Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Ziemer

Adsorption von Plasmaproteinen an modifizierten Fremdoberflächen - Bedeutung für die Hämokompatibilität der extrakorporalen Zirkulation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Janina Caliebe
aus
Gaildorf

2005

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Ziemer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Hofbeck

Meinen Eltern und meinem Bruder

1 EINLEITUNG

1.1 BIOMATERIALIEN 9

1.2 HÄMOKOMPATIBILITÄT 11

1.3 DIE EXTRAKORPORALE ZIRKULATION 14

1.3.1 HINTERGRUND 14
1.3.2 DURCHFÜHRUNG DER EXTRAKORPORALEN ZIRKULATION 15
1.3.3 AUSWIRKUNGEN DER EXTRAKORPORALEN ZIRKULATION 16

1.4 GERINNUNGS- UND FIBRINOLYSESYSTEM 17

1.4.1 PLASMATISCHE BLUTGERINNUNG 17
1.4.1.1 DIE INTRINSICHE AKTIVIERUNG 17
1.4.1.2 DIE EXTRINSICHE AKTIVIERUNG 18
1.4.2 FIBRINOLYSE 19
1.4.3 INHIBITOREN 20
1.4.4 KOMPLEMENTSYSTEM 21
1.4.5 THROMBOZYTEN 22
1.4.6 LEUKOZYTEN 23

1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT 25

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN 27

2.2 VERBRAUCHSMATERIAL 28

2.3 ANTIKÖRPER 29

2.3.1 ELISA: PRIMÄRE POLYKLONALE ANTIKÖRPER 29
2.3.2 ELISA: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER 29
2.3.3 "WESTERN BLOTTING": PRIMÄRE ANTIKÖRPER 30
2.3.4 "WESTERN BLOTTING": SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER 30

2.4 ELISA KITS 31

2.5. PUFFER UND LÖSUNGEN 31

2.6 GERÄTE 34

2.7 ÜBERSICHT 35

2.8 HERSTELLUNG DER PROBEN 35

2.8.1 PROBANDEN 35
2.8.2 BLUTENTNAHME 35
2.8.3 CHANDLER-LOOP-MODELL 36
2.8.3.1 PRINZIP 36
2.8.3.2 DURCHFÜHRUNG 37

2.9 ANALYSE DER ADSORPTIONSPROTEINE DURCH ELISA (ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY) 37

2.9.1 Verarbeitung der Schläuche 38
2.9.2. Das ELISA-Verfahren 38
2.9.2.1 Vorbereitung 38
2.9.2.2 "Blockierung" unspezifischer Bindungen 39
2.9.2.3 Detektion der adsorbierten Plasmaproteine 39
2.9.2.3.1 Prinzip 39
2.9.2.3.2 Antikörperreaktion 40
2.9.2.3.3 Substratreaktion 41
2.9.2.3.4 Messung 41

2.10 ANALYSE DER ADSORPTIONSPROTEINE DURCH "WESTERN BLOTTING" 41

2.10.1 Verarbeitung der Schläuche 42
2.10.2 Konzentrierung der Eluate 42
2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 42
2.10.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting 43
2.10.4.1 Probenvorbereitung 43
2.10.4.2 SDS-PAGE 43
2.10.4.3 Immunoblotting 44
2.10.4.4 "Fast-Green-Färbung" 44
2.10.4.5 "Blockierung" unspezifischer Bindungen 45
2.10.4.6 Antikörperreaktion 45
2.10.4.7 Substratreaktion 46

2.11 BESTIMMUNG DER LÖSLICHEN AKTIVIERUNGSMARKER IM PLASMA 46

3 ERGEBNISSE

3.1 GERINNUNGSSYSTEM 47

3.1.1 ANALYSE DER ADSORPTIONSPROTEINE 47
3.1.1.1 FIBRINOGEN 47
3.1.1.2 FIBRONEKTIN 50
3.1.1.3 HIGH MOLECULAR WEIGHT KININOGEN (HMWK) 52
3.1.1.4 PROTHROMBIN/THROMBIN 53
3.1.1.5 ANTITHROMBIN III (AT III) 54
3.1.2 LÖSLICHE AKTIVIERUNGSMARKER 56
3.1.2.1 THROMBIN-ANTITHROMBIN-KOMPLEX (TAT) 56

3.2 KOMPLEMENTSYSTEM 57

3.2.1 ANALYSE DER ADSORPTIONSPROTEINE 57
3.2.1.1 C3 57
3.2.1.2 C1-ESTERASE-INHIBITOR 58
3.2.2 LÖSLICHE AKTIVIERUNGSMARKER 60
3.2.2.1 TERMINALER KOMPLEMENT KOMPLEX (TCC) 60
3.2.2.2 PMN-ELASTASE 61

3.3 WEITERE BESTIMMUNGEN 63

3.3.1 ANALYSE DER ADSORPTIONSPROTEINE 63
3.3.1.1 ALBUMIN 63
3.3.1.2 HITZESCHOCKPROTEIN 70 (HSP 70) 65
3.3.1.3 CD 41 65
3.3.2 THROMBOZYTEN 66
3.3.2.1 THROMBOZYTENZAHL 66
3.3.2.2 THROMBOZYTENAKTIVIERUNG, β-THROMBOGLOBULIN 67

3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 69

4 Diskussion

4.1 KONZEPTION 71

4.2 METHODISCHE VORAUSSETZUNGEN 73

4.3 HÄMOKOMPATIBILITÄT: ADSORPTION VON PLASMAPROTEINEN UND ZELLAKTIVIERUNGEN 75

4.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN 87

5 Zusammenfassung

5 ZUSAMMENFASSUNG 89

6 Literatur

6 LITERATUR 93

DANKSAGUNG 106
LEBENSLAUF 107

1 EINLEITUNG

1.1 Biomaterialien

In den letzten Jahrzehnten ist durch die Etablierung und Weiterentwicklung moderner Therapieverfahren die Nachfrage nach synthetischen Materialien in vielen Bereichen der Medizin enorm gestiegen. Zu diesen Bereichen gehören insbesondere die Kardiochirurgie bzw. Kardiologie mit der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) und den verschiedenen Katheterverfahren, aber natürlich auch die Hämodialyse und die Implantologie im allgemeinen. Entsprechend wurden zahlreiche neue Materialien entwickelt; zunächst handelte es sich jedoch um Materialien, die ursprünglich für den industriellen Einsatz entwickelt wurden (Ratner und Bryant, 2004; Salzmann et al., 1994; Yianni, 1992). Diese „medical devices“ umfassen eine breite Palette an verschiedenen Kunststoffen wie z. B. Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylchlorid, Polyester, Polystyrol, Polysulfon, Polyamid, Polyurethan, Silikon etc., sowie deren Derivate. An die im klinischen Bereich verwendeten Biomaterialien werden höchste Ansprüche bezüglich ihrer Qualität gestellt, dazu gehören unter anderem Anwendbarkeit, Haltbarkeit, Sicherheit, Verträglichkeit, etc. Dabei stellt noch immer die häufig unzureichende Hämokompatibilität, d.h. die Blutverträglichkeit der Kunststoffe ein ungelöstes Problem dar, da der Kontakt des Blutes mit den verschiedenen Fremdoberflächen verschiedene pathophysiologische Reaktionen des Organismus induzieren kann, was im folgenden detaillierter angesprochen werden wird (Colman et al., 1987; Hamsten, 1993; Miller und Levy, 1997).

Die Biokompatibilität von Devices, die mit Blut in Kontakt kommen, wird unter anderem maßgeblich durch die thrombogenetische Antwort bestimmt, die durch die jeweiligen Materialien induziert wird (Sefton et al., 2000). Hämolytische, toxische und immunologische Reaktionen sind Probleme, die unter Umständen im Rahmen der Entwicklung der Materialien zu lösen waren, in der Anwendung jedoch eigentlich keine Rolle mehr spielen. Thrombotische und thromboembolische Komplikationen allerdings sind ebenso wie Blutungsrisiken, insbesondere im Rahmen der notwendigen antikoagulativen Therapie, stets ein

Thema, wenn es um kardiovaskuläre Devices geht. Klinische Manifestationen von Bioinkompatibilitäten sind zahlreich, dazu gehören z. B. die Obstruktion von Stents innerhalb einiger Wochen (Bittl, 1996), embolische Komplikationen im Zusammenhang mit Kunstherzen, Kathetern oder künstlichen Herzklappen (Edmunds Jr., 1996; Geiser et al., 1998) oder thrombotische Komplikationen während der extrakorporalen Zirkulation (Edmunds Jr., 1996; Geiser et al., 1998).

Angesichts dieser Probleme ist eine Minimierung der durch die Fremdoberflächen induzierten Aktivierungsmechanismen zu fordern. Um die Hämokompatibilität kardiovaskulärer Devices zu verbessern, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Es wurden Modifikationen an ihren Oberflächen vorgenommen: Dazu gehören die Variation der hydrophoben/ hydrophilen Eigenschaften, hydrogelartige Strukturen, Phospholipidbeschichtungen und „bioaktive“ Beschichtungen. Diese bioaktiven Oberflächen sind z. B. mit Prostaglandinen, Urokinase, Hirudin oder Heparin beschichtet (Forbes und Courtney, 1994; Larm et al., 1983; Ohshiro und Kosaki, 1980; Phaneuf et al., 1997). Verschiedene Heparinbeschichtungen sind im Bereich der EKZ (Wendel und Ziemer, 1999) bereits im Handel bzw. in der Anwendung.

Die Beurteilung und Einschätzung der Interaktionen zwischen Blut und Fremdmaterialien wird allerdings erschwert durch die Tatsache, dass unser Verständnis von den hämostatischen Abläufen immer noch limitiert ist. Man weiß nicht, welches Ausmaß an inflammatorischer und thrombotischer Antwort akzeptiert werden kann und wie schädlich die Alterationen der physiologischen Hämostase sind, die durch ein Device induziert werden.

Zusätzlich zu den Strategien im Bereich der Biomaterialien werden auch pharmakologische Ansätze verfolgt. Dazu gehören beispielsweise eine Komplementinhibierung mit einem Anti-C5a-Antikörper (Fitch et al., 1999), die Verwendung von Serinproteaseninhibitoren wie Aprotinin (Murkin, 1997) oder von Plättchenrezeptorantagonisten wie Anti-GPIIb/IIIa (Kondo et al., 2004; Rao et al., 1999; Tabata et al., 2004). Trotz teilweise vielversprechender Ergebnisse sind Schlussfolgerungen und Aussagen in bezug auf die „Gesamtbiokompatibilität“ von Devices schwierig. Da außerdem viele Mittel nur auf eine Komponente im komplizierten Zusammenspiel der Hämokompatibilitätsantwort wirken, ist

nicht sicher, ob sie immer effektiv genug sind, um in einem klinischen Nutzen zu resultieren. Andererseits können mit ihrer Hilfe wertvolle Informationen über die Mechanismen gewonnen werden, die bei thrombotischen Komplikationen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Devices eine Rolle spielen.
Unter physiologischen Bedingungen trifft Blut auf ein Endothel mit antikoagulativen und antithrombotischen Eigenschaften. Interaktionen zwischen Blut und Fremdmaterialien hingegen triggern eine komplexe Serie von Abläufen, zu denen die Proteinadsorption, Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung und -adhäsion, die Komplementaktivierung und die Gerinnung gehören. Diese Abläufe sind vielfältig miteinander vernetzt und sollen im weiteren besprochen werden, wobei, wie bereits angesprochen, die Aktivierungsprozesse im Vordergrund stehen sollen, die durch den direkten Kontakt von Humanblut mit Fremdmaterialien (Biomaterialien) induziert werden.

1.2 Hämokompatibilität

Blut ist in allen Organen vorhanden, es kann aufgrund seiner zahlreichen Aufgaben und Funktionen dabei aber auch selbst als „flüssiges Organsystem“ bezeichnet werden. Es dient als Transport- und Kommunikationsmedium, das für die Aufrechterhaltung der normalen Körperfunktionen essentiell ist. Es transportiert Gase (O_2, CO_2), Wärme, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Hormone, Elektrolyte, etc. Durch die Bestimmung der jeweiligen spezifischen Parameter können wichtige Informationen über normale und pathologische Organfunktionen erhoben werden.
Blut setzt sich aus zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) und Plasma zusammen. Der Anteil der zellulären Blutelemente am Gesamtblutvolumen wird als Hämatokrit bezeichnet und beträgt ungefähr 42%. Während die Hauptaufgabe der Erythrozyten im Gastransport liegt, erfüllen die Leukozyten als hochspezialisierte Gruppe von Blutzellen verschiedene Abwehrfunktionen durch die Erkennung und Zerstörung fremder Pathogene (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten), aber auch pathologisch veränderter Körperzellen. Das Blutplasma besteht zu 90% aus Wasser und zu 10% aus gelösten Substanzen, von denen die Proteine 70%, niedermolekulare Stoffe

20% und Elektrolyte 10% ausmachen. Hinter diesen Zahlen stehen viele hundert Molekülarten, wobei insbesondere die Plasmaproteine eine erstaunliche Funktionsvielfalt aufweisen. Sie sind an Transport- und Abwehrfunktionen beteiligt und, zusammen mit den Thrombozyten, insbesondere für die Gerinnungsfunktion des Blutes verantwortlich. Dieses wichtige Teilsystem des Blutes, das Gerinnungssystem, soll im weiteren im Mittelpunkt der Ausführungen stehen.

Ein intaktes Gerinnungssystem schützt den Körper einerseits vor Blutverlusten und verhindert andererseits intravaskuläre Gerinnselbildungen. Dabei muss stets eine feine Balance gehalten werden; einerseits soll das Blut flüssig bleiben, andererseits im Falle einer Verletzung jedoch schnell und lokal begrenzt in einen festen Zustand überführt werden. Dies wird anhand eines durch vielerlei Aktivatoren und Inhibitoren der Gerinnung bzw. Fibrinolyse aufeinander abgestimmten Systems bewerkstelligt, das durch zahlreiche Positiv- und Negativ-Feedback-Mechanismen die hämostatische Balance aufrecht erhält. Dieser Gleichgewichtszustand zwischen Gerinnung und Fibrinolyse darf jedoch nicht als statisches System angesehen werden, da es durch ständige Umsetzung der einzelnen Faktoren dynamisch bleibt. Noch ist dieses komplexe Netzwerk, in dem Gefäßwandzellen (Endothel, Fibroblasten, glatte Muskelzellen), zirkulierende Zellen (Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Neutrophile), plasmatische Gerinnungsfaktoren, Proteine der Fibrinolyse und Faktoren des Komplementsystems zusammenspielen, nicht vollständig entschlüsselt.

Unter physiologischen Bedingungen findet sich eine eng aufeinander abgestimmte Regulierung des vaskulären, des thrombozytären und des plasmatischen Systems, durch die eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Blutung und Thrombose gewährleistet ist.

Interne Veränderungen (kongenitale und erworbene Gerinnungsdefekte, Störungen infolge von Organschädigungen oder malignen Erkrankungen, etc.) oder externe Einflüsse (Medikamente, extrakorporale Zirkulation) können den Gerinnungsablauf stören. Extrakorporale Zirkulationssysteme (z.B. Herz-Lungen-Maschine, HLM) greifen massiv in das Gleichgewicht der Hämostase ein, da das Blut in diesen Systemen mit bis zu 3 m^2 Fremdoberfläche in Kontakt kommt (Reservoir, Oxygenator, Wärmetauscher, Entschäumer,

Filter, Schlauchsysteme, etc.). Durch die Kontaktaktivierung werden über die verschiedenen Kaskadensysteme humorale und zelluläre Mechanismen initiiert, die zu einer pathophysiologischen, dem traumatischen Schock ähnlichen Antwort des Organismus führen (Colman et al., 1987; Hamsten, 1993; Wachtfogel et al., 1993). Diese Mechanismen und ihre Folgen werden für einen Teil der klinischen Probleme verantwortlich gemacht, die im postoperativen Management solcher Patienten im Vordergrund stehen. Dazu gehören z.B. das Postperfusionssyndrom mit kardiopulmonalen, renalen und hämostatischen Dysfunktionen, zerebrale Störungen, Veränderungen der Immunreaktion und nicht-operationsbedingte Nachblutungen (Gans et al., 1967; Kirklin et al., 1983; Mammen, 1968; Moriau et al., 1977). Dabei werden als mögliche Ursachen Faktoren wie Heparineffekte, Plasmaproteindenaturierung, metabolische Azidose, Thrombozytopenie, Hämolyse, exzessive Fibrinolyse und Verbrauchskoagulopathie diskutiert (Bachmann et al., 1975; Bick et al., 1976; Boldt et al., 1991; Deklerk et al., 1977; Hoffmeister et al., 1975; Mc Intire et al., 1976).

Obwohl viele in der Medizin und insbesondere in der kardiovaskulären Medizin verwendeten Vorrichtungen und Geräte bereits seit längerer Zeit mit niedrigem oder akzeptablem Komplikationsrisiko im Einsatz sind, kann keines der Materialien als wirklich biokompatibel bezeichnet werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Polymerwerkstoffen, die in extrakorporalen Kreislaufsystemen zum Einsatz kommen. Durch die Anwendung immunologischer Methoden wurde das Adsorptions- und Aktivierungsverhalten von Plasmaproteinen an den Fremdoberflächen untersucht.

Nachfolgend wird auf die extrakorporale Zirkulation eingegangen und es werden die in diesem Zusammenhang essentiellen Abläufe in den Reaktionssystemen des Blutes erläutert. Die ausführliche Beschreibung aller bekannter Regulationsmechanismen der Hämostase wäre aufgrund der Komplexität im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu umfangreich, so dass auf umfassende Literatur verwiesen wird (Bloom et al., 1994; Bauer, 1996; Silbernagl und Lang, 1998; Spaethe und Kolde, 1992). Es sollen in den Ausführungen daher speziell die Aktivierungsprozesse im Vordergrund stehen, die durch den direkten Kontakt von Humanblut mit Fremdmaterialien (Biomaterialien) induziert werden.

1.3 Die extrakorporale Zirkulation

Ein zentrales Instrument der Herzchirurgie ist die Herz-Lungen-Maschine (HLM), mit der die extrakorporale Zirkulation (EKZ) durchgeführt wird. Dadurch können Herz und Lunge aus dem Kreislauf ausgeschaltet und Korrekturen am stillgelegten Herzen durchgeführt werden. Durch die extrakorporale Zirkulation werden die Pumpfunktion des Herzens und die Gasaustauschfunktion der Lunge vorübergehend ersetzt. Bei Operationen am offenen Herzen werden die Herzhöhlen oder die herznahen großen Gefäße eröffnet (intrakardiale Korrekturen, Klappenersatz, etc.). Bei Operationen am geschlossenen Herzen erfolgt der Eingriff z.B. an den Koronararterien, am Perikard oder an den thorakalen Gefäßen.

1.3.1 Hintergrund

Die erste erfolgreiche Operation am offenen Herzen unter Zuhilfenahme der HLM, der Verschluss eines Vorhofseptumdefektes, wurde von Gibbon 1953 durchgeführt (Gibbon, 1954; Gibbon; 1959; Litwak, 2003). Nach diesem ersten Erfolg waren jedoch einige Misserfolge zu verzeichnen, die zunächst einen gewissen Pessimismus über den Einsatz der HLM zur Folge hatten. Lillehei führte daraufhin Korrekturen von angeborenen Herzfehlern mit Hilfe der kontrollierten „Kreuzzirkulation“ durch, während der der Patient an eine „Spenderzirkulation“ (normalerweise ein Elternteil) angeschlossen wurde, wodurch die Pump- und Gasaustauschfunktion von Herz und Lunge für die Dauer der Herzoperation vom „Spender“ übernommen wurde. Der große Erfolg dieser Operationen führte zu einer intensiven Forschungsarbeit mit dem Ziel, einen kardiopulmonalen Bypass zu etablieren, ohne auf einen Lebendspender angewiesen zu sein. Ein Durchbruch bei diesen Bestrebungen waren die ersten erfolgreichen Operationsserien mit verschiedenen Oxygenatoren im Jahr 1955 (Mayo Clinic-Gibbon Screen Oxygenator, DeWall-Lillehei Oxygenator).

Durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine wurden wegweisende Operationen möglich – teilweise spektakuläre Pionierleistungen – die bisweilen die einzige kurative Therapie bestimmter Erkrankungen darstellen (orthotoper Herzklappenersatz 1961, Venenbypassoperation 1964, Herztransplantation

1967). Es wurde eine Entwicklungsphase eingeleitet, die heute auch beispielsweise eine Versorgung sehr komplexer angeborener Herzfehler ermöglicht.
Herzchirurgische Eingriffe insgesamt sind heute Routine geworden, im Jahr 2003 wurden in Deutschland ungefähr 94.712 Herzoperationen unter Einsatz der EKZ durchgeführt (Kalmar und Irrgang, 2004). Neben den chirurgisch-technischen Anforderungen und der Beeinflussung der pathophysiologischen Zusammenhänge stehen heute das Streben nach einer Optimierung der Ergebnisse und die Ausweitung der Indikationen im Vordergrund.

1.3.2 Durchführung der extrakorporalen Zirkulation

Zu den Grundkomponenten der EKZ gehören die venöse Abflussleitung, ein Reservoir, eine Pumpe, ein Oxygenator mit integriertem Wärmetauscher, ein arterieller Filter und die arterielle Zuflussleitung.
Der extrakorporale Bypass-Kreislauf wird zunächst mit einer ausgeglichenen Salzlösung “geprimed“, um den Hämatokrit auf 20-25 % zu verdünnen. Diese Hämodilution verringert den Bedarf an Blutkonserven, reduziert die Traumatisierung von Blutzellen und Plasmaproteinen und erhöht die Urinausscheidung und die Kreatininclearance. Sie senkt allerdings den intravaskulären onkotischen Druck und führt somit zu einer stärkeren interstitiellen Ödembildung.
Vor der Kanülierung für die EKZ muss eine Antikoagulation mit ungefähr 400 IE Heparin/kg KG durchgeführt werden.
Über die drainierenden Kanülen im rechten Vorhof, in den beiden Hohlvenen oder der V. femoralis fließt das Blut mittels Schwerkraft über ein Reservoir in einen Gasaustauscher, in dem Kohlendioxid aus dem Blut entfernt und Sauerstoff zugesetzt wird. Das Oxygenatorsystem ist mit einem Wärmetauscher ausgestattet, der das Blut abkühlen und erwärmen kann. Das sauerstoffreiche Blut wird über eine Pumpe in die Aorta bzw. die A. femoralis geleitet. Bei normaler Körpertemperatur liegt der notwendige Flussindex bei ca. 2,5-3,0 l/min/m^2. Kurzdauernde Eingriffe werden überwiegend in Normothermie durchgeführt. Längerdauernde Eingriffe werden in Hypothermie durchgeführt, wobei der Grad der Hypothermie von der Art, Komplexität und der voraussichtlichen Dauer des

Eingriffs abhängig ist (moderate Hypothermie von 26-32°C normalerweise bei Routineoperationen, tiefe Hypothermie unter 20°C bei Korrekturen angeborener Vitien bei Neugeborenen und Kleinkindern). Die Hypothermie führt zu einer vorteilhaften Verlangsamung der Stoffwechselprozesse, so dass weniger Sauerstoff- und Substratangebot notwendig ist. Daher kann, in Abhängigkeit von der Temperatur, das Flussvolumen der Herz-Lungen-Maschine erheblich reduziert werden, was zugleich den Vorteil hat, dass das Operationsgebiet blutleerer und übersichtlicher wird.
Während der EKZ müssen in kurzen Abständen die Gerinnungsparameter kontrolliert werden, ebenso wie Blutfluss, systemarterieller und -venöser Druck, Temperatur, Urinausscheidung, Blutgase, Elektrolyte, Blutzucker, Hämatokrit.
Nach Beendigung der EKZ wird das Herz dekanüliert und die Antikoagulation wird durch die Gabe von Protaminsulfat aufgehoben (Lange, 2001; von der Emde und Cesnjevar, 1999; Yun und Burdon, 1998).

1.3.3 Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation

Die EKZ führt immer zu einer pathophysiologischen Reaktion des Organismus (Colman et al., 1987; Wachtfogel et al., 1993). Durch den mechanischen Transport wird das Blut erhöhten Scherkräften ausgesetzt, wodurch Erythrozyten hämolysiert werden. Durch den Kontakt mit den Fremdoberflächen werden vor allem Thrombozyten in ihrer Funktion und Gesamtzahl reduziert. Zahlreiche humorale Systeme wie die plasmatische Blutgerinnung, die Fibrinolyse, das Komplementsystem und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System werden aktiviert. Durch Leukozytenaktivierung werden spezifische Mediatoren wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle exprimiert, was zu einer generalisierten Abwehrreaktion des Organismus, vergleichbar einer systemischen Entzündungsreaktion, führt (Hill, 1998; Wan et al., 1997).
Klinisch äußert sich dies in Temperaturanstieg, Leukozytose und einer gesteigerten Kapillarpermeabilität („capillary leak syndrome“) mit Ödemneigung und sekundären Organfunktionsstörungen (Lunge, Niere, Gehirn, Darm). Diese Effekte sind von der Dauer der EKZ abhängig und betreffen Säuglinge, Kleinkinder und ältere Menschen besonders stark.

1.4 Gerinnungs- und Fibrinolysesystem

1.4.1 Plasmatische Blutgerinnung

Die Blutgerinnung setzt sich aus einer Reihe proteolytischer Reaktionen zusammen, die in der Bildung eines Fibringerinnsels münden. Dabei sind 15 bekannte Gerinnungsfaktoren beteiligt, bei denen es sich um Kofaktoren sowie um Proenzyme von Serinproteasen handelt, die durch eine „limitierte Proteolyse“ in Serinproteasen transformiert werden können. Der inaktive Teil des Proenzyms wird abgespalten und das aktive Zentrum des Enzyms freigelegt. Die kaskadenartigen Gerinnungsreaktionen laufen dabei teilweise an Komplexen ab, die aus Gerinnungsfaktoren, Ca^{2+}-Ionen und Phospholipiden bestehen. Thrombin ist das zentrale Gerinnungsprotein, da es die Reaktion von Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin katalysiert. Der auslösende Mechanismus für die Gerinnung ist entweder eine Kontaktaktivierung (intrinsisches System) oder eine Gewebsverletzung mit Freisetzung von Gewebefaktor (tissue factor, TF) durch Zellen (extrinsisches System der plasmatischen Gerinnung). Beide Reaktionswege unterscheiden sich in ihrem Ablauf bis zur Bildung des Prothrombinaktivators (Aktivierung von Faktor X), münden dann aber in einen gemeinsamen Weg ein, so dass Fibrinogen durch die Thrombinwirkung in Fibrin umgewandelt wird. Anschließend verbindet und stabilisiert der thrombinaktivierte Faktor XIII das monomere Fibrin zu stabilen Fibrinpolymeren und bewirkt seine Vernetzung mit aggregierten Thrombozyten, so dass ein fester Thrombus entsteht.

1.4.1.1 Die intrinsische Aktivierung

Das „Intrinsische System“ wird durch Kontaktaktivierung über die FXII-Aktivierung initiiert. Außerdem sind in dieser ersten Phase die Proenzyme FXI, Präkallikrein und als Kofaktor hochmolekulares Kininogen (HMWK) beteiligt (Fuhrer et al., 1990). Es wird allgemein angenommen, dass diese Moleküle für die Aktivierung der Proenzyme in vitro den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen benötigen (Schmaier, 1997), so dass das adsorbierte Proenzym FXII durch sofortige Autoaktivierung in die aktiven Serinproteasen α- und β-FXIIa umgewandelt wird (Griffin, 1978; Revak und Cochrane, 1976; Revak et al., 1978). Faktor

XIIa wandelt Präkallikrein in Kallikrein um und aktiviert, mit HMWK als Kofaktor, Faktor XI zu Faktor XIa. Faktor XIa aktiviert Faktor IX zu Faktor IXa. Da Kallikrein selbst α- und β-FXIIa aktivieren kann (positives Feedback), kommt es zu einer massiven Aktivierung von FXII. Die beiden FXII-Fragmente sind außerdem über die zusätzliche Aktivierung der extrinsischen Gerinnung über Faktor VII (Osterud, 1990; Radcliffe et al., 1977), der Fibrinolyse über Plasminogen (Binnema et al., 1991; Bouma et al., 1980) und des Komplementsystems über den Komplementfaktor C1 mit den anderen hämostaseologischen Systemen verknüpft.

Die Bedeutung der intrinsischen Aktivierung für die physiologische Blutgerinnung ist nicht ganz klar, da das Auftreten negativ geladener Oberflächen in vivo limitiert ist. Nach einer Gefäßläsion aus dem Subendothel ausgetretenes Kollagen könnte die für diesen Reaktionsweg benötigte Oberfläche darstellen (Furie und Furie, 1988). Die unter physiologischen Bedingungen eher untergeordnete Rolle der intrinsischen Aktivierung könnte durch die Tatsache bestätigt werden, dass ein Mangel an den beteiligten Proteinen HMWK, Präkallikrein und FXII in vivo nicht mit einer abnormen Blutungsneigung verbunden ist.

1.4.1.2 Die extrinsische Aktivierung

Der physiologische Initiator der Gerinnung ist der Gewebefaktor („tissue factor“, TF), der in den Zellmembranen von Endothelzellen enthalten ist und nach einer Gefäßläsion aus den verletzten Zellen freigesetzt wird. TF bildet daraufhin in Anwesenheit von Plättchenfaktor 3 und Ca^{2+} mit Faktor VII aus dem Plasma einen Komplex, den TF-VIIa Komplex, der FX zu FXa aktiviert (Nemerson und Bach, 1982; Osterud, 1984). FVII selbst wird durch geringe Mengen von Thrombin, FIXa, FXa und TF-VIIa Komplex aktiviert. Sehr geringe Mengen von FVIIa im Picomol-Bereich zirkulieren stets im Blut, es wird angenommen, dass sie als Primer in der Initiierung der Gerinnungskaskade wirken, da sie bei einer TF-Freisetzung die sofortige Bildung von TF-VIIa Komplex erlauben. Der TF-VIIa Komplex aktiviert außerdem FIX zu FIXa und stellt damit einen wichtigen Rückkopplungsmechanismus zur intrinsischen Gerinnung dar (s.o.). In entgegengesetzter Richtung kann eine Aktivierung des intrinsischen Systems

auch zu einer Aktivierung des extrinsischen Systems führen, da FXIIa auch FVII aktiviert (Osterud, 1990; Radcliffe et al., 1977). Die extrinsische und intrinsische Aktivierung sind also nicht unabhängig voneinander, es bestehen Verbindungen zwischen den beiden Systemen. Wird die Gerinnung über den „tissue-factor pathway“ initiiert, ist auch der intrinsische Tenase-Komplex FIXa-FVIIIa von Bedeutung, da die durch ihn induzierte FXa-Produktion signifikant zur Thrombin-Bildung beiträgt (Lawson et al., 1994). Es scheint, dass der extrinsische Tenase-Komplex TF-FVIIa für den Start der Gerinnung verantwortlich ist, während der intrinsische Tenase-Komplex für die weitere Fortsetzung maßgeblich ist.

1.4.2 Fibrinolyse

Dem Vorgang der Blutgerinnung steht ein ähnlich komplexes System gegenüber, das fibrinolytische System, das am Endprodukt der Blutgerinnung, dem Fibrin, angreift. Es handelt sich prinzipiell um zwei eigenständige Systeme, die jedoch durch mehrere positive und negative Feedback-Mechanismen miteinander verknüpft sind (Bachmann, 1987; Paques und Heimburger, 1986). Die Fibrinolyse ist ein enzymatischer Prozess, bei dem die durch die Blutgerinnung entstandenen Fibringerinnsel abgebaut werden. Das zentrale Enzym ist die Serinprotease Plasmin, die unlösliches Fibrin in lösliche Fibrinopeptide spaltet. Plasmin spaltet außerdem die Faktoren V und VIII und Fibrinogen. Aktives Plasmin entsteht aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen, für die Plasminogenaktivierung existieren wie bei der Blutgerinnung ein intrinsischer und ein extrinsischer Weg. Der wichtigste Plasminogenaktivator des Blutes ist Faktor XIIa, der aus Präkallikrein das Kallikrein freisetzt, das Plasminogen in Plasmin überführt; außerdem kann die intrinsische Aktivierung über FXIa erfolgen. Die extrinsische Fibrinolyseaktivierung erfolgt hauptsächlich durch zwei Typen von Aktivatoren: Durch den Gewebetyp (t-PA) und den Urokinasetyp (u-PA). Die Gewebeaktivatoren des Plasminogens werden u.a. von Endothelzellen, Leukozyten und Epithelzellen der Harnwege gebildet. Reize zur Freisetzung der Gewebefaktoren sind u.a. Gefäßdehnung und erhöhte Katecholaminfreisetzung. Die Gewebefaktoren selbst werden durch spezifische Inhibitoren im Plasma kontrolliert (Koh et al.,1991; Kruithof, 1988).

1.4.3 Inhibitoren

Das Plasma enthält eine Reihe von physiologischen Serinprotease-Inhibitoren, die eine entscheidende Rolle in der Gerinnung und Fibrinolyse wie auch in der Regulation inflammatorischer Prozesse spielen (Scott et al., 1986). Der C1-Esterase-Inhibitor hemmt die Faktoren XIa, XIIa und Kallikrein. Weitere Serinprotease-Inhibitoren sind α_1-Antitrypsin, α_2-Antiplasmin, α_2-Makroglobulin und Antithrombin III. Die Inhibierung erfolgt über die Bildung von Enzym-Inhibitor-Komplexen, wodurch das aktive Zentrum des Enzyms blockiert wird. Der wichigste Inhibitor der Blutgerinnung ist wahrscheinlich Antithrombin III, das FXa und Thrombin inhibiert, aber auch FIXa, FXIa und FXIIa inhibieren kann (Hirsh, 1991; Perry, 1994). Seine Aktivität wird in Anwesenheit von Heparin bis zu 1000-fach gesteigert, Antithrombin III wird deshalb auch als Heparin-Kofaktor bezeichnet.

Der TF-VIIa Komplex wird durch Antithrombin III nicht effektiv inhibiert, sein Inhibitor ist der „Tissue factor pathway-Inhibitor“ (TFPI). Er befindet sich zu einem geringeren Teil im Plasma, zu einem größeren Teil auf Gefäßendothel und kann auch von Thrombozyten und aktivierten Monozyten freigesetzt werden. TFPI hat zwei Bindungsstellen, eine für FXa und eine für den TF-VIIa Komplex. Die Inaktivierung von FXa durch die Bindung an TFPI ist Voraussetzung für die Inhibierung des TF-VIIa Komplexes.

Ein weiterer wichtiger Inhibitor der plasmatischen Gerinnung ist Protein C (Dahlbäck, 1995), das zusammen mit seinem Kofaktor Protein S (Vitronectin) proteolytisch FVa und FVIIIa inaktiviert. Außerdem kann aktiviertes Protein C (APC) den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor aus Endothelzellen und Thrombozyten abbauen und dadurch fibrinolysefördernd wirken (Fouw et al., 1987; Hinsbergh et al., 1985; Sakata et al., 1985). Eine APC-Resistenz stellt daher einen wichtigen Risikofaktor für thromboembolische Erkrankungen dar.

Schließlich fördert Fibrin selbst eine Aktivierung der Fibrinolyse, indem Plasminogen und der Plasminogen-Aktivator an Fibrin binden und dadurch eine erhebliche Steigerung der Plasminogenaktivierung bewirken.

Die Inhibierung des fibrinolytischen Systems erfolgt vorwiegend durch

Antiplasmine, die im Blut vorhandenes freies Plasmin schnell inaktivieren. Dazu gehören α_1-Antitrypsin, α_2-Antiplasmin, α_2-Makroglobulin und Antithrombin III. Die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA werden von spezifischen Inhibitoren im Plasma (PAI) kontrolliert (Koh et al., 1991; Kruithof, 1988).

1.4.4 Komplementsystem

Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle in der körpereigenen Abwehr gegen Infektionen und „körperfremde“ Elemente. Es stellt ein lytisches System zur Beseitigung pathogener Organismen dar und ist das entwicklungsphysiologisch älteste Abwehrsystem des Menschen. Es besteht aus über 20 verschiedenen Plasmaproteinen, die als Komplementfaktoren und als verschiedene Zellfaktoren fungieren. Das Komplementsystem lässt sich über zwei Aktivierungskaskaden initiieren, die als klassischer und als alternativer Pathway bezeichnet werden (Vogt, 1982). Der klassische Weg wird normalerweise durch Antigen-Antikörper-Komplexe getriggert, die an den C1-Komplex binden. Die Aktivierung des alternativen Pathways erfordert keine Antikörper- oder Immunkomplexe und wird durch verschiedene Fremdoberflächen wie Pilz- und Bakterienpolysaccharide, Lipopolysaccharide oder Oberflächen von Biomaterialien induziert. Beide Wege führen zur Bildung eines C3-spaltenden Enzyms. Die generierten C3-Fragmente sind an der Bildung eines weiteren Enzyms beteiligt, das die Aktivierung von C5 bewirkt. Am Ende beider Kaskaden steht die Bildung des terminalen Lysekomplexes (C5b-9, TCC), der auch als „membrane attack complex“ (MAC) bezeichnet wird. Dieser Komplex baut sich in die Lipidmembran der entsprechenden Zelle ein und führt schließlich zur vollständigen Lyse der attackierten Zelle (Ward et al., 1985).

Die Komplementaktivierung spielt außerdem eine entscheidende Rolle in der Blutgerinnung, da das Komplementsystem mit dem Kontaktphasensystem und dem Schlüsselsystem der Fibrinolyse, Plasmin, verbunden ist (Kirklin et al., 1983; Mammen 1968; Tennenberg et al., 1990). FXIIa bewirkt durch Proteolyse von C1 die Aktivierung der ersten Komponente des Komplementsystems. Auch Plasmin und Thrombin, die durch FXII generiert werden, können C1 aktivieren. Die Aktivierung von C3 zu C3a durch Plasmin stellt eine weitere

Verbindung zum Fibrinolysesystem dar. Kallikrein aktiviert C1 und C5 und Faktor B des alternativen Komplementweges. Aktivierte Komplementfaktoren können wiederum den chemotaktischen Effekt von Kallikrein auf Leukozyten verstärken. Auch geringe Mengen an C5b-9 können Leukozyten aktivieren (Kazatchkine und Carreno, 1988), so dass auch ein Material mit einer verhältnismäßig niedrigen terminalen Komplementaktivierung eine signikante inflammatorische Antwort induzieren kann. Das Komplementsystem ist demnach nicht nur ein humorales Abwehrsystem, sondern kann zusätzlich als Vermittler der zellulären Abwehrkaskade wirken. Die Leukozytenaktivierung selbst führt zur Aktivierung von Gerinnungs- und Kontaktphasensystem, die wiederum das Komplementsystem aktivieren können. Dieser stark ausgeprägte Feedback-Mechanismus kann insbesondere auch infolge fehlender Rückkopplung des Komplementsystems mit seinem terminalen Endprodukt pathophysiologisch zu ausgeprägten inflammatorischen Reaktionen bis hin zu Sepsis und akutem Lungenversagen führen (Heimburger, 1994; Müller, 1991).

1.4.5 Thrombozyten

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten liegt in der raschen und zuverlässigen Abdichtung eines verletzten Blutgefäßes durch Bildung eines Thrombozytenpfropfes. Thrombozyten sind kernlose, scheibchen- bzw. linsenförmige Zellen mit einem Durchmesser von 3-4 μm. Sie entstehen durch Abschnürungen aus den Megakaryozyten des Knochenmarks, die normale Thrombozytenkonzentration im Blut beträgt 150.000 bis 400.000/ml Blut. Die Plättchenaktivierung erfolgt über Kontakt mit thrombogenen Oberflächen wie verletztem Endothel, Subendothel oder künstlichen Oberflächen. Sie wird durch die Interaktion eines extrazellulären Stimulus mit der Plättchenoberfläche gestartet. Dabei bindet ein Agonist an einen spezifischen Rezeptor auf der Plasmamembran der Thrombozyten. Zu diesen Plättchenaktivatoren gehören Plasmaproteine wie Thrombin und Fibrinogen, Kollagen oder Moleküle, die aus Leukozyten oder Plättchen selbst stammen, wie z.B. der platelet activating factor (PAF). Die Plättchenaktivierung führt zu mindestens fünf physiologischen Antworten. Es werden Stoffe aus intrazellulären Granula freigesetzt wie z.B.

β-Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4, Thrombospondin, ADP und Serotonin. Nach dieser α-Granula-Sekretion wird P-Selektin freigesetzt und auf der Thrombozytenmembran exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Thrombozytenadhäsion an Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten (Rinder et al., 1991; Rinder et al., 1994). Die Plättchenaktivierung führt zu einer deutlichen Änderung der äußeren Form, es entstehen kugelige Gebilde mit langen Fortsätzen, wodurch die Plättchen in engen und verzahnten Kontakt treten und aggregieren können. Die Aktivierung resultiert außerdem in der Bildung von Plättchen-Mikropartikeln (PMPs), die u.a. FVa und Plättchenfaktor 3 enthalten, an Fibrinogen und Fibrin adhärieren können und mit Plättchen ko-aggregieren können. Unter den verschiedenen Plättchenrezeptoren haben GPIb und GPIIb/IIIa die höchste Dichte auf den Plättchen. GPIb vermittelt die Plättcheninteraktion mit von Willebrand Faktor (vWF). GPIIb/IIIa befindet sich auf ruhenden Plättchen in einer inaktiven Form und zeigt eine niedrige Bindungsaffinität zu adsorbiertem Fibrinogen. Durch Plättchenaktivierung wird eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für gelöstes Fibrinogen präsentiert. Die Bindung von Fibrinogen an GPIIb/IIIa führt sowohl zur Thrombozytenaggregation als auch zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (Gorbet und Sefton, 2004).
Während der EKZ kommt es zur Thrombozytenaktivierung und -adhäsion (Hanson, 1993; Ratner, 1993), womit die in diesem Gebiet assoziierten thrombotischen Komplikationen verbunden sind, so dass diese Verknüpfungen in Untersuchungen zur Biokompatibilität miteinbezogen werden.

1.4.6 Leukozyten

Zur Gruppe der Leukozyten gehören die neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, die Monozyten und die Lymphozyten. Im weiteren wird nur auf die Neutrophilen und die Monozyten eingegangen werden, da sie die Hauptbeteiligten in der inflammatorischen Antwort auf kardiovaskuläre Devices sind. Werden sie im Rahmen inflammatorischer Prozesse freigesetzt, erhöht sich ihre Halbwertszeit auf mehrere Tage (die der Neutrophilen beträgt normalerweise 8-20 h, die der Monozyten 36-104 h). Neutrophile und Monozyten besitzen Rezeptoren für verschiedene Moleküle des Komplementsystems und

andere proinflammatorische Substanzen wie PAF oder Zytokine. Für freigesetzte Plättchensubstanzen wie β-Thromboglobulin und PDGF konnte in vitro ebenfalls eine Neutrophilenaktivierung gezeigt werden (Bazzoni et al., 1992; Del Maschio et al., 1989; Del Maschio et al., 1993). Die Leukozytenaktivierung führt zu bestimmten physiologischen Antworten. Die Expression von Membranrezeptoren verändert sich. Es kommt zu einer Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, zu denen u.a. Elastase, Kathepsin G und Laktoferrin gehören. Des weiteren werden Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNFα, etc.) freigesetzt. Arachidonsäuremetaboliten wie Leukotrien B_4 und PAF werden von aktivierten Neutrophilen hergestellt. Die freigesetzten Mediatoren wirken chemotaktisch auf Leukozyten, unterstützen die Anlagerung an Endothelzellen und führen zu einer weiteren Leukozyten- und Plättchenaktivierung. Die Aktivierung kann außerdem eine Freisetzung von Radikalen (O_2^-, H_2O_2) bewirken, die Gewebe und aktivierte Zellen zerstören können. Aktivierte Neutrophile und Monozyten haben eine erhöhte Fähigkeit, sich an Endothel oder anderen Oberflächen anzulagern, eine wichtige Eigenschaft im Rahmen der inflammatorischen Antwort.

Der Kontakt mit kardiovaskulären Devices aktiviert sowohl Neutrophile als auch Monozyten, dies wurde für den kardiopulmonalen Bypass (Cameron, 1996; El Habbal et al., 1995; Rinder et al., 1996), aber auch für die Angioplastie (Inque et al., 1996; Neumann et al., 1996) und Hämodialyse (Christol et al., 1994; Rousseau et al., 1990; Von Appen et al., 1994) gezeigt. Die Leukozytenaktivierung durch Biomaterialien führt auch zu einer gesteigerten Adhäsion, beispielsweise an Oxygenatoren (Jobes, 1998). Die genauen Mechanismen der Leukozytenadhäsion auf Fremdoberflächen sind noch nicht geklärt, gezeigt werden konnten jedoch Beteiligungen von Komplementfaktoren (iC3b (Anderson, 1993; Remes und Williams, 1992)) und Fibrinogen (Tang et al., 1993; Tang und Eaton, 1993). Ob die Leukozyten direkt durch den Kontakt mit den Fremdoberflächen oder über das Komplementsystem, Kallikrein oder eine Thrombozytenaktivierung aktiviert werden, steht noch nicht sicher fest. Es ist dabei durchaus denkbar, dass die Leukozytenaktivierung durch mehrere Mediatoren bewerkstelligt wird (Gorbet und Sefton, 2004).

1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Komplexität der Interaktionen von Blutbestandteilen mit Biomaterialien führt dazu, dass die Mechanismen in ihrer Gesamtheit bis heute viele Fragen offen lassen. Die Diskussionen um diese Interaktionen kehren jedoch zu einem initialen Punkt zurück, nämlich der Rolle der adsorbierten Plasmaproteine. Die Plasmaproteinadsorption ist vom zeitlichen Ablauf her gesehen der erste und auch der schnellste Schritt in der Interaktion zwischen Blut und Biomaterial. Es wird daher heute davon ausgegangen, dass die Adsorption und Aktivierung bestimmter Plasmaproteine (z. B. Faktor XII, Fibrinogen, Vitronectin, Komplementfaktor C3, u. a.) durch den Kontakt mit Fremdoberflächen eine entscheidende Rolle für sämtliche nachfolgenden Aktivierungsreaktionen (Gerinnungssystem, FXII-Kallikrein-Kinin-System, Komplementsystem, Zellstimulierungen, Fibrinolyse) spielen und so letztendlich den Grad der Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche bedingen (Cornelius und Brash, 1993; Salzmann et al., 1994; Santerre et al., 1992; Tsai et al., 1999; Weber et al., 2000). Neben den aktivatorischen Adsorptionsproteinen gibt es jedoch auch Adsorptionsproteine, denen „passivierende“ Eigenschaften zugeschrieben werden (z.B. Albumin, HMWK) (Wendel et al., 1999). Die Adsorption dieser Proteine an die Fremdoberflächen bewirkt eine reduzierte Adhäsion und Aktivierung von Blutzellen (v. a. Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten) (Khan et al., 1998; Yung et al., 1996; Yung et al., 2000), woraus eine verbesserte Hämokompatibilität resultieren kann.
Das selektive Adsorptionsverhalten bzw. der Aktivierungsgrad der Plasmaproteine und das Ausmaß der Zellaktivierungen beeinflussen entscheidend die Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche. Durch die Aufklärung dieser Mechanismen und Zusammenhänge können neue Impulse für die Entwicklung hämokompatibler Materialien gegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand verschiedener Methoden vergleichende Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Plasmaproteinen an modifizierten Fremdoberflächen durchgeführt.
Der erste Teil befasste sich mit der Analyse der auf den Fremdoberflächen adsorbierten Plasmaproteine mit Hilfe eines kürzlich entwickelten modifizierten

ELISA-Verfahrens (Wendel et al.,1999).

Im zweiten Teil wurden die von den Fremdoberflächen abgelösten Adsorptionsproteine durch „Western Blotting“ analysiert.

Im dritten Teil wurden Konzentrationsänderungen der löslichen Aktivierungsmarker des Gerinnungs- und des Komplementsystems und der Thrombozyten im Plasma untersucht.

Mit diesen Methoden können mögliche Korrelationen zwischen selektiv adsorbierten Plasmaproteinen und der Thrombogenität von Fremdoberflächen untersucht werden. Anhand des Adsorptionsverhaltens sollten Aussagen über die Hämokompatibilität von Polymerwerkstoffen, die in der extrakorporalen Zirkulation eingesetzt werden (könnten), ermöglicht werden. Neben der Heparinbeschichtung, die bereits im klinischen Einsatz ist und bekanntermaßen eine ausgesprochen gute Hämokompatibilität aufweist, wurden auch andere Beschichtungen, Polypeptidbeschichtungen, untersucht. Außerdem wurden verschiedene unbeschichtete Kunststoffe untersucht.

Zusätzlich zu den Aussagen über die Hämokompatibilität könnten sich außerdem neue Erkenntnisse bezüglich der Interaktionen zwischen Proteinadsorption, Zellaktivierungsmechanismen und den thrombogenen Eigenschaften eines Materials ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Art	Firma	Katalog-Nr.
Acrylamidmix (rotiphorese® Gel 30)	Roth, Karlsruhe	3029
„Ampuwa“ (aqua ad iniectabilia)	Boehringer Ingelheim Delta-Pharma, Pfullingen	
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt	101201
Sigma FAST™ BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet	Sigma, Deisenhofen	B-5655
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen	B-0126
BSA (Bovine Fraction V Powder)	Sigma, Deisenhofen	A-9647
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Darmstadt	115444
CWFS Gelatine	Aurion Biotrend, Köln	900033
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt	111474
Donkey Serum	Sigma, Deisenhofen	D-9663
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Merck, Darmstadt	100066
Ethanol (pro analysi absolut)	Merck, Darmstadt	100983
Fast Green FCF	Merck, Darmstadt	104022
Glycerin	Merck, Darmstadt	159522
Glycin (Puffersubstanz für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt	104169
Goat Serum	Sigma, Deisenhofen	G-9023
HCl (1 N)	Merck, Darmstadt	109057
HCl (rauchend 37 %)	Merck, Darmstadt	100317
HMW-Marker (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High Range)	Bio-Rad, München	161-0303
Liquemin® N 25000	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz	
Methanol (zur Analyse)	Merck, Darmstadt	106009
NaCl (pro analysi)	Merck, Darmstadt	106404
Isotonische Natriumchlorid-Lösung	Boehringer Ingelheim Delta-Pharma, Pfullingen	

NaN_3 (Natriumazid)	Merck, Darmstadt	106688
Natronlauge (NaOH, 2 N)	Merck, Darmstadt	109136
Nonfat-Dried Milk (Bovine)	Sigma, Deisenhofen	M-7409
PBS Special GIBCO BRL	Life Technologies, Karlsruhe	14190-169
PFA (Para-Formaldehyd)	Merck, Darmstadt	104005
Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure 85 %)	Merck, Darmstadt	100573
Sigma FAST™ pNPP Tablet Sets	Sigma, Deisenhofen	N-2770
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Deisenhofen	L-3771
TEMED	Sigma, Deisenhofen	T-7024
Titriplex® III (pro analysi)	Merck, Darmstadt	108418
Tris (Trizma® Base)	Sigma, Deisenhofen	T-1503
Tween® 20	Merck, Darmstadt	822184

2.2 Verbrauchsmaterial

Art	**Firma**
Neutrale Monovette® (ohne Präparierung), 9,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoffspritzen	Braun, Melsungen
Plastikbecher	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcon®-Röhrchen (Falcon® Blue Max™), 50 ml	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Centriprep®10	Amicon, Beverly, USA
Filterpapier (Extra Thick Filter Paper, 15 x 20 cm, 30 Stück)	Bio-Rad, München

Nitrocellulosemembran (Trans-Blot® Transfer Medium, 0,45 mm)	Bio-Rad, München

2.3 Antikörper

2.3.1 ELISA: Primäre polyklonale Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Verwendetes Serum	Sekundärer Antikörper	Firma	Kat.-Nr.
Anti-Human Fibrinogen	Goat	1:1000	Donkey	Anti-Sheep IgG-AP (aus Donkey)	Sigma, Deisenhofen	F-2506
Anti-Human C3-Komplement	Goat	1:1000	Donkey	Anti-Sheep IgG-AP	ICN (Cappel), Aurora, USA	55-117
Anti-Human Antithrombin III	Goat	1:1000	Donkey	Anti-Sheep IgG-AP	Sigma, Deisenhofen	A-8904
Anti-Human C1-Esterase-Inhibitor	Goat	1:1000	Donkey	Anti-Sheep IgG-AP	Sigma, Deisenhofen	C-8159
Anti-Human Fibronectin	Goat	1:1000	Donkey	Anti-Sheep IgG-AP	ICN (Cappel), Aurora, USA	55-125
Sheep anti-Human Thrombin	Sheep	1:500	Donkey	Anti-Sheep IgG-AP	Biodesign, Kennebunk, USA	K95002S
Anti-Human High-Molecular-Weight-Kininogen	Goat	1:1000	–	Anti-Sheep IgG-AP	ICN (Cappel), Aurora, USA	66-106
Anti-Human Albumin	Rabbit	1:500	Goat	Anti-Rabbit IgG-AP (aus Goat)	Sigma, Deisenhofen	A-0433

2.3.2 ELISA: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Serum	Firma	Kat.-Nr.
Anti-Sheep IgG-AP	Donkey	Alkalische Phosphatase	1:400	Donkey	Sigma, Deisenhofen	A-5187
Anti-Rabbit IgG-AP	Goat	Alkalische Phosphatase	1:800	Goat	Sigma, Deisenhofen	A-9919

2.3.3 „Western Blotting“: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	poly-/monoklonal	Sekundärer Antikörper	Firma	Kat.-Nr.
Anti-Human Fibrinogen	Goat	1:2000	polyklonal	Anti-Sheep IgG-AP (aus Donkey)	Sigma, Deisenhofen	F-2506
Anti-Human C3-Komplement	Goat	1:2000	polyklonal	Anti-Sheep IgG-AP	ICN (Cappel), Aurora, USA	55-117
Anti-Human Antithrombin III	Goat	1:2000	polyklonal	Anti-Sheep IgG-AP	Sigma, Deisenhofen	A-8904
Anti-Human C1-Esterase-Inhibitor	Goat	1:2000	polyklonal	Anti-Sheep IgG-AP	Sigma, Deisenhofen	C-8159
Anti-Human Fibronectin	Goat	1:2000	polyklonal	Anti-Sheep IgG-AP	ICN (Cappel), Aurora, USA	55-125
Anti-Human High-Molecular-Weight-Kininogen	Goat	1:2000	polyklonal	Anti-Sheep IgG-AP	ICN (Cappel), Aurora, USA	66-106
Anti-Human Albumin	Rabbit	1:2000	polyklonal	Anti-Rabbit IgG-AP (aus Goat)	Sigma, Deisenhofen	A-0433
Anti-Human CD 41	Mouse	1:2000	monoklonal	Anti-Mouse IgG-AP (aus Goat)	Immunotech (Beckmann/ Coulter), Marseille, Frankreich	0539
Anti-Human Hsp 70	Mouse	1:2000	monoklonal	Anti-Mouse IgG-AP (aus Goat)	Dianova, Hamburg	MA3-006

2.3.4 „Western Blotting“: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Firma	Kat.-Nr.
Anti-Sheep IgG-AP	Donkey	Alkalische Phosphatase	1:10.000	Sigma, Deisenhofen	A-5187
Anti-Rabbit IgG-AP	Goat	Alkalische Phosphatase	1:10.000	Sigma, Deisenhofen	A-9919
Anti-Mouse IgG-AP	Goat	Alkalische Phosphatase	1:20.000	Immunotech (Beckmann/Coulter), Marseille, Frankreich	0818

2.4 ELISA Kits

Kit	Beschreibung	Firma
Asserachrom® β-TG	Enzymimmunologischer in-vitro Test zur quantitativen Bestimmung von β-Thromboglobulin	Roche Diagnostics, Mannheim
Enzygnost® F 1+2 micro	Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Prothrombinfragment F 1+2	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
Enzygnost® TAT micro	Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Thrombin/ Antithrombin III-Komplex	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
PMN Elastase 2 h Version	Heterogener Enzymimmunoassay zur spezifischen Bestimmung der PMN Elastase	Merck, Darmstadt
SC5b-9 Komplex ELISA Kit	Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von SC5b-9 Komplexen im Serum/Plasma	INNOGENETICS GmbH, Heiden

2.5 Puffer und Lösungen

Lösung	Ansatz
Heparinlösung für Neutralmonovetten	Neutralmonovetten 9 ml: Zugabe von 900 µl Liquemin®-Lösung mit 10 IU Liquemin®/ml Lösung, verdünnt in physiologischer NaCl 0,9 % (d.h. 9 IU Liquemin®/9 ml Endvolumen Blut)
Modifizierter ELISA	
4 % Para-Formaldehyd-Lösung	4 % Para-Formaldehyd in PBS, pH 7,4
TBS-Stammlösung (0,5 M)	Tris und NaCl 0,5 M in H_2O
TBS-Lösung (0,05 M)	TBS-Stammlösung (0,5 M) in H_2O, pH 7,4

Glycin-Lösung (0,05 M)	Glycin 0,05 M in TBS (0,05 M)
Blockierungs-Lösung	80 ml Ansatz: 80 ml TBS (0,05 M) 4,0 g BSA 80 ml CWFS-Gelatine 8 ml Esel- oder Ziegen-Normalserum (je nach Spezies des sekundären Antikörpers der Immuninkubation)
Antikörper-Puffer (für alle Antikörper mit Ausnahme des Anti-Human HMWK)	200 ml Ansatz: 200 ml TBS (0,05 M) 2,0 g BSA 2 ml Esel- oder Ziegen-Normalserum (je nach Spezies des sekundären Antikörpers der Immuninkubation)
Antikörper-Puffer für den Versuch mit anti-Human-HMWK)	200 ml Ansatz: 200 ml TBS (0,05 M) 10,0 g BSA 2 ml Esel-Normalserum
pNPP-Substrat-Lösung (ELISA)	1 Puffertablette und 1 Substrattablette in 20 ml H_2O lösen
Western Blotting	
EDTA-Lösung (20 mMol)	EDTA (20 mMol) in PBS, pH 7,4
1 % SDS-Lösung	1 % SDS in TBS (0,05 M)
Bradford-Lösung	250 ml Ansatz: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 wurden in 12,5 ml Ethanol p.a. (99 %) sowie 25 ml Phosphorsäure p.a. (85 %) vorgelöst und mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt
Gelpuffer	100 ml Ansatz: 18,8 g Tris 0,4 g SDS 80 ml NaN_3 mit HCl auf pH 8,8 titrieren und mit H_2O auf 100 ml auffüllen
Reduzierender Probenpuffer	100 ml Ansatz: 2,5 ml Gelpuffer 2,0 g SDS 0,5 g Dithiothreitol 10 mg Bromphenolblau 20 ml Glycerin (87 %) mit H_2O auf 100 ml auffüllen
Tris (Trenngel), 1,875 M	Tris 1,875 M in H_2O, pH 8,8

Tris (Sammelgel), 0,625 M	Tris 0,625 M in H_2O, pH 6,8
10 % APS	10 % APS in H_2O
10 % SDS-Lösung	10 % SDS in H_2O
Trenngel (8 %), 0,375 M Tris pH 8,8 0,1 % SDS	6,7 ml Acrylamidmix (30 %), 5 ml Tris (5fach) und 13,3 ml H_2O gut mischen 250 ml SDS (10 %), 12,5 ml TEMED (100 %) und 250 ml APS (10 %) hinzufügen, gut mischen und das Gel sofort gießen
Sammelgel (4 %), 0,125 M Tris pH 6,8 0,1 % SDS	3,3 ml Acrylamidmix (30 %), 5 ml Tris (5fach) und 16,6 ml H_2O gut mischen 250 ml SDS (10 %), 25 ml TEMED (100 %) und 350 ml APS (10 %) hinzufügen, gut mischen und das Gel sofort gießen
Elektrodenpuffer	500 ml Ansatz: 1,5 g Tris, 7,2 g Glycin und 0,5 g SDS in 500 ml H_2O lösen
Transferpuffer	1000 ml Ansatz: 3,0 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS und 200 ml Methanol mit H_2O auf 1000 ml auffüllen
0,1 % Fast Green in 1 % Essigsäure (100 %)	200 ml Ansatz: 0,2 g Fast Green und 2 ml Eisessig mit 198 ml H_2O auffüllen und mischen
NaOH (0,2 M)	NaOH 0,2 M in H_2O
Blockierungs- Lösung	Wie vom Hersteller angegeben: 100 ml Ansatz: Trockenmilchpulver (Nonfat-Dried Milk from Bovine) durch Zufügen von 100 ml H_2O und Rühren vollständig auflösen
TBS, 20 mM Tris 500 mM NaCl	PH 7,5
TTBS, 20 mM Tris 500 mM NaCl 0,05 % Tween® 20	1000 ml Ansatz: 1000 ml TBS, 0,5 ml Tween® 20 hinzufügen und gut mischen

BCIP/NBT-Substrat-Lösung	Wie vom Hersteller angegeben: 10 ml Ansatz: 1 Tablette in 10 ml „Ampuwa“ auflösen, Substrat-Lösung sofort verwenden
Tris-Puffer	0,1 M Tris ultra Pure in H_2O
Zitratpuffer	2,1 g Zitronensäure-Monohydrat auf 1l H_2O, pH 6,0

2.6 Geräte

Typ	Hersteller	Gerätename
Chandler-Loop-Modell	Eigenbau Universitäts-Klinikum Tübingen	
Magnetrührer/ Heizplatte	Heidolph	MR 3001
Vortex	Scientific Industries	Vortex-Genie 2™
Zentrifuge (klein)	Eppendorf	Centrifuge 5415 C
Zentrifuge (groß)	Heraeus	Cryofuge 8000
Brutschrank	MELAG	Incubat
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Dynatech	MR 7000
Heizblock	UNITEK	HB-130
Power Supply	Bio-Rad	Model 200/2.0 Power Supply
Apparatur zum Gelgießen	Bio-Rad	
Gelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad	Mini-PROTEAN® II
Blotting-Apparatur	Pharmacia LKB	Multiphor 2
„Blot-Schüttler“	Heidolph	Rotamax 120

2.7 Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand verschiedener Methoden vergleichende Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Plasmaproteinen an modifizierten Fremdoberflächen durchgeführt.
Der erste Teil befasste sich mit der Analyse der auf den Fremdoberflächen adsorbierten Plasmaproteine mit Hilfe eines kürzlich entwickelten modifizierten ELISA-Verfahrens.
Im zweiten Teil wurden die von den Fremdoberflächen abgelösten Adsorptionsproteine durch „Western Blotting“ analysiert.
Im dritten Teil wurden Konzentrationsänderungen der löslichen Aktivierungsmarker des Gerinnungs- und des Komplementsystems im Plasma untersucht.

2.8 Herstellung der Proben

2.8.1 Probanden

Die Untersuchungen erfolgten mit Blut von Nichtrauchern (Alter: 20-30 Jahre), die gesund waren und bei denen keine Störungen der Blutgerinnung bekannt waren. Die Probanden nahmen keine Medikamente regelmäßig ein, insbesondere keine oralen Kontrazeptiva und nichtsteroidalen Antiphlogistika. Die letzte Einnahme von Acetylsalicylsäure (Aspirin®) lag mindestens zwei Wochen zurück.

2.8.2 Blutentnahme

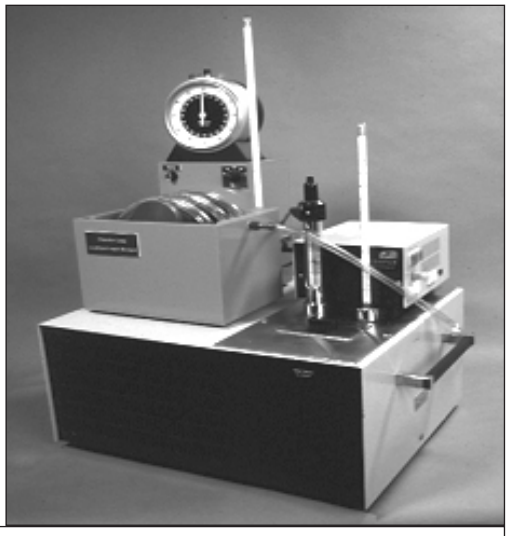
Nach Hautdesinfektion und kurzer Stauung wurde eine große Kubitalvene mit einem Butterfly-M19 (Venisystems™) punktiert, das Blut wurde mit einer Monovette aspiriert. Die 9 ml fassenden Neutralmonovetten (Sarstedt, Nümbrecht) waren vorher mit 900 µl Heparinlösung (9 IE/ 900 µl, Liquemin®, Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz) gefüllt worden, so daß eine Heparinkonzentration von 1 IE/ ml Vollblut resultierte.

2.8.3 Chandler-Loop-Modell

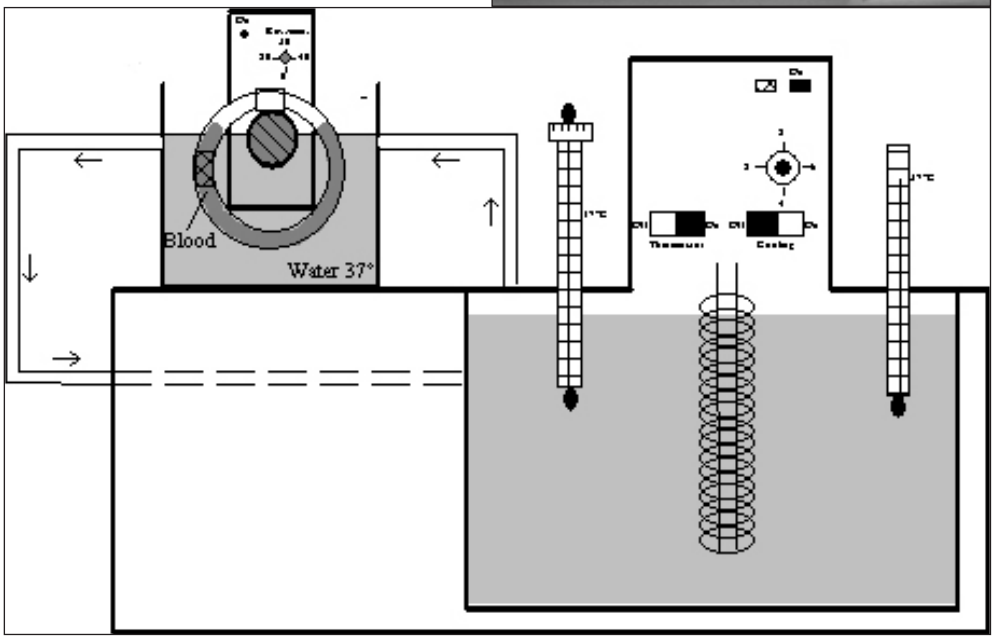
2.8.3.1 Prinzip

Das Chandler-Loop-Modell ist ein in-vitro-System, das eine Rezirkulation von kleineren Blutvolumina ermöglicht. In kreisförmig geschlossenen Schlauchstücken von 50 cm Länge wurden jeweils 20 ml frisches Humanblut über einen Zeitraum von 15, 60 und 120 Minuten lang rezirkuliert. Diese Rezirkulation erfolgte unter konstanter Umdrehungszahl (15 U/min) in einem 37°C warmen Wasserbad und erlaubte so eine hinreichende Annäherung an die physiologischen intrakorporalen Bedingungen. Durch den dynamischen Fluss wurde das Blut kontinuierlich an der Innenoberfläche der Schläuche vorbeigeleitet, so daß ein ständiger Oberflächenkontakt und damit die entsprechenden Wechselwirkungen zwischen Fremdoberfläche und Blutbestandteilen gewährleistet waren.

Das Chandler-Loop-Modell bot sich daher für die vergleichenden Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Plasmaproteinen an unbeschichteten und beschichteten Fremdoberflächen an.



Modifizierter Chandler-Loop:
Hämokompatibilitäts-Testmodell



2.8.3.2 Durchführung

Das heparinisierte Vollblut wurde sofort in einem Plastikgefäß „gepoolt“ und gemischt. Anschließend wurden jeweils 20 ml Blut in die entsprechenden Kunststoffschläuche (Polyvinylchlorid (PVC)- bzw. Silikon-Schläuche mit unbeschichteten oder beschichteten Oberflächen) gefüllt (siehe Abbildung links). Die Enden der Schläuche (3/8 X 3/32 inch, 50 cm Länge, Innenoberfläche 150 cm²) wurden mit kurzen Silikonschlauchstücken konnektiert und sofort in einem modifizierten Chandler-Loop-Modell (15 Umdrehungen/min, 37°C, siehe Schema links) rezirkuliert (Chandler, 1958).

Von jedem der sechs Schlauchmaterialien wurden pro Versuch drei Schläuche benötigt, einer für den 15-Minuten-, einer für den 60-Minuten- und einer für den 120-Minuten-Wert. Da in das Chandler-Loop-Modell maximal 10 Schläuche eingesetzt werden können, wurden pro Versuch immer drei Materialien, also insgesamt neun Schläuche verwendet.

Die entsprechenden Schläuche wurden nach 15, 60 und 120 Minuten aus der Apparatur entnommen. Nach Entfernung der Konnektoren wurden aus den Schläuchen Blutproben zur Messung der löslichen Aktivierungsmarker gewonnen [siehe 2.11], der Rest des Blutes wurde verworfen. Die Schläuche wurden gespült, in 2 cm-Stücke geschnitten, fixiert und eingefroren. Diese Schlauchstücke wurden zur Analyse der Adsorptionsproteine durch ELISA verwendet [siehe 2.9].

Für die Detektion der adsorbierten Plasmaproteine mittels „Western-Blotting“ wurden pro Material neun Schläuche 120 Minuten lang im Chandler-Loop rezirkuliert, entnommen, gespült und entsprechend weiterbehandelt [siehe 2.10].

2.9 Analyse der Adsorptionsproteine durch ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)

Die auf der Innenfläche der Schläuche adsorbierten Plasmaproteine wurden mit einem ELISA-Verfahren semiquantitativ analysiert (Weber et al., 2000; Wendel et al., 1999).

2.9.1 Verarbeitung der Schläuche

Nach 15, 60 und 120 Minuten Rezirkulation wurden die Schlauchringe geöffnet, das Blut wurde verworfen und die Schläuche sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung (10–12 Schlauchvolumina) gespült. An den beiden Enden, die mit den Konnektoren verbunden waren, wurden jeweils ungefähr 10 cm abgeschnitten und verworfen; der restliche Schlauch wurde in 2 cm lange Stücke geschnitten. Zur Fixierung der Proteine wurden die kleinen Schlauchstücke sofort mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung ([w/v] Merck, Darmstadt) in 0,05 M PBS (phosphate buffered saline, Life Technologies, Karlsruhe, pH 7,4) für eine Stunde bei 4°C inkubiert, wobei die Lösung nach einer halben Stunde ausgetauscht wurde. Danach wurden die Schlauchstücke zweimal jeweils für eine halbe Stunde mit PBS (4°C) inkubiert. Nach Abgießen der PBS-Lösung wurden die Schlauchstücke bei – 20°C eingefroren.

2.9.2 Das ELISA-Verfahren

2.9.2.1 Vorbereitung

Von den sechs verwendeten Schlauchsorten wurden jeweils drei Schlauchstücke von jedem Zeitpunkt (15 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten Rezirkulation) für einen Ansatz vorbereitet. Die 2 cm langen Schlauchstücke wurden zum Auftauen zunächst in PBS-Lösung inkubiert. Sie wurden auf einer Seite durch den Deckel eines „Eppendorf-Cups“ verschlossen, um so ein Reaktionsgefäß zu bilden.
Die Schlauchstücke wurden stets nach dem unten genannten Pipettierschema geordnet. Als Kontrolle wurde für jedes Material ein Schlauchstück ohne Blutkontakt mit angesetzt. Eine 120-Minuten-Probe der PVC-Schläuche wurde als interne Versuchskontrolle nicht mit dem primären Antikörper befüllt (Versuchsanordnung siehe Abbildung Seite 40).

Pipettierschema:

PVC (15‘)	PVC (60‘)	PVC (120‘)	PVC-Kontr.	Versuchs-K.
Heparin (15‘)	Heparin (60‘)	Heparin (120‘)	Hep.-Kontr.	
Silikon (15‘)	Silikon (60‘)	Silikon (120‘)	Sil.-Kontr.	

Polypeptid (15‘)	Polypeptid (60‘)	Polypeptid (120‘)	Polypeptid-Kontr.	
Gelatine (15‘)	Gelatine (60‘)	Gelatine (120‘)	Gel.-Kontr.	
Polypeptid/ Heparin (15‘)	Polypeptid/ Heparin (60‘)	Polypeptid/ Heparin (120‘)	Polypeptid/ Heparin-Kontr.	

Dieser Ansatz wurde pro Versuch, das heißt für jedes untersuchte Plasmaprotein, dreimal durchgeführt.

2.9.2.2 „Blockierung“ unspezifischer Bindungen

Die Schlauchstücke wurden zunächst mit 0,05 M Glycin (Merck, Darmstadt) in 0,05 M TBS (Tris-buffered saline, Sigma, Deisenhofen, pH 7,4) gefüllt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Aldehydreste aus der Fixierung zu inaktivieren. Nach dem Absaugen der Glycinlösung wurden die Schlauchstücke zweimal mit 0,05 M TBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden dann durch eine zweistündige Inkubation bei 37°C mit folgender Blockierungslösung eliminiert: 0,05 TBS mit 5 % BSA (Bovines Serumalbumin [w/v], Sigma, Deisenhofen) und 0,1% CWFS Gelatine ([v/v] Biotrend, Köln) und 5 % Esel- oder Ziegen-Normalserum ([v/v], Sigma, Deisenhofen).
Das verwendete Normalserum für diese Blockierungslösung war von derselben Spezies wie der im zweiten Schritt der Immuninkubation verwendete Antikörper.

2.9.2.3 Detektion der adsorbierten Plasmaproteine

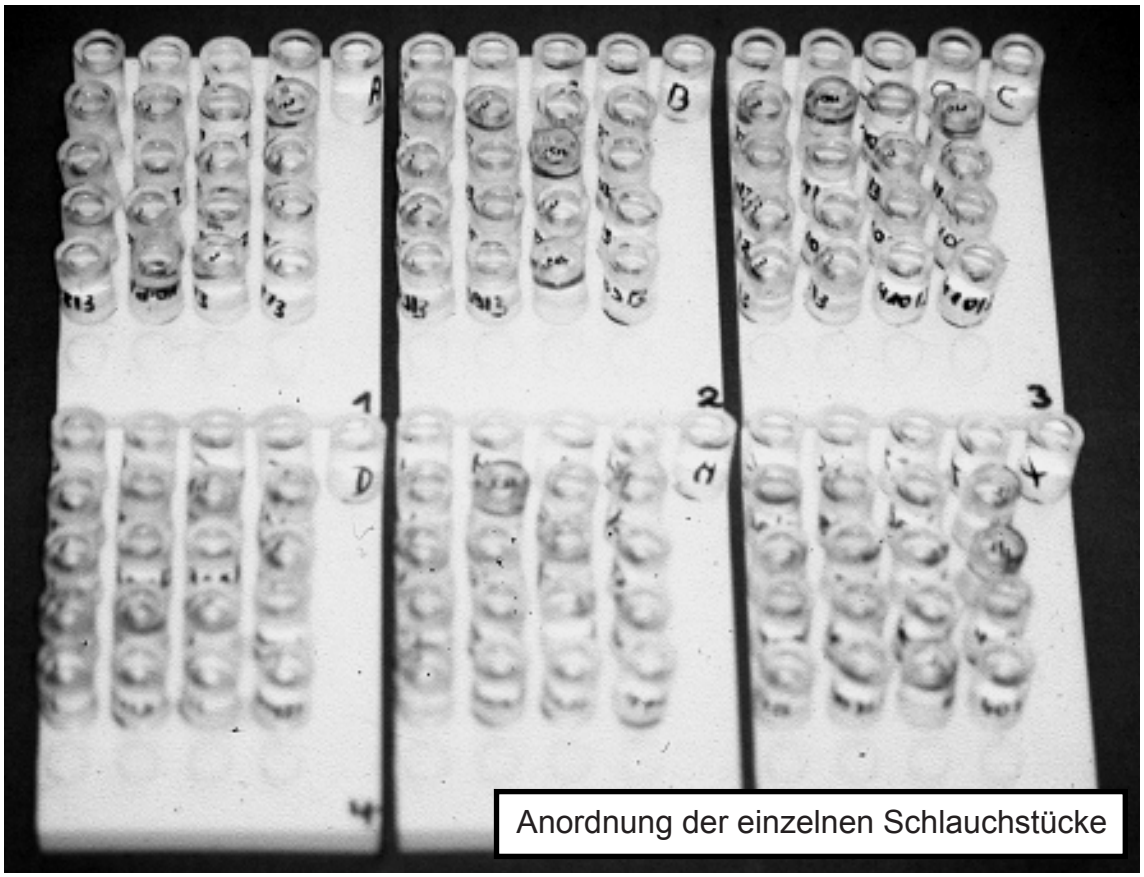
2.9.2.3.1 Prinzip

Der primäre Antikörper gegen das zu untersuchende Plasmaprotein bindet an die jeweiligen auf der Innenoberfläche der Schlauchstücke immobilisierten Adsorptionsproteine. Im zweiten Schritt bindet der Sekundärantikörper an diese Primärantikörper. Als Sekundärantikörper werden Gammaglobuline gegen die Spezies, in der der Primärantikörper gezüchtet wurde, verwendet. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert. Dieses Enzym setzt ein anschließend hinzugefügtes chromogenes Substrat um, es entsteht ein gelber Farbstoff. Die Lösung färbt sich proportional zur Menge des an der Oberfläche adsorbierten Proteins.

Durch die photometrische Messung der entsprechenden Extinktionen können daher semiquantitative Aussagen über das Adsorpionsverhalten der verschiedenen Plasmaproteine an den unterschiedlichen Fremdoberflächen gemacht werden.

2.9.2.3.2 Antikörperreaktion

Der jeweilige primäre Antikörper wurde entsprechend im Antikörper-Puffer verdünnt und ungefähr 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Blockierungslösung wurde aus den Schlauchstücken abgesaugt, diese wurden dann zweimal mit 0,05 M TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Befüllung der Schlauchstücke mit je 1 ml der primären Antikörper-Lösung pro Schlauchstück. Der polyklonale Antikörper konnte nun an die immobilisierten Plasmaproteine auf den Innenoberflächen der Schlauchstücke binden, die eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Nach Ablauf dieser Stunde wurde die primäre Antikörper-Lösung abgesaugt, die Schlauchstücke wurden sechsmal mit 0,05 M TBS gewaschen, um möglichst alle ungebundenen primären Antikörper aus den Reaktionsgefäßen zu entfernen.



Anordnung der einzelnen Schlauchstücke

Auch der jeweilige sekundäre Antikörper wurde entsprechend im Antikörper-Puffer verdünnt und 30 Minuten vorinkubiert. Nach Absaugen der TBS-Lösung des letzten Waschschrittes wurde in jedes Schlauchstück 1 ml der sekundären Antikörper-Lösung gefüllt. Während der einstündigen Inkubation bei 37°C konnte nun der mit Alkalischer Phosphatase konjugierte sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden. Nach der Inkubation wurde der sekundäre Antikörper abgesaugt und es folgten wieder sechs Waschschritte mit 0,05 M TBS, um überschüssige ungebundene sekundäre Antikörper zu entfernen.

2.9.2.3.3 Substratreaktion

Die adsorbierten Plasmaproteine konnten nun mit Hilfe des chromogenen Substrates pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma, Deisenhofen) detektiert werden.

Nach dem Absaugen der 0,05 M TBS-Lösung wurde in jedes Schlauchstück je 1 ml Substratlösung pipettiert. Die Dauer der Substratreaktion hing vom verwendeten Primärantikörper ab und variierte zwischen sechs und zehn Minuten. Bei subjektiv ausreichender Gelbfärbung der Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Dies erfolgte durch Abpipettieren von 900 µl der Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße, in die zuvor 250 µl 3 N NaOH-Lösung vorgelegt worden waren.

2.9.2.3.4 Messung

Aus jedem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden drei Proben zu je 200 µl entnommen und in die Wells einer Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) pipettiert. Die Extinktionen wurden dann photometrisch im ELISA-Reader (Dynatech, Modell MR 5000) bei 405 nm gemessen.

2.10 Analyse der Adsorptionsproteine durch „Western Blotting“

Die auf der Innenfläche der Schläuche adsorbierten Plasmaproteine wurden abgelöst, konzentriert und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer

auf eine Nitrozellulosemembran konnten die einzelnen Plasmaproteine durch Reaktionen mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

2.10.1 Verarbeitung der Schläuche

Von jedem der sechs Schlauchmaterialien wurden neun Schläuche 120 Minuten lang im Chandler-Loop-Modell mit je 20 ml Blut rezirkuliert. Die Schlauchringe wurden geöffnet, das Blut wurde verworfen und die Schläuche mit physiologischer Kochsalzlösung (10–12 Schlauchvolumina) sorgfältig gespült. Anschließend wurden sie mit einer Lösung, die den organischen Komplexbildner EDTA (Titriplex, Sigma, Deisenhofen, 20 mMol in 0,05 M PBS) enthielt, gespült (4–5 Schlauchvolumina).

Um die Adsorptionsproteine von den Fremdoberflächen zu eluieren, wurde 1 %-ige SDS-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in 0,05 M TBS verwendet. Dazu wurden in jeden Schlauch 4 ml SDS-Lösung eingefüllt, die Schlauchenden wurden mit frischen Silikonkonnektoren wieder zu einem Schlauchring verschlossen. Die SDS-Lösung wurde für 30 Minuten im Chandler-Loop-Modell (15 Umdrehungen pro Minute) zirkuliert, um die Proteine von den Schlauchinnenflächen abzulösen. Anschließend wurden die Schlauchringe geöffnet, die Eluate gepoolt (neun Schläuche mit je 4 ml Eluat) und bei – 20°C eingefroren.

2.10.2 Konzentrierung der Eluate

Die Konzentrierung der Proben erfolgte mit Centriprep®-10-Röhrchen (Amicon, Inc., Beverly, MA, USA) in der Zentrifuge (Cryofuge 8000, Heraeus, 3000 g, 25°C). Die 36 ml Eluat, die pro Schlauchmaterial gewonnen worden waren, wurden in mehreren Zentrifugationsschritten auf eine Menge von jeweils ungefähr 1500 µl aufkonzentriert. Diese konzentrierten Proben wurden aliqotiert (35 µl pro Eppendorf-Cup), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 20°C gelagert.

2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 (Bradford, 1976). Als Standard diente eine Lösung mit 0,2 mg/ml bovinem Serumalbumin. Von

den zu bestimmenden konzentrierten Eluaten wurden 2 µl Probe vorgelegt und mit 200 µl Bradford-Lösung versetzt. Die photometrische Messung wurde in Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) durchgeführt. Die Extinktionen wurden in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Dynatech, Modell MR 5000) bei 630 nm gemessen.

2.10.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting

2.10.4.1 Probenvorbereitung

Die aufkonzentrierten Eluatproben wurden aufgetaut (von jedem Schlauchmaterial eine, also insgesamt sechs Proben). Von jeder Probe wurden 10 µl in ein Eppendorf-Cup vorgelegt und mit 25 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer auf 35 µl aufgefüllt. Die Proben wurden in einem Heizblock (HB-130, UNITEK) für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteine vor der Elektrophorese zu denaturieren. Die Proteine wurden durch diese Behandlung mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) markiert und erhielten eine negative Ladung, wodurch eine elektrophoretische Trennung möglich wurde.
Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine diente ein HMW-Marker (BioRad, München). Der Marker enthielt folgende Eichproteine: Myosin (200 kDa), β-Galaktosidase (116,25 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa). Vom Marker wurden wie von den Proben 10 µl in ein Eppendorf-Cup vorgelegt und mit 25 µl reduzierendem Probenpuffer auf 35 µl aufgefüllt.

2.10.4.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurde eine vertikale Gelkammer (Bio-Rad) verwendet. Das Gel bestand aus einem 8 %-igen Trenngel und einem 4 %-igen Sammelgel, die Geldicke betrug 1 mm. Die äußeren Taschen des Gels links und rechts wurden nicht belegt. Pro Geltasche wurden 35 µl Probe aufgetragen. Da zwei Apparaturen ins Gerät passten, wurden bei jeder Elektrophorese parallel zwei identische SDS-Gele hergestellt und nach dem selben Schema beladen. Die

Elektrophorese wurde mit einem Elektrodenpuffer (siehe Tabelle) bei einer Stromstärke von 20 mA durchgeführt. Es wurde zunächst eine Spannung von 70 Volt angelegt, die beim Übergang der Proben ins Trenngel auf 200 Volt erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde beim Übertritt der blauen Probenpufferlinie in den Elektrodenpuffer gestoppt, dies war nach ungefähr 45 Minuten der Fall.

2.10.4.3 Immunoblotting

Die Proteine wurden nach der Elektrophorese zunächst aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dadurch wurden die aufgetrennten Makromoleküle immobilisiert und gleichzeitig für die weiteren Reaktionen mit den spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Plasmaproteine exponiert.
Nach der Elektrophorese wurden Glasplatten und Spacer entfernt und das Sammelgel mit einem Spatel abgetrennt und verworfen. Zwei Filterpapiere (Extra Thick Filter Paper, Bio-Rad) und eine Nitrozellulosemembran (0,45 μm Porengröße, Bio-Rad) in der Größe des Trenngels wurden zusammen mit dem Trenngel 15 Minuten in Transferpuffer (siehe Tabelle) inkubiert. Die Blottingapparatur wurde vorbereitet, indem ihre Graphitplatten mit Transferpuffer gesättigt wurden. Dann wurden die folgenden Teile zur Anode orientiert sandwichartig zusammengesetzt:

- Filterpapier
- SDS-Gel
- Nitrocellulosemembran
- Filterpapier

Der Blotting-Vorgang erfolgte bei 15 V über einen Zeitraum von 30 Minuten.

2.10.4.4 »Fast-Green-Färbung«

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran („Blot“) zur richtigen Seitenzuordnung für die weiteren Versuche markiert. Der Blot wurde sofort in ein Färbebad mit 0,1 % Fast Green (Merck, Darmstadt) in 1 % Essigsäure überführt und 5 Minuten unter leichtem Schütteln (Rotamax 120, Heidolph) inkubiert, um eine ausreichende Färbung der Proteinbanden zu erreichen. Anschließend wurde

die Reaktion durch gründliches Waschen des Blots mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Positionen der Banden des HMW-Markers wurden markiert. Das Proteinmuster der verschiedenen Proben wurde durch Einscannen des Blots in zwei Fällen dokumentiert. Zur Durchführung der Antikörperreaktionen wurde der Blot durch mehrere Waschschritte mit 0,2 M NaOH wieder entfärbt und mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.10.4.5 „Blockierung“ unspezifischer Bindungen

Zunächst wurde durch Inkubation des Blots in 100 ml 3 %-iger Trockenmilch (Sigma, Deisenhofen) über Nacht bei 4°C ein Blockierungsschritt durchgeführt. Dadurch wurden freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran besetzt, um bei der nachfolgenden Immunreaktion unspezifische Bindungen der Antikörper auf der Oberfläche der Membran zu verhindern.

2.10.4.6 Antikörperreaktion

Nach Entnahme aus der Blockierungslösung erfolgte eine Inkubation des Blots in TTBS (0,05 % Tween® 20 in 20 mM TBS) für eine Minute, im Anschluss daran drei jeweils fünfminütige Waschschritte in TBS (20 mM) unter leichtem Schütteln. Im ersten Schritt der Antikörperreaktion wurde der Blot unter konstantem leichten Schütteln für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 20 ml TBS inkubiert, denen die entsprechende Menge des jeweiligen Primärantikörpers (siehe Tabelle) hinzugefügt wurde.
Die verwendeten primären und sekundären Antikörper entsprechen weitgehend denen, die auch für den modifizierten ELISA verwendet wurden. Nach der zweistündigen Inkubation mit dem primären Antikörper folgten fünf Waschschritte mit TBS zu jeweils zwei Minuten. Anschließend wurden 20 ml TBS zum Blot gegeben, zu denen der sekundäre Antikörper gemäß den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen gegeben wurde. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wurde der Blot fünfmal für jeweils zwei Minuten mit TBS gewaschen.

2.10.4.7 Substratreaktion

Nach der Bindung des primären Antikörpers an das entsprechende auf dem Blot fixierte Plasmaprotein konnte der sekundäre Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert war, an den primären Antikörper binden. Die Alkalische Phosphatase katalysierte nach Hinzufügen der Substratlösung eine Farbreaktion, bei der stark gefärbte, unlösliche Produkte entstanden. Durch die Farbreaktion konnte eine Visualisierung der Adsorptionsproteine erfolgen, die entstandenen Produkte waren als Banden auf dem Blot zu sehen. Mit dieser Methode können die Adsorptionsproteine, aber auch andere Makromoleküle, sehr spezifisch mit Hilfe verschiedener Antikörper identifiziert werden. Das verwendete Substratsystem war 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro-blue tetrazolium (Sigma Fast™ BCIP/NBT, Sigma, Deisenhofen). Die präzipitierende Substratlösung wurde wie vom Hersteller angegeben angesetzt, 20 ml Substratlösung wurden zum Blot gegeben. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser abgestoppt, der Blot wurde luftgetrocknet und durch Einscannen dokumentiert.

2.11 Bestimmung der löslichen Aktivierungsmarker im Plasma

Um Konzentrationsänderungen der löslichen Aktivierungsmarker des Gerinnung- und des Komplementsystems zu erfassen, wurden im Rahmen der Kinetikversuche Blutproben aus den Schläuchen entnommen. Die Probenentnahmen erfolgten vor der Rezirkulation des Blutes in den Schläuchen (Kontrolle), 15, 60 und 120 Minuten nach Beginn der Rezirkulation. Die Proben wurden mit herkömmlichen ELISA Kits gemäß den Anweisungen der Hersteller auf die folgenden Marker hin untersucht: β-Thromboglobulin (β-TG, Roche, Mannheim), Prothrombinfragment 1 + 2 (F 1+2, Dade Behring, Marburg), Thrombin/Antithrombin III-Komplex (TAT, Dade Behring, Marburg), PMN-Elastase (Merck, Darmstadt), SC5b-9 Komplex (INNOGENETICS, Heiden).

3 Ergebnisse

Man nimmt an, dass die Adsorption und Aktivierung von Plasmaproteinen durch den Kontakt mit Fremdoberflächen einen Einfluss auf sämtliche nachfolgenden Reaktionen des Gerinnungs-, Komplement- und Zellaktivierungssystems hat und dadurch maßgeblich die Hämokompatibilität von Biomaterialien beeinflusst. Daher ist die Identifizierung der auf Biomaterialien adsorbierten Proteine bezüglich ihrer Art und ihrer Quantität von besonderem Interesse.
Durch die neue ELISA-Technik war es möglich, immobilisierte Proteine auf beschichteten und unbeschichteten Oberflächen zu vergleichen. Zusätzlich wurden mit SDS-Eluaten Western Blots durchgeführt, um auch adsorbierte Spaltprodukte und denaturierte Proteine zu detektieren. Des weiteren wurden mit Hilfe kommerzieller ELISA-Kits die löslichen Marker der Gerinnungs-, Komplement- und Zellaktivierung bestimmt und mit den Proteinbindungskapazitäten korreliert.
An unbeschichteten Materialien wurden PVC und Silikon eingesetzt, bezüglich der beschichteten Materialien wurden Beschichtungen mit Heparin (Carmeda Bioactive Surface), Polypeptid, Gelatine und Polypeptid/ Heparin untersucht, insgesamt wurden sechs verschiedene Biomaterialien verglichen.

3.1 Gerinnungssystem

3.1.1 Analyse der Adsorptionsproteine

3.1.1.1 Fibrinogen

Die Kinetik-Studie für adsorbiertes Fibrinogen zeigt ein ähnliches Adsorptionsmuster auf den beiden unbeschichteten Materialien PVC und Silikon und den vier unterschiedlich beschichteten PVC-Schläuchen (siehe Abbildung Seite 49). Es findet sich eine sehr schnelle Adsorption bereits 15 Minuten nach Beginn des Blut-Biomaterial-Kontaktes. Nach 60 Minuten war eine Sättigung der Oberflächen mit Fibrinogen erreicht. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Materialien allerdings deutlich im Ausmaß ihrer Fibrinogenadsorption. Die beiden unbeschichteten Materialien PVC und Silikon zeigten zu allen drei Zeitpunkten

eine höhere Fibrinogenadsorption als die beschichteten Schläuche. Deutliche Unterschiede waren zwischen den unbeschichteten Schläuchen PVC und Silikon und den Beschichtungen Heparin und Polypeptid/ Heparin messbar, letztere präsentierten im Vergleich zu den unbeschichteten Schläuchen signifikant niedrigere Fibrinogenadsorptionen ($p<0,05$).

Wie bereits oben beschrieben wurden die oberflächengebundenen Plasmaproteine, die mittels SDS eluiert werden konnten, mit Hilfe von „Western Blotting"-Methoden analysiert. Die Daten der Immunoblots zeigen, dass alle neun verschiedenen Proteine, die getestet wurden, in den Eluaten nachweisbar waren. Zusätzlich zu den Proteinen, für die Kinetiken durchgeführt wurden, wurden zwei weitere „Western Blotting"-Versuche mit Hsp 70 und CD 41 durchgeführt, diese Daten werden daher nicht im direkten Vergleich zu den jeweiligen Kinetiken gezeigt, sondern extra aufgeführt.
Die SDS-Eluate sind von links nach rechts entsprechend der Beschriftung in immer derselben Reihenfolge aufgetragen, ganz links und ganz rechts wurde ein Proteinmarker mit definierten Molekülmassen aufgetragen. Zum Vergleich herangezogen werden soll der ganz rechts aufgetragene Proteinmarker aufgrund der besseren Qualität. Zur Gesamtproteindarstellung auf dem Blot wurde eine „Fast Green"-Färbung durchgeführt.

3.1.1.2 Fibronektin

Die Darstellung der Kinetik für die Adsorption von Fibronektin zeigt ein

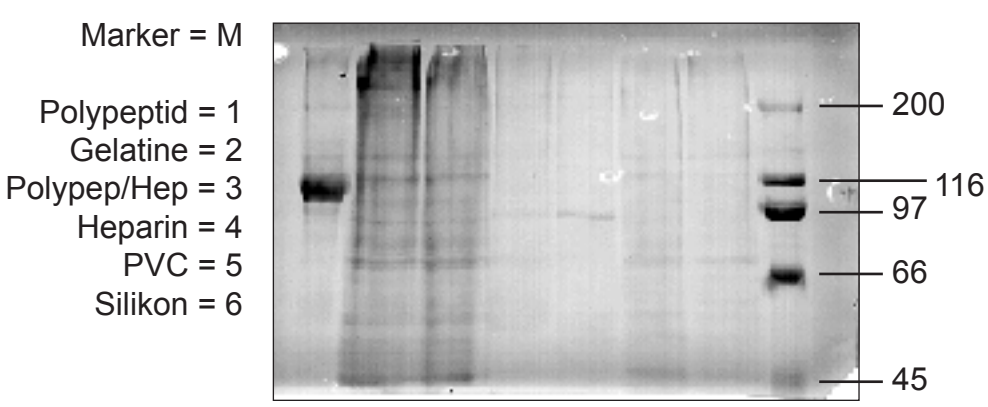


Abbildung 1-0: Fast Green, Gesamtproteinfärbung auf dem Western Blot.

Wie bereits in der Kinetik gezeigt, konnten auf den Heparin- bzw. Polypeptid/ Heparin-beschichteten Schläuchen signifikant niedrigere Mengen Fibrinogen detektiert werden, dies gilt auch für den Western Blot. Dort zeigt sich im Prinzip ein ähnliches Bandenmuster im Vergleich der Eluate der verschiedenen Oberflächen, wobei die Unterschiede in der Ausprägung der Banden deutlich zutage treten und die Banden der Eluate der Heparin- und der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung nur schwach zu sehen sind.

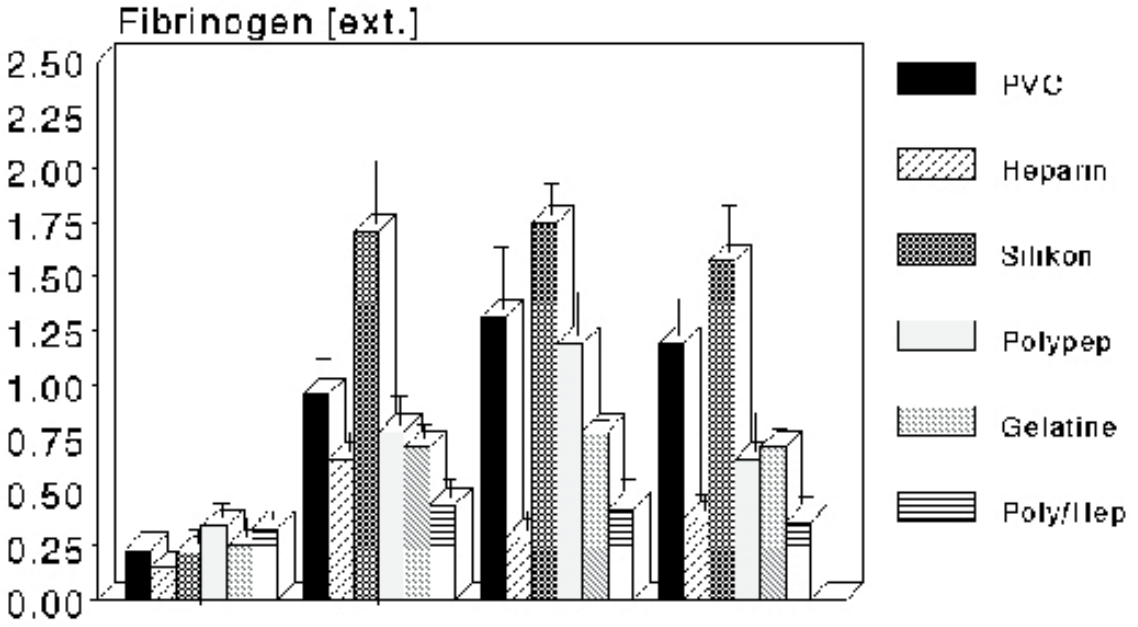
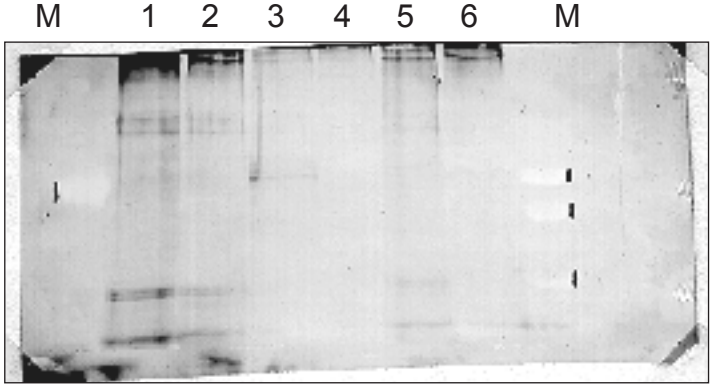


Abbildung 1-1: Zeitlicher Verlauf der Fibrinogenadsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).



Marker = M

Polypeptid = 1
Gelatine = 2
Polypep/Hep = 3
Heparin = 4
PVC = 5
Silikon = 6

Abbildung 1-2: Immunoblot Muster des eluierten Fibrinogen nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

ähnliches Muster wie die der Fibrinogen-Adsorption. Es findet sich auch hier eine sehr schnelle Fibronektin-Adsorption 15 Minuten nach Beginn des Blut-Fremdoberflächen-Kontaktes. Nach 60 Minuten war ebenfalls wieder eine Sättigung der Oberfläche erreicht. Beim Vergleich der Materialien untereinander zeigten sich wieder deutliche Unterschiede. Die unbeschichteten Materialien PVC und Silikon unterschieden sich in ihrem Adsorptionsverhalten für Fibronektin nicht von der Heparin- und der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung. Die Gelatine-beschichteten Schläuche zeigten hingegen eine so hohe Adsorption von Fibronektin, dass zur Auswertung eine 1:3 – Verdünnung des Versuchsansatzes vor Einlesen im ELISA-Reader erfolgen musste. Entsprechend signifikant waren die Unterschiede in der Fibronektin-Adsorption im Vergleich zu den fünf anderen Biomaterialien ($p<0,05$), letztere zeigten deutlich niedrigere Werte für die Fibronektin-Adsorption. Die Polypeptid-Beschichtung lag in ihrem Fibronektin-Adsorptionsverhalten höher als PVC, Silikon, Heparin- und Polypeptid/ Heparin-Beschichtung, wobei $p<0,05$ nur für die 15- und die 60- Minuten-Werte erfüllt war. Im Vergleich zur Gelatinebeschichtung lagen die Werte der Polypeptid-Beschichtung jedoch stets signifikant niedriger.

Auch der Western Blot zeigte ein besonders stark ausgeprägtes Bandenmuster der Albumin- und Gelatine-Eluate, wobei interessanterweise die Banden des Albumineluates nochmals deutlich stärker waren. Die unbeschichteten PVC- und Silikonschläuche waren in ihrem Bandenmuster wesentlich schwächer, hoben sich aber noch deutlich von der Heparin- und der Poplypeptid/ Heparin-Beschichtung ab, die wie auch in der Kinetik die relativ niedrigste Fibronektinadsorption zeigten.

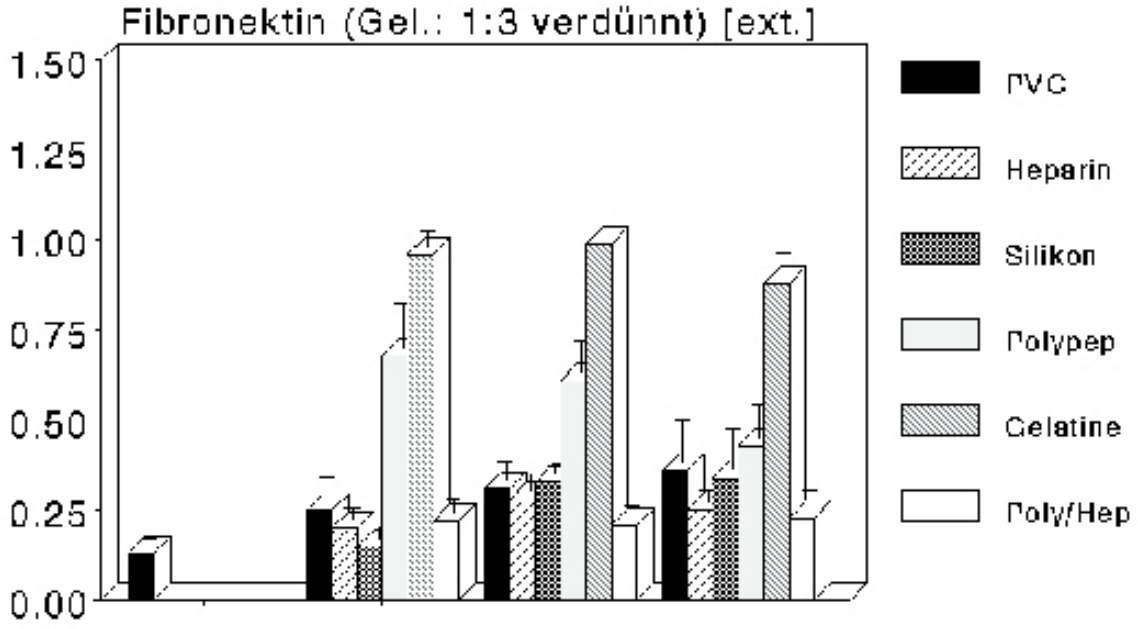
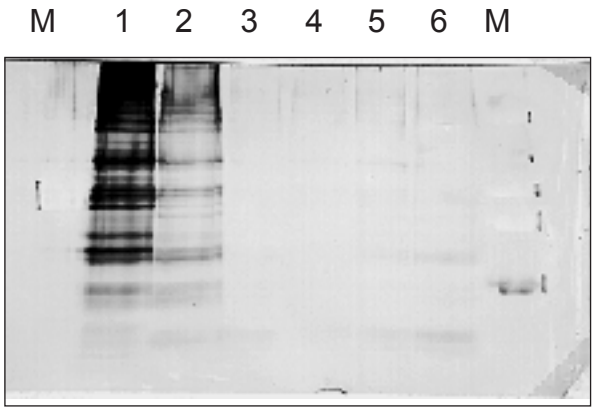


Abbildung 2-1: Zeitlicher Verlauf der Fibronektinadsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).



Marker = M

Polypeptid = 1
Gelatine = 2
Polypep/Hep = 3
Heparin = 4
PVC = 5
Silikon = 6

Abbildung 2-2: Immunoblot Muster des eluierten Fibronektin nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.1.1.3 High Molecular Weight Kininogen (HMWK)

Bezüglich der Adsorption von HMWK an den verschiedenen Biomaterialien soll in der Kinetik nur auf das Adsorptionsverhalten an den Heparin-beschichteten Oberflächen eingegangen werden. Die anderen Materialien zeigten von Beginn an und auch im zeitlichen Verlauf nur „Baseline"-Konzentrationen an HMWK, worauf in der Diskussion näher eingegangen werden wird. Für die Heparin-beschichtete Oberfläche war nach 15minütigem Blutkontakt ebenfalls keine signifikante HMWK-Adsorption nachweisbar, wohl aber nach 60 und 120 Minuten. Es zeigt sich im Verlauf eine kontinuierliche Zunahme der HMWK-Adsorption, ohne dass eine Sättigung erreicht wurde. Die höchste Konzentration wurde am Ende des Experiments (nach 120 Minuten) gemessen. Allerdings war auch erst der 120-Minuten-Wert signifikant höher als derjenige der anderen fünf Materialien ($p<0,05$). Auch darauf wird in der Diskussion näher eingegangen werden.
Deutlicher als in der Kinetik zeigt sich die Adsorption von HMWK an die Heparin-beschichteten Schläuche in der Untersuchung der Eluate mittels des Western Blot. Bei 100-110 kDa präsentiert sich, stärker an der reinen Heparinbeschichtung, schwächer an der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung, eine immunoreaktive „Hauptbande", die mit dem intakten Molekül korrespondiert.

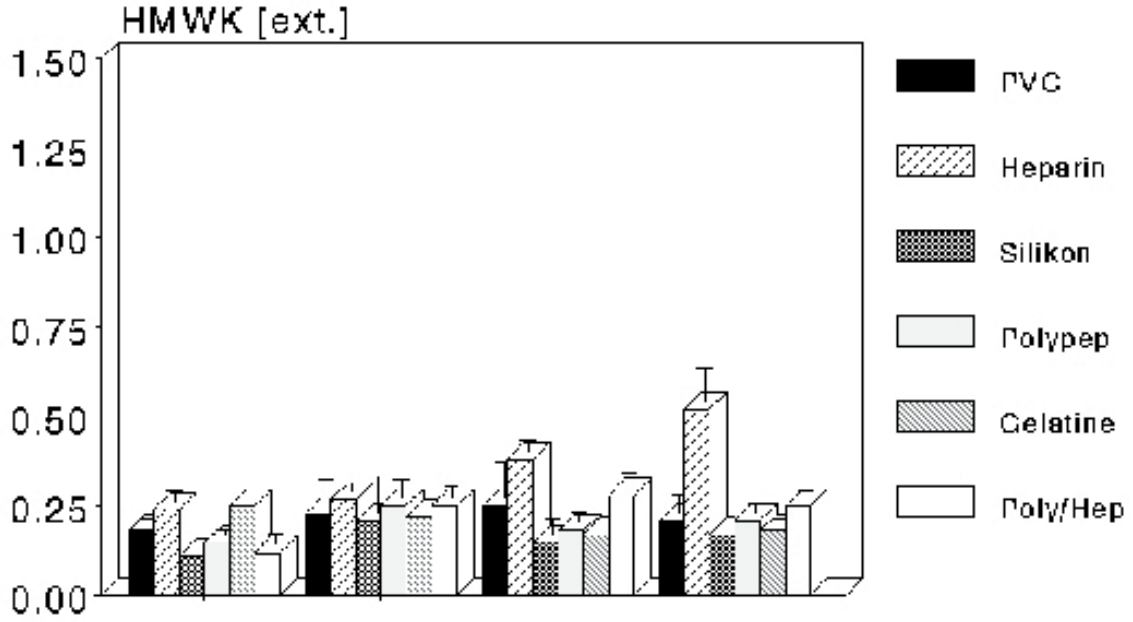


Abbildung 3-1: Zeitlicher Verlauf der HMWK-Adsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).

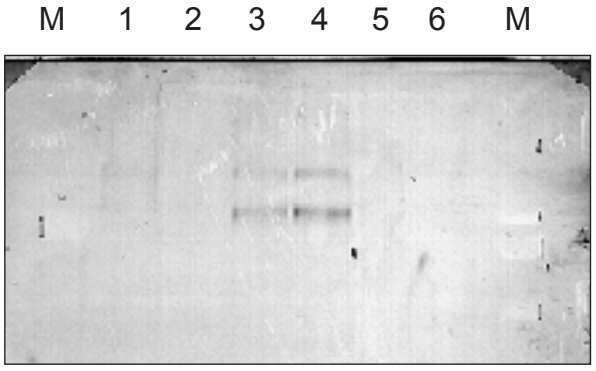


Abbildung 3-2: Immunoblot Muster des eluierten HMWK nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.1.1.4 Prothrombin/Thrombin

Die Adsorption von Prothrombin/Thrombin an unbeschichteten PVC- und Silikon-Schläuchen und den Beschichtungen mit Polypeptid, Gelatine und Polypeptid/ Heparin ging nicht über „Baseline“-Konzentrationen hinaus und zeigte überdies auch im zeitlichen Verlauf keine Veränderungen. An den Heparin-beschichteten PVC-Schläuchen zeigte sich eine sehr schnelle Prothrombin/ Thrombin-Adsorption, gleichzeitig war der 15-Minuten-Wert auch der höchste Konzentrationswert, im weiteren fielen die Konzentrationen an adsorbiertem Prothrombin/Thrombin signifikant ab. Dabei war der 120-Minuten-Wert – wie auch der 15- und der 60-Minuten-Wert – im Vergleich zu den fünf anderen Materialien signifikant erhöht.

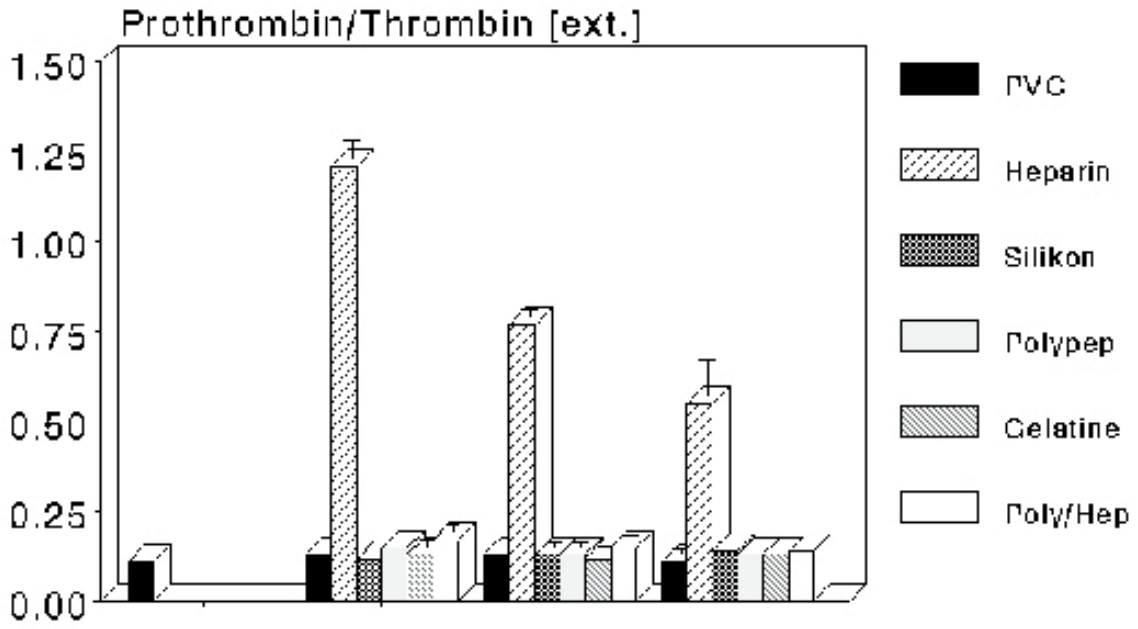


Abbildung 4-1: Zeitlicher Verlauf der Prothrombin/ Thrombin-Adsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).

3.1.1.5 Antithrombin III (AT III)

Die Adsorption von Antithrombin III stellt sich ebenfalls als schneller, innerhalb der ersten 15 Minuten nach Beginn des Experiments ablaufender Prozess dar. Im weiteren Verlauf wurden nach 60 bzw. 120 Minuten keine höheren Konzentrationen mehr gemessen, so dass von einer Sättigung ausgegangen werden kann. Die höchsten Konzentrationen wurden an den Heparin-beschichteten Schläuchen gemessen, sie lagen signifikant höher als die der anderen fünf Materialien, insbesondere auch als die der anderen heparinhaltigen Beschichtung, der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung. Diese zeigte die zweithöchsten AT III-Konzentrationen, die sich ebenfalls signifikant von denen der restlichen vier Materialien unterschieden. Wegen der hohen AT III-Konzentrationswerte der Kontrollen wird in der Diskussion näher auf diese Kinetik eingegangen werden.
Auch der Western Blot bestätigte die in der Kinetik dargestellten Ergebnisse und erhärtete sie vor allem in ihrer Aussagekraft, die aufgrund der hohen Ausgangswerte der Kontrollen sonst für sich betrachtet eingeschränkter wäre. So zeigen sich aber in den Eluaten der Heparin- und der Polypeptid/ Heparin-

Beschichtung jeweils zwei deutliche Banden bei ca. 50 kDa, während auf keinem der übrigen Materialien Banden detektiert werden konnten. Korrespondierend zu den Ergebnissen der Kinetik unterschieden sich die Heparin- und die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung aber in der Intensität der Banden, das Eluat der Heparin-Beschichtung enthielt höhere AT-III-Mengen als das der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung und führte zu wesentlich intensiver gefärbten Banden.

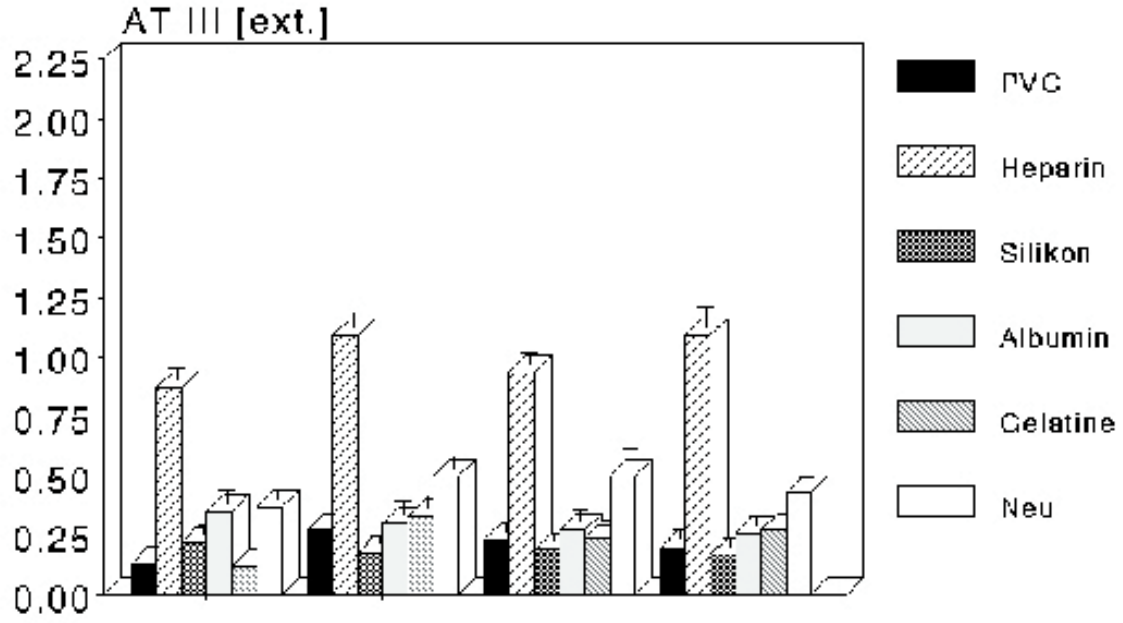
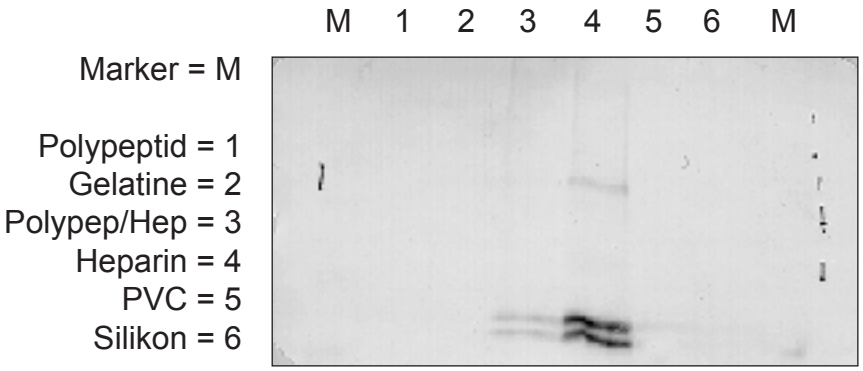


Abbildung 5-1: Zeitlicher Verlauf der Antithrombin III-Adsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).



Marker = M

Polypeptid = 1
Gelatine = 2
Polypep/Hep = 3
Heparin = 4
PVC = 5
Silikon = 6

Abbildung 5-2: Immunoblot Muster des eluierten Antithrombin III nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.1.2 Lösliche Aktivierungsmarker

3.1.2.1 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)

Nach 60 Minuten Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen ist es zu einer deutlichen Generierung von Thrombin-Antithrombin-Komplexen bei den PVC-, Silikon- und den Heparin-beschichteten Schläuchen gekommen. Auf die Werte aus den Heparin-beschichteten Schläuchen wird in der Diskussion noch eingegangen werden. Im Vergleich zu den 120-Minuten-Werten kommt es zu keiner signifikanten Konzentrationsänderung mehr. Dies gilt auch für die drei anderen Materialien Polypeptid, Gelatine und Polypeptid/ Heparin, für die ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zwischen 60 und 120 Minuten gemessen werden konnten. Die Beschichtung mit Polypeptid zeigte im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Anstiege in den TAT-Konzentrationen. Gar kein TAT-Konzentrationsanstieg konnte in den Polypeptid/ Heparin-beschichteten Schläuchen erhoben werden. Im Vergleich der Materialien untereinander unterscheiden sich PVC, die Heparin-Beschichtung und Silikon signifikant von der Beschichtung mit Polypeptid/ Heparin.

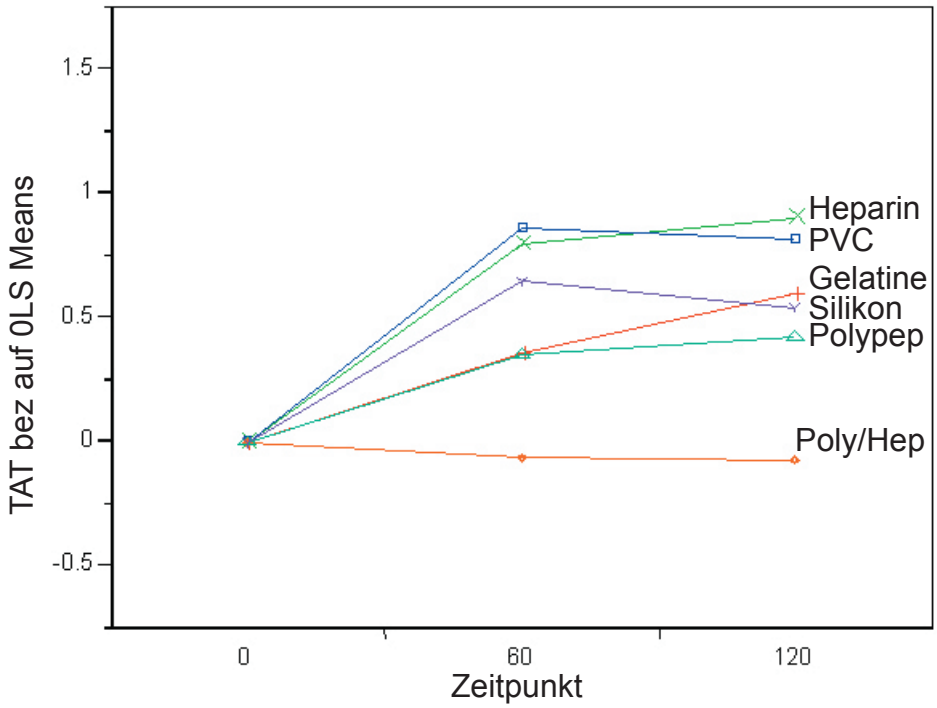


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der TAT-Konzentration während 120-minütiger Zirkulation von humanem Vollblut in Schläuchen aus den sechs obengenannten Biomaterialien (LS Means Plot; n = mind. 5, max. 13).

3.2 Komplementsystem

3.2.1 Analyse der Adsorptionsproteine

3.2.1.1 C3

Die Kinetik für die Adsorption des Komplementfaktors C3 zeigte ein ähnliches Muster wie die des Fibrinogen. Die Adsorption von C3 geschieht sehr schnell, bereits 15 Minuten nach Beginn des Blut-Biomaterial-Kontaktes sind die Oberflächen von PVC und Silikon und die der Gelatine-Beschichtung gesättigt. Für die Polypeptid-Beschichtung gilt dies nach 60 Minuten. Die Heparin-Beschichtung zeigt keine eindeutige Kinetik, während sich bei der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung eine diskrete kontinuierliche Konzentrationszunahme zeigt, wobei sich bei letzterer kein Sättigungspunkt ausmachen lässt, die höchste Konzentration wurde am Ende des Experiments nach 120 Minuten gemessen.
Die verschiedenen Materialien unterscheiden sich deutlich im Ausmaß ihrer C3-Adsorption. Die beiden unbeschichteten Materialien PVC und Silikon und die Polypeptid-beschichteten PVC-Schläuche unterschieden sich in ihrem Adsorptionsverhalten für C3 kaum voneinander, zeigten zu allen drei Zeitpunkten aber eine deutlich höhere C3-Adsorption als die Beschichtungen mit Heparin, Polypeptid/ Heparin und Gelatine ($p<0,05$). Die C3-Konzentrationen der Gelatine-Beschichtung lagen dabei höher als die der Heparin- und der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung. Im Vergleich der letzteren untereinander zeigte die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung sogar signifikant niedrigere Werte als die Heparin-Beschichtung und damit die niedrigsten C3-Konzentrationen der sechs untersuchten Biomaterialien.
Das intakte C3-Molekül besteht aus einer schweren (α)-Kette (110 kDa) und einer leichten (β) Kette (75 kDa). Der Western Blot zeigt, dass die leichte (β) Kette (75 kDa) von C3 auf allen sechs Biomaterialien adsorbiert wurde, aber die Eluate aus den Heparin-haltigen Beschichtungen enthielten deutlich niedrigere Mengen dieses Fragments als die unbeschichteten PVC- und Silikon- Schläuche und die Gelatine-beschichteten Schläuche.

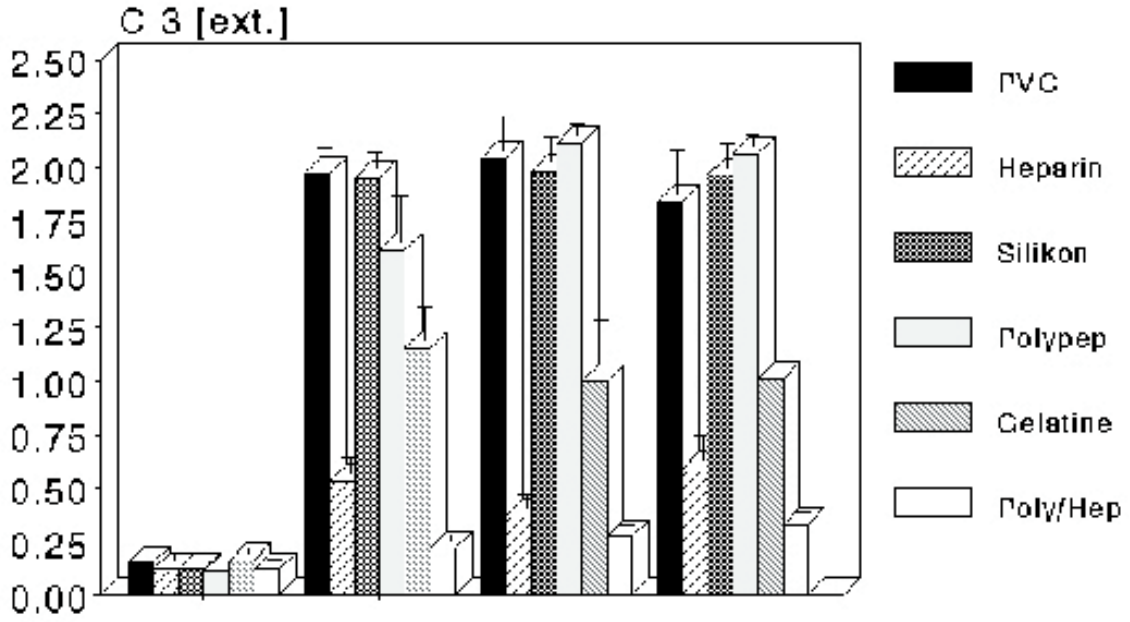
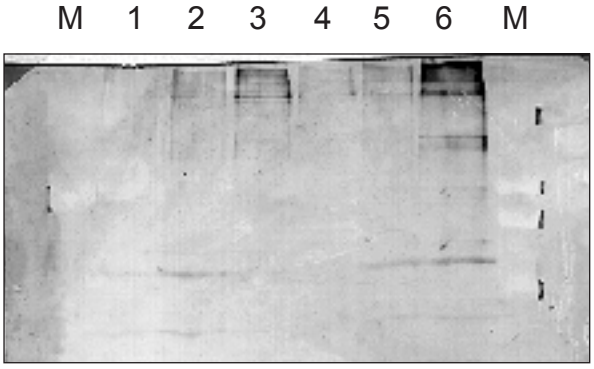


Abbildung 7-1: Zeitlicher Verlauf der C3-Adsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).



Marker = M

Polypeptid = 1
Gelatine = 2
Polypep/Hep = 3
Heparin = 4
PVC = 5
Silikon = 6

Abbildung 7-2: Immunoblot Muster des eluierten C3 nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.2.1.2 C1-Esterase-Inhibitor

Die Konzentrationen an adsorbiertem C1-Esterase-Inhibitor zeigten für die unbeschichteten Materialien PVC und Silikon und für die Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine keine über „Baseline“-Niveau hinausgehenden Werte. Im zeitlichen Verlauf ergaben sich keine Änderungen, es können keine

Aussagen über Sättigungen gemacht werden. Dies trifft im Prinzip auch für die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung zu. Die Heparin-Beschichtung hingegen adsorbierte schnell eine signifikante Menge an C1-Esterase-Inhibitor, der Wert nach 15 Minuten war der höchste, der Wert nach 120 Minuten lag niedriger. Die C1-Esterase-Inhibitor-Konzentration auf der Heparin-Beschichtung war zu allen Zeitpunkten höher als die der anderen Biomaterialien.

Wesentlich deutlicher als die Kinetik kann der Western Blot die C1-Esterase-Inhibitor-Adsorption auf den Heparin- und Polypeptid/ Heparin-beschichteten Schläuchen abbilden. Die Banden der Eluate sind zwar ganz diskret auf allen sechs Biomaterialien nachweisbar, die Banden der mit Heparin versehenen Beschichtungen treten jedoch wesentlich deutlicher hervor, wobei interessanterweise die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung noch höhere Intensitäten der Banden zeigt als die Heparin-Beschichtung. Die zwei Hauptbanden lagen bei ca. 90-100 kDa, was der Molekülmasse des intakten Moleküls entspricht.

Abbildung 8-1: Zeitlicher Verlauf der C1-Esterase-Inhibitor-Adsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).

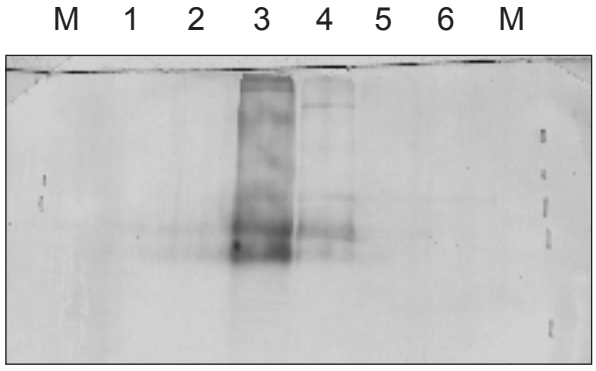


Abbildung 8-2: Immunoblot Muster des eluierten C1-Esterase-Inhibitor nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.2.2 Lösliche Aktivierungsmarker

3.2.2.1 Terminaler Komplement Komplex (TCC)

Zur Beurteilung der Komplementaktivierung wurden in der Gruppe der löslichen Aktivierungsmarker die Konzentrationen des terminalen Komplementkomplexes gemessen. Nach 60 Minuten waren die TCC-Konzentrationen aus PVC, Silikon und den Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine signifikant gegenüber den Ausgangswerten vor dem Blut-Fremdoberflächen-Kontakt erhöht. Zwischen 60 und 120 Minuten war keine weitere signifikante Zunahme der TCC-Konzentrationen messbar. Für die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung war kein signifikanter TCC-Wert gegenüber dem Ausgangswert messbar, für die Heparinbeschichtung erst nach 120 Minuten. Es zeigten sich große Unterschiede in der Bildung von TCC im Vergleich der verschiedenen Materialien untereinander. Die TCC-Konzentrationen aus den unbeschichteten PVC- und Silikon-Schläuchen waren sehr deutlich gegenüber denen der beschichteten Materialien erhöht und unterschieden sich dabei signifikant von den beschichteten Materialien. PVC und Silikon selbst unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Bei den Beschichtungen unterschieden sich die TCC-Konzentrationen von Heparin und Polypeptid/ Heparin kaum, ebenso lagen die TCC-Konzentrationen von Polypeptid und Gelatine sehr nahe beeinander. Heparin und Polypeptid/ Heparin zeigten die

niedrigsten Werte an TCC-Konzentrationen aller sechs Biomaterialien, dabei bestanden allerdings keine Signifikanzen gegenüber den Werten von Gelatine und Polypeptid.

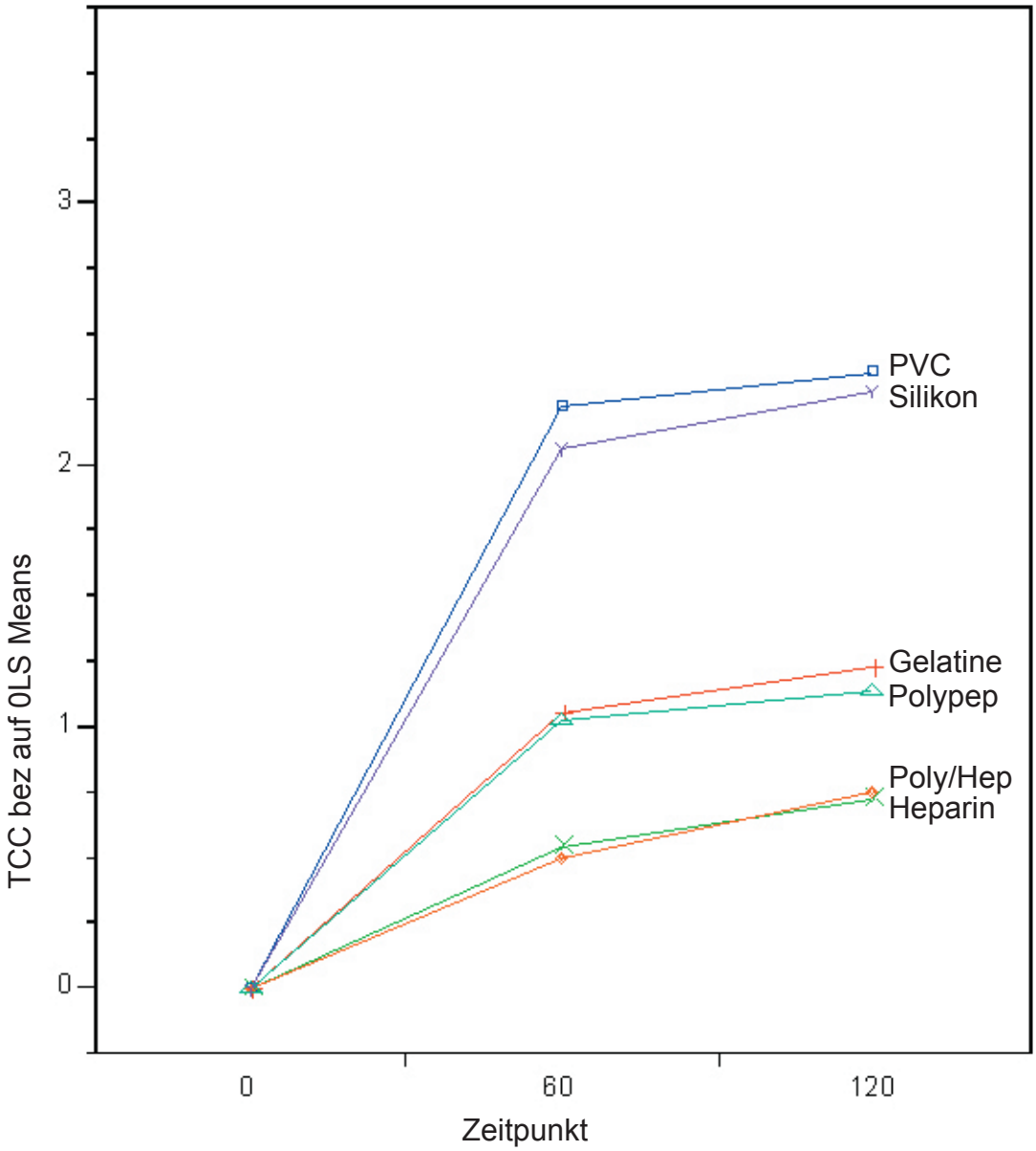


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von TCC während 120-minütiger Zirkulation von humanem Vollblut in Schläuchen aus den sechs obengenannten Biomaterialien (LS Means Plot; n = mind. 5, max. 13).

3.2.2.2 PMN-Elastase

Für alle untersuchten Materialien konnte eine Zunahme der Konzentration an PMN-Elastase im Versuchsverlauf festgestellt werden. Dabei war jedoch nur

der Konzentrationsanstieg von PVC und Silikon nach 60 Minuten signifikant. Für PVC war der Anstieg zwischen 60 und 120 Minuten nochmals signifikant. Ein statistisch relevanter Anstieg konnte nach 120 Minuten für die Heparin- und die Gelatine-Beschichtung festgestellt werden. Keinerlei signifikante Konzentrationssteigerung an PMN-Elastase konnte für Polypeptid und Polypeptid/ Heparin gemessen werden. Im Vergleich der Materialien untereinander lagen das unbeschichtete Silikon und die verschiedenen Beschichtungen mit ihren PMN-Elastase-Konzentrationen nahe beeinander, zwischen diesen Materialien waren keine statistisch bedeutsamen Unterschiede zu verzeichnen. Von allen Materialien zeigte PVC die höchsten PMN-Elastase-Konzentrationen, diese waren im Vergleich zu den übrigen fünf Materialien aber erst für die 120-Minuten-Konzentrationen signifikant.

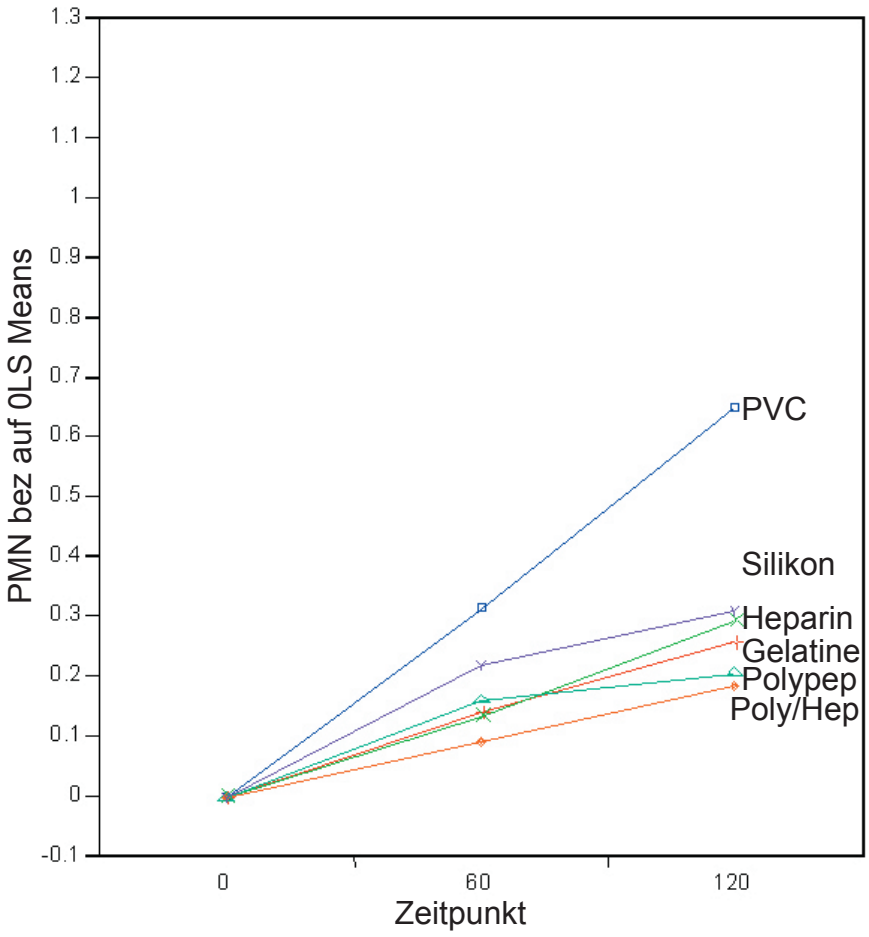


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von PMN-Elastase während 120-minütiger Zirkulation von humanem Vollblut in Schläuchen aus den sechs obengenannten Biomaterialien (LS Means Plot; n = mind. 5, max. 13).

3.3 Weitere Bestimmungen

3.3.1 Analyse der adsorbierten Proteine

3.3.1.1 Albumin

Alle sechs untersuchten Biomaterialien zeigten eine sehr schnelle Adsorption von Albumin an ihren Oberflächen, mit Ausnahme von PVC ist bereits nach 15 Minuten eine Sättigung eingetreten. Die PVC-Schläuche hingegen demonstrieren eine leichte kontinuierliche Zunahme der Konzentration, deren höchster Wert am Ende des Experiments nach 120 Minuten gemessen wird, so dass kein Sättigungszeitpunkt bestimmt werden kann. Entsprechend der Zusammensetzung der Beschichtung zeigen die Polypeptid-beschichteten und die Polypeptid/ Heparin-beschichteten Schläuche zu allen Zeitpunkten die höchsten Albuminkonzentrationen, die sich signifikant von den unbeschichten Schläuchen und den Beschichtungen mit Gelatine und Heparin unterschieden. Dabei liegen die Konzentrationen an den Polypeptid/ Heparin-beschichteten Schläuchen nochmals signifikant über denen der Polypeptid-Beschichtung. Die niedrigsten Adsorptionswerte für Albumin wurden an den Heparin-beschichteten Schläuchen gemessen, sie lagen dabei deutlich unter denen von PVC, Silikon und der Gelatine-Beschichtung.

Entsprechend der unterschiedlichen Zusammensetzung der einzelnen Beschichtungen zeigten sich im Immunblot ähnliche Ergebnisse wie in der Kinetik. Die Eluate aller untersuchten Biomaterialien enthielten Albumin, was sich in einer bei allen Materialien nachweisbaren Bande bei ungefähr 65 kDa manifestierte, was der Molekülmasse von Albumin entspricht. Allerdings wurde Albumin in unterschiedlichen Quantitäten adsorbiert, die Banden unterschieden sich deutlich in ihrer Intensität. Die hohen Werte der Kinetik der Polypeptid/ Heparin-Beschichtung ließen sich auch in der Lane des Eluates aus diesen Schläuchen nachweisen, zusätzlich zu obengenannter Bande war eine Färbung der ganzen Lane detektierbar.

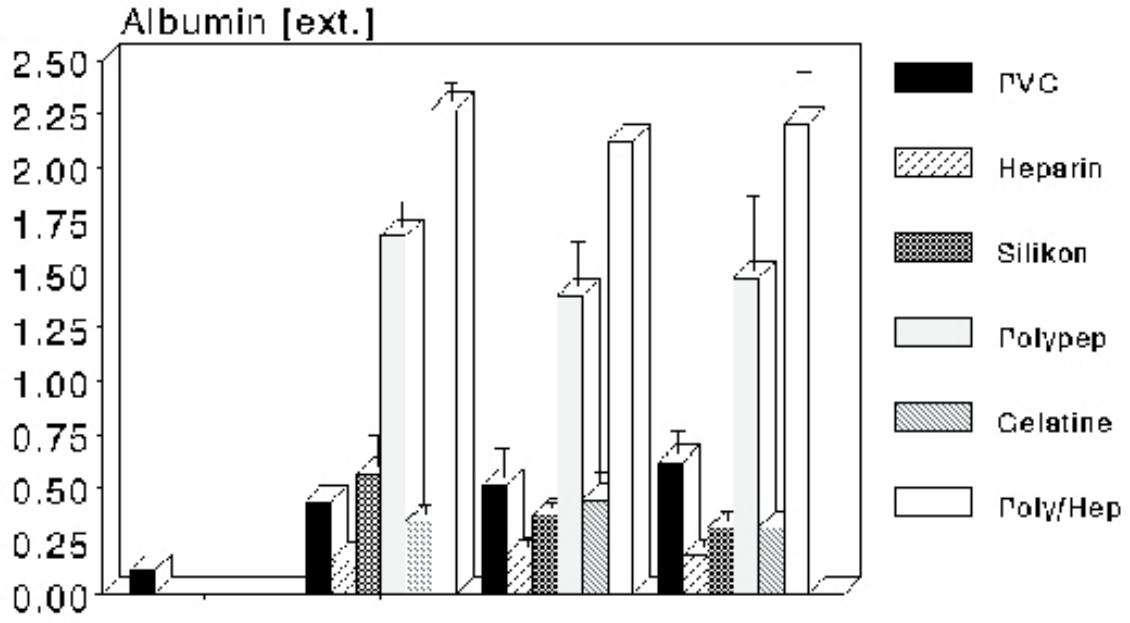
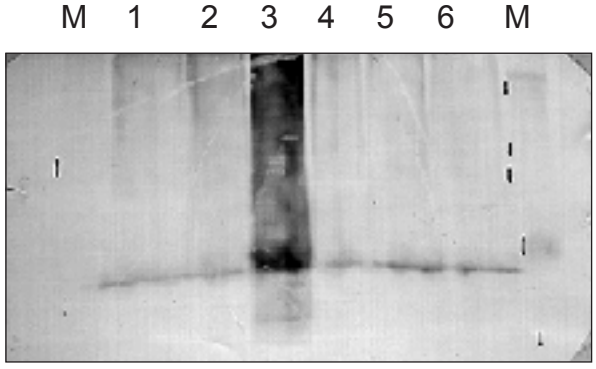


Abbildung 11-1: Zeitlicher Verlauf der Albumin-Adsorption aus humanem Vollblut an die sechs obengenannten Biomaterialien (Mittelwert ± SD; n = 3).



Marker = M

Polypeptid = 1
Gelatine = 2
Polypep/Hep = 3
Heparin = 4
PVC = 5
Silikon = 6

Abbildung 11-2: Immunoblot Muster des eluierten Albumin nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.3.1.2 Hitzeschockprotein 70 (Hsp 70)

Bei ungefähr 75-85 kDa konnten Banden von adsorbiertem Hsp 70 in den Eluaten aus Polypeptid, Gelatine, PVC und Silikon nachgewiesen werden. Aus den Eluaten der Polypeptid/ Heparin- und der Heparin-Beschichtung wurden keine Banden detektiert. Die detektierten Banden unterschieden sich in ihrer Intensität und damit in der Quantität des adsorbierten Hsp 70, die Intensität der Bande von unbeschichtetem PVC war am höchsten.

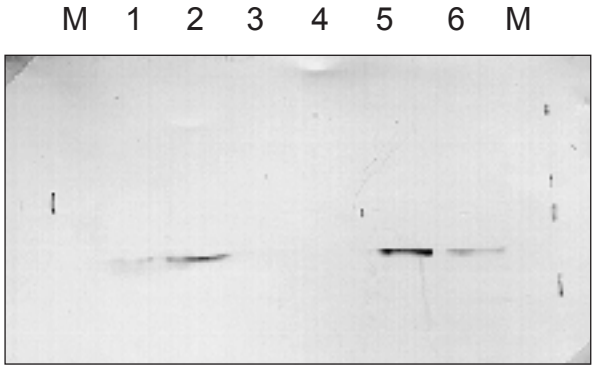


Abbildung 12: Immunoblot Muster des eluierten Hsp 70 nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.3.1.3 CD41

Obwohl nur auf den Polypeptid- und den Gelatine-beschichteten Schläuchen Zellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten, fand sich adsorbiertes CD41 auf den Oberflächen aller sechs Biomaterialien, wobei sich deutliche Unterschiede im Bandenmuster fanden, die doch recht gut mit dem Nachweis von Zellen korrespondieren. Polypeptid und Gelatine, auf denen Zellen nachweisbar waren, zeigen ein gleiches Bandenmuster, wobei Gelatine die höhere Bandenintensität generierte. Die beiden Banden, die bei diesen Materialien am stärksten ausgeprägt waren, ließen sich auch bei PVC und Silikon, aber schwächer, nachweisen. Die obere der Banden konnte auch bei den Polypeptid/ Heparin- und Heparin-Beschichtungen nachgewisen werden, allerdings deutlich schwächer. Diese obere Bande wurde bei 115 kDa detektiert,

was der Molekülmasse des intakten Proteins entspricht. Die untere Bande, die bei den übrigen Materialien die jeweils stärkste war, war bei diesen kaum detektierbar. Die Polypeptid/ Heparin- und die Heparin-Beschichtung zeigten damit die geringste Adsorption von CD41.

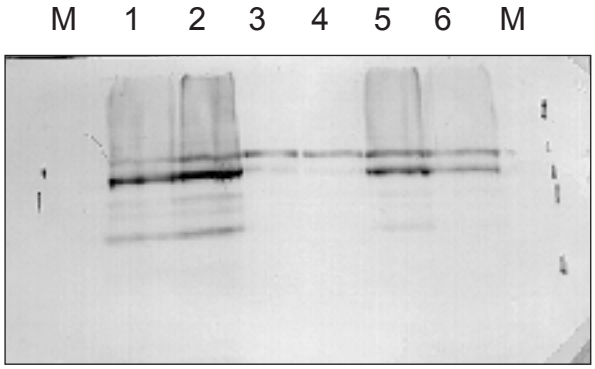


Abbildung 13: Immunoblot Muster des eluierten CD41 nach Blutkontakt mit den entsprechenden Biomaterialien (120 Minuten).

3.3.2 Thrombozyten

3.3.2.1. Thrombozytenzahl

Die verschiedenen Biomaterialien fördern in unterschiedlichem Maße die Adhäsion von Thrombozyten auf ihren Oberflächen, was sich in einer unterschiedlich großen Depletion zirkulierender Thrombozyten nach der Rezirkulation zeigte. Zwischen den Thrombozytenzahlen eines jeweiligen Materials zu den Zeitpunkten 60 und 120 Minuten waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Im Vergleich der Materialien untereinander zeigten Heparin und Polypeptid/ Heparin nach 120 Minuten die höchsten Thrombozytenzahlen, es kam zu keiner statistisch relevanten Änderung der Thrombozytenzahl gegenüber dem Ausgangswert. Heparin unterschied sich außer von Polypeptid/ Heparin signifikant von den übrigen vier Biomaterialien. Polypeptid/ Heparin unterschied sich statistisch

relevant von Polypeptid, Gelatine und Silikon, nicht aber von Heparin und PVC. Die niedrigste Thrombozytenzahl nach 120 Minuten Rezirkulation ließ sich für Silikon nachweisen, dieser Wert war bei 60 Minuten gegenüber allen anderen Materialien signifikant erniedrigt, nach 120 Minuten war allerdings kein signifikanter Unterschied zu Gelatine mehr messbar.

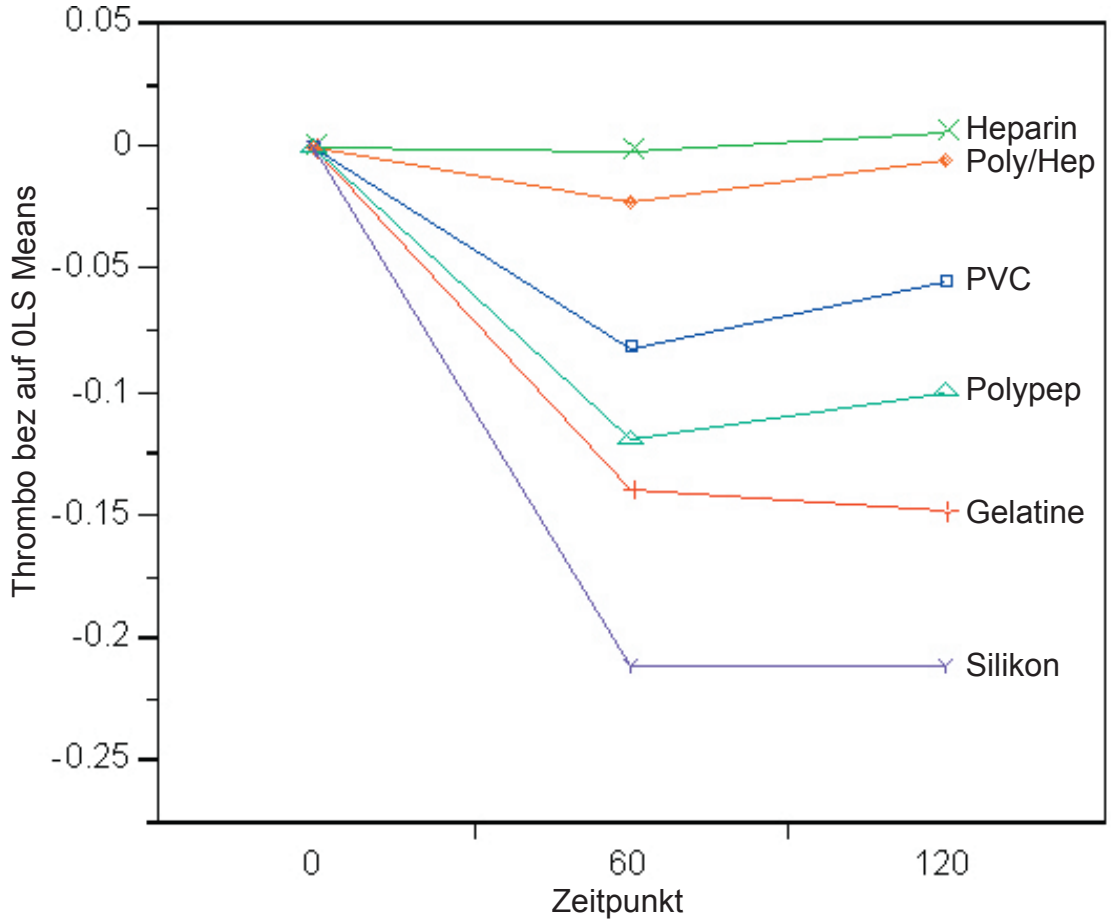


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenkonzentration während 120-minütiger Zirkulation von humanem Vollblut in Schläuchen aus den sechs obengenannten Biomaterialien (LS Means Plot; n = mind. 5, max. 13).

3.3.2.2 Thrombozytenaktivierung, β-Thromboglobulin

Die Konzentrationen eines weiteren Markers der Thrombozytenaktivierung, des β-Thromboglobulin, waren innerhalb von 60 Minuten bei allen Biomaterialien signifikant angestiegen. Für keines der Biomaterialien war ein statistisch relevanter Unterschied zwischen 60 und 120 Minuten festzustellen. Es fanden sich deutliche Unterschiede im direkten Vergleich der verschiedenen Schlauchmaterialien.

Die β-Thromboglobulin-Konzentrationen aus den unbeschichteten PVC- und Silikonschläuchen waren am höchsten und unterschieden sich dabei kaum voneinander. Es bestanden auch keine Signifikanzen gegenüber den niedrigeren Werten der Polypeptid- und Gelatine-Beschichtungen. Die niedrigsten β-Thromboglobulin-Konzentrationen wurden für die Beschichtungen mit Heparin und Polypeptid/ Heparin gemessen. Heparin und Polypeptid/ Heparin unterschieden sich darin aber nicht signifikant voneinander. Diese niedrigsten Konzentrationen der Heparin- und Polypeptid/ Heparin-Beschichtungen waren gegenüber PVC, Silikon und den Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine signifikant niedriger.

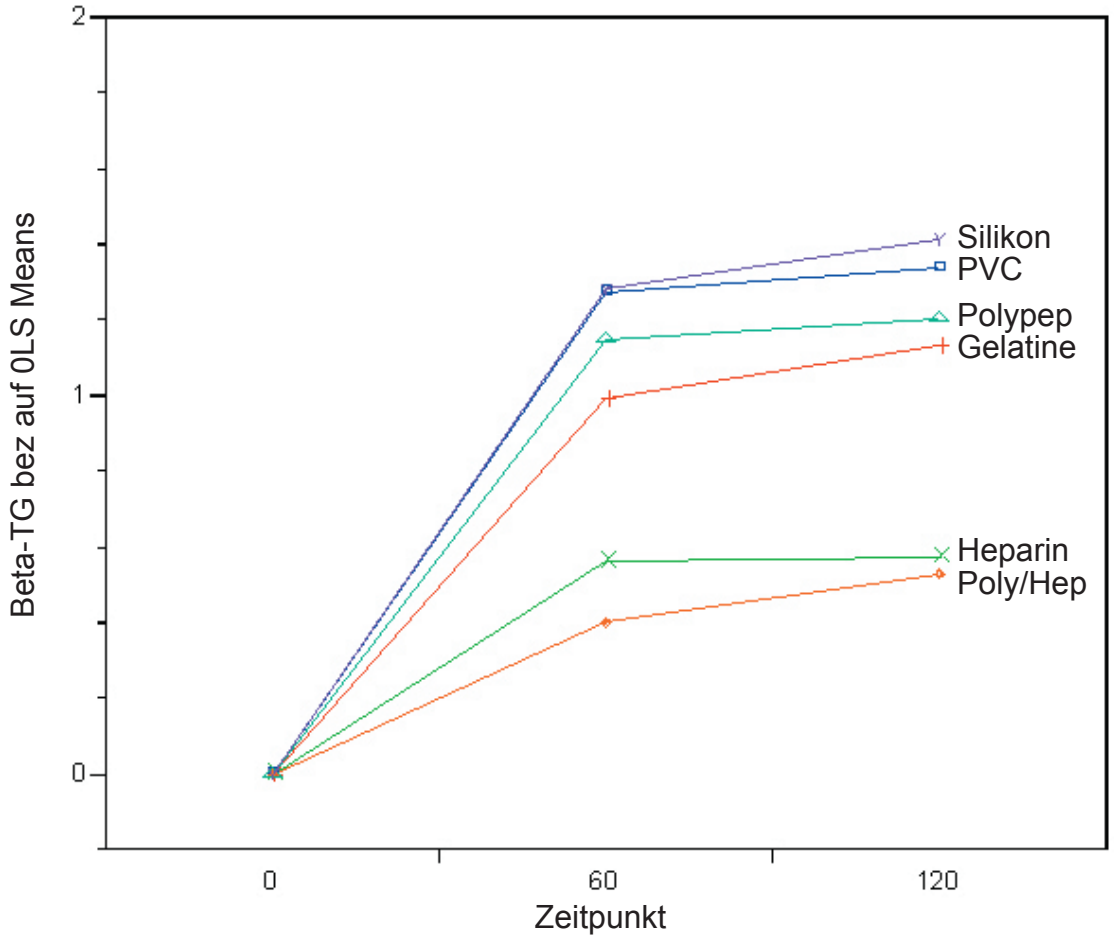


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von β-Thromboglobulin während 120-minütiger Zirkulation von humanem Vollblut in Schläuchen aus den sechs obengenannten Biomaterialien (LS Means Plot; n = mind. 5, max. 13).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Während der 120-minütigen Zirkulation des Blutes in den verschiedenen beschichteten und unbeschichteten Schlauchmaterialien im Chandler-Loop-Modell konnten Unterschiede im Anstieg der untersuchten humoralen Aktivierungsmarker, in den Adsorptionsintensitäten der Plasmaproteine und in der Spaltung bzw. Denaturierung bestimmter Adsorptionsproteine gemessen werden.

Die Konzentrationen der humoralen Aktivierungsmarker stiegen in der unbeschichteten Gruppe PVC und Silikon am deutlichsten an und lagen signifikant höher als die der Heparin-beschichteten Gruppe (Heparin bzw. Polypeptid/ Heparin). Die Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine führten je nach untersuchtem Marker teilweise zu ähnlich hohen Konzentrationsanstiegen wie die der unbeschichteten Gruppe bzw. nur geringen Anstiegen und ähnlich niedrigen Konzentrationen wie die Heparin-beschichtete Gruppe. Sowohl die Aktivierung des Gerinnungssystems als auch die von Komplementsystem und Granulozyten ließ sich durch die Verwendung der Heparin-(haltigen) Beschichtungen erheblich reduzieren.

Die Ergebnisse der löslichen Aktivierungsmarker lassen sich mit den Adsorptionsintensitäten der jeweiligen, für die verschiedenen Kaskadenreaktionen/-systeme verantwortlichen Plasmaproteine korrelieren. In den Untersuchungen zeigte sich für die verschiedenen Plasmaproteine ein überwiegend unterschiedliches Adsorptionsverhalten bezüglich unbeschichteter, Heparin-beschichteter und anders beschichteter Oberflächen. Auf den Heparin bzw. Polypeptid/ Heparin-beschichteten Oberflächen konnten vergleichsweise hohe Konzentrationen an adsorbiertem HMWK, C1-Esterase-Inhibitor und AT III nachgewiesen werden. Umgekehrt dazu stellte sich die Adsorption von Fibrinogen, Fibronektin, C3 und CD41 dar, hier konnten auf den unbeschichteten und Polypeptid- bzw. Gelatine-beschichteten Oberflächen vergleichbar höhere Konzentrationen gemessen werden. Bezüglich des zeitlichen Ablaufs konnte festgestellt werden, dass die Adsorption der Plasmaproteine an die Fremdoberflächen ein relativ schneller Vorgang ist, der bereits in den ersten 15-30 Minuten des Blut-Fremdoberflächenkontaktes stattfindet und häufig schon zu

diesem Zeitpunkt einen Sättigungswert erreicht hat.

In den Western Blots zeigten sich teilweise für die sechs untersuchten Materialien weitgehend gleiche Bandenmuster, wobei sich die Banden dabei bisweilen deutlich in ihrer Intensität und damit in der relativen Menge an adsorbiertem Protein unterschieden. Dies galt für die Immunoblots von Fibrinogen, Albumin, CD41 und Hsp 70. Teilweise fand sich jedoch eine höhere Denaturierung bestimmter Adsorptionsproteine durch unbeschichtete Oberflächen im Vergleich zu den Heparin-Beschichtungen, so dass nicht nur unterschiedliche Intensitäten der Banden, sondern auch unterschiedliche Bandenmuster detektiert werden konnten. Dies war bei HMWK, Fibronektin und C3 der Fall. Die Detektion von relativ kleinen adsorbierten C3-Fragmenten, die mit den Molekularmassen bekannter Aktivierungsmarker des Komplementsystems korrelierten, wies auf eine Komplementaktivierung durch unbeschichtete bzw. mit Polypeptid oder Gelatine beschichtete Oberflächen hin. Auf den mit Polypeptid und Gelatine beschichteten Oberflächen waren adhärente Zellen sichtbar (REM), was die höchsten Konzentrationen an CD41 erklärt. Dennoch konnten auf den unbeschichteten Oberflächen ebenfalls vergleichsweise hohe Konzentrationen an CD41 nachgewiesen werden, obwohl keine adhärierten Zellen zu sehen waren. Die Polypeptid/ Heparin-beschichteten bzw. Heparin-beschichteten Schläuche, auf denen ebenfalls keine adhärierten Zellen gesehen wurden, zeigten die niedrigsten CD41-Konzentrationen.

4 Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Teil werden die im Rahmen der Arbeit angewendeten Methoden erläutert und die Auswahl ihrer jeweiligen Komponenten begründet. Im zweiten Abschnitt sollen die erzielten Ergebnisse diskutiert und in den Kontext bisher bekannter Ergebnisse und Sachverhalte eingebunden werden. Dabei sollen auch mögliche Wirkmechanismen, die entscheidend zur Hämokompatibilität von Biomaterialien beitragen könnten, diskutiert werden. Der dritte Teil befasst sich mit den Schlussfolgerungen, die aus den in der Arbeit erzielten Ergebnissen gezogen werden können.

4.1 Konzeption

Der Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation ist mit einer Aktivierung von Blutzellen und den Systemen der proteolytischen Enzyme im Plasma (Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse und F XII-Kallikrein-Kinin-Kaskade) verbunden (Hill, 1998; Wan et al., 1997; Yung et al., 2000). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Hämokompatibilität von Fremdoberflächen durch verschiedene Oberflächenmodifikationen deutlich verbessert werden kann (Wendel und Ziemer, 1999). Dabei wurden entscheidende Erfolge bisher vor allem durch Heparinbeschichtungen erzielt. Gott et al. (Gott et al., 1963) berichteten bereits 1963 von einer Heparinbeschichtung an Kunststoffen, die mit Graphit vorbehandelt wurden. In den darauf folgenden Jahren wurde an einer verbesserten ionischen Beschichtungstechnik über eine Bindung des negativ geladenen Heparinmoleküls an positiv geladene, festphasengebundene Ammoniumionen gearbeitet (Grode et al., 1969, Lagergren und Erikson, 1971). 1983 wurde die derzeit etablierte Methode der Heparinbeschichtung vorgestellt, die sich als stabilste und auch im Langzeiteinsatz wirksamste Methode erwiesen hat (Larm et al., 1983). Es handelt sich hierbei um eine kovalente Bindung des Heparins an die Oberfläche, wobei durch die Technik der Endpunktbefestigung die aktiven Pentasaccharidsequenzen des Heparinmoleküls nicht beeinträchtigt werden und somit eine äußerst bioaktive Oberflächenstruktur resultiert. Diese Heparinbeschichtung (CBAS = Carmeda Bioactive Surface) ist die bisher am

besten untersuchte Beschichtungstechnik. Es wurde seither eine Vielzahl experimenteller und klinischer Studien durchgeführt, die die Vorteile der heparinbeschichteten Systeme zeigen konnten. Hier sind die geringere humorale und zelluläre Aktivierung (Korn et al., 1996; Moen et al., 1996; Shigemitsu et al., 1994; Wagner et al., 1994; Wendel et al., 1994) hervorzuheben, insbesondere die reduzierte Komplementaktivierung (Fosse et al., 1994; Moen et al., 1996; Videm et al., 1992). Bozdayi et al. (Bozdayi et al., 1996) sahen unter Verwendung von CBAS eine verminderte Produktion von freien Sauerstoffradikalen. Außerdem konnte mit CBAS eine geringe Expression der Leukozytenadhäsionsmoleküle CD 11b/c festgestellt werden, was auf eine verminderte Neutrophilen-Aktivierung hinweist (Hogevold et al., 1997).

Dabei handelt es sich nicht nur um rein laborchemische Befunde, vielmehr konnten klinische Untersuchungen deutliche Vorteile im klinischen Verlauf und Outcome der Patienten nachweisen. Mit der Verwendung dieser CBAS-Heparinbeschichtung kam es unter anderem zu geringeren Drainageblutungen, reduzierten neurologischen Komplikationen und letztlich zu einer Verkürzung des Klinikaufenthaltes (Svenmarker et al., 1997). Insgesamt kann durch den Einsatz der CBAS-Beschichtung eine signifikante Reduzierung des inflammatorischen Postperfusionssyndroms erzielt werden. Die genannten Vorteile sind bei Langzeitanwendungen mit dieser Beschichtungstechnik von besonderer Relevanz.

Die Heparinbeschichtung von Carmeda (CBAS) stellt also die derzeit am besten untersuchte und gleichzeitig die am besten biokompatible Oberfläche dar, sie wurde daher bewusst als „Positivkontrolle“ gewählt. So konnten die Adsorptionseigenschaften der untersuchten Plasmaproteine an dieser Oberfläche mit den biokompatiblen bzw. hämokompatiblen Eigenschaften dieser Heparinbeschichtung korreliert werden.

Als am häufigsten verwendetes und ebenfalls in früheren Studien gut untersuchtes unbeschichtetes Material (Weber et al., 2000; Wendel et al., 1999) wurde PVC gewählt. Als weiteres unbeschichtetes und auch im medizinischen Bereich bereits häufig zur Anwendung gekommenes Material wurde Silikon mit untersucht. Neben reinen Heparin-Beschichtungen sind auch „Beschichtungsmischungen“ mit Heparin in Kombination mit anderen Stoffen und weitere Beschichtungen

mit organischen Molekülen Gegenstand der aktuellen Forschung. Um diesen gegenwärtigen Entwicklungen Rechnung zu tragen, wurden außerdem eine Beschichtung mit Polypeptid/ Heparin, eine reine Polypeptid- und eine Gelatine-Beschichtung ausgewählt, so dass insgesamt sechs verschiedene Materialien in dieser Arbeit untersucht wurden.

Man geht heute davon aus, dass die Adsorption und Aktivierung von Plasmaproteinen wie auch die Aktivierung von Zellen durch den Kontakt des Blutes mit Fremdmaterialien alle nachfolgenden Interaktionen beeinflussen, die die Hämokompatibilität von Biomaterialien ausmachen.

Zur Untersuchung der Adsorptionseigenschaften der Plasmaproteine an den jeweiligen Oberflächen wurde eine neue Methode zum Nachweis der adsorbierten Proteine an Schlauchstücken, die für die Anwendung in der Herz-Lungen-Maschine konzipiert sind, angewendet. Mit dieser Methode konnten die verschiedenen Materialien in ihren Adsorptionseigenschaften für die verschiedenen Plasmaproteine direkt miteinander verglichen werden. Zusätzlich zum direkten Nachweis der adsorbierten Plasmaproteine auf den Innenoberflächen der Schlauchstücke wurden die Aktivierungs- und Denaturierungszustände von adsorbierten Kontaktphaseenzymen, Inhibitoren und anderen Proteinen durch die Methode des Western Blottings bestimmt. Durch diese sehr sensitive Technik konnten die Ergebnisse der Schlauchstück-ELISA-Versuche erhärtet und ergänzt werden.

Parallel zu den bereits genannten Untersuchungsverfahren konnten die löslichen Aktivierungsmarker durch konventionelle ELISA-Verfahren bestimmt werden und mit den Adsorptionsintensitäten der für die Aktivierung der verschiedenen Kaskadenreaktionen verantwortlichen Plasmaproteine korreliert werden.

4.2 Methodische Voraussetzungen

Voraussetzung für die Untersuchung der Adsorptionsproteine ist ein relativ standardisiertes Verfahren, das einen guten Kontakt zwischen Plasmaproteinen und Fremdoberflächen gewährleistet und eine Adsorption der Plasmaproteine überhaupt erst ermöglicht. Die Verwendung des bereits im Methoden-Teil

angesprochenen „Chandler-Loop-Modells“ bietet hier sich aus mehreren Gründen an (Chandler, 1958). Durch dieses „Closed-Loop-Modell“ kann ein Ablauf wie der einer Operation an der extrakorporalen Zirkulation auf ideale Weise simuliert werden. Es herrschen konstante, standardisierte und reproduzierbare Strömungsverhältnisse, durch die das Blut beständig an den Fremdoberflächen entlanggeleitet wird und so kontinuierlich in Wechselwirkung mit denselben treten kann.

Die zum Einsatz kommenden Schläuche sind dieselben, die im klinischen Alltag zum Einsatz kommen, nicht nur was die Materialien, sondern auch die Maße betrifft. Ein weiterer ausschlaggebender Vorteil dieses Verfahrens ist, im Gegensatz zu manch anderen Untersuchungen, in denen nur mit Plasma oder Serum gearbeitet wird, die Verwendung von Vollblut. Dadurch beinhaltet das Testsystem alle Aktivierungs-, Inhibierungs- und Feedbackmechanismen auf zellulärer und nichtzellulärer Ebene (Freisetzung von Gerinnungsfaktoren und Komplementenzymen aus aktivierten Blutzellen wie Thrombozyten, Leukozyten etc., Zytokin-Freisetzung, etc.) wie auch kompetitive Interaktionen zwischen verschiedenen Plasmaproteinen und Oberflächen. Das Modell kommt so der klinischen Situation im Blut-Fremdoberflächen-Kontakt sehr nahe.

Zum Nachweis der an den Schläuchen adsorbierten Plasmaproteine wurde eine neu entwickelte, modifizierte ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) – Technik angewendet. So konnte das jeweilige Plasmaprotein direkt an den Innenoberflächen der Schlauchstücke, die als „Reaktionsgefäß“ verwendet wurden, detektiert werden. Die Durchführung wurde im Teil „Methoden“ in dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Diese Technik zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus, was durch die relativ niedrigen Werte der Standardabweichungen gezeigt werden konnte. Diese Standardabweichungen lagen zum Teil erheblich niedriger als diejenigen der kommerziell erhältlichen ELISA-Kits, die zur Messung der löslichen plasmatischen Aktivierungsmarker verwendet wurden.

Ein entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche Durchführung der Experimente schien die Auswahl der eingesetzten Antikörper und deren teilweise auftretendes unspezifisches Bindungsverhalten darzustellen. Es konnte zum Beispiel mehrfach beobachtet werden, dass Antikörper gegen das

gleiche Antigen, die aber von unterschiedlichen Herstellern bezogen wurden, erhebliche Differenzen in ihrer Spezifität aufwiesen, dies galt teilweise sogar für Antikörper desselben Herstellers, aber verschiedener Chargen, was auf erhebliche Schwankungen der Antikörperqualitäten schließen lässt. Zum einen lag dies sicher daran, dass die verwendeten Antikörper polyklonalen Ursprungs sind und daher mit Kreuzreaktionen anderer Proteine bzw. mit unspezifischem Bindungsverhalten gerechnet werden muss. Durch einen „Blockierungsschritt“ in den Versuchsabläufen konnten diese Eigenschaften der polyklonalen Antikörper jedoch auf ein vertretbares Maß reduziert werden.

4.3 Hämokompatibilität: Adsorption von Plasmaproteinen und Zellaktivierungen

Mit den oben genannten und beschriebenen Techniken ließen sich für die sechs verschiedenen Biomaterialien deutliche Unterschiede im Adsorptionsverhalten bestimmter Plasmaproteine nachweisen. Dabei konnten die kinetischen Untersuchungen nicht nur Aussagen am Ende der Experimente nach 120-minütiger Rezirkulation liefern, sondern ermöglichten auch eine differenziertere Beurteilung sehr schnell ablaufender Vorgänge innerhalb der ersten 15-30 Minuten nach Beginn der Versuche. Diese Aussagen erlaubten die Western Blotting-Ergebnisse nicht, sie hingegen lieferten häufig eine genauere Aussage über die Verhältnisse am Ende der Versuche nach 120 Minuten, da die Untersuchungsmethode an sich differenzierter, sensitiver und spezifischer ist und damit letztendlich aussagekräftiger ist. Dies war insbesondere bei den Versuchen von Bedeutung, bei denen wahrscheinlich aufgrund der bereits angesprochenen Problematik in den Spezifitäten der polyklonalen Antikörper wahrscheinliche oder zum Teil bereits bekannte Ergebnisse trotz Wiederholungen und eines sonst sehr gut funktionierenden Ansatzes nicht erzielt oder nicht reproduziert werden konnten.

Dazu zählt beispielsweise der Kinetik-ELISA von HMWK, wo kaum Signifikanzen zu den Kontrollen – Schlauchstücke ohne Blutkontakt – gemessen werden konnten. Im direkten Vergleich konnten signifikante Unterschiede zwischen

den einzelnen Materialien sicher erst nach 60 bzw. 120 Minuten gemessen werden, die bereits veröffentlichten Daten waren hier eindeutiger (Weber et al., 2002, Weber et al., 2000; Wendel et al., 1999). Deutlich hingegen traten die Unterschiede zwischen den Heparin-haltigen und den unbeschichteten Materialien im Western Blot hervor und können somit die im Kinetik-ELISA nur angedeuteten Unterschiede erhärten.

Eine ähnliche Problematik lag auch dem Kinetik-Versuch mit C1-Esterase-Inhibitor zugrunde, wo die gemessenen Extinktionen des ELISA insgesamt auf niedrigem Niveau lagen und Schwankungen innerhalb der Werte, die von besonderem Interesse waren, eine statistische Aussage erschwerten und sich lediglich Tendenzen ausmachen ließen. Demgegenüber zeichnete sich der Western Blot auch hier durch eine präzisere Abbildung der C1-Esterase-Inhibitor-Adsorption aus.

Schwankungen innerhalb der Extinktionswerte stellten in den ELISA-Versuchen zur Kinetik der Adsorptionen der verschiedenen Plasmaproteine meist kein großes Problem dar, wie bereits zu Anfang erwähnt stellte sich der Ansatz des neu entwickelten ELISA als gut reproduzierbar dar. Die Standardabweichungen lagen, wie schon angesprochen, im allgemeinen deutlich unter denen kommerzieller Kits. Aufgrund der wegen der Komplexität des Ansatzes nicht beliebig zu steigernden Probenzahl für die Durchführung der ELISA-Versuche schlugen sich dann jedoch einzelne „Ausreißerwerte“ in hohen Standardabweichungen nieder, wodurch die im Ergebnisteil und dem obigen Abschnitt angesprochene Problematik einzelner Kinetiken erklärbar ist. Wie oben bereits konkret gezeigt, konnten diese Unschärfen durch die Western Blot-Ergebnisse kompensiert und ergänzt werden. Denn gleichzeitig konnte durch diese Beschränkung der Probenzahl ein breiter Grundansatz gewählt werden, wodurch es möglich war, in einem Ansatz alle sechs verschiedenen Biomaterialien unter den gleichen Bedingungen zu testen. Nur so war eine direkte Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Materialien gewährleistet.

Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Messergebnisse der adsorbierten Proteine mittels ELISA und Western Blotting kann angenommen werden, dass die Konzentrationen bestimmter adsorbierter Plasmaproteine an einer Fremdoberfläche ein entscheidendes Kriterium für deren Biokompatibilität

darstellen. Dabei ist neben der Konzentration an sich ausschlaggebend, um welches Adsorptionsprotein es sich handelt. Der Adsorption einiger Plasmaproteine werden überwiegend positive Eigenschaften zugeschrieben (HMWK, C1-Esterase-Inhibitor, AT III). Im Gegensatz dazu wird die Anlagerung anderer Plasmaproteine wie Fibrinogen, Fibronektin, CD41 und C3 mit einer schlechteren Hämokompatibilität in Verbindung gebracht.
Durch die selektive Adsorption dieser Plasmaproteine an die Fremdoberfläche kann die weitere Aktivierung der Blutzellen wie auch der Kontaktphasensysteme eingeleitet bzw. reduziert werden. Viele Forschergruppen konnten zeigen, dass die auf den Fremdoberflächen adsorbierten Plasmaproteine ein signifikantes Kriterium für die weitere Thrombogenität darstellen (v. a. Vroman und Brash, (Brash und ten Hove, 1989; Vroman, 1988). Diese hängt, wie beispielsweise von Didisheim und Watson (Didisheim und Watson, 1989) vetreten, maßgeblich davon ab, wie sehr die Aktivierung und Inhibierung von Plättchenadhäsion und -aggregation stimuliert werden kann.

In der Untersuchung der Kinetik der Fibrinogenadsorption auf die sechs verschiedenenen Biomaterialien fanden sich sehr schnell nach Beginn des Blut-Material-Kontaktes erhöhte Fibrinogenkonzentrationen, die unbeschichteten Materialien PVC und Silikon waren bereits nach 15 Minuten mit Fibrinogen gesättigt. Die Fibrinogenkonzentrationen auf diesen unbeschichteten Biomaterialien lagen zu allen Zeitpunkten signifikant höher als die der beiden Heparin-haltigen Beschichtungen (Carmeda, Polypeptid/ Heparin), die zu allen Zeitpunkten die niedrigsten Fibrinogenkonzentrationen zeigten.
Solides phasengebundenes Fibrinogen führt zu einer starken Plättchenaktivierung und damit zu Adhäsion und Aggregation und in fortgeschrittenem Stadium zu thromboembolischen Prozessen (Gluszko et al., 1987; Stanford et al., 1983; Vroman, 1983; Wenger et al., 1989). Dabei legen in letzter Zeit veröffentlichte Daten nahe, dass weniger die absolute Menge an adsorbiertem Fibrinogen von Bedeutung zu sein scheint als vielmehr die Konformation oder Ausrichtung der Proteine auf dem Biomaterial (Balasubramanian et al., 2000). Die reduzierte Thrombogenität der Heparin-haltigen Oberflächen hingegen wurde in der Vergangenheit aus den katalytischen Effekten auf AT III und der begleitenden

Bildung von Thrombin-Komplexen abgeleitet. Diese Hypothese kann so nicht aufrecht erhalten werden. Der Vorteil der Heparin-Beschichtungen liegt vielmehr in der reduzierten oder selektiven Adhäsion von Plasmaproteinen, woraus zum einen die schnellere Bildung einer blutfreundlichen Sekundär-Oberflächenmembran resultiert und andererseits eine weitere Denaturierung und damit Aktivierung der adhärierten Proteine verhindert wird. Wir nehmen daher an, dass die Fibrinogenadsorption alleine nicht der wichtigste Schritt zu einer Thrombogenität von künstlichen Devices ist. Eine Überlagerung oder ein Ersetzen von Fibrinogen durch andere Plasmaproteine (Vroman, 1987) scheint für das weitere Ausmaß der Aktivierung thrombogener Kaskadereaktionen verantwortlich zu sein.

Speziell High Molecular Weight Kininogen (HMWK) scheint hier eine entscheidende Rolle zu spielen. Hohe Konzentrationen von HMWK fanden sich nur auf den Heparin-haltigen Oberflächen und wir nehmen an, dass dies maßgeblich die bessere Hämokompatibilität dieser Verbindungen bewirkt. In Experimenten (Cornelius und Brash, 1997; Yung et al., 1996) konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung/-beschichtung von Oberflächen eine reduzierte Neutrophilen- und Bakterienadhäsion zur Folge hat.
In unseren Experimenten fiel im Western Blot auf, dass sich die Banden nicht nur in ihrer relativen Stärke unterscheiden, sondern dass sich je nach Biomaterial ein auffallend anderes Bandenmuster zeigte, was für das Vorhandensein von Spaltprodukten und aktivierten Formen spricht. Auf den Heparin-haltigen Oberflächen konnten Eluate gewonnen werden, die eine immunoreaktive „Haupt-Bande“ bei 100-110 kDa ergaben und die von der Masse her dem intakten Molekül entspricht (Scott et al., 1985). Diese konnte auf den anderen Oberflächen kaum oder nicht detektiert werden. Es zeigte sich außerdem eine weitere Bande bei 55-65 kDa, die nur auf den Heparin-haltigen Oberflächen detektiert werden konnte. Spaltprodukte des hochmolekularen Kininogen können auf verschiedene Weise entstehen. Kallikrein spaltet HMWK in drei aufeinander folgenden Schritten. Zuerst verursacht Kallikrein einen Knick im HMWK-Molekül, wodurch ein zweikettiges Molekül entsteht, das durch eine Disulfidbrücke in Verbindung steht. Dann setzt Kallikrein Bradykinin frei und im dritten Schritt resultiert ein stabiles,

kininfreies Protein, das sich aus zwei Ketten zu 64 und 45 kDa zusammensetzt, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Es wurde berichtet, dass das zweikettige HMWK-Molekül ein potentes „Anti-Zell-Adhäsions-Protein" ist (Asakura et al., 1992). Zusätzlich zu diesen Mechanismen bewirkt auch Faktor XIa eine Spaltung des HMWK, allerdings an anderen Stellen, wodurch eine schwere Kette (65 kDa) und eine leichte Kette (45 kDa) entstehen (Reddigari und Kaplan, 1988). Da keine dieser Ketten eine Kofaktor-Aktivität ausübt, wurde geäußert, dass F XIa durch diese Spaltung des HMWK zur Kontrolle über den Kontaktaktivierungsprozess beiträgt (Scott et al., 1985). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung/-beschichtung von Oberflächen mit HMWK die Adhäsion von Neutrophilen und Bakterien reduzieren kann (Cornelius und Brash, 1997; Khan et al., 1998; Yung et al., 1996; Yung et al., 2000). Es wurde gefolgert, dass HMWK und gespaltenes HMWK Bindungsstellen für anionische Oberflächen und Neutrophile in der selben Domäne besitzen. Sobald sie nun an einer Oberfläche adsorbiert sind, steht die Bindungsstelle für Neutrophile nicht mehr zur Verfügung und es resultiert ein anti-adhäsiver Effekt (Yung et al., 2000). Wir nehmen daher an, dass die erhöhte Adhäsion von HMWK auf den Heparin-beschichteten Oberflächen durch die anti-adhäsive Wirkung auf andere Zellen maßgeblich zur besseren Hämokompatibilität dieser Verbindungen beiträgt.

Fibronektin hat ein Molekulargewicht von 440.000 kDa (Dimer), intaktes Fibronektin erscheint in der reduzierten SDS-PAGE als Bande von 200 kDa (Sekiguchi und Hakomori, 1983). Während aus den Eluaten der Heparinbeschichtungen kaum Fibronektin detektiert werden konnte, zeigten die unbeschichteten Materialien PVC und Heparin dasselbe Bandenmuster, allerdings war die relative Intensität der Banden bei Silikon höher. Das Augenmerk muss aber auf den Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine liegen. In den Kinetik-Versuchen konnten für diese Beschichtungen die höchsten Extinktionen aller sechs Biomaterialien gemessen werden, zur Bestimmung der Extinktionen innerhalb des Messbereiches mussten die Ansätze aus den Gelatine-beschichteten Schlauchstücken sogar im Verhältnis 3:1 verdünnt werden. Die Ergebnisse der SDS-PAGE bestätigen diese Messungen auf eindrückliche Weise, zeigen diese beiden Beschichtungen doch ein anderes Bandenmuster als die übrigen Materialien, allerdings sind hier

die Intensitäten der Banden der Polypeptid-Beschichtung deutlich intensiver als die der Gelatine-Beschichtung. Die Bedeutung des Matrixproteins Fibronektin liegt in seiner Fähigkeit, eine Verbindung zwischen Zelloberflächen und einer Substratoberfläche herzustellen. Dies erlaubt das Anheften und Ausbreiten von Zellen und vermittelt die Bindung von Teilchen an Zellen (Opsonierung), wobei sich das Fibronektin an Bakterien und andere Partikel anlagert und diese an Zellen bindet, die die Teilchen dann aufnehmen und abbauen. Es konnte gezeigt werden, dass adsorbierter von Willebrand-Faktor und Fibronektin die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten fördern (Grunkemeier et al., 2000). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen des Western Blotting, wo höhere Mengen an adsorbiertem Fibronektin auf Silikon und insbesondere auf Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine als auf den übrigen Materialien nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise waren diesen beiden Beschichtungen Polypeptid und Gelatine die einzigen der sechs Schlauchmaterialien, auf denen elektronenmikroskopisch das Vorhandensein von Zellen nachgewiesen werden konnte. Der Western Blot zeigte außerdem in den Eluaten von Polypeptid und Gelatine viele diffuse Banden im Bereich unter 200 kDa, so dass von kleineren Fragmenten denaturierten Fibronektins ausgegangen werden kann. Solch unspezifische Degradierung kann durch das Vorhandensein von Proteasen erklärt werden, die durch Zellzerfall oder Zellausschüttung während der Versuche freigesetzt wurden. Zum einen wurde berichtet, dass ein Zusammenhang zwischen dem Denaturierungsgrad von adsorbierten Proteinen und der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten besteht (Ito et al., 1990). Zum anderen zeichnet Fibronektin bereits unter physiologischen Bedingungen für die Thrombozytenadhäsion verantwortlich. Es ist daher anzunehmen, dass (denaturiertes) Fibronektin zumindest teilweise für die Hämokompatibilität von Fremdoberflächen verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang müssen die Ergebnisse der Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine kritisch beurteilt werden.

Der Komplementfaktor C3 spielt eine zentrale Rolle im Komplementsystem, da hier der klassische und der alternative Weg der Komplementaktivierung zusammentreffen. Das intakte C3-Molekül besteht aus einer schweren (α)

Kette (110 kDa) und einer leichten (β) Kette (75 kDa) (Sim et al., 1981). Die Aktivierung des Komplementfaktors C3 führt zur Spaltung der (α) Kette in die Produkte 3a und 3b (Cornelius und Brash, 1993). Der Western Blot zeigt, dass die leichte (β) Kette auf allen Oberflächen adsorbiert war, aber dass die Eluate von den Heparin-beschichteten Oberflächen deutlich niedrigere Mengen dieses Fragmentes enthielten als die übrigen Materialien und insbesondere Silikon. Im Gegensatz dazu war die schwere (α) Kette (110 kDa) nicht auf allen Oberflächen adsorbiert. Zusätzlich fanden sich auf den unbeschichteten Materialien PVC und Silikon und den Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine einige deutliche Banden mit niedrigerem Molekulargewicht. Bei diesen Fragmenten handelt es sich wahrscheinlich um aktivierte C3-Komponenten, da ihre Molekularmassen mit ungefähr 30 kDa ungefähr denen von C3d entsprechen (Gemmell, 1997). Diese „kontaktaktivierten" C3-Fragmente könnten eine direkte oder indirekte Aktivierung des Komplementsystems induzieren, was sich durch die hohen Konzentrationen an generiertem terminalem Komplementkomplex (TCC) belegen lässt. Frühere Versuche konnten eine Korrelation herstellen zwischen der Kapazität der C3-Adsorption an unterschiedliche Oberflächen und der Fähigkeit dieser Oberflächen, die Bildung von TCC zu initiieren (Weber et al., 2000). So ergeben sich deutliche Hinweise dafür, dass durch die Adsorption von C3 an unbeschichteten Oberflächen eine starke Komplementaktivierung erfolgt. Außerdem folgerten einige Studien, dass das adsorbierte C3 ein entscheidender Parameter für die Adhäsion von Monozyten und Granulozyten sei (Kao et al., 1996; McNally und Anderson, 1994). Dies konnte durch Untersuchungen bestätigt werden, die eine deutlich reduzierte Aktivierung von Monozyten durch Heparin-Beschichtungen zeigen konnten (Weber et al., 2001). Es ist daher anzunehmen, dass die Menge an adsorbiertem und aktiviertem C3 eine Schlüsselrolle in der weiteren Aktivierung des Blutes einnimmt. Die bereits oben erläuterte Analyse des adsorbierten C3 durch den Western Blot kann mit den Ergebnissen der Kinetik-Studie korreliert werden, in der für die unbeschichteten Materialien PVC und Silikon zu allen Zeitpunkten eine hohe und für die Beschichtungen mit Heparin und Polypeptid/ Heparin stets eine niedrige C3-Adsorption festgestellt wurde. Diese Ergebnisse ließen sich direkt mit den Messungen des terminalen Komplementkomplexes in Verbindung setzen, dessen Konzentration in den

unbeschichteten PVC- und Silikon-Schläuchen deutlich erhöht war. Die niedrigsten Konzentrationen konnten in den Heparin- und den Polypeptid/ Heparin-beschichteten Schläuchen gemessen werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die bisher bekannten Beobachtungen zu unbeschichteten PVC- und Heparin-beschichteten Schläuchen und erlauben im Vergleich eine zuverlässige Aussage über das Ausmaß der Komplementaktivierung durch die übrigen Materialien.

Als logische Konsequenz zu den Untersuchungen über Komponenten des Koagulationssystems und Indikatoren der Komplementaktivierung wurden Versuche mit den Inhibitoren des Gerinnungssystems und des Kontaktsystems durchgeführt. Als Inhibitor der prokoagulatorischen Serinproteasen des Gerinnungssystems wurde Antithrombin III untersucht. Zur Beurteilung der Inhibitoren der aktivierten Komponenten des Kontaktsystems wurde mit dem C1-Esterase-Inhibitor der wesentliche Inhibitor des Faktor XIIa gewählt. Aus den bisherigen Ausführungen, d.h. den Ergebnissen zu Aktivatoren der Gerinnung und des Komplementsystems ist zu postulieren, dass diejenigen Materialien, für die eine geringe Aktivierung dieser Systeme nachgewiesen werden konnte, einen hohen Nachweis von Inhibitoren der beiden Systeme nach sich ziehen müssten und umgekehrt.

Antithrombin III ist der wichtigste Inhibitor der Gerinnungsenzyme. Es hat eine besonders starke Affinität zu Thrombin und Faktor Xa, während Faktor IXa wie auch Faktor XIIa, XIa und Kallikrein schlechter inhibiert werden. AT III ist ein Glykoprotein mit einer einzigen Polypeptidkette von 65 kDa. Die Bindung an Heparine aktiviert AT III, wobei Pentasaccharide eine Konformationsänderung bewirken, durch die besonders Faktor Xa inaktiviert wird. Die Aktivität von AT III kann durch die Bindung an Heparine bis zu 1000fach gesteigert werden, AT III wird daher auch als „Heparin-Kofaktor“ bezeichnet (Perry, 1994; Spaethe und Kolde, 1992).

Der C1-Esterase Inhibitor ist ein Proteaseninhibitor mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, der die aktivierten Subkomponenten des ersten Komplementfaktors, des Faktors XIIa, XIa, Kallikrein und Plasmin hemmt. C1-Esterase-Inhibitor ist der wichtigste Inhibitor von α-FXIIa, β-FXIIa und Kallikrein (Schapira et al., 1988).

In Korrelation zu den oben genannten Ergebnissen und Erwartungen waren

die Oberflächen mit der höchsten AT III- und C1-Inhibitor-Bindungskapazität die Heparin-beschichteten Oberflächen. AT III konnte in den Eluaten aus den übrigen vier Materialien nicht nachgewiesen werden. Es fand sich auf dem Western Blot das gleiche Bandenmuster für die Eluate aus den Heparin-beschichteten Schläuchen, die Intensität war für die Heparin-beschichteten Schläuche jedoch deutlich höher als für die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung. Die Ergebnisse der AT III-Kinetik wiesen dieselben Tendenzen auf, es fanden sich jedoch bereits auf den Kontrollen hohe Extinktionswerte, die nicht erklärbar waren, zusammenfassend konnten die Ergebnisse jedoch durch die SDS-PAGE verifiziert werden. C1-Esterase Inhibitor ließ sich ebenfalls nur auf den Heparin-haltigen Beschichtungen deutlich nachweisen, auf den übrigen Materialien konnte kaum C1-Inhibitor detektiert werden. Die Polypeptid/ Heparin- und die Heparin-Beschichtung präsentierten ebenfalls wieder ein einheitliches Bandenmuster, wobei die Intensität der Banden des Polypeptid/ Heparin-Eluates in diesem Fall die höhere war.

Wie bereits oben angesprochen muss zur Beurteilung der Thrombogenität von Fremdoberflächen das Maß an Aktivierung von Plättchenadhäsion und -aggregation berücksichtigt werden. Zur Beurteilung der Einflüsse des Fremdoberflächenkontaktes auf die Thrombozyten wurden die Thrombozytenzahl, das β-Thromboglobulin und CD41 untersucht.

Ein sehr einfach zu untersuchender, aber aussagekräftiger Parameter ist die absolute Thrombozytenanzahl, die im Normalfall beim Menschen zwischen 150.000 und 400.000/µl Blut liegt. Durch den Kontakt des Blutes mit den Fremdmaterialien im Rahmen der EKZ kommt es einerseits zur Thrombozytenaktivierung und -adhäsion, andererseits wird ein Teil der Thrombozyten auch durch die mechanische Traumatisierung aus dem Blutstrom eliminiert, beide Mechanismen führen zu einer Reduzierung der Thrombozytenzahl bis hin zu einer klinischen relevanten Thrombopenie, die teilweise für die postoperativ auftretenden Blutungskomplikationen verantwortlich zeichnet und unter Umständen eine Thrombozytensubstitution erforderlich macht. Nach 120-minütiger Rezirkulation konnte für die Heparin-haltigen Beschichtungen keine Änderung der Thrombozytenzahl festgestellt werden. Die deutlichste Reduktion

der Thrombozytenzahl wurde in den unbeschichteten Schläuchen aus Silikon festgestellt. In anderen Untersuchungen konnte auch eine starke Aktivierung von Monozyten durch Silikon-Schläuche beobachtet werden (Weber et al., 2001). Dieses Verhalten könnte mit der Oberflächenchemie von Silikon erklärt werden, die nahelegt, dass hydrophobe Polymere wie Silikon zu einer höheren Adsorption von Plasmaproteinen neigen, die Zelladhäsion und Zellaktivierung nach sich ziehen können, was sich mit den bereits angesprochenen beschriebenen (Anderson et al., 1995; Fabrizius Homan und Cooper, 1991; Jenney und Anderson, 2000) und eigenen Beobachtungen deckt. Materialien mit hydrophilen Eigenschaften wird demgegenüber aufgrund ihrer geringeren Adsorption von Plasmaproteinen eine verbesserte Biokompatibilität zugesprochen (Altankov et al., 1996; Desai und Hubbell, 1991; Horbett et al., 1988). Da auf den Silikon-Schläuchen elektronenmikroskopisch keine Zellen nachgewiesen werden konnten, muss davon ausgegangen werden, dass sie im Rahmen der bereits angesprochenen Waschschritte verloren gegangen sind, ein anderer Teil könnte durch die mechanische Alteration entfernt worden sein.

Interessanterweise konnten auf allen sechs Oberflächen adsorbierte CD41-Proteine nachgewiesen werden, obwohl, wie bereits oben genannt, nur auf der Polypeptid- und der Gelatine-Beschichtung elektronenmikroskopisch Zellen gefunden werden konnten. Es ist jedoch denkbar, dass durch die Rezirkulation oder die darauf folgenden intensiven Waschschritte der Schläuche ursprünglich adhärierte Zellen abgewaschen wurden, so dass das weiterhin adhärierte CD41 auf den Oberflächen nachgewiesen werden konnte, während die Thrombozyten im Rahmen des Waschens verloren gegangen sind. Übereinstimmend dazu wurde von Wenger et al. (Wenger et al., 1989) ein signifikanter Verlust an CD41 im Rahmen von Operationen an der Herz-Lungen-Maschine beschrieben. In den vorliegenden Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Eluate der Heparin-haltigen Beschichtungen deutlich weniger CD41 enthielten als die der übrigen vier Materialien, die höchsten Intensitäten zeigten die Banden der Eluate von den Polypeptid- und den Gelatine-Beschichtungen. Die „Hauptbande“, die in unterschiedlichen Intensitäten von allen Fremdoberflächen detektiert werden konnte, lag bei 110-120 kDa, was in etwa der beschriebenen Molekülmasse dieses Proteins entspricht (Calvete et al., 1989). In den Eluaten

der übrigen Materialien, insbesondere denen der Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine konnten CD41-Fragmente niedrigerer Molekülmasse detektiert werden, die sich nur ganz diskret oder gar nicht in den Eluaten der Heparin-haltigen Beschichtungen fanden.

Bei der Bestimmung der β-Thromboglobulin-Konzentrationen waren die Werte, die aus den PVC- und Silikon-Schläuchen und den Polypeptid- und Gelatine-Beschichtungen gemessen werden konnten, deutlich höher als die β-Thromboglobulin-Konzentrationen der Heparin-haltigen Beschichtungen.

Die bei der Untersuchung des Thrombozytenverhaltens gewonnen Ergebnisse lassen sich gut mit den Werten der Fibrinogenadsorption korrelieren, so dass Rückschlüsse auf die Bedeutung der Fibrinogenadsorption bei der Vermittlung der Thrombozytenadhäsion gezogen werden können (Tsai et al., 1999). Dabei ist fraglich, ob nicht vielmehr die Konformation und Ausrichtung der Fibrinogenmoleküle als ihre absolute adsorbierte Menge ausschlaggebend ist (Balasubramanian et al., 2000). Nach ihrer Aktivierung erfahren die Thrombozyten eine Reihe physikalischer, biochemischer und morphologischer Veränderungen, was letztendlich zu einer spezifischen, von der Intensität des Stimulus abhängigen Freisetzung ihrer Granula führt. Mit der Veränderung ihrer Form, kommt es zu einer weiteren Exposition des Glykoprotein-Rezeptor IIb-IIIa-Komplexes und weiterer Fibrinogen-Bindung. Fibrinogen kann als Dimer (Mulzer und Brash, 1990) eine direkte Verbindung zwischen den Thrombozyten herstellen, so dass letztendlich ein Thrombozytenaggregat entsteht. Die Thrombozytenaggregate führen wiederum zu weiteren Aktivierungs- und Freisetzungsmechanismen weiterer Thrombozyten und anderer Blutzellen, so dass ein sich selbst unterhaltender Zyklus angeregt wird, der schließlich in der Bildung eines Thrombozytenthrombus mündet. Gleichzeitig mit diesen zellulären Veränderungen werden inaktive Vorstufen von Gerinnungs- und Komplementfaktoren durch Spaltung von Peptidbrücken in ihre entsprechenden aktiven Formen umgewandelt. Diese klassischen Kaskadenhypothesen für die Aktivierung des Gerinnungs- und Komplementsystems führen zur Bildung des mehrfach erwähnten Membranangriffkomplexes (TCC) und zur Bildung von Fibrin, was wiederum in der Lyse der Zielzelle und der Generierung eines

Thrombus resultiert (Weber et al., 2002).

Neuen Daten von Asea et al. folgend, wurde ein Western Blot zur Detektierung von Hitzeschockprotein 70 (Hsp 70) durchgeführt. Asea et al. konnten zeigen, dass sich Hsp 70 nicht auf der Oberfläche intakter Monozyten findet, aber nachgewiesen werden kann, wenn die Monozyten aktiviert sind (Asea et al., 2000). Zusätzlich zeigten sie, dass exogenes Hsp 70 als Zytokin funktioniert und die Aktivierung von Monozyten induziert. Auf diesen Kenntnissen basierend nahmen wir an, dass Hsp 70 im Plasma nachgewiesen werden kann, wenn es zu einer fremdoberflächenvermittelten Aktivierung von Blutzellen gekommen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Western Blot eine selektive Adsorption von Hsp 70 an die sechs untersuchten Biomaterialien festgestellt werden. In anderen Untersuchungen wurden auch materialabhängige Levels von Hsp 70 im Plasma gefunden (Weber et al., 2003). Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Expression von Hsp 70 mRNA in oberflächen-aktivierten Monozyten nicht mit diesen Hsp 70 Niveaus im Plasma korrelierte, was eine mechanistische Erklärung über den Ursprung des Hsp 70 schwierig macht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhten Hsp 70 Niveaus im Plasma durch andere oberflächen-aktivierte Zelltypen wie Granulozyten und Thrombozyten verursacht sind, die Hsp 70 ins Plasma abgegeben haben. Zuvor wurde ja bereits ausgeführt, dass Granulozyten und Thrombozyten auf die Aktivierung durch Biomaterialien mit einer schnellen Freisetzung von Elastase oder β-Thromboglobulin reagieren können. So ist es durchaus denkbar, dass auch Hitzeschockprotein in diesen Zellen gespeichert wird und nach einer Aktivierung schnell freigesetzt wird. Konkret konnte in der SDS-PAGE auf der Polypeptid- und der Gelatinebeschichtung und den unbeschichteten Materialien PVC und Silikon Hsp 70 detektiert werden, dabei zeigte sich eine Bande bei ca. 80 kDa, die sich je nach Material in ihrer Intensität unterschied und für PVC am stärksten war. In den Eluaten der Heparin-Beschichtungen konnte kein Hsp 70 detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen eine bisher unerkannte Funktion von Hsp 70 als extrazelluläres Protein mit möglichen regulatorischen Einflüssen auf die Hämokompatibilität von künstlichen Oberflächen vermuten.

4.4 Schlussfolgerungen

Die selektive Anlagerung von Plasmaproteinen an Biomaterialien hat eine Einleitung bzw. Reduzierung der weiteren Aktivierung der Blutzellen sowie der Kontaktphasensysteme zur Folge. Das Adsorptionsverhalten bestimmter Plasmaproteine wie beispielsweise Fibrinogen, Fibronektin, C3, HMWK, etc. wird deshalb als Schlüsselmechanismus für die weitere Bluttraumatisierung an Fremdoberflächen betrachtet. Durch die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der Plasmaproteine und die materialabhängigen Unterschiede können Aussagen über die Hämokompatibilität von Biomaterialien gemacht werden. Nach der Auswertung und Diskussion des Adsorptionsverhaltens der verschiedenen Materialien stellen sich die Materialien mit deutlichen Unterschieden bezüglich ihrer Biokompatibilität dar. Als „Positivkontrolle“ mit bekannten Ergebnissen, die für eine gute Biokompatibilität sprechen, wurde die Carmeda Heparin-Beschichtung eingesetzt. Als „Standard“, wurden die PVC-Schläuche gewählt, die wie die Heparin-beschichteten Schläuche häufig im klinischen Alltag verwendet werden und zu denen ebenfalls schon Untersuchungsergebnisse vorliegen. In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte die gute Hämokompatibilität der Carmeda Heparin-Beschichtung bestätigt werden. Eine ähnlich gute Hämokompatibilität kann für die Polypeptid/ Heparin-Beschichtung festgestellt werden. Im direkten Vergleich dieser beiden Materialien ließen sich keine großen Unterschiede bezüglich der Hämokompatibilität feststellen. Beide Beschichtungen legten im Vergleich zu den übrigen vier untersuchten Biomaterialien die beste Hämokompatibilität an den Tag.

Die schlechteste Hämokompatibilität muss für die Silikonschläuche festgestellt werden. In ihrem Adsorptionsverhalten von der Tendenz her den unbeschichteten PVC-Schläuchen ähnlich, war die Aktivierung der Blutzellen und der Kontaktphasensysteme durch die Silikonschläuche aber meist höher als die der PVC-Schläuche. Die Beschichtungen mit Gelatine und Polypeptid zeichneten sich durch ein inhomogenes Adsorptionverhalten aus, das bisweilen eine Zuordnung zu den „guten“ Heparin-haltigen Beschichtungen ermöglichte, meist aber war das Adsorptionsverhalten dem der unbeschichteten Materialien ähnlich. Auf beiden Beschichtungen konnten elektronenmikroskopisch Zellen nachgewiesen

werden. Deshalb und weil ihr Adsorptionsverhalten insgesamt nur teilweise und dann auch nur graduell für eine bessere Hämokompatibilität, bisweilen sogar für eine schlechtere Hämokompatibilität als die der unbeschichteten Materialien sprach, scheint sich kein Vorteil aus ihrer Verwendung zu ergeben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Operative Eingriffe am offenen Herzen und den großen herznahen Gefäßen erfordern häufig die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine zum passageren Ersatz der Pump- und Oxygenierungsfunktionen von Herz und Lunge. Der Einsatz dieser extrakorporalen Zirkulationssysteme ist durch den Kontakt des Blutes mit bis zu 3 m^2 Fremdoberfläche (Oxygenator, Wärmetauscher, Filter, Schlauchsysteme, etc.) mit einer ausgeprägten Bluttraumatisierung assoziiert. Das Gleichgewicht der Hämostase, zu dem das Endothel, die zellulären Bestandteile des Blutes, Gerinnungsfaktoren, Proteine der Fibrinolyse und Faktoren des Komplementsystems beitragen, wird durch die extrakorporalen Zirkulationssysteme massiv beeinträchtigt. Durch die Kontaktaktivierung werden über die verschiedenen Kaskadensysteme humorale und zelluläre Abwehrmechanismen in Gang gesetzt. Es resultiert eine pathophysiologische, dem traumatischen Schock ähnliche Antwort des Organismus, die auch als „Postperfusionssyndrom“ bezeichnet wird. Klinisch können unspezifische inflammatorische Symptome, Blutungskomplikationen oder neurologische Beeinträchtigungen im Vordergrund stehen. Es bestand daher bereits früh das Anliegen, den massiven Eingriff in das Gleichgewicht der Hämostase zu reduzieren. Ein Ansatzpunkt dafür ist die Entwicklung von Materialien, die sich durch eine bessere Hämokompatibilität auszeichnen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Polymerwerkstoffen, die in extrakorporalen Zirkulationssystemen zum Einsatz kommen. Die Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche wird maßgeblich durch ihre Fähigkeit, Zellaktivierungsmechanismen in Gang zu setzen, bestimmt. Diese Zellaktivierungen werden wiederum durch das Adsorptions- und Aktivierungsverhalten von Plasmaproteinen initiiert und determiniert. Zur Beurteilung der Hämokompatibilität in der Herzchirurgie verwendeter Biomaterialien wurden daher in der vorliegenden Arbeit das Adsorptionsverhalten von Plasmaproteinen an Fremdoberflächen und die daraus resultierenden Zellaktivierungen untersucht. Unter Anwendung immunologischer Methoden wurden vergleichende Untersuchungen zu sechs verschiedenen Biomaterialien

vorgenommen. Dabei standen Aktivierungsprozesse, die durch den direkten Kontakt von Humanblut mit Fremdmaterialien induziert werden, im Vordergrund.
Untersucht wurden sechs verschiedene Biomaterialien, die unbeschichteten Schläuche aus PVC und Silikon, eine Beschichtung mit kovalent gebundenem Heparin (CBAS), eine gemischte Beschichtung aus Polypeptid und Heparin und Beschichtungen aus Polypeptid bzw. Gelatine.
Das „Chandler Loop Modell“, ein „Closed Loop Modell“, erwies sich als ideal für die Untersuchungen zur Hämokompatibilität, weil das System eine extrakorporale Zirkulation unter standardisierten Bedingungen simuliert. Ein weiterer Vorteil lag in der Verwendung von Vollblut, so dass alle Feedbackmechanismen wie die Zytokin-Freisetzung und die Freisetzung von Gerinnungsfaktoren und Komplementenzymen aus aktivierten Blutzellen wie Thrombozyten und Leukozyten involviert waren. Außerdem konnten so auch kompetitive Interaktionen zwischen verschiedenen Plasmaproteinen und den Fremdoberflächen berücksichtigt werden. Es handelte sich um Vollblut gesunder nicht rauchender Probanden ohne Dauer- oder das Gerinnungssystem beeinflussende Medikation, das direkt vor der Rezirkulation venös abgenommen wurde.
Mit Hilfe eines neu entwickelten ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) konnten die an der jeweiligen Fremdoberfläche adsorbierten Plasmaproteine direkt im Schlauchstück, das als Reaktionsgefäß verwendet wurde, semiquantitativ bestimmt werden. Aus dem zirkulierten Blut wurden mit Hilfe konventioneller ELISA-Kits die löslichen Aktivierungsmarker bestimmt. In einer weiteren Untersuchung wurden die an den verschiedenen Biomaterialien adsorbierten Plasmaproteine mittels SDS von den Fremdoberflächen abgelöst. Die Eluate wurden dann mittels Western Blotting analysiert.
Es zeigten sich für die verschiedenen Biomaterialien deutliche Unterschiede in ihrem Adsorptionsverhalten für die jeweiligen Plasmaproteine. Für die untersuchten sechs Biomaterialien konnten selektive Adsorptionsmuster festgestellt werden. Dabei erlaubten die Versuche einerseits eine relative Bestimmung der Menge an adsorbiertem Protein. Andererseits konnten auch Aussagen über den zeitlichen Ablauf der Plasmaproteinadsorption gemacht werden. Ergänzend konnten durch die Western Blot-Untersuchungen unter anderem denaturierte Proteine und Spaltprodukte in die Analyse mit einbezogen werden. Die Bestimmung der löslichen

Aktivierungsmarker lieferte Zusatzinformationen über Reaktionsteilnehmer des Gerinnungs- und Komplementsystems und der Thrombozytenaktivierung. Alle Ergebnisse in der Zusammenschau ermöglichten Aussagen über die Hämokompatibilität der verschiedenen Biomaterialien. Die Adsorption von einigen Plasmaproteinen konnte mit einer besseren Hämokompatibilität korreliert werden, dazu gehören HMWK, C1-Esterase Inhibitor und AT III. Überwiegend schlechte Eigenschaften im Zusammenhang mit der Hämokompatibilität müssen für Fibrinogen, Fibronektin, CD41 und C3 gesehen werden. Eine signifikant bessere Hämokompatibilität konnte für die Heparin-haltigen Beschichtungen Carmeda und Polypeptid/ Heparin festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass die selektive Aufnahme und Spaltung bestimmter Plasmaproteine, Enzyme und Kofaktoren des Kontaktsystems und ihre sofortige Inaktivierung durch adsorbierte Inhibitoren für diese gute Hämokompatibilität verantwortlich ist. Demgegenüber muss den unbeschichteten Materialien PCV und Silikon eine deutlich schlechtere Hämokompatibilität zugesprochen werden. Insbesondere die Silikonschläuche zeigten, was für hydrophobe Materialien bekannt ist, eine sehr schnelle und hohe Plasmaproteinadsorption, durch die eine Zelladhäsion, Zellaktivierung und Initiierung der Gerinnungskaskade vermittelt werden. Die Beschichtungen mit Polypeptid und Gelatine waren in ihrem Adsorptionsverhalten inhomogener als die Heparin-haltigen und die unbeschichteten Materialien. Sie adsorbierten allerdings große Mengen an Fibronektin und CD41 und waren die einzigen der untersuchten Materialien, auf denen elektronenmikroskopisch Zellen nachgewiesen werden konnten. Ihre Hämokompatibilität ist sicher als bedeutend schlechter als die der Heparin-haltigen Beschichtungen zu beurteilen. Dabei ist es insgesamt nicht einfach zu beurteilen, wie Unterschiede in der Proteinkonzentration, der Konformation oder anderer Parameter die Thrombogenität beeinflussen und in welchem Maße welcher Parameter von Bedeutung ist. Die Ausführungen machen deutlich, welch komplexes Netzwerk verschiedener Systeme die Hämostase ist. Die zahlreichen Interaktionen der unterschiedlichen Komponenten müssen dabei immer berücksichtigt werden. Die Mechanismen, die die Systeme in einem ständigen dynamischen Gleichgewicht halten, sind nicht trivial und werden teilweise kontrovers diskutiert, einige sind auch noch nicht vollständig entschlüsselt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Adsorption bestimmter Plasmaproteine ein direktes Maß für die Hämokompatibilität von Fremdmaterialien darstellt. Mit Hilfe dieser Daten konnten die untersuchten Biomaterialien in ihrer Biokompatibilität eingeschätzt werden, so dass sich Empfehlungen für den klinischen Einsatz schließen lassen. Zusätzlich ergeben sich weitere Anwendungsmöglichkeiten der in der Arbeit verwendeten Ansätze und Methoden. Andere, neu entwickelte Biomaterialien könnten bereits vor ihrer klinischen Anwendung auf ihre Qualität hin beurteilt werden. Konkret können in ihrem Adsorptionsverhalten bekannte Biomaterialien anhand der genannten Methoden während des Herstellungsprozesses auf ihre Qualität hin untersucht werden und somit auch einer Sicherheitskontrolle unterzogen werden. Ferner lassen sich anhand der Daten Kriterien und Zielvorgaben für die Entwicklung neuer Biomaterialien formulieren. Von Bedeutung werden in diesem Kontext sicher Oberflächen sein, denen es gelingt, physiologische Gegebenheiten zu mimikrieren. Anhand der speziellen Oberflächeneigenschaften soll hierbei den für die Hämokompatibilität essentiellen Systemen des Blutes statt der tatsächlichen Fremdumgebung ein physiologisches Umfeld angeboten werden. Diese Fremdoberflächen würden bei Blutkontakt nicht mehr die kaskadenartigen Fremdkörperreaktionen initiieren, sondern körpereigenes Material adhärieren und so eine körpereigene Sekundäroberfläche bzw. „Neointima“ bilden.

Es wird sich zeigen, inwieweit es einerseits gelingen wird, das hochkomplexe System der Hämostase, das nicht statisch ist, sondern sich in dynamischen Gleichgewichtsreaktionen befindet, zu verstehen und andererseits, inwieweit es gelingen kann, in diesem komplexen Umfeld ein „perfektes“ synthetisches Material herzustellen.

6 LITERATUR

Altankov, G., Grinnell, F., Groth, T. (1996). Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. J Biomed Mater Res *30*, 385-391.

Anderson, J.M. (1993). Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. Cardiovasc Pathol *2*, 33S-41S.

Anderson, J.M., Ziats, N.P., Azeez, A., Brunstedt, M.R., Stack, S., Bonfield, T.L. (1995). Protein adsorption and macrophage activation on polydimethylsiloxane and silicone rubber. J Biomater Sci Polym Ed *7* , 159-169.

Asakura, S., Hurley, R.W., Skorstengaard, K., Ohkubo, I., Mosher, D.F. (1992). Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen. J Cell Biol *116*, 465-476.

Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., Calderwood, S.K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. Nat Med *6*, 435-442.

Bachmann, F (1987). Fibrinolysis, 227-265. In: Verstraete, M., Vermylen M., Lijnen R., Arnout J., eds.: Thrombosis and haemostasis. Leuven University Press, Leuven.

Bachmann, F., Mc Kenna, R., Cole, E.R., Hajafi, H. (1975). The hemostatic mechanism after open-heart-surgery. J Thorac Cardiovasc Surg *70*, 76-84.

Balasubramanian, V., Grusin, N.K., Bucher, R.W., Turitto, V.T., Slack, S.M. (2000). Residence-time dependent changes in fibrinogen adsorbed to polymeric biomaterials. J Biomed Mater Res *44*, 253-260.

Bauer, C. (1996), Blut: Ein flüssiges Organsystem,185-212. In: Klinke, R., Silbernagl, S., eds.: Lehrbuch der Physiologie; 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Bazzoni, G., Dejana, E., Del Maschio, A. (1992). Platelet-dependent modulation of neutrophil function. Pharmacol Res *26*, 269-272.

Bick, R.L., Schmalhorst, W.R., Arbegast, N.R. (1976). Alterations of hemostasis associated with cardiopulmonary bypass. Thromb Res *8*, 285-292.

Binnema, D.J., Dooijeward, G., Turion, P.N. (1991). An analysis of the activators of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) in the dextran sulphate euglobulin fraction of normal plasma and of plasmas deficient in factor

XII and prekallikrein. Thromb Haemost *65*, 144-148.

Bittl, J.A. (1996). Coronary stent occlusion: thrombus horribilis. J Am Coll Cardiol *28*, 368-370.

Bloom, A. L., Forbes, C. D., Thomas, D. P., Tuddenham, E. G. D., eds. (1994). Haemostasis and Thrombosis. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Boldt, J., Zickmann, B., Ballesteros, M., Scholz, D., Dapper, F., Hempelmann, G. (1991). Does the preparation of heparin influence anticoagulation during cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth. *5*, 449-453.

Bouma, B.N., Miles, L.A., Berretta, G. (1980). Human plasma prekallikrein. Studies of its activation by activated factor XII and of its inactivation by diisopropyl phosphofluoridate. Biochemistry *19*, 1151-1160.

Bozdayi, M., Borowiec, J., Nilsson, L., Venge, P., Thelin, S., Hansson, H.-E. (1996). Effects of heparin coating of cardiopulmonary bypass circuits on in vitro oxygen free radical production during coronary bypass surgery. Artif Organs *20*, 1008-1016.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, *72*, 248-254.

Brash, J.L., ten Hove, P. (1989). Transient adsorption of fibrinogen on foreign surfaces: simolar behavior in plasma and whole blood. J Biomed Mater Res *23*, 157-169.

Calvete, J.J., Henschen, A., Gonzalez Rodriguez, J. (1989). Complete localization of the intrachain disulfide bonds and the N-glycosylation points in the alpha-subunit of human platelet glycoprotein IIb. Biochem J *261*, 561-568.

Cameron, D.E. (1996). Initiation of white cell activation during cardiopulmonary bypass: cytokines and receptors. J Cardiovasc Pharmacol *27*, S1-S5.

Chandler, A.B. (1958). In vitro thrombotic coagulation of blood: a method for producing a thrombus. Lab Invest *7*, 116.

Christol, J.P., Canaud, B., Rabesandratana, H., Gaillard, I., Serre, A., Mion, C. (1994). Enhancement of reactive oxygen species production and cell surface markers due to hemodialysis. Nephrol Dial Transplant *9*, 389-394.

Colman, R. W., Scott, C. F., Schmaier, A. H., Wachtfogel, Y. T., Pixley, R. A., Edmunds Jr., L. H. Initiation of blood coagulation at artificial surfaces. Leonard, E. F. Turrito V. T. Vroman L. 253-267. 1987. Ann NY Acad Sci
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Cornelius, R.M., Brash, J.L. (1993). Identification of proteins adsorbed to

hemodialyser membranes from heparinized plasma. J Biomater Sci Polym Ed *4*, 291-304.

Cornelius, R.M., Brash, J.L. (1997). Effect of single-chain and two-chain high molecular weight kininogen on adsorption of fibrinogen from binary mixtures to glass and sulfonated polyurethane surfaces. J Biomed Mater Res *37*, 314-323.

Dahlbäck, B. (1995). New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. Thromb Haemost *74*, 139-148.

Deklerk, J., Benzer, H., Haider, W., Pauser, G., Stellwag, F. (1977). Beeinflussung des Kininogen-Kinin-Systems durch einen Kallikreinhemmer bei Operationen am offenen Herzen in extrakorporaler Zirkulation. Anaesthesist *26*, 639-643.

Del Maschio, A., Corvazier, E., Maillet, F., Kazatchkine, M.D., Maclouf, J. (1989). Platelet dependent induction and amplification of polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release. Br J Haematol *72*, 329-335.

Del Maschio, A., Dejana, E., Bazzoni, G. (1993). Bidirectional modulation of platelet and polymorphonuclear leukocyte activities. Ann Hematol *67*, 23-31.

Desai, N.P., Hubbell, J.A. (1991). Solution technique to incorporate polyethylene oxide and other water-soluble polymers into surfaces of polymeric biomaterials. Biomaterials *12*, 144-152.

Didisheim, D., Watson, J. (1989). Thromboembolic complications of cardiovascular devices and artificial surfaces, 275-296. In: Kwaan, H., Samama M. Y., eds.: Clinical Thrombosis; CRC, Boca Raton.

Edmunds Jr., L.H. (1996). Is prosthetic valve thrombogenicity related to design or material? Tex Heart Inst J *23*, 24-27.

El Habbal, M.H., Carter, H., Smith, L., Elliot, M.J., Strobel, M.S. (1995). Neutrophil activation in pediatric extracorporeal circuits: effect of circulation and temperature variation. Cardiovasc Res *29*, 102-107.

Fabrizius Homan, D.J., Cooper, S.L. (1991). A comparison of the adsorption of three adhesive proteins to biomaterial surfaces. J Biomater Sci Polym Ed *3*, 27-47.

Fitch, J.C., Rollins, S., Matis, L., Alford, B., Aranki, S., Collard, C.D., Dewar, M., Elefteriades, J., Hines, R., Kopf, G., Kraker, P., Li, L., O'Hara, R., Rinder, C., Rinder, H., Shaw, R., Smith, B., Stahl, G., Shernan, S.K. (1999). Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. Circulation *100*, 2499-2506.

Forbes, C. D., Courtney, J. M. (1994). Thrombosis and artificial surfaces, 1301-1324. In: Bloom, A. L., Forbes C. D., Thomas D. P., Tuddenham E. G. D., eds.: Hemostasis and Thrombosis; Churchill Livingstone, Edinburgh.

Fosse, E., Moen, O., Johnson, E., Semb, G., Brockmeier, V., Mollnes, T.E., Fagerhol, M.K., Venge, P. (1994). Reduced complement and granulocyte activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg *58*, 472-477.

Fouw de, N.J., Hinsbergh van, V.W.M., Jong de, Y.F., Haverkate, F., Bertina, R.M. (1987). The interaction of activated protein C and thrombin with the plasminogen activator inhibitor released from human endothelial cells. Thromb Haemost *57*, 176-182.

Fuhrer, G., Gallimore, M.J., Heller, W., Hoffmeister, H.E. (1990). F XII (Review). Blut *61*, 258-266.

Furie, B., Furie, B.C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. Cell *53*, 505-518.

Gans, H., Castaneda, A.R., Subramanian, V., John, S., Lillehei, C.W. (1967). Problems in hemostasis during open heart surgery: IX. Changes observed in the plasminogen-plasmin system and their significance for therapy. Ann Surg *160*, 980 ff.

Geiser, T., Sturzenegger, M., Genewein, U., Haeberli, A., Beer, J.H. (1998). Mechanisms of cerebrovascular events as assessed by procoagulant activity, cerebral emboli and platelet microparticles in patients with prosthetic heart valves. Stroke *29*, 1770-1777.

Gemell, C.H. (2001). Activation of platelets by in vitro whole blood contact with materials: increases in microparticle, procoagulant activity, and soluble P-selectin blood levels. J Biomater Sci Polym Ed *12*, 933-943.

Gemmell, C.H. (1997). A flow cytometric immunoassay to quantify adsorption of complement activation products (iC3b, C3d, CS5b-9) on artificial surfaces. J Biomed Mater Res *37*, 474-480.

Gibbon, J.H.Jr. (1954). Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. Minn Med *37*, 171-185.

Gibbon, J.H.Jr. (1959). Maintenance of cardiorespiratory functions by extracorporeal circulation. Circulation *19*, 646-656.

Gluszko, P., Rucinski, B., Musial, J., Wenger, R.K., Schmaier, A.H., Colman, R.W., Edmunds Jr., L.H., Niewiarowski, S. (1987). Fibrinogen receptors in platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuit. Am J Physiol.

Gorbet, M.B., Sefton, M.V. (2004). Biomaterial-associated thrombosis: roles

of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes (Review). Biomaterials *25*, 5681-5703.

Gott, V.L., Whiffen, J.D., Dutton, R.C. (1963). Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. Science *142*, 1297-1298.

Griffin, J.H. (1978). The role of surface-dependent activation of Hageman factor (factor XII). Proc Natl Acad Sci USA *75*, 2002.

Grode, G.A., Anderson, S.J., Grotta, H.M., Falb, R.D. (1969). Nonthrombogenic materials via a simple coating process. Trans Am Soc Artif Intern Organs *15*, 1-6.

Grunkemeier, J.M., Tsai, W.B., McFarland, C.D., Horbett, T.A. (2000). The effect of adsorbed fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and vitronectin on the procoagulant state of adhered platelets. Biomaterials *21*, 2243-2252.

Hamsten, A. (1993). The hemostatic system and coronary heart disease. Thromb Res *70*, 1-38.

Hanson, S.R. (1993). Device thrombosis and thromboembolism. Cardiovasc Pathol *2*, 157S-165S.

Heimburger, N. (1994). Entzündungsreaktionen und Hämostase. Haemostaseologie *14*, 1-6.

Hill, G.E. (1998). Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? J Cardiothorac Vasc Anesth *12*, 21-25.

Hinsbergh van, V.W.M., Bertina, R.M., Wijngaarden, A., Tilburg van, N.H., Emeis, J.J., Haverkate, F. (1985). Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. Blood *65*, 444-451.

Hirsh, J. (1991). Oral anticoagulant drugs. N Engl J Med *324*, 1865-1875.

Hoffmeister, H.E., Schorer, R., Stunkat, R. (1975). Klinische Verwendung von Membran-Oxygenatoren für länger dauernde extrakorporale Zirkulation. Thoraxchirurgie *23*, 49-57.

Hogevold, H.E., Moen, O., Fosse, E., Venge, P., Braten, J., Andersson, C. (1997). Effects of heparin coating on the expression of CD11b, CD11c and Cd62L by leucocytes in extracorporeal circulation in vitro. Perfusion *12*, 9-20.

Horbett, T.A., Waldburger, J.J., Ratner, B.D., Hoffman, A.S. (1988). Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. J Biomed Mater Res *22*, 383-404.

Inque, T., Sakai, Y., Morooka, S., Hayashi, T., Takayanagi, K., Takabatake, Y.

(1996). Expression of polymorphonuclear adhesion molecules and its clinical significance inpatients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol *28*, 1127-1133.

Ito, Y., Sisido, M., Imanishi, Y. (1990). Adsorption of plasma proteins and adhesion of platelets onto novel polyurethaneureas - relationship betwen denaturation of adsorbed proteins and platelet adhesion. J Biomed Mater Res *24*, 227-242.

Jenney, C.R., Anderson, J.M. (2000). Adsorbed serum proteins responsibel for surface dependent human macrophage behaviour. J Biomed Mater Res *49*, 435-447.

Jobes, D.R. (1998). Safety issues in heparine and protamine administration for extracorporeal circulation. J Cardiothorac Vasc Anesth *12*, 17-20.

Kamar, P., Irrgang, E. (2004). Cardiac surgery in Germany during 2003: a report by the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. Thorac Cardiovasc Surg *52*, 312-317.

Kao, W.J. (2000). Evaluation of leukocyte adhesion on polyurethanes: the effects of shear stress and blood proteins. Biomaterials *21*, 2295-2303.

Kao, W.J., Sapatnekar,S., Hiltner,A., Anderson,J.M. (1996). Complement-mediated leukocyte adhesion on poly(etherurethane ureas) under shear stress in vitro. J Biomed Mater Res *32*, 99-109.

Kazatchkine, M.D., Carreno, M.-P. (1988). Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces. Biomaterials *9*, 30-35.

Khan, M.M.H., Kunapuli, S.P., Lin, Y.Z., MajlufCruz, A., DeLaCadena, R.A., Cooper, S.L., Colman, R.W. (1998). Three noncontiguous peptides comprise bonding sites on high-molecular-weight kininogen to neutrophils. Am J Phys Heart Circ Phys *44*, H145-H150.

Kirklin, J.K., Westaby, S., Blackstone, E., , K.J.W., Chenoweth, D., Pacifico, A. (1983). Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg *86*, 845-857.

Koh, S.C.L., Viegas, O.A.C., Chua, S.E., Ng, B.L., Sen, D.K., Ratnam, S.S. (1991). Plasminogen activators t-PA, u-PA and its inhibitor (PAI) in normal males and females. Thromb Haemost *66*, 581-585.

Kondo, N., Wakayama, F., Suzuki, Y., Fukui, K., Takaya, S., Fukuda, I. (2004). The state of platelets preserved in extracorporeal circulation with a glycprotein IIb/IIIa inhibitor. Thromb Res *113*, 303-310.

Korn, R.L., Fisher, C.A., Livingston, E.R., Stenach, N., Fishman, S.J.,

Jeevanadam, V., Addonizio, V.P. (1996). The effects of Carmeda Bioactive Surface on human blood components during simulated extracorporeal circulation. J Thorac Cardiovasc Surg *111*, 1073-1084.

Kruithof, E.K. (1988). Plasminogen activator inhibitors - a review. Enzyme *40*, 113-121.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lagergren, H.R., Erikson, J.C. (1971). Plastics with a stable surface monolayer of cross-linked heparin: preparation and evaluation. Trans Am Soc Artif Int ern Organs *17*, 10-12.

Lange, R. (2001). Herzchirurgie, 359-425. In: Siewert, J., ed.: Chirurgie; 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Larm, O., Larsson, R., Olsson, P. (1983). A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. Biomater Med Devices Artif Organs *11*, 161-173.

Lawson, J.H., Kalafatis, M., Stram, S., Mann, K.G. (1994). A model for the tissue factor pathway to thrombin. An empirical study. J Biol Chem *269*, 23357-23366.

Litwak, R.S. (2003). Historical vignettes concerning cardiopulmonry bypass without homologous blood and perfusion hypothermia. Perfusion *18*, 201-206.

Mammen, E.F. (1968). Natural proteinase inhibitors in extracorporeal circulation. Ann NY Acad Sci *146*, 754.

Martin, J.F., Daniel, T.D., Trowbridge, E.A. (1987). Acute and chronic changes in platelet volume and count after cardiopulmonary bypass induced thrombocytopenia in man. Thromb Haemost *57*, 55-58.

Mc Intire, L.V., Dewitz, T.W., Martin, R.R. (1976). Mechanical trauma effects on leukocytes. Trans Am Soc Artif Intern Organs *22*, 444-449.

McNally, A.K., Anderson, J.M. (1994). Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces. Proc Natl Acad Sci USA *91*, 10119-10123.

Miller, B.E., Levy, J.H. (1997). The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth *11*, 355-366.

Moen, O., Fosse, E., Dregelid, E., Brockmeier, V., Andersson, C., Hogasen, K., Venge, P., Mollnes, T.E., Kierulf, P. (1996). Centrifugal pump and heparin coating improves cariopulmonary bypass biocompatibility. Ann Thorac Surg *62*, 1134-1140.

Moriau, M., Masure, R., Hurlet, A., Dekeys, C., Chalant, C., Ponlet, R., Iaumain,

P., Suraze-Kestens, Y., Ravaux, A., Goener, M. (1977). Haemostasis disorders in open heart surgery with extracorporeal circulation. Vox Sang *32*, 41 ff.

Mulzer, S.R., Brash, J.L. (1990). Analysis of proteins adsorbed to glss from human plasma using immunoblotting methods. J Biomater Sci Polym Ed *1*, 173-182.

Murkin, J.M. (1997). Cardiopulmonary bypass and the inflammatory response; a role for serine protease inhibitor. J Cardiothorac Vasc Anesth *11*, 19-23.

Müller, E. (1991). Adult respiratory distress syndrome (ARDS): Activation of complement, coagulation and fibrinolytic systems. Biomedical Progress *4*, 3-6.

Nemerson, Y., Bach, R. (1982). Tissue factor revisited. Prog Hemost Thromb *6*, 237-261.

Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Puchner, G., Schömig, A. (1996). Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. J Am Coll Cardiol *27*, 819-824.

Nuttall, G.A., Erchul, D.T., Haight, T.J., Ringhofer, S.N., Miller, T.L., Oliver Jr.,W.C., Zehr,K.J., Schroeder,D.R. (2003). A comparison of bleeding and transfusion in patients who undergo coronary artery bypass grafting via sternotomy with and without cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth *17*, 447-451.

Ohshiro, T., Kosaki, G. (1980). Urokinase immobilized on medical polymeric materials: fundamental and clinical studies. Artif Organs *4*, 58-64.

Osterud, B. (1984). Activation pathways of the coagulation system in normal haemostasis. Scand J Haematol *32*, 337-345.

Osterud, B. (1990). Factor VII and hemostasis. Bood Coagul Fibrinolysis *1990*, 175-181.

Paques, E.P., Heimburger, N. (1986). Das fibrinolytische System. Haemostaseologie *6*, 139-147.

Perry, D.J. (1994). Antithrombin and its inherited deficiencies. Blood Rev *8*, 37-55.

Phaneuf, M.D., Bide, M.J., Quist, W.C., LoGerfo, F.W., Berceli, S. (1997). Covalent linkage of recombinant hirudin to poly(ethylene terephthalate) (Dacron): creation of a novel antithrombin surface. Biomaterials *18*, 755-765.

Radcliffe, R., Bagdasarian, A., Colman, R.W., Nemerson, Y. (1977). Activation of F VII by Hageman factor fragments. Blood *59* , 611-617.

Rao, A.K., Sun, L., Gorman, J.H., Edmunds Jr., L.H. (1999). GPIIb/IIIa receptor

antagonist Tirofiban inhibits thrombin generation during cardiopulmonary bypass in baboons. Thromb Haemost *82*, 140-144.

Ratner, B.D. (1993). The blood compatibility catastrophe. J Biomed Mater Res *27*, 283-287.

Ratner, B.D., Bryant, S.J. (2004). Biomaterials: where we have been and where we are going. Annu Rev Biomed Eng *6*, 41-75.

Reddigari, S., Kaplan, A.P. (1988). Cleavage of human high-molecular weight kininogen by purified kallikreins and upon contact activation of plasma. Blood *71*, 1334-1340.

Remes, R., Williams, D.F. (1992). Immune response in biocompatibility. Biomaterials *13*, 731-743.

Revak, S.D., Cochrane, C.G. (1976). Hageman factor: its structure and models of activation. Thromb Haemost *35*, 570-575.

Revak, S.D., Cochrane, C.G., Bouma, B.N., Griffin, J.H. (1978). Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. J Exp Med *147*, 719-729.

Rinder, C., Fitch, J. (1996). Amplification of the inflammatory response: adhesion molecules associated with platelet/white cell responses. J Cardiovasc Pharmacol *27 (Suppl. 1)*, S6-S12.

Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A., Smith, B.R. (1991). Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. Blood *78*, 1730-1737.

Rinder, H.M., Tracey, J.L., Rinder, C.S., Leitenberg, D., Smith, B.R. (1994). Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. Thromb Haemost *72*, 750-756.

Rousseau, Y., Carreno, M.-P., Poignet, J.-L., Kazatchkine, M.D., Haeffner-Cavaillon, N. (1999). Dissociation between complement activation, integrin expression and neutropenia during hemodialysis. Biomaterials *20*, 1959-1967.

Sakata, Y., Curriden, S., Lawrence, D., Griffin, J.H., Loskutoff, D.J. (1985). Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. Proc Natl Acad Sci USA *82*, 1121-1125.

Salzmann, E., Merri, E., Kent, K. Interaction of blood with artificial surfaces. Bloom, A. L. Thomas D. P. Tuddenham E. G. D. 1469-1485. 1994. Edinburgh, Churchill Livingstone. Haemostasis and Thrombosis.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Santerre, J.P., ten Hove, P., Brash, J.L. (1992). Polyurethanes bearing pendant amino acids: Fibrinogen adsorption and coagulant properties. J Biomed Mater

Res *26*, 1003-1018.

Schapira, M., DeAgostini, A., Colman, R.W. (1988). C 1 inhibitor: The predominant inhibitor of plasma kallikrein. Methods Enzymol *163*, 179-185.

Schmaier, A.H. (1997). Contact activation: a revision. Thromb Haemost *77*, 101-107.

Scott, C.F., Carell, R.W., Glaser, C.B., Kueppers, F., Lewis, J.H., Colman, R.W. (1986). Alpha-1-antitrypsin-Pittsburg. A potent inhibitor of human F XIa; kallikrein and factor XIIf. J Clin Invest *77*, 631-634.

Scott, C.F., Silver, L.D., Purdon, A.D., Colman, R.W. (1985). Cleavage of human high molecular weight kininogen by factor XIa in vitro. J Biol Chem *260*, 10856-10863.

Sefton, M.V., Gemmell, C.H., Gorbet, M.B. (2000). What really is blood compatibility? J Biomater Sci Polym Ed *11*, 1165-1182.

Sekiguchi, K., Hakomori, S. (1983). Domain structure of human plasma fibronectin. Differences and similarities between human and hamster fibronectins. J Biol Chem *258*, 3967-3973.

Shigemitsu, O., Hadama, T., Takasaki, H., Mori, Y., Kimura, T., Miyamoto, S., Sako, H., Soeda, T., Kawawaki, Y., Uchida, Y. (1994). Biocompatibility of a heparin-bonded membrane oxygenator (Carmeda MAXIMA) during the first 90 minutes of cardiopulmonary bypass: clinical comparison with the conventional system. Artif Organs *18*, 936-941.

Silbernagl, S., Lang, F. (1998). Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Sim,E., Wood,A.B., Hsiung,L.M., Sim,R.B. (1981). Pattern of degradation of human complement fragment, C3b. FEBS Lett *132* , 55-60.

Spaethe, R., Kolde, H. J. (1992). Hämostase Teil A. Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim.

Stanford, M.F., Munoz, P.C., Vroman, L. (1983). Platelets adhere where flow has left fibrinogen on glass. Ann NY Acad Sci *416*, 504-512.

Svenmarker, S., Sandström, E., Karlsson, T., Jansson, E., Häggmark, S., Lindholm, R., Appelblad, M., Aberg, T. (1997). Clinical effects of the heparin coated surface in cardiopulmonary bypass. Eur J Cardiothorac Surgery *11*, 957-964.

Tabata, S., Yamaguchi, S., Nagamine, H., Tomita, S., Arai, S., Takemura, H., Watanabe, G. (2004). Efficacy of FK 633, an ultra-short acting glycoprotein IIb/IIIa antagonist on platelet preservation during and after cardiopulmonary bypass. Eur J Cardiothorac Surg *26*, 289-293.

Tang, L., Eaton, J.W. (1993). Fibrinogen mediates acute inflammatory responses to biomaterials. J Exp Med *178*, 2147-2156.

Tang, L., Lucas, A.H., Eaton, J.W. (1993). Inflammatory responses to implanted polymeric biomaterials: role of surface adsorbed immunoglobin G. J Lab Clin Med *122*, 292-300.

Tennenberg, S.D., Clardy, C.W., Bailey, W.W., Solomkin, J.S. (1990). Complement activation and lung permeability during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg *50*, 597-601.

Tsai, W.B., Grunkemeier, J.M., Horbett, T.A. (1999). Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene. J Biomed Mater Res *44*, 130-139.

Turrito, V.T., Hall, C.L. (1998). Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. Thromb Res *92*, S25-S31.

Tzoneva, R., Heuchel, M., Groth, T., Altankov, G., Albrecht, W., Paul, D. (2002). Fibrinogen adsorption and platelet interactions on polymer membranes. J Biomater Sci Polym Ed *13*, 1033-1050.

Videm, V., Svennevig, J.L., Fosse, E., Semg, G., Osterud, A., Mollnes, T.E., Nielsen, H. (1992). Reduced complement activation with heparin-coated oxygenator and tubings in coronary bypass operations. J Thorac Cardiovasc Surg *102*, 806-813.

Vogt, W. (1982). Aktivierung und biologische Wirkung des Komplementsystems. Funkt Biol Med *1*, 189-198.

Von Appen, K., Goolsby, C., Mehl, P., Goewert, R., Ivanovich, P. (1994). Leukocyte adhesion molecule as biocompatibility markers for hemodialysis membranes. ASAIO J *40*, M609-M615.

von der Emde, J., Cesnjevar, R. (1999). Herz und herznahe Gefäße, 453-491. In: Koslowski, L., Bushe, K.-A., Junginger, Th., Schwemmle, K., eds.: Die Chirurgie; 4. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York.

Vroman, L. (1983). Possible relationships and intractions among events in clotting, platelet adhesion, immune surface reactions and granulocyte adhesion. J Theor Biol *105*, 541-543.

Vroman, L. (1987). The Importance of surfaces in contact phase reactions. Semin Thromb Hemostasis *13*, 79-85.

Vroman, L. (1988). The life of an artificial device in contact with blood: initial events and their effect on its final state. Bull N Y Acad Med *64*, 352-357.

Wachtfogel, Y.T., DeLaCadena, R., Colman, R.W. (1993). Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. Thromb Res *72*, 1-21.

Wagner, W.R., Johnson, P.C., Thompson, K.A., Marrone, G.C. (1994). Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: hemostatic alterations and postoperative blood loss. Ann Thorac Surg *58*, 734-740.

Wan, S., LeClerc, J.L., Vincent, J.L. (1997). Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. Chest *112*, 676-692.

Ward, P.A., Till, G.O., Hatherill, J.R., Annesley, T.M., Kunkel, R.G. (1985). Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation. J Clin Invest *76*, 517-527.

Weber, N., Caliebe, J., Wendel, H.P., Ziemer, G. (2003). Material-dependent levels of heat-shock protein 70 (hsp 70) in human plasma following contact of blood with artificial surfaces. J Biomater Sci Polym Ed *14*, 747-760.

Weber, N., Wendel, H. P., Ziemer, G. (2001). Gene monitoring of surface-activated monocytes in circulating whole blood using Duplex RT-PCR. J Biomed Mater Res *56*, 1-8.

Weber, N., Wendel, H.P., Ziemer, G. (2000). Quality assessment of heparin-coatings by their binding capacities of coagulation and complement enzymes. J Biomater Appl *15*, 8-22.

Weber, N., Wendel, H.P., Ziemer, G. (2002). Hemocompatibility of heparin-coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption. Biomaterials *23*, 429-439.

Weerasinghe, A., Taylor, K.M. (1998). The platelet in cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg *66*, 2145-2152.

Wendel, H.P., Hauser, N., Ziemer, G. (2002). Hemocompatibility of medical connectors with biopassive or bioactive surface coatings. J Biomater Appl *17*, 5-17.

Wendel, H.P., Heller, W., Gallimore, M.J., Hoffmeister, H.E. (1994). Heparin-coated oxygenators significantly reduce contact system activation in an ex-vivo cardiopulmonary bypass model. Bood Coagul Fibrinolysis *5*, 673-678.

Wendel, H.P., Weber, N., Ziemer, G. (1999). Increased adsorption of high-molecular weight kininogen to heparin-coated artificial surfaces and correlation to hemocompatibility. Immunopharmacology *43*, 149-153.

Wendel, H.P., Ziemer, G. (1999). Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial surfaces. Eur J Cardiothorac Surgery *16*, 342-350.

Wenger, R.K., Lukasiewicz, H., Mikuta, B.S., Niewiarowski, S., Edmunds, L.H. (1989). Loss of platelet fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg *97*, 235-239.

Yianni, Y. P. (1992). Biocompatible surfaces based upon biomembrane mimicry, 187-216. In: Quinn, P. J., Cherry R. J., eds.: Structural and dynamic properties of lipids and membranes; Portland Press Ltd., London.

Yun, K.L., Burdon, T.A. (1998). Acquired Disease of the Heart, 466-492. In: Niederhuber, J.E., ed.: Fundamentals of Surgery; First Edition, Appleton & Lange, Stanford, Connecticut.

Yung, L.Y.L., Lim, F., Khan, M.M.H., Kunapuli, S.P., Rick, L., Colman, R.W., Cooper, S.L. (1996). Neutrophil adhesion on surfaces preadsorbed with high molecular weight kininogen under well-defined flow conditions. Immunopharmacology *32*, 19-23.

Yung, L.Y.L., Lim, F., Khan, M.M.H. Kunapuli, S.P., Rick, L., Colman, R.W., Cooper, S.L. (2000). High-molecular-weight kininogen preadsorbed to glass surface markedly reduces neutrophil adhesion. Biomaterials *21*, 405-414.

DANKSAGUNG:

Bedanken möchte ich mich als erstes bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Ziemer für die Möglichkeit, in seinem klinischen Forschungslabor arbeiten zu können.
Für die interessante und spannende Tätigkeit im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. H.P. Wendel bedanken, der mir das Thema vorschlug und sowohl die praktische wie auch die theoretische Arbeit betreute. Die hervorragende Unterstützung und Hilfsbereitschaft und die Tatsache, stets einen Ansprechpartner zu haben und jederzeit Fragen stellen zu können, habe ich als außerordentlich hilfreich und nicht selbstverständlich empfunden.
Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Norbert Weber, der mich nicht nur in die Methoden einwies, sondern als Biologe auch über den medizinischen Standpunkt hinaus meinen Blickwinkel für naturwissenschaftliche Fragestellungen schärfte – bis hin zum Erlernen von Vogelstimmen auf dem Weg zum Mittagessen. Seine Faszination für diese Forschungsrichtung, seine Ideen und die Freude an diesem Thema waren ansteckend und von seiner Didaktik, ruhigen Art und seinem Humor habe ich sehr profitiert.
Zu der sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre haben insbesondere auch das Interesse und die Hilfsbereitschaft der weiteren Mitarbeiter des THG-Labors beigetragen. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Doris Armbruster, Frau Michaela Braun, Frau Ingrid Schulz und Herrn Bernd Neumann für ihre Hilfe und Unterstützung. Doris Armbruster danke ich insbesondere für die routinemäßigen Messungen der löslichen Aktivierungmarker.
Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitdoktoranden/innen, die in den Pausen für Abwechslung sorgten und interessante Gespräche und Austausch ermöglichten.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Tina Herberts vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Auswertung der Daten der löslichen Aktivierungsmarker.

Ein herzlicher Dank geht an alle Blutspender/innen für ihren aufopfernden Einsatz für die Wissenschaft, ganz besonders an Christian Gille, Daniel Dürr und Florian Urlichs, die zu fast jeder Tageszeit angeradelt kamen. Christian Gille und Daniel Dürr danke ich auch für ihre große Unterstützung in computertechnischen Fragen und ihre Freundschaft seit unserem ersten Semester.

Für die große computertechnische Unterstützung bei der endgültigen Formgebung der Arbeit gebührt Matthias Knecht und meinem Bruder Vincent ganz besonderer Dank.

Für die Unterstützung in vielerlei Hinsicht danke ich besonders meinen Eltern.
Zum Abschluss bedanke ich mich bei allen meinen Freunden, besonders Ute Braig, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben und mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENSLAUF:

Name:	Janina Caliebe
Geboren:	01.03.1976 in Gaildorf
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1982 – 1986	Grundschule im Aischbach, Tübingen
1986 – 1995	Uhland-Gymnasium, Tübingen
Juni 1995	Abitur

Studium:

Oktober 1995	Beginn des Medizinstudiums, Universität Tübingen
1997	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
1998	Erster Abschnitt des Staatsexamens
2002	Zweiter Abschnitt des Staatsexamens
10/2001 – 09/2002	Praktisches Jahr
12.11.2002	Dritter Abschnitt des Staatsexamens

Beruflicher Werdegang:

01/2003 – 06/2004	Ärztin im Praktikum, Universitäts-Kinderklinik Tübingen
01/2003 – 12/2003	Abteilung Kinderkardiologie, Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Hofbeck
01/2004 – 06/2004	Abteilung Neonatologie, Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Poets
Seit 08/2004	Assistenzärztin, Universitäts-Kinderklinik Tübingen Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie, Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Niethammer Sektion Pädiatrische Endokrinologie, Leiter: Prof. Dr. Ranke