Computertomographie, Leukozyten-Szintigraphie, PET-CT) gewertet werden (siehe Abbildungen 1 und 2). Je nachdem wie weit sich die Infektion entlang der Driveline ausgebreitet hat, wird zwischen oberflächlichen und tiefen Driveline-Infektionen unterschieden. Sobald die Infektion die Faszie der Bauchmuskulatur erfasst, handelt es sich um eine tiefe Driveline-Infektion und damit um einen weiter fortgeschrittenen Krankheitsprogress. Darüber hinaus unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Driveline-Infektionen. Akute Driveline-Infektionen mit unreifem Biofilm entstehen definitionsgemäß innerhalb der ersten 4 Wochen nach der Implantation oder im Falle von ascendierenden Infektionen dürfen die Symptome zum Diagnosezeitpunkt nicht länger als 3 Wochen bestanden haben. Anschließend werden die Infektionen als chronisch beschrieben. Hauptmerkmal der chronischen Infektionen ist die Ausbildung eines stabilen Biofilms. Für die Auswahl der korrekten Therapiestrategie ist primär die Infektionsdauer ausschlaggebend. Im Falle einer akuten Infektion besteht ein unreifer Biofilm, welcher mit einer biofilmaktiven antiinfektiven Therapie eradiziert werden kann. Anders besteht bei chronischen Driveline-Infektionen ein stabiler Biofilm, der mit antibiotischer Therapie allein nicht mehr eradiziert werden kann. In diesen Fällen ist die Suppressionstherapie die Strategie der Wahl.

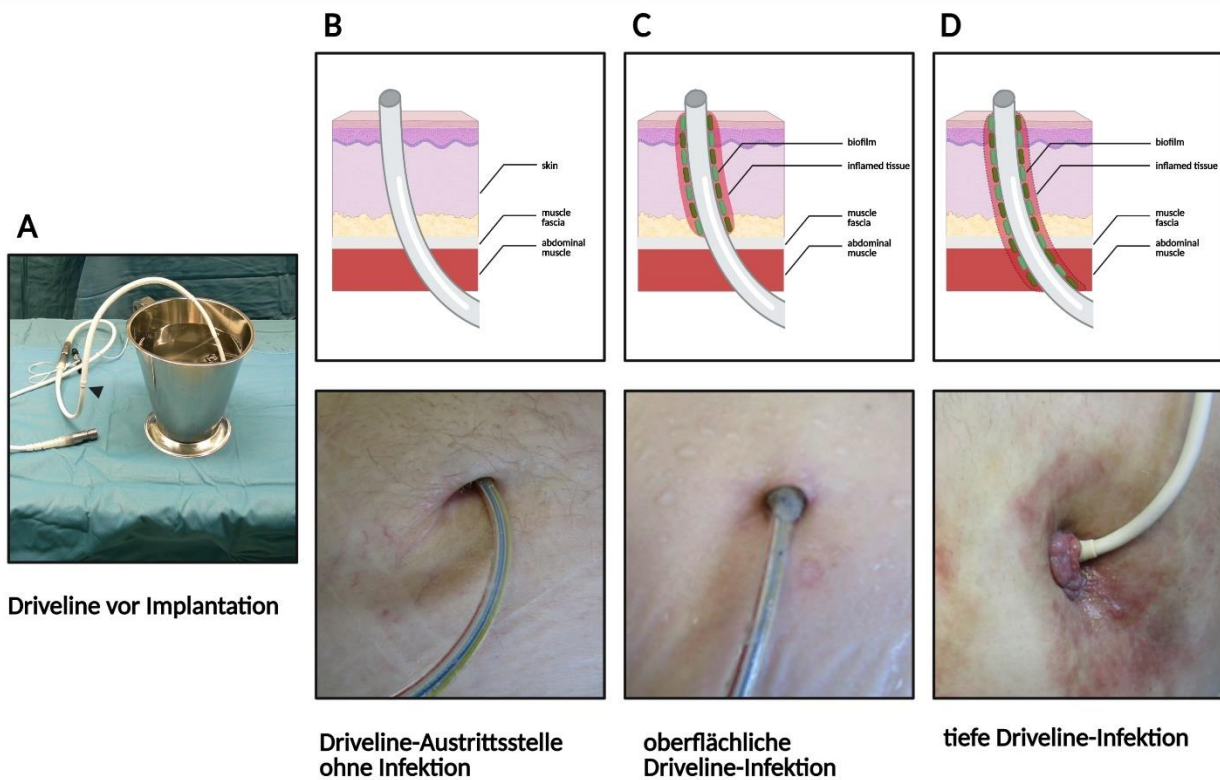


Abbildung 1 Stadien aufsteigender Driveline-Infektionen. (A) LVAD mit Driveline vor Implantation. (B) Driveline-Austrittsstelle ohne klinische Zeichen einer Entzündung und Infektion. (C-D) Klinische Zeichen einer Infektion im Bereich der Driveline-Austrittsstelle. Im Falle einer tiefen Driveline-Infektion überwinden die Erreger die Muskelfaszie. (Adaptiert von Kourouklis et al.<sup>22</sup>)

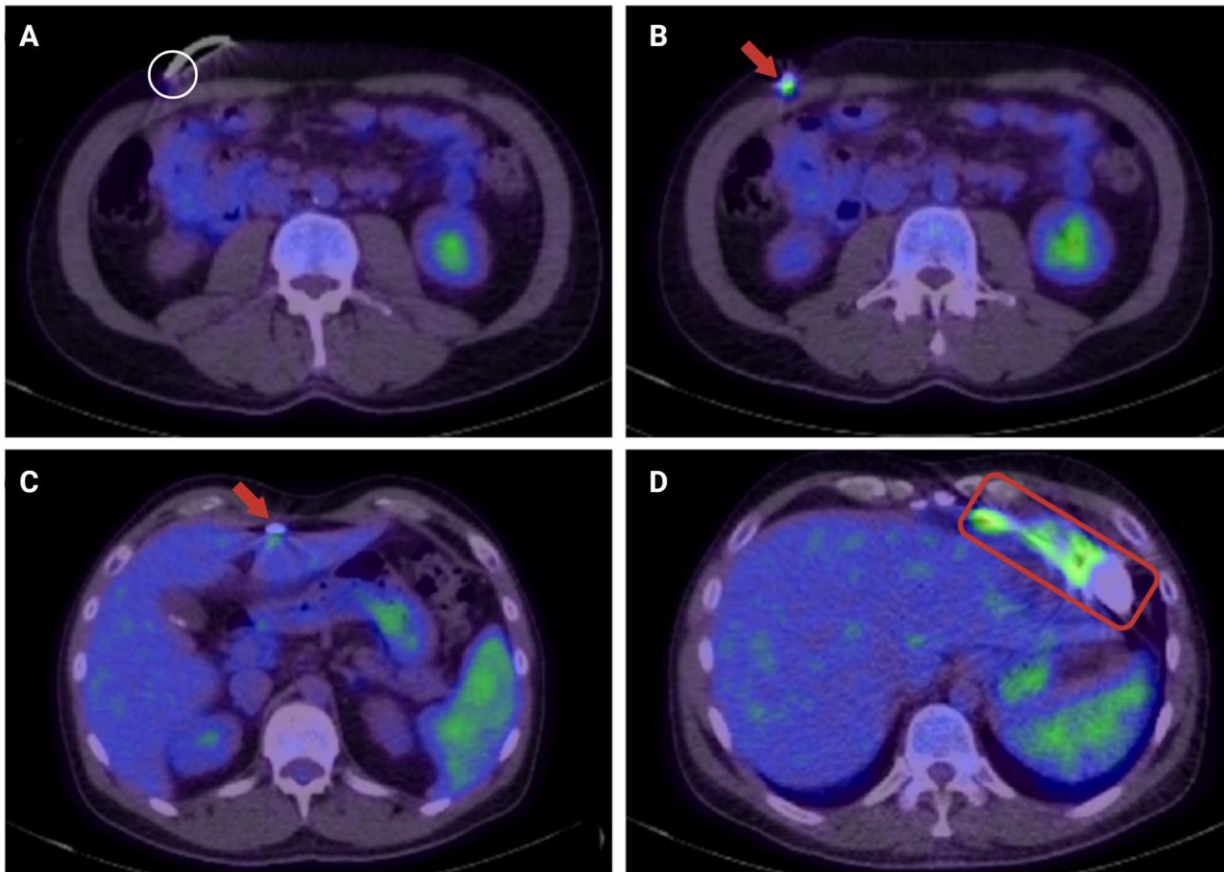


Abbildung 2 Darstellung einer Driveline-Infektion im PET-CT. (A) Der weiße Kreis markiert die Driveline-Austrittsstelle im Bereich des rechten Abdomens. (B-C) Die roten Pfeile markierte eine erhöhte Glucose-Aufnahme im Bereich des Driveline-Tunnels. (D) Im Bereich des roten Kastens zeigt sich eine verstärkte Glucose-Aufnahme, ein deutliches Zeichen für eine Driveline-Infektion welche bereits das Pumpengehäuse des VADs erreicht hat. (eigene Darstellung)

Entsprechend einer Entscheidungshilfe für die Auswahl der Therapiestrategie, welche in enger Kooperation zwischen der PRO-IMPLANT FOUNDATION und dem Deutschen Herzzentrum in Berlin entwickelt wurde, werden alle akuten Driveline-Infektionen über 6 Wochen antibiotisch mit Biofilm-aktiven Substanzen therapiert - mit dem Ziel einer Eradikation. Im Gegensatz dazu werden chronische Infektionen mit einer 2-4 wöchigen antibiotischen Therapie behandelt und es kommen zusätzlich revisionschirurgische Eingriffe zur Anwendung. Die typische chirurgische Therapie von Driveline-Infektionen besteht aus chirurgischem Debridement, Verlagerung der Driveline und der dazugehörigen Austrittsstelle oder die Listung zur dringlichen Herztransplantation.<sup>23</sup>

An unserer Institution ist, im Falle einer Driveline-Verlagerung, die Durchführung einer medianen Laparotomie und die Ummantelung der Driveline mit Omentum das chirurgische Standardvorgehen. Dabei wird ein neuer Driveline-Tunnel auf der gegenüberliegenden Seite des Abdomens geschaffen. Nachdem die alte Driveline-Austrittsstelle exzidiert

wurde und die Driveline aus dem alten Tunnel befreit wurde, wird die Driveline mittels einer chirurgischen Thoraxdrainage zur neuen Driveline-Austrittsstelle verlagert und dabei durch die Bauchhöhle für die Ummantelung mit Omentum geführt.<sup>24</sup>

Zusätzlich zur antiinfektiven und chirurgischen Therapie ist die korrekte Wundversorgung ein elementarer Bestandteil in der Therapie von Driveline-Infektionen. Zu Beginn einer solchen Infektion ist häufig eine Erhöhung der Frequenz der Verbandwechsel ausreichend. Für persistierende Infektionen im Bereich der Austrittsstelle sind die Administration lokaler Antibiotika, Vakuum-Therapie (negative-pressure wound therapy (NPWT)) oder kaltes atmosphärisches Plasma etablierte Therapien.<sup>22</sup>

Besonders Patienten, welche mit LVADs im Sinne der DT-Indikation behandelt werden, sind ständig von therapieresistenten Driveline-Infektionen bedroht. Für diese Patienten ist eine Herztransplantation keine mögliche Therapieoption als Ultima Ratio. Entsprechend kann im Falle einer unkontrollierbaren Infektion, trotz antiinfektiver Therapie und chirurgischer Therapie, nur noch ein Systemwechsel das Leben dieser Patienten retten. Jedoch geht ein solcher Eingriff mit einem hohen chirurgischen Risiko einher und trägt eine hohe Mortalität. Aus Mangel an anderen therapeutischen Optionen wurden in einzelnen Fällen Patienten mit experimentellen Therapieansätzen, wie der Verwendung von Bakteriophagen, therapiert.<sup>25,26</sup>

Wegen der potenziell fatalen Konsequenzen von Driveline-Infektionen hat die Vermeidung derselben die größte Bedeutung während der VAD-Therapie. Eine perioperative Antibiotikaphylaxe wird standardmäßig bei jedem Patienten eingesetzt. Während der postoperativen Phase wird die Driveline an der Austrittsstelle mittels temporärer Nähte befestigt. Später wird diese Immobilisation durch ein spezielles Pflaster gewährleistet. Die Pflegenden werden während des Krankenaufenthalts des Patienten geschult, um die Verbandwechsel selbständig in aseptischer Technik durchzuführen und auch Infektionen rechtzeitig zu erkennen.<sup>17</sup> Die aktuell beste Konfiguration der Driveline, um Infektionen zu vermeiden, ist ein kurzer Velour-Anteil, der vollständig unter dem Hautniveau versenkt ist und entsprechend eine Silikon-Haut-Grenze im Bereich der Austrittsstelle besteht.<sup>19,21</sup>

## 1.7 Bildung von Biofilm auf LVAD-Drivelines

Viele Mikroorganismen haben die Fähigkeit, Biofilme auszubilden – es handelt sich dabei um ein Netzwerk aus Mikroben, eingebettet in einer Schicht aus extrazellulärer Matrix. Biofilme haben die Tendenz, sich an Oberflächen auszubilden und dort zu überleben. Entsprechend wechseln die Mikroorganismen bei Ausbildung eines Biofilms von einer planktonischen in eine sessile Form. In der modernen Medizin spielen bakterielle Biofilme eine entscheidende Rolle bei therapieresistenten und wiederkehrenden Infektionen, besonders im Kontext von Implantat-Infektionen. Nachdem Implantate in den Körper eingebracht wurden, werden sie sofort mit einer Schicht an Proteinen überzogen. In der Anwesenheit von Bakterien kann es nun zum Beginn der Ausbildung von Biofilmen kommen. Die Bakterien heften sich in diesem Fall an die mit Proteinen überzogene Oberfläche und beginnen mit der Produktion von extrazellulärer Matrix. Anschließend folgt eine Phase der Reifung und Evolution des neu gebildeten Biofilms, während sich die Pathogene vermehren. Mittels dem sogenannten quorum sensing können die Mikroorganismen innerhalb des Biofilms Informationen austauschen. Dies erlaubt es, dass sich der Biofilm weiterentwickeln und an Umweltveränderungen anpassen kann.<sup>27</sup>

Chemische und physikalische Materialeigenschaften von medizinischen Implantaten, wie beispielsweise die Polarität oder Steifheit der Oberfläche, spielen eine elementare Rolle in der Ausbildung von Biofilmen.<sup>28</sup> Dies trifft auch auf LVAD-Drivelines zu. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass das äußere Isolationsmaterial, der Durchmesser und die Steifigkeit von Drivelines einen Einfluss auf die Infektionsrate hat.<sup>21,29</sup>

Die meisten Bakterien, die Driveline-Infektionen und damit VAD spezifische Infektionen auslösen, haben die Fähigkeit stabile Biofilme zu bilden.<sup>30</sup> Nach der Biofilm-Ausbildung an der Driveline-Austrittsstelle kann es zu einer Migration der Erreger und damit des Biofilms entlang der Driveline zum Pumpengehäuse kommen. In einer Studie von Qu et al.<sup>31</sup>, wurde gezeigt, dass die Migration von Biofilmen kein linearer Prozess ist und dabei auch keine kontinuierlichen Biofilme entstehen. Vielmehr handelt es sich um eine Kombination aus Biofilm-Expansion und der Ablösung von planktonischen Bakterien, was zu einer Verteilung der Erreger entlang der Driveline führt. Darüber hinaus zeigt die Studie, dass das Velour der Driveline zu keiner kompletten Gewebeintegration führt, auch wenn es

komplett unter dem Hautniveau versenkt wird. Es entstehen während des Einwachsens des umliegenden Gewebes Mikrospalten, welche möglicherweise als Kanäle für eine Migration der Pathogene fungieren.

Gleichsam wie bei anderen Biofilmen, zeigen etablierte Biofilme auf VAD-Drivelines eine erhöhte Resistenz gegenüber dem körpereigenen Immunsystems und der Therapie mit Antibiotika.<sup>31,32</sup>

Die Immunevasion von im Biofilm gebundenen Erregern basiert auf der Unfähigkeit des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten) zu einer suffizienten Attacke, sogar bei Verstärkung durch das adaptive Immunsystem. Die Ausbildung eines Biofilms verhindert durch seine Größe die Phagozytose der Erreger, die Matrix des Biofilms verhindert ein korrektes Wirken des Komplementsystems und darüber hinaus werden die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) von der Erkennung des Immunsystems versteckt. Darüber hinaus kommt es im Rahmen der Reifung des Biofilms zur Ausbildung von Erregern mit unterschiedlichen Wachstumseigenschaften und auch von sogenannten persistierenden Zellen („persister cells“). Entsprechend der Verteilung von Nährstoffen und Sauerstoff innerhalb des Biofilms finden sich metabolisch- und proliferativ aktive Zellen im Bereich der Biofilm-Oberfläche. Die metabolisch inaktiven sesshaften persistierenden Zellen finden sich hingegen tief innerhalb des Biofilms nahe der Oberfläche des Implantates.<sup>33</sup> Diese persistierenden Zellen haben die Fähigkeit selbst dann zu überleben, wenn die nicht-persistierenden Pathogene des Biofilms durch die Immunantwort abgetötet wurden. Sobald das Immunsystem aufgrund fehlender Ziele die Immunantwort beendet, können die persistierenden Zellen als eine Quelle einer schwelenden niedriggradigen Infektion agieren und den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines neuen Biofilms darstellen.<sup>32</sup>

Die beschriebenen Vorgänge, zusammen mit der erhöhten Resistenz gegenüber Antibiotika, machen die Therapie von Biofilm-basierten VAD spezifischen Infektionen in der klinischen Realität anspruchsvoll.



## 1.8 Fremdkörperreaktion - Foreign body reaction

Alle medizinischen Implantate und damit auch L-VADs zählen als Fremdkörper. Ab dem Moment der Implantation reagiert das umgebende Gewebe und körpereigene Immunsystem mit einer Fremdkörperreaktion (foreign body reaction; FBR). Bekannte Beispiele für ausgeprägte FBRs durch medizinische Implantate sind Kapselkontrakturen bei Brustimplantaten und die Ausbildung fibrotischer Kapseln um Schrittmacheraggregate. Neben den kosmetischen oder chirurgischen Implikationen von fibrotischen Kapseln, führt das fibrotische Gewebe zu einer verschlechterten Immunabwehr in nächster Nähe des Implantates und erhöht daher die Gefahr von Infektionen.<sup>34,35</sup> Grundsätzlich basiert die FBR auf der Unfähigkeit des angeborenen Immunsystems, die überproportional großen Fremdkörper abzuräumen. Folglich versuchen Makrophagen und Riesenzellen mit der Ausbildung der fibrotischen Hülle, das fremde Material vom gesunden Gewebe abzugrenzen.<sup>36</sup>

Die FBR durchläuft folgende Stadien: Benetzung der Oberfläche des Implantates mit Proteinen und anderen Blutbestandteilen, akute Entzündung, chronische Entzündung, Entstehung von sogenannten Fremdkörper-Riesenzellen (foreign body giant cells; FBGCs) und letztlich Ausbildung der fibrotischen Kapsel.<sup>37</sup> Sofort nach der Implantation und dem damit verbundenen Implantat-Blut-Kontakt bildet sich eine Protein-Matrix auf der Oberfläche des Implantates, die für die weitere Erkennung des Fremdkörpers durch das Immunsystem relevant ist.<sup>37,38</sup> Vergleichbar wie bei der Ausbildung von mikrobiellen Biofilmen sind die physikochemischen Eigenschaften und die Oberflächenstruktur der Implantate ausschlaggebend für Zusammensetzung der Matrix und den weiteren Verlauf der Abwehrreaktion gegen den Fremdkörper. Jedoch kann das Immunsystem auch direkt, ohne das Vorhandensein einer Matrix, stimuliert werden.<sup>36,39</sup> Die folgende akute Entzündungsreaktion wird hauptsächlich durch polymorphkernige neutrophile Leukozyten und Mastzellen ausgelöst und unterhalten. Diese erkennen den Schaden durch den Fremdkörper und die damit verbundene Freisetzung von DAMPS (danger associated molecular patterns; Schaden assoziierte molekulare Muster). Die Zellen können über Oberflächenrezeptoren (beispielsweise Integrine) an der Protein-Matrix (Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, etc.) der fremden Oberflächen haften. Durch Degranulation der neutrophilen Granulozyten und der Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen beider Zellarten

kommt es zur Rekrutierung von Monozyten, welche den Übergang in die chronische Entzündungsphase signalisieren. Darüber hinaus kommt es durch die Größe der Implantate zu frustranter Phagozytose durch die neutrophilen Granulozyten und damit verbunden, zum wiederholten Ausstoß von Sauerstoffradikalen. Durch das Zusammenspiel dieser Faktoren entsteht eine akute Entzündungsreaktion um den Fremdkörper.<sup>36</sup>

Die nächste Phase der FBR ist durch eine chronische Entzündung gekennzeichnet. Dies beginnt mit der Bindung der angelockten Monozyten an die Protein-Matrix mittels Integri-  
nen.<sup>40</sup> Nach Aktivierung der Monozyten entwickeln sich diese sowohl zu Makrophagen mit pro-inflammatorischen als auch antiinflammatorischen Eigenschaften. Durch die insuffiziente Phagozytose der zu großen Fremdkörper, kommt es im weiteren Verlauf zur Fusion von Makrophagen zu den typischen FBGC am Fremdkörper-Gewebe-Übergang. Je nach Größe der Fremdkörper versuchen die FBGCs wiederum, mittels Phagozytose oder mittels der Freisetzung von Enzymen, reaktiver Sauerstoffspezies und Säure, die Fremdkörper im Extrazellulärraum abzubauen.<sup>40</sup>

Die letzte Phase der FBR ist durch die Ausbildung einer aus Kollagen bestehenden fibrotischen Kapsel charakterisiert. Die Kapselbildung basiert auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen den an der FBR beteiligten Zellen (hauptsächlich M2 Makrophagen), sezernierten Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ ) und proteolytischen Enzymen wie Matrix-Metalloproteinasen. Letztlich werden dadurch Fibroblasten, Endothelzellen und Myofibroblasten rekrutiert, die ein Granulationsgewebe bilden, welches im weiteren Verlauf zu einer festen fibrotischen Kapsel reift, deren Hauptbestandteil Kollagen Typ I ist. Durch den kontinuierlichen Entzündungsreiz durch den Fremdkörper kommt es, anders als bei normaler Wundheilung, nicht zu einer Beendigung dieser Prozesse und es wird immer mehr fibrotisches Gewebe gebildet.<sup>36</sup>

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass sowohl die chemischen Eigenschaften der Implantate als auch deren Oberflächenstruktur eine wesentliche Rolle für die Ausprägung der sich ausbildenden FBR spielen.<sup>36,40</sup> Letztlich bildet sich im Rahmen der Fremdkörperreaktion ein funktionell minderwertiges Narbengewebe. Im Zusammenhang mit Implantat-Infektionen spielen vor allem die eingeschränkten Abwehrmechanismen gegen Pathogene eine relevante Rolle.

### **1.9 Zusammenspiel zwischen Implantat-Infektionen und der Fremdkörperreaktion**

Zwischen der Entstehung von pathogenen Biofilmen und der Fremdkörperreaktion des Immunsystems bestehen besonders in der Anfangsphase einige Parallelen. So spielt sowohl in der Bildung von Biofilmen als auch bei der FBR, die initiale Bildung der Protein-Matrix nach Blut-/Gewebekontakt eine wichtige Rolle. Gristina et al. beschrieb 1988 diesen Wettstreit zwischen Pathogenen und dem Immunsystem um die Einnahme beziehungsweise die Integration von Fremdkörpern als „race for the surface“. Gewinnen die Pathogene, so kommt es zu Implantat-Infektionen und bei dazu befähigten Mikroben zur Ausbildung eines Biofilms.

Das Risiko für eine Implantatinfektion steigt durch die Ausbildung einer Fremdkörperreaktion, da es durch die FBR zu einer lokalen Störung des körpereigenen Immunabwehr im Bereich um das Implantat kommt, welche auch das umliegende Gewebe betreffen kann.<sup>34,41</sup> Erste Hinweise für einen lokalen Immundefekt hat schon Zimmerli et al. 1984 veröffentlicht. Dabei wurde sowohl *in vitro* als auch in einem Tiermodell bei Vorhandensein eines Fremdkörpers ein komplexer Funktionsausfall der Granulozyten in der Abwehr gegen Pathogene beobachtet.<sup>35</sup> Darüber hinaus kommt es im Rahmen der FBR zu einer vermehrten Expression von immunsuppressiven Cytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ , welche die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen durch Leukozyten mindern und letztlich eine verminderte Immunreaktion verursachen. Hiervon ist auch die Funktion der an der Fremdkörperreaktion beteiligten FBGCs und Makrophagen betroffen.<sup>42</sup>

### **1.10 Biosynthetische Cellulose – Reduktion der Fremdkörperreaktion**

Biosynthetische Cellulose ist ein natürliches Polymer, welches durch bestimmte Bakterienstämme - wie beispielsweise *Acetobacter xylinum* - synthetisiert werden kann. Die synthetisierte Cellulose besteht aus  $\beta$ -1-4 glykosidischen verknüpften Glucosemolekülen. Diese Ketten aus Glucosemolekülen ordnen sich nach deren Synthese über die Zwischenschritte Subfibrillen, Mikrofibrillen, Bündel und schlussendlich zu Bändern (sog. Ribbons). Je nach synthetisierendem Organismus unterscheidet sich die entstehende Cellulose in ihrer Struktur und damit auch ihren mechanischen Eigenschaften.<sup>43</sup> Cellulosemembranen werden durch die synthetisierenden Bakterien in Anwesenheit einer Glucose-reichen Nährlösung mittels Fermentation gebildet. In ruhender Kultur bildet sich an der Luft-Nährlösungs-Grenze eine dichte Schicht biosynthetischer Cellulose.

Biosynthetisch hergestellte Cellulose ist hochgradig hydrophil.<sup>43</sup> Diese Eigenschaft trägt zu einer verminderten Absorption von Proteinen im Rahmen der FBR bei und ist damit ein wichtiger Grund für die hohe Biokompatibilität des Stoffes.<sup>36,44</sup> Eine Möglichkeit die Biokompatibilität zu erhöhen und damit die FBR weiter zu mildern ist es, die Oberflächenstruktur auf der Mikroebene entsprechend zu verändern. Dazu verwendete Bottan et al.<sup>45</sup> in einem Versuch das Verfahren „guided assembly-based biolithography (GAB)“. Grundprinzip dieser Technik ist es, eine Polydimethylsiloxane (PDMS) Form mit einer vorgegebenen Oberfläche an der Luft-Nährlösungs-Grenzfläche der Bakterienkultur zu befestigen. Entsprechend produzieren die Bakterien ein Cellulose-Substrat an dieser Grenzfläche, dessen Oberfläche den Negativabdruck der PDMS Form darstellt.

Entsprechend des GAB-Protokolls von Bottan et al. und der von Robotti et al.<sup>46</sup> beschriebenen antifibrotischen Oberflächentopographie, welche durch Mikro-Vertiefungen charakterisiert ist, wurde in einem weiteren Schritt eine biosynthetische Cellulose mit verbesserter Biokompatibilität hergestellt. Diese Cellulose-Membranen wurden bereits erfolgreich im Tierversuch implantiert.<sup>47</sup> Dabei wurden Schrittmacher-Implantate mit den modifizierten Cellulose-Membranen ummantelt und anschließend für 12 Monate implantiert. Bei Beendigung der Studie zeigte sich eine signifikant dünnere fibrotische Kapsel um die mit der oberflächenveränderten Cellulose ummantelten Schrittmacher-Implantate im Vergleich zu Kontroll-Implantaten.<sup>47</sup> Dieser Versuch hat erneut die Bedeutung von biosynthetischer Cellulose als Schutzschicht zur Erhöhung der Biokompatibilität medizinischer Implantate aufgezeigt. Neben der FBR stellt auch die bakterielle Besiedlung der Implantate eine konstante Gefahr dar. Entsprechend stellt die Evaluation von mikrostrukturierte Cellulose als Barriere gegen bakterielle Infiltration einen weiteren wichtigen Forschungsschwerpunkt dar.

### 1.11 Fragestellung

In dieser Studie wurde die Barrierefunktion von biosynthetischer Cellulose gegenüber der bakteriellen Kolonisation der Silikonoberfläche von LVAD-Drivelines sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* untersucht. Dies basiert auf der Annahme, dass das Zusammenspiel aus den physikalischen Eigenschaften und des bekannten antifibrotischen Effektes der Cellulose eine bakterielle Kontamination der Implantatoberfläche verhindern kann.

## 2 Methodik

### 2.1 Mikrostrukturierte biosynthetische Cellulose (BC)

Die in diesem Versuch verwendete Cellulose wurde in statischer Kultur mittels eines *Acetobacter xylinum*-Stammes (ATCC-700178) hergestellt. Die Synthese der BC dauerte eine Woche bei 27°C bis die Membranen eine durchschnittliche Stärke von 3-4 mm aufwiesen. In einem ersten Schritt wurden der BC anhaftende Bakterien mittels Natronlauge entfernt. Dazu wurden die Membranen für 80 min bei 80°C in einer einmolaren Natronlauge gewaschen. Um erneut eine pH-Neutralität zu erreichen, folgte eine Waschung in deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur, bis der Ziel-pH erreicht wurde. Vor der finalen Sterilisation wurden die hergestellten BC-Membranen dehydriert und anschließend rehydriert. Die rehydrierten Membranen wurden der Autoklavierung für 15 min bei 121°C und 1.1 bar Druck zugeführt. Anschließend wurden die sterilen BC-Membranen gekühlt (4°C) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung aufbewahrt. Die synthetisierten BC-Membranen hatten eine Größe von 15 x 20 cm.

Die mittels Rasterelektronenmikroskopie bestimmte, durchschnittliche Porengröße der fertigen BC-Membranen lag bei < 500 nm.

### 2.2 In-vitro-Permeationsversuch

Um die grundsätzliche Durchlässigkeit der Cellulose-Membranen zu evaluieren, wurden zwei einzelne Versuche durchgeführt. Der verwendete Versuchsaufbau wurde für diesen Versuch neu entwickelt.

In einem ersten Schritt wurde die Durchlässigkeit der biosynthetischen Cellulose für Mikropartikel evaluiert. Der Versuchsaufbau bestand aus zwei vertikal übereinandergestapelten zylindrischen Kammern, welche durch eine in der Mitte gespannte Cellulose-Schicht voneinander getrennt wurden. Beide Kammern wurden anschließend mit dem gleichen Volumen eines reinen Lösungsmittels befüllt. Um den Übertritt von Stoffen einer definierten Größe entlang der Schwerkraft über die Cellulose-Barriere zu evaluieren, wurde dem Lösungsmittel der oberen Kammer 2 µm große, fluoreszierende Dextran-Kügelchen (SPHERO Fluorescent Light Yellow Particles 1%w/v 1.97 µm, Spherotech Inc.). Nach 24 h Inkubationszeit wurde die Cellulose aus dem Zweikammer-System entnommen und beidseitig mittels Hellfeld-Mikroskopie auf Permeation untersucht. Die mit

Dextran-Kügelchen inkubierte Oberseite diente dabei als Positivkontrolle. Die Unterseite einer Cellulose-Membran (angrenzend an die untere Kammer), welche nur mit destilliertem Wasser inkubiert wurde, diente als Negativkontrolle. Eine erfolgte Permeation wurde wie folgt definiert: fluoreszierende Dextran-Kügelchen zeigen sich nach Inkubation sowohl an der Oberseite als auch an der Unterseite der Cellulose-Membran (siehe Abbildung (siehe Abbildung 7 A und B).

In einem nächsten Schritt sollte die in-vitro-Barrierefunktion gegenüber Pathogenen untersucht werden, die in der Lage sind, Implantatinfektionen auszulösen. Dazu wurde die intakte Cellulose-Membran auf eine mit Agar beschichtete Petrischale gelegt. Es wurden zuvor Agar-Würfel mit einer Kantenlänge von 1 cm hergestellt und in einer Suspension von *S. aureus* inokuliert. Anschließend wurde der inokulierte Agar-Würfel auf die Oberseite der Cellulose-Membran gelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der bakteriellen Cellulose von der Agar-Oberfläche und die Evaluation der bakteriellen Kolonisation. Eine Koloniebildung auf der Agar-Oberfläche entsprach definitionsgemäß einer Permeation der Pathogene durch die Cellulose-Membran. Als Positivkontrolle wurde eine mittels einer sterilen Nadel durchstochene Cellulose-Membran mitgeführt.

### **2.3 Tierversuch (in-vivo-Experiment)**

Der beschriebene Tierversuch wurde entsprechend der behördlichen Genehmigung G 099/18 der Tierschutzbehörde des LaGeSo (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Versuch entsprechend der Richtlinie 2010/63 der europäischen Union, dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG), der deutschen Tierschutzversuchsverordnung (TierSchVersV) und der ARRIVE Leitlinie, durchgeführt.

### **2.4 Versuchstiere**

Diese Studie wurde mit behornten und enthornten weißen deutschen Edelziegen durchgeführt. Die Tiere stammten vom Züchter Preclinics GmbH. Alle Tiere waren weiblich, ausgewachsen und nicht gravide. Insgesamt wurden 8 Tiere in die Studie eingeschlossen. Die Tiere wurden entsprechend ihrer Standzeit und damit der Dauer zwischen Implantation der LVAD Silikon-Driveline-Mäntel (s.d.m.) und ihrer Explantation zum Ende des Versuches, in 4er Gruppen eingeteilt (Gruppe 1 mit den Tieren Nr. 1.-4; Gruppe 2 mit

den Tieren Nr. 5.-8.). Die Dauer zwischen Implantation und Explantation der s.d.m. betrug für die Gruppe 1 sechs Wochen und für Tiere der Gruppe 2 zwölf Wochen. Jedes Tier erhielt im Rahmen der Studie vier s.d.m. ( $n=4$ ), davon waren zwei mit biosynthetisch hergestellter Cellulose (BC-s.d.m.) ummantelt. Abweichend vom klinischen Szenario, bei dem Patienten mit einem LVAD eine Driveline und damit nur eine Austrittsstelle besitzen, wurden im vorliegenden Tierversuch mehrere s.d.m. pro Tier implantiert. Dieses Vorgehen wurde im Rahmen der 3-R-Prinzipien (Ziel: Reduce) gewählt, um die Gesamtanzahl zu reduzieren.

Entsprechend der vorangegangenen Erläuterungen wurde in jede Flanke eines Versuchstieres in einem abwechselnden Schema jeweils eine mit Cellulose-beschichtete s.d.m. (BC-s.d.m.) und eine unbeschichtete s.d.m. (B-s.d.m., Kontrolle) implantiert. Insgesamt erhielt jede Tiergruppe 16 s.d.m.-Implantate ( $n=16$ ): acht BC-s.d.m. ( $n=8$ ) und acht ( $n=8$ ) B-s.d.m. als Kontrolle. Alle Tiere, die in die Studie eingeschlossen wurden, erreichten den zeitlichen Endpunkt von jeweils 6- oder 12-Wochen. Kein Tier musste von der abschließenden Analyse ausgeschlossen werden.

Da Abschnitte der kommerziell erhältlichen Silikon-Außenhülle von L-VAD Drivelines (HeartMate 3, Abbott, IL, USA) genutzt wurden, hatten die Implantate eine Länge zwischen 6-10 cm und einen Durchmesser von 6,6 mm.<sup>29</sup> Um ein vergleichbares Verhältnis von Driveline-Austrittsstelle zu Körperoberfläche herzustellen, musste ein Großtier für den Tierversuch gewählt werden. Es wurden Ziegen über Minischweine ausgewählt, da Ziegen zu weniger selbstverletzendem Verhalten neigen und in Gruppenhaltung nach der Implantation gehalten werden können. Darüber hinaus ist es einfacher, eine ausreichende Wundhygiene in Ziegen aufrechtzuerhalten im Vergleich zu Minischweinen.

Um Manipulationen und Wundstress an den Austrittsstellen vorzubeugen, wurden in dieser Studie Schutzwesten für die Tiere verwendet. Die Westen bestanden aus dickem, gepolstertem Stoff und wurden entsprechend des Designs von Großhauser et al.<sup>48</sup> hergestellt. Die Westen bestanden aus zwei großen Seitenteilen, die über der Brust der Tiere miteinander verbunden waren. Ausschnitte für die Vorderbeine der Tiere befanden sich am vorderen Ende der Westen. Zusätzlicher Schutz der Implantationsstellen wurde durch Schaumstoff-Pads gewährleistet, die in dafür vorgesehene Innentaschen der Westen, eingesteckt wurden. Mittels Bändern und Schnallen an der Rücken-Partie konnten die Westen an die Größe der Tiere angepasst werden. Im Schwanzbereich der Tiere wurden

die Schutzwesten offen gelassen und die Hinterläufe hatten an dieser Stelle keinen Kontakt zu den Westen.

Nach Ankunft in der Einrichtung wurde allen Tieren eine Eingewöhnungszeit von zwei Wochen vor Beginn des Versuches gewährt. Während dieser Zeit wurden die Ziegen an das Tragen der Westen und an den Weg zwischen Stall und Anästhesie-Einleitungs-Raum gewöhnt. Darüber hinaus wurde das Anlegen der Inhalationsmasken für die Einleitung mit volatilen Anästhetika geübt. Zur positiven Verstärkung wurde während des Trainings ein Mix aus Karotten, Äpfeln und Futter-Pellets genutzt. Der beschriebene Versuchsablauf wurde im Rahmen der Refinement-Strategie entwickelt, um perioperativen Stress zu reduzieren und die Anästhesie-Einleitung ohne Prämedikation durchführen zu können.

Die Standzeit (6-Wochen Gruppe/ 12-Wochen Gruppe) verbrachten die Tiere während des Versuchs in den Ställen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) am Campus Virchow-Klinikum (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland). Entsprechend der Stallgröße wurden die Tiere in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten. Alle Stallungen waren mit automatisierten Wasserspendern ausgestattet. Darüber hinaus wurden der Tierart angepasste Anreicherungsgegenstände eingesetzt, wie zum Beispiel Futterspielzeuge. Die Tiere wurden während des Versuchs mit Heu und Futterpellets gefüttert. Bei der Durchführung der täglichen Gesundheitskontrolle, bei Verbandswechseln und durch die Studie bedingten Eingriffen wurde den Tieren zusätzlich ein Mix aus Karotten und Äpfeln angeboten, um die Akzeptanz für die Eingriffe zu erhöhen.

Entsprechend der „Standard Operating Procedures“ des FEM wurden Sägespäne als Einstreu zusammen mit Stroh für die Ställe genutzt. Standardmäßig herrschte in den Stallungen eine konstante Temperatur von  $18 \pm 2$  °C und die Luftfeuchtigkeit bewegte sich in einem Rahmen von  $55 \pm 10$  %. Ein weiterer wichtiger Aspekt während der langen Standzeit der Tiere war die Ausstattung der Ställe mit Fenstern und damit dem Einfall natürlichen Lichtes, damit die Tiere entsprechend des natürlichen zirkadianen Rhythmus leben konnten.

## **2.5 Postoperative Wundkontrollen**

Ein sehr aufwändiger Teil des chronischen Tierversuchs waren die postoperativen Wundkontrollen. Anders als bei Patienten mit LVADs üblich, war eine standardisierte Planung



der Wechselintervalle von Verbänden nicht möglich. Durch den schnellen Fellwuchs und die damit schlechten Möglichkeiten Verbände zu befestigen, waren individuelle Wechselintervalle zwischen einem Tag und einer Woche notwendig. Entsprechend wurden die Verbände gewechselt, sobald eine Beschädigung festgestellt wurde. Die Verbandwechsel wurden in „no-touch“ Technik durchgeführt. Bei sichtbaren Verunreinigungen oder im Falle von sezernierenden Wunden wurden die Wundfläche lediglich mit steriler 0,9% Kochsalzlösung gespült. Ein Verzicht auf desinfizierende Wundspüllösungen wurde bewusst gewählt, um falsch-negative Ergebnisse im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchung zu vermeiden. Die Wundaufgabe bestand aus sterilen Kompressen, die großflächig mit Pflastern an den Flanken der Tiere befestigt wurden. Bei jeder Wundkontrolle wurden die Wundverhältnisse beurteilt und dokumentiert.

## **2.6 Perioperatives Management**

Zur Vermeidung von Atemwegskomplikationen, wurden alle Tiere für 12 Stunden vor der Operation nüchtern gelassen. Durch das präoperativ durchgeführte Training konnten die Tiere ohne Notwendigkeit für eine Prämedikation in den Narkoseeinleitungsraum begleitet werden. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung mittels inhalativem Isofluran (3-5 %). Nachdem mindestens zwei sichere periphere intravenöse Zugänge etabliert werden konnten, wurde die Narkose mittels einer Bolusgabe Thiopental-Natrium (10-15 mg/kg) vertieft. Anschließend erfolgte die endotracheale Intubation. Die weitere Narkose der Tiere wurde mittels der Kombination aus Isofluran in Konzentrationen zwischen 0,8-1,5 % und intravenösem Fentanyl (1-5 µg/kg Bolus und kontinuierlich mit einer Laufrate von 1-5 µg/kgKG/h) aufrechterhalten. Schon während der Narkoseeinleitung wurde im Rahmen eines postoperativen Schmerzkonzeptes ein Fentanylpflaster (Dosis 75 µg/h) an einem Vorderlauf jedes Tieres angebracht.

Zur Entlastung des Pansens wurde eine Pansensonde eingelegt. Vor dem Hautschnitt erhielten alle Tiere eine präoperative Antibiotikaprophylaxe mit intravenösem Ampicillin/Sulbactam (2000 mg/1000 mg). Während der Narkose wurden die Vitalparameter (Herzfrequenz, Blutdruck, Atemfrequenz, Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur) der Tiere kontinuierlich überwacht. Eine kontinuierliche Darstellung der Kapnographiekurve am Beatmungsgerät diente als Kontrolle für die korrekte Lage des Endotrachealtubus und eine ausreichende Beatmung der Versuchstiere.

Postoperativ wurde die antibiotische Abdeckung mittels der wiederholten intramuskulären Gabe von Amoxicillin (15 mg/kg) sichergestellt. Die erste Dosis wurde kurz vor Beendigung der Operation gegeben, die zweite nach 48 Stunden und die letzte nach 96 Stunden.

Vor Beginn der chirurgischen Maßnahmen wurden beide Flanken der Tiere rasiert.

## **2.7 Durchführung der Implantation**

Nach Lagerung der Ziegen in Bauchlagerung auf dem Operationstisch wurden die Operationsfelder auf beiden Flanken mittels PVP-iodhaltiger (7,5 %) Desinfektionslösung (Braunol®, B. Braun SE, Melsungen, Germany) gründlich desinfiziert. Das sterile Feld auf jeder Flanke hatte eine Größe von circa 15 x 20 cm nachdem die chirurgischen Tücher angebracht wurden.

Um eine möglichst realitätsnahe Situation zu schaffen, wurden in dieser Studie die äußere Silikonummantelung (s.d.m.) der Drivelines des HeartMate3 (HM3; Abbott, Chicago, IL, USA) LVADs genutzt. Auf einem sterilen Beistelltisch wurden die s.d.m. für die Implantation vorbereitet.

Zuerst wurde der Velours-haltige Teil der s.d.m. abgetrennt, da bekannt ist, dass ein deutlich höheres Risiko für eine Driveline-Infektion besteht, wenn dieser Teil an der Driveline-Austrittsstelle exponiert ist als wenn die Austrittsstelle aus einem Silikon-Haut-Kontakt besteht. Dies zeigte sich sowohl in vitro-Studien als auch in vivo und führte dazu, dass der Velours-Teil der Driveline während einer L-VAD Implantation in der klinischen Routine tief im Subkutangewebe platziert wird.<sup>21,30,49</sup> Anschließend wurden die s.d.m. in 6-10 cm lange Abschnitte unterteilt. Die einzelnen s.d.m. Abschnitte wurden im nächsten Schritt mit der BC ummantelt. Die Cellulose-Membranen wurden dazu auf einer angefeuchteten Kompresse aufgefaltet. Da nur eine Seite der Membran die Mikro-Topographie besitzt, war es ein entscheidender Schritt, die nichttopographisch veränderte Seite der Cellulose direkt auf die Oberfläche der s.d.m. aufzubringen. Dieser Schritt wurde dadurch gewährleistet, dass eine Ecke der Cellulose-Membran abgerundet war und dies die korrekte Orientierung erlaubte. Entsprechend der Darstellung in Abbildung 3 (A-D) wurde die BC durch eine rollende Bewegung um die s.d.m. gewickelt. Anschließend wurden die überstehenden Enden der Cellulose-Membran abgetrennt. Durch die aufgelagerte Cellulose-Membran vergrößerte sich der Querschnitt des Implantates deutlich im Vergleich zu den als Kontrollen fungierenden B-s.d.m. Abschnitten ohne Cellulose.

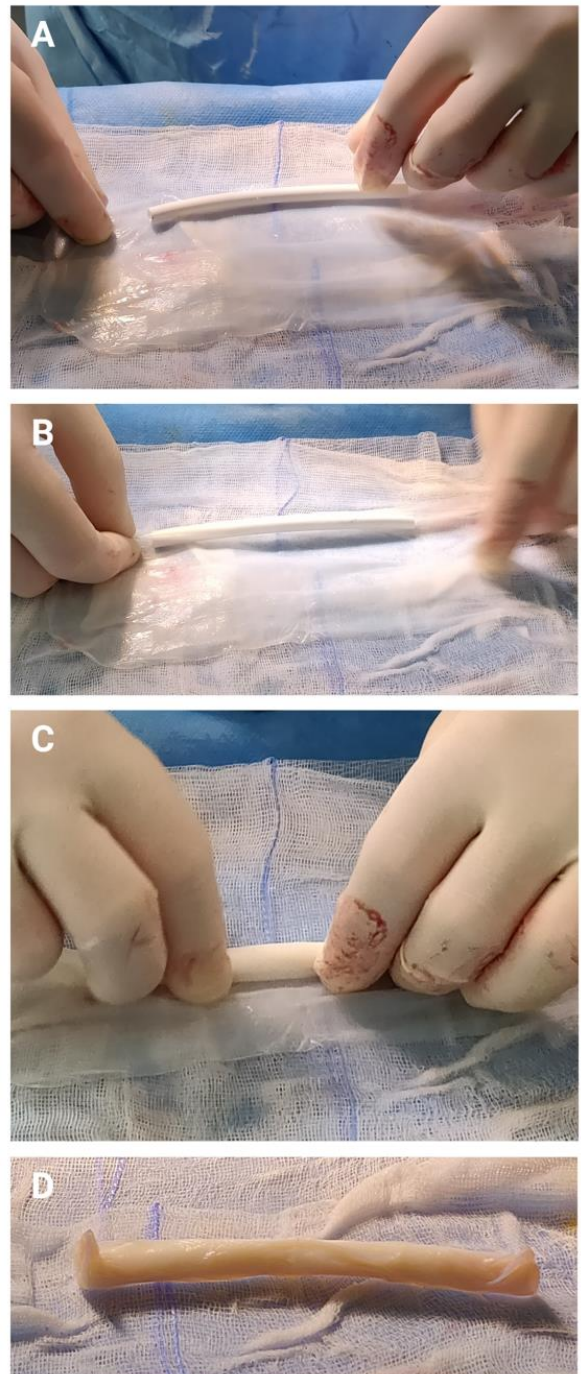


Abbildung 3 Beschichtung der Driveline-Außenhülle mit biosynthetischer Cellulose. (A) Entscheidend für eine korrekte Ausrichtung der mikrostrukturierten Oberfläche ist dass die abgerundete Ecke der Cellulose sich auf der oberen rechten Seite befindet. (B-C) Mit einer rollenden Bewegung wird die Cellulose aufgebracht. (D) Mit Cellulose beschichtete Driveline-Außenhülle. (eigene Darstellung)

Die Implantation der vorbereiteten Implantate erfolgte in vier Schritten: (1) parallele Hautinzision, (2) stumpfe subkutane Präparation eines Gewebetunnels, (3) Durchzug der Implantate durch den Gewebetunnel und (4) Befestigung der Enden der Implantate an der Haut im Bereich der Driveline-Austrittsstellen. Alle Hautinzisionen wurden mit einem Skalpell angelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Abstände 5-9 cm zwischen den parallel angeordneten Inzisionen betragen und die Inzisionsgröße an die Abmessung der Implantate angepasst war. Anschließend wurde mit einem Nadelhalter stumpf ein subkutaner Tunnel zwischen den beiden Inzisionen geschaffen. Nachdem der subkutane Tunnel vollständig präpariert wurde, wurde ein Wundabstrich vom jeweiligen Hauttunnel asserviert. Im vorletzten Schritt, wurde der Nadelhalter durch den gesamten Tunnel geführt und nach Einspannen des jeweiligen Implantates, dieses in den Tunnel versenkt. Zum Schluss, wurden beide Enden der Implantate mit einer Tabaksbeutelnaht an den Austrittsstellen befestigt, um ein Lageveränderung der Implantate während des Versuchs zu verhindern. Im Fall von BC-s.d.m. wurde auch die Cellulose mit in die Naht einbezogen. In jede Flanke des Tieres wurden zwei Implantate (1 BC-s.d.m. und 1 B-s.d.m.) mit einem vertikalen Abstand von 4-6 cm zueinander implantiert (siehe Abbildung 4 A). Nach abgeschlossener Implantation, wurden die Wunden mitsterilen Kompressen und Pflastern steril verbunden. Vor Beendigung der Narkose, wurde den Tieren die Schutzweste angelegt (siehe Abbildung 4 B-C).

Nach Narkosebeendigung und Extubation wurden die Tiere für die weitere Aufwachphase in den Stall verbracht.

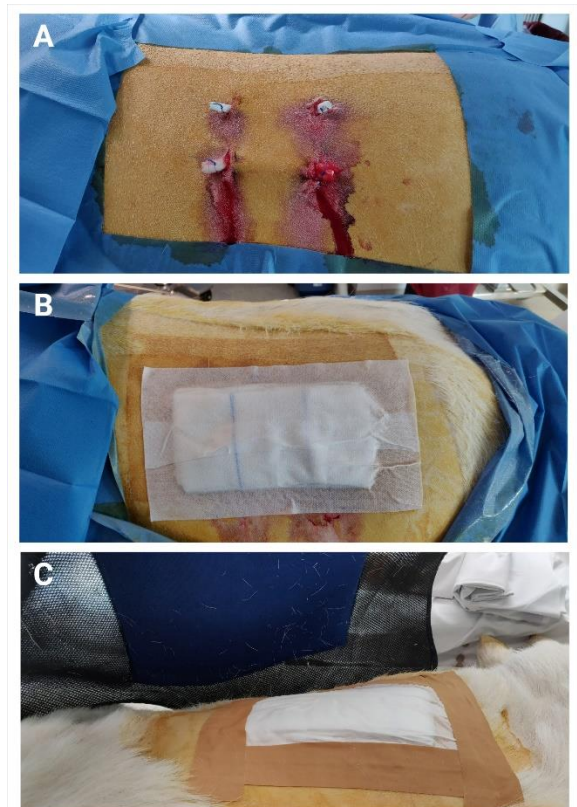


Abbildung 4 Implantationsstelle. (A) Flanke des Tieres nach Implantation der zu untersuchenden Implantate. Bei dem oberen Implantat handelt es sich um die Kontrolle. (B) Steriler Wundverband über der Implantationsstelle. (C) Anlage der Schutzweste im Bereich der Implantationsstelle. (eigene Darstellung)

## 2.8 Explantation der Implantate und Gewinnung von mikrobiologischen Proben

Nach entsprechender Standzeit der Tiere (6-Wochen Gruppe/ 12-Wochen Gruppe) wurden die Tiere entsprechend dem präoperativen Vorgehen in den Narkose-Einleitungsraum geführt. Anschließend wurden die Tiere mittels inhalativem Isofluran (5,5%) in eine tiefe Narkose versetzt. Nach Etablierung eines sicheren intravenösen Zugangs wurden die Tiere mittels der Gabe von Thiopental-Natrium (2500 mg), Fentanyl (0,5 mg), Pancuronium (2 mg) und schlussendlich der Gabe von 7,45% Kaliumchlorid-Lösung (60 ml) euthanasiert. Danach wurden die implantierten s.d.m. (BC-s.d.m. und B-s.d.m.) Implantate mitsamt der umgebenden Haut als Gewebeprobe entnommen. Ein wichtiger Aspekt war dabei, das Gewebe in der Nähe der Implantate während der Explantation nicht zu beschädigen. Aus diesem Grund wurde die Gewebeprobe tief von der Muskelfaszie abpräpariert und hatte eine Dicke von circa 3 cm. Darüber hinaus sollte der Hautschnitt nicht näher als 2 cm an den Gewebetunnel oder die Driveline-Austrittsstellen heranreichen. Zur weiteren Probengewinnung für die mikrobiologische Untersuchung wurden die Gewebeprobe auf einen sterilen Beistelltisch transferiert. Insgesamt wurden 16 Gewebeprobe (n=16) mit jeweils zwei s.d.m. (B-s.d.m. (n=8); BC-s.d.m.(n=8)) im Rahmen dieser Studie verarbeitet.

Zuerst wurden beide Implantate (BC-s.d.m. und B-s.d.m.), die in jeder Gewebeprobe enthalten waren, längs voneinander getrennt. Anschließend wurden die DSM in drei Abschnitte unterteilt, zwei Abschnitte die die Austrittsstellen enthielten und der mittlere Abschnitt der DSM, welcher am tiefsten im Subkutangewebe lag. Die Länge dieses Abschnitts betrug circa 1 cm. Der mittlere Abschnitt der DSM wurde in dieser Studie als Zielstruktur für die mikrobiologische Untersuchung ausgewählt, da es sich um den Punkt handelt, der am weitesten von den Driveline-Austrittsstellen entfernt war und somit das Risiko falsch positiver Befunde aufgrund der Kontamination der Driveline-Austrittsstelle an dieser Stelle am geringsten war.

Die mittleren Abschnitte der Implantate wurden durch einen longitudinalen Schnitt vom umgebenden Gewebe befreit. Die Implantate (BC-s.d.m. und B-s.d.m.) wurden danach für die weitere mikrobiologische Untersuchung vorbereitet. Dazu wurden die freigelegten

Abschnitte der B-s.d.m. direkt in 15 ml konische Zentrifugenröhrchen (Corning™Falcon™) transferiert, welche mit 3 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung befüllt waren. Im Falle der BC-s.d.m. wurden über das Auslösen aus dem umgebenden Gewebe, die Cellulose mit einem weiteren longitudinalen Schnitt aufgetrennt und von der darunterliegenden s.d.m. gelöst. Die BC-s.d.m. Implantate unterteilten sich weiter in Driveline ohne BC (BCB-s.d.m.) und biosynthetische Cellulose (BC) ohne Driveline. Diese Anteile wurden getrennt voneinander, wie für die B-s.d.m. beschrieben, jeweils in 15 ml konische Zentrifugenröhrchen (Corning™Falcon™) verbracht, welche zuvor mit 3 ml Natriumchlorid-Lösung befüllt wurden. Insgesamt wurden drei Arten von Proben für die mikrobiologische Untersuchung pro Gewebeprobe gewonnen: (1) Mittelstück der B-s.d.m., (2) BCB-s.d.m. und (3) die dazugehörige BC.

Die Proben für die mikrobiologische Untersuchung wurden unter sterilen Kautelen in die Probenröhrchen verbracht.

## 2.9 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Wundabstriche, die während der Implantation von den Driveline-Austrittsstellen und den subkutanen Tunneln gewonnen wurden, sollten dazu dienen, Informationen über die grundlegende bakterielle und mykotische Kolonisation der Wundfläche zu liefern. Diese Abstriche wurden mittels steriler Tupfer gewonnen, die anschließend für die mikrobiologische Untersuchung an ein auf Tierproben spezialisiertes Labor (LABOKLIN, Deutschland) geschickt wurden. Da von jedem Hauttunnel ein Abstrich asserviert wurde, wurden entsprechend der Anzahl implantierter DSM insgesamt 32 Abstriche (n=32) analysiert. Davon stammten 16 (n=16) von der 6-Wochen Gruppe und weitere 16 (n=16) von der 12-Wochen Gruppe.

Nach Explantation der Gewebeproben bei Beendigung des Tierversuches und der Gewinnung der mikrobiologischen Proben wurden diese innerhalb von 6 h im Labor weiterverarbeitet. Eine der wichtigsten Methoden für die Diagnostik von Infektionen medizinischer Implantate stellt das Verfahren der Sonikation und der anschließenden Kultivierung dar, insbesondere für die Detektion von Biofilm.<sup>50</sup> Durch die weitere Aufteilung der gewonnenen BC-s.d.m.-Implantate in reine biosynthetische Cellulose (BC) und die dazugehörige BCB-s.d.m. wurden bei 32 Implantaten (n= 32) von den beiden Versuchsgruppen

insgesamt 48 einzelne Proben gewonnen und mittels Sonikation untersucht: 16 B-s.d.m., 16 BC und 16 BCB-s.d.m. (siehe Abbildung 5).

Das Protokoll für die Sonikation und die anschließende bakterielle Kultivierung bestand aus fünf Arbeitsschritten. Zuerst wurden alle Proben in den Zentrifugenröhrchen für 30 Sekunden mittels eines Reagenzglasrührers (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) geschüttelt. Direkt im Anschluss folgte die Sonikation im Ultraschallbad (BactoSonic/BANDELIN electronic GmbH & Co. KG) bei 40 kHz und  $0,2 \text{ W/cm}^2$  für 1 min. Im dritten Arbeitsschritt wurden die Proben erneut für 30 Sekunden mittels des Reagenzglasrührers geschüttelt. Für die bakterielle Kultivierung, wurden mit einer Pipette  $100 \mu\text{l}$  der Sonikationsflüssigkeit in eine Petrischale mit Hirnherzinfusion-Agar (brain heart infusion (BHI) agar; BD, Le Pont de Claix, Frankreich) gegeben. Im letzten Schritt wurden die inokulierten Petrischalen für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Jedes bakterielle Wachstum nach Inkubation der Proben wurde als Kolonisation des Implantates gewertet.

Sterile Driveline-Außenhüllen des HeartWare HVAD (HW; Medtronic, Minneapolis, MN, USA) und nicht implantierte biosynthetische Cellulose-Membranen wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

## **2.10 Statistik und genutzte Software**

Die Daten der mikrobiologischen Untersuchung wurden rein deskriptiv ausgewertet. Dazu wurde die Software Microsoft Excel 2019 genutzt. Darüber hinaus wurden die Abbildungen (1-6) mit der Software Biorender.com und Microsoft PowerPoint erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 In-vitro-Permeationsversuch

Der initial durchgeführte in vitro-Test diente der Charakterisierung der Durchlässigkeitsgrenze und dem Nachweis der Undurchlässigkeit gegenüber bakteriellen Pathogenen. Der Permeationstest im Zwei-Kammer-System mit fluoreszierenden Mikropartikeln zeigte eine Undurchlässigkeit der biosynthetisierten Cellulose-Membran für Stoffe mit einer Größe von 2  $\mu\text{m}$  und größer. Mikropartikel mit einer Größe von 2  $\mu\text{m}$  blieben vollständig in der Kammer oberhalb der Cellulose und entsprechend konnten keine Fluoreszenz an der Unterseite der Cellulose nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7 B).

Im nächsten Schritt wurde die tatsächliche Barrierefunktion gegenüber *S. aureus* in einem ähnlichen Setting geprüft. Dabei zeigte sich zwar Wachstum auf der Oberfläche der intakten Cellulose-Membran, jedoch kein Wachstum auf dem darunter befindlichem Nährmedium. Dies spricht für eine komplette Undurchlässigkeit der Cellulose-Membran für Bakterien, jedoch sind die Bakterien in der Lage die Oberfläche der Cellulose durch die Diffusion von Nährstoffen zu kolonisieren. Im Falle einer Durchstechung der Membran vor Inokulation der Oberfläche mit *S. aureus* im Sinne einer Positivkontrolle waren die Bakterien in der Lage den Nährboden unterhalb der Cellulose-Membran zu kolonisieren (siehe Abbildung 7 C).

Zusammenfassend zeigen die in-vitro-Tests, dass die verwendeten, intakten Cellulose-Membranen eine undurchlässige Barriere für Stoffe einer Größe ab 2  $\mu\text{m}$  darstellen. Diese Barrierefunktion besteht auch in vitro bei der Kolonisation der Cellulose-Oberfläche mit dem Bakterium *S. aureus*.

### 3.2 In-vivo-Versuch (Tierversuch)

In einem weiteren Schritt wurde die Barrierefunktion der biosynthetischen Cellulose im Tierversuch weiter untersucht.

Nach der Implantation heilten die Wunden regelrecht. Während der gesamten Standzeit zeigte keines der Tiere Anzeichen für eine systemische Infektion. Alle Tiere erreichten



den entsprechenden Endpunkt (6-Wochen und 12-Wochen) und kein Tier musste vorzeitig aus der Studie ausgeschlossen werden.

Nach chirurgischer Anlage der subkutanen Tunnel wurde die Ausgangs-Kontamination mittels steriler Wundabstriche erfasst. Pro Implantationsstelle wurde ein Abstrich asserviert. Dementsprechend wurden insgesamt 32 Abstriche im Laufe des Versuches gewonnen, 16 stammten von der 6-Wochen Gruppe und weitere 16 von der 12-Wochen Gruppe. Dabei zeigte sich, dass trotz der Desinfektionsmaßnahmen und Operationsdurchführung unter sterilen Kautelen 59,4% (19/32) der Implantationsstellen schon vor Implantation der s.d.m. bakteriell kolonisiert waren. Dieses Ergebnis war nicht auf eine der Untersuchungsgruppen beschränkt, sondern es fand sich eine ähnliche Kontaminationsrate in beiden Gruppen mit 9/16 positiven Wundabstrichen in der 6-Wochen Gruppe und 10/16 positiven Wundabstrichen in der 12-Wochen Gruppe.

Im Rahmen der Explantation wurden insgesamt 32 s.d.m. von beiden Tiergruppen gewonnen (16 explantierte s.d.m. von der 6-Wochen Gruppe und 16 explantierte s.d.m. von der 12-Wochen Gruppe). Entsprechend handelte es sich bei den 16 explantierten s.d.m. jeder Untersuchungsgruppe um 8 Kontroll-s.d.m. (B-s.d.m.) ohne biosynthetische Cellulose-Beschichtung und 8 s.d.m. mit Cellulose-Beschichtung (BC-s.d.m.). Für getrennte mikrobiologische Untersuchung von Cellulose und darunter liegender Driveline im Falle der BC-s.d.m., wurde die Cellulose im Rahmen der Probengewinnung von der Driveline entfernt. Insgesamt wurden in jeder der beiden Tiergruppen drei unterschiedliche Probenarten mittels Sonikation und anschließender Kultivierung untersucht: (1) Kontroll-Driveline (B-s.d.m.) (n=8), (2) bakterielle Cellulose nach Entfernung von der darunter liegenden s.d.m. (BC) (n=8) und (3) s.d.m. nachdem die Cellulose-Beschichtung entfernt wurde (BCB-s.d.m.) (n=8) (siehe Abbildung 5). Entsprechend wurden sowohl in der 6-Wochen Gruppe als auch in der 12-Wochen Gruppe jeweils 24 mikrobiologische Proben untersucht.

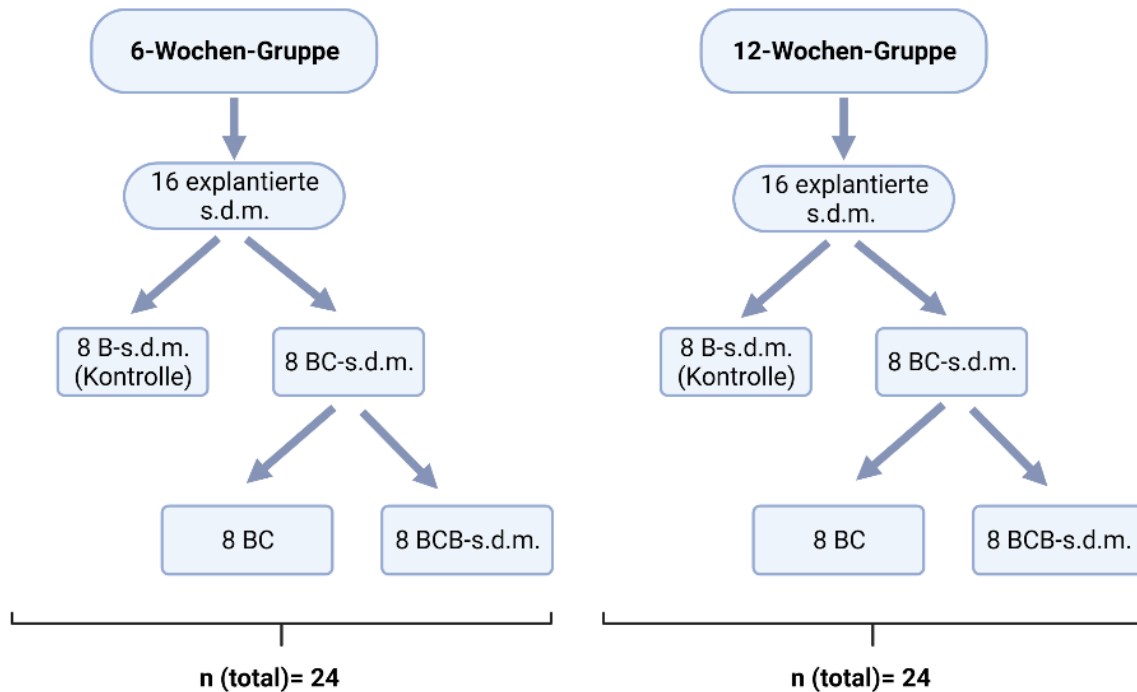


Abbildung 5 Probenaufteilung in den Versuchsgruppen. In beiden Versuchsgruppen (6-Wochen/12-Wochen-Gruppe) wurden insgesamt 16 Silikon-Driveline-Außenhüllen (s.d.m.) implantiert. In jeder Gruppe jeweils 8 Kontrollen ohne Cellulose-Ummantelung und 8 mit Cellulose-Ummantelung. Bei Explantation entstanden drei Probenarten (B-s.d.m., BC, BCB-s.d.m.) mit jeweils 8 Proben. (B-s.d.m. = Driveline-Außenhüllen ohne Cellulose-Beschichtung; BC-s.d.m. = mit Cellulose beschichtete Driveline-Außenhüllen; BC = biosynthetische Cellulose nach Entfernung von der darunterliegenden Driveline-Außenhülle und BCB-s.d.m. = Driveline-Außenhülle nach Entfernung der biosynthetischen Cellulose) (eigene Darstellung)

Bakterielle Kolonisation trat in allen untersuchten Gruppen auf. Die höchsten Kolonisationsraten fanden sich in der BC-s.d.m.-Gruppe. Von den explantierten Cellulose-Proben waren in der 6-Wochen Gruppe 75 % (6/8) kolonisiert und in der 12-Wochen Gruppe alle Proben. Die niedrigsten Kolonisationsraten wiesen die Kontroll-s.d.m. (B-s.d.m.) mit 25% (2/8) in der 6-Wochen Gruppe auf und auch in der 12-Wochen Gruppe waren die Kontroll-s.d.m. um 37,5% (3/8) seltener kolonisiert als die BC-s.d.m. der gleichen Versuchstiergruppe. Erwartungsgemäß stiegen die Kontaminationsraten aller Gruppen mit der Implantationsdauer an.

Die interessanteste Beobachtung dieses Versuches zeigt sich beim Vergleich der Kontaminationsraten zwischen der BC-Gruppe und der BCB-s.d.m.-Gruppe. In der 6-Wochen Gruppe fand sich trotz Kolonisation der Cellulose (BC) in 50% (3/6) keine bakterielle Kolonisation auf der darunterliegende BCB-s.d.m. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in der

12-Wochen Gruppe, bei der die Kolonisationsrate der BCB-s.d.m. um 37,5 % (3/8) niedriger war als in der BC-Gruppe (siehe Abbildung 6).

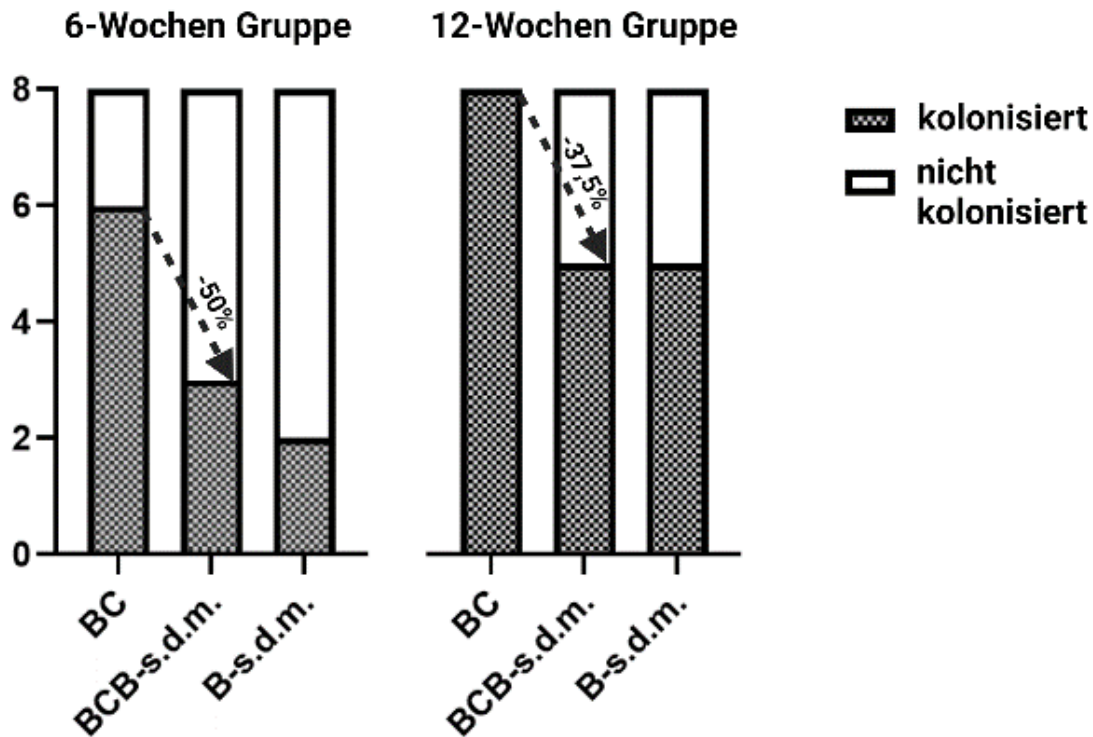


Abbildung 6 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung. Es zeigt sich ein allgemeiner Anstieg der Kolonisationsraten zwischen der 6-Wochen-Gruppe und der 12-Wochen-Gruppe. In beiden Versuchsgruppen zeigte sich die höchste Kolonisationsrate in der Cellulose-Probengruppe (BC). Die darunterliegende Driveline-Außenhüllen (BCB-s.d.m.) waren jedoch im Falle 6-Wochen Gruppe in nur der Hälfte der Fälle kolonisiert und im Falle der 12-Wochen Gruppen um 37,5% weniger kolonisiert. Bei der B-s.d.m Gruppe handelt es sich um die nicht beschichteten Kontroll-Driveline-Außenhüllen. Diese Probengruppe wies in der 6-Wochen-Tiergruppe die niedrigste Kolonisationsrate auf. In der 12-Wochen Gruppe war die B-s.d.m. genauso häufig wie die BCB-s.d.m. kolonisiert. Adaptiert nach Kaemmel et al.<sup>51</sup>

## 4 Diskussion

VAD spezifische Infektionen stellen weiterhin ein Hauptproblem während der Therapie von Patienten dar, die auf ein solches System angewiesen sind. Patienten mit der Indikation „Destination Therapy“ sind in besonderer Weise von dieser Komplikation bedroht, da es außer einem Systemwechsel keine Möglichkeit für diese Patienten gibt, ohne ein L-VAD zu überleben.

Da es trotz der schnellen technischen Entwicklung der letzten zwei Jahrzehnte weiterhin keine marktreife Option zu einem kabellosen transkutanen Energietransfer für State-of-the-Art LVAD Systeme gibt, besteht auch bei der neuesten LVAD Generation ein hohes Infektionsrisiko durch die kontinuierlich verletzte Hautbarriere an der Driveline-Austrittsstelle. Bis zur Lösung aktuell vorherrschender Probleme, die einen transkutanen Energietransfer verhindern, sind Modifikationen der physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Driveline und Veränderungen an der Driveline-Austrittsstelle wichtige Forschungsschwerpunkte, um das Outcome von Patienten mit LVAD Systemen weiter zu verbessern.

Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt für die Verhinderung von Driveline-Infektionen ist, durch die Implantateigenschaften modulierend auf die Schwere der Fremdkörperreaktion gegen die Driveline einzuwirken. Dies könnte verhindern, dass sich immuninkompetentes Gewebe in direkter Nachbarschaft zum Implantat bildet und auch das umgebende Gewebe kein Reservoir für Krankheitserreger darstellt.<sup>34,35,41,42</sup> Entsprechend wurde in dieser Studie der Einfluss einer Ummantelung von LVAD Driveline-Außenhüllen mittels einer speziellen biosynthetischen Cellulose auf das Infektionsgeschehen an der Driveline-Hauteintrittsstelle untersucht.

Durch die Ausschlussgröße von 2 µm zeigt der in vitro-Versuch deutlich, dass die in dieser Studie verwendete biosynthetische Cellulose für Zellen größer als dieser kritische Wert undurchlässig ist (siehe Abbildung 7 A und B). Dementsprechend kam es auch bei der Imprägnierung der Petrischalen-abgewandten Oberfläche der Cellulose nicht zu einer Durchwanderung der Cellulose. Der in vitro-Versuch zeigt allerdings, dass Bakterien – in diesem Falle *S. aureus* – in der Lage sind, die Oberfläche zu kolonisieren (siehe Abbildung 7 C). Dies ist möglich durch eine Diffusion von Nährstoffen aus dem Nährboden durch die Cellulose. Im Falle der Zerstörung der Integrität der Cellulose, beispielsweise durch mechanische Kraft – hier das Durchstechen der Cellulose, verliert die Cellulose

ihre Barrierefunktion und die Pathogene können ungehindert den darunterliegenden Nährboden kolonisieren. Die beobachtete Barrierefunktion konnte anschließend im in-vivo-Versuch reproduziert werden. In einer relevanten Anzahl von Fällen kam es trotz Kolonisation der Cellulose-Ummantelung nicht zu einer Kolonisierung des darunter liegenden Implantates. Diese Barrierefunktion ist auf die Materialbeschaffenheit der Cellulose-Membran zurückzuführen, da die Membran aufgrund ihrer geringen Porengröße den Übertritt der Bakterien verhindert. Die insgesamt höhere Kolonisierungsrate der mit biosynthetischer Cellulose ummantelten Driveline-Hüllen ist möglicherweise Folge des deutlich größeren Querschnitts der Implantate im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollen, da aus anderen Studien bekannt ist, dass ein erhöhter Driveline-Diameter mit einer erhöhten Infektionsrate assoziiert ist.<sup>52</sup>

Wesentliche neue Erkenntnisse der hier dargestellten Studie sind, dass die hier getestete biosynthetische Cellulose von Bakterien sowohl in vitro- als auch in vivo kolonisiert werden kann. Die unbehandelte Cellulose wirkt nicht bakteriostatisch oder bakterizid. Jedoch ist sie durch die geringe Porengröße und die damit verbundene Undurchlässigkeit für Stoffe mit einer Größe über 2  $\mu\text{m}$ , impermeabel für bakterielle Pathogene. Dies konnte sowohl in vitro nachgewiesen als auch in vivo bestätigt werden. Obwohl die biosynthetische Cellulose um die s.d.m. bakteriell kolonisiert war, blieben die darunterliegenden s.d.m. in 50 % der Fälle (6-Wochen Gruppe) und 37,5 % der Fälle (12-Wochen Gruppe) frei von einer Kolonisation. Diese Studie zeigt, dass die hier verwendete biosynthetische Cellulose eine Barriere darstellt, die die bakterielle Kolonisation der darunterliegenden Driveline-Silikonhülle verhindern kann.

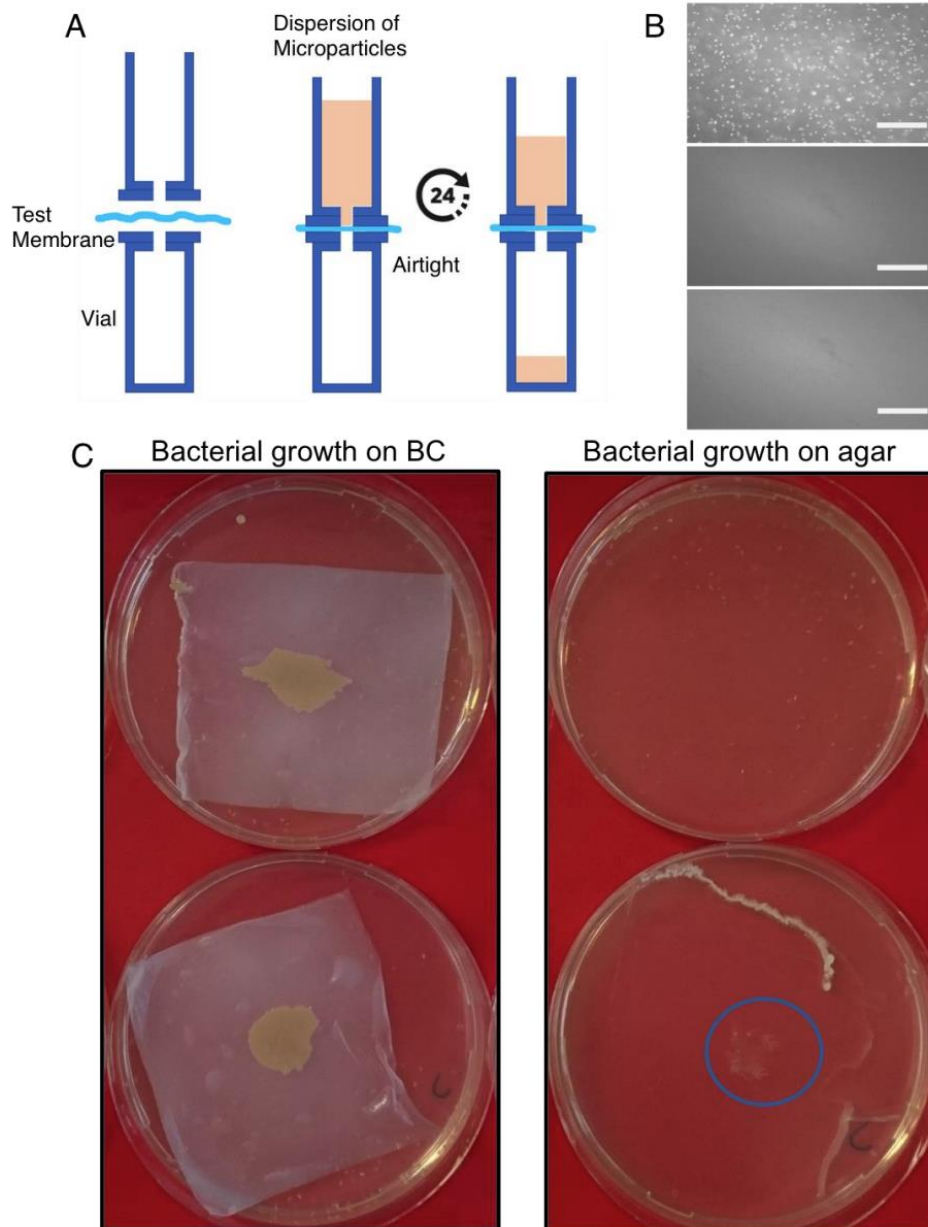


Abbildung 7 In-vitro-Permeationsversuch. (A) Versuchsaufbau zur Untersuchung der Durchlässigkeit der BC mittels Dextran-Kügelchen. Zwei vertikal angeordnete Probengefäße sind mittels einer BC-Membran voneinander getrennt. Zum oberen Probengefäß werden die Dextran-Mikropartikel hinzugefügt und für 24 h inkubiert. (B) Mikroskopische Darstellung der BC nach Inkubation mit Dextran-Mikropartikeln. Auf der Oberseite der Cellulose-Membran zeigen sich Dextran-Kügelchen (oberstes Bild) - Positivkontrolle. Nach 24 h finden sich an der Unterseite der BC keine übertretenden Dextran-Mikropartikel (mittleres Bild). Negativkontrolle nach Inkubation mit destilliertem Wasser (unterstes Bild). (C) Nach Beimpfung der Oberfläche intakter BC mit *Staphylococcus aureus* kommt es an der Oberfläche der Cellulose zur Koloniebildung (oben links). Nach Entfernung der Cellulose vom darunterliegenden Nährboden, zeigt sich kein Übertritt der Erreger durch die BC (oben rechts). Nach Zerstörung der Integrität der BC-Membran mit einer Kanüle können die Erreger die Cellulose durchwandern und den Nährboden erreichen (unten links und rechts). Der blaue Kreis zeigt die Koloniebildung auf dem Nährboden im Bereich der zuvor perforierten BC-Membran. (übernommen von Kaemmel et al.<sup>51</sup>)

#### 4.1 Relevanz der Ergebnisse für klinische Praxis und zukünftige Forschung

Die Ergebnisse dieser Studie sind auf mehrere Arten klinisch relevant. Zwar war die unbehandelte biosynthetische Cellulose in beiden Versuchsgruppen als Driveline-Ummantelung häufiger kolonisiert als die entsprechenden Kontrollen ohne Cellulose-Beschichtung, jedoch konnte eine Kolonisation der darunterliegenden Driveline in einigen Fällen verhindert werden. Die in-vitro beobachtete Barrierefunktion konnte damit auch im Tierversuch reproduziert werden. Darüber hinaus hat die verwendete Cellulose in vorangegangenen Studien ihre besonderen antifibrotischen Eigenschaften im Rahmen der Fremdkörperreaktion gegen kardiale implantierbare elektrische Geräte (cardiac implantable electronic devices, CIED) bewiesen.<sup>47</sup> Eine weitere Studie von Albano et al.<sup>53</sup> hat gezeigt, dass die Verwendung der hier besprochenen biosynthetischen Cellulose nach Imprägnierung mit antibiotischen Substanzen eine deutlich bessere anti-Biofilm Wirkung aufweist, im Vergleich zu anderen Stoffen wie Silicon, Polyurethan oder Titan, die mit denselben antibiotischen Substanzen beschichtet wurden. In Hinblick auf die besprochenen Studien wäre der Einsatz der biosynthetischen Cellulose trotz der insgesamt höheren Kolonisationsrate der unbehandelten Beschichtung im Rahmen von LVAD Drivelines aus mehreren Gründen relevant: (1) entsprechend der Beobachtung von Albano et al. erfolgt die Eradizierung von Biofilm-verursachenden Pathogenen effizienter an der Grenzschicht von antibiotisch vorbehandelter Cellulose und es ist damit wünschenswerter als die Biofilmbildung direkt auf der Driveline, (2) im Falle einer Infektion der Cellulose-Membran könnte diese durch ihre antifibrotischen Eigenschaften mit nur einem kleinen Eingriff aus dem Driveline-Tunnel entfernt werden und damit die Infektion eradiziert werden und (3) die Cellulose könnte ein Reservoir für antibiotische Substanzen während der Implantationsdauer der LVAD Systeme darstellen.

Entsprechend sollte in einem weiteren Tierversuch die Fähigkeit von antibiotisch vorbehandelter Cellulose zur Reduktion von Driveline-Infektionen untersucht werden. Entscheidend ist die Auswahl Biofilm-wirksamer Antibiotika wie beispielsweise von Rifampicin. Dabei könnte man sich in einem ersten Schritt an den Beobachtungen der Studie von Albano et al. orientieren. Um den wichtigen Unterschied zwischen Implantatdurchmessern zwischen unbeschichteten Drivelines und Implantaten mit Cellulose-Ummantelung auszugleichen, sollte die Cellulose-Membran in folgenden Studien im Sinne eines einlagigen zirkulären Schutzes als Schlauch auf die Drivelines aufgebracht werden. Dies wäre

möglich durch Dehydrierung eines entsprechenden Schlauches auf den Drivelines und die anschließende Rehydrierung.

Beobachtungen dieser Studie und den zuvor besprochen Studien die einen Zusammenhang zwischen Implantatdurchmesser und Infektionsrisiko beschreiben<sup>52</sup>, führte zur Entwicklung einer Driveline-Alternative. Diese wird aktuell in einem Tierversuch getestet.<sup>22</sup> Durch die generierte Hypothese, dass kleinere Querschnitte der Implantate zu weniger Fremdkörperreaktion, weniger immuninkompetentem Gewebe und letztlich zu geringeren Infektionsraten führt, wird aktuell eine transkutane Energietransfer über dünne Einzelleiter entwickelt. In einem ersten Versuch wurden mit Silikon-beschichtete Kupferdrähte (Durchmesser zwischen 0,2–0,4 mm) mit einer speziellen 3D Topographie in Großtieren implantiert. Um vergleichbare Leitungseigenschaften zu einer typischen LVAD Driveline zu erhalten, die im Falle des HeartMate3 (Abbott, IL, USA) einen Außendurchmesser von circa 6 mm aufweisen, wurden je nach Durchmesser der Kupferleiter eine Vielzahl dieser implantiert, um den gleichen Gesamtquerschnitt zu erreichen. Einige wichtige Impulse und Erfahrungen, der im Manteltext beschriebenen Studie, sind in das Versuchsdesign der Studie von Kourouklis et al. eingeflossen. Möglicherweise stellt in Zukunft der Energietransfer über multiple kleine Leiter eine infektionssichere Alternative zur handelsüblichen Driveline dar. Es bleibt die endgültigen Daten der Studie abzuwarten.

## 4.2 Stärken und Schwächen der Studie

Durch den in vitro-Versuch wurde in einem ersten Schritt deutlich dargestellt, dass die in diesem Versuch verwendete biosynthetische Cellulose eine Permeabilitätsbarriere für Bakterien darstellt. Diese bildete den Ausgangspunkt für eine weitere Untersuchung dieser Eigenschaft im Tierversuch. Um möglichst nahe an einem realen klinischen Szenario zu bleiben, wurden für den Tierversuch Großtiere und die s.d.m. von handelsüblichen LVADs verwendet. Im Einklang mit den 3-R (Replace, Reduce, Refine) Prinzipien in der Tierforschung mussten entsprechende Modifikationen am Versuchsaufbau vorgenommen werden. Um die Gesamtanzahl zu senken, mussten jedem Tier insgesamt vier Drivelines (2 B-s.d.m., 2 BC-s.d.m.) implantiert werden. Dieser Ansatz unterscheidet sich deutlich von der klinischen Situation, bei der Patienten mit isoliertem LVAD eine Driveline mit dazugehöriger Austrittsstelle besitzen. Im Falle der vorgestellten Studie wurden insgesamt 32 s.d.m. bei 8 Tieren implantiert. Darüber hinaus wurden die s.d.m. Stücke in einer Weise implantiert, die anders als in der klinischen Realität mit jeweils zwei Driveline-



Austrittsstellen einhergeht. Entsprechend wurden bei 32 Implantaten insgesamt 64 Austrittsstellen angelegt, die eine potentielle Eintrittspforte für Erreger darstellen. Zusammen mit der kürzeren Länge der verwendeten s.d.m. von 6-10 cm im Vergleich zu circa 20 cm Driveline Länge im Rahmen einer L-VAD Implantation und der damit zusammenhängenden kürzeren subkutanen Tunnel, erhöht der gewählte Versuchsaufbau das Risiko für eine Kolonisation der Driveline und damit auch für eine Driveline-Infektion. Dieser Ansatz des maximalen „Stresstests“ wurde aus zwei Gründen gewählt: (1) da die Inzidenz von Driveline-Infektionen mit der Implantationsdauer ansteigt, konnte die Standzeit der Tiere nach Implantation auf 3 Monate reduziert werden und (2) erhöht sich die Validität der Studienergebnisse, wenn Implantate in dieser Versuchsanordnung frei von bakterieller Kolonisation bleiben. Eine weitere Stärke dieser Studie ist die Definition eines „Versagens“ der Schutzfunktion der Cellulose. Sobald eine bakterielle Kolonisierung der Driveline trotz schützender Celluloseummantelung festgestellt wurde, wurde ein Versagen der Barrierefunktion angenommen. Diese Definition ist im Vergleich zur klinischen Realität sehr strikt, da die Kolonisation von Drivelines nicht immer mit einer klinisch relevanten Infektion korreliert. Da es sich bei Implantat-Infektionen in der Regel um Biofilm-assoziierte Infektionen handelt, wurde für die mikrobiologische Diagnostik in dieser Studie primär die Sonikation als Verfahren der Wahl gewählt. Mittlerweile stellt das Verfahren der Sonikation den Goldstandard für die Diagnostik von Implantat-Infektionen dar. Im Vergleich zu konventioneller mikrobiologischer Diagnostik mittels Abstrichen ist die Sensitivität der Sonikation deutlich höher.<sup>54</sup>

Auf der anderen Seite müssen auch einige Schwächen für die korrekte Interpretation der Studienergebnisse beachtet werden. Da die s.d.m. nachträglich mit hydrierter biosynthetischer Cellulose ummantelt wurden, besaßen die zu untersuchenden Implantate einen größeren Außendurchmesser als die Kontrollen. Da vorangegangene Studien den Durchmesser der Driveline als einen relevanten Risikofaktor für die Entstehung von Driveline-Infektionen identifiziert haben, könnte dies die Ergebnisse des *in vivo*-Versuchs beeinflusst haben.<sup>52</sup> Darüber hinaus muss beachtet werden, dass trotz gründlicher chirurgischer Antisepsis schon bei Implantation ein Großteil der subkutanen Tunnel eine bakterielle Kontamination aufwies. Dies trat sowohl in der 6-Wochen- als auch in der 12-Wochen Gruppe auf. Diese Beobachtung hat jedoch geringen Einfluss auf die externe Validität der Ergebnisse, da auch in der Humanmedizin bekannt ist, dass Desinfektionsmittel lediglich eine Keimreduktion bedingen und keine vollständige Sterilität erzeugen.

Zusätzlich wurde diesem Störfaktor mit einer perioperativen Antibiotikaphylaxe entgegengewirkt. In zukünftigen Studien könnte der Einfluss der bakteriellen Hautkolonisation mittels eines Vergleiches des Erregerspektrums zwischen Wundabstrich und Sonikation der explantierten Implantate untersucht werden. Anders als bei Patienten mit LVADs ist es in der Veterinärmedizin deutlich schwerer, aseptische Wundverhältnisse dauerhaft aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund sind die Implantate schon grundsätzlich einem höheren Risiko ausgesetzt, kolonisiert zu werden. Ein weiterer Schwachpunkt dieser Studie ist die geringe Tieranzahl und die damit verbundene geringe Anzahl an untersuchten Implantaten.

## 5 Schlussfolgerungen

VAD-spezifische Infektionen und besonders Driveline-Infektionen stellen weiterhin eine Hauptkomplikation während der Therapie mit LVADs dar. Da weiterhin keine zugelassenen transkutanen Energietransfersysteme verfügbar sind, sind Modifikationen der bestehenden Driveline-abhängigen Systeme ein wichtiger Forschungsschwerpunkt. In der hier präsentierten Arbeit, wurden BC-Membranen auf die Oberfläche handelsüblicher LVAD-Drivelines aufgebracht und deren Funktion als Barriere gegenüber bakterieller Durchwanderung untersucht. Trotz der insgesamt höheren Kolonisierungsrate der BC-Membran ummantelten Drivelines zeigt der beschriebene Versuch, dass die BC als Barriere fungiert und die bakterielle Kolonisation der darunterliegenden Driveline verhindern kann. Diese Beobachtung ist klinisch relevant, da eine unabhängige Studie gezeigt hat, dass die verwendete Cellulose, sobald sie mit Antibiotika beladen ist, weniger anfällig für bakterielle Kolonisation ist als antibiotisch beschichtete Materialien wie Silikon. Dementsprechend ist es wünschenswert, eine bakterielle Kolonisation auf die Cellulose zu begrenzen und das darunterliegende Implantat zu schützen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass in zukünftigen Studien die Querschnittsfläche der Implantate kleiner sein muss, um den vollen protektiven Effekt der BC zu nutzen.

## Literaturverzeichnis

- 1 Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A. & Hoes, A. W. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* **22**, 1342-1356 (2020). <https://doi.org/10.1002/ejhf.1858>
- 2 McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A. W., Jaarsma, T., Jankowska, E. A., Lainscak, M., Lam, C. S. P., Lyon, A. R., McMurray, J. J. V., Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Francesco Piepoli, M., Price, S., Rosano, G. M. C., Ruschitzka, F. & Kathrine Skibellund, A. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* **42**, 3599-3726 (2021). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
- 3 Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A. & Hoes, A. W. Epidemiology of heart failure. *European Journal of Heart Failure* **22**, 1342-1356 (2020). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejhf.1858>
- 4 Cook, C., Cole, G., Asaria, P., Jabbour, R. & Francis, D. P. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol* **171**, 368-376 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.028>
- 5 Lesyuk, W., Kriza, C. & Kolominsky-Rabas, P. Cost-of-illness studies in heart failure: a systematic review 2004-2016. *BMC Cardiovasc Disord* **18**, 74 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0815-3>
- 6 Kemp, C. D. & Conte, J. V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology* **21**, 365-371 (2012). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.11.007>
- 7 Stevenson, L. W., Pagani, F. D., Young, J. B., Jessup, M., Miller, L., Kormos, R. L., Naftel, D. C., Ullisney, K., Desvigne-Nickens, P. & Kirklin, J. K. INTERMACS Profiles of Advanced Heart Failure: The Current Picture. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **28**, 535-541 (2009). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.healun.2009.02.015>
- 8 Kadakia, S., Moore, R., Ambur, V. & Toyoda, Y. Current status of the implantable LVAD. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* **64**, 501-508 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11748-016-0671-y>
- 9 Krabatsch, T., Drews, T., Potapov, E., Weng, Y., Pasic, M. & Hetzer, R. Different surgical strategies for implantation of continuous-flow VADs-Experience from Deutsches Herzzentrum Berlin. *Ann Cardiothorac Surg* **3**, 472-474 (2014). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2225-319X.2014.09.06>
- 10 Hannan, M. M., Xie, R., Cowger, J., Schueler, S., de By, T., Dipchand, A. I., Chu, V. H., Cantor, R. S., Koval, C. E., Krabatsch, T., Hayward, C. S., Nakatani, T. & Kirklin, J. K. Epidemiology of infection in mechanical circulatory support: A global analysis from the ISHLT Mechanically Assisted Circulatory Support Registry. *J Heart Lung Transplant* **38**, 364-373 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.01.007>
- 11 Goldstein, D. J., Naftel, D., Holman, W., Bellumkonda, L., Pamboukian, S. V., Pagani, F. D. & Kirklin, J. Continuous-flow devices and percutaneous site infections: clinical outcomes. *J Heart Lung Transplant* **31**, 1151-1157 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.healun.2012.05.004>

- 12 Blanco-Guzman, M. O., Wang, X., Vader, J. M., Olsen, M. A. & Dubberke, E. R. Epidemiology of Left Ventricular Assist Device Infections: Findings From a Large Nonregistry Cohort. *Clin Infect Dis* **72**, 190-197 (2021). <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa011>
- 13 Shah, P., Yuzefpolskaya, M., Hickey, G. W., Breathett, K., Wever-Pinzon, O., Ton, V. K., Hiesinger, W., Koehl, D., Kirklin, J. K., Cantor, R. S., Jacobs, J. P., Habib, R. H., Pagani, F. D. & Goldstein, D. J. Twelfth Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support Report: Readmissions After Left Ventricular Assist Device. *Ann Thorac Surg* **113**, 722-737 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2021.12.011>
- 14 Agrawal, S., Garg, L., Shah, M., Agarwal, M., Patel, B., Singh, A., Garg, A., Jorde, U. P. & Kapur, N. K. Thirty-Day Readmissions After Left Ventricular Assist Device Implantation in the United States: Insights From the Nationwide Readmissions Database. *Circ Heart Fail* **11**, e004628 (2018). <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.117.004628>
- 15 Hannan, M. M., Husain, S., Mattner, F., Danziger-Isakov, L., Drew, R. J., Corey, G. R., Schueler, S., Holman, W. L., Lawler, L. P., Gordon, S. M., Mahon, N. G., Herre, J. M., Gould, K., Montoya, J. G., Padera, R. F., Kormos, R. L., Conte, J. V. & Mooney, M. L. Working formulation for the standardization of definitions of infections in patients using ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant* **30**, 375-384 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.01.717>
- 16 Qu, Y., Peleg, A. Y. & McGiffin, D. Ventricular Assist Device-Specific Infections. *J Clin Med* **10** (2021). <https://doi.org/10.3390/jcm10030453>
- 17 Kusne, S., Mooney, M., Danziger-Isakov, L., Kaan, A., Lund, L. H., Lyster, H., Wieselthaler, G., Aslam, S., Cagliostro, B., Chen, J., Combs, P., Cochrane, A., Conway, J., Cowger, J., Frigerio, M., Gellatly, R., Grossi, P., Gustafsson, F., Hannan, M., Lorts, A., Martin, S., Pinney, S., Silveira, F. P., Schubert, S., Schueler, S., Strueber, M., Uriel, N., Wrightson, N., Zabner, R. & Huprikar, S. An ISHLT consensus document for prevention and management strategies for mechanical circulatory support infection. *J Heart Lung Transplant* **36**, 1137-1153 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.06.007>
- 18 Pavlovic, N. V., Randell, T., Madeira, T., Hsu, S., Zinoviev, R. & Abshire, M. Risk of left ventricular assist device driveline infection: A systematic literature review. *Heart Lung* **48**, 90-104 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2018.11.002>
- 19 Shore, S., Pienta, M. J., Watt, T. M. F., Yost, G., Townsend, W. A., Cabrera, L., Feters, M. D., Chenoweth, C., Aaronson, K. D., Pagani, F. D. & Likosky, D. S. Non-patient factors associated with infections in LVAD recipients: A scoping review. *J Heart Lung Transplant* **41**, 1-16 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.10.006>
- 20 Angleitner, P., Kaider, A., De By, T., Dimitrov, K., Schlöglhofer, T., Tops, L. F., Fiane, A. E., Rábago, G., Laufer, G. & Zimpfer, D. Obesity and outcomes after left ventricular assist device implantation: insights from the EUROMACS Registry. *Eur J Cardiothorac Surg* **62** (2022). <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezac401>
- 21 Dean, D., Kallel, F., Ewald, G. A., Tatoes, A., Sheridan, B. C., Brewer, R. J., Caldeira, C., Farrar, D. J. & Akhter, S. A. Reduction in driveline infection rates: Results from the HeartMate II Multicenter Driveline Silicone Skin Interface (SSI) Registry. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **34**, 781-789 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.11.021>
- 22 Kourouklis, A. P., Kaemmel, J., Wu, X., Potapov, E., Cesarovic, N., Ferrari, A., Starck, C., Falk, V. & Mazza, E. Systems of conductive skin for power transfer in

- clinical applications. *Eur Biophys J* **51**, 171-184 (2022).  
<https://doi.org:10.1007/s00249-021-01568-8>
- 23 Renz N., T. A., Potapov E., Schönraht F. Vol. 2 (PRO-IMPLANT FOUNDATION, 2020).
- 24 Pieri, M., Scandroglio, A. M., Müller, M., Pergantis, P., Kretzschmar, A., Kaufmann, F., Falk, V., Krabatsch, T., Arlt, G., Potapov, E. & Kukucka, M. Surgical management of driveline infections in patients with left ventricular assist devices. *J Card Surg* **31**, 765-771 (2016). <https://doi.org:10.1111/jocs.12860>
- 25 Mulzer, J., Trampuz, A. & Potapov, E. V. Treatment of chronic left ventricular assist device infection with local application of bacteriophages. *Eur J Cardiothorac Surg* **57**, 1003-1004 (2020). <https://doi.org:10.1093/ejcts/ezz295>
- 26 Rojas, S. V., Junghans, S., Fox, H., Lazouski, K., Schramm, R., Morshuis, M., Gummert, J. F. & Gross, J. Bacteriophage-Enriched Galenic for Intrapericardial Ventricular Assist Device Infection. *Antibiotics (Basel)* **11** (2022).  
<https://doi.org:10.3390/antibiotics11050602>
- 27 Solano, C., Echeverez, M. & Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **18**, 96-104 (2014). <https://doi.org:10.1016/j.mib.2014.02.008>
- 28 Lee, S. W., Phillips, K. S., Gu, H., Kazemzadeh-Narbat, M. & Ren, D. How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation. *Biomaterials* **268**, 120595 (2021).  
<https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120595>
- 29 Kranzl, M., Stoiber, M., Schaefer, A. K., Riebandt, J., Wiedemann, D., Marko, C., Laufer, G., Zimpfer, D., Schima, H. & Schlöglhofer, T. Driveline Features as Risk Factor for Infection in Left Ventricular Assist Devices: Meta-Analysis and Experimental Tests. *Front Cardiovasc Med* **8**, 784208 (2021).  
<https://doi.org:10.3389/fcvm.2021.784208>
- 30 Qu, Y., McGiffin, D., Kure, C., Ozcelik, B., Fraser, J., Thissen, H. & Peleg, A. Y. Biofilm formation and migration on ventricular assist device drivelines. *J Thorac Cardiovasc Surg* **159**, 491-502.e492 (2020).  
<https://doi.org:10.1016/j.jtcvs.2019.02.088>
- 31 Qu, Y., McGiffin, D., Hayward, C., McLean, J., Duncan, C., Robson, D., Kure, C., Shen, R., Williams, H., Mayo, S., Thissen, H., Marasco, S., Zimmet, A., Negri, J., Jansz, P., Dhital, K., Kaye, D. M. & Peleg, A. Y. Characterization of infected, explanted ventricular assist device drivelines: The role of biofilms and microgaps in the driveline tunnel. *J Heart Lung Transplant* **39**, 1289-1299 (2020).  
<https://doi.org:10.1016/j.healun.2020.07.015>
- 32 Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø. & Høiby, N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology* (2022).  
<https://doi.org:10.1038/s41579-022-00682-4>
- 33 Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199-210 (2008). <https://doi.org:10.1038/nrmicro1838>
- 34 Arciola, C. R., Campoccia, D. & Montanaro, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol* **16**, 397-409 (2018).  
<https://doi.org:10.1038/s41579-018-0019-y>
- 35 Zimmerli, W., Lew, P. D. & Waldvogel, F. A. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *J Clin Invest* **73**, 1191-1200 (1984).  
<https://doi.org:10.1172/jci111305>
- 36 Klopffleisch, R. & Jung, F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A* **105**, 927-940 (2017).  
<https://doi.org:10.1002/jbm.a.35958>

- 37 Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* **20**, 86-100 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
- 38 ANDERSON, J. M. Inflammatory Response to Implants. *ASAIO Journal* **34**, 101-107 (1988).
- 39 Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. & Pearcy, M. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* **11**, 1-18 (2005). <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1>
- 40 Sheikh, Z., Brooks, P. J., Barzilay, O., Fine, N. & Glogauer, M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials (Basel)* **8**, 5671-5701 (2015). <https://doi.org/10.3390/ma8095269>
- 41 Zaat, S., Broekhuizen, C. & Riool, M. Host tissue as a niche for biomaterial-associated infection. *Future Microbiol* **5**, 1149-1151 (2010). <https://doi.org/10.2217/fmb.10.89>
- 42 Higgins, D. M., Basaraba, R. J., Hohnbaum, A. C., Lee, E. J., Grainger, D. W. & Gonzalez-Juarrero, M. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials. *Am J Pathol* **175**, 161-170 (2009). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080962>
- 43 Mohite, B. V. & Patil, S. V. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnol Appl Biochem* **61**, 101-110 (2014). <https://doi.org/10.1002/bab.1148>
- 44 Wei, Q., Becherer, T., Angioletti-Uberti, S., Dzubiella, J., Wischke, C., Neffe, A. T., Lendlein, A., Ballauff, M. & Haag, R. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**, 8004-8031 (2014). <https://doi.org/10.1002/anie.201400546>
- 45 Botton, S., Robotti, F., Jayathissa, P., Hegglin, A., Bahamonde, N., Heredia-Guerrero, J. A., Bayer, I. S., Scarpellini, A., Merker, H., Lindenblatt, N., Poulikakos, D. & Ferrari, A. Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-based biolithography (GAB). *ACS Nano* **9**, 206-219 (2015). <https://doi.org/10.1021/nn5036125>
- 46 Robotti, F., Botton, S., Frascchetti, F., Mallone, A., Pellegrini, G., Lindenblatt, N., Starck, C., Falk, V., Poulikakos, D. & Ferrari, A. A micron-scale surface topography design reducing cell adhesion to implanted materials. *Sci Rep* **8**, 10887 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29167-2>
- 47 Robotti, F., Sterner, I., Botton, S., Monné Rodríguez, J. M., Pellegrini, G., Schmidt, T., Falk, V., Poulikakos, D., Ferrari, A. & Starck, C. Microengineered biosynthesized cellulose as anti-fibrotic in vivo protection for cardiac implantable electronic devices. *Biomaterials* **229**, 119583 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119583>
- 48 Großhauser, J., Reiter, K., Grosse-Siestrup, C., Kertzsch, U. & Affeld, K. Protective waistcoat for goats in a long-term animal model. *BIOMEDICAL ENGINEERING-BIOMEDIZINISCHE TECHNIK* **59**, S56-+ (2014).
- 49 Camboni, D., Zerditzki, M., Hirt, S., Tandler, R., Weyand, M. & Schmid, C. Reduction of INCOR® driveline infection rate with silicone at the driveline exit site. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **24**, 222-228 (2017). <https://doi.org/10.1093/icvts/ivw336>
- 50 Izakovicova, P., Borens, O. & Trampuz, A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev* **4**, 482-494 (2019). <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180092>



- 51 Kaemmel, J., Ferrari, A., Robotti, F., Bottan, S., Eichenseher, F., Schmidt, T., Gonzalez Moreno, M., Trampuz, A., Eulert-Grehn, J. J., Knosalla, C., Potapov, E., Falk, V. & Starck, C. On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines. *Sci Rep* **11**, 18776 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98220-4>
- 52 Imamura, T., Murasawa, T., Kawasaki, H., Kashiwa, K., Kinoshita, O., Nawata, K. & Ono, M. Correlation between driveline features and driveline infection in left ventricular assist device selection. *J Artif Organs* **20**, 34-41 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10047-016-0923-8>
- 53 Albano, M., Greenwood-Quaintance, K. E., Karau, M. J., Mandrekar, J. N. & Patel, R. Anti-biofilm activity of antibiotic-loaded Hylomate®. *IJC Heart & Vasculature* **34**, 100801 (2021). [https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2021.100801](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2021.100801)
- 54 Trampuz, A., Piper, K. E., Jacobson, M. J., Hanssen, A. D., Unni, K. K., Osmon, D. R., Mandrekar, J. N., Cockerill, F. R., Steckelberg, J. M., Greenleaf, J. F. & Patel, R. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection. *New England Journal of Medicine* **357**, 654-663 (2007). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061588>



## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julius Elias Kaemmel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [**Biosynthetische Cellulose - Neuartige Barriere gegen Biofilmbildung auf Ventricular Assist Device-Drivelines / Biosynthetic Cellulose – Novel barrier against biofilm formation on ventricular assist device drivelines**] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Ich bin der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Starck beigetreten, nachdem der Tierversuch für die diesem Manteltext zu Grunde liegende Publikation von Kaemmel et al.<sup>51</sup> durch die zuständige Behörde bereits genehmigt war. Die Implantation und Explantation der Versuchsimplantate, die in dieser Publikation beschrieben wurden, habe ich zusammen mit Herrn Prof. Starck selbst durchgeführt. Es wurden entsprechend meiner Vorgaben die Probengewinnung durchgeführt und Modifikationen an der Entnahmep Praxis vorgenommen. Darüber hinaus war ich aktiv unter Anleitung durch die Tierärztin Dr. Schmidt an der Konditionierung und Nachsorge der Tiere während des Versuchs beteiligt. Die regelmäßigen Wundkontrollen und -versorgungen wurden durch mich durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Herrn PD Trampuz, Frau Dr. Moreno-Gonzalez und Herrn Prof. Starck habe ich die Methodik für die mikrobiologische Untersuchung der explantierten VAD-Drivelines erarbeitet. Nach Einführung durch Frau Dr. Moreno-Gonzales habe ich die mikrobiologische Untersuchung mittels Sonikation selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Die deskriptive Datenanalyse, die in der Publikation dargestellt wurde, wurde durch mich durchgeführt, Herr Dr. Ferrari stand mir beratend zur Seite. Abschließend habe ich die Rohfassung der Publikation „On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines“ geschrieben. Nach Beratung und Korrekturen durch Herrn Dr. Ferrari, Erst- und Zweitbetreuer und schlussendlich durch die Co-Autoren habe ich die finale Fassung der präsentierten Publikation geschrieben. Danach habe ich die Publikation bei der Fachzeitschrift „Biomaterials“ (IF = 12.479; Stand 2020) eingereicht. Diese wurde nach dem Review abgelehnt. Dabei fungierte ich als der korrespondierende Autor. Nachdem ich weitere Anpassungen an der Publikation entsprechend der Vorgaben der Fachzeitschrift „Scientific Reports“ vorgenommen hatte und dies mit den Co-Autoren abgestimmt hatte, habe ich als korrespondierender Autor die Publikation erneut eingereicht. Die Anmerkungen und Änderungswünsche durch die Reviewer habe ich in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Starck und Herrn Dr. Ferrari beantwortet. Schlussendlich ist die Publikation im September 2021 in der Fachzeitschrift „Scientific Reports“ (IF = 4.996; Stand 2021) des Nature Research Verlages erschienen. Die Abbildungen 1, 2 und 3 der Publikation wurden durch mich erstellt.

Julius Elias Kaemmel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Kaemmel J, Ferrari A, Robotti F, Bottan S, Eichenseher F, Schmidt T, Gonzalez Moreno M, Trampuz A, Eulert-Grehn JJ, Knosalla C, Potapov E, Falk V, Starck C. On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines. Sci Rep. 2021 Sep 21;11(1):18776. doi: 10.1038/s41598-021-98220-4. PMID: 34548588; PMCID: PMC8455583.

Beitrag im Einzelnen:

- Versuchsdurchführung (Implantation/Explantation der VAD-Drivelines)
- Vorbereitung des Tierversuchs (Konditionierung der Tiere an Haltungsbedingungen, Vorbereiten des OP-Saals, Probenlogistik)
- Nachsorge für die Tiere (Wundkontrollen, Verbandswechsel)
- Planung und Durchführung der mikrobiologischen Analyse der explantierten VAD-Drivelines
- Datenanalyse
- Verfassen des Manuskripts
- Einreichung des fertigen Manuskripts bei wissenschaftlichen Verlagen

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

# Druckexemplar der Publikation - On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines

[www.nature.com/scientificreports](https://www.nature.com/scientificreports)

## scientific reports



OPEN

### On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines

Julius Kaemmel<sup>1,✉</sup>, Aldo Ferrari<sup>2</sup>, Francesco Robotti<sup>2,3</sup>, Simone Bottan<sup>2</sup>, Fritz Eichenseher<sup>4</sup>, Tanja Schmidt<sup>5</sup>, Mercedes Gonzalez Moreno<sup>6,7</sup>, Andrej Trampuz<sup>6,7</sup>, Jaime-Jürgen Eulert-Grehn<sup>1,8</sup>, Christoph Knosalla<sup>1,8,9</sup>, Evgenij Potapov<sup>1,8</sup>, Volkmar Falk<sup>1,8,10</sup> & Christoph Starck<sup>1,8</sup>

Bacterial colonization of drivelines represents a major adverse event in the implantation of left ventricular assist devices (L-VADs) for the treatment of congestive heart failure. From the external driveline interface and through the skin breach, pathogens can ascend to the pump pocket, endangering the device function and the patient's life. Surface Micro-Engineered Biosynthesized cellulose (BC) is an implantable biomaterial, which minimizes fibrotic tissue deposition and promotes healthy tissue regeneration. The topographic arrangement of cellulose fibers and the typical material porosity support its potential protective function against bacterial permeation; however, this application has not been tested in clinically relevant animal models. Here, a goat model was adopted to evaluate the barrier function of BC membranes. The external silicone mantle of commercial L-VAD drivelines was implanted percutaneously with an intervening layer of BC to separate them from the surrounding soft tissue. End-point evaluation at 6 and 12 weeks of two separate animal groups revealed the local bacterial colonization at the different interfaces in comparison with unprotected driveline mantle controls. The results demonstrate that the BC membranes established an effective barrier against the bacterial colonization of the outer driveline interface. The containment of pathogen infiltration, in combination with the known anti-fibrotic effect of BC, may promote a more efficient immune clearance upon driveline implantation and support the efficacy of local antibiotic treatments, therefore mitigating the risk connected to their percutaneous deployment.

Congestive heart failure is a common and severe medical condition, with 2.2% prevalence in the United States<sup>1</sup>. Individuals in the age of 40 have a lifetime risk of 20% for developing heart failure<sup>2</sup>. In the frame of an ageing Western population, these figures are bound to further increase<sup>3</sup>.

Due to the shortage of donor organs and the limited therapeutic options for patients with end-stage heart failure, left ventricular assist devices (L-VADs) have emerged as a viable alternative to heart transplantation<sup>4</sup>. Nowadays, VADs are implanted with different therapeutic goals, ranging from bridge-to-transplantation to destination therapy<sup>5</sup>. Patients treated with continuous flow L-VADs have 1-year survival rates comparable to those patients receiving an orthotopic heart transplant<sup>6,7</sup>. However, these figures diverge at 3 years, with patients under mechanical support showing significantly reduced survival<sup>6,7</sup>. After 1 year on mechanical circulatory support approximately 19% of patients develop at least one driveline infection<sup>8</sup>. In general, VAD infections are associated with reduced survival of patients<sup>8,9</sup>.

<sup>1</sup>Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, German Heart Center Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. <sup>2</sup>Hylomorph AG, Technoparkstrasse 1, 8005 Zurich, Switzerland. <sup>3</sup>Wyss Zurich, Zurich, Switzerland. <sup>4</sup>Food Microbiology Laboratory, ETH Zurich, Schmelzbergstrasse 7, 8092 Zurich, Switzerland. <sup>5</sup>Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. <sup>6</sup>Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Center for Musculoskeletal Surgery, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. <sup>7</sup>Berlin Institute of Health at Charité-Universitätsmedizin Berlin, BIH Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. <sup>8</sup>DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, Berlin, Germany. <sup>9</sup>Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>10</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany. ✉email: kaemmel@dhzb.de

State of the art L-VADs [e.g. HeartMate3 (HM3; Abbott, Chicago, IL, USA) and HeartWare HVAD (HW; Medtronic, Minneapolis, MN, USA)] rely on an external power source and control unit thus requiring a percutaneous driveline. The associated exit sites represent a breach in the skin barrier function against pathogens. The superficial colonization of the driveline, able to ascend and reach the pump pocket, is a common adverse event connected to VADs for mechanical circulatory support<sup>10</sup>. According to the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), VAD infections are classified as follows: VAD-specific infections, VAD-related infections and non-VAD infections. Infections involving the driveline and the adjacent tissue are accounted as VAD-specific infections<sup>11</sup>.

These infections are mostly caused by Gram-positive or Gram-negative bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*<sup>12</sup>, whereas fungal infections only account for a small fraction of them.

In addition to this, and in all cases even if to a variable extent, the interaction between an implanted medical device and the body tissues elicits an acute and chronic inflammation, the foreign body reaction (FBR). Over time, FBR leads to the encapsulation of the synthetic materials in a dense fibrous tissue and establishes an environment with poor vascularization and reduced immune surveillance<sup>13–15</sup>.

This further complicates the picture, as the silicone interface of the drivelines becomes rapidly encapsulated. In this scenario, the interplay between FBR and implant infection is twofold. First, the dysregulated immune response to foreign bodies, leading to fibrosis, hampers the local tissue ability to react to contaminating pathogens and is conducive to the establishment of a persisting infection around the implant<sup>14,15</sup>. The colonization of soft tissues in the surgical pocket can additionally generate niches for pathogen survival. These have been shown to cause relapsing infections upon revision of contaminated implants<sup>14</sup>.

Second, the metallic or silicone surfaces of most implants are prone to bacterial adhesion and biofilm formation<sup>15</sup>. The process is supported by the aspecific protein fouling of abiotic surfaces which mediates bacteria docking via adhesins, binding to matrix proteins such as collagen, fibronectin, and fibrinogen. The fate of the implant is then decided by whether host cells can integrate the biomaterial before bacteria colonize the surface. If bacteria win this 'race to the surface'<sup>15</sup> a biofilm is established, which cannot be cleared by the host immune system and is often resistant to antimicrobial treatments. Persistent biofilms cause chronic inflammations in the surgical pocket and represent a root cause of implant failure and death. Altogether, driveline infections and their fibrotic encapsulation remain major challenges tainting the success of VADs as viable treatment for heart failure. Minimizing FBR and limiting biofilm formation shall be therefore regarded as key measure against recurrent implant infections.

Biosynthesized cellulose (BC) is a naturally occurring polymer that has received increasing consideration as promising implantable biomaterial<sup>16</sup>. Bacterial fermentation of sugars at the interface with air generates free-form layers of a cellulose hydrogel containing > 95% of water. The process can be harnessed by up-scalable fabrication protocols, which control the distribution of cellulose nanofibers, the resulting nanoscale porosity, and the microscale surface geometry<sup>17</sup>. Currently, BC is approved as *dura mater* substitute<sup>18</sup>, and chronic in vivo tests demonstrate its efficacy in minimizing the foreign body reaction against cardiac implantable electronic devices<sup>13</sup>. Surface Micro-Engineered BC<sup>17</sup> has shown excellent antifouling and antiadhesive properties significantly reducing fibrotic tissue deposition around soft tissue implants<sup>13</sup>. In addition, it establishes a porous interface improving the efficacy of antibiotic molecules, as compared to metals or silicones<sup>19</sup>. However, the role of BC as barrier against bacterial infiltration and colonization remains to be proven both in vitro and in vivo.

Here, we tested the protective effect of BC layers to prevent bacterial colonization of the L-VAD driveline external silicone interface (the silicone driveline mantle; s.d.m.) in a large animal model in vivo. The study rationale leverages on the antifibrotic effect of the protective material coupled with its intrinsic nano-scale architecture blocking bacterial infiltration and supporting immune clearance. To this end, we percutaneously implanted the silicone mantle of L-VAD drivelines with and without BC protection and evaluated the dynamics of bacterial infiltration at their external interface. Specifically, two time points at 6- and 12-weeks post-implantation were analyzed, and bacterial colonization was detected by microbiological screening.

## Materials and methods

**Biosynthesized cellulose fabrication and characterization.** The Surface Micro-Engineered BC used in this study was synthesized by a strain of the bacterium *Acetobacter xylinum* in static culture. The wild type *Acetobacter xylinum* strain ATCC-700178 (LGC Standards, Wesel, Germany) was used for BC fermentation<sup>17</sup>. The bacteria were grown in a medium prepared as reported in Table 1 and sterilized by autoclaving. The resulting BC membranes were made of a three-dimensional network of randomly arranged cellulose nanoribbons, forming a multi-layered hydrogel with high porosity<sup>17</sup>. The average pore diameter was < 500 nm.

The BC membranes were harvested after 1 week of incubation at 27 °C. BC purification was performed as reported in Botton et al.<sup>17</sup>. Briefly, at the end of the culturing period a thick (3–4 mm) cellulose layer was formed. BC substrates were then harvested. To remove bacteria from the BC the pellicles were washed in NaOH 1 M for 80 min at 80 °C, and subsequently in deionized (DI) water at room temperature (RT) until neutral pH was reestablished. The BC substrates were fully hydrated upon harvesting from the bacterial fermentation culture. This stage is defined as nondehydrated bacterial cellulose (NDH). The NDH substrates were then washed and dehydrated overnight at RT. Dehydrated cellulose substrates (DH) were then rehydrated with DI water. Finally, the rehydrated substrates (RH) were autoclaved (121 °C, 1.1 bar for 15 min) and stored in PBS at 4 °C. Membranes had a residual endotoxin content < 20 EU/device, as prescribed for fully implantable medical devices<sup>13</sup>. In particular, sterile biosynthetic cellulose sheets measuring 10 × 20 cm were used for the animal experiments.

The surface porosity ( $\Phi$ ) was measured on planar images at high magnification (25,000×) as the ratio of the area of pores divided by the area of the field of view (Supplementary Fig. 1). The area of the pores was calculated



Additive	Molecular formula	Quantity
D-Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	20 g
Diazanium sulfate (ammonium sulfate)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.5 g
Potassium dihydrogen phosphate (phosphoric acid)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7 g
Sodium phosphate dibasic dodecahydrate	(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sub>12</sub> H <sub>2</sub> O	3.4 g
Magnesium sulfate heptahydrate	(MgSO <sub>4</sub> ) <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O	2.1 g
Boric acid	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4.3 mg
Ferrous sulfate heptahydrate	(FeSO <sub>4</sub> ) <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O	9.5 mg
Pyridine-3-carboxamide (nicotinamide)	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	0.7 mg
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	6 ml

**Table 1.** Composition of culture medium for *Acetobacter xylinum*. Additives for 1 l of medium in Milli-Q filtered water.

using the Analyze Particle tool of ImageJ on a binary mask obtained from the SEM image setting a signal intensity threshold. To obtain a value for the average pore diameter,  $\Phi$  was divided by the number of individual pores detected from the processed image. This evaluation was performed on multiple fields of view to obtain a standard deviation for the average pore diameter.

After preparation, the BC substrates were characterized using scanning electron microscope (SEM) imaging. To prepare the samples for SEM, the substrates were washed twice in Milli-Q water, and then rinsed for 10 min in increasing concentrations of filtered ethanol (30, 50, 70, 90 and 95%). They were then rinsed twice in 100% ethanol for 15 min each. Ethanol dehydration was followed by gradual replacement with hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich) that was let to evaporate in a fume hood overnight. Samples were finally coated with a 5 nm-thick film of gold/palladium (60/40 wt%). The substrates were imaged using a JEOL JSM-7500FA scanning electron microscope (SEM), equipped with a cold field emission gun (FEG). Initially, low magnification images at 30° tilt angle were acquired, to allow for perspective 3D imaging. The BC nanofibers were imaged at higher magnification and resolution, operating the machine at an acceleration voltage 2 kV in order to minimize any possible beam damage effect. In both cases the SEM imaging was performed by collecting secondary electron (SE) signal.

**In vitro permeation assay.** A custom-developed setup was exploited for the permeation assay (Fig. 3). A test membrane (i.e. the BC membrane) was mounted to separate the two chambers (Fig. 3A). The upper chamber was then filled with a stabilized suspension of 2  $\mu$ m microparticles (SPHERO Fluorescent Light Yellow Particles 1%w/v 1.97  $\mu$ m, SpheroTech Inc.), while the lower chamber was filled with an equivalent volume of pure solvent. After 24 h incubation at room temperature, the test membrane was retrieved and the number of beads permeating from the upper to the lower chamber was evaluated at different time points by inspecting the membrane surface by means of bright-field microscopy.

For bacterial colony formation, cubes of agar with lateral size of 1 cm were prepared and inoculated with a solution of *S. aureus* (Fig. 3C). The agar cubes were then leaned on a BC membrane separating them from an agar plate. Samples were incubated overnight at 37 °C and the colonization of the agar plate surface (i.e. by bacteria crossing the BC membrane) was evaluated. BC membranes in which an array of holes was created by puncturing with a syringe tip were included as internal controls, following the same experimental scheme.

**Experimental animals.** The animal study was performed on adult non-gravid, horned and dehorned female goats (German improved white goat/Preclinics GmbH) on the basis of the governmental permit G 0099/18 issued by LaGeSo (Berlin, Germany) and according to the guidelines of the EU directive 2010/63, the German animal protection act (TierSchG) and the regulation for the protection of laboratory animals (TierSchVersV). The animal study complies with the ARRIVE guidelines.

Large animals were necessary for this study since the implanted s.d.m. (i.e. the external silicon layer of commercial L-VAD drivelines) measured 6–10 cm in length. Goats represent the most adequate model. They can be easily trained and handled. Using protective vests, self-mutilation of the implants can be prevented even in group housing. For this study, the protective vests for maintenance of proper wound hygiene were fabricated based on the design published by Grosshauser et al.<sup>20</sup> (Fig. 1).

A total of eight (n = 8) animals were included in the study. Animals were divided into two groups, a 6-week (animals Nr. 1–4) and a 12-week (animals Nr. 5–8) endpoint group based on the time span between the implantation and explantation of the s.d.m. Each animal (6-week and 12-week group) received four s.d.m. (n = 4) to reduce the total number of animals. On both flanks of the animal, one control s.d.m. without BC coating and one BC covered s.d.m. were implanted following a staggered scheme. In total, each group of animals received sixteen individual s.d.m. (n = 16), i.e. eight control s.d.m. (n = 8) and eight BC covered s.d.m. (n = 8). No animal was excluded during this study.

**Housing, husbandry and animal welfare.** Animals were allowed to adapt to the new environment, personnel and the protective vests for 2 weeks before the surgery. In addition, all animals were trained to walk the path from the stable to the room where the anesthesia induction was performed and were acclimated to the



**Figure 1.** Experimental animal wearing a protective vest to secure the integrity of wound dressings.

inhalation masks. Training as well as later induction of anesthesia was performed in groups of two animals. This approach was chosen to reduce stress to individual animals. In particular, induction of anesthesia directly via Isoflurane application using an inhalation mask rendered premedication by intramuscular injection unnecessary.

In general, animals were accommodated in stables in groups of 2–4. Each stable was equipped with an automated water dispenser and appropriate enrichment. Animals were fed with hay and feed pellets. Upon study-associated manipulations or health checkups, animals were additionally fed with carrots and apples. The bedding consisted of a combination of sawdust and straw. Pens were cleaned and disinfected once a week. Temperature was kept at  $18 \pm 2$  °C and air humidity at  $55 \pm 10\%$ . Stables were illuminated by daylight, ensuring a natural circadian rhythm.

All animals were inspected daily by veterinarians and animal care attendants. Each animal was weighted weekly. Post implantation, wounds were inspected regularly at intervals ranging from daily to once a week. The frequency of wound controls and the associated dressing changes were primarily dependent on the condition of the wound dressings. General health and wound condition were documented at every inspection.

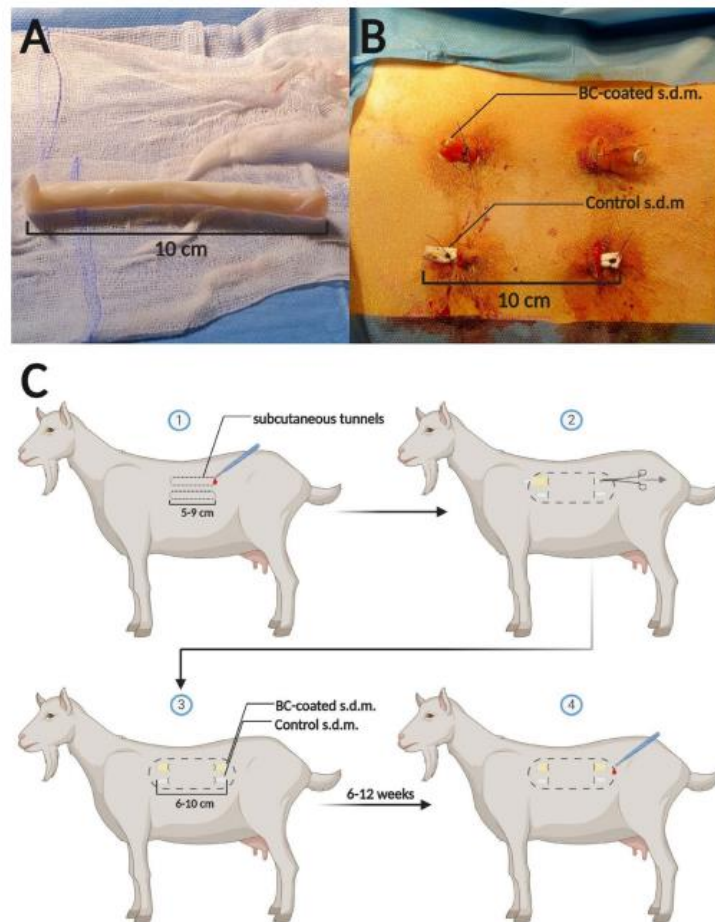
**Perioperative management for implantation.** All animals were fasted for 12 h before anesthesia induction. Anesthesia was induced by inhalation of Isoflurane (3.0–5.0%) using a facemask connected to the respirator. Afterwards, an IV access was established on an ear vein and a distal leg vein. Sedation was intensified by an IV bolus (10–15 mg/kg) of Sodium Thiopental. Following endotracheal intubation, anesthesia was maintained with inhaled Isoflurane (0.8–1.5%) and IV Fentanyl (1–5 µg/kg bolus/1–5 µg/kg/h). All animals received a Fentanyl (75 µg/h) skin patch to one foreleg before surgery. Moreover, an oropharyngeal temperature probe and a ruminal tube were placed. All animals received preoperatively a single shot of Ampicillin/Sulbactam (2000 mg/1000 mg) intravenously. Continued antibiotic prophylaxis until healing of the wound was ensured by an intramuscular injection of Amoxicillin (15 mg/kg) before the end of surgery. The injection with Amoxicillin was repeated at 48 and 96 h after surgery. During anesthesia heart rate and respiratory rate were monitored continuously. Proper mechanical ventilation was ensured by capnometry.

**Implantation procedure.** Commercial s.d.m. of HeartMate3 (HM3; Abbott, Chicago, IL, USA) drivelines were used in this study. The external silicon layer of the drivelines (i.e. the s.d.m.) was divided in 6–10 cm long pieces. Previous studies indicated an increase in the risk of infection by a skin-velour interface compared to a skin-silicone interface, hence the velour portion of the s.d.m. was discarded in this study<sup>21,22</sup>. Sterile BC sheets were unfolded on wet sterile gauze and aligned in a manner that the rounded edge was situated at the right top corner. This approach ensures correct application of the cellulose to the s.d.m.

The BC membranes adopted for this study exhibited excellent tensile strength and proved very conformable<sup>13</sup>. These properties allow the material to wrap around the high curvature of the silicone drivelines used for this study. The application of the BC protective layer was performed by tightly rolling the membrane around the driveline silicone surface. Due to the properties of hydrated BC, the membranes were tightly adhering to the s.d.m. after application. The process was performed without damaging or tearing the BC layer. Afterwards, the protruding ends of the cellulose were trimmed to the exact length of the s.d.m. on both sides (Fig. 2A). After implantation of the BC-protected s.d.m. into the subcutaneous tunnel, the surrounding tissue naturally applied sufficient pressure to the implant to maintain the BC membrane in place without unfolding. A single suture at the end of each driveline tied the membrane to the silicone driveline outer layer and further stabilized the implant configuration. The correct configuration was retrieved upon explantation of the test articles for the ensuing analysis.

Implantation was performed for all animals in aseptic technique. Prior to surgery, both flanks of the animals were shaved using hair clippers. Thereafter the skin of both flanks up to the spine was thoroughly disinfected using a 7.5% povidone-iodine-solution. Surgical drapes were used to create a rectangular surgical field measuring approximately 15 × 20 cm on both flanks of the animal.

Two subcutaneous tunnels were created on each side of the animal by incising the skin at four points with a scalpel and subsequent atraumatic preparation in the subcutaneous tissue with surgical scissors. Each tunnel measured 5–9 cm in length. The two tunnels on the same animal side were approximately 4–6 cm apart. Implantation of control s.d.m. and BC covered counterparts was performed by channeling through the subcutaneous tunnels and securing them with a non-absorbable 2–0 Ethilon (Ethicon, USA) purse-string suture at each exit



**Figure 2.** Application of biosynthesized cellulose (BC) to the silicone mantle (s.d.m.) of L-VAD-drivelines and implantation process. (A) Original s.d.m. wrapped in BC. Both ends of overlapping BC were trimmed to the length of the s.d.m. (B) Surgical site at the end of the procedure. S.d.m. are secured at the exit sites by a single purse string suture. (C) Preparation of subcutaneous tunnels and insertion of s.d.m. Arrangement of implants at the animals flank. Dotted line represents future incision for the explantation of the s.d.m.

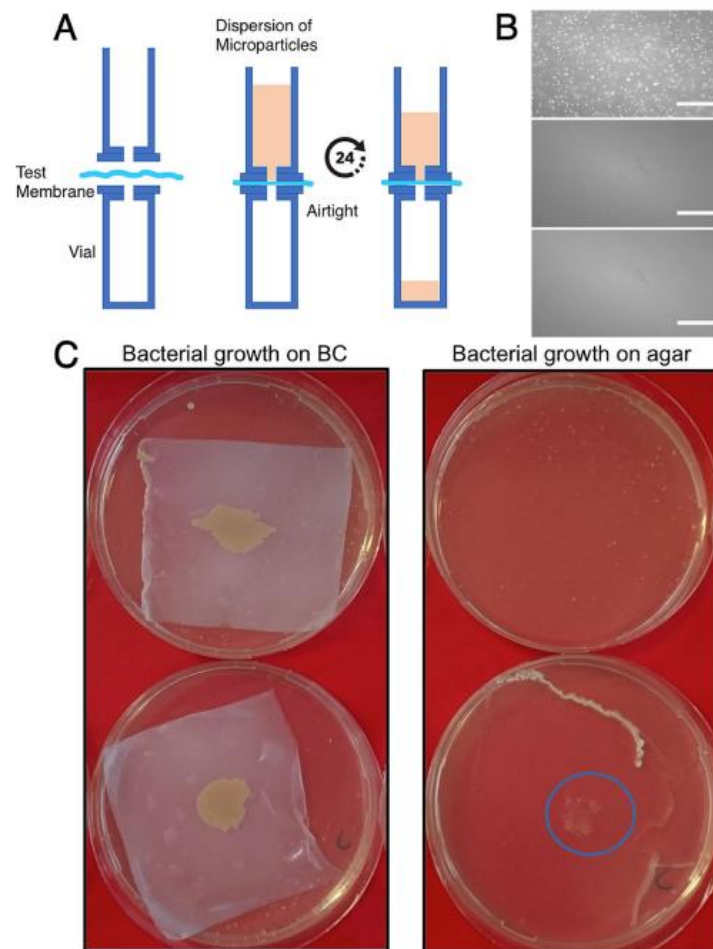
site (Fig. 2B, C). For additional stability, the s.d.m. ends protruding from the subcutaneous tissue were tied to the sutures securing the exit sites (Fig. 2B).

**Dressing changes.** Dressing changes were performed aseptically either by using a touchless technique or by wearing sterile surgical gloves. Adhesions and contaminants were removed using sterile 0.9% saline solution and sterile compresses. Wounds were covered using sterile compresses and adhesive bandage. Edges of the bandage were further secured using an extra bandage layer. The first wound control and dressing change was performed within the first three postoperative days. Consecutive dressing changes were performed regularly every 1–7 days depending on the integrity of the wound closure material.

**Sample collection.** Animals were euthanized directly after being under deep anesthesia induced by inhalation of Isoflurane (5.5%) followed by IV administration of 2500 mg Sodium Thiopental, 0.5 mg Fentanyl, 2 mg Pancuronium Bromide and 60 ml of 7.45% potassium chloride solution. The s.d.m. and the adjacent tissue specimens were then gathered directly.

An approximately 3 cm thick (dissected to the muscle fascia) square tissue section (10 × 10 cm) was cut out of the skin utilizing a scalpel. Importantly, the tissue size was selected such that the edges of the sample were at





**Figure 3.** In vitro test of BC barrier function. (A) Experimental settings. A test BC membrane separates two chambers assembled with an airtight seal. A dispersion of microparticles is loaded into the upper chamber and let to diffuse for 24 h. (B) Direct evaluation of microparticle penetration (Dextran beads) across BC membranes. The upper surface of the BC membrane is reported as positive control (upper panel). The lower surface of the BC membrane upon incubation with Dextran beads (middle panel). The lower surface of BC membrane upon incubation with distilled water, reported as negative control (lower panel). (C) Bacterial colonization of pristine (upper left) and punctured BC membranes (lower left) and of the underlying agar substrate (right). A blue circle (lower right) indicates bacterial colonization underneath punctured BC membranes.

least 2 cm away from the implant at all points. Once explanted, the two tissue specimens (from both flanks of the animal, containing all 4 s.d.m.), were transferred to another sterile instrument table for further dissection and sample collection. Specifically, each sample (s.d.m. and surrounding tissue) was dissected longitudinally into three sections. Two sections contained the exit sites (left and right, where the s.d.m. exits the skin) and the middle section containing the subcutaneous part of the implant. The middle section measured approximately 1 cm in length.

The middle section was cut longitudinally in order to separate the s.d.m. from the adjacent tissue. Control s.d.m. were freed from the tissue and transferred into 15 ml Falcon tubes filled with 3 ml sterile 0.9% NaCl solution. BC-covered s.d.m. were separated prior to transfer into 15 ml Falcon tubes filled with 3 ml sterile 0.9% NaCl solution. Therefore, the BC was dissected and peeled off the corresponding s.d.m. This separation resulted in three distinct groups for microbiologic testing: (1) control bare s.d.m. (B-s.d.m.), (2) BC-coated s.d.m. deprived

of BC (BCB-s.d.m.) and (3) BC. Transfer of implant specimens into Falcon tubes was performed under sterile conditions.

**Microbiology.** Wound swabs collected from the subcutaneous tunnel and corresponding exit sites prior to the s.d.m. implantation were sent to a specialized veterinarian laboratory (LABOKLIN, Germany) for microbiologic testing.

Post-collection specimens were processed in a microbiology laboratory within 6 h. Falcon tubes containing the implants immersed in 0.9% NaCl were vortexed for 30 s (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia NY, USA), followed by sonication in an ultrasound bath at 40 kHz and 0.2 W/cm<sup>2</sup> (BactoSonic/BANDELIN electronic GmbH & Co. KG) for 1 min and another 30 s vortexing. Finally, 100 µl of the sonication fluid were plated on a brain heart infusion (BHI; BD, Le Pont de Claix, France) agar and incubated for 24 h at 37 °C. Sterile not implanted BC (same batch as the implanted BC) and a sterile driveline mantle of a HeartWare HVAD (HW; Medtronic, Minneapolis, MN, USA) driveline were used as negative controls.

**Software.** The cartoons in Fig. 2 were created with [Biorender.com](https://www.biorender.com).

## Results

**In vitro barrier function of BC.** To demonstrate that the BC membranes under study establish an effective physical barrier against bacterial pathogens we initially evaluated their exclusion size in a permeation test in vitro. The results of this analysis, which exploited a custom developed two chamber cell (Fig. 3A), are reported in Fig. 3B. Microparticles of 2 µm in diameter were completely excluded from the lower chamber, indicating a cut-off size smaller than 2 µm. These data therefore demonstrate that the BC membrane structure is compatible with a barrier function against particles of this size or larger.

Next, the actual exclusion of bacteria from crossing the BC membranes was tested using inoculation with *S. aureus* (Fig. 3C). Specifically, bacteria were inoculated on the upper surface of BC membranes lying on agar plates. In this experimental configuration, the growth of bacteria on the underlying agar substrate demonstrates permeation across the test membrane.

In all tested samples, bacteria were able to grow and colonize the upper surface of BC membranes, indicating that cellulose is permeable to nutrients diffusing from the underlying plate (Fig. 3C). However, no signs of colonization were detected directly on the agar plate in the case of pristine BC barriers. On the other hand, when macroscopic holes were implemented on the membranes by puncturing them with a syringe, the BC layer became conducive to bacterial penetration and allowed colonization of the agar plate.

Altogether, these results demonstrate that BC membranes are permeable to small soluble molecules, but naturally constitute an effective physical barrier against the diffusion of microscopic structures, including bacteria.

**In vivo study set-up.** To evaluate in vivo the protective effect of BC membranes towards bacterial colonization, we tested their barrier function upon the percutaneous implantation of L-VAD s.d.m.

Two groups of four adult female goats each entered the study. Each animal received 4 individual 6–10 cm long s.d.m. segments (see Materials and Methods). In particular, at each side of the animal one bare s.d.m. and one BC-coated s.d.m. were implanted percutaneously (Fig. 2B). Due to the additional thickness generated by the superposition of BC, percutaneous skin tunnels were distinctly larger for BC-coated s.d.m. than for their bare counterparts (Fig. 2B).

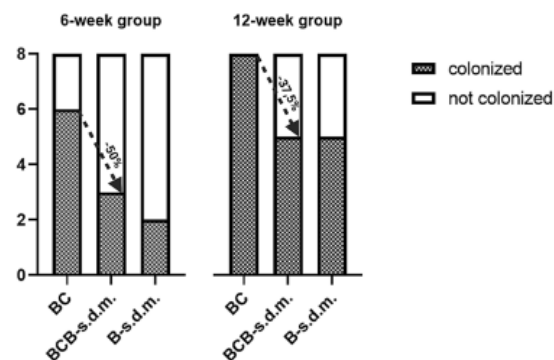
In general, wounds healed well in all animals. In case of wound secretion, implant sites were flushed with sterile 0.9% NaCl solution and wound dressings were changed. No animal had fever or signs of systemic infection during the observational period. The BC membranes gradually changed color (from opaque white to brown-yellow) along the duration of the study. Their distal part, which protruded outside of the skin, rapidly dried losing flexibility and becoming brittle. The experiment was terminated at two subsequent time points, with the sacrifice and explantation at 6-weeks for the animals of the first group and at 12-weeks for those in the second group.

**In vivo barrier function of BC.** After the subcutaneous tunnels were surgically prepared, an initial test was performed to evaluate the baseline contamination of the implant sites, and in particular the effect of their preparation, cleaning, and disinfection. In this frame, sterile microbiological swabs were employed to detect fungal or bacterial contamination of the tunnels and their respective exit sites. Therefore, 32 swabs samples were collected for microbiological analysis from both animal groups (16 from 6-week group and 16 from 12-week group).

None of the swabs collected prior to s.d.m. implantation showed signs of fungal colonization. On the other hand, despite thorough skin disinfection and use of sterile surgical equipment, 19 (19/32; 59.38%) specimens were positive to bacterial growth after culturing, with an almost equal distribution between the 6- (9/16) and 12-week (10/16) group.

This demonstrates an existing bacterial contamination in the majority of the surgical sites, which has to be expected as the applied disinfection procedure can reduce the resident flora but not to eradicate all microbes.

In total, 32 specimens were collected for microbiological analysis from both animal groups (6- and 12-week) including 16 BC-coated s.d.m. (8 at 6 weeks and 8 at 12 weeks) and 16 bare counterparts. Prior to sonication and subsequent plating, BC-coated s.d.m. were divided into their components (i.e. the BC and the s.d.m.) resulting in a total of 48 distinct specimens. Accordingly, for the analysis we considered the following target substrates: the control bare s.d.m. (B-s.d.m.; n = 16), the BC membranes (BC; n = 16), and the BC-deprived bare s.d.m. (BCB-s.d.m.; n = 16). Samples were considered colonized if bacterial growth was observed in agar plates inoculated with the sonication fluid after 24 h at 37 °C.



**Figure 4.** Microbiologic results after sonication and subsequent plating. Observed implant colonization rate (bacterial growth) in the 6- and 12-week-group. In both groups, bacterial colonization rate of BC was higher than for the underlying BCB-s.d.m. No corresponding BCB-s.d.m. colonization was observed in 50% and 37.5% of the cases in the 6- and 12-week group, respectively. The control group (B-s.d.m.) is reported as control.

As expected, due to the distinctly larger tunnel size the highest colonization rate occurred in the BC-group, where 75% (6/8) and 100% (8/8) of samples were colonized at 6 and 12 weeks, respectively (Fig. 4). The smaller tunnel size in the control group (B-s.d.m.) consistently reduced the colonization rate to 25% (2/8) and 37.5% (3/8) at 6 and 12 weeks, respectively. In all three target substrates the colonization rate increased between 6- and 12-weeks, with the higher colonization rates found in the 12-week group.

Despite colonization of the external BC cover, a significant fraction of the corresponding s.d.m. were free from bacteria. In fact, in 50% (3/6 at 6 weeks) and 37.5% (3/8 at 12 weeks) of the cases we registered no bacterial colonization of the corresponding BCB-s.d.m. (Fig. 4). Bacteria colonizing the external BC wrapping were therefore prevented from reaching the interface with the underlying s.d.m.

## Conclusions

Bacterial colonization of synthetic implant interfaces represents an outstanding biomedical challenge. The complex physicochemical material properties together with their intrinsic texture at the micro and nanoscale generate niches for bacterial growth, where the reach of the immune system is limited, and chronic infection can arise. Such complications often appear in conjunction with the intrinsic inflammatory reaction triggered by the interaction between the implant biomaterials and the surrounding tissues, leading to fibrotic tissue deposition. The formation of a fibrotic capsule, featuring poor vascularization and dense matrix, further contributes with the reduction of immune clearance, creating an ideal environment for bacterial growth.

BC has been recently proposed as viable protection against foreign body reaction, facilitating the fast regeneration of soft tissue in the surgical pocket of pacemakers<sup>13</sup> or during the healing of skin wounds<sup>17</sup>. This natural hydrogel is well tolerated by the body for its mechanical and chemical properties, and has a typical nanofibrous composition, which naturally enforces a barrier to the penetration of inflammatory cells<sup>13,17</sup>.

The exclusion size of BC membranes is compatible with its function as a barrier against smaller cells (Fig. 3). While the intrinsic porosity allows for percolation, and thus diffusion of soluble molecules, it completely blocks the diffusion of microscale beads (Fig. 3B) and, more importantly, of bacteria (Fig. 3C). In vitro experiments clearly showed that bacteria cannot penetrate BC membranes. This effect is obtained by the typical pore diameter provided by the material which is well below the hindrance of bacteria. In fact, only when the integrity of the membranes is artificially compromised, by punching a microscopic hole in the BC layer, the underlying agar culture is colonized (Fig. 3C).

When such configuration is applied to L-VAD drivelines and implanted percutaneously in test animals, it reproduces its barrier function. Here, the external surface of the BC membranes is frequently colonized (Fig. 4). This is to be expected, in light of the site contamination prior to implantation and the relatively large diameter of the exit sites. The relevant result, which agrees with the in vitro permeation tests, is that in several cases the underlying surface of the s.d.m remains free from pathogens. We ascribe this effect to the exclusive effect of the BC porous structure, which restricts the contamination to its external surface.

It is indeed preferable to limit bacterial contamination on the external surface of the BC membrane, rather than on other non-porous implant materials such as metals or silicones. Here, antimicrobial treatments are significantly more effective in eradicating bacterial colonization before a biofilm is produced<sup>19</sup>. This is again to be referred to the intrinsic porosity of the BC membranes, offering a percolating system, which allows the free movement of small soluble molecules (Fig. 3) but restricting the passage of larger biological moieties, such as human cells<sup>13</sup> or bacteria (Fig. 3).

This observation, if confirmed, would open a way to avoid bacterial colonization of VAD drivelines and other exposed implant interfaces, limiting bacterial colonization to the protective BC membranes. BC can be generated



in conformable layers that wrap and protect target implants, therefore forming an intervening level between the implant external interface and the surrounding tissue (Fig. 2). In light of the reduced fibrotic response against this material and the higher efficacy of antibiotic treatments against biofilm formation<sup>19</sup>, the presentation of bacteria and their clearance could be more efficient thus reducing or eliminating niches for bacterial growth.

This shall be regarded in the frame of an all-round implant protection, whereby the BC establishes an antifibrotic layer with the function of minimizing the foreign body reaction and promoting a prompt tissue regeneration<sup>13</sup>. In this scenario, potential contaminations may be managed better than in the case of a concomitant inflammatory process triggered by less compatible implant materials, such as the silicone polymers comprising the drivelines<sup>19</sup>.

### Limitations

For a proper interpretation of the results, some limitations of the study must be considered.

The differentiation of bacterial taxonomy among colonized specimens was not the aim of this study. However, it would be interesting to examine the correlations between bacterial species present at the implant site and those found on colonized implants. This correlation appears to be especially relevant considering that, despite skin disinfection with povidone-iodine solution, the majority of implant sites in our study were contaminated prior to implantation. Based on the observations reported in our work and other clinical studies which describe higher wound infection rates using povidone-iodine solution for surgical antiseptics, as compared to a chlorhexidine solution, a chlorhexidine-based skin disinfectant should be considered as antiseptic of choice in future studies<sup>23</sup>.

In addition, the cross section of percutaneous skin tunnels generated for the two conditions tested in this work (with and without BC coating) are different due to the increased diameter of the coated driveline mantles. Such increase may influence driveline infection rates<sup>24</sup>, therefore the study setup is not suitable for the evaluation of absolute colonization rates. The reduction of the exit site diameter shall represent a key factor to potentially reduce ensuing infection rates and facilitate the process of tissue regeneration. In this work, our focus was to demonstrate that BC established an impermeable layer which restricts contamination to the external surface of the implant, in contact with surrounding tissues.

Finally, the sites at which bacterial colonization originates in the coated driveline mantles are not known and the possibility that bacteria are present on the silicone surface before implantation cannot be excluded. This reduces the interpretation of the results to the conditions in which infections are detected on the external BC coating but not on the underlying driveline mantle.

### Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to technical or time limitations but are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 31 March 2021; Accepted: 1 September 2021

Published online: 21 September 2021

### References

- Redfield, M. M. *et al.* Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: Appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* **289**, 194–202. <https://doi.org/10.1001/jama.289.2.194> (2003).
- Lloyd-Jones, D. M. *et al.* Lifetime risk for developing congestive heart failure: The Framingham Heart Study. *Circulation* **106**, 3068–3072. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000039105.49749.6f> (2002).
- Heidenreich, P. A. *et al.* Forecasting the impact of heart failure in the United States: A policy statement from the American Heart Association. *Circ. Heart Fail.* **6**, 606–619. <https://doi.org/10.1161/HHF.0b013e318291329a> (2013).
- Rose, E. A. *et al.* Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *New Engl. J. Med.* **345**, 1435–1443. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012175> (2001).
- Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. J. Heart Fail.* **18**, 891–975. <https://doi.org/10.1002/ehf.592> (2016).
- Kirklin, J. K. *et al.* Second annual report from the ISHLT mechanically assisted circulatory support registry. *J. Heart Lung Transplant* **37**, 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.01.1294> (2018).
- ISHLT Transplant Registry Quarterly Reports for Heart in Europe (Survival Rates 2013–2016); Access Date: 29.03.2020. <https://ishltregistries.org/registries/quarterlyDataReportResults.asp?organ=HR&rtType=all&continent=3>.
- Goldstein, D. J. *et al.* Continuous-flow devices and percutaneous site infections: Clinical outcomes. *J. Heart Lung Transplant* **31**, 1151–1157. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2012.05.004> (2012).
- Gordon, R. J. *et al.* Prospective, multicenter study of ventricular assist device infections. *Circulation* **127**, 691–702. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.128132> (2013).
- Kirklin, J. K. *et al.* Eighth annual INTERMACS report: Special focus on framing the impact of adverse events. *J. Heart Lung Transplant* **36**, 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.07.005> (2017).
- Hannan, M. M. *et al.* Working formulation for the standardization of definitions of infections in patients using ventricular assist devices. *J. Heart Lung Transplant* **30**, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.01.717> (2011).
- Hannan, M. M. *et al.* Epidemiology of infection in mechanical circulatory support: A global analysis from the ISHLT Mechanically Assisted Circulatory Support Registry. *J. Heart Lung Transplant* **38**, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.01.007> (2019).
- Robotti, F. *et al.* Microengineered biosynthesized cellulose as anti-fibrotic in vivo protection for cardiac implantable electronic devices. *Biomaterials* **229**, 119583. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119583> (2020).
- Zaat, S., Broekhuizen, C., & Riool, M. Host tissue as a niche for biomaterial-associated infection. *Future Microbiol.* **5**, 1149–1151. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.89> (2010).
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y> (2018).
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. & Bohn, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587> (2005).

17. Botton, S. *et al.* Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-based biolithography (GAB). *ACS Nano* **9**, 206–219. <https://doi.org/10.1021/nn5036125> (2015).
18. Rosen, C. L. *et al.* Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery* **69**, 1093–1103. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e3182284aca> (2011).
19. Albano, M., Greenwood-Quaintance, K. E., Karau, M. J., Mandrekar, J. N. & Patel, R. Anti-biofilm activity of antibiotic-loaded Hylomate. *IJC Heart Vasc.* **34**, 100801. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2021.100801> (2021).
20. Großhauser, J., Reiter, K., Grosse-Siestrup, C., Kertzschner, U. & Affeld, K. Protective waistcoat for goats in a long-term animal model. *Biomed. Eng. Biomed. Techn.* **59**, S56–S59 (2014).
21. Camboni, D. *et al.* Reduction of INCOR(R) driveline infection rate with silicone at the driveline exit site. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **24**, 222–228. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivw336> (2017).
22. Dean, D. *et al.* Reduction in driveline infection rates: Results from the HeartMate II multicenter driveline silicone skin interface (SSI) Registry. *J. Heart Lung Transplant.* **34**, 781–789. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.11.021> (2015).
23. Chen, S., Chen, J. W., Guo, B. & Xu, C. C. Preoperative antiseptic with chlorhexidine versus povidone-iodine for the prevention of surgical site infection: A systematic review and meta-analysis. *World J. Surg.* **44**, 1412–1424. <https://doi.org/10.1007/s00268-020-05384-7> (2020).
24. Imamura, T. *et al.* Correlation between driveline features and driveline infection in left ventricular assist device selection. *J. Artif. Organs* **20**, 34–41. <https://doi.org/10.1007/s10047-016-0923-8> (2017).

### Acknowledgements

We thank Josep M. Monné Rodríguez for the useful discussion regarding this study.

### Author contributions

C.S., C.K., A.F., T.S. and J.K. designed the study. J.K., C.S., T.S. performed the animal experiment. J.K., F.R. and M.G.M. carried out the in vitro-permeability assays and microbiologic testing. J.K., A.F. and C.S. analyzed and interpreted the data; F.R., M.G.M. and A.T. also contributed in data interpretation. J.K., A.F. and C.S. wrote the manuscript. All authors participated in the critical review of the manuscript.

### Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

### Competing interests

S.B., F.R. and A.F. are working for Hylomorph AG. No further conflict of interest relevant to this article has been reported.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98220-4>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.K.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Komplette Publikationsliste

**Kaemmel J**, Ferrari A, Robotti F, Botta S, Eichenseher F, Schmidt T, Gonzalez Moreno M, Trampuz A, Eulert-Grehn JJ, Knosalla C, Potapov E, Falk V, Starck C. On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines. *Sci Rep*. 2021 Sep 21;11(1):18776. doi: 10.1038/s41598-021-98220-4. PMID: 34548588; PMCID: PMC8455583.

IF Stand 2019: 3.998

Kourouklis AP, **Kaemmel J**, Wu X, Potapov E, Cesarovic N, Ferrari A, Starck C, Falk V, Mazza E. Systems of conductive skin for power transfer in clinical applications. *Eur Biophys J*. 2022 Mar;51(2):171-184. doi: 10.1007/s00249-021-01568-8. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34477935; PMCID: PMC8964546.

IF Stand 2020: 1.733

Starck C, **Kaemmel J**, Falk V. Tackling postoperative sudden cardiac death in high-risk cardiac surgical patients-role of wearable cardioverter defibrillators. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2022 May 2;61(5):1041-1042. doi: 10.1093/ejcts/ezac067. PMID: 35165712.

IF Stand 2020: 4.191

**Kaemmel J**, Falk V, Starck C. Outcomes of Surgically Treated Complications Caused by Cardiovascular Interventions. *Thorac Cardiovasc Surg* 70(S 01): DGTHG-KV21. 2022

IF Stand 2020: 1.827

Dupuch M, **Kaemmel J**, Alogna A, Reiter K, Cesarovic N, Stössel V, Ostach P, Falk V, Starck C, Hierold C. Inflow Cannula Pressure Sensor for Autonomous Dynamic Ventricular Assist Device Control. *Thorac Cardiovasc Surg* 70(S 01): DGTHG-V46. 2022

IF Stand 2020: 1.827

Kourouklis AP, Wu X, Geyer RC, Exarchos V, Nazari T, **Kaemmel J**, Magkoutas K, Daners MS, Weisskopf M, Maini L, Roman C, Iske J, Pappas GA, Chen MJ, Smid C, Unbehau A, Meyer A, Emmert M, Ferrari A, Schuett C, Poulikakos D, Mazza E, Falk V, Cesarovic N. Building an interdisciplinary program of cardiovascular research at the Swiss Federal Institute of Technology- the EHeart story. *iScience*. 2022 Sep 27;25(10):105157. doi: 10.1016/j.isci.2022.105157. PMID: 36185369; PMCID: PMC9520014.

IF Stand 2020: 5.458

Heck R, Wisniewski L, Podlowski LM, Rauf H, **Kaemmel J**, Lanmüller P, Falk V, Starck C. Risk Stratification of Incomplete Intracardiac or Intravascular Mass Aspiration with a Percutaneous Aspiration System. *Thorac Cardiovasc Surg* 71(S 01): DGTHG-V25. 2023

IF Stand 2021: 1.756

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. med. Christoph Starck, für seine fortwährende klinische als auch akademische Unterstützung und seine wertvollen Hinweise. Weiterhin, möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Jaime-Jürgen Eulert-Grehn bedanken, dessen hoher Qualitätsanspruch mir stets ein Ansporn war.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Co-Autoren, die mich jederzeit während der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Ich möchte mich auch ganz herzlich für die Unterstützung durch das Team des FEM im Rahmen der Tierhaltung bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für ihre bedingungslose Unterstützung, welche meinen Karrierepfad erst möglich gemacht hat.