

Aus der
Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Tübingen

**Etablierung einer quantitativen Echtzeit-PCR-basierten
Methode zur Detektion inflammatorischer Reaktionen
während der Hämokompatibilitätsprüfung verschiedener
Testmaterialien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Braun, Julia Maria

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatterin: Professorin Dr. S. Krajewski

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Peter

Tag der Disputation: 10.12.2024

Widmung

*„Zwei Dinge sollten Kinder von ihren Eltern bekommen: Wurzeln und Flügel.“
(Johann Wolfgang von Goethe)*

Für meine Familie in großer Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Biomaterialien und blutkontaktierende Werkstoffe	2
1.1.1 Metalle und Metalllegierungen	3
1.1.2 Polymere	3
1.1.3 Bioaktive Beschichtungen.....	4
1.2 Biologische Wechselwirkungen blutkontaktierender Materialien	5
1.3 Blutkontakt und Hämokompatibilität.....	6
1.3.1 Zellen des peripheren Blutes und Plasmamarker	7
1.3.2 Blutstillung und Blutgerinnung.....	8
1.3.3 Komplementsystem.....	10
1.4 Immunaktivierung	11
1.4.1 Zytokine	12
1.4.2 Zelladhäsionsmoleküle.....	19
1.5 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Vorbereitung der Monovetten zur Blutentnahme	28
2.2.2 Auswahl der Spender für die Blutentnahme	28
2.2.3 Hämokompatibilitätsprüfung verschiedener Testmaterialien	29
2.2.3.1 Durchführung der Hämokompatibilitätsversuche	31
2.2.3.2 Enzymimmunoassay	34
2.2.4 Isolierung der mRNA aus humanem Vollblut	35
2.2.5 Versuche mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	35
2.2.5.1 Isolierung der PBMC aus dem Vollblut.....	36
2.2.5.2 Isolierung der mRNA aus den PBMCs	38
2.2.6 Synthese der cDNA aus mRNA	39
2.2.7 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion	39
2.2.8 Auswertung der RT-qPCR-Fluoreszenzdaten.....	41

2.2.9 Statistische Datenauswertung.....	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Hämkompatibilitätsprüfung der blutkontaktierenden Testmaterialien	43
3.1.1 Zellzahlen und -populationen.....	44
3.1.2 Plasmatische Aktivierungsmarker.....	47
3.2 Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials der Testmaterialien im Blut	51
3.3 Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials der Testmaterialien in den PBMCs	56
3.4 Vergleich des Immunaktivierungspotenzials von blutkontaktierenden Materialien in den Zellen des Bluts und in den PBMCs	62
4 Diskussion	70
4.1 Inkubationsmodelle für Blutzellen und PBMCs	70
4.2 Analyse der Hämkompatibilität	71
4.2.1 Versuchsdurchführung und Limitationen des Testprotokolls	71
4.2.2 Erythrozytenparameter	73
4.2.3 Leukozytenaktivierung.....	74
4.2.4 Thrombozytenaktivierung	75
4.2.5 Aktivierung der Blutgerinnung	76
4.2.6 Aktivierung des Komplementsystems.....	77
4.3 Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials blutkontaktierender Materialien	78
4.3.1 Immunaktivierungspotenzial in den Zellen des Blutes	78
4.3.2 Immunaktivierungspotenzial in den PBMCs	82
4.3.3 Vergleich des Immunaktivierungspotenzials zwischen Zellen des Blutes und den PBMCs	87
4.4 Ausblick	90
5 Zusammenfassung.....	93
6 Literaturverzeichnis.....	X
7 Erklärung zum Eigenanteil	XVII
8 Danksagung	XVIII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einbringung eines Stents mittels Ballon-Katheter.	2
Abb. 2: Übersichtsdarstellung über das plasmatische Gerinnungssystem.	9
Abb. 3: Das Komplementsystem und seine drei Aktivierungswege.	11
Abb. 4: Schematische Darstellung des CCL-2-Signalwegs.	13
Abb. 5: Schematische Darstellung der Signalwege der Interferone.	14
Abb. 6: Schematische Darstellung des Interleukin-1 β -Signalwegs.	15
Abb. 7: Schematische Darstellung des IL-6-Signalwegs.	16
Abb. 8: Übersichtsgrafik zur Aktivierung des IL-8-Signalwegs.	17
Abb. 9: Schematische Darstellung der TGF- β -Signaltransduktion.	18
Abb. 10: Schematische Übersicht über den TNF- α -regulierten Signalweg.	19
Abb. 11: Schematische Darstellung der ICAM-1-Ausschüttung.	20
Abb. 12: Aufbau der Experimente der Blutversuche.	29
Abb. 13: Nahaufnahmen der Testmaterialien Titan, PVC und Lugdunin.	30
Abb. 14: Versuchsaufbau der Inkubation auf der „Rocking platform“.	32
Abb. 15: Aufbau der Experimente mit den PBMCs.	35
Abb. 16: Dichtegradientenzentrifugation.	37
Abb. 17: Plattenbelegung der Well-Platte.	38
Abb. 18: Auswertung der relativen Quantifikation.	41
Abb. 19: Ergebnis des Hämatogramms.	45
Abb. 20: Ergebnis der ELISAs.	48
Abb. 21: Expressionswerte der verschiedenen Immunmarker im Blut.	53
Abb. 22: Expressionswerte der Immunmarker in den PBMC.	58
Abb. 23: Expressionswerte der Immunmarker in der Vergleichstestung.	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die in der Hämokompatibilitätsprüfung untersuchten Zellen.....	7
Tab. 2: Überblick über die Plasmamarker.....	8
Tab. 3: Übersicht über die Immunmarker aus der Familie der Zytokine.....	12
Tab. 4: Reagenzien und Chemikalien.	23
Tab. 5: Eigene Puffer und Zellkulturmedium.	24
Tab. 6: Verbrauchsmaterialien.	24
Tab. 7: Test- und Reagenzienkits.	25
Tab. 8: Geräte.	26
Tab. 9: Sonstige Materialien.	26
Tab. 10: Software.	27
Tab. 11: Vor- und Rückwärtsprimer für die Immunmarker.....	27
Tab. 12: Testmaterialien für die Blutversuche.	30
Tab. 13: Antikoagulanzen bei der Hämokompatibilitätsprüfung.....	33
Tab. 14: Komponenten der verwendeten ELISA.	34
Tab. 15: Testmaterialien für die Versuche mit PBMCs.	38
Tab. 16: Programm „ISCRIP“.....	39
Tab. 17: Zusammensetzung des „Hauptmixes“.....	40
Tab. 18: Protokoll für die RT-qPCR.	40
Tab. 19: Aspekte der Testung der Hämokompatibilität.	43
Tab. 20: Übersicht über die Parameter der Hämokompatibilitätsprüfung.	45
Tab. 21: Übersicht über die Parameter der ELISA.	48
Tab. 22: Genexpression der Immunmarker im Blut.....	56
Tab. 23: Genexpression der Immunmarker in PBMCs.	61
Tab. 24: Geeignete Marker für den Vergleich von Vollblut mit PBMCs.	62
Tab. 25: Genexpression der Immunmarker in der Vergleichstestung.....	69

Abkürzungsverzeichnis

*	Signifikant	Mean-Cq	M: mean, Mittelwert; C: cycle, Zyklus, Q: quantity, Menge
%	Prozent	MEK	MAP-Kinase 2
° C	Grad Celsius	mg	Milligramm
AB	Albumin	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Abb.	Abbildung	min	Minute(n)
ADP	Adenosin-Di-Phosphat	ml	Milliliter
AK	Antikörper	MLB	Mannose-bindendes Lektin
Akt	Proteinkinase B, Synonym: PI3K	mM	Millimolar
AP-1	Aktivator-Protein-1	mm	Millimeter
APZ	Antigenpräsentierende Zellen	mRNA	messenger RNA, Boten-mRNA
ASS	Aspirin, Acetylsalicylsäure	MRSA	Methicillin-resistenter Staph. aureus
BL	Baseline	MW	Mittelwert
BMS	Bare Metal Stent	MyD88	Adapterprotein, Myeloid differentiation primary response 88
BRS	Bioresorbierbarer Stent	n	Anzahl
C3-C9	Komplementfaktoren	Na	Natrium
CAM	Zelladhäsionsmolekül(e)	NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Cas9	CRISPR-assoziierte Endonuklease 9	ng	Nanogramm
CCL-2	CC-Chemokin-Ligand 2	NK	Negativkontrolle
CCR-2	CC-Chemokin-Rezeptor 2	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
CD	Cluster of differentiation, Unterscheidungsgruppen	nm	Nanometer
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNA	ns	Nicht signifikant
cm	Zentimeter	NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
CO ₂	Kohlen(stoff)dioxid	OAS	(2'-5'-) Oligoadenylatsynthetase
CREB	cAMP Response Elements	OPD	O-Phenylenediamin-Dihydrochlorid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	P2Y ₁₂	Subtyp des Adenosindiphosphat-Rezeptors
CTAD	Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol	p38, p50, p65	NFκB-assoziierte Proteine
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor	PBMC(s)	Peripheral blood mononuclear cell(s), mononukleäre Zelle(n) des peripheren Bluts
DAPT	Duale Plättchenhemmung	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
DES	Drug eluting stent	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (Synonym: Akt)
DIN	Deutsches Institut für Normung	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
dl	Deziliter	PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

DMSO	Dimethylsulfoxid	PLA	Polylactid, Polymer aus Milchsäure
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure	PMN-Elastase	Polymorphnuklear-Elastase
DZ	Dendritische Zellen	PVC	Polyvinylchlorid
E. U.	Endotoxin unit(s), Endotoxin-Einheit(en)	PZN	Pharmazentralnummer
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung	qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure	RAF	Serin/Threonin-Proteinkinase (Rapidly accelerated fibrosarcoma)
EGFR	Epidermal growth factor receptor	RAS	Protoonkogen (Rat sarcoma)
EKZ	Extrakorporale Zirkulation	rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	RelA	Transkriptionsfaktor 65, Synonym: p65
EN	Europäische Norm	RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ERF	ETS-Domänen-assoziiierter Transkriptionsfaktor	rpm	Umdrehungen pro Minute
ERK	Extracellular-signal regulated kinases	RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
et al.	Et alii, und andere	RT	Reverse Transkriptase
FCS	Fetales Kälberserum	s	löslich
G	Gauge	s	Sekunden
g	Gramm	Staph.	Staphylococcus, Staphylokokken
G	Guanin (Nukleotid)	S1P	Sphingosin-1-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	SC5b-9	Membranangriffskomplex
gp130	Glycoprotein 130	SEM	Standardfehler des Mittelwerts
h	Stunde(n)	SMAD	Intrazelluläre Proteine
H ₂ O	Wasser	STAT	Signaltransduzierende Transkriptionsaktivator
Hb	Hämoglobin	sTNF- α	Löslicher TNF- α
Hkt	Hämatokrit	Tab.	Tabelle
I-XIII	Gerinnungsfaktoren	TAB1/2	TGF- β activated kinase 1/2, TGF- β aktivierte Kinase 1/2
I. E. /I. U.	Internationale Einheit(en)	TAH	Thrombozytenaggregationshemmung
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1	TAT-Komplex	Thrombin-Antithrombin-Komplex
IFN (- α , - β , - γ)	Interferon (- α , - β , - γ)	TGF- β	Transforming Growth Factor β
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor	TH _{1/2} -Zelle(n)	Typ-1/2-T-Helferzelle(n), TH _{1/2} -Lymphozyt(en)
IFNR	Interferonrezeptor	TLR-2, -3, -4	Toll-like-Rezeptor 2, -3, -4
Ig	Immunglobulin(e)	TMB	Tetramethylbenzidin
IL (-1 β , -6, -8)	Interleukin(e) (-1 β , -6, -8)	TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
IL-R	Interleukin-Rezeptor	TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

Intima	Tunica intima, Endothelschicht in Blutgefäßen	Traf6	TNF receptor associated factor 6, TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
IRF9	Interferon-Regulationsfaktor 9	TYK2	Tyrosinkinase 2
ISO	Internationale Organisation für Normung	U	Unit(s), Einheit(en)
J.	Jahr(e)	UFH	Unfraktioniertes Heparin
JAK	Januskinase	V.	Vena, Vene
K	Kalium	VLSct, VLST	sehr späte Scaffold-Thrombose, sehr späte Stentthrombose
l	Liter	x g	Relative Zentrifugalkraft
LPS	Lipopolysaccharid	β -TG	β -Thromboglobulin
m	Membranständig, -gebunden	λ	Wellenlänge
MAC	Membranangriffskomplex	μ g	Mikrogramm
MAP	Mitogen-activated protein, mitogenaktiviertes Protein	μ l	Mikroliter
MAPK	MAP-assoziierte Kinase, MAP-Kinase		

1 Einleitung

Die Gruppe der Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellt die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen dar ^[1]. Annähernd jeder zweite Todesfall in Europa (48 %) kann ursächlich auf diese Systemerkrankungen zurückgeführt werden ^[2]. Besonders die zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung wirkt in diesem Zusammenhang fördernd auf die Inzidenz und Prävalenz dieser Beschwerden.

Der Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen umfasst verschiedene Syndrome wie beispielsweise die koronare Herzkrankheit, den Myokardinfarkt sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Dabei gehen diese Krankheiten mit typischen Risikofaktoren einher, können jedoch durch frühzeitige Diagnose und Therapie in ihrer Prognose deutlich verbessert werden ^[1,3]. Die Arteriosklerose als multifaktorielle Genese liegt dabei beinahe all diesen Erkrankungen zugrunde ^[2]. Bei diesem vaskulären Leiden handelt es sich primär um eine chronisch-entzündliche Veränderung der Intima der großen Blutgefäße ^[4]. Bedingt durch die Einlagerung von Cholesterinkristallen und der Aktivierung von Makrophagen zu Schaumzellen kommt es zu einer Wandverdickung und einer Verminderung des Gefäßdurchmessers durch lipidhaltige Konkremente. Durch die Ruptur einer solchen vulnerablen Plaque und deren Verschleppung mit dem Blutstrom können bei einer Verlegung von Blutgefäßen ischämische Ereignisse bis hin zu Infarkten die Folge sein. Die damit verbundene Entzündungsreaktion wird maßgeblich durch die Thrombozyten ausgelöst ^[4].

Als Therapiemöglichkeiten dieser mit den kardiovaskulären Erkrankungen assoziierten Nebenwirkungen und Risikofaktoren kommen – je nach Genese der Grunderkrankung und Schweregrad – primär eine Behandlung mit Stents und Prothesen zur Rekanalisierung verschlossener oder durchmessergeminderter Gefäße zur Anwendung. Unter den gegenwärtigen Behandlungsverfahren stellt neben der medikamentösen Therapie bei Artherosklerose vor allem die invasive intraluminale Versorgung mit Stents oder Ballondilatation (Abb. 1) den Goldstandard dar ^[5].

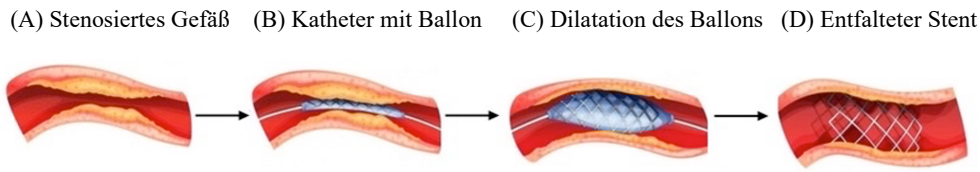


Abb. 1: Einbringung eines Stents mittels Ballon-Katheter.

Dargestellt ist ein Schema zur Durchführung der einzelnen Schritte bei der Ballondilatation eines Gefäßabschnitts mithilfe der von *Sigwart et al.* etablierten Methode [5]. In dem sich durch Lipidplaques zunehmend verengenden Gefäß (A) wird über einen Katheter ein nicht-entfalteter Ballon in den verlegten Gefäßabschnitt vorgeschoben (B) und anschließend durch Dilatation des Ballons die Stenose gesprengt (C). Dabei entfaltet sich der aufliegende Stent und wird in die Tunica intima gepresst (D). Im Laufe der Zeit kommt es zu einem Einwachsen des Metallgeflechts in die Endothelschicht der Intima (modifiziert nach [6]).

1.1 Biomaterialien und blutkontaktierende Werkstoffe

Im klinischen Alltag werden bevorzugt Stents zur Erweiterung lumenreduzierter Gefäße kleineren Kalibers sowie Gefäßprothesen zur Prävention der Ruptur großkalibriger Gefäße angewandt. Diese Prothesen bestehen meist aus synthetischen Polymeren [7].

In der Therapie der kleinlumigen Gefäße und deren Verschlüsse haben sich im Laufe der Zeit drei Arten von Stents etabliert: Der Bare Metal Stent (BMS), der Drug Eluting Stent (DES) sowie der bioresorbierbare Stent (BRS): Der BMS stellt die erste Generation der Gefäßstents dar und besteht aus einem reinen Metallgeflecht bevorzugt aus Titan und dessen Legierungen ohne weitere Beschichtung [8]. Hierbei besteht ein hohes Risiko für eine Restenose infolge der Besiedlung mit körpereigenen Fibroblasten und Immunzellen, die eine Neointima im Drahtgeflecht bilden können. Um diesem Prozess vorzubeugen sind die DES der Folgegeneration mit antiproliferativ wirkenden Substanzen aus der Familie der mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus oder Everolimus beschichtet [8, 9]. Durch den antiproliferativen Effekt besteht jedoch gleichzeitig die Gefahr einer Stentthrombose durch Thrombozytenadhäsion auf der Oberfläche.

Daneben wird seit einigen Jahren die Anwendung bioresorbierbarer Stents ausgebaut und weitere neuartige Beschichtungen mit Biopolymeren sowie natürlichen Proteinen oder synthetischer mRNA erforscht [10, 11]. Besonders durch die Verwendung von resorbierbaren synthetischen Polymeren soll durch eine langfristig vollständige Resorption eine bessere Verträglichkeit mit den Blut- und Immunzellen des Körpers und eine Verringerung der immunogenen Wirkung erreicht werden [9].

1.1.1 Metalle und Metalllegierungen

Aufgrund ihrer hohen Bruchresistenz und Materialflexibilität eignen sich Metalle und deren Legierungen ideal als Stentmaterial. Vor allem Titan und seine Verbindungen zeichnen sich aufgrund der hohen Biokompatibilität als Implantatwerkstoff aus ^[12]: Titan gilt als bioniertes Metall, das durch Kontakt mit Sauerstoff oxidiert und eine stabile Passivierungsschicht bildet. Dadurch besitzt das Leichtmetall eine hohe Korrosionsbeständigkeit und die Freisetzung toxischer Metallionen wird minimiert ^[13]. In Folge dessen sind auch die biologischen Wechselwirkungen von Titan gering. Dennoch haben sich metallhaltige Produkte unter langjähriger Exposition im humanen Vollblut als problematisch erwiesen: Es werden Reaktionen beschrieben, die eine Verwendung des Materials zur Implantation nur unter Ausschluss einer Unverträglichkeitsreaktion erlauben. So kann es je nach Status der individuellen Immunausstattung bei Empfängern zu einer chronischen Entzündungsreaktion sowie zu einer lokalisierten hypersensitiven Gefäßentzündung in Form einer Vaskulitis mit Umbau der Gefäßarchitektur und Dysfunktion des Endothels kommen ^[14]. Auch Fälle von allergischen Reaktionen insbesondere gegen nickel- oder chromhaltige Titanverbindungen bei den DES sind bekannt ^[15, 16].

1.1.2 Polymere

Die Materialklasse der Polymere stellt die größte Gruppe der Biomaterialien dar. Dabei kommen sowohl synthetisch hergestellte Polymere als auch die Biopolymere natürlichen Ursprungs, *ex-vivo* bzw. *in-vivo* zum Einsatz.

Das synthetische Polymer mit der breitesten Anwendung im medizinischen Bereich stellt das Polyvinylchlorid (PVC) dar. Dieser hitzebeständige Kunststoff wird als Grundmaterial für Schlauchmaterialien verschiedener Anwendungsgebiete angewendet ^[17]: Hierzu zählen vor allem die Schläuche für Apparate zur extrakorporalen Zirkulation (EKZ) und Oxygenierung (ECMO) ^[18, 19] sowie als Material für Infusionssysteme und Venenverweilkanülen. Da es sich bei PVC jedoch um ein äußerst sprödes Material handelt, muss es für die Anwendung meist durch Zugabe von Weichmachern vorbehandelt werden. Diese Verarbeitung bringt gewisse Probleme mit sich, wie eine ausgeprägte Unverträglichkeit mit humanem Blut und der damit einhergehenden Aktivierung des Immunsystems ^[20]. Diese Stimulation kann zytokinvermittelt über

verschiedene Signalkaskaden zu einer ausgeprägten Immunreaktion gegen das Fremdmaterial führen.

1.1.3 Bioaktive Beschichtungen

In der klinischen Anwendung werden aktuell bevorzugt Stents mit einer antiproliferativ-wirkenden Beschichtung verwendet, um damit die Restenosisierung durch überschießende Neointimaformation zu verhindern. Jedoch kann die dadurch ebenfalls reduzierte Endothelialisierung der Stentoberfläche auch zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Weiterhin gibt es die Möglichkeit bioaktive Moleküle, wie synthetische messenger-RNA (mRNA) oder Peptide, in die Beschichtung zu integrieren, um dadurch die Thrombogenität, zelluläre Hyperplasie oder Anfälligkeit für bakterielle Besiedlung des Materials zu reduzieren.

Synthetische mRNA: *In-vitro* hergestellte und modifizierte mRNA erwies sich im Kontakt mit humanem Vollblut als weniger immunogen als eine RNA natürlichen Ursprungs^[10, 21] und kann nach Einbringen in den Organismus am Applikationsort unter physiologischen Bedingungen zu einem biologisch aktiven Protein translatiert werden.

In vorangegangenen Forschungsprojekten aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski konnte bereits erfolgreich eine solche mRNA zur Kodierung membrangebundener Glykoproteine auf der Oberfläche von T-Lymphozyten als Stent-Beschichtung mit antithrombotischer Wirkung etabliert werden^[10, 22]. Dabei ließ sich demonstrieren, dass die synthetisch generierte mRNA als Beschichtung für Stents eine reduzierte ADP-vermittelte Thrombozytenaktivierung damit und auch ein geringeres Restenosisierungsrisiko des Gefäßes mit sich bringt^[23].

Die hier vorgestellte synthetische mRNA codiert für das Protein Cas9, eine Endonuklease aus dem bakteriellen Immunsystem CRISPR/Cas. Das Cas9-Enzym wird durch eine spezifische guideRNA zur zellulären DNA geleitet und führt dort einen Doppelstrangbruch herbei, um gezielt Gene aus dem Erbgut der Zelle zu entfernen. Durch die Applikation von Cas9-kodierender mRNA als Stentbeschichtung kann die Proliferation der glatten Muskelzellen gehemmt werden, indem über eine Modulation am TLR-2 auf T-Lymphozyten die Expression von Zelladhäsionsmolekülen der CAM-Familie und pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 am Ort der Implantation herabgesetzt wird^[24].

Antibakteriell wirksame Peptide: Viele Mikroorganismen können septische Komplikationen auslösen, insbesondere das Bakterium *Staph. aureus*. Es gilt als Hauptverursacher postoperativer Infektionen sowie Erreger bakterieller Superinfektionen in endovaskulären Implantaten [25-27]. Dabei kommt es zu einer chronischen bakteriellen Besiedlung der implantierten Medizinprodukte mit Problemkeimen, was man als Biofilmbildung bezeichnet [28, 29]. An dieser Stelle ist vor allem die hohe Resistenz des *Staph. aureus* gegenüber einer antibiotischen Therapie problematisch: Ein auf diese Weise entstandener Biofilm kann nicht mehr medikamentös aufgelöst werden, sodass der infizierte bzw. belegte Stent mechanisch durch Intervention gereinigt oder sogar explantiert werden muss [12, 30, 31]. Durch eine Implantatbeschichtung mit einem antibiotisch wirksamen Polypeptid könnte diese Komplikation überwunden werden. Das Cyclopeptid Lugdunin A, isoliert aus dem Bakterium *Staph. lugdunensis*, besitzt eine hohe antibiotische Wirkung [32-34] und ist hochpotent gegenüber Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) und verhindert ebenfalls die Besiedlung mit Streptokokken und Enterokokken. Aufgrund dieser Eigenschaften kommt Lugdunin als potenzieller Beschichtungsbestandteil für Implantate in Frage [35].

1.2 Biologische Wechselwirkungen blutkontaktierender Materialien

Die möglichen Komplikationen im Rahmen der Therapie mit unterschiedlichen Endoprothesen sind vielfältig und die Implantate sind für einen langjährigen oder sogar dauerhaften Verbleib im Körper ausgewiesen. Dennoch werden sie vom biologischen System des Empfängers als Fremdkörper erkannt und entsprechend behandelt. Auf diese Weise können systemische sowie lokale Komplikationen auftreten, die durch die Optimierung von Implantatmaterial und -beschichtungen sowie medikamentöser Therapie des Patienten nach Implantation verbessert werden kann.

Thrombusbildung: Zu diesen Komplikationen einer Stenttherapie zählen die Gefahr einer Thrombusbildung im Gefäßsystem oder im Stent durch die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten an der Oberfläche des implantierten Materials. Zur Reduktion dieser Gefahr ist eine medikamentöse duale antithrombozytäre Therapie (DAPT) indiziert, jedoch ergibt sich dadurch eine Erhöhung der Blutungsneigung und das Risiko für (spontane) Blutungsereignisse steigt [36].

Muskelzellproliferation: Eine weitere Gefahr ist die Restenosierung des Stents durch eine komplexe und zeitabhängige Entwicklung einer zweiten Intima über dem Scaffold des Stents durch eine verstärkte Zellproliferation ^[37]. Hierbei kommt es infolge der Besiedlung mit körpereigenen glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Immunzellen, die eine Neointima im Drahtgeflecht bilden können ^[10]. Gleichzeitig stimuliert dieser Reiz die Produktion neuer Kollagenfasern in der Extrazellulärmembran, das Gefäß verhärtet sich und neue Plaques entstehen ^[38, 39]. Durch antiproliferative Beschichtungen können diese Reaktionen zwar reduziert werden, jedoch zeigt sich als Nebenwirkung dieser Therapie eine Verzögerung der Mitose in den Endothelzellen, die für die Zellteilung und damit Vermehrung und Ausbildung einer neuen Endothelschicht benötigt werden.

Reendothelialisierung und Restenosierung: Die Endothelialisierung des Scaffolds und damit Integration in die Intima des Gefäßabschnitts stellt einen gewünschten Effekt in der Behandlung mit Gefäßprothesen dar. Die Überwachsung des Stentinneren mit körpereigenen Zellen soll das Risiko endogener Thromben durch die Aktivierung des Immunsystems unterdrücken. Dies geschieht allerdings unter Bildung von Narbengewebe, sodass ein dysfunktionales Endothel das Risiko einer Thrombozytenaggregation am freiliegenden Stentmaterial sowie einer chronischen Immunantwort durch die Expression von Adhäsionsfaktoren und die Einwanderung von Monozyten erhöht. Infolgedessen kann es erneut zur Bildung von atherosklerotischen Plaques und einer Wiederverengung des Gefäßlumens kommen. Eine nachträgliche Modifikation des bereits entfalteten Stent kann diesen Prozess nicht beeinflussen, sodass eine starke Stenose des Lumens einen erneuten operativen Eingriff zur Entfernung des Stents für den Träger nötig macht und ihn einem erneuten Operationsrisiko aussetzt ^[40, 41].

1.3 Blutkontakt und Hämkompatibilität

Eine der gesetzlich vorgeschriebenen Qualitätskontrollen von Medizinprodukten ist die Hämkompatibilitätsprüfung nach DIN EN ISO 10993-4 in akkreditierten Laboren. Dabei wird die Wechselwirkung von Vollblut und dessen Zellen mit Fremdoberflächen analysiert. Somit beschreibt die Hämkompatibilität, wie verträglich ein Material mit den Bestandteilen des Bluts ist. Die Testung unterteilt sich in die Bestimmung der zellulären und plasmatischen Blutparameter: Die Analyse umfasst die Quantifizierung

verschiedener Zellpopulationen, Hämoglobin und Hämatokrit sowie plasmatische Marker für die Leukozyten- (PMN-Elastase), Thrombozyten- (β -TG), Gerinnungs- (TAT-Komplex) sowie die Komplementaktivierung (SC5b-9).

1.3.1 Zellen des peripheren Blutes und Plasmamarker

Bei der Hämkompatibilitätstestung liegt der Fokus besonders auf dem zellulären Anteil des Blutes, welcher den Intensitätsgrad der Immunreaktion auf das Testmaterial maßgeblich bestimmt. Das humane Vollblut besteht zu 55 % aus flüssigen Bestandteilen, dem Blutplasma, und zu 45 % aus zellulären Bestandteilen. Die Zellen des menschlichen Blutes lassen sich in Erythrozyten, Leukozyten und deren Subformen sowie Thrombozyten unterteilen (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die in der Hämkompatibilitätsprüfung untersuchten Zellen.

Zellpopulation	Einheit	Referenz	Funktion	Anteil am Vollblut
Erythrozyten	$\times 10^6$ Zellen/ μ l	4,8 – 5,4 (σ 5,1)	Sauerstofftransport, Gasaustausch	98 – 99 %
Leukozyten	$\times 10^3$ Zellen/ μ l	4 – 11 (σ 7,5)	Immunabwehr, Entzündungsreaktionen	~ 1 %
Thrombozyten	$\times 10^3$ Zellen/ μ l	150 – 300 (σ 225)	Hämostase, Blutstillung und Blutgerinnung	< 1 %

Die Referenzwerte sind der Fachliteratur entnommen ^[42-44].

Daneben wurden in der Analyse auch diverse Marker aus dem Blutplasma einbezogen. Dazu zählt der Hämatokrit (Hkt), welcher den zellulären Anteil der Zellen am Blutvolumen beschreibt. Außerdem wurde die Hämoglobin-Konzentration (Hb) gemessen, welches als Funktionseinheit auf den Erythrozyten den Sauerstofftransport ins Gewebe und den Gasaustausch vermittelt. Neben diesen Parametern wurden auch die Werte der ausgewählten Enzyme PMN-Elastase, TAT, β -TG und SC5b-9 für die Quantifizierung einer Aktivierung des humoralen und zellulären Immunsystems bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2: Überblick über die Plasmapmarker.

Plasmapmarker	Abkürzung	Einheit	Referenzwert	Funktion
Hämatokrit	Hkt	%	45	Anteil aller Zellen im Blut
Hämoglobin	Hb	g/dl	11-18 (ø 14,5)	Protein der Erythrozyten zur Vermittlung des Gasaustauschs
Polymorphonuklear-Elastase	PMN-Elastase	ng/ml	> 250	spezifischer Marker des Granulozytenverbrauchs
Thrombin-Antithrombin-III-Komplex	TAT	µg/l	> 60	Nachweis einer gesteigerten Thrombinbildung
β-Thromboglobulin	β-TG	I.U./ml	> 300	Chemotaxis von Thrombozyten untereinander
Membranangriffskomplex	SC5b-9	ng/ml	> 80	Aktivierung des Komplementsystems

Die Referenzwerte entsprechen den Herstellerangaben der ELISA-Protokolle ^[45, 46].

1.3.2 Blutstillung und Blutgerinnung

Um die physiologische Hämostase des menschlichen Körpers aufrechtzuerhalten, greifen viele verschiedene Prozesse ineinander, die eine ausgewogene Balance zwischen der Bildung und der Auflösung eines Thrombus herstellen. Dieser permanente Auf- und Abbau von Blutgerinnseln findet im Körper physiologischerweise dauerhaft durch die Vermittlung des Thrombin und dessen Gegenspieler Antithrombin statt. Durch die Implantation von körperfremden Materialien kann dieses Gleichgewicht gestört werden, was in einer erhöhten Gerinnungsneigung des Blutes resultiert und thrombotische Ereignisse provoziert. Die Messung dieses Thrombin-Antithrombin-III-Komplexes kann somit als Nachweis einer gesteigerten Thrombinbildung im Organismus genutzt werden ^[47-49]. In diesem Prozess wird eine primäre Phase, die Blutstillung, von der der eigentlichen Blutgerinnung, der sekundären Hämostase, unterschieden ^[50]. Die Blutstillung wird maßgeblich durch im Blut zirkulierende Faktoren und auf zellulärer Ebene von den Endothelzellen und Thrombozyten vermittelt. Damit ist diese Phase ein bedeutender Teil der zellulären Immunantwort des menschlichen Körpers. Nach der Verletzung des Endothels oder durch Kontakt der Thrombozyten mit den im Blut zirkulierenden intrinsischen Faktoren wird als erste Maßnahme eine Stillung der Blutung initiiert. Den Thrombozyten kommt hierbei die Aufgabe zu, die entstandene Läsion bei Verletzung eines Gefäßes gegen weiteren Blutverlust abzudichten und deren Reparatur einzuleiten. Dabei steht die durch von-Willebrand-Faktor vermittelte Adhäsion der Thrombozyten an das beschädigte Endothel im Vordergrund. Im weiteren Verlauf kommt

es zur Bindung der Thrombozyten an die Matrix. Die von ihnen freigesetzten Signalmoleküle binden an die P2Y₁₂-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und vermittelt die Aktivierung der Thrombozyten untereinander. Diese Rezeptoren sind der Angriffspunkt für die medikamentöse DAPT. Die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Thrombozyten führt letztendlich zur Aggregation womit die primäre Thrombusbildung abgeschlossen ist. Die sekundäre Hämostase zur Ausbildung eines stabilen Fibrinthrombus stellt die eigentliche Blutgerinnung dar. Durch im Blut enthaltene Plasmaproteine, die Gerinnungsfaktoren, werden je nach Stimulus ein extrinsischer oder intrinsischer Gerinnungsweg eingeleitet, der kaskadenartig abläuft. Beide Wege resultieren in einer gemeinsamen Endstrecke mit der Aktivierung des Faktors Xa als gemeinsamem Endprodukt (Abb. 2).

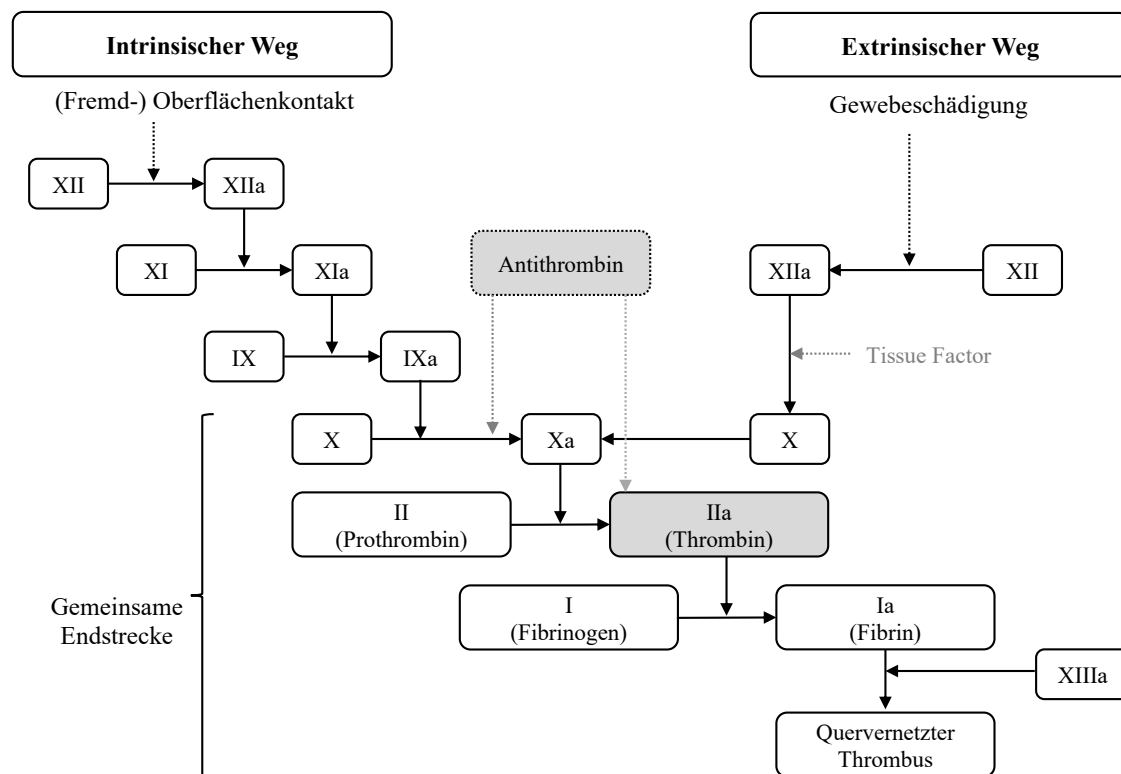


Abb. 2: Übersichtsdarstellung über das plasmatische Gerinnungssystem.

Dargestellt sind der intrinsische sowie extrinsische Weg zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und die Aktivierung der einzelnen Gerinnungsfaktoren sowie die gemeinsame Endstrecke beider Einzelwege bis hin zur Bildung eines stabilen und quervernetzten Thrombus als Ziel der plasmatischen Gerinnung (modifiziert nach ^[50]).

Der zentrale Gerinnungsfaktor in der extrinsischen Kaskade ist der Faktor VII, welcher im Rahmen einer Endothelverletzung ausgeschüttet wird und seine Kaskade über seinen

Kofaktor III anstößt. Finden sich diese beiden Komponenten nach Unterbrechung der Gewebekontinuität des Endothels zusammen, bilden sie einen gemeinsamen Komplex aus, der über weitere Schritte die Spaltung von Faktor X zu Xa induziert.

Der intrinsische Weg der Gerinnungsauslösung wird bei Oberflächenkontakt mit Kollagen oder Serinproteasen angestoßen. Auch dieser im Ablauf der Aktivierungskaskade entstehende Enzymkomplex dient der Spaltung des Faktors X in die aktive Form Xa und führt anschließend in die gemeinsame Endstrecke. Diese schließt an die Spaltung des Faktors X in seine aktive Form Xa an. Als Einheit mit dem durch Thrombin aktivierten Kofaktor Va unter Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen bildet er die Prothrombinase. Dieses Enzym spaltet im nächsten Schritt das Vorläuferprotein Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa). Letzteres aktiviert weiterhin das Fibrinogen (Faktor I) durch enzymatische Spaltung zum Fibrin (Faktor Ia). Dabei werden die löslichen Fibrinogen-Polymere zu wasserunlöslichen Fibrin-Monomeren gespalten, die sich zusammenlagern. Auf diese Weise entsteht ein kovalent vernetztes Netzwerk aus Fibrinfasern, in dem sich Erythrozyten verfangen und damit zusätzlich zur Abdichtung der Läsion beitragen.

1.3.3 Komplementsystem

Das Komplementsystem gehört zum humoralen Immunsystem und basiert auf einer Reihe von unterschiedlichen Proteinen, den Komplementfaktoren. Sie liegen an Zellen gebunden oder gelöst im Blutserum vor ^[51]. Die Aufgaben des Komplementsystems umfassen die Abwehr mikrobieller Keime und Antigen-Antikörper-Komplexen sowie die Oponierung von Antigenen, was zur Ausbildung lokaler Entzündungsreaktionen führt. Die Stimulation dieses Abwehrsystems erfolgt auf drei unterschiedlichen Wegen als klassischer, MLB-abhängiger und alternativer Aktivierungsweg in Abhängigkeit vom jeweils detektierten Antigen (siehe Abb. 3). Diese Aktivierung besteht aus der enzymatischen Spaltung einzelner Komplementfaktoren. Die so entstehenden aktiven Formen der Faktoren dienen nun wiederum selbst als Spaltenzym eines folgenden Komplementfaktors, wodurch eine Aktivierungskaskade ausgelöst wird.

Alle drei Wege der Aktivierung resultieren in der Bildung einer C3-Konvertase, die den Beginn der gemeinsamen Endstrecke markiert. Diese Konvertase spaltet nun ihrerseits den Faktor C5 in eine a- und b-Untereinheit. Das aktive b-Fragment, verbunden mit den Anteilen der C3-Konvertase lagern sich nun weitere Komplementfaktoren an. Aus diesem

Komplex des C5-Teils mit den Faktoren C6 bis C9 geht nun der Membranangriffskomplex (MAC) hervor, synonym auch bezeichnet als SC5b-9. Dieser führt die zuvor als körperfremd oder bakteriell-befallene detektierte Zielzelle nun in die kontrollierte Apoptose ^[52].

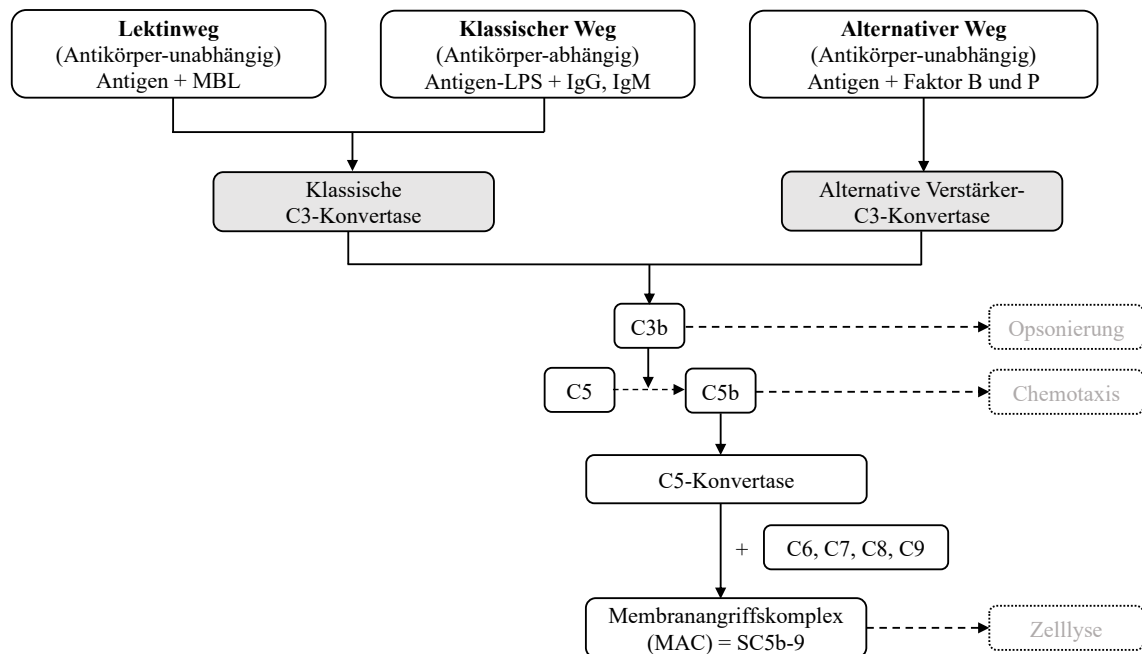


Abb. 3: Das Komplementsystem und seine drei Aktivierungswege.

In der Darstellung können die drei Aktivierungswege des Komplementsystems abgegrenzt werden. Der klassische Aktivierungsweg ist dabei anhängig von der Bildung spezifischer Antikörper gegen das eindringende Fremdantigen, wohingegen der alternative Aktivierungsweg und der Lektinweg antikörperunabhängig ausgelöst werden. Alle drei Wege enden nach der Bildung der C3-Konvertase in einer gemeinsamen Endstrecke mit der Bildung des Membranangriffskomplexes (modifiziert nach ^[51]).

1.4 Immunaktivierung

Biomaterialien, die in den Körper implantiert werden und in direktem Kontakt mit Blut stehen, interagieren auf vielfältige Weise mit dem biologischen System des Empfängers: Durch die Vielzahl der Immunzellen, die sich im Blut befinden, wie Leukozyten, Monozyten und dendritische Zellen (DZ), können Fremdoberflächen und darauf immobilisierte Biomoleküle eine immunologische Reaktion verursachen wodurch unterschiedliche inflammatorische Prozesse angestoßen werden und langfristig zu negativen Folgen beim Patienten führen können. Die Induktion der inflammatorischen Prozesse wird durch die Expression und Ausschüttung von unterschiedlichen Zytokinen im Körper moduliert.

1.4.1 Zytokine

Die Gruppe der Zytokine umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, die eine regulatorische Funktion bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen übernehmen [53]. Sie spielen als Mediatoren eine entscheidende Rolle für Immunreaktionen und Entzündungsprozesse und gehören damit zum unspezifischen Immunsystem. Zytokine werden als Reaktion auf Materialkontakt ausgestoßen und nehmen durch ihre jeweilige pro- oder anti-inflammatorische Wirkung direkten Einfluss auf Einheilung und Verträglichkeit der Medizinprodukte im Körper (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht über die Immunmarker aus der Familie der Zytokine.

Bezeichnung	Abkürzung	Bildungsort/ Ursprungszelle	Hauptaufgabe
CC-Chemokin-Ligand-2	CCL-2	Monozyten, T-Gedächtniszellen	Chemotaxis von Monozyten und T-Lymphozyten
Interferon- α	IFN- α	Virusinfizierte und gesunde Zellen	Aktivierung von NK-Zellen
Interferon- β	IFN- β	Virusinfizierte Fibroblasten	Aktivierung von NK-Zellen
Interferon- γ	IFN- γ	TH ₁ -Zellen	Aktivierung von Makrophagen
Interleukin-1 β	IL-1 β	Monozyten	Pyrogen, Entzündungsmediator
Interleukin-6	IL-6	Leukozyten, Hepatozyten	Regulation der Entzündungsreaktion
Interleukin-8	IL-8	Endothelzellen, Monozyten, Fibroblasten	Entzündungsmediator, Chemotaxis von Neutrophilen
Transforming Growth Factor- β	TGF- β	verschiedene Zellen	Zellproliferation, Zelldifferenzierung
Tumornekrose-Faktor- α	TNF- α	Makrophagen	Pyrogen, Modulation der Immunzellaktivität

CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL-2): Der CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL-2), ist ein Signalmolekül aus der Familie der Chemokine [54]. Seine Hauptaufgabe besteht in der Rekrutierung von Mono- und Lymphozyten an den Entzündungsort. Durch die Erkennung einer Fremd-RNA am Toll-like-Rezeptor-3 (TLR-3) und -4 (TLR-4) in diesen Zellen wird seine Expression angestoßen (Abb. 4) [55].

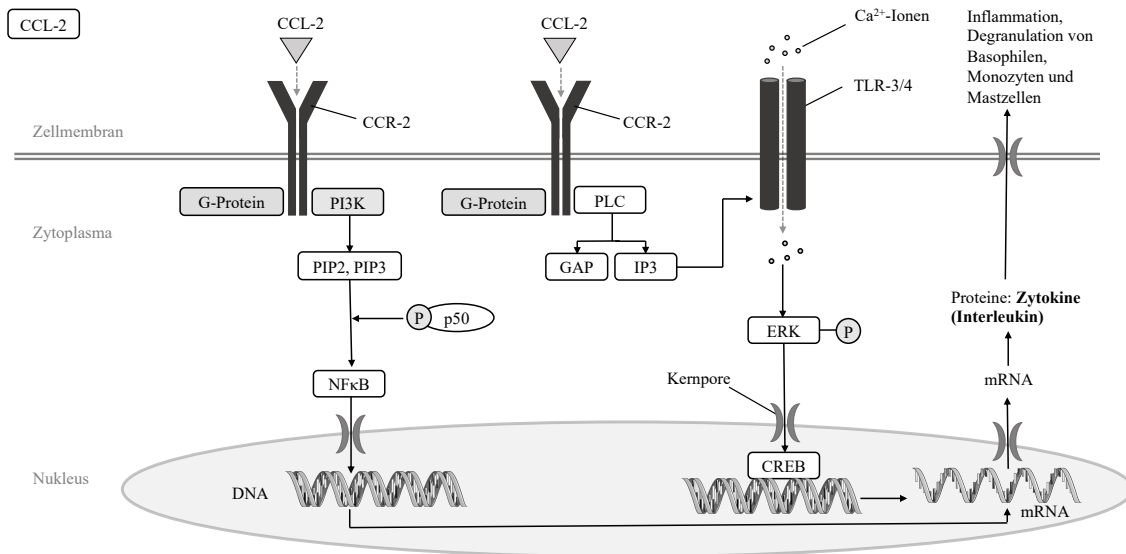


Abb. 4: Schematische Darstellung des CCL-2-Signalwegs.

Das Molekül vermittelt seine Wirkung nach Bindung an den Rezeptor CCR-2 über eine G-Proteingekoppelte Signalkaskade und aktiviert die Transkriptionsfaktoren NFκB oder CREB und die Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf T-Lymphozyten. Dadurch wird die Expression von Interleukinen angeregt, welche eine Inflammation sowie Degranulation von Immunzellen stimulieren (modifiziert nach [55]).

Interferon-α (IFN-α): Die Familie der Interferone spielt eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunreaktion des menschlichen Organismus (Abb. 5). In seiner Funktion als Zytokin wird IFN-α insbesondere von Makrophagen und Monozyten sowie virusinfizierten Zellen produziert. Nach der Bindung an den zugehörigen Interferonrezeptor IFNR, wird dieser aktiviert und der JAK-STAT-Signalweg angestoßen. Dies resultiert in der Aktivierung des signaltransduzierende Transkriptionsaktivator (STAT). Dieser induziert im Nukleus mit dem Regulationsfaktor IRF9 [56] die Transkription verschiedener antiviraler Gene zur Synthese von Zytokinen sowie verschiedenen Proteinen, welche über unterschiedliche Wege eine Virusreplikation inhibieren [57, 58]. Zudem wirkt IFN-α auf die Expression des MHC-I-Komplexes, welcher von CD8⁺ T-Zellen im Rahmen der Antigenpräsentation auf deren Oberfläche exprimiert wird. Somit bewirkt es über diese zytotoxischen T-Zellen eine Lyse (virus-)infizierter Körperzellen. Weiterhin nimmt IFN-α Einfluss auf das angeborene Immunsystem, indem es Natürliche Killerzellen zur Zytokinfreisetzung stimuliert [59, 60].

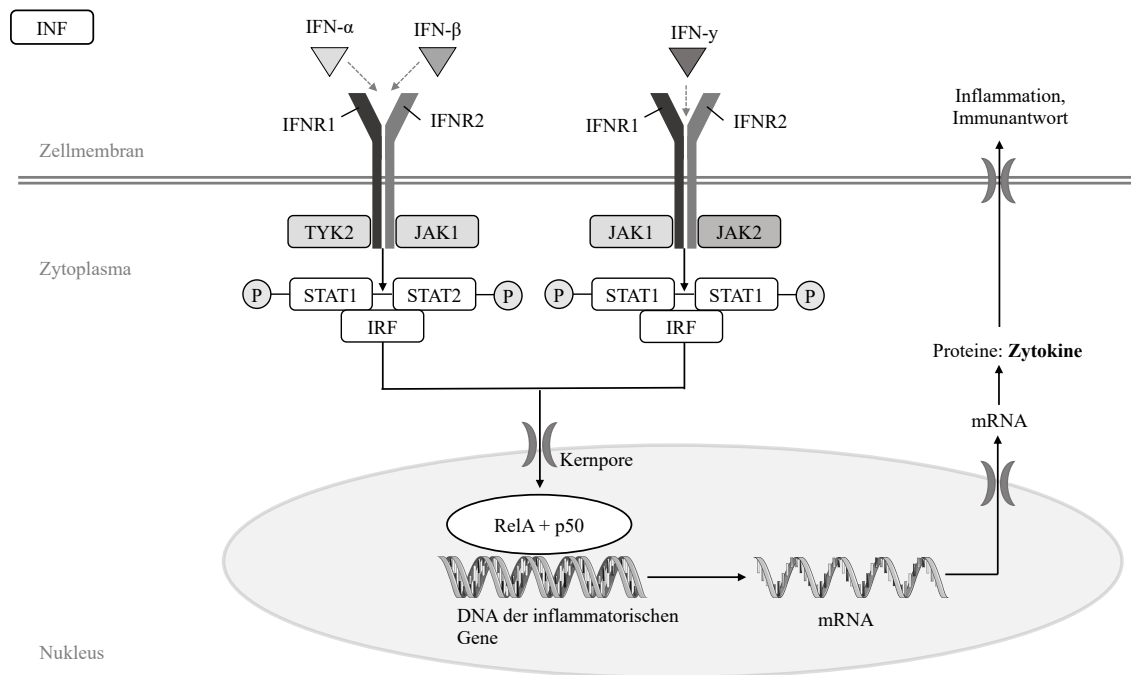


Abb. 5: Schematische Darstellung der Signalwege der Interferone.

Während IFN- α und IFN- β ihre Wirkung über die Tyrosin- und Januskinase (JAK) vermitteln, beschränkt sich die Aktivierung der Rezeptoren durch IFN- γ als Liganden auf eine Aktivierung der JAK 1/2. Beide Signalwege aktivieren über STAT-Proteine die Einschleusung des Transkriptionsfaktors IRF in den Zellkern. Dort transkribiert er die DNA der inflammatorischen Gene unter Einfluss von Regulatoren. Die entstandene mRNA wird ins Zytoplasma ausgeschleust und provoziert dort eine Entzündung und Immunantwort (modifiziert nach ^[57, 58]).

Interferon- β (IFN- β): Das IFN- β bindet ebenfalls am IFNR (Abb. 5) und aktiviert somit den JAK-STAT-Signalweg und führt zur Expression antiviral wirksamer Proteine. Anders als IFN- α wird IFN- β jedoch nicht von Immunzellen, sondern von Fibroblasten insbesondere bei viraler Infektion sezerniert ^[61, 62]. Durch seinen antiproliferativen Effekt auf die Vorläuferzellen des Bindegewebes, welche durch Ausschüttung von Zytokinen bei Gewebeschädigung üblicherweise zur Proliferation und damit zur Narbenbildung angeregt werden, ist es im Zusammenhang mit Implantationen von Interesse.

Interferon- γ (IFN- γ): Das Glykoprotein IFN- γ stellt eine eigene Subgruppe innerhalb der Interferon-Familie dar (Abb. 5). Obwohl IFN- γ wie die beiden Interferone IFN- α und - β stimulierend auf die MHC-Komplex-Expression an Makrophagen und auf die Antigenpräsentation wirkt, nutzt es zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs einen eigenen Rezeptor, den Interferon- γ -Rezeptor (IFNGR) ^[57]. Die resultierende Signalkaskade ist jedoch vergleichbar. IFN- γ wird hauptsächlich durch CD4⁺-T-

Lymphozyten sezerniert, nachdem sie Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen hatten. Dabei entfaltet es eine antivirale und immunmodulatorische Wirkung ^[56, 59, 63].

Interleukin-1 β (IL-1 β): Interleukin-1 β wird als „Monozyten-Interleukin“ bezeichnet, aber auch von Makrophagen und DZ sezerniert und wirkt als endogenes Pyrogen ^[64]. Seine Aufgabe besteht v.a. in der Entzündungsinduktion und -modulation indem es Endothelzellen und Leukozyten am Entzündungsort aktiviert. Daneben hat es auch Einfluss in der Entstehung chronischer Entzündungsreaktionen wie Artherosklerose ^[65]. Der Signalweg nach Rezeptorbindung ist in Abb. 6 dargestellt. IL-1 β kann an zwei verschiedene Rezeptortypen binden: Während bei Bindung des IL1R1 eine Signalkaskade ausgelöst wird, an deren Ende die Aktivierung weiterer Zytokine wie TNF- α oder Interleukine (IL-6 und IL-8) steht, bleibt diese Kaskade bei Bindung an den Rezeptorsubtyp IL1R2 aus. Diese Bindung führt lediglich zu einem inaktiven Rezeptor-Liganden-Komplex.

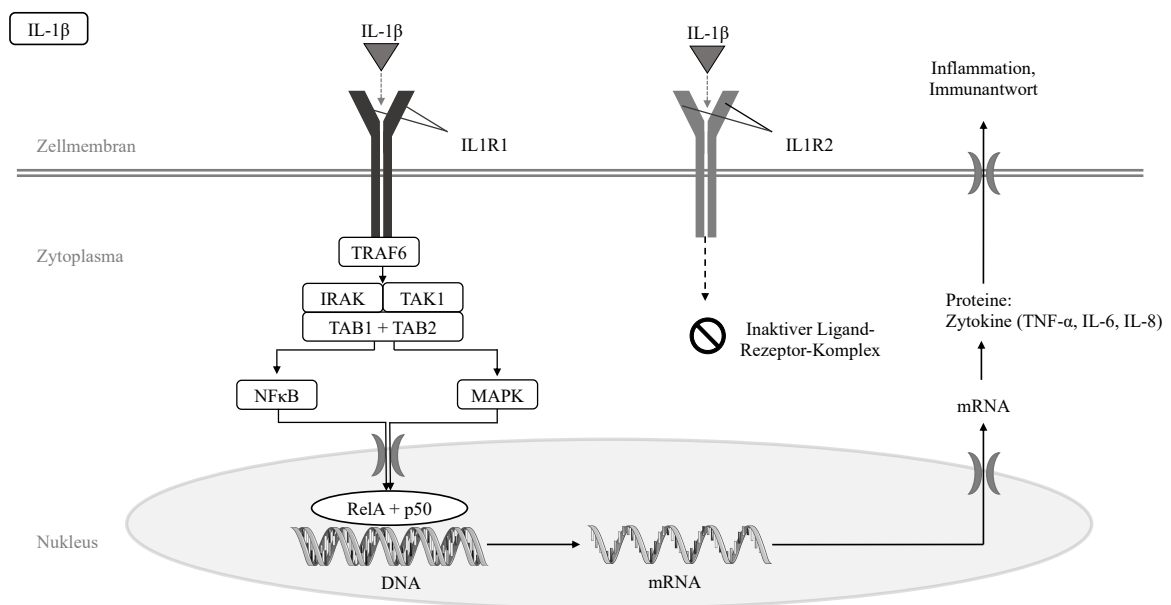


Abb. 6: Schematische Darstellung des Interleukin-1 β -Signalwegs.

Nach der aktiven Bindung von IL-1 β an den Rezeptor IL1R1 werden über diverse Zwischenschritte und Aktivierung verschiedener Effektorproteine der Transkriptionsfaktor NF κ B oder AP-1 über zugehörige Enzyme aktiviert. Beide Faktoren transkribieren unter Anwesenheit der Kofaktoren RelA und p50 die Gene für die pro-inflammatorische Zytokine. Die entstandene mRNA wird im Zytoplasma zum aktiven Protein umgeschrieben, das anschließend eine immunogene Wirkung im Organismus ausübt (modifiziert nach ^[65, 66]).

Interleukin-6 (IL-6): Das Interleukin-6 erfüllt im Immunsystem mehrere Funktionen und verfügt sowohl über eine pro- als auch anti-inflammatorische Komponente in

Abhängigkeit vom aktivierten Signalweg ^[64, 67]. Es wird primär von Leukozyten sowie Hepatozyten gebildet. Bei massiven Entzündungsreaktion wird die sonst geringe Sekretion von IL-6 stark hochreguliert ^[68]. Die Immunaktivierung durch IL-6 kann auf zwei verschiedene Arten stattfinden (Abb. 7): Im pro-inflammatorischen Trans-Signalweg werden lösliche Komponenten des Rezeptors und seiner Liganden voraktiviert. Beim anti-inflammatorischen, klassischen Signalweg befinden sich die Komponenten dieses Signalkomplexes bereits an der Zellmembran gekoppelt, wenn die Rezeptor-Liganden-Bindung stattfindet. Die anschließende Signalkaskade im Zytoplasma ist jedoch beiden Signalwegen gemeinsam.

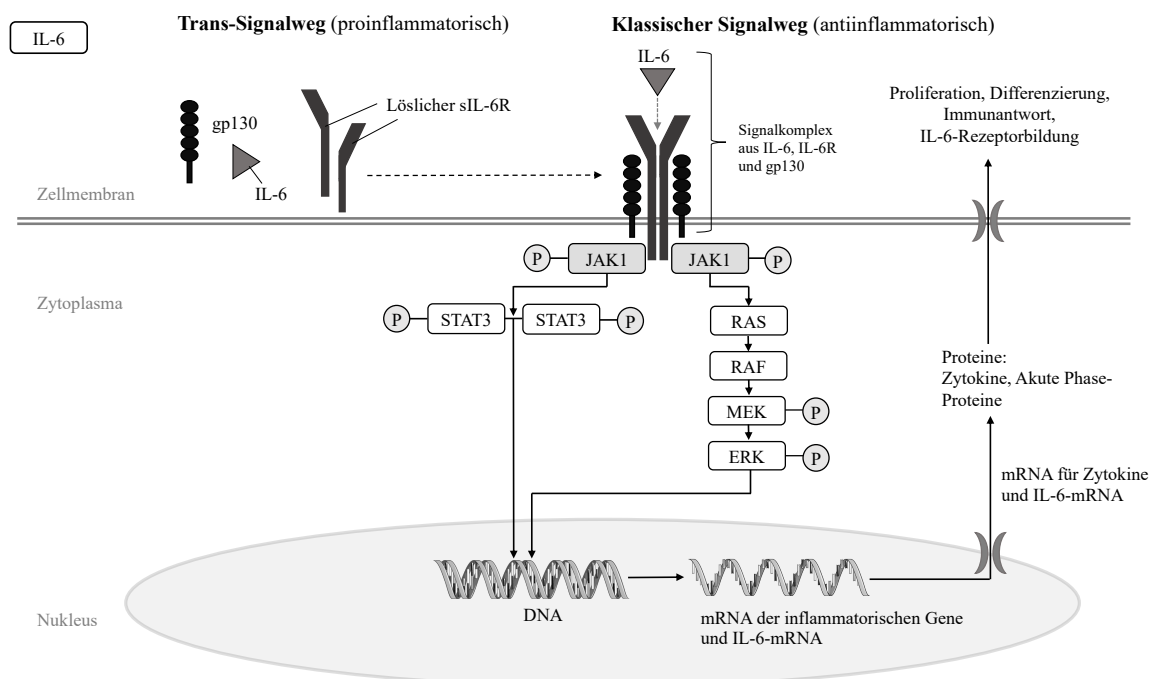


Abb. 7: Schematische Darstellung des IL-6-Signalwegs.

Ausgelöst durch einen Komplex aus zwei Januskinasen 1 kommt es nach der IL-6-Rezeptoraktivierung durch den zugehörigen Liganden zur Dimerisierung und Phosphorylierung des STAT3 oder Aktivierung des RAS-Signalwegs. Letzterer endet mit der Expression des Transkriptionsfaktors ERK. Die so aktivierten Faktoren führen zur Translation der mRNA inflammatorischer Gene. Im Zytoplasma der Zelle werden diese in ihre aktiven Proteine wie Zytokine und Akute-Phase-Proteine umgewandelt und aus der Zelle ausgeschleust (modifiziert nach ^[68]).

Interleukin-8 (IL-8): Das chemotaktisch wirkende Interleukin-8 wird von unterschiedlichen humanen Zellen exprimiert. Dazu zählen Monozyten und Makrophagen, verschiedene Leukozytenpopulationen ^[64]. Dabei wirkt IL-8 über verschiedene Signalwege (Abb. 8) auf die verschiedenen Subtypen der Granulozyten, NK-Zellen und T-Lymphozyten aber auch auf hämatopoetische Zellen aktivierend und führt zu deren Einwanderung ins Gewebe bzw. an den Ort der Entzündung. Das

Signalmolekül wirkt als Ligand am dimeren CXC-Motiv-Chemokinrezeptor CXCR. Bei Aktivierung des Rezeptors zerfällt das gekoppelte G-Protein in seine drei Untereinheiten und es kommt zur Signalweitergabe über drei unterschiedliche enzymgekoppelte Kaskaden. Am Ende dieser Kaskade stehen funktionsfähige Proteine, die dann im Organismus verschiedene Funktionen erfüllen. Diese bestehen insbesondere in einer Stimulation der Immunantwort, und der Anti-Apoptose. *Akdis et al.* bringen das Interleukin-8 zudem mit der Tumorgenerese von Geweben in Verbindung [64].

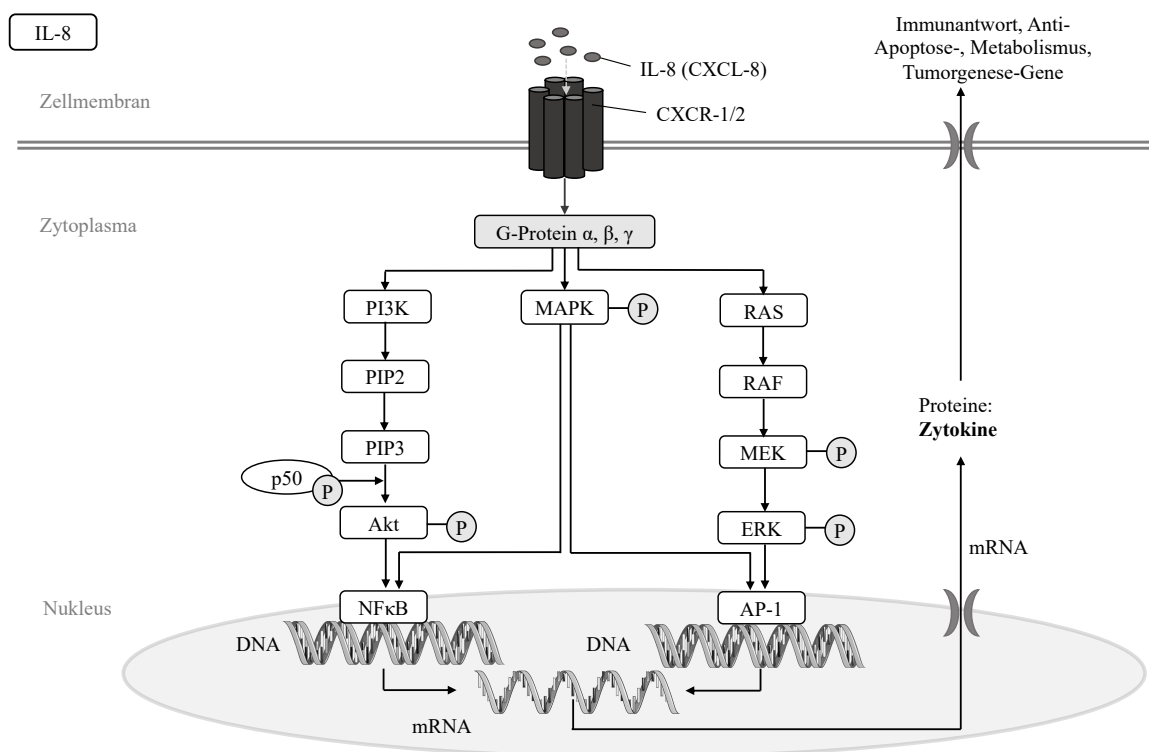


Abb. 8: Übersichtsgrafik zur Aktivierung des IL-8-Signalwegs.

Der Weg der PI3K stimuliert über verschiedene Zwischenschritte den Transkriptionsfaktor NFκB, während der RAS-Signalweg mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 die Information aus der DNA im Zellkern transkribiert. Eine dritte, MAP-Kinase-kontrollierte Signaltransduktion, kann sowohl über den NFκB als auch AP-1 seine Transkription steuern. Nach der Umschreibung von DNA für die Produktion weiterer Zytokine und der Translation der mRNA in funktionsfähige Proteine können diese aus der Zelle ausgeschleust werden (modifiziert nach [64]).

Transforming Growth Factor-β (TGF-β): Ein weiteres entscheidendes Signalmolekül des menschlichen Körpers ist der Transforming Growth Factor β (TGF-β), der im Körper viele unterschiedliche Funktionen erfüllt: Neben der Proliferationskontrolle bis zur Apoptose kontrolliert er auch die Zelldifferenzierung sowie Zelladhäsion [69] über zwei Wege der Signaltransduktion (Abb. 9). Der SMAD-assoziierte Weg vermittelt seine Wirkung über die namensgebenden Effektorproteine SMAD2 und 3, die sich nach

Phosphorylierung unter Einfluss des Kofaktors Co-SMAD4 aneinander anlagern und nach Passage der Kernmembran durch die Kernporen die Transkription TGF- β -regulierter Gene einleiten. Im Signalweg, der nicht auf diesen SMAD-Proteinen basiert, dem non-SMAD-Signalweg, wird diese Transkription über den Faktor NF κ B vermittelt. Dieser kann entweder über den ERK-Weg mit diversen Kofaktoren oder über den PI3-Kinase-Weg ausgeschüttet werden. TGF- β erfüllt im menschlichen Körper die Funktion eines Wachstumsfaktors und dient im physiologischen Zustand zur Regulation der T-Lymphozyten-Selektion und -Reifung. Daneben hält er die Zellzahl der naiven T-Lymphozyten aufrecht und unterdrückt die Differenzierung zu CD8⁺ zytotoxischen Zellen. Seine Hauptaufgabe besteht in der Unterstützung der Differenzierung von T-Lymphozyten zu verschiedenen T-Helferzell-Subtypen wie TH₁- und TH₂-Zellen [69].

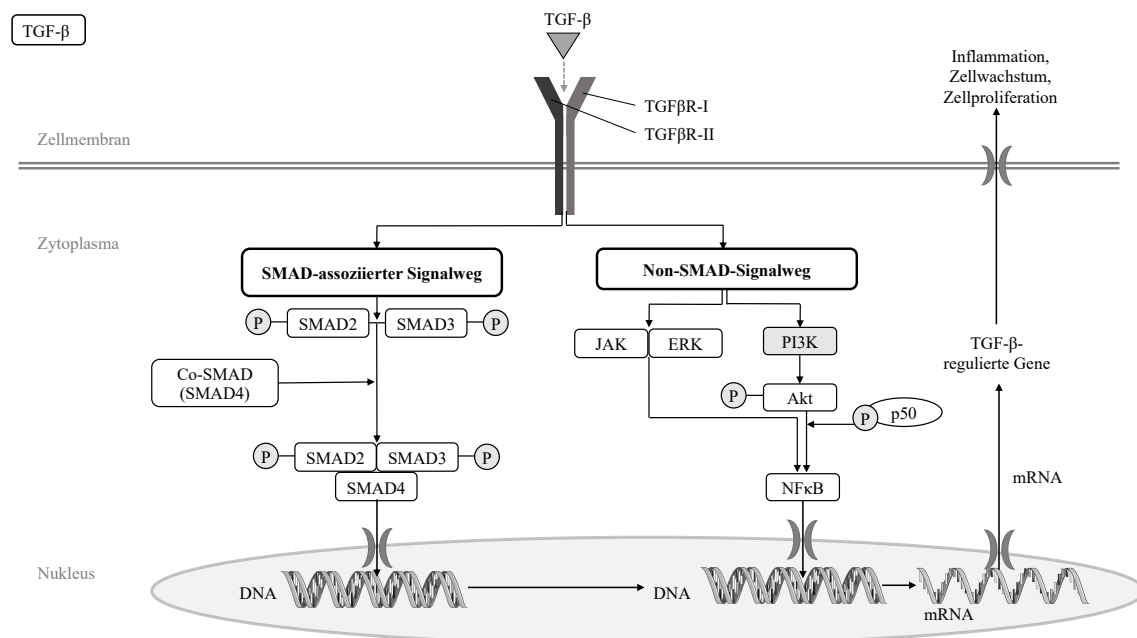


Abb. 9: Schematische Darstellung der TGF- β -Signaltransduktion.

Das Signalmolekül TGF- β vermittelt seine inflammatorische und proliferationsfördernde Wirkung auf Immunzellen über zwei unterschiedliche Signalwege, den SMAD-assoziierten und den non-SMAD-Signalweg. Am Ende der Transduktionskaskade werden TGF- β -regulierte Gene zu ihren Effektorproteinen umgeschrieben und aus der Zelle in den Organismus abgegeben, wo sie ihre entzündliche und wachstumsstimulierende Wirkung an den Immunzellen – insbesondere T-Lymphozyten – entfalten (modifiziert nach [69]).

Tumornekrosefaktor α (TNF- α): Der primär von Makrophagen ausgeschüttete Tumornekrosefaktor α agiert als ein multifunktionales Signalmolekül des Immunsystems [53]. Es stimuliert als Entzündungsmediator die lokale und systemische Entzündungsreaktion und dient daneben auch zur Aktivierung der Akute-Phase-Proteine.

Seine Aufgaben sind vielfältig und dienen vor allem Vorgängen wie Zelldifferenzierung und -proliferation aber auch der Einleitung der Apoptose (Abb. 10). Daneben erfüllt er auch eine parakrine Funktion bei der Regulation und Ausschüttung anderer Zytokine, indem er über zwei verschiedene Wege die Signalkaskade auslöst: Über sTNF- α und den Subtyp 1 des Rezeptors kommt es zur Stimulation des ERK-Signalwegs. Dieser führt über Zwischenschritte und Kofaktoren zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die in den Nukleus eingeschleust werden, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Bei mTNF- α und dem assoziierten Subtyp 2 wird ebenfalls ein TRADD-Enzym aktiviert, welches den PI3K-Signalweg im Plasma der Zelle stimuliert. Am Ende der Kaskade stehen mehrere Transkriptionsfaktoren, welche die DNA der durch TNF- α -kontrollierten Gene zur mRNA umschreiben.

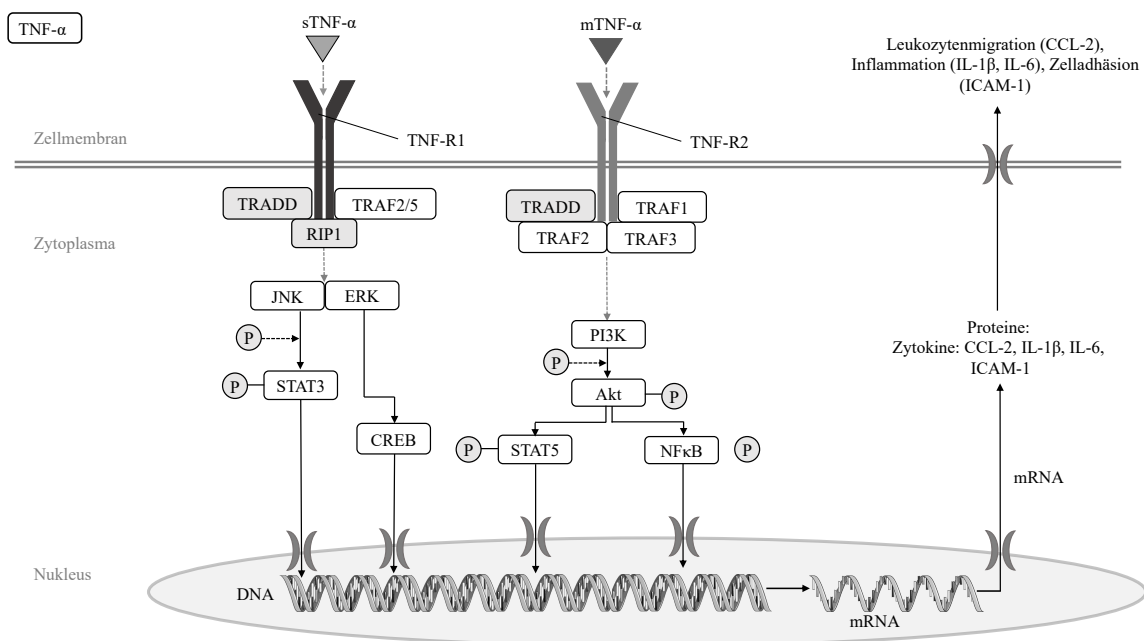


Abb. 10: Schematische Übersicht über den TNF- α -regulierten Signalweg.

Hierbei unterscheidet man eine lösliche (sTNF- α) von einer membranständigen (mTNF- α) Form des Signalmoleküls, die beide ihre Wirkung durch unterschiedliche Zwischenschritte und Enzyme entfalten. Während der sTNF- α an den Rezeptor des Subtyp 1 bindet, aktiviert mTNF- α die Subform 2. Nach der Transkription der mRNA werden im Plasma der Zelle die entsprechenden Zytokine mit einer migrations- oder entzündungsfördernden Funktion hergestellt (modifiziert nach ^[53]).

1.4.2 Zelladhäsionsmoleküle

Die Transmembranproteine auf der Oberfläche diverser Zellpopulationen werden unter der Bezeichnung „Zelladhäsionsmoleküle“ (CAM) zusammengefasst ^[70]. Zu diesen gehört auch das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 (Abb. 11). Diese Moleküle

bilden die Grundlage für Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Verbindungen. Insgesamt wirken diese Proteine inflammatorisch und immunmodulatorisch, indem sie die Interaktion von T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen und die Bindung von Leukozyten ans Endothel der Intima vermitteln.

Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1): Das membranständige Glykoprotein ICAM-1 dient als zentrales Signalmolekül für die Migration der Leukozyten in das Gefäßendothel (Diapedese) und verschiedene Immunreaktionen auf zellulärer Ebene, wie die Lymphozytenaktivierung ^[71]. Im physiologischen Zustand ohne Entzündungsreaktion wird ICAM-1 nur in sehr geringen Konzentrationen exprimiert ^[72]. Kommt es jedoch zu einer Hochregulation im Rahmen einer Immunreaktion folgt eine Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β und IFN- γ ^[73, 74].

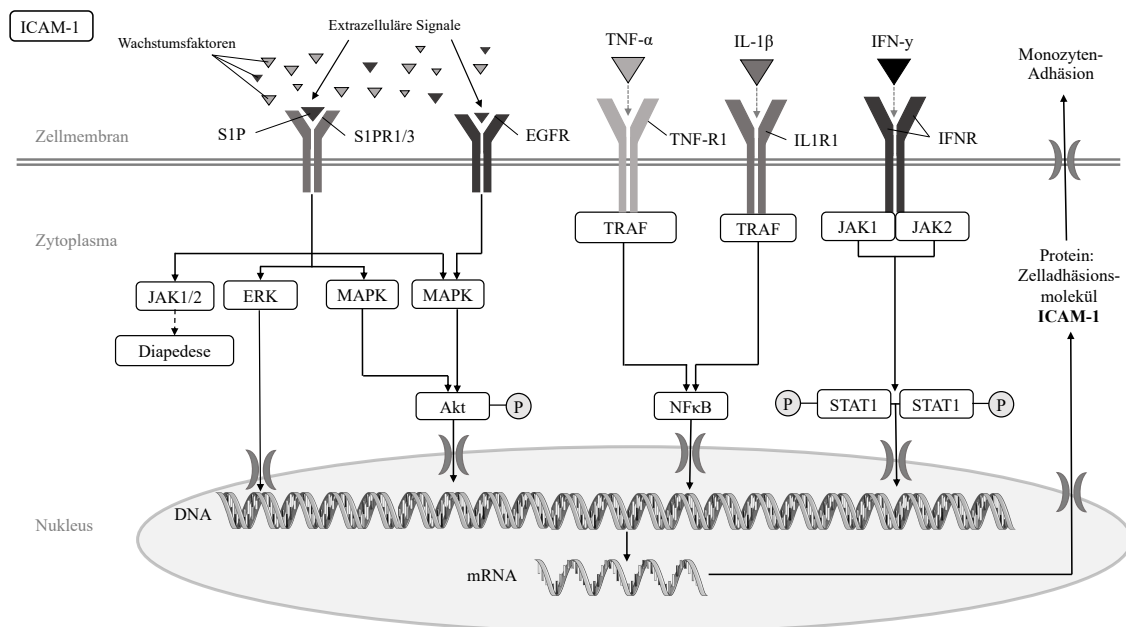


Abb. 11: Schematische Darstellung der ICAM-1-Ausschüttung.

Zu sehen ist eine schematische Darstellung der verschiedenen Signalmoleküle, die eine Aktivierung der ICAM-1-Ausschüttung als Liganden unterschiedlicher Rezeptortypen stimulieren. Sowohl extrazelluläre Signale am S1P-Rezeptor oder Wachstumsrezeptor EGFR als auch diverse Zytokine aus der TNF- und Interleukin- bzw. Interferon-Familie stimulieren über verschiedene Effektorenzyme die Transkription der ICAM-1-DNA im Zellkern. Über diverse Transkriptionsfaktoren wird das Gen transkribiert und als Zelladhäsionsmolekül aus der Zelle ausgeschleust (modifiziert nach ^[71-75]).

1.5 Zielsetzung

Aufgrund der stetig zunehmenden Prävalenz und Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen und der gleichzeitig steigenden Lebenserwartung in der Bevölkerung kommen Implantate im kardiovaskulären System zunehmend als dauerhafte Therapeutika zum Einsatz. Trotz intensiver Forschung zur Verbesserung der implantierbaren Materialien und neuen Ansätzen zur Materialbeschichtung, stellen Implantat-assoziierte Komplikationen in der klinischen Anwendung noch immer das größte Risiko für die Patienten dar.

Thromboembolische Ereignisse nach Implantation oder die Restenosierung implantierter Stents und Gefäßprothesen, die im Rahmen der biologischen Antwort auf das körperfremde Material entstehen, können erneute Interventionen erforderlich machen und den Patienten zusätzlich belasten. Mögliche materialbedingte Risikofaktoren sollen mit der gesetzlich vorgeschriebenen Hämokompatibilitätsprüfung für Medizinprodukte frühzeitig erkannt und reduziert werden. Diese Prüfung deckt jedoch nicht alle Bereiche der biologischen Wechselwirkungen ab, sondern legt den Fokus hauptsächlich auf das Verhalten der Blutbestandteile und die Aktivierung des Gerinnungs- sowie Komplementsystems nach Materialkontakt. Die zunehmenden Beobachtungen von überschießenden Immunreaktionen bei Implantatempfängern zeigen jedoch eindrücklich, dass bei der Materialcharakterisierung einer Analyse von Immunmarkern vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden muss.

Daher war es das Ziel dieser Promotionsarbeit, einen Assay zu etablieren, welcher ergänzend zur Hämokompatibilitätsanalyse eine Aktivierung des Immunsystems bereits auf molekulargenetischer Ebene detektierbar machen soll. Dabei soll nach Inkubation mit ausgesuchten Testmaterialien die Expression ausgewählter Immunmarker, wie Interleukine (IL-1 β , IL-6, IL-8), Interferone (IFN- α , - β , - γ), das Adhäsionsprotein ICAM-1, die Marker TNF- α , TGF- β und CCL-2 im Vollblut sowie in isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes unabhängig voneinander quantifiziert und gegenübergestellt werden. Dieses Testverfahren soll zur Ergänzung der gesetzlichen Hämokompatibilitätsprüfung als Qualitätskontrolle für neuartige blutkontaktierende Biomaterialien dienen und die Vorgänge der Immunreaktion besonders auf molekulargenetischer Ebene mittels Real-time qPCR untersuchen. Um eine Aussage zur

Genexpression der ausgewählten Zytokine zu treffen, wurden diese mittels Real-time qPCR im Vollblut und PBMCs unabhängig voneinander nachgewiesen und quantifiziert. Eine Quantifizierung erfolgte aus der isolierten mRNA bzw. umgeschriebenen cDNA für jedes einzelne Testmaterial dieser beiden Gruppen. Durch dieses Procedere soll untersucht werden, ob es für eine aussagekräftige Analyse ausreichend ist, die Testmaterialien im Vollblut zu inkubieren oder ob nur eine Testung mit isolierten Immunzellen zu einem validen Ergebnis führt. Anhand dieser Werte sollte gezeigt werden, welche Zytokine durch welches Implantatmaterial oder bioaktive Beschichtung verstärkt ausgeschüttet werden.

Auf diese Weise sollten als zweites Ziel die aussagekräftigsten Immunmarker für die Testung der verwendeten Materialien aus dem Datenset der 10 zuvor festgelegten Zytokine identifiziert werden. Diese könnten in Zukunft nach erfolgreicher Identifizierung und Reproduzierbarkeit die herkömmliche Hämokompatibilitätsprüfung als weitere standardisierte Parameter für die Komponente der Immunaktivierung ergänzen.

Als drittes Ziel sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob die Analyse der Genexpression der Immunmarker im Vollblut alleine schon ausreichende Aussagekraft besitzt und somit eine Untersuchung in den zeit- und kostenaufwändig isolierten PBMCs obsolet macht.

Am Ende des Projekts sollte somit ein sensitiver Immunassay basierend auf quantitativer Real-time PCR als Ergänzung zur standardisierten Hämokompatibilitätsprüfung stehen, der eine Beurteilung der Reaktion des menschlichen Immunsystems nach Kontakt mit unterschiedlichen blutkontaktierenden Implantaten sowie bioaktiven Beschichtungen ermöglicht. An dieser Stelle möchte die vorliegende Arbeit einen wertvollen Beitrag zur Verbesserung der Hämokompatibilität kardiovaskulärer Implantate leisten und in Zukunft zu einer verbesserten Einschätzung des Risikoprofils der einzelnen Medizinprodukte für den Patienten beitragen.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel der Arbeit werden die verwendeten Materialien für die Durchführung der Versuche und die im Protokoll verwendeten Methoden dargestellt.

2.1 Materialien

In diesem Abschnitt findet sich eine Auflistung aller Materialien, die für die Durchführung der Versuche verwendet wurden. In den Tabellen 4 bis 10 sind die verwendeten Reagenzien und Chemikalien, Puffer, Zellkulturmedium, Verbrauchsmaterialien, Testkits und Geräte sowie Software aufgelistet. Abschließend sind in Tab. 11 die Gensequenzen der Primer aufgeführt, wie sie für den Gennachweis in der RT-qPCR verwendet wurden.

Tab. 4: Reagenzien und Chemikalien.

Verwendete Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (DE)	7151-5
iQTM Custom SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)	172-5002
Na ₂ -EDTA-2-H ₂ O	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	E5134
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	A9434
Cas9-mRNA	Antonia Theurer (geb. Link)	–
CASY-Ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (DE)	5651808001
Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)	14190-094
EDTA-Lösung (0,5 M in Wasser)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	E7889-100ML
Ethanol absolut (molekularbiologische Qualität)	AppliChem GmbH, Darmstadt (DE)	3678, 0250
Gibco™ Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)	11573397
Heparin-Natrium LEO 25.000 I.E./5ml Injektionslösung	LEO Pharma, Ballerup Sogn (DK)	PZN 15261203
Histopaque®-1077	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	10771-6X100ML
Humanes AB-Serum (male AB plasma, USA origin, sterile-filtered)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)	MFCD00165829
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	237205
L-Glutamin (200 mM)	Gibco® Life Technologies® GmbH, Darmstadt	25030081
Lugdunin A	Eberhard-Karls-Universität Tübingen	Patentnummer EP3072899B1
NaCl 0,9 % Spüllösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (DE)	7152.5

10.000 U Penicillin/ 10.000 µg Streptomycin/ml	Gibco® Life Technologies® GmbH, Darmstadt	15140122
Tris Base	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	10708976001
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim (DE)	60-24-2

Tab. 5: Eigene Puffer und Zellkulturmedium.

Lösung	Volumen	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lyse-Puffer (EL)	1.000 ml	8,29 g Ammoniumchlorid, 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat, 0,37 g Na ₂ -EDTA-2-H ₂ O in 1.000 ml Ampuwa (steril herzustellen, bei 4 °C zu lagern)
PBS-1	500 ml	2 ml 0,5 M EDTA (0,854 g/l EDTA), in 500 ml D-PBS (ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺) (steril herzustellen, bei 4 °C zu lagern)
PBS-2	500ml	2 ml 0,5 M EDTA und 10 ml FCS (100%) in 500 ml D-PBS (ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺) (steril herzustellen, bei -20 °C zu lagern)
RPMI-2-Medium	500 ml	500 ml RPMI-Medium, 8 % AB-Serum, 1,5 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 3 I.U./ml Heparin
Tris-Puffer (pH 7,5)	50 ml	Eigene Herstellung

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Artikelnummer
12-Well-Platten (Greiner CELLSTAR® multiwell culture plates)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)	M9187-100EA
CASY Cup	Roche Diagnostics GmbH (Innovantis), Mannheim (DE)	43003
CELLSTAR® Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)	607 180
CELLSTAR® Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)	760 160
CELLSTAR® Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)	606 160
CELLSTAR® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)	188 261
CELLSTAR® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)	227 261
CTAD-Vacutainer 2,7 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (DE)	367562
DNA LoBind Tube 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30108035
DNA LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30108051
DNA LoBind Tube 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30108078
Duran-Laborflaschen Duran GL 45, 1.000ml mit Schraubkappe	DWK Life Sciences, Wertheim (DE)	SD-0808
ep Dualfilter T.I.P.S.®, 2-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30078543
ep Dualfilter T.I.P.S.®, 2-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30078535
Eppendorf twin.tec® PCR Plate 96	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30133390
Eppendorf UVette® 220 nm – 1.600 nm	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	0030 106.318
Autoklavier-Folie	Wipak Walothén GmbH, Helsinki (FI)	EN 868-5
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, high profile, semi skirted	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)	HSS9601

Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)	MSB1001
Multiply® reaction tubes	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	72.735.002
Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg-Filtrationsgeräte mit PES-Membran	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)	10793344
Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg-Flaschenaufsatzfilter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)	169-0045
Nukleasefreies Wasser	Qiagen N.V., Hilden (DE)	129114
Pasteur Kapillar Pipetten, 150 mm	Wilhelm Ulbrich™ Pasteur Pipet	10390401
PCR-Cooler 0,2 mL	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	3881000015
Polypropylene Tubes - Round Bottom (14 ml, PP, 17/100 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)	187201
Protein LoBind Tube 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30108132
Protein LoBind® Tube 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	22431081
PVC-Schlauchstücke	PVC Schlauch FITT Cristallo Extra, transparent, Weich-PVC / PVC-P (Polyvinylchlorid)	–
S-Monovette® 1,4 ml 9NC; Citrat: 0,106 mol/l	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	61.668.001
S-Monovette® 2,7 ml; EDTA: 0,106 mol/l	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	51.167
S-Monovette® 9ml K3 EDTA: 1,6 mg/ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	21.066.001
S-Monovette®; 4,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	51.104.001
S-Monovette®; 9 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	21.726.001
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg (DE)	30120086
Safety-Multifly® 20 G	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	85.1637.201
Softsept® N Desinfektion	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (DE)	3887138
TipOne® Pipettenspitzen, 1.000 µl	STARLAB GmbH, Hamburg (DE)	S1126-7810
TipOne® Pipettenspitzen, 100 µl	STARLAB GmbH, Hamburg (DE)	S1123-1840
TipOne® Pipettenspitzen, 20 µl	STARLAB GmbH, Hamburg (DE)	S1120-1810
TipOne® Pipettenspitzen, 10 µl	STARLAB GmbH, Hamburg (DE)	S1121-3810
Titanplättchen	Institut Straumann AG, Basel (CH)	–
Schraubbecher 100 ml mit Schraubverschluss	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)	75.562.105

Tab. 7: Test- und Reagenzienkits.

Test- und Reagenzienkit	Hersteller	Artikelnummer
Asserachrom® β-TG ELISA	Diagnostica Stago, Parsippany (USA)	943
Aurum™ Total RNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	732-6820
ENDONEXT™ EndoLISA® Endotoxin Detection Assay	BioVendor GmbH, Heidelberg (DE)	609033
Enzygnost® TAT micro ELISA	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen (DE)	OWMG15
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)	1708890

MicroVue SC5b-9 Plus EIA ELISA	Quidel Corporation, San Diego (USA)	A029
PMN-Elastase-ELISA	Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel (DE)	DEH3311
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen N.V., Hilden (DE)	52304

Tab. 8: Geräte.

Geräte	Modellbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec-VE	Systec GmbH, Linden (DE)
Blutbildanalysegerät	Micros 60	Axon Lab AG, Baden-Dättwil (CH)
Brutschrank	Incubator TI-O	Incutec GmbH, Mössingen (DE)
Feinwaage	NewClassic ME403	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Mastercycler	Eppendorf-Cycler	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Mikroplattenleser	EON-Reader	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall (DE)
PCR-Sterilwerkbank	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (DE)
PCR-Reader	Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Pipette 0,5 - 10 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Pipette 10 - 100 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Pipette 100 - 1.000 µl	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt (DE)
Schüttelinkubatoren	Heidolph Polymax 1040, Heidolph Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (DE)
Sterilwerkbank	HeraSafe Heraeus	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen (DE)
Thermoblock	Eppendorf ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Ultrazentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Vortexer I	Bio Vortex V1	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (DE)
Vortexer II	Mixer Uzusio VTX-3000L	Laboratory & Medical Supplies, Brigachtal (DE)
Wasserbad	GFL 1083	GFL GmbH, Burgwedel (DE)
Zellzählgerät	CASY® Cell Counter+Analyzer	Roche Diagnostics GmbH (Innovantis), Mannheim (DE)
Zentrifuge I	Centrifuge MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Zentrifuge II	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Zentrifuge III	Cryofuge 5500i	Heraeus Group, Hanau (DE)
Zentrifuge IV	Varifuge 3.2RS	Heraeus Group, Hanau (DE)

Tab. 9: Sonstige Materialien.

Art	Modellbezeichnung	Hersteller
Boxen für Eppis	EPPi® KEA	National Lab GmbH, Mölln (DE)

Flüssigstickstoffbehälter	Dewar Transport Gefäß Typ 26 B	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk Schieder GmbH, Karlsruhe (DE)
---------------------------	-----------------------------------	--

Tab. 10: Software.

Software	Entwickler
CFX Manager	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
GraphPad PRISM	Graphpad Software, Inc. (USA)
SMART Servier Medical Art	Servier Deutschland GmbH, München (DE)

Tab. 11: Vor- und Rückwärtsprimer für die Immunmarker.

Immunmarker	Primersequenzen (5' bis 3')	Hersteller
GAPDH-Vorwärtsprimer	TCA ACA GCG ACA CCC ACT CC	ELLA Biotech GmbH, Martinsried (DE)
GAPDH-Rückwärtsprimer	TGA GGT CCA CCA CCC TGT TG	s.o.
CCL-2-Vorwärtsprimer	TCA TAG CAG CCA CCT TCA TTC	s.o.
CCL-2-Rückwärtsprimer	CTC TGC ACT GAG ATC TTC CTA TTG	s.o.
ICAM-1-Vorwärtsprimer	CTT GAG GGC ACC TAC CTC TGT C	MWG BioTech AG, Ebersberg (DE)
ICAM-1-Rückwärtsprimer	CGG CTG CTA CCA CAG TGA TG	s.o.
IFN- α -Vorwärtsprimer	CCT GCT ATA ACT ATG ACC ATG C	ELLA Biotech GmbH, Martinsried (DE)
IFN- α -Rückwärtsprimer	CAC AGT GTA AAG GTG CAC ATG ACG	s.o.
IFN- β -Vorwärtsprimer	TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AG	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg (DE)
IFN- β -Rückwärtsprimer	CGG AGG TAA CCT GTA AGT CTG TTA A	s.o.
INF- γ -Vorwärtsprimer	CTG CCA GGA CCC ATA TGT AAA	ELLA Biotech GmbH, Martinsried (DE)
INF- γ -Rückwärtsprimer	GTC ATC CTC CTC TTT CCA ATT CT	s.o.
IL-1 β -Vorwärtsprimer	CCC ACA GAC CTT CCA GGA GA	s.o.
IL-1 β -Rückwärtsprimer	CGG AGC GTG CAG TTC AGT G	s.o.
IL-6-Vorwärtsprimer	CAC ACA GAC AGC CAC TCA CCT C	s.o.
IL-6-Rückwärtsprimer	CTG CCA GTG CCT CTT TGC TG	s.o.
IL-8-Vorwärtsprimer	GAC TTC CAA GCT GGC CGT G	s.o.
IL-8-Rückwärtsprimer	CTC CTT GGC AAA ACT GCA CC	s.o.
TGF- β -Vorwärtsprimer	AAC AAG CCC AGA GAG GTT AAG	s.o.
TGF- β -Rückwärtsprimer	CCT GGC CTG AAC TAC TAT CTT	s.o.
TNF- α -Vorwärtsprimer	CCC AGG CAG TCA GAT CAT CTT C	s.o.
TNF- α -Rückwärtsprimer	GTT ATC TCT CAG CTC CAC GCC	s.o.

Ethikvotum: Die für diese Arbeit verwendeten Blutzellen und PBMCs sind humanen Ursprungs. Sie entstammen dem Blut freiwilliger, gesunder Spender, aus welchem sie mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden. Dieses Vorgehen fand in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki statt und wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen im Antrag Nr. 389/2021BO2 zustimmend bewertet.

2.2 Methoden

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Methoden und die Versuchsdurchführung vorgestellt. Zur Durchführung der einzelnen Versuche wurde ein eigenes Protokoll erarbeitet, das im Laufe der Experimente für alle Spender angewandt wurde.

2.2.1 Vorbereitung der Monovetten zur Blutentnahme

Zur Entnahme von PBMCs und Vollblut wurde venöses Blut in K₃-EDTA-beschichtete und heparinisierte Monovetten entnommen. Zur Gewinnung von Vollblut für die Hämokompatibilitätsprüfung wurden Neutralmonovetten mit einer NaCl-Heparin-Lösung befüllt, sodass die resultierende Konzentration 1,5 I. E./ml Blut entsprach. Die auf diese Weise heparinisierten Monovetten wurden bis kurz vor der Abnahme im Kühlschrank gelagert. Vor der Blutentnahme mussten diese Blutröhrchen wieder auf Raumtemperatur gebracht werden.

2.2.2 Auswahl der Spender für die Blutentnahme

Bei jedem Spender wurden nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über den Ablauf des geplanten Versuchs und mögliche Risiken der Blutentnahme durch den Prüfarzt 99 ml Blut (11 Monovetten zu jeweils 9 ml Volumen) entnommen. Als Studieneinschlusskriterien für Spender galten wie folgt: Neben körperlicher Gesundheit und aktuellem Wohlbefinden durften innerhalb der letzten 10 Tage keine gerinnungshemmenden Medikamente eingenommen worden sein. Hierzu zählte die Einnahme bestimmter NSAR wie ASS oder Ibuprofen sowie Antibiotika aus der Gruppe der Penicillin-Derivate [76-78]. Bei den Spenderinnen wurde zudem die Einnahme von oralen Kontrazeptiva sowie eine Schwangerschaft als Ausschlusskriterium betrachtet, um einen zusätzlichen Einfluss auf das Gerinnungssystem auszuschließen [79-81]. Insgesamt

umfasste die Kohorte 10 Spender deren Alter nicht zu weit voneinander abwich (Durchschnittsalter 31,3 Jahre) und in der die Geschlechter gleichmäßig verteilt waren. Für die Entnahme wurden bevorzugt die V. mediana cubiti oder V. cephalica als Entnahmestelle gewählt. Nach oberflächlicher alkoholischer Desinfektion der Punktionsstelle wurde mit einer Multifly-Kanüle der Größe 20 G unter Lösung der Stauung möglichst schonend das Blut abgenommen.

2.2.3 Hämokompatibilitätsprüfung verschiedener Testmaterialien

Da einige Medizinprodukte trotz der guten hämokompatiblen Eigenschaften zur einer Überreaktion des Immunsystems beim Empfänger führen können, sollen in dieser Studie die Vorgänge im Körper bei der Immunreaktion genauer betrachtet werden. Einen Überblick über den Versuchsaufbau mit den einzelnen Experimenten mit dem Vollblut gibt die Abb. 12.

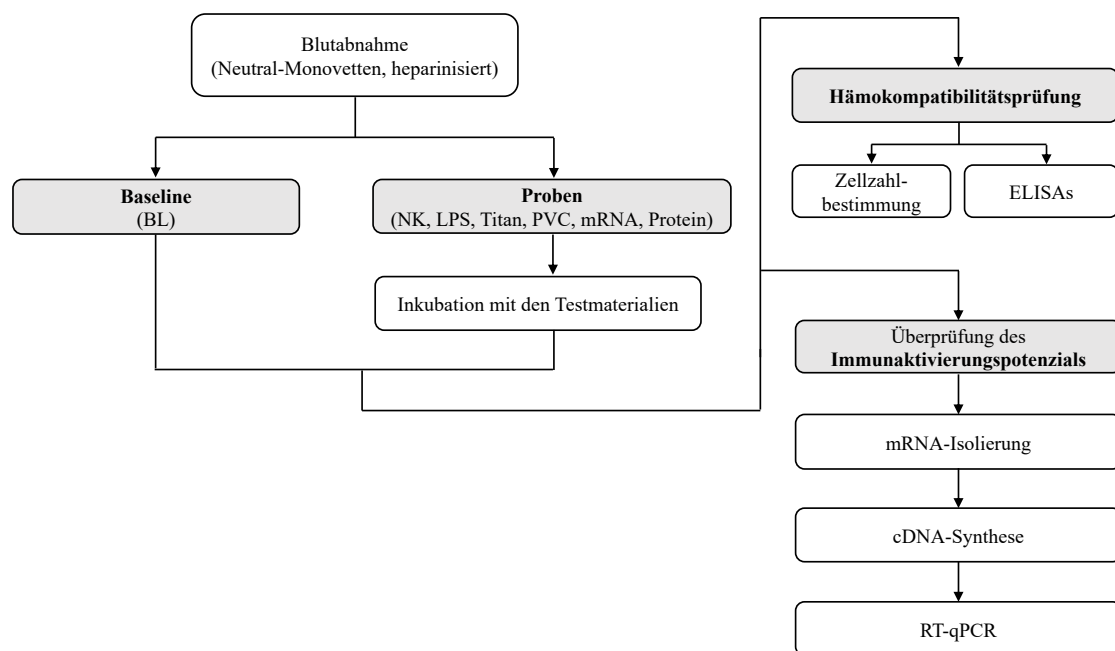


Abb. 12: Aufbau der Experimente der Blutversuche.

Zusätzlich zur Hämokompatibilität sollte daher eine mögliche Aktivierung des Immunsystems durch diverse Testmaterialien auf Genebene getestet werden. Dazu musste zuvor die mRNA aus den Blutbestandteilen isoliert werden. Mit dieser ließ sich im weiteren Verlauf die Expression immunologischer Markerproteine analysieren. In den folgenden Abschnitten werden die Testgruppen (Tab. 12) sowie die eingesetzten

Materialien vorgestellt, deren Hämokompatibilität nach gesetzlich vorgegebener Methode geprüft werden sollte.

Tab. 12: Testmaterialien für die Blutversuche.

Nr.	Probe	Material	Stamm- lösung	Wunsch- konzentra- tion	Zugabe Menge/ Volumen	absolute Zellzahl
0	Baseline (BL)	Blut direkt nach der Entnahme	-	-	-	in jeder Probe 7,5 x 10 ⁶ /ml
1	Negativ- kontrolle (NK)	Blut ohne Materialkontakt	-	-	-	
2	Positiv- kontrolle (LPS)	Lipo- polysaccharid	414,9 E.U./ml	2 E.U./ml	38,6 µl	
3	Titan	Titanplättchen	-	1 Plättchen	1 Plättchen	
4	PVC	PVC-Schlauch- stückchen	-	1 Stückchen	1 Stückchen	
5	mRNA	Cas9-mRNA	100 µg/ml	0,5 µg/ml	40 µl	
6	Peptid	Lugdunin	20 mg/ml (1:100)	0,2 µg/ml	8 µl	

Vorbereitung der Materialien: Für die Prüfung wurden zunächst die ausgewählten Testmaterialien präpariert: Diese waren ein Titanplättchen, ein PVC-Schlauchstückchen, eine Cas9-mRNA-Lösung sowie eine Lugdunin-Lösung. Um nachzuweisen, dass eine Immunreaktion im Spenderblut erzielt werden kann, wurde LPS aus der Zellwand von Bakterien als Positivkontrolle zur Stimulierung der Blut- und PBM-Zellen zugesetzt.

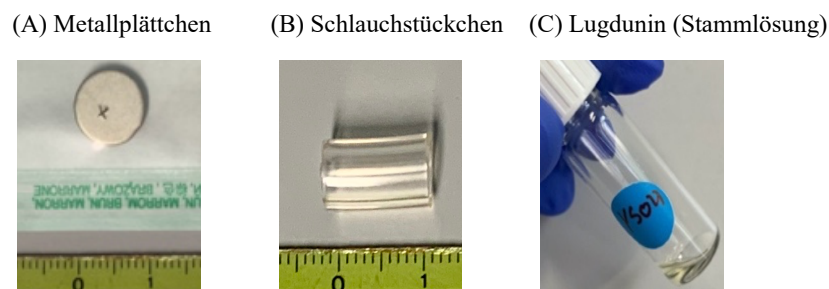


Abb. 13: Nahaufnahmen der Testmaterialien Titan, PVC und Lugdunin.

Abgebildet sind ein folienverschweißtes und autoklaviertes Titanplättchen (A) mit einem Durchmesser von 1 cm, ein desinfiziertes und steril getrocknetes PVC-Schlauchstück (B) mit den Maßen 1 cm x 0,5 cm sowie das in DMSO gelöste Lugdunin (C) in der Stammlösung (eigene Aufnahmen).

Die Plättchen aus maschinengepoliertem Titan des Härtegrads 5 mit kreuzmarkierter Unterseite (Abb. 13 A) wurden im Ultraschallbad gereinigt und anschließend per Dampfsterilisation (20 min, 121 °C) dekontaminiert. Die zugeschnittenen Schlauchstücke

(Abb. 13 B) wurden zur Reinigung 30 min im Ethanolbad (70 %) inkubiert und anschließend unter sterilen Bedingungen getrocknet und aufbewahrt. Die synthetische, für Cas-9-codierende mRNA wurde ausgehend eines Plasmids durch das *in-vitro*-Transkriptionsverfahren hergestellt und anschließend dephosphoryliert und aufgereinigt [10, 21]. Zur Reduktion der natürlichen Immunogenität wurden bei der Synthese die Nukleotid-Analoga 5'-Methylcytidin und Pseudouridin verwendet [21]. Die Verdünnungslösungen aus der LPS- sowie die Lugdunin-Stammlösung (Abb. 13 C) wurden vor jedem Durchgang frisch in der gewünschten Konzentration hergestellt.

Auswahl der Volumina oder Konzentrationen der Testmaterialien: Für die Versuche mit PBMCs sollten dieselben Mengen bzw. Konzentrationen des Testmaterials wie für die Testung im Vollblut verwendet werden. Daher wurde die PBMCs-Zellzahl so gewählt, dass sie der Blutzellzahl entspricht: Die gewählte Konzentration von $7,5 \times 10^6$ PBMCs/ml, lässt sich mit dem Konzentrationsbereich der Leukozyten ($4,0 - 11,0 \times 10^3$ Zellen/ μl = $4,0 - 11,0 \times 10^6$ Zellen/ml; \varnothing $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml) im menschlichen Blut vergleichen.

2.2.3.1 Durchführung der Hämokompatibilitätsversuche

Diese Hämokompatibilitätsprüfung gemäß DIN EN ISO 10993-4 wird angewendet, um die Wechselwirkung von Blut mit Fremdoberflächen zu analysieren und ist zur Prüfung von Medizinprodukten gesetzlich vorgeschrieben. Der Fokus dieser Prüfung liegt dabei auf dem Verhalten der Blutbestandteile und der Aktivierung des Gerinnungs- sowie Komplementsystems. Dabei umfasst die Analyse standardmäßig eine Testung von Zellpopulationen sowie verschiedene Markerproteine. Dazu zählen die Zahl der Blutzellen, Hämoglobin- sowie Hämatokritgehalt, Leukozytenmarker (PMN-Elastase), Thrombozytenmarker (β -TG), Marker für das Gerinnungssystem (TAT-Komplex) und die Komplementaktivierung (SC5b-9-Komplex).

Dafür wurde das heparinisierte Spenderblut in einem Sammelbecher gepoolt und damit anschließend sowohl verschiedene Monovetten befüllt um EDTA-, Citrat- sowie CTAD-Plasmen erzeugt, um die Ausgangswert (Baseline) zu ermitteln als auch die Round-Tubes, in denen sich die entsprechende Testmaterialien befinden (Abb. 14 A).

Die befüllten Probenröhrchen wurden anschließend unter dynamischer Inkubation für 2 h bei 37 °C auf der „Rocking platform“, dem Schüttelinkubator, inkubiert (Abb. 14 B).

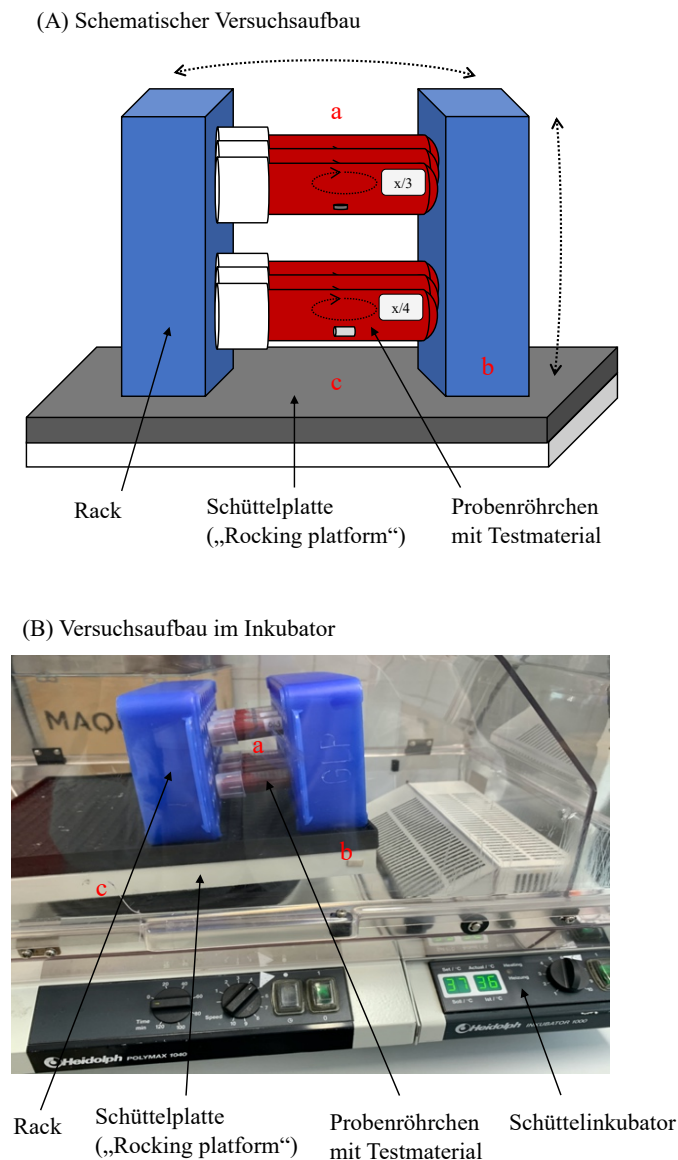


Abb. 14: Versuchsaufbau der Inkubation auf der „Rocking platform“.

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (A): Die Röhrchen (a) werden zwischen zwei Racks eingespannt (b). Die gestrichelten Pfeile zeigen die Bewegungsrichtungen der Schüttelplatte sowie des Bluts in den Round-Tubes an. Auf der Schüttelplatte (eigene Aufnahme, B) wurde das Blut mit den Materialien in den Round-Tubes unter Bewegung bei 37 °C inkubiert (c) (eigenes Schema, eigene Aufnahme).

Desweiteren wurde jeder Probe 1 ml des gepoolten Blutes für die anschließende mRNA-Isolierung entnommen. Dieser Wert diente auch an dieser Stelle als Baseline. Vom restlichen gepoolten Blut wurde parallel zur Inkubation 1 ml für die die anschließende

mRNA-Isolierung entnommen. Dieser Wert diente an dieser Stelle als Baseline in den gesamten Versuchen für die Hämokompatibilitätsprüfung. Alle Proben, sowohl die Baseline als auch die Proben nach der Inkubation, wurden auf die gleiche Weise verarbeitet.

Tab. 13: Antikoagulanzen bei der Hämokompatibilitätsprüfung.

Antikoagulans	Parameterbestimmung	Volumen	Zentrifugation	Aliquots	Lagerung
K ₃ -EDTA	SC5b-9	1,2 ml	4 °C, 2500 rcf, 20 min	3x 250 µl	-80 °C
Citrat	TAT, PMN	1,4 ml	RT, 1800 rpm, 18 min	6x 100 µl	-20 °C
CTAD	–	2,7 ml	4 °C, 2500 rcf, 20 min	700 µl	–
Neutralmonovette (700 µl CTAD)	β-TG	4,5 ml	4 °C, 2500 rcf, 20 min	3x 100 µl	-20 °C

Zuerst wurde das Blut in die kleinen EDTA-, Citrat- und CTAD-Monovetten umgefüllt und nach dem etablierten Protokoll der Arbeitsgruppe weiterverarbeitet (Tab. 13): In die Citratröhrchen wurden 1,4 ml Blut überführt und anschließend das Röhrchen fünfmal invertiert, bevor es für 18 min bei einer Geschwindigkeit von 1800 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Nach dieser Zentrifugation wurde das abgetrennte Citratplasma in 6 Eppendorfcups mit jeweils 100 µl aliquotiert und nach dem Schockfrieren in Flüssigstickstoff bei -20 °C gelagert. Das schnelle Einfrieren im Flüssigstickstoff garantiert ein schonenderes Gefrieren und somit längere Haltbarkeit der Probe. In die kleinen EDTA-Röhrchen wurden 1,2 ml Blut eingefüllt und nach fünfmaligem Invertieren die Blutparameter (Blutbild mit Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hb, Hkt) mit dem Zählgerät bestimmt. Danach wurden die Proben auf Eis für 15 min bis maximal 60 min inkubiert. Währenddessen wurden die gekühlten CTAD-Röhrchen aus dem Kühlschrank genommen und 2,7 ml Blut für jede der Proben in sie umgefüllt. Die Abtrennung des Plasmas der EDTA- und CTAD-Proben erfolgte gemeinsam in einer gekühlten Zentrifuge bei 4 °C für die Dauer von 20 min und einer Drehzahl von 2.500 rcf. Anschließend erfolgte das Aliquotieren des EDTA-Plasmas in 3 x 250 µl. Diese Proben wurden auch wieder in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Im Anschluss daran musste die CTAD-Probe erneut zentrifugiert werden: Dazu wurden 700 µl aus der mittleren Plasma-Fraktion entnommen und diese in eine kleine Neutralmonovette (4,5 ml Volumen) überführt. Danach erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt wieder bei derselben Drehzahl in der gekühlten

Zentrifuge für 20 min. Nach dem Ende der Zentrifugation wurden aus der mittleren Plasma-Fraktion 3x 100 µl entnommen und wie beschrieben aliquotiert, schockgefroren und bei -20 °C eingelagert. Das Plasma aller Proben wurde im weiteren Verlauf mithilfe von ELISA untersucht: Dabei wurde auf eine Aktivierung der Thrombozyten (β -TG), eine Aktivierung des Gerinnungssystems (TAT) und des Komplementsystems (SC5b-9-Komplementkomplex) sowie Leukozyten-Aktivierung (PMN-Elastase) getestet ^[82].

2.2.3.2 Enzymimmunoassay

Der Enzymimmunoassay (engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) ist eine antikörperbasierte Nachweismethode zur spezifischen und quantitativen Detektion von Proteinen ^[83]. Diese beruht auf dem Nachweis von Antikörper-Antigen-Bindungen unter Farbumschlag gekoppelter Enzyme. In dieser Arbeit kam diese Nachweismethode im Rahmen der Hämokompatibilitätsprüfung zur Anwendung: Durch spezifische ELISA-Kits verschiedener Hersteller konnten die Markerproteine des Gerinnungs- und Komplementsystems sowie einzelner Zellpopulationen quantifiziert werden. Die einzelnen Komponenten der ELISA und die Wellenlänge für die optische Messung sind in der folgenden Tab. 14 dargestellt:

Tab. 14: Komponenten der verwendeten ELISA.

Analyt	Plasma	1. AK	2. AK	Klonalität	Enzym	Substrat	λ (nm)
PMN-Elastase	Citrat	Mensch	Mensch	polyklonal	Peroxidase	TMB	450
TAT	Citrat	Kaninchen	Kaninchen	monoklonal	Peroxidase	OPD	492
β -TG	CTAD	Kaninchen	Kaninchen	monoklonal	Peroxidase	TMB	450
SC5b-9	EDTA	Maus	Ziege	monoklonal	Peroxidase	TMB	450

Die Durchführung und photometrische Quantifizierung des PMN-Elastase-ELISA erfolgte entsprechend dem Protokoll DEH3311 des Herstellers Demitec Diagnostics in der Version 2-10/12 (updated 121009) ^[84]. Die Bestimmung der Konzentration von TAT-Komplex im humanen Blut erfolgte mit dem Enzygnost® TAT micro (OMWGG15E0503(971)) der Firma Siemens in der Version 2015-01 ^[85]. Um die Konzentrationen an β -Thromboglobulin in den einzelnen Blutproben zu ermitteln, wurde der Asserachrom® β -TG-ELISA (REF00950) der Firma Diagnostica Stago in der Version vom Januar 2014 (DE4) verwendet ^[86]. Der SC5b-9-ELISA wurde mit dem Kit MicroVue SC5b-9 Plus EIA nach den Angaben des Herstellers Quidel nach dem

Protokoll 0980DE03 in der Version 2009/01 durchgeführt und mit chromatisch-optischen Messmethode ausgewertet ^[87].

2.2.4 Isolierung der mRNA aus humanem Vollblut

Ergänzend zur Analyse der hämokompatiblen Eigenschaften der Materialien sollte ebenfalls deren Immunaktivierungspotenzial auf genetischer Ebene untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde zuvor die mRNA mittels 2-Phasen-Reaktion als Isolationsmethode aus den Zellen des Vollbluts extrahiert: Diese Isolation erfolgte vor und nach der Inkubation mit dem Probenmaterial mithilfe des QIAamp® RNA Blood Mini Kit nach dem Protokoll „Purification of Total Cellular RNA from Human Whole Blood“ (Version 0233-004, letzte Überarbeitung 02/2021) ^[88]. Die so gewonnene mRNA wurde vor der Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Versuche mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Um zu verstehen, welche Immunreaktionen im Körper ausgelöst werden, sollen diese auf Ebene der Proteine und Gene betrachtet werden. Dabei ist wichtig zu unterscheiden, ob die Reaktionen unspezifisch über die Aktivierung des Komplementsystems bei Blutkontakt stattfinden oder ob es sich um spezifische Immunabwehrmechanismen durch PBMCs handelt. Eine Übersicht über die hierbei durchgeführten Experimente und deren chronologischen Ablauf gibt die Abb. 15.

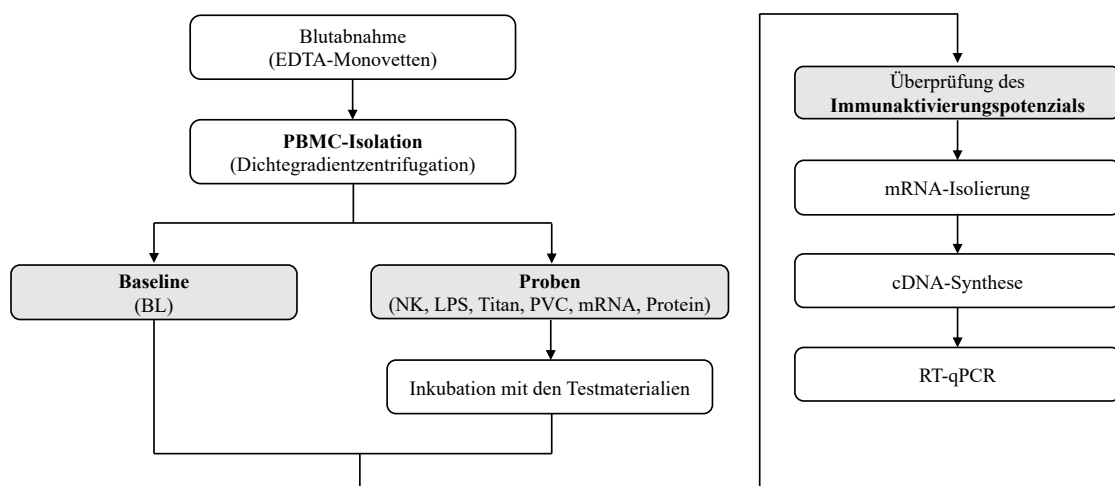


Abb. 15: Aufbau der Experimente mit den PBMCs.

2.2.5.1 Isolierung der PBMC aus dem Vollblut

Die für die Versuche verwendeten PBMCs werden durch die Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt (Abb. 16). Wie bereits zuvor das Vollblut werden auch sie mit den unterschiedlichen Testmaterialien anschließend für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Genexpression der ausgewählten Immunmarker mittels RT-qPCR untersucht.

Vorbereitung der Puffer und des Mediums für die Immunzellen: Zur Isolierung der PBMCs wurden verschiedene Lysepuffer und Reagenzien nach im Labor etablierten Rezepten (Tab. 2) angesetzt: Für den Erythrozyten-Lysepuffer wurden Ammoniumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat und Na₂-EDTA-H₂O in einem Liter Ampuwa gelöst, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Als weitere Lösung wurde PBS-1 mit 2 mM EDTA ebenfalls steril angesetzt und diese Lösung ebenfalls in der Kühlzelle gelagert. Daneben wurde eine zusätzliche auf PBS basierende Pufferlösung steril hergestellt (PBS-2). Diese Lösung wurde aufgrund des enthaltenen FC-Serums bei -20 °C gelagert. Als Medium für die Kultivierung der Zellen während der Inkubation mit den Testmaterialien wurde ein spezielles RPMI-Medium benötigt: Dazu wurden einer Flasche mit dem RPMI-Nährmedium humanes AB-Serum, L-Glutamin und Antibiotika wie Penicillin und Streptomycin sowie Heparin zugegeben. Dieses so hergestellte RPMI-2-Medium konnte im Kühlschrank gelagert bzw. für eine spätere Verwendung bei -20 °C als Aliquots eingefroren werden.

Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation: Für die Isolation der PBMCs wurde das Blut derselben freiwilligen Spender verwendet wie für die Hämokompatibilitätsprüfung, allerdings mit EDTA als Antikoagulans. Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter der sterilen Werkbank der Zellkultur statt: Für die Isolation der Immunzellen wurden in zwei 50-ml-Zentrifugengefäße jeweils 18 ml der PBS-1-Lösung vorgelegt. In jedes dieser Gefäße wurde nun 18 ml Vollblut gegeben und durch vorsichtiges manuelles Invertieren vermischt. In vier frischen 50-ml-Zentrifugengefäße wurden jeweils 18 ml des Histopaque-1077 vorgelegt. Darauf wurde das gleiche Volumen der Blutsuspension vorsichtig aufgeschichtet ohne die Lösungen zu vermischen (Abb. 16 A, B). Die geschichtete Suspension wurden anschließend bei 400 x g für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die einzelnen Blutbestandteile trennen sich dadurch entsprechend

ihrer Dichte im Vergleich zum Trägermaterial Histopaque® (Dichte: 1.077 g/ml) auf (Abb. 16 C, D).

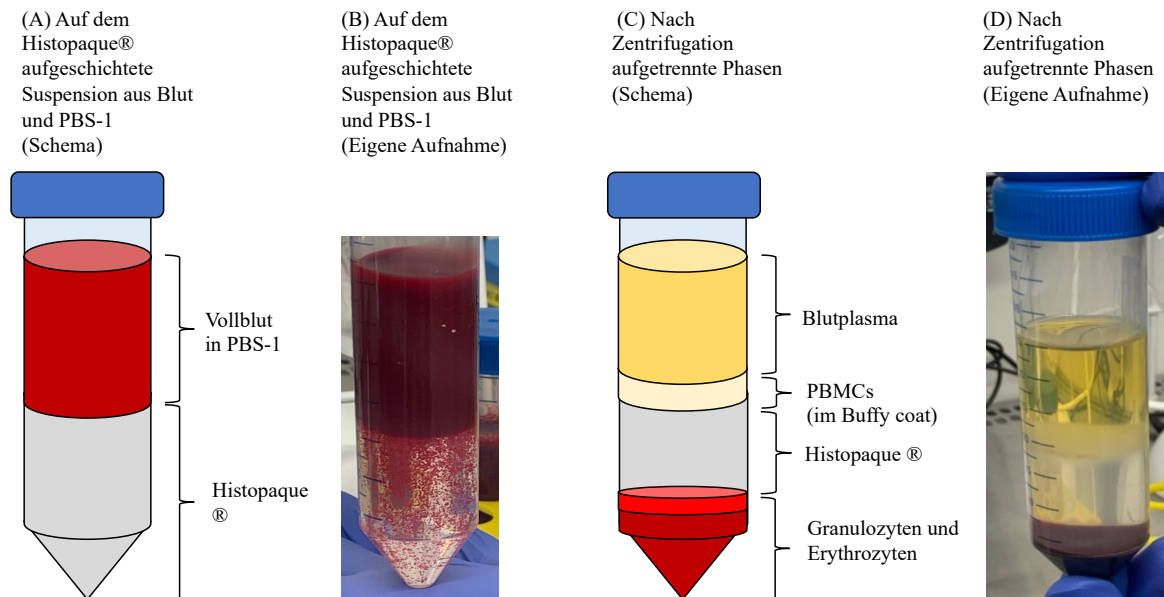


Abb. 16: Dichtegradientenzentrifugation.

Darstellung der auf dem Histopaque® aufgeschichteten Suspension aus Blut und PBS-1 als Schema (A) und Fotografie (B) sowie die nach Zentrifugation aufgetrennten Phasen als Schema (C) und Aufnahme (D). Unter der obersten Plasma-Schicht ist nach der Zentrifugation der „Buffy coat“ mit den enthaltenen PBMCs sichtbar (C, D) (eigenes Schema, eigene Aufnahme).

Nach der Zentrifugation der Suspension wurde mit einer Pasteurpipette die obere Schicht mit dem Blutplasma abgesaugt und verworfen. Danach konnte die mittlere Grenzschicht mit den PBMCs, der „Buffy coat“, vorsichtig abgenommen und in ein frisches steriles 50-ml-Reaktionsgefäß durch Pipettieren überführt werden. Danach wurden beide Gefäße mit der PBS-2-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt und durch Invertieren vermischt. Diese Gefäße wurden erneut bei einer Geschwindigkeit von 300 x g für 10 min zentrifugiert, bei diesem Durchgang mit Bremse. Der Überstand konnte anschließend wieder mit den Pasteurpipetten abgesaugt und verworfen werden. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet mit den isolierten PBMCs in 40 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Suspension bei 400 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wieder verworfen.

Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt für die Zellen, indem das Pellet mit 5 ml PBS-2 resuspendiert und in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt wurde. Dann wurden Zellen bei 300 x g für 10 min pelletiert, in 20 ml des RPMI-2-Mediums

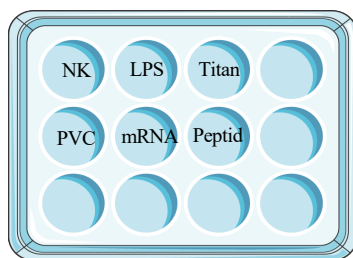
rsuspendiert und die Zellzahl bestimmt. In jedes Well der 12-Well-Platte wurden 15×10^6 Zellen gegeben und auf 2 ml Gesamtvolumen pro Well mit Medium aufgefüllt.

Tab. 15: Testmaterialien für die Versuche mit PBMCs.

Nr.	Probe	Material	Stamm- lösung	Zugabe Menge/ Volumen	absolute Zellzahl
0	Baseline (BL)	Blut direkt nach der Entnahme	-	-	In jeder Probe $7,5 \times 10^6/\text{ml}$
1	Negativkontrolle (NK)	Blut ohne Materialkontakt	-	-	
2	Positivkontrolle	Lipo- polysaccharid (LPS)	414,9 E.U./ml	38,6 μl	
3	Titan	Titanplättchen	-	1 Plättchen	
4	PVC	PVC-Schlauch- stückchen	-	1 Stückchen	
5	mRNA	Cas9-mRNA	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40 μl	
6	Peptid	Lugdunin	20 mg/ml (1:100)	8 μl	

In die einzelnen Wells der Platte wurden die verschiedenen Testmaterialien in der selben Menge wie im Blut zugegeben (Tab. 15) und die Materialien mit dem PBMCs für zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 -Gehalt im Brutschrank inkubiert (Abb. 17). Parallel zur Inkubation wurde zur Bestimmung der Ausgangswerte der PBMCs mit dem entsprechenden Volumen Zellsuspension erstellt und daraus direkt die mRNA gewonnen.

(A) Schematischer Versuchsaufbau



(B) Versuchsaufbau in der Well-Platte

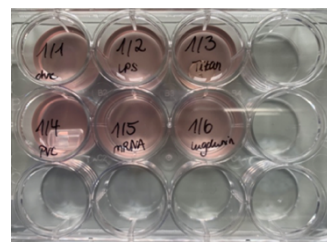


Abb. 17: Plattenbelegung der Well-Platte.

In der schematischen Darstellung (links) ist die Plattenbelegung zur Inkubation mit den Testmaterialien gezeigt, daneben die belegte 12-Well-Platte mit den PBMCs in RPMI-2-Zellkulturmedium (rechts) (eigenes Schema, eigene Aufnahme).

2.2.5.2 Isolierung der mRNA aus den PBMCs

Für die Isolation der mRNA aus den Immunzellen vor und nach der Inkubation wurde das Aurum™ Total RNA Mini Kit gemäß Herstellerangaben nach dem Spin Format Protokoll für kultivierte Zellen (Version 2926 Rev A, 028440203, Part #411-0134) für

kultivierte Zellen verwendet ^[89]. Die so aus den PBMCs gewonnene mRNA wurde bei -80 °C gelagert, bevor die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte.

2.2.6 Synthese der cDNA aus mRNA

Für die Echtzeit-PCR wird als Ausgangssubstrat DNA benötigt, welche mit der PCR-Technologie amplifiziert werden kann. Dazu musste die zuvor isolierte Zell-RNA die sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte mithilfe der Reversen Transkriptase (RT) nach Herstellerangaben mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad (Version INST 653 Ver D 4106228 (15-1170 0915)) in einem Thermocycler nach dem Temperaturprogramm ISCRIP (Tab. 16):

Tab. 16: Programm „ISCRIP“.

Syntheseschritt	Temperatur	Dauer
Priming	25 °C	5 min
Reverse Transkription	46 °C	20 min
RT-Inaktivierung	95 °C	1 min
Optional	4 °C	Hold

Im Anschluss konnte die so erzeugte cDNA bei -20 °C gelagert werden, bis die damit die RT-qPCR zur Untersuchung der Genexpression durchgeführt wurde.

2.2.7 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Um die Reaktionen der Blutzellen und der PBMCs auf Genebene nachvollziehen zu können, wurde mit der Methode der Echtzeit-basierten quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (Real-time quantitative Polymerase-Chain-Reaction, RT-qPCR) gearbeitet. Die genaue Quantifizierung der Expression der inflammatorischen Gene erfolgt anhand der ausgewählten Zytokine, die durch den Kontakt mit Implantatmaterial sowie den bioaktiven Beschichtungen ausgeschüttet werden.

Die RT-qPCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, in deren Verlauf diese Vervielfältigung der vorgelegten cDNA-Templates, in Echtzeit beobachtet und analysiert werden kann ^[90]. Die in dieser Arbeit verwendete Messmethode basiert auf dem Nachweis von SYBR®-Green, welcher sich bei Zugabe in das cDNA-Template einlagert. Dabei wird dieser Farbstoff mit dem genspezifischen Primern für jeden nachzuweisenden Immunmarker zu einem Hauptmix (Tab. 17) pipettiert.

Tab. 17: Zusammensetzung des „Hauptmixes“.

Reagenz	Volumen
SYBR Green	234 μ l
Primermix	81 μ l
Gesamtvolumen für n = 7 Proben	324 μ l = (n+2) x 36 μ l

Für die RT-qPCR wird als Ausgangssubstrat die synthetisierte cDNA benötigt, welche dem Enzym Polymerase als Vorlage für die DNA-Vervielfältigung dient. Dazu wird die cDNA im Verhältnis 1:10 in nukleasefreiem Wasser verdünnt. Parallel dazu wird der Hauptmix für den Gennachweis nach vorgegebener Zusammensetzung vorgelegt. Um den Forward- und Reverse-Primermix vorzubereiten, werden in einem Eppendorfcup 800 μ l nukleasefreiem H₂O vorgelegt und anschließend jeweils 15 μ l des Forward- und 15 μ l des Reverse-Primers zugegeben. Da jede DNA-Probe auf der Platte als Triplet aufgetragen wird, wurde hierfür in einem Eppendorfcup ein weiterer Mix vorgelegt. Dieser bestand aus 36 μ l des Hauptmixes und 18 μ l der verdünnten cDNA. Von diesem Probenmix wurden in jedes Well anschließend 15 μ l pipettiert. Für das Auftragen der Proben auf die Platte wurden Pipettenspitzen mit Dualfilter benutzt, um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Anschließend wurde die Platte mit einer adhäsiven Folie luftdicht verschlossen, um ein Verdampfen der Probe während des Aufheizens auf eine Synthesetemperatur von 95 °C zu vermeiden. Die Analyse der Platte erfolgte mithilfe des iCyclers CFX Connect Real-Time PCR System der Firma Bio-Rad. Als Protokoll (Tab. 18) diente ein Ablauf, welcher bereits zuvor erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert worden war:

Tab. 18: Protokoll für die RT-qPCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95 °C	3 min
2	95 °C	15 s
3	63 °C	30 s
4	72 °C	10 s
5	39 x Wiederholung der Schritte 2 bis 4	
6	70 °C – 95 °C	Erhöhung der Temperatur in 0,5 °C-Schritten für 10 s
7	15 °C	10 min

Als Gene für die Untersuchung waren die Immunmarker aus der Familie der Interleukine (IL-1 β , IL-6, IL-8) sowie Interferone (IFN- α , - β , - γ), das Adhäsionsprotein ICAM-1 sowie die Marker TNF- α , TGF- β und CCL-2 aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften ausgewählt worden. Zudem wurde die in allen Körperzellen vorkommende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen mit aufgetragen.

2.2.8 Auswertung der RT-qPCR-Fluoreszenzdaten

Die Expressionsstärke der ausgewählten Immunmarker wurden mithilfe der relativen Quantifizierung in der RT-qPCR bestimmt. Die Expression des „Housekeeping-Gens“ GAPDH diente bei der anschließenden Datenanalyse als Kontrollwert, an dem die relative Genexpressionen der anderen Immunmarker vergleichend gemessen wurden. Die schematische Darstellung der einzelnen gewonnenen Daten einer Quantifizierung der RT-qPCR-Analyse (Abb. 18) zeigt die zeitlich abhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität als Signale für GAPDH und für die Zielgene.

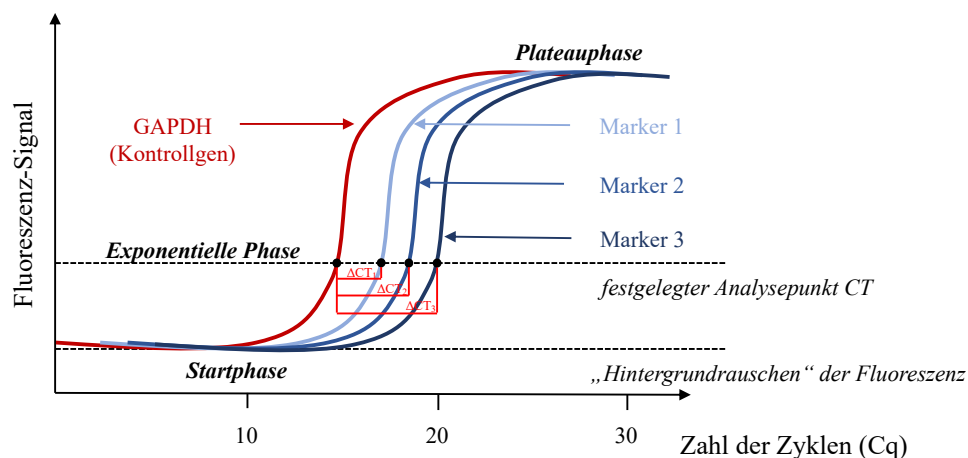


Abb. 18: Auswertung der relativen Quantifikation.

Dargestellt sind die auf Fluoreszenz des SYBR-Greens® basierenden Kurven für das Referenzgen GAPDH und die Zielgene sowie die einzelnen qPCR-Phasen (Start-, exponentielle und Plateauphase). Zudem ist der CT-Punkt zu sehen, der für die Berechnung der Genexpression ausschlaggebend ist (modifiziert nach ^[91]).

Die S-Form der Fluoreszenzkurven erklärt sich durch den Beginn des PCR-Programms in der Startphase, in dem noch wenige DNA-Stücke vorliegen und dem Erreichen einer Plateauphase am Ende der PCR ^[91]. Dazwischen befindet sich die exponentielle Phase, in der es zur eigentlichen Amplifikation der DNA-Bruchstücke kommt. In der Startphase

der qPCR ist die Menge der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente noch begrenzt und kann sich in der exponentiellen Phase unter optimalen Bedingungen verdoppeln. In dieser Phase erreicht das Fluoreszenzsignal durch exponentielle Vermehrung schließlich den im Programm vorgegebenen Analysepunkt des threshold cycle. An diesem Schwellenwert überstieg das Fluoreszenzsignal der Zielgene das Hintergrundrauschen. Nachdem die amplifizierte DNA-Menge einen solchen hohen Wert erreicht, dass die entstehenden PCR-Produkte miteinander hybridisieren, ist die Plateauphase erreicht: Bei einem Durchschnittswert abgelaufener Quantifizierungszyklen (Mean-Cq) von ≥ 30 Zyklen muss von einer unspezifischen Bindung der DNA-Fragmente ausgegangen werden. Je geringer der Vergleichswert ausfällt, desto höher sind die initial entstandenen spezifischen Kopien der DNA-Fragmente.

Die folgenden Formeln zeigen die Berechnungen des Expressions- und Cq-Wertes, mit denen die Software des Cyclers die Daten aus den Fluoreszenzkurven generiert:

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{Kontrollgen}) = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{GAPDH})$$

$$\Delta\Delta \text{ Relative Quantität} = \text{Effizienz}^{CT (\text{Kontrollgen}) - CT (\text{Zielgen})}$$

$$\text{Normalisierungsfaktor} = (\text{Relative Quantität 1} \times \text{Relative Quantität 2} \times \text{Relative Quantität n})^{(1/n)}$$

$$\text{Expressionslevel} = \text{Relative Quantität} / \text{Normalisierungsfaktor}$$

2.2.9 Statistische Datenauswertung

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche wurden mit GraphPad Prism (Version 8.0.1) statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Daten wurden zunächst auf Gauß-Normalverteilung geprüft und anschließend mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung auf die Mittelwerte (MW) der einzelnen Testgruppen und den Standardfehler ihres Mittelwerts (SEM) ausgewertet. Dabei wurde auf signifikante Unterschiede, insbesondere im Hinblick auf die zugehörigen Negativkontrollen, getestet. Nicht-normalverteilte Daten wurden mit dem Friedman-Test analysiert. Mithilfe dieser Varianzanalysen sollte untersucht werden, ob sich zwei oder mehrere Grundgesamtheiten hinsichtlich der Markerexpressionen der verschiedenen Proben signifikant voneinander unterscheiden. Für alle durchgeführten statistischen Testmethoden wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ bzw. auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Im nun folgenden Kapitel werden die Ergebnisse vorgestellt, welche bei den zuvor beschriebenen Versuchen erarbeitet wurden. Die venösen Blutentnahmen verliefen bei allen Spendern unauffällig und komplikationslos, sodass stets eine ausreichende Blutmenge für die Versuche gewonnen werden konnte. Das im Vorfeld erarbeitete Versuchsprotokoll konnte über den gesamten Ablauf der einzelnen Experimente in seiner ursprünglichen Form für das Kollektiv von zehn Probanden angewandt werden.

3.1 Hämokompatibilitätsprüfung der blutkontaktierenden Testmaterialien

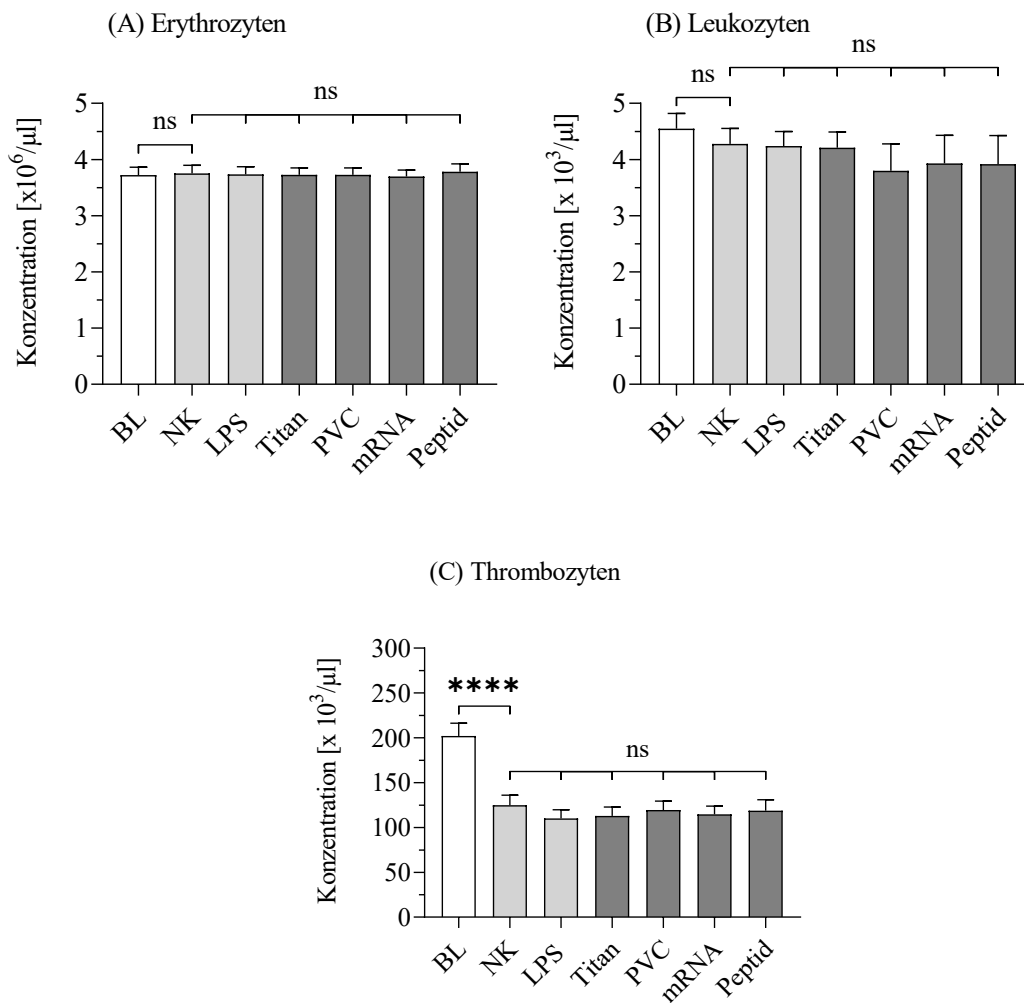
Die standardisierte Prüfung der Blutverträglichkeit der Testmaterialien erfolgte gemäß DIN *EN ISO* 10993-4 und umfasste neben der Messung verschiedener Zell- und Blutparameter auch die Durchführung von ELISAs zum Nachweis bestimmter Serinproteasen. Nach erfolgreicher Validierung des Prüfprotokolls wurden für jeden Blutspender zwei Einzelexperimente durchgeführt: Neben der Hämokompatibilitätsprüfung erfolgte die Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials der Testmaterialien in den Zellen des Vollbluts und den PBM-Zellen desselben Spenders. Dabei wurde auf zellulärer Ebene die Blutverträglichkeit von vier Testmaterialien (Titan, PVC, mRNA und Peptid) analysiert. Neben diesen Materialien wurde ein Blutröhrchen ohne Materialzusatz als Negativkontrolle (NK) und ein Röhrchen mit einer Probe von Lipopolysaccharid (LPS) als Positivkontrolle mit in den Versuch eingeschlossen. Die folgende Tab. 19 gibt einen Überblick über die in diesem Zusammenhang untersuchten Parameter und Analysemethoden.

Tab. 19: Aspekte der Testung der Hämokompatibilität.

Kategorie	Fokus	Parameter	Methode	Probenmaterial
Hämatologie	Blutbild, Hämatogramm	Zellzahlen und -populationen	Cell Counter	EDTA-Blut
Leukozyten	Zellaktivierung	PMN-Elastase	ELISA	Citrat-Plasma
Blutgerinnung	Gerinnungsparameter	Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)	ELISA	Citrat-Plasma
Thrombozyten	Zellaktivierung	β -Thromboglobulin (β -TG)	ELISA	CTAD-Plasma
Komplement-system	Komplement-aktivierung	Membranangriffs-komplex (MAC)	ELISA	EDTA-Plasma

3.1.1 Zellzahlen und -populationen

Bei der Messung der Zellparameter als eine der Hauptkomponenten der Hämokompatibilitätsprüfung wurde deren absolute Anzahl pro Mikroliter Vollblut durch den Cell Counter bestimmt (Abb. 19). Als weitere Parameter wurden neben diesen Zellpopulationen zusätzlich der Hämatokrit sowie der Hämoglobinwert bestimmt.



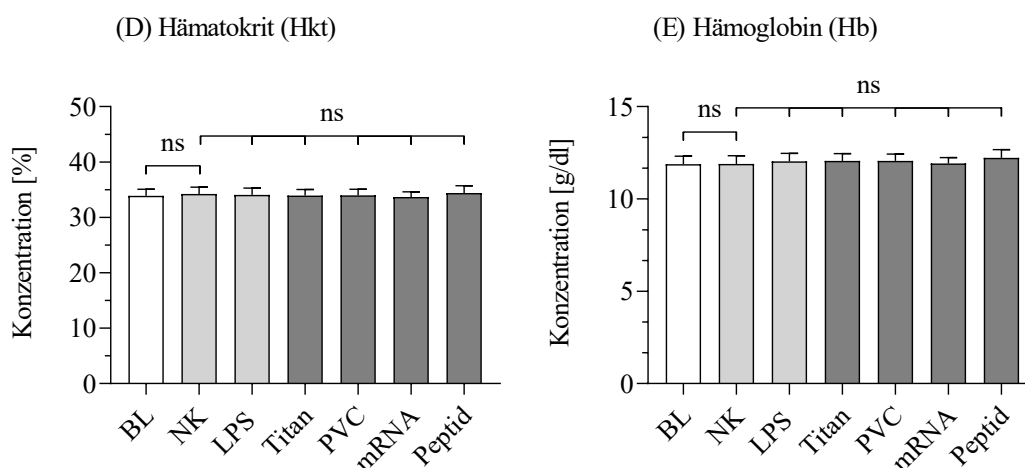


Abb. 19: Ergebnis des Hämatogramms.

Blutbildanalyse vor (BL) und nach Inkubation auf der „Rocking platform“ (NK, LPS, Titan, PVC, mRNA, Peptid) (Mittelwert \pm SEM, $n = 10$; **** $p < 0,0001$).

Dargestellt sind die Konzentrationen der einzelnen Zellpopulationen mit ihrer absoluten Anzahl in einem Mikroliter Vollblut, unterschieden nach Erythrozyten (A), Leukozyten (B) und Thrombozyten (C). In der Grafik der Blutplättchen (C) sind signifikante Unterschiede im Vergleich der BL mit der Negativkontrolle (NK) sicht- und messbar. Daneben sind der Hämatokrit-Wert (D) und die Hämoglobin-Konzentration (E) abgebildet. Auch darin sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) sichtbar.

Legende: (BL) Baseline, (NK) Negativkontrolle, (LPS) Positivkontrolle, (Titan) Titanplättchen, (PVC) Polymerstück, (mRNA) Cas9-mRNA, (Peptid) Lugdunin aus *Staph. lugdunensis*.

Als Referenzwert für die Bewertung gilt in den Versuchen dieser Arbeit die vor der Inkubation gemessene Baseline (BL). Diese wurde für Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten einzeln bestimmt und die einzelnen Proben der Kontroll- und Testmaterialien nach der Inkubation mit dieser Referenz verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 aufgelistet und der Vergleich des Testmaterials zur zugehörigen BL bewertet.

Tab. 20: Übersicht über die Parameter der Hämokompatibilitätsprüfung.

Parameter	Einheit	BL	NK	LPS	Titan	PVC	mRNA	Peptid	Bewertung
Erythrozyten	$10^6/\mu\text{l}$	3,724	3,755	3,735	3,729	3,729	3,700	3,782	✓
Leukozyten	$10^3/\mu\text{l}$	4,550	4,280	4,240	4,210	3,800	3,930	3,920	↓
Thrombozyten	$10^3/\mu\text{l}$	202,0	124,8	110,2	112,9	119,6	114,7	118,8	↓↓
Hämatokrit	%	33,90	34,21	34,05	33,95	33,98	33,67	34,41	✓
Hämoglobin	g/dl	11,88	11,90	12,04	12,06	12,06	11,92	12,22	✓

Bewertung im Vergleich zur Baseline als Referenzwert dieser Versuche (MW, $n = 10$), BL: Baseline; Legende: ✓ im Referenzbereich, ↓ erniedrigt, ↓↓ stark erniedrigt.

Erythrozyten: Die Analyse der Zellzahlen für die roten Blutkörperchen (Abb. 19 A) zeigte einen BL-Wert von $7,724 \pm 0,138 \times 10^6/\mu\text{l}$ als Referenz des Versuchs und ließ zudem

keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen (Titan ($3,729 \pm 0,127 \times 10^6/\mu\text{l}$) und PVC ($3,729 \pm 0,123 \times 10^6/\mu\text{l}$), mRNA ($3,700 \pm 0,141 \times 10^6/\mu\text{l}$)) erkennen: Die Erythrozytenzahl im Blut wurde, verglichen mit der Negativkontrolle ($3,755 \pm 0,142 \times 10^6/\mu\text{l}$) auch durch den Zusatz von LPS ($3,735 \pm 0,136 \times 10^6/\mu\text{l}$) nicht signifikant beeinflusst.

Leukozyten: Bei den Leukozyten (Abb. 19 B) war im Vergleich zur Negativkontrolle ($4,280 \pm 0,275 \times 10^3/\mu\text{l}$) ein leichter Abfall in der Gruppe von Titan ($4,210 \pm 0,281 \times 10^3/\mu\text{l}$) und PVC ($3,800 \pm 0,477 \times 10^3/\mu\text{l}$) sowie ein minimaler Anstieg bei mRNA ($3,930 \pm 0,501 \times 10^3/\mu\text{l}$) und Peptid ($3,920 \pm 0,505 \times 10^3/\mu\text{l}$) zu erkennen. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant, zeigten sich jedoch als Tendenz in den Messwerten. Als Referenzwert dieser Messungen diente die Baseline ($4,550 \pm 0,272 \times 10^3/\mu\text{l}$), welche die höchste Zellzahl für Leukozyten im Spenderblut aufwies. Der Wert für LPS lag mit $4,240 \pm 0,258 \times 10^3/\mu\text{l}$ nahe der Gruppen Titan und PVC.

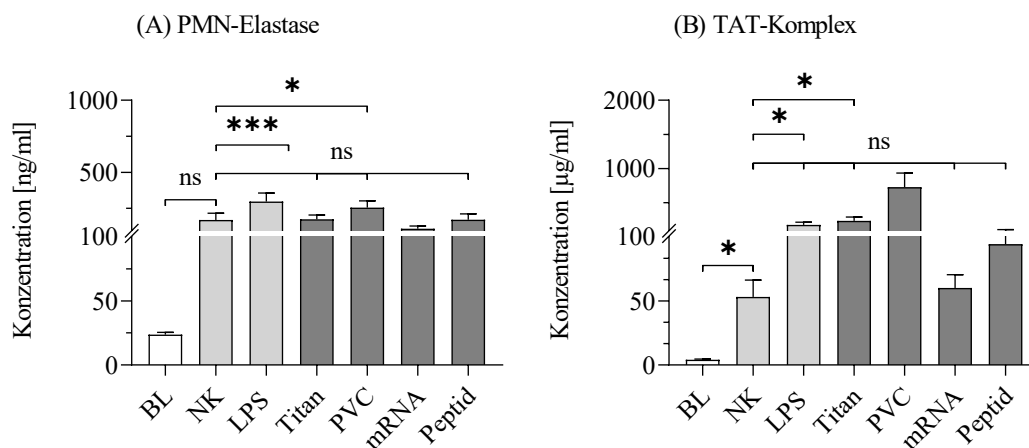
Thrombozyten: Bei den Thrombozyten (Abb. 19 C) fiel ein starker Abfall der Zellzahlen durch die Inkubation auf der „Rocking Platform“ auf: Der Unterschied zwischen Baseline ($202,0 \pm 14,20 \times 10^3/\mu\text{l}$) und NK ($124,8 \pm 11,27 \times 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,0001$) zeigte sich als statistisch signifikant. Darüber hinaus zeigte sich zudem eine deutliche, wenngleich nicht signifikante Reduktion der Zellzahl in Anwesenheit von LPS ($110,2 \pm 9,503 \times 10^3/\mu\text{l}$), verglichen mit der NK. Insgesamt waren die Thrombozytenzahlen der Testmaterialgruppen (PVC ($119,6 \pm 9,948 \times 10^3/\mu\text{l}$), Peptid ($118,8 \pm 12,22 \times 10^3/\mu\text{l}$), mRNA ($114,7 \pm 9,032 \times 10^3/\mu\text{l}$), Titan ($112,9 \pm 9,990 \times 10^3/\mu\text{l}$)) tendenziell geringer messbar als die der NK, was für einen Rückgang der freien Thrombozyten im Blut spricht. Diese Beobachtung erwies allerdings als statistisch nicht signifikant.

Hämatokrit (Hkt): Der Hämatokritwert beschreibt den zellulären Anteil des Bluts und kann je nach Geschlecht und Ernährungszustand des Blutspenders um wenige Prozent abweichen. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kontroll- und Testgruppen in diesem Versuch erwiesen sich als marginal (Minimum bei BL ($33,90 \pm 1,180 \%$), mRNA ($33,67 \pm 0,957 \%$), Maximum bei Peptid ($34,41 \pm 1,290 \%$); Titan ($33,95 \pm 1,08 \%$), PVC ($33,98 \pm 1,09$)) und waren statistisch nicht signifikant (Abb. 19 D). Dazwischen bewegten sich die Messwerte der NK ($34,21 \pm 1,26 \%$) und des LPS ($34,05 \pm 1,25 \%$), die sich beim Mittelwert und der Standardabweichung nur minimal voneinander unterschieden.

Hämoglobin (Hb): Die Anwesenheit der verschiedenen Testmaterialien führte zu keinen signifikanten Veränderungen des Hämoglobinlevels im Blut (Abb. 19 E) (Titan ($12,06 \pm 0,398$ g/dl), PVC ($12,06 \pm 0,365$ g/dl), mRNA ($11,92 \pm 0,317$ g/dl), Peptid ($12,22 \pm 0,448$ g/dl)). Allerdings fiel in den Messdaten der Mittelwerte der insgesamt leicht reduzierte Wert des Hämoglobins auf. Dennoch bewegten sich auch dieser Parameter über alle Gruppen hinweg um einen Median von 12 g/dl (BL ($11,88 \pm 0,434$ g/dl), NK ($11,90 \pm 0,437$ g/dl), LPS ($12,04 \pm 0,424$ g/dl) sowie der Wert der unterschritten diesen nur knapp und wiesen auch untereinander nur geringe Abweichungen auf.

3.1.2 Plasmatische Aktivierungsmarker

Als weitere Hauptkomponente der Hämokompatibilitätsprüfung wurden durch verschiedene ELISA-Verfahren aussagekräftige Parameter zur Aktivierung der Thrombozyten, Leukozyten sowie des Gerinnungs- und Komplementsystems bestimmt. Bei der Betrachtung der Werte der ELISA in Abb. 20 fiel zunächst auf, dass bei allen vier Analysen die Werte der NK deutlich von ihrer BL abwich. Insbesondere beim SC5b9- und β -TG-ELISA war diese Erhöhung der Plasmamarker als signifikant zu werten.



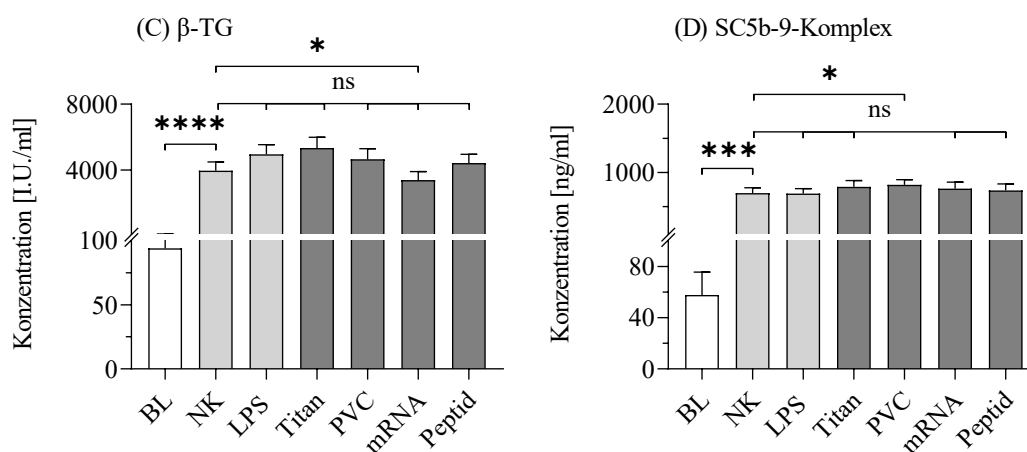


Abb. 20: Ergebnis der ELISAs.

Zum Nachweis der PMN-Elastase (A), des TAT-Komplexes (B), des β -TG (C) und des SC5b-9-Membranangriffskomplexes (D) wurden ELISAs aus dem Vollblut vor (BL) und nach Inkubation auf der „Rocking platform“ (NK, LPS, Titan, PVC, mRNA, Peptid) durchgeführt (MW \pm SEM, n = 10; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

In allen Grafiken der einzelnen ELISA sind statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) sichtbar, wobei in den Nachweisverfahren für PMN-Elastase, TAT und SC5b-9 auch Signifikanzen für einzelne Testmaterialien nachweisbar waren.

Eine Gegenüberstellung der signifikanten Konzentrationsanstiege oder -abfälle der Thrombozyten und Leukozytenmarker sowie Marker des Gerinnungs- und Komplementsystems in den ELISA sortiert nach Testmaterialien zeigt Tab. 21.

Tab. 21: Übersicht über die Parameter der ELISA.

Parameter	Einheit	BL	NK	LPS	Titan	PVC	mRNA	Peptid	Bewertung
PMN-Elastase	ng/ml	23,69	171,5	298,7	175,3	256,7	110,7	171,7	↑↑↑
TAT	μ g/ml	4,167	53,15	176,00	236,80	726,80	60,13	94,25	↑↑↑
β -TG	I.U./ml	94,192	3951,1	4952,0	5329,7	4654,6	3379,3	4414,0	↑↑↑↑
SC5b-9	ng/ml	57,767	697,52	692,68	791,56	820,22	764,28	738,1	↑↑↑

Bewertung im Vergleich zur Baseline als Referenzwert dieser Versuche (MW, n = 10), BL: Baseline; Legende: ↑↑↑ stark erhöht, ↑↑↑↑ sehr stark erhöht.

Polymorphonuklear-Elastase-(PMN)-ELISA: In dieser Analyse der PMN-Elastase unterschied sich die Probe mit LPS ($298,7 \pm 59,20$ ng/ml; p = 0,0003) signifikant von der Negativkontrolle ($171,5 \pm 46,54$ ng/ml) (Abb. 20 A). Die Grundlage für diese Messungen bildete die Baseline BL ($23,69 \pm 1,71$ ng/ml). Die Freisetzung der PMN-Elastase bei Kontakt zu Titan ($175,3 \pm 28,94$ ng/ml) war vergleichbar mit der NK. Bei Inkubation mit PVC stieg die PMN-Elastase-Sekretion jedoch deutlich und signifikant an ($256,7 \pm 46,32$ ng/ml; p = 0,0258). Der Ausschüttungslevel des Enzyms nach Blutkontakt mit dem Peptid

(171,7 ± 41,25 ng/ml) war ebenfalls mit der NK vergleichbar, wobei diese Probe gegenüber dem mit PVC-inkubierten Blut; $p = 0,0317$) statistisch signifikant weniger PMN-Ausschüttung provozierte. Daneben lag der Wert der Freisetzung von PMN-Elastase nach Inkubation des Blutes mit mRNA (110,7 ± 18,11 ng/ml) als einzige der Proben mit dem Testmaterial deutlich unter dem der NK (171,5 ± 46,54 ng/ml).

Thrombin-Antithrombin-Komplex-(TAT)-ELISA: Die Inkubation von Blut mit LPS führte zu einer Erhöhung des TAT-Spiegels (176,00 ± 39,95 µg/ml; $p = 0,0365$) verglichen mit der NK (53,15 ± 13,11 µg/ml), wie zu sehen in Abb. 20 B. Dieser Unterschied war zudem insignifikant in der Datenanalyse. Der Wert der am höchsten zu messenden Probe, dem mit PVC inkubierten Blut (726,80 ± 209,6 µg/ml) war der NK gegenüber erhöht, wobei Freisetzung von TAT-Komplexen nach dem Blutkontakt mit PVC-Stücken sogar den Wert der Positivkontrolle LPS überstiegen. Bei der Analyse der PVC-inkubierten Blutprobe (726,80 ± 209,6 µg/ml) fiel trotz der hohen Messwerte allerdings kein signifikanter Unterschied zu den Ausschüttungsleveln der NK-Probe (53,15 ± 13,11 µg/ml) auf. Hingegen zeigte sich die Abweichung der Probe mit Blutkontakt zum Titan (236,80 ± 54,18 µg/ml; $p = 0,0465$) als signifikant im statistischen Vergleich gegenüber der Leerprobe NK (53,15 ± 13,11 µg/ml) erhöht. Nach Kontakt der Blutzellen mit Peptid (94,25 ± 12,35 µg/ml) sowie mRNA (60,13 ± 10,30 µg/ml) waren die Enzymlevel für den TAT-Gerinnungskomplex ebenfalls gegenüber der NK moderat erhöht. Die Abweichung des Ausschüttungsniveaus aus der mit mRNA- sowie der mit Peptid-inkubierten Blutprobe ließ sich in der Varianzanalyse als statistisch signifikant abweichend ($p = 0,0298$) messen. Diese Werte standen einer nur sehr geringen TAT-Freisetzung in der Baseline-Kontrolle (4,167 ± 0,504 µg/ml) gegenüber, die gegenüber der Leerwert-Kontrolle (53,15 ± 13,11 µg/ml; $p = 0,0465$) signifikant erniedrigt war.

β-Thromboglobulin-(β-TG)-ELISA: Die Ausschüttung des Moleküls β-TG (Abb. 20 C) zeigt die Thrombozytenaktivierung an. Die Negativkontrolle (3951,1 ± 533,27 I.U./ml; $p < 0,0001$) ließ sich in dieser Analyse signifikant gegenüber der BL (94,192 ± 13,774 I.U./ml) erhöht nachweisen. Die Positivkontrolle LPS (4952,0 ± 586,38 I.U./ml) war gegenüber der NK (3951,1 ± 533,27 I.U./ml) gesteigert, jedoch nicht auf signifikantem Niveau. Besonders fiel an dieser Stelle erneut die mit Titan (5329,7 ± 658,15 I.U./ml) inkubierte Blutprobe auf: Sie überstieg sogar den Wert der Positivkontrolle LPS um mehr als 300 I.U./ml und war gegenüber der mit mRNA inkubierten Probe (3379,3 ± 522,84

I.U./ml; $p = 0,0016$) und auch gegenüber der NK ($3951,1 \pm 533,27$ I.U./ml; $p = 0,0436$) signifikant erhöht. Die Freisetzung von β -TG wird durch die verbleibenden Testmaterialien PVC ($4654,6 \pm 634,47$ I.U./ml), mRNA ($3379,3 \pm 522,84$ I.U./ml) und Peptid ($4414,0 \pm 534,28$ I.U./ml) zwar deutlich stimuliert, zeigen aber im Vergleich mit der NK keine statistisch signifikante Abweichung von dieser Kontrolle. Lediglich zwischen den Inkubationsproben der Testmaterialien PVC ($4654,6 \pm 634,47$ I.U./ml) und mRNA ($3379,3 \pm 522,84$ I.U./ml) bestand ein signifikanter Unterschied bei der β -TG-Ausschüttung zugunsten des PVC ($p = 0,0036$).

Membranangriffskomplex-(SC5b-9)-ELISA: Bei der Messung des SC5b-9 (Abb. 20 D), als Komponente der Komplementaktivierung, zeigte nur die Probe mit PVC ($820,23 \pm 75,623$ ng/ml; $p = 0,0303$) in der Gruppe der Testmaterialien einen signifikanten Konzentrationsunterschied im Vergleich zur NK ($697,52 \pm 81,234$ ng/ml). Diese Negativkontrolle war gegenüber der BL ($57,767 \pm 17,851$ ng/ml; $p = 0,0002$) statistisch relevant gesteigert. Der Kontakt zu Titan ($791,56 \pm 89,631$ ng/ml), mRNA ($764,28 \pm 93,999$ ng/ml) und Peptid ($738,01 \pm 95,127$ ng/ml) mit der Blutprobe resultierte in einem vergleichbaren SC5b-9-Anstieg wie bei der NK ($697,52 \pm 81,234$ ng/ml). Dennoch war der durch PVC-Kontakt-vermittelte Wert ($820,23 \pm 75,623$ ng/ml) der höchste für die Aktivierung des Komplementsystems in allen Testmaterialien. Während das LPS einen Wert von $697,52 \pm 81,234$ ng/ml erreicht hatte, überstiegen die Expressionen aller Testmaterialien diesen Wert der Positivkontrolle deutlich.

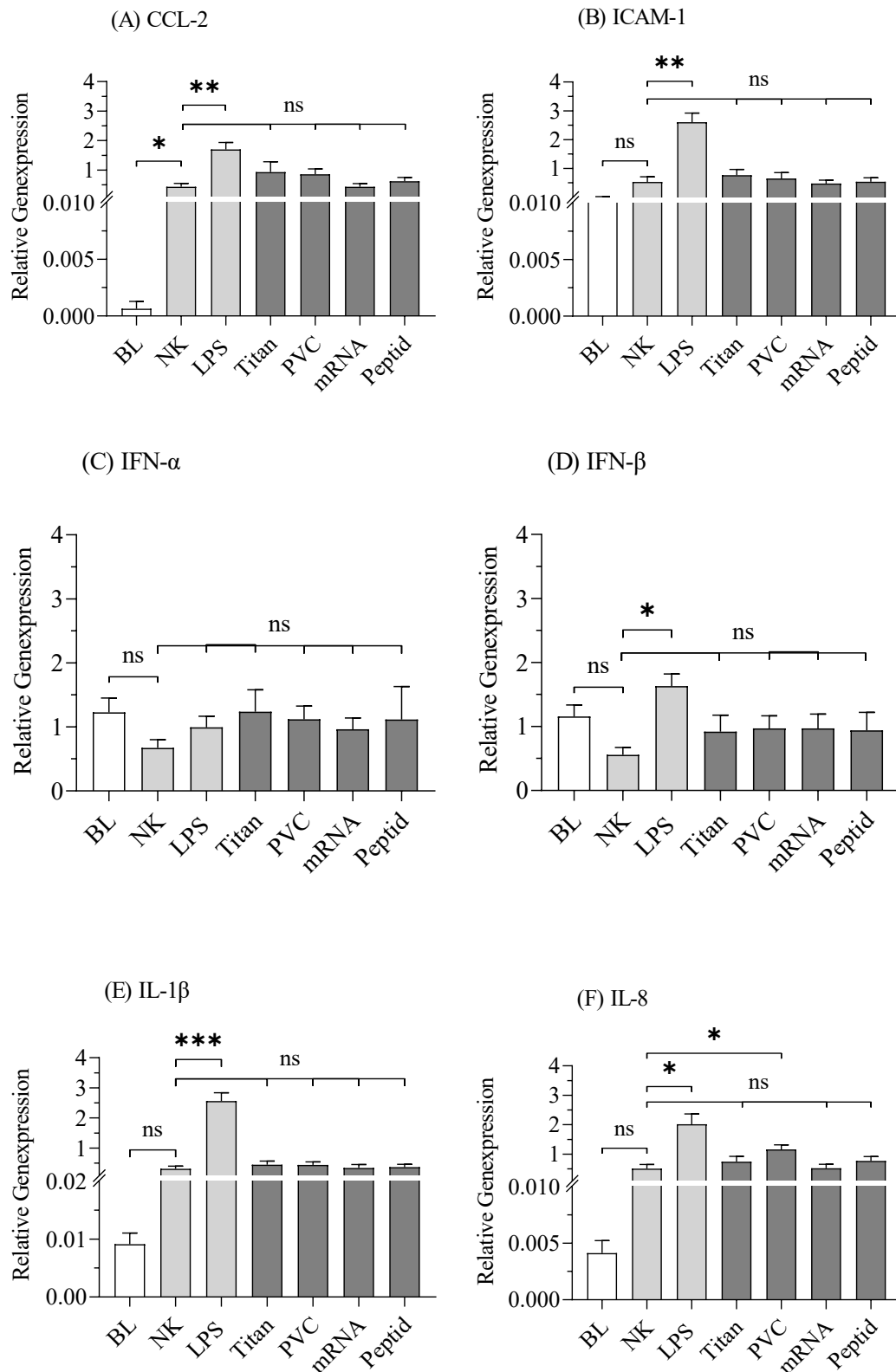
In dieser Untersuchung der plasmatischen Aktivierungsmarker fiel der deutliche Unterschied der Proteinexpressionen der ELISA-Nachweise bei PMN-Elastase und TAT-Komplex im Vergleich Expressionen der BL sowie mit den übrigen Testmaterialien wie PVC und mRNA auf. Bei Titan wurden im Vergleich mit den Kontrollgruppen hingegen beim Immunnachweis von TAT und SC5b-9 vermehrt ausgeschüttet. Für den β -TG-ELISA dominierte der Einfluss dieses Testmaterials die Effekte der übrigen Test- und Kontrollmaterialien deutlich, bei der NK, und mRNA war dieser Konzentrationsunterschied sogar statistisch signifikant. Eine besonders starke Expression beim Testmaterial PVC, verglichen mit der zugehörigen NK, zeigte sich beim Nachweis der PMN-Elastase und SC5b-9. Die Profile der synthetischen mRNA und Peptid fielen durch eine überwiegend geringere Enzymexpressionen auf, wenngleich statistische Signifikanzen fehlten.

3.2 Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials der Testmaterialien im Blut

Für den Nachweis der Genexpressionen der zehn Immunmarker aus der cDNA der Zellen des Vollbluts wurden $n = 8$ Spender in die Auswertung miteinbezogen. Nach der Analyse des Mean-Cq-Wertes und der zugehörigen Expressionslevel musste ein Spender aus der Wertung genommen werden, da die GAPDH als Kontrollgen einen zu hohen Mean-Cq über den Schwellenwert von 30,000 aufwies. Dieser Wert des Mean-Cq beschreibt die durchschnittliche Anzahl abgelaufener Quantifizierungszyklen. Überschreitet die Zahl dieser Zyklen den festgelegten, zuvor genannten Grenzwert von 30, muss von einer unspezifischen Bindung der DNA-Fragmente und falsch-hohen Expressionsdaten ausgegangen und diese aus der Varianzanalyse ausgeschlossen werden.

Weiterhin zeigten sich bei einem weiteren Spender sehr hohe Expressionslevel über einige Testgruppen, insbesondere in der Negativkontrolle, sodass ein Einfluss von immunaktivierenden Komponenten wie Medikation mit NSAR oder eine ablaufende Erkrankung auch dieser Spender aus der Varianzanalyse ausgeschlossen werden musste. Somit verblieben acht Spender aus dem ursprünglichen Spenderkollektiv in der Gruppe der Vollblutzellen. Nach der Durchführung der qPCR erwiesen sich die beiden Immunmarker IFN- γ und IL-6 für eine Untersuchung der Genexpressionen im Vollblut als ungeeignet. Diese waren bei der Analyse des Mean-Cq durch zu hohe Schwellenwerte und damit zu wenige konkret messbare Genexpressionen in der Polymerase-Kettenreaktion aufgefallen, welche nicht auf Anwendungsfehler bei der Durchführung der PCR zurückzuführen waren. Damit konnten die gemessenen Freisetzungsniveaus dieser Immunmarker nicht verwendet werden.

In den Zellen des Vollbluts wurden somit die Marker CCL-2 (A), ICAM-1 (B), IFN- α (C), IFN- β (D), IL-1 β (E), IL-8 (F), TGF- β (G) und TNF- α (H) auf ihre Expressionslevel untersucht (Abb. 21). Diese Werte sind dimensionslos und wurden in Relation zur Expression des „Haushaltsgens“ GAPDH berechnet.



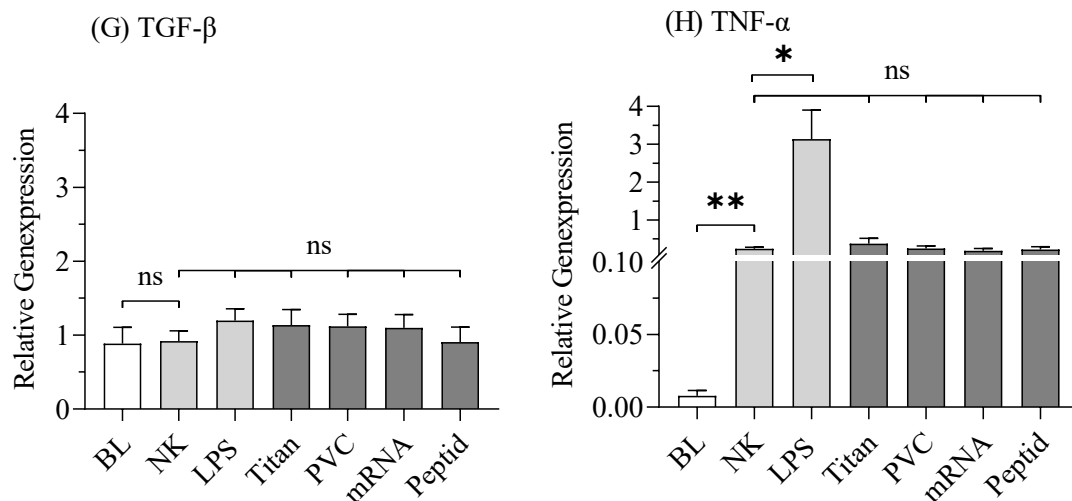


Abb. 21: Expressionswerte der verschiedenen Immunmarker im Blut.

Sortierung nach Kontroll- (BL, NK, LPS) und Testmaterialien (Titan, PVC, mRNA, Peptid). Die BL stellt den Wert vor der Inkubation dar, die übrigen Testgruppen wurden nach der zweistündigen Inkubation im Vollblut auf der „Rocking platform“ bestimmt. Dargestellt ist die Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle (NK). (MW \pm SEM, n = 8; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

In den Grafiken der Marker IFN- α (C), IFN- β (D) und TGF- β (G) sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) sichtbar, wohingegen die übrigen Marker CCL-2 (A), ICAM-1 (B), IL-1 β (E), IL-8 (F) und TNF- α (H) für einzelne Materialgruppen signifikante Expressionsunterschiede aufwiesen. Insbesondere die LPS-Expression ist hier signifikant gegen die Negativkontrolle (NK) erhöht.

CCL-2: Für den Immunmarker CCL-2 (Abb. 21 A) war dessen Expression für die Baseline-Probe ($0,001 \pm 0,001$) kaum nachzuweisen und wich somit deutlich von der NK ($0,431 \pm 0,114$; p = 0,0338) ab. In der weiteren Untersuchung war die CCL-2-Genexpression in der LPS-behandelten Blutprobe ($1,696 \pm 0,238$; p = 0,0079) im Vergleich zur NK signifikant erhöht. Als Trend erkennbar, wenngleich nicht signifikant, zeigte sich die Expression von CCL-2 bei Titankontakt ($0,913 \pm 0,348$), die bei diesem Testmaterial am höchsten ausfiel. Weiterhin folgten in absteigender Reihenfolge die Expressionslevel von PVC ($0,857 \pm 0,184$), Peptid ($0,620 \pm 0,131$) und mRNA ($0,432 \pm 0,109$) lag knapp über der Expression der NK ($0,431 \pm 0,114$).

ICAM-1: Im Experiment mit dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Abb. 21 B) war die Baseline nur äußerst gering nachweisbar ($0,011 \pm 0,008$). Daneben war die Positivkontrolle mit LPS-Stimulation ($2,602 \pm 0,319$; p = 0,0044) hochsignifikant gegen die NK ($0,527 \pm 0,181$) erhöht. Weiterhin zeigten die Messwerte die Tendenz an, dass die ICAM-1-Expression bei Titan am höchsten ($0,764 \pm 0,203$) ausfiel. Als übrige Testmaterialien stimulierten die PVC- ($0,650 \pm 0,201$), Peptid- ($0,536 \pm 0,136$) und

mRNA-Probe ($0,473 \pm 0,120$) eine deutlich geringere ICAM-1-Ausschüttung. Der Messwert des Peptids ($0,536 \pm 0,136$) hingegen lag nur gering über dem Wert der NK.

IFN- α : Die Werte des Immunmarkers IFN- α (Abb. 21 C) zeigen im Vergleich untereinander keine statistisch nachweisbaren Unterschiede (Titan ($1,239 \pm 0,340$), PVC ($1,120 \pm 0,205$), mRNA ($0,963 \pm 0,176$), Peptid ($1,115 \pm 0,516$)). Die Expressionen bei der BL ($1,226 \pm 0,226$) waren dennoch stark ausgeprägt messbar und lagen sogar weit über dem Wert für die NK ($0,673 \pm 0,128$) und dem LPS ($0,996 \pm 0,172$).

IFN- β : Das Interferon- β (Abb. 21 D) fiel durch ein bereits zu Versuchsbeginn stark erhöhtes Messniveau in der BL-Probe ($1,157 \pm 0,180$) auf. Die mit LPS-stimulierten Blutzellen ($1,631 \pm 0,189$) schütteten deutlich und auch statistisch signifikant mehr Interferon- β im Vergleich zur NK ($0,557 \pm 0,116$; $p = 0,0340$) aus. Der jeweilige Expressionslevel der vier Testmaterialien (mRNA ($0,971 \pm 0,224$), PVC ($0,972 \pm 0,196$), Peptid ($0,940 \pm 0,281$), Titan ($0,919 \pm 0,257$)) war im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant erhöht.

Die folgenden zwei Abbildungen 21 E und 21 F zeigen die Auswertungen für die Familie der Interleukine. Stellvertretend waren hierfür das IL-1 β (Abb. 21 E) und IL-8 (Abb. 21 F) als für den Nachweis in den Blutzellen ausgewählt worden:

IL-1 β : Beim Interleukin-1 β , einem endogenen Pyrogen (Abb. 21 E), zeigte sich die NK ($0,311 \pm 0,089$) gegenüber der Baseline ($0,009 \pm 0,002$) erhöht. Die Ausschüttung IL-1 β aus den mit LPS inkubierten Blutzellen ($2,559 \pm 0,277$; $p = 0,0006$) war im Vergleich mit der NK hingegen signifikant erhöht. Die IL-1 β -Expressionen aus Vollblutzellen nach dem entsprechenden Blutkontakt mit Titan ($0,448 \pm 0,117$), PVC ($0,438 \pm 0,101$), Peptid ($0,365 \pm 0,097$) und mRNA ($0,336 \pm 0,119$) überschritten alle, wenngleich nicht statistisch signifikant, den Messwert der Negativkontrolle.

IL-8: Als weiterer geeigneter Marker aus der Familie der Interleukine erwies sich das Interleukin-8 (Abb. 21 F), dessen Messwert der NK ($0,507 \pm 0,146$) im Hinblick auf nur gering ausgeprägte Baseline-Daten ($0,004 \pm 0,001$) deutlich gesteigert zu messen war. Entsprechend des Musters der anderen Immunmarker zeigte auch IL-8 einen signifikant erhöhten Wert für LPS ($2,014 \pm 0,355$; $p = 0,0120$) gegenüber der NK. Als einziges Testmaterial zeigte sich in der mit PVC inkubierten Probe ($1,16 \pm 0,158$, $p = 0,0436$) ein signifikant erhöhtes Ausschüttungsniveau im Vergleich mit der NK ($0,507 \pm 0,146$). Die

übrigen Proben aus der Gruppe der Testmaterialien (Peptid ($0,772 \pm 0,144$), Titan ($0,746 \pm 0,177$), mRNA ($0,519 \pm 0,133$)) zeigten sich eine zur NK nicht signifikant abweichende IL-8-Ausschüttung. In den Testgruppen konnte weiterhin im Vergleich mit dem Blutkontakt zu PVC ($1,16 \pm 0,158$, $p = 0,0041$) zur mRNA ($0,519 \pm 0,133$; $p = 0,0436$) und zum Peptid ($0,772 \pm 0,144$; $p = 0,0436$) eine jeweils signifikante Erhöhung der IL-8-Expression zugunsten des PVC gemessen werden.

TGF- β : Die ausgewerteten Expressionen des Immunmarkers TGF- β zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede der einzelnen Testgruppen (Titan ($1,137 \pm 0,209$), PVC ($1,119 \pm 0,162$), mRNA ($1,100 \pm 0,178$), Peptid ($0,907 \pm 0,201$)) im Vergleich zur NK ($0,921 \pm 0,139$) in der Varianzanalyse. Der Grafik in Abb. 21 G können die erhöhten TGF- β -Expressionen der einzelnen Testmaterialien entnommen werden: Nach der Inkubation des Blutes zeigt sich im Vergleich zur davor entnommenen Baseline ($0,885 \pm 0,220$) ein deutlicher Anstieg der TGF- β -Ausschüttung in der Probe der NK. Den höchsten Wert aller Gruppen zeigte die mit LPS inkubierte Blutprobe ($1,198 \pm 0,160$).

TNF- α : Als weiterer geeigneter Immunmarker konnte auch der TNF- α (Abb. 21 H) ausgewertet werden: Bei einem niedrigen Freisetzungslevel von $0,008 \pm 0,004$ in der BL-Probe zeigte die Blutprobe der NK ($0,242 \pm 0,042$; $p = 0,0041$) einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Ausschüttung aus den Zellen. Die Freisetzung dieses Faktors aus den mit LPS inkubierten Blutzellen ($3,14 \pm 0,765$; $p = 0,0273$) hingegen war gegenüber der NK sehr stark erhöht, was auch eine statistische Signifikanz nach sich zog. Wenngleich nicht statistisch signifikant, lässt die Verteilung der Messdaten erkennen, dass dieser Marker beim Blutkontakt mit den übrigen vier Testmaterialien (Titan ($0,377 \pm 0,141$), PVC ($0,254 \pm 0,066$), Peptid ($0,227 \pm 0,072$), mRNA ($0,193 \pm 0,057$)) auf ähnlich geringem Niveau ausgeschüttet wurde.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ließen sich für die einzelnen Immunmarker jeweils ein Testmaterial mit dem höchsten und dem geringsten Messwert für den Mittelwert nachweisen. Bei der Inkubation des Blutes mit dem PVC war ein statistisch relevanter Anstieg der IL-8-Ausschüttung im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle nachweisbar. Einen Überblick über die jeweiligen Immunmarker und das zugehörige Testmaterial mit der stärksten Expression des Markers gibt die Tab. 22.

Tab. 22: Genexpression der Immunmarker im Blut.

Marker	Testmaterial mit der höchsten Expression	Signifikanz zur NK	Testmaterial mit der niedrigsten Expression	Signifikanz zur NK
CCL-2	Titan	ns	mRNA	ns
ICAM-1	Titan	ns	mRNA	ns
IFN- α	Titan	ns	mRNA	ns
IFN- β	mRNA	ns	Titan	ns
IL-1 β	Titan	ns	mRNA	ns
IL-8	PVC	* p = 0,0436	mRNA	ns
TGF- β	Titan	ns	Peptid	ns
TNF- α	Titan	ns	mRNA	ns

Die Signifikanz bezieht sich auf die zugehörige Negativkontrolle NK der Population der Blutzellen (Vollblut, MW \pm SEM, n = 8; ns = nicht signifikant bei $p > 0,05$, * $p < 0,05$).

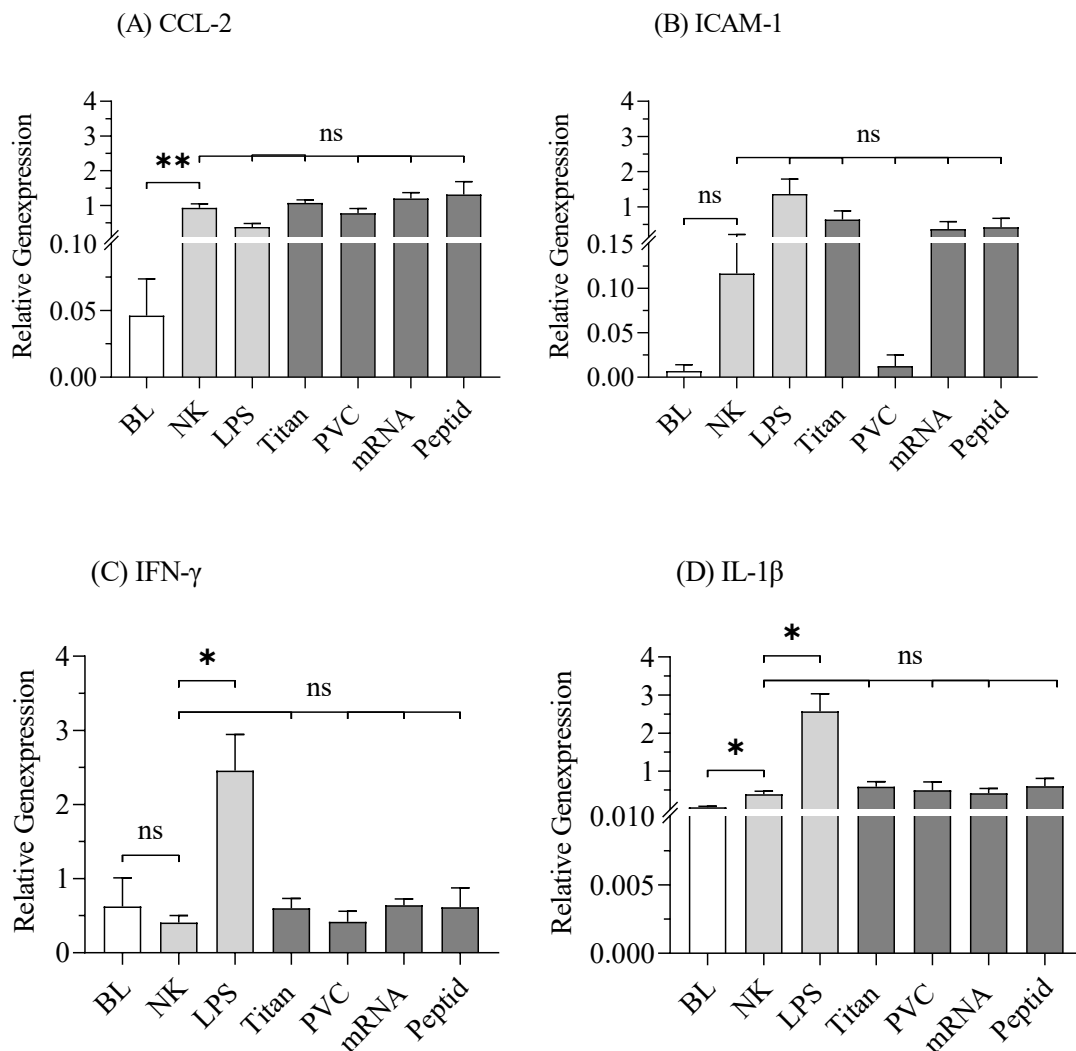
Hierin zeigt sich, dass in der Untersuchung der Zellen des Vollbluts bevorzugt eine Reaktion auf das Testmaterial Titan auftritt: Beim Kontakt mit dem Titan werden insbesondere die Marker CCL-2, ICAM-1, IFN- α , IL-1 β und TNF- α exprimiert. Die beiden verbleibenden Marker verteilen sich gleichmäßig auf die Testmaterialien PVC und mRNA beim IFN- β , IL-8 und TGF- β sind für das PVC bzw. mRNA höhere Immunmarkerausschüttungen messbar, wobei diese Expression bei IL-8 für PVC sogar statistisch signifikant war. Als Material mit der niedrigsten Immunmarker-Ausschüttung für die analysierten Marker fielen insbesondere die mit mRNA inkubierten Proben auf. Von dieser Beobachtung abweichend präsentierten sich nur die niedrige Freisetzung des Markers IFN- β nach Inkubation mit Titan und die durch das Peptid geringer stimulierte TGF- β -Ausschüttung in den Zellen des Vollbluts.

3.3 Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials der Testmaterialien in den PBMCs

Die Genexpressionen der zuvor schon im Vollblut analysierten Immunmarker konnten in dieser Zellpopulation bei sieben Spendern ausgewertet werden: So mussten zwei Spender aufgrund zu hoher Mean-Cq-Schwellenwerte ausgeschlossen werden, während ein weiterer Spender in der qPCR überschießende Markerexpressionen aus der PBMC-Population über alle analysierten Testgruppen hinweg zeigte, die teilweise hundert- bis tausendfach gegenüber den Werten der anderen Blutspender erhöht waren. Aus diesem

Grund konnte eine kürzlich abgelaufene oder latente Erkrankung mit einem kompromittierten Immunsystem oder eine übermäßige Manipulation der Zellen bei der Blutentnahme nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Analyse der qPCR erwiesen sich die beiden Interferone IFN- α und IFN- β aufgrund nur weniger generierbarer Messdaten als ungeeignet für die Genuntersuchung: In den PBMCs wurden die Marker CCL-2 (A), ICAM-1 (B), IFN- γ (C), IL-1 β (D), IL-6 (E), IL-8 (F), TGF- β (G) und TNF- α (H) auf ihre Expressionslevel untersucht (Abb. 22). Diese Werte wurden im Vergleich zur Freisetzung der GAPDH berechnet und sind dimensionslos.



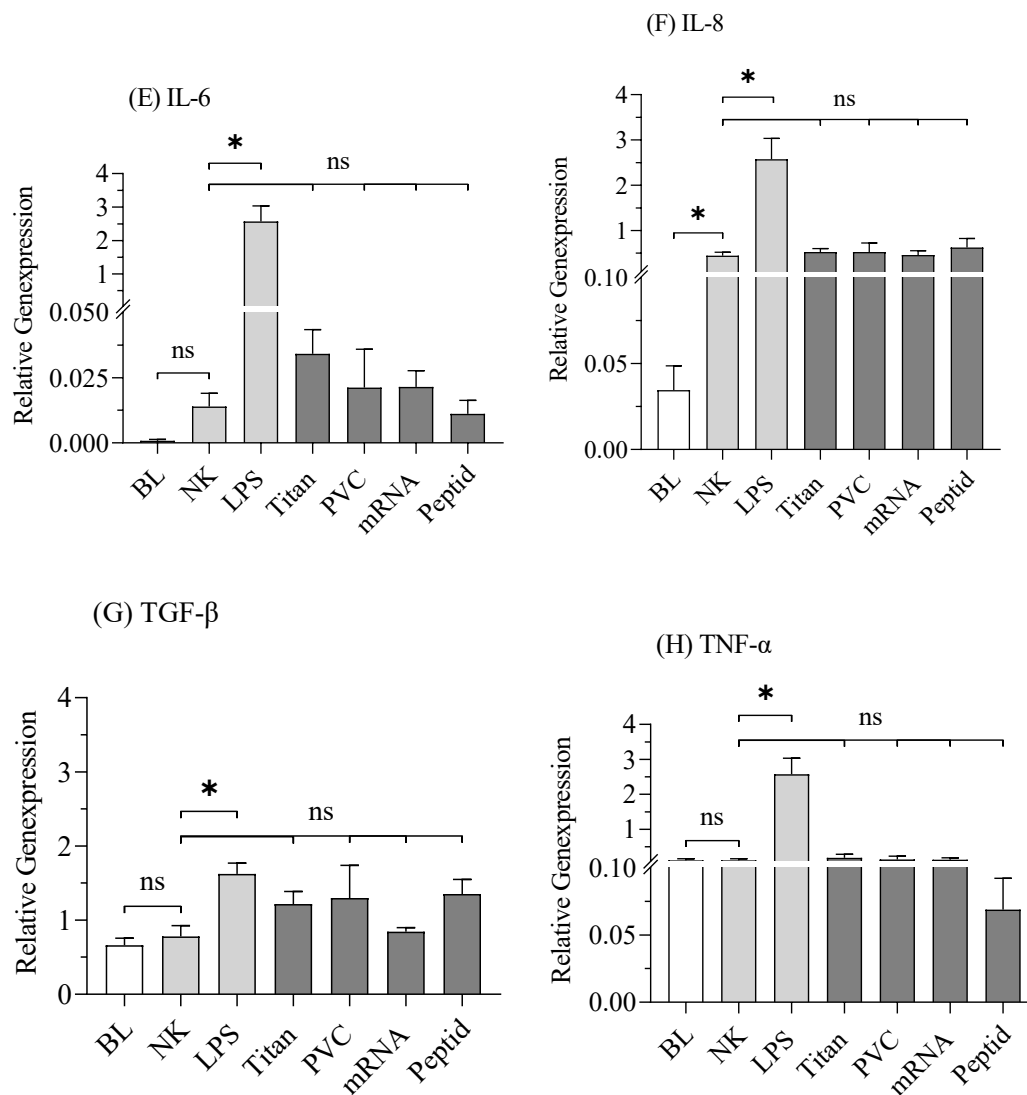


Abb. 22: Expressionswerte der Immunmarker in den PBMC.

Sortierung nach Kontroll- (BL, NK, LPS) und Testmaterialien (Titan, PVC, mRNA, Peptid) (MW \pm SEM, n = 7; * p < 0,05; ** p < 0,01). Die BL stellt den Wert vor der Inkubation dar, die übrigen Testgruppen wurden nach der zweistündigen Inkubation im Well im Zellinkubator bestimmt. Dargestellt ist die Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle (NK).

In der statistischen Auswertung der meisten Marker sind signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) sichtbar, wohingegen diese jedoch teilweise nur für die LPS-Expression nachweisbar sind. Eine signifikante Expressionserhöhung für die getesteten Materialien Titan, PVC, mRNA und Peptid sind deren Messwerte nicht statistisch relevant gegen den Leerwert (NK) erhöht.

CCL-2: Der Chemokin-Ligand CCL-2 (Abb. 22 A) zeigte mit einer Baseline von $0,046 \pm 0,028$ einen nur geringen Expressionslevel. Dem gegenüber war der Kontrollwert der zugehörigen NK ($0,929 \pm 0,118$; p = 0,0017) statistisch höher zu messen. Die Datensätze zeigten weiterhin eine nur schwache Expression für die mit LPS stimulierten PBMCs ($0,380 \pm 0,098$). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wiesen die übrigen Zellproben

nach der Inkubation mit den einzelnen Testmaterialien (Peptid ($1,313 \pm 0,375$), mRNA ($1,204 \pm 0,167$), Titan ($1,071 \pm 0,088$), PVC ($0,779 \pm 0,135$)) eine höhere Ausschüttung für den Chemokin-Liganden auf. Diese Vergleiche blieben jedoch erneut ohne statistische Signifikanz.

ICAM-1: Das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 (Abb. 22 B) zeigte nur geringe Messwerte für die BL ($0,007 \pm 0,007$). Eine solche geringe Genexpression für ICAM-1 konnte auch für die Inkubation der PBMCs mit dem Testmaterial PVC ($0,013 \pm 0,013$) gezeigt werden. Auf diese geringe Ausschüttung des untersuchten Adhäsionsmoleküls folgte eine geringfügig höher ausgeprägte Expression in der Leerprobe NK ($0,116 \pm 0,097$) nach der Inkubation in der Wellplatte ohne Kontakt zu anderen Materialien. Im Kontrast dazu konnte beim Vergleich mit dieser Probe eine erhöhte ICAM-1-Ausschüttung unter Stimulation mit LPS ($1,37 \pm 0,426$) nachgewiesen werden. In der Gruppe der Testmaterialien zeigte die mit Titan inkubierte Probe ($0,641 \pm 0,242$) die stärkste Expression dieses Signalproteins, wenngleich dies nicht statistisch zur NK messbar war. Daneben zeigten die PBMCs mit Kontakt zum Peptid ($0,419 \pm 0,252$) und zur mRNA ($0,369 \pm 0,207$) eine noch geringere ICAM-1-Ausschüttung als die übrigen Testmaterialien.

IFN- γ : In der Analyse in der PBMC-Zellpopulation erwies sich lediglich der γ -Subtyp der ausgewählten Familie der Interferone als ein geeigneter Marker zum Nachweis einer Genexpression (Abb. 22 C). Hierbei fiel jedoch bereits vor Inkubation der Proben ein hoher IFN- γ -Wert bei der Baseline ($0,624 \pm 0,388$) auf. Die Interferon-Ausschüttung nach der Anregung der PBMCs mit LPS ($2,457 \pm 0,488$; $p = 0,0463$) war hierbei signifikant zur Messung in der Probe der NK ($0,409 \pm 0,095$) erhöht. In den weiteren Messdaten ließ sich erkennen, dass sich bei den Expressionsleveln des Interferons nach Zellkontakt mit den Testmaterialien (Titan ($0,601 \pm 0,132$), mRNA ($0,641 \pm 0,086$), Peptid ($0,613 \pm 0,261$), PVC ($0,418 \pm 0,142$)) keine signifikanten Abweichungen zur NK zeigten.

IL-1 β : Beim Interleukin-1 β (Abb. 22 D) wies der Wert der NK-Probe ($0,395 \pm 0,082$) nach der Inkubation einen signifikanten Anstieg der IL-1 β -Ausschüttung im Vergleich mit der Baseline ($0,055 \pm 0,021$; $p = 0,0366$) auf. Dem gegenüber zeigte sich die zur NK-Probe ($0,395 \pm 0,082$) signifikant erhöhte Interleukin-Ausschüttung nach der Inkubation mit dem LPS ($2,574 \pm 0,458$; $p = 0,0166$). Unter den Messdaten der Testmaterialien

präsentierte die PBMC-Probe mit Kontakt zum Peptid ($0,607 \pm 0,205$) die stärkste IL-1 β -Expression, wenn auch diese Beobachtung im Vergleich zur NK wie bei den übrigen Testmaterialien (Titan ($0,593 \pm 0,134$), PVC ($0,501 \pm 0,221$), mRNA ($0,421 \pm 0,129$)) nicht signifikant in der Varianzanalyse ausfiel.

IL-6: In der Probe der BL des Immunmarkers IL-6 (Abb. 22 E) waren nur wenige Expressionswerte messbar ($0,0004 \pm 0,0003$). Der IL-6-Mittelwert der PMBCs nach Anregung mit dem Stimulans LPS ($2,574 \pm 0,458$) war auch bei diesem Marker signifikant gegenüber der zugehörigen Probe der NK ($0,014 \pm 0,005$; $p = 0,0159$) erhöht. Insgesamt stellten sich die Freisetzungsniveaus des IL-6 für die Testmaterialien als nur sehr gering dar: Die mit den Testmaterialien inkubierten Proben (Titan ($0,034 \pm 0,009$), PVC ($0,021 \pm 0,015$), mRNA ($0,021 \pm 0,006$), Peptid ($0,011 \pm 0,005$)) der PBMCs zeigen lediglich geringe und insignifikante von der NK abweichende Werte.

IL-8: Die IL-8-Expression (Abb. 22 F) der PBMC-Baseline ($0,035 \pm 0,014$) war gegenüber der inkubierten NK-Probe ($0,444 \pm 0,080$; $p = 0,0198$) signifikant erhöht. Auch bei diesem Immunmarker war der Wert nach LPS-Stimulation ($2,574 \pm 0,458$) im Hinblick auf die NK ($0,444 \pm 0,080$; $p = 0,0237$) statistisch relevant erhöht. Die Mittelwerte der Testmaterialien (Peptid ($0,609 \pm 0,201$), Titan ($0,525 \pm 0,076$), PVC ($0,525 \pm 0,198$), mRNA ($0,476 \pm 0,092$)) wichen im Grad ihrer jeweiligen IL-8-Freisetzung allerdings nur gering von der NK ab, sodass sich eine statistische Insignifikanz dieser Abweichungen zeigte.

TGF- β : Im Kontrast zu den zuvor beschriebenen Analysen der Immunmarker ist die durch die Materialien vermittelte TGF- β -Expression (Abb. 22 G) in der Probe des LPS nur gering ausgeprägt ($1,623 \pm 0,146$; $p = 0,0266$) und dennoch im Vergleich mit der Kontrollprobe NK ($0,780 \pm 0,146$) signifikant erhöht. Die verbliebene TGF- β -Freisetzung der Proben der übrigen Testmaterialien (Peptid ($1,354 \pm 0,195$), mRNA ($0,844 \pm 0,054$), PVC ($1,300 \pm 0,440$), Titan ($1,217 \pm 0,171$)) waren verglichen mit der entsprechenden NK nicht signifikant ausgeprägt.

TNF- α : Bei der Analyse von TNF- α (Abb. 22 H) fallen die insgesamt sehr geringen Genexpressionen für alle Proben, abgesehen vom LPS ($2,574 \pm 0,459$), auf. Während dieser Wert statistisch im Vergleich mit der NK ($0,109 \pm 0,049$; $p = 0,0130$) signifikant erhöht ist, blieben die Abweichungen der Testmaterialien (Titan ($0,183 \pm 0,010$), PVC

($0,139 \pm 0,092$), mRNA ($0,125 \pm 0,057$), Peptid ($0,069 \pm 0,023$)) untereinander und zur NK ohne statistische Signifikanz.

Aus den Datensätzen lässt sich für die gewählten Immunmarker jeweils ein Testmaterial identifizieren (Tab. 23), durch welches die Expression am stärksten gesteigert wird. Jedoch wiesen die Steigerungen im Vergleich zur Negativkontrolle keine statistische Signifikanz auf.

Tab. 23: Genexpression der Immunmarker in PBMCs.

Marker	Testmaterial mit höchster Expression	Signifikanz zur NK	Testmaterial mit niedrigster Expression	Signifikanz zur NK
CCL-2	Peptid	ns	PVC	ns
ICAM-1	Titan	ns	PVC	ns
IFN- γ	mRNA	ns	PVC	ns
IL-1 β	Peptid	ns	mRNA	ns
IL-6	Titan	ns	Peptid	ns
IL-8	Peptid	ns	mRNA	ns
TGF- β	Peptid	ns	mRNA	ns
TNF- α	Titan	ns	Peptid	ns

Die Signifikanz bezieht sich auf die zugehörige Negativkontrolle NK der Population der PBMCs (MW \pm SEM, n = 7; ns = nicht signifikant, p > 0,05).

In der Betrachtung dieser Übersichtstabelle ist dargestellt, wie bei der Reaktion der PBMCs mit den Testmaterialien die Verteilung der Marker mit der niedrigsten bzw. höchsten Genexpression der Immunmarker zu analysieren waren: Jene Testmaterialien, welche die höchsten Freisetzungsniveaus der einzelnen Immunmarker hervorrufen, verteilen sich auf das Titan, die mRNA und Peptid, wobei letzteres den Hauptanteil ausmacht und auf mehr als die Hälfte der getesteten Genmarker den stärksten stimulierenden Einfluss ausübt – zählt man noch das IFN- γ hinzu, bei welchem Lugdunin direkt nach mRNA die stärkste Immunmarkerexpression auslöste. Bei den Testmaterialien mit der geringsten Markexpression-Stimulation sind neben der erneut vertretenen Testmaterialien mRNA und Peptid auch das PVC zu finden. Es gilt hierbei dennoch zu beachten, dass keine der beschriebenen Beobachtungen von statistischer Signifikanz war.

3.4 Vergleich des Immunaktivierungspotenzials von blutkontaktierenden Materialien in den Zellen des Bluts und in den PBMCs

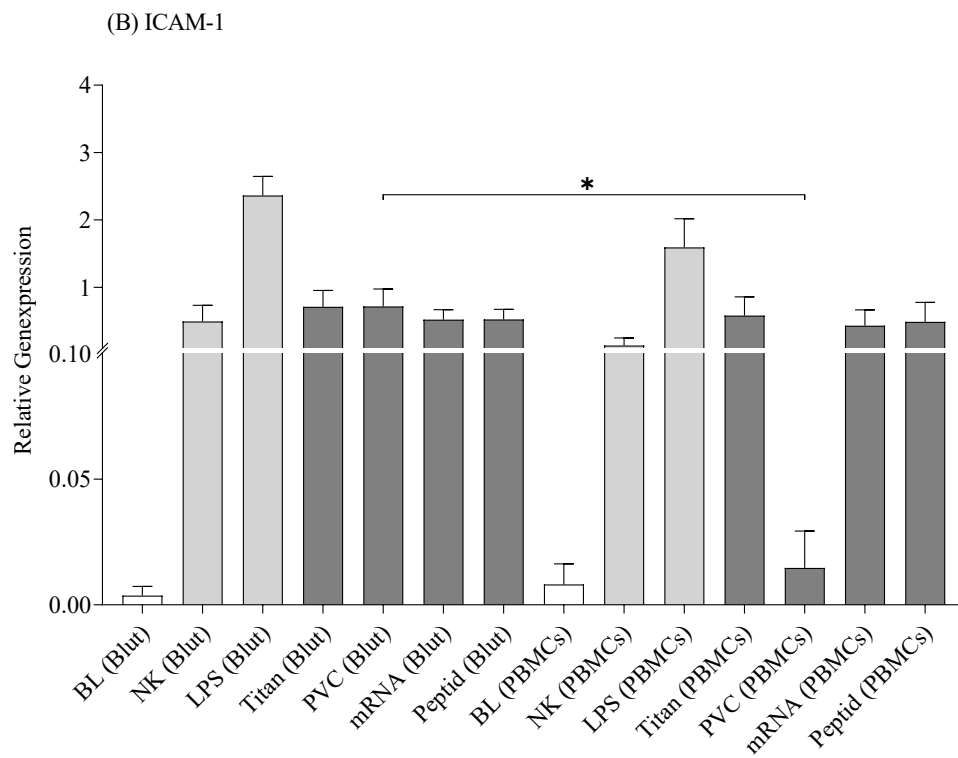
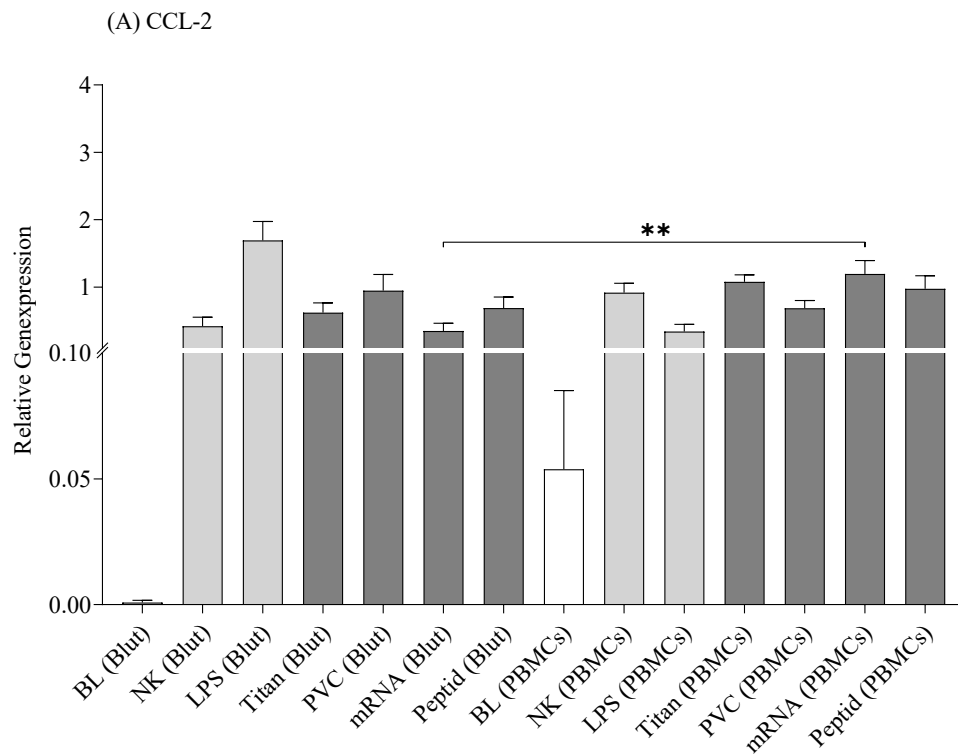
In diesem Abschnitt der Arbeit sollen nun die Einzelexperimente zur Analyse des Immunaktivierungspotenzials in den Zellen des humanen Vollblutes sowie in den PBMC-Zellen miteinander hinsichtlich der zuvor als geeignet identifizierten Immunmarker verglichen werden. Nach der oben beschriebenen Analyse der Genexpressionen, getrennt nach Vollblut und PBMCs, wurden fünf Immunmarker identifiziert, welche bei beiden Gruppen zuverlässige Expressionen gezeigt hatten: Diese Zielgene waren CCL-2, ICAM-1, IL-1 β , IL-8, TGF- β und TNF- α (siehe Tab. 24).

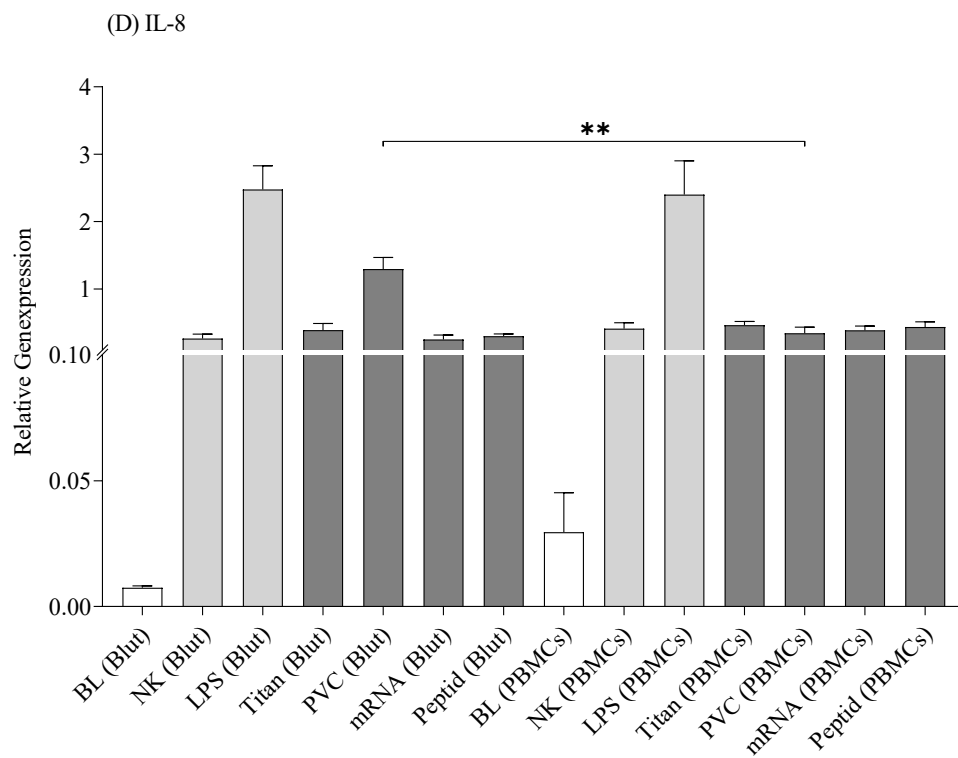
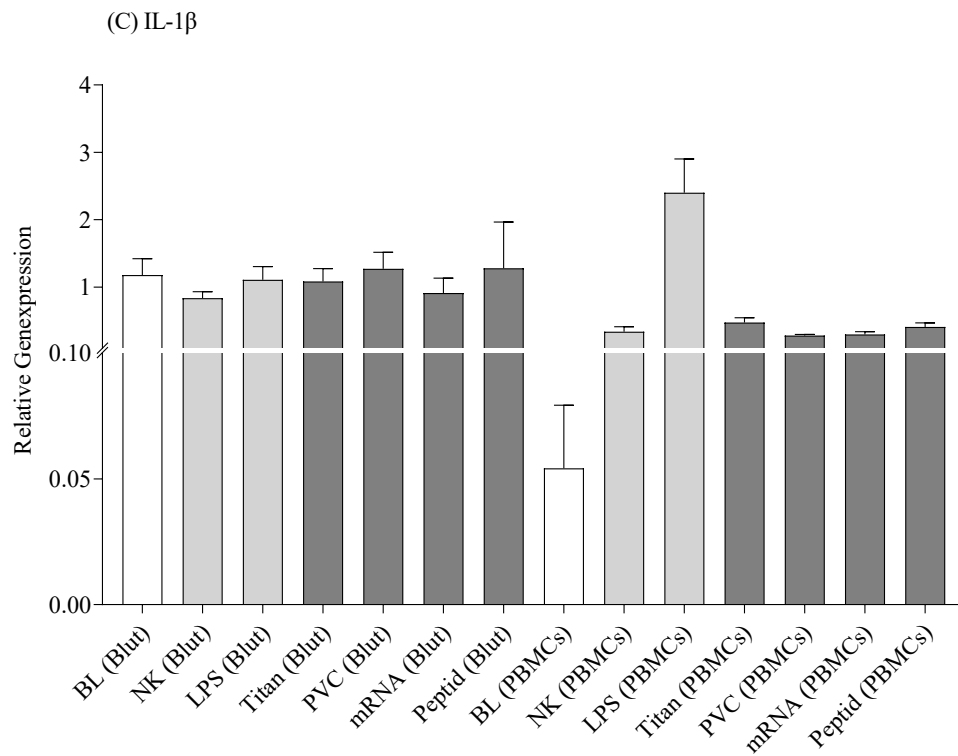
Tab. 24: Geeignete Marker für den Vergleich von Vollblut mit PBMCs.

Marker	Blut	PBMCs	Vergleich	Marker	Blut	PBMCs	Vergleich
CCL-2	✓	✓	✓	IL-1 β	✓	✓	✓
ICAM-1	✓	✓	✓	IL-6	x	✓	x
IFN- α	✓	x	x	IL-8	✓	✓	✓
IFN- β	✓	x	x	TGF- β	✓	✓	✓
IFN- γ	x	✓	x	TNF- α	✓	✓	✓

Legende: x = nicht geeignet; ✓ = geeignet

Um diese Marker in den Zellen des Bluts und den PBMCs vergleichen zu können, wurden nur sechs der ursprünglichen Blutspender eingeschlossen, welche schon zuvor zuverlässige GAPDH- und Immunmarker-Expressionen in den Einzelexperimenten gezeigt hatten. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Einzelexperimenten wurden die statistischen Unterschiede in diesem Abschnitt jeweils im Vergleich zum Testmaterial der anderen Zellpopulation untersucht: So wurden für jeden der Immunmarker die Ergebnisse der Proben von Titan, PVC, mRNA und Peptid aus Vollblut mit den Ergebnissen der Markerexpressionen nach Stimulation mit denselben Testmaterialien aus der Gruppe der PBMCs verglichen.





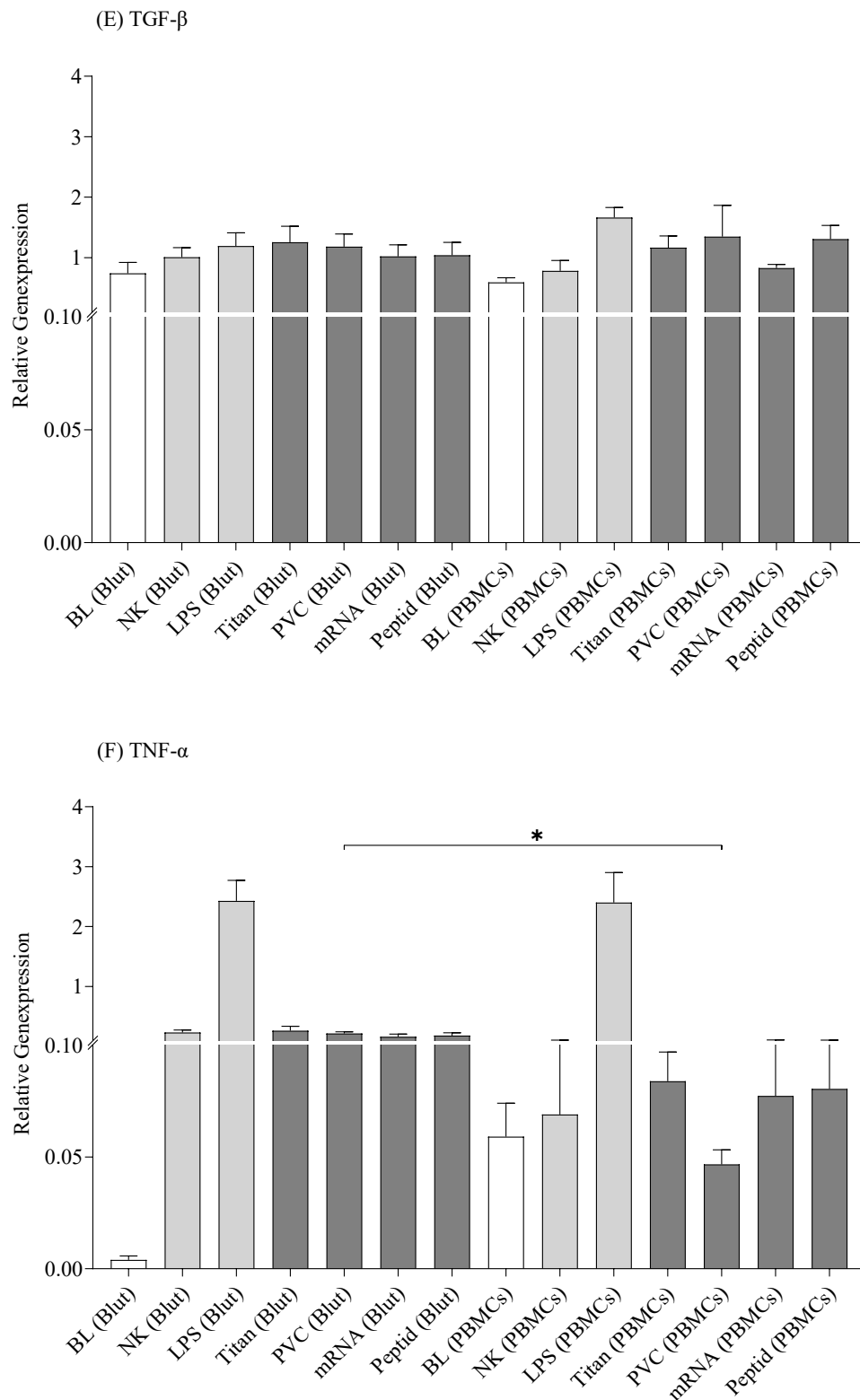


Abb. 23: Expressionswerte der Immunmarker in der Vergleichstestung.

Zu sehen ist die Signifikanz im Vergleich der beiden Zellpopulationen zueinander unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zum entsprechenden Testmaterial (Vollblut/PBMCs) (Mittelwert \pm SEM, n = 6; * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001).

CCL-2 (A), ICAM-1 (B), IL-1 β (C), IL-8 (D), TGF- β (E) und TNF- α (F). Die BL stellt den Wert vor der Inkubation dar, die übrigen Testgruppen wurden nach der zweistündigen Inkubation auf der „Rocking platform“ und im Well im Zellinkubator bestimmt. In den Grafiken aller Marker sind Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) insbesondere für die LPS-Expression sichtbar. Eine signifikante Expressionserhöhung im Vergleich der beiden Zellpopulationen für die getesteten Materialien zur zugehörigen NK zeigte sich für die analysierten Immunmarker CCL-2 bei mRNA-Kontakt sowie bei Inkubation mit PVC bei den Markern ICAM-1, IL-8 und TNF- α .

CCL-2: Im Vergleich der beiden Zellpopulationen hinsichtlich des Immunmarkers CCL-2 (Abb. 23 A) zeigen sich ein statistisch signifikanter Unterschied für die Positivkontrolle LPS (Blutzellen: $1,69 \pm 0,281$; $p < 0,0001$; PBMCs ($0,341 \pm 0,107$) und das Testmaterial mRNA (PBMCs: $1,20 \pm 0,197$, $p = 0,0020$; Blut: $0,349 \pm 0,114$), wobei das LPS in den Blutzellen und die mRNA in den PBMC die Freisetzung des CCL-2 stärker stimulieren als die andere Zellpopulation.

Der Wert der Baseline für diesen Marker war hingegen in beiden Populationen nur gering messbar (Blut: $0,0009 \pm 0,0009$; PBMC: $0,054 \pm 0,031$). Auch bei der NK (Blut: $0,421 \pm 0,132$; PBMC: $0,917 \pm 0,138$) zeigten sich im direkten Vergleich nach Zellpopulation keine statistisch relevanten Abweichungen. Insgesamt dominierte die CCL-2-Expression in der Zellpopulation der PBMCs (Titan: $1,078 \pm 0,104$, PVC: $0,686 \pm 0,114$, Peptid: $0,976 \pm 0,193$) die Ausschüttung dieses Immunmarkers aus den Vollblutzellen (Titan: $0,621 \pm 0,144$, PVC: $0,948 \pm 0,238$, Peptid: $0,688 \pm 0,166$).

ICAM-1: Für das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 (Abb. 23 B) zeigten die BL der Blutprobe ($0,004 \pm 0,004$) sowie der PBMC-Probe ($0,008 \pm 0,008$) nur geringe Expressionswerte. Auf diese Messwerte folgten in aufsteigender Reihenfolge die Leerproben NK des Bluts ($0,494 \pm 0,238$) und der PBMCs ($0,136 \pm 0,112$). Bei beiden Kontrollproben BL und NK für beide Zellpopulationen blieben die Unterschiede statistisch insignifikant. In der Gruppe der Testmaterialien fiel hingegen ein statistischer signifikanter Unterschied zwischen den Zellpopulationen für die Inkubation mit PVC auf: Während die mit Blutzellen inkubierte PVC-Probe einen Messwert von $0,717 \pm 0,258$ aufwies, erreichte diese Messung in den PBMCs lediglich eine Expression von $0,015 \pm 0,015$ ($p = 0,0498$). Auch die Abweichungen der anderen Testmaterialien zueinander blieben ohne statistische Signifikanz (Blut: Titan ($0,710 \pm 0,242$), mRNA ($0,521 \pm 0,146$), Peptid ($0,522 \pm 0,150$); PBMCs: Titan ($0,494 \pm 0,228$), mRNA ($0,431 \pm 0,234$), Peptid ($0,489 \pm 0,286$)).

IL-1 β : Beim Interleukin-1 β (Abb. 23 C) waren in der Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen der Blut- und PBMC-Population sichtbar geworden. In der grafischen Darstellung zeigten sich ähnliche, beinahe symmetrische, Konfigurationen der Diagrammbalken von Blut und PBMCs. Dies galt insbesondere hinsichtlich des erhöhten LPS-Wertes und der gering exprimierten IL-1 β -Werten der einzelnen Materialien: Die IL-1 β -BL des Blutes ($0,008 \pm 0,0007$) wie auch der PBMCs ($0,054 \pm 0,025$) zeigte nur eine sehr geringe Expression des Markers. Ähnlich verhielten sich die Proben der NK (Vollblut: $0,264 \pm 0,065$); PBMCs: $0,034 \pm 0,072$) und des LPS (Vollblut: $2,478 \pm 0,350$, PBMCs: $2,401 \pm 0,502$). Bei der Analyse des IL-1 β waren unter den einzelnen Materialgruppen im Vergleich nach Zellpopulationen keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennbar (Vollblut: Titan ($0,390 \pm 0,096$), PVC ($0,391 \pm 0,076$), mRNA ($0,251 \pm 0,065$), Peptid ($0,301 \pm 0,033$); PBMCs: Titan ($0,473 \pm 0,072$), PVC ($0,280 \pm 0,018$), mRNA ($0,297 \pm 0,041$), Peptid ($0,408 \pm 0,060$)). Ebenso waren die Interleukin-1 β -Expressionen hier in keiner der beiden Zellpopulationen über die andere Zellpopulation dominierend.

IL-8: Als weiterer geeigneter Immunmarker aus der Familie der Interleukine präsentierte sich das IL-8 (Abb. 23 D). In dieser Analyse zeigte sich in der Statistik eine relevante Abweichung im direkten Vergleich des Testmaterials PVC zwischen beiden Zellpopulationen: Die IL-8-Ausschüttung aus der mit PVC inkubierten Blutprobe ($1,296 \pm 0,170$; $p = 0,0087$) war gegenüber dieser Probe aus den PBMCs ($0,342 \pm 0,090$) deutlich gesteigert. Während die Proben der NK (Blut: $0,491 \pm 0,162$; PBMCs: $0,412 \pm 0,087$) und mit dem effektiven Stimulanz LPS (Blut: $1,936 \pm 0,480$; PBMCs: $2,401 \pm 0,502$) in den beiden Vergleichspopulationen eine ähnliche Verteilung zeigen, war die BL bei den PBMCs ($0,030 \pm 0,016$) gegen die Blutzellen ($0,005 \pm 0,001$) deutlich stärker ausgeprägt. Bei der Betrachtung der Grafiken der beiden Interleukin-Subfamilien IL-1 β und IL-8 fiel die annähernd gleichförmige Konfiguration, vor allem in der Zellpopulation der PBMCs auf: Die Ausschüttung des Interleukins-8 aus den PBMCs als Reaktion auf die Inkubation mit den Testmaterialien (Titan ($0,464 \pm 0,054$),; mRNA ($0,387 \pm 0,063$), Peptid ($0,436 \pm 0,076$)) fiel insgesamt jedoch deutlich geringer aus als in den Zellen des Vollbluts (Titan ($0,693 \pm 0,186$), mRNA ($0,488 \pm 0,143$), Peptid ($0,791 \pm 0,182$)).

TGF- β : Für den folgenden Immunmarker TGF- β (Abb. 23 E) wurden bei diesem Marker in der Varianzanalyse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden

Zellgruppen Blut und PBMCs identifiziert. Dennoch zeigten die Werte der Inkubation in den PBMCs deutlich höhere Expressionen beim Testmaterial (Titan ($1,166 \pm 0,193$), PVC ($1,348 \pm 0,518$), mRNA ($0,827 \pm 0,061$), Peptid ($1,308 \pm 0,224$)) als die des Blutes (Titan ($1,256 \pm 0,263$), PVC ($1,183 \pm 0,210$), mRNA ($1,020 \pm 0,191$), Peptid ($1,041 \pm 0,211$)). Zudem wurde in beiden Experimenten sichtbar, dass TGF- β unter Einfluss der Testmaterialien deutlich höher exprimiert wird als durch die Kontrollgruppen der BL (Blut: $0,754 \pm 0,186$; PBMCs: $0,592 \pm 0,075$), NK (Blut: $1,007 \pm 0,159$; PBMCs: $0,781 \pm 0,173$) und durch den LPS-Kontakt (Blut: $1,194 \pm 0,216$; PBMCs: $1,665 \pm 0,166$). Besonders das als Positivkontrolle eingesetzte LPS zeigte hier bei den Blutzellen nicht die bei den anderen vier Vergleichsmarkern erkennbare Stimulation. Allerdings dominierte die Gruppe der Vollblutzellen bei der Ausschüttung dieses Immunmarkers über das Stimulationsmuster aller Kontroll- und Testgruppen.

TNF- α : Der letzte geeignete Immunmarker für den Vergleich der Zellgruppen, der Tumornekrosefaktor- α (Abb. 23 F), zeigte eine erhöhte Expression nach Kontakt mit dem Testmaterial PVC, die sich zwischen Blut- und PBMC-Zellen statistisch signifikant zugunsten der Blutzellen unterschied: Im Vollblut stimulierte dieser Kontakt mit PVC ($0,215 \pm 0,029$; $p = 0,0498$) eine stärkere Expression als dies bei den PBMCs der Fall war ($0,047 \pm 0,006$). Als ebenfalls deutlich erhöht zeigte sich der Vergleich der BL (Blut: $0,004 \pm 0,002$; PBMCs: $0,060 \pm 0,015$) zugunsten der PBMCs. Bei der NK (Blut: $0,231 \pm 0,040$; PBMCs: $0,069 \pm 0,034$) und dem LPS (Blut: $2,478 \pm 0,350$; PBMCs: $2,401 \pm 0,502$) zeigte sich dieses Verhältnis gegenläufig. In der Gruppe der Testmaterialien ergaben sich für diesen Immunmarker beim Titan, der mRNA und dem Peptid keine direkt vergleichbaren, statistisch signifikanten Unterschiede (Blut: Titan ($0,262 \pm 0,074$), mRNA ($0,162 \pm 0,043$), Peptid ($0,179 \pm 0,048$); PBMCs: Titan ($0,084 \pm 0,013$), mRNA ($0,075 \pm 0,031$), Peptid ($0,081 \pm 0,024$)). Die Zellpopulation der Blutzellen erreichte hierbei die höheren Genexpressionen für diesen Immunmarker. Insgesamt erwiesen sich die einzelnen Messwerte der TNF- α -Expression jedoch als deutlich geringer, als bei den übrigen anderen fünf Immunmarkern in dieser Analyse (Abb. 23 A-E).

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Grafiken in Abb. 23 sowie der Berücksichtigung der Varianzanalyse zeigten sich bei den Genexpressionen für die Immunmarker CCL-2, ICAM-1, IL-8 und TNF- α statistisch signifikante Unterschiede je nach Inkubation mit den Zellgruppen Blut- oder PBM-Immunezellen (Tab. 25).

Tab. 25: Genexpression der Immunmarker in der Vergleichstestung.

Marker	Vollblut		PBMCs		Vergleich	
	höchste Expression	niedrigste Expression	höchste Expression	niedrigste Expression	Signifikanz (Blut zu PBMC)	dominierende Population
CCL-2	PVC	mRNA	Titan	mRNA	** p = 0,002	PBMC
ICAM-1	PVC	mRNA	Titan	PVC	* p = 0,0498	Blutzellen
IL-1 β	PVC	mRNA	Titan	PVC	ns	keine
IL-8	PVC	mRNA	Titan	PVC	** p = 0,0087	Blutzellen
TGF- β	Titan	mRNA	PVC	mRNA	ns	keine
TNF- α	Titan	mRNA	Titan	PVC	* p = 0,0498	Blutzellen

Die Signifikanz bezieht sich auf die entsprechende Materialprobe aus der anderen Zellgruppe (Blut vs. PBMCs, MW, n = 6; ns = p > 0,05; * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001).

Je nach untersuchtem Testmaterial in Abhängigkeit von der stimulierten Zellpopulation dominierten jeweils andere Immunmarker. Dennoch zeigten sich auch in dieser Untersuchung, dass beide Zellgruppen besonders auf den Kontakt mit Titan und PVC mit einer verstärkten Genexpression dieser Signalmoleküle des Immunsystems reagierten, wobei der Kontakt zur mRNA – insbesondere im Vollblut – einen gegenteiligen Effekt auszuüben schien und diese Markerausschüttungen auf deutlich reduziertem Niveau ausfielen. Die PBMC reagierten hierbei verstärkt auf das Titan mit einer Interleukin-Ausschüttung, die Blutzellen schütteten diese Signalproteine allem als Reaktion auf einen Kontakt zum Polymer PVC aus.

4 Diskussion

Mit zunehmender Diagnostizierung von Erkrankungen aus dem kardiovaskulären Formenkreis bei ansteigender Lebenserwartung in der europäischen Bevölkerung wächst der Bedarf an Biomaterialien und Medizinprodukten zur Behandlung der Folgen, die solche Erkrankungen auf die Beschaffenheit von Blutgefäßen haben. Um diese klinische Anwendung und ihren Erfolg zu gewährleisten, dürfen die eingebrachten blutkontaktierenden Materialien keine Schädigung von Zellen des menschlichen Körpers sowie Strukturproteinen unterschiedlicher Art und Funktion auslösen. Daneben ist die Senkung des Risikos für Unverträglichkeitsreaktionen bei einer Aktivierung des Immunsystems des Empfängers eine zentrale Komponente ihrer Biokompatibilität. So soll eine Immunaktivierung durch Implantation dieser Materialien möglichst geringgehalten werden. Idealerweise entfalten sie zudem positive Effekte auf die Signalwege zur Kommunikation der Zellen untereinander, indem sie die Einheilung der Devices unterstützen oder eine Neointimabildung verhindern. Zu diesem Zweck ist es unabdingbar, die Kompatibilität dieser Produkte mit dem Blut und seinen zellulären Bestandteilen standardisiert zu prüfen.

4.1 Inkubationsmodelle für Blutzellen und PBMCs

Zur Simulation des Biosystem-Material-Kontaktes wurden zwei verschiedene *ex-vivo*-Inkubationsmodelle ausgewählt, welche die physiologischen Bedingungen im menschlichen Blutkreislauf unter kontrollierten Bedingungen nachbilden sollten: Ein dynamisches Inkubationsmodell für Vollblut und ein statisches Modell für PBMCs. Diese tierversuchsfreien Methoden zur Testung der Interaktionen des Empfängerbluts mit den körperfremden Materialien war bereits erfolgreich in Studien des THG-Labors Tübingen nach gesetzlichen Vorgaben angewendet worden [75, 92]. Durch schonende Bewegung der Proberöhrchen auf dem Schüttelinkubator konnten die Bedingungen im humanen Blutkreislauf nachgebildet, Störfaktoren wie die Hintergrundaktivierung gering gehalten und so Materialeffekte erkannt werden [93, 94]. Im Gegensatz dazu wurde für die PBMCs ein statisches Modell in der Wellplatte zur Materialtestung gewählt, da diese Zellen unter mechanischer Belastung schnell zerstört werden [82, 95-100]. Die Nachteile einer solchen statischen Inkubation, wie Zell- oder Materialsedimentation, wurden somit bewusst

einkalkuliert, um die empfindliche Zellpopulation nicht zu beeinträchtigen ^[101]. Der bedeutendste Unterschied dieser *in-vitro*-Modelle bestand jedoch in der Abwesenheit einer Gefäßendothelschicht: Während in der *in-vivo*-Anwendung der Kontakt von Implantatmaterial mit dem Blut und dem intravasalen Endothel eine Expression von Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen sowie pro- und anti-thrombotischen Signalmolekülen stimuliert wird, kann eine *in-vitro*-Testung diese Effekte nur orientierend abbilden ^[102]. Für beide Modelle wurde die Inkubationsdauer mit dem Testmaterial auf 2 h in den Experimenten dieser Arbeit angesetzt. Auf diese Weise wurde die kritische Marke von 4 h von der Blutabnahme bis zur Gewinnung der Serumproben nach Inkubation nicht überschritten. *Blok et al.* empfahlen eine Verarbeitung frischer humaner Blutzellen in einem Zeitraum von idealerweise 2 bis maximal 4 h nach der Blutentnahme ^[101]. Dies basiert auf ihrem Nachweis, dass Heparin als Antikoagulans in Vollblut, welches bei über 4 h bei 37 °C gelagert wurde, einen signifikanten Einfluss auf die Markerproteine des Komplementsystems (SC5b-9) ausübte und zu falsch hohen Messwerten führte. Einen vergleichbaren Effekt beschrieben sie in ihrer Studie auch für Elastasen, TAT und Hämoglobin ^[18, 101].

4.2 Analyse der Hämokompatibilität

Eine *in-vivo*-Anwendung von blutkontaktierenden Biomaterialien setzt eine präklinische Testung dieser Materialien und ihrer Einflüsse auf die physiologischen Prozesse des menschlichen Organismus voraus. Die gesetzlich vorgeschriebenen Methoden und formalen Vorgaben dieser Testung sind in der EU-Richtlinie ISO 10993-4 festgehalten ^[82]. Diese Analyse umfasst den Einfluss der Materialien auf verschiedene hämatologische und plasmatische Marker unter Berücksichtigung des klinischen Anwendungsbereichs und des erwünschten Effekts für die Patienten vor dem Hintergrund der Produktgestaltung und des -materials.

4.2.1 Versuchsdurchführung und Limitationen des Testprotokolls

Im Rahmen der Versuchskonzipierung und -durchführung waren einige Limitationen hinsichtlich der Repräsentation eines klinischen Patientenkollektivs durch die ausgewählten Spender sowie den Versuchsaufbau deutlich geworden:

Blutentnahme und Antikoagulation: Ergänzend zu der Anpassung des Inkubationsmodells *in vitro* war auch die Qualität des Testblutes für die Versuche entscheidend, um zuverlässige Messwerte bei der Hämokompatibilitätsanalyse zu erhalten [82, 92, 103, 104]. Den Empfehlungen der Forschungsgruppe um *Lippi et al.* folgend, wurde bei der Blutentnahme unter Aspirationstechnik auf eine längere Stauung über mehr als einer Minute mit einem Tourniquet verzichtet, um hämolysierend wirkende Einflüsse zu vermeiden [105, 106]. Neben einer schonenden Blutentnahme war die Antikoagulation des frisch entnommenen Blutes zur Vermeidung spontaner Gerinnungsreaktionen ausschlaggebend [82]. Die Wahl fiel auf unfraktioniertes Heparin (UFH) als Antikoagulans mit hoher Lagerungsstabilität und guter Dosierbarkeit. Hierbei wurde die Standardkonzentration von 1,5 I. E./ml Blut gewählt, wie in klinischen Hämokompatibilitätsstudien üblich [93, 107] und auch erfolgreich in Arbeiten des THG-Labors in Tübingen angewandt [10]. Diese Konzentration übte keinen Störeffekt auf die Blutparameter bei der Hämokompatibilitätsprüfung aus und stellte somit einen idealen Kompromiss zwischen der Gerinnungshemmung zur Versuchsdurchführung und der Nachahmung der physiologischen Hämostase dar [82, 101].

Spenderkollektiv: Mit der Auswahl des Probandenkollektivs mit 5 weiblichen und 5 männlichen Spendern konnte nur eine limitierte Repräsentation der Gesellschaft erreicht werden. In der Vorplanung wurde jedoch bewusst diese Spenderzahl und die Entnahme geringer Blutvolumina gewählt: Beide sollten ausreichend groß sein, um mögliche statistische Unterschiede zu zeigen und dennoch den Kosten- und Materialaufwand neben dem zeitlichen Bedarf effizient zu gestalten. Das sehr junge Spenderkollektiv mit einem Altersdurchschnitt von 31,3 J. wurde nach körperlicher Gesundheit und aktuellem Wohlbefinden ausgewählt [76-81, 108]. Häufige kardiovaskuläre Risikofaktoren waren bei ihnen vorab ausgeschlossen und auch durch die Altersverteilung limitiert worden, um den Effekt der Materialien möglichst isoliert unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können [108].

Präparation der Testmaterialien: Obwohl die einzelnen Testmaterialien, insbesondere die Feststoffe Titan und PVC, zuvor bestmöglich dampf- oder ethanolsterilisiert worden waren, können minimalste Kontaminationen des Materials im semi-sterilen Versuchsaufbau nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Zudem bot die Beschaffenheit des Materials selbst, wie die Prägung des Titanplättchens oder der

manuelle Zuschnitt der PCV-Schlauchstücke, die Möglichkeit für eine Irritation der Zellen bei Kontakt zu den körperfremden Oberflächenstrukturen. Weiterhin musste auch die Stammkonzentration für das Peptid Lugdunin zur Versuchsdurchführung angepasst werden und wurde dabei auf eine Dilution (1:100) zur Reduktion der halbtöxischen Konzentration für humane Blutzellen festgelegt. Dadurch sollte einerseits der schädigende Einfluss des DMSO-basierten Lösungsmittels für das Peptid möglichst geringgehalten werden ^[109, 110]. Andererseits orientierte sich dieser Wert an den sehr geringen Konzentrationen der zu Stentbeschichtungen klinisch eingesetzten Immunsuppressiva wie mTOR-Inhibitoren ^[111-115]. In diesem Zusammenhang beschrieben *Lammer et al.* eine Gesamtdosis von maximal 200 µg pro Stent als effektiven Schutz vor Restenose mit einer entsprechenden systemischen Konzentration von 2 ng/ml Blut, um toxische Schäden an Zellen und Molekülstrukturen zu vermeiden ^[112]. In einer weiteren Publikation beschrieben *Li et al.*, dass ein Kontakt mit mTOR-Inhibitoren im Vollblut zu einer frühen Immunreaktion mit einem signifikanten IL-6-Anstieg führte ^[114]: In den Versuchen dieser Arbeit konnte im Widerspruch zu diesen Resultaten jedoch in keiner der beiden Zellreihen ein signifikanter IL-6-Anstieg während der Inkubation festgestellt werden. Daher konnte bei der hier angewandten Gesamtdosis von 1,6 µg Lugdunin pro Well von einem klinisch bedeutsamen Einfluss auf die frühe Immunaktivierung mit Zellschädigung abgesehen werden.

4.2.2 Erythrozytenparameter

Im Rahmen der Hämokompatibilitätsprüfung wurden zunächst die Erythrozyten als größte Subpopulation der Blutzellen analysiert: Diese zeigten in ihrer Anzahl zwar eine Varianz bei den Geschlechtern, bewegten sich aber um einen literarischen Durchschnittswert von ca. 4,8 bis 5,4 x10⁶/µl. Die in den Experimenten dieser Arbeit gemessenen Werte bewegten sich insgesamt deutlich unter einem Messwert von 4,0 x10⁶ Zellen/µl und wichen nicht signifikant voneinander ab. Der prozentuale Anteil zellulärer Blutbestandteile, der Hämatokrit, variierte in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht des Probanden in der Literatur um einen Referenzwert von durchschnittlich 45 % ^[42, 45]. Von diesem Wert wichen die Ergebnisse des gemessenen Hämatokrits mit einem Durchschnittswert von 34 % sichtlich ab. Die Vermittlung des Gasaustauschs über das Hämoglobin wurde ebenfalls in der Analyse untersucht: Der geschlechtsabhängige Referenzwert für freies Hämoglobin beträgt in der Literatur durchschnittlich 11-18 g/dl

[46]. Obwohl das Kollektiv der in dieser Arbeit untersuchten Probanden als sehr jung zu bewerten war, bewegten sich die Messwerte des Blutbildanalysegeräts mit 12 g/dl unter diesem Referenzbereich.

Bei all diesen Messwerten gilt es jedoch die Verdünnung aufgrund der 10%-Heparinlösung (900 μ l pro 9 ml Blut) zu berücksichtigen: Damit ergeben sich nach Abzug des Verdünnungsfaktors für die Erythrozytenkonzentration rechnerisch ein Durchschnittswert von $4,1 \times 10^6$ Zellen/ μ l für die Baseline und $4,2 \times 10^6$ Zellen/ μ l für die übrigen Kontroll- und Testgruppen. Der Hämatokrit liegt letztendlich bei 37,7 % für die Baseline und 37,8 % für die übrigen Proben. Weiterhin berechnet sich ein Baseline-Hämoglobinwert von 13,2 g/dl und in den verbliebenden Proben von durchschnittlich 13,4 g/dl. Diese Abweichungen der Parameter vom jeweiligen Referenzwert im niedrignormalen Bereich lässt den Schluss zu, dass die geringen Messwerte trotz Verdünnung durch die Heparinisierung auf die Messmethode zurückzuführen sind: Die photometrische Stichprobenmessung eines kleinen Probevolumens, das auf das Gesamtvolumen zurückschließen lässt, liefert zwar schnell Ergebnisse, ist aber anfällig für Fehlmessungen von falsch-niedrigen Werten. Die Konstellation aus stabiler Hämatokrit-, Hämoglobin sowie Erythrozytenkonzentration in den hier präsentierten Ergebnissen wies auf keine negativen Effekte wie Hämolyse durch Kontakt der Materialien mit Blut – soweit in diesem *in-vitro*-Versuchskonzept zu beurteilen – hin [82].

4.2.3 Leukozytenaktivierung

Die Population der Leukozyten als Träger der Immunabwehr und Vermittler von Entzündungsreaktionen sind in ihrer Konzentration im Blut weniger geschlechtsabhängig als die Erythrozyten und bewegen sich in einem Referenzbereich von $4,0$ - $11,3 \times 10^3$ Zellen/ μ l [43, 116]. Die in der Hämokompatibilitätsanalyse gemessenen Werte zeigten jedoch Ergebnisse, die sich am unteren Grenzwert dieses Intervalls um einen Mittelwert von $4,0 \times 10^3$ Zellen/ μ l orientierten. Nach Korrektur der Verdünnung durch das Heparin lag die Leukozytenzahl der BL bei $5,1 \times 10^3/\mu$ l und der übrigen Proben bei $4,5 \times 10^3/\mu$ l. Diese niedrignormalen Zellzahlen sind hierbei am ehesten auf die automatische Messung im Blutbildanalysegerät und die verwendete Analysemethode zurückzuführen und blieben in der Varianzanalyse statistisch unauffällig. Entsprechend konnte von einem stimulierenden Effekt des Blutkontakts der untersuchten Materialien auf Leukozyten im

Sinne einer Entzündungsreaktion auf Zellebene Abstand genommen werden [43, 116, 117]. Zur Unterstützung dieser Beobachtung wurde ein Immunesay der PMN-Elastase durchgeführt. Diese Serinprotease wird hochspezifisch aus den Speichergranula der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten bei Stimulation dieser Zellen im Rahmen von Entzündungsreaktionen ausgeschüttet [118]. In den Untersuchungen in dieser Arbeit zeigte sich schon für die Negativkontrolle nach der Inkubation ein deutlicher Konzentrationsunterschied, verglichen mit der Baseline. Ab einem Messwert von 250 ng/ml könne laut Herstellerprotokoll zuverlässig von einem Leukozyten-getragenen Entzündungsgeschehen ausgegangen werden [84]. Während dieser pro-inflammatorische Effekt in dieser Arbeit beim Stimulans LPS und dem PVC reproduzierbar war, konnte die synthetische mRNA in der Probe diese Zellstimulation sogar reduzieren. Diese Beobachtung stützt die Annahme von *Abraham et al.* sowie *Avci-Adali et al.*, dass eine Inkubation des Vollbluts mit einer chemisch-modifizierten mRNA eine positive immunmodulatorische Wirkung entfalten könne. Eine überschießende Reaktion der Neutrophilen auf eine dynamische Bewegung des Blutes oder auch den Kontakt zu einer unbeschichteten Kunststoffoberfläche mit diesen Leukozyten konnte somit abgeschwächt werden [10, 21].

4.2.4 Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten gelten als sehr sensitive Marker für eine Einflussnahme auf das Gerinnungssystem, die beim Kontakt zu freiliegenden Endothelien oder fremden Oberflächenstrukturen durch verschiedene Signalproteine angelockt werden [119]. Im Laufe der Plättchenaktivierung kommt es zur Bildung eines Thrombus. Somit ist die Reduktion der Anzahl der freien Thrombozyten im Blut gleichzeitig ein Marker für deren Aktivierung [82, 120]. Bei der Untersuchung in dieser Arbeit fiel ein deutlicher Rückgang der Zellzahlen im Vergleich der Baseline mit den verbliebenen Kontroll- und Testgruppen mit statistischer Signifikanz auf. Der literarische Referenzwert für diese Plättchen im menschlichen Blut liegt im Bereich von 150 bis 300 $\times 10^3$ Zellen/ μ l [44], wohingegen die Werte der Kontroll- und Testgruppen auch nach Korrektur der Heparin-Verdünnung mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 129,8 $\times 10^3$ Zellen/ μ l deutlich unter diesem Grenzwert lagen. Dies sprach für einen Rückgang der freien Thrombozyten und somit für eine Gerinnungsaktivierung durch die Inkubationsmethode.

Die Chemotaxis von Granulozyten oder Fibroblasten zum Ort einer Gewebeverletzung wird von den Blutplättchen durch eine Ausschüttung des Botenstoffs β -Thromboglobulin aus deren α -Granula vermittelt [120]. Bereits durch den Kontakt zum Probenröhrchen mit anschließender dynamischer Inkubation unter Wärmezufuhr war es zu einer massiven Freisetzung dieses Proteins aus Thrombozyten gekommen. Das Herstellerprotokoll weist auf eine Aktivierung der Thrombozyten ab einem β -TG-Wert von 300 I.U./ml hin [86]. Durch den Kontakt zu Titan war es zu einer massiven β -TG-Expression im Vollblut gekommen, die sogar das Niveau des bakteriellen Pyrogens LPS überstieg. Obwohl dieses Metall aufgrund seiner Beschaffenheit ein ideales Stentmaterial dargestellt und seine biologischen Wechselwirkungen im humanen Blut als gering eingeschätzt werden [12], lassen sich in der Literatur Beschreibungen erhöhter Thrombogenität und Fibrinadhäsion finden [121, 122]. Diese Beobachtung unterstützten die nachweisbare Reduktion der Thrombozyten und des β -Thromboglobulins in dieser Arbeit beim Blutkontakt mit Titan [10, 82, 120].

4.2.5 Aktivierung der Blutgerinnung

Das Protein Thrombin ist im menschlichen Organismus das wichtigste Protein der Blutgerinnung und geht mit seinem direkten Gegenspieler Antithrombin-III einen TAT-Komplex unter Aktivitätsverlust beider Proteine ein. Damit kann der ELISA diese entstehenden Komplexe exakt quantifizieren und dadurch Hinweise zur Funktionalität des Gerinnungsystems geben [82]. Die Messung dieses Komplexes diente als Nachweis einer gesteigerten Thrombinbildung und damit indirekt als Zeichen der Hämostaseaktivität der Zellen. Eine Aktivierung der Gerinnungskaskade konnte nach Herstellerangaben ab Messwerten über 60 μ g/ml zuverlässig angenommen werden [85]. Bei einem sehr geringen Ausgangswert zeigte sich ein deutlicher Anstieg alleine durch die dynamische Inkubation über den Zeitraum von zwei Stunden. In dieser Untersuchung fielen besonders die Werte der Proben mit Titan und PVC als signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht auf: Dies zeigte den starken Einfluss des Polymers sowie des Titans auf die Thrombinbildung. *Hong et al.* konnten in *in-vitro*-Experimenten den Zusammenhang zwischen Thrombogenität der Materialien und einer erhöhten Expression des TAT-Komplexes nachweisen. Sie beschrieben PVC und Titan sogar als Materialien mit dem höchsten thrombogenen Potenzial unter allen Implantatmaterialien, die im

klinischen Kontext zur Anwendung kommen ^[122]. Im Gegensatz dazu imponierten die Proben synthetischer mRNA und dem Peptid mit deutlich geringerer Thrombin-Antithrombin-III-Aktivierung, was sich auch in der vorliegenden statistischen Analyse als signifikantes Ergebnis zeigte. In Forschungsprojekten aus den Arbeitsgruppen um *Abraham et al.* sowie *Avci-Adali et al.* erwies sich *in-vitro* hergestellte, modifizierte mRNA bei Inkubation mit Vollblut als weniger immunogen als RNA mit natürlichem Ursprung und war in diesem Zusammenhang erfolgreich als antithrombotische Stent-Beschichtung etabliert worden ^[10, 21-23]. Im Widerspruch dazu beschrieben *Egert et al.* einer Studie zu pathogenen Organismen, Lugdunin als ein proteinöses Toxin bakterieller Herkunft. Als dieses besäße es zwar bakterizide Aktivität gegen bakterielle Pathogene, präsentiere sich aber als ungeeignet für eine systemische Anwendung durch seine, von den Forschern postulierte, Immunogenität und Thrombogenität ^[96].

4.2.6 Aktivierung des Komplementsystems

Ein weiterer ELISA untersuchte die Wirkung der Materialien auf das Komplementsystem, indem die Expression des SC5b-9-Komplexes als Surrogatparameter gemessen wurde. Dieser Membranangriffkomplex bildet die Endstrecke der unterschiedlichen Aktivierungswege dieser Enzymkaskade, die als Reaktion auf das Erkennen körperfremder Strukturen und Oberflächen aktiviert wird ^[51, 123]. Nach Informationen des ELISA-Herstellers spiegelte ein Messwert über 80 ng/ml die Aktivierung dieses Komplementsystems wider ^[87]. So zeigte die NK zwar die erwartete Erhöhung gegenüber der Baseline, doch übertrafen alle Testmaterialien mit einem Wert von mindestens 700 ng/ml die SC5b-9-Expression der Kontrolle deutlich. Bei der Probe mit PVC war diese Reaktion des Komplementsystems auf das Fremdmaterial sogar signifikant erhöht. Auffällig präsentierten sich in diesem ELISA die Profile der mRNA und des Lugdunins als deutlich expressionsfördernd für SC5b-9: *Bennet et al.* brachten diese Funktion direkt mit dem Effekt auf die Thrombozyten in Verbindung: Sie beobachteten die Aktivierung des Komplementsystems durch körperfremde Strukturen und den damit einhergegangenen Thrombozyten-Verbrauch im Blut als sekundäre Reaktion auf die unmittelbar vorausgegangene Plättchenaktivierung ^[124].

4.3 Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials blutkontaktierender Materialien

Zur Untersuchung des Immunaktivierungspotenzials blutkontaktierender Materialien wurden zwei Einzelexperimente mit Zellpopulationen aus Vollblut und isolierten PBMCs durchgeführt und verglichen. Im Anschluss an die erfolgreich durchgeführten RT-qPCR-Durchläufe mit der extrahierten und zu cDNA transkribierten mRNA beider Einzelversuche wurden die Genexpressionswerte gegeneinander verglichen: Dies diente zur Beurteilung, ob eine PBMC-Isolierung in Ergänzung zu einer Vollblut-basierten Testung zusätzliche relevante Informationen zu Immunmarker-Expressionen nach Inkubation mit denselben Kontaktmaterialien liefern könnte.

4.3.1 Immunaktivierungspotenzial in den Zellen des Blutes

Die heterogene Zellpopulation der Blutzellen umfasste nach der Aufreinigung zur Isolierung zellulärer mRNA die kernhaltigen Leukozyten. Zu diesen zählen die diversen Immunzellen sowie die segment- oder stabkernigen Granulozyten mit multiformen Nuklei ^[125]. Die Expression bestimmter Signaturgene einzelner Zelltypen kann in diesem Zusammenhang zu diagnostischen Zwecken oder als prädiktiver Marker bei einem Entzündungsgeschehen genutzt werden. Dennoch schätzen Experten wie *Watkins et al.* die Aussagekraft von Modellen mit Vollblutzellen als limitiert ein, was sie durch die große Schwankungsbreite in den Genexpressionen einzelner Markerproteine zwischen gesunden Probanden begründeten ^[125].

Eine gesteigerte Markerausschüttung alleine durch die Inkubation im dynamischen Modell zeigte sich in den Experimenten bei den Immunmarkern CCL-2 und TNF- α . Lediglich bei IFN- α und TGF- β waren keine Effekte durch die Inkubation unter Wärmezufuhr oder durch Zugabe der stimulierenden Substanz statistisch nachweisbar. In der Gesamtübersicht über die verwendeten Testsubstanzen und -stoffe präsentierte sich Titan als das Testmaterial, welches bei den meisten der verwendeten Immunmarker zur stärksten Expression führte, wenngleich dieser Effekt in der Statistik nicht als signifikant auffiel. Das niedrigste Expressionsniveau der Immunmarker zeigte sich beim Kontakt der Zellen zur mRNA. Diese Beobachtung stützte die Beurteilung der synthetisch modifizierten mRNA als weniger immunmodulierend als eine mRNA in ihrem

natürlichen Zustand. Gleichzeitig übte sie keinen Einfluss auf die humane Gerinnungskaskade aus, zumal sie nicht die Blutungszeit verlängerte^[10, 21-23]. Dies hatten bereits die Analysen der Hämokompatibilitätsprüfung nahegelegt.

Eine Einordnung des Titans als potenziell allergenes und pro-inflammatorisches Material^[15, 16, 84, 126-128], stützt sich neben Fallbeschreibungen aus dem klinischen Alltag auf *in-vivo*-Studien zur Kompatibilität von Titan und seinen Legierungen mit den Leukozyten des menschlichen Blutes^[13, 126-130]. So beschrieben *Harloff et al.* verschiedene Fälle von Patienten mit Metallunverträglichkeiten, bei welchen Titan als Mittel der Wahl für Stents oder Gefäßprothesen verwendet wurde^[127]. Zudem konnten erhöhte T-Lymphozyten-assoziierte Entzündungskomponenten wie die Zytokine IL-6 und TNF- α in den Gewebeproben dieser Patienten nachgewiesen werden^[131]. Diese vielfach vorbeschriebene Titansensitivität nach mehrjährigem Verbleib im menschlichen Körper deuteten beide Forschungsgruppen als Ursache niedriger, aber wiederkehrender Stimuli auf das Immunsystem^[15, 16, 127]. Im Rahmen ihrer Studien wiesen *Hamlet et al.* in mehreren Kurzzeitkulturen mit kleinem Testkollektiv erhöhte Expressionslevel für CCL-2, IL-1 β und TNF- α nach^[126]: Der CC-Chemokin-Ligand-2 ist ein Signalmolekül aus der Familie der Chemokine^[54] und rekrutiert bevorzugt Monozyten sowie Lymphozyten durch die Erkennung einer körperfremden (m)RNA am TLR-3 und 4 an den Entzündungsort^[55].

Das sogenannte Monozyten-Interleukin IL-1 β wird von Makrophagen sezerniert und wirkt als endogenes Pyrogen. *Akdis et al.* konnten zudem nachweisen, dass dieses Interleukin eine systemische Entzündungsreaktion induziert, indem es Endothelzellen und Leukozyten am Entzündungsort aktiviert. Auf diese Weise bewirkt es eine lokale Zytokinausschüttung u. a. von TNF- α ^[64]. Damit stützten die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur die Beobachtung der Studie von *Hamlet et al.*, sondern lieferten einen Hinweis für die direkte Verknüpfung der steigenden IL-1 β und den ebenfalls erhöhten TNF- α -Konzentrationen in den hier vorgestellten *in-vitro*-Versuchen.

Der Tumornekrosefaktor- α erfüllt multiple Funktionen im menschlichen Immunsystem und stimuliert beispielweise als Entzündungsmediator die lokale und systemische Entzündungsreaktion, induziert aber auch die Ausschüttung anderer Zytokine wie CCL-2^[53]. Durch diese Rückwirkung auf das CCL-2 und damit verbundene indirekte

Stimulation des IL-1 β ließen sich die insgesamt recht hohen Expressionen dieser drei Marker nach Titankontakt im Blut in den Ergebnissen dieser Arbeit interpretieren: In der Analyse der Genexpressionen dieser genannten Immunmarker zeigten sich gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Expressionen nach Inkubation mit Titan. *Høl et al.* untersuchten den Effekt von Titan auf das humane Immunsystem vor dem Hintergrund einer Hypersensitivitätsreaktion und wiesen dabei nach, dass Titan das Potenzial zur Induktion einer Entzündung besitzt. So mache es den Anstieg der Lymphozyten-assoziierten Zytokine wie IFN- α eine prädiktive Testung hinsichtlich einer Titanunverträglichkeit möglich ^[130]. Entgegen dieser These wirkte das LPS als Derivat eines bakteriellen Endotoxins in den Analysen der vorliegenden Arbeit kaum stimulierend auf die IFN- α -Ausschüttung nach Kontakt mit den Testmaterialien.

Im Gegensatz zu diesem Interferon wird das IFN- β nicht nur von Immunzellen, sondern v. a. von Fibroblasten exprimiert. Es besitzt einen antiproliferativen Effekt, indem es die Ausschüttung von Zytokinen bei Gewebeschädigung hemmt ^[61, 62]. Auf diese Weise wird auch eine Intimaproliferation unterdrückt, was das Interferon- β im Zusammenhang mit Implantaten und Biomaterialien interessant macht. In verschiedenen Untersuchungen aus dem THG-Labor in Tübingen wiesen *Michel et al.* bei der *in-vitro*-Analyse zum Einfluss synthetischer mRNA auf die Entstehung einer frühen Entzündungsreaktion eine nur leichte und damit insignifikante Erhöhung von IFN- α - und IFN- β -Expressionen in einer Kurz- und Langzeitkultur nach ^[22, 103]. In den Experimenten der hier vorgestellten Arbeit zeigte sich die höchste IFN- β -Ausschüttung nach der Inkubation des Blutes mit der synthetischen mRNA, wobei diese Genexpressionswerte in ihrem Expressionslevel insgesamt deutlich hinter den Messungen der übrigen Immunmarker zurückblieben. Bei beiden Interferonen zeigte sich jedoch ein sehr hoher Baseline-Wert bereits vor der Inkubation der Zellen auf dem Schüttelinkubator ohne Materialkontakt. Dies ließ auf eine Voraktivierung der Zellen im Rahmen der Blutabnahme oder des Transfers mittels Aspirationstechnik in die Blutröhrchen schließen.

Ein anderer Forschungsansatz von *Treves et al.* zur unmittelbaren sowie verzögerten Titanhypersensitivität bei chronischen Entzündungen beschrieb die Leukozyten-Endothelzellen-Interaktion als ausschlaggebenden Faktor. Aus diesem Grund war es aus Sicht der Forscher unabdingbar, bei Implantationen von Titanprodukten diese Reaktionen zu kontrollieren, ohne die Reparaturmechanismen des Körpers zu blockieren. Nur auf

diese Weise könne die Einheilung ins Gewebe nicht gefährdet werden^[13]. Diese Funktion vermittelten die Leukozyten maßgeblich über ICAM-1 als Anreiz zur Adhäsion neutrophiler Granulozyten ans Endothel^[13]. Die Forschungsgruppe um *Bruni et al.* untersuchte daher die Fähigkeit der Titanproben, eine Erhöhung des ICAM-1-Proteins zu bewirken: In Kurz- sowie Langzeitkulturen zeigte sich ein signifikanter Anstieg des ICAM-Proteins nach Inkubation mit Proben von Titanlegierungen^[13, 129]. Diese Beobachtungen stützten die Ergebnisse dieser Arbeit, bei der ebenfalls durch Kontakt zu einer Titanprobe eine vermehrte ICAM-1-Ausschüttung auf Genebene in den Zellen des humanen Vollbluts aufgefallen war. Eine statistische Signifikanz fehlte hierbei jedoch.

Als ein besonderer Marker in der Untersuchung des immunaktivierenden Potenzials blutkontaktierender Materialien präsentierte sich das Interleukin-8. Dieses zeigte eine signifikante Expression in der Zellreihe der Vollblutzellen nach Kontakt zum PVC. Dieses Polymer findet vor allem in Venenverweilkathetern oder Schlauchsystemen medizinischer Geräte Anwendung und wird daher unter zusätzlicher Heparinbeschichtung beispielsweise bei Operationen zur Implantation kardiopulmonaler Bypässe im Zusammenhang mit EKZ und ECMO eingesetzt^[18, 19]. Daher ist diese Verwendung von Kunststoffen im medizinisch-klinischen Kontext und sein Nebenwirkungsprofil häufig Gegenstand der aktuellen Forschung: *Lappegård et al.* entwickelten für ihre Analysen zur Untersuchung von PVC ein *in-vitro*-Modell, das dem in dieser Arbeit angewandten Modell sehr nahekam. Hierbei wurde gesunden Spendern nach konventioneller Methode venöses Blut entnommen und mittels eines nicht näher beschriebenen Stimulans eine künstliche Entzündungsreaktion induziert. Mithilfe ihres Modelles wollten die Forscher um *Lappegård et al.* eine isolierte Analyse des Einflusses der Oberflächenbeschaffenheit des synthetischen Polymers auf die Entzündungsantwort des Körpers durchführen. Auf diese Weise wollten sie die Rolle des Immunsystems sowie die beteiligten Zellpopulationen untersuchen^[18]. Die Limitationen ihres Modells sahen sie jedoch darin, dass aufgrund des Fehlens einer Endothelschicht wichtige physiologisch vorkommende Plasmamarker und Strukturproteine fehlten. Dennoch erlaubte ihnen dieser Versuchsaufbau eine zuverlässige Untersuchung der einzelnen Leukozytenpopulationen und deren Anteil an der Synthese von Entzündungsmediatoren. Dabei kamen sie zu der Erkenntnis, dass die IL-8-Synthese insbesondere durch neutrophile Granulozyten getragen wurde^[18]. Bei diesem Signalprotein zeigten sich in

den Experimenten dieser Arbeit bereits signifikante Veränderungen zwischen der Baseline und der Erhöhung des Markers in der Leerprobe, alleine durch die dynamische Inkubation auf der Schüttelplatte.

Zusammenfassend betrachtet konnte in den Experimenten dieser Arbeit somit die von *Lappegård et al.* postulierte hohe Biokompatibilität von Heparin- beschichteten PVC-basierten Materialien nicht uneingeschränkt reproduziert werden ^[18]. Stattdessen deutete sich durch den erhöhten IL-8-Ausstoß eine starke, Granulozyten-getragene Immunreaktion nach Kontakt mit diesem Polymer an.

4.3.2 Immunaktivierungspotenzial in den PBMCs

Die Isolierung von PBMCs war Voraussetzung für funktionelle Tests zum Nachweis der PBMC-Aktivität nach Inkubation mit den Testmaterialien. Diese inhomogene Zellgruppe, bestehend hauptsächlich aus T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten, kann als Zellmodell zur möglichst realistischen Nachbildung der physiologischen Verhältnisse *in-vivo* verstanden werden ^[13, 18]. Sie dienen daher in vielen Forschungsansätzen zur Darstellung der Effekten von bioaktiven Materialien und epitheliale Beschichtungen auf unterschiedliche Immunzellen und haben sich daher unter anderem als Testsystem zur Erforschung immunmodulatorischer Wirkung verschiedenster Signalproteine etabliert ^[18, 132]. Dabei gestaltet sich die schonende Entnahme und Lagerung dieser Zellen als nicht unerheblich für den Testverlauf, da diese fragilen Korpuskel empfindlich auf die Änderung ihres gewohnten Milieus reagieren ^[132]. Daher sollten auf Anraten von Experten zwischen der Entnahme des Blutes mit anschließender Isolierung der PBMCs und der Inkubation mit den Testmaterialien nur wenige Stunden vergehen ^[133].

Kleiveland et al. empfahlen zur Bestimmung der Genexpression die Durchführung einer RT-qPCR, wie sie in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Dadurch konnten quantitative Aussagen zu den Änderungen im Genexpressionsniveau der einzelnen Marker getroffen werden. In diesem Zusammenhang postulierten sie eine Mindestinkubationsdauer von 1 h für den Kontakt von PBMCs mit Fremdmaterialien als ausreichend um eine relevante Immunreaktion zu provozieren ^[132]. Ihren Ergebnissen zufolge war zudem die Gruppe der Zytokine zur Evaluation eines Einflusses auf das Immunsystem durch Kontakt mit den Testmaterialien am aussagekräftigsten ^[132]. Eine gesteigerte Markerausschüttung alleine durch die in dieser Arbeit auf 2 h festgelegte

Inkubation im statischen Modell in der Wellplatte zeigte sich bei den Immunmarkern CCL-2 und den Interleukinen IL-1 β und IL-8. Bei Kontakt zu mRNA kam es zu einer gesteigerten Expression von INF- γ , Titan stimulierte die Freisetzung von ICAM-1, IL-6 und TNF- α . Lugdunin war hingegen für erhöhte Ausschüttungslevel bei CCL-2, IL-1 β , IL-8 und TGF- β verantwortlich.

In ihrer Publikation zur Wirkung von Titan und seinen Derivaten auf die Integrität der Zellmembran und Interzellularkontakte wählten *Treves et al.* ein auf PBMCs basierendes Modell. Diese statische Inkubation war der in dieser Arbeit zugrundeliegenden Methode sehr ähnlich: Die Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Spenderblut gewonnen und anschließend in mehreren Schritten mit PBS-Pufferlösungen gewaschen. Anschließend wurden sie in einem RPMI-Medium mit Zusatz von Antibiotika, FCS und Humanalbumin im 5%-CO₂-Inkubator bei 37 °C in Wells zu je 2 Millionen Zellen kultiviert ^[13]. Die Wahl dieser Methode sollte damit der Ausbeute einer ausreichenden Menge kultivierbarer Zellen zur Untersuchung der Biokompatibilität der Testmaterialien dienen. Alle analysierten Metalle führten bei *Treves et al.* nicht zu einem signifikant erhöhten Ausstoß von ICAM-1 oder anderen Zelladhäsionsmolekülen, unabhängig von dem Grad der Wärmezufuhr im Inkubator ^[13]. Diese Resultate spiegelten sich auch in den Ergebnissen der Untersuchungen dieser Arbeit für ICAM-1 wider: Dieser Indikator einer Lymphozytenaktivierung war in der Fraktion der PBMCs nach Kontakt zum den Testmaterialien gering, aber insignifikant, im Vergleich mit der Negativkontrolle erhöht ^[71]. Besonders hervorzuheben war hingegen der Kontakt der Zellen mit dem PVC: Infolgedessen waren nur eine sehr geringe ICAM-Expression nachweisbar und blieb auf dem Niveau der Baseline, was für die ausbleibende Entzündungsreaktion durch fehlende Hochregulation des Gens sprach ^[72]. Dies steht im direkten Kontrast zu den Analysen mit den Zellen des Vollbluts, bei welchen nach Inkubation mit dem PVC-basierten Schlauchstückchen die ICAM-1-Expression sogar signifikant gegen die Leerprobe erhöht gewesen war. Dennoch reagierten diese Zellen in der Studie von *Treves et al.* empfindlich auf den Kontakt mit Titan und mit einer signifikant erhöhten TNF- α -Ausschüttung. Ihre Studienergebnisse zeigten eine Anreicherung im Bereich um Implantate, sodass die Forscher dieses Metall als einen Sensibilisator für das Immunsystem bei Kontakt auch zu anderen Körperflüssigkeiten als dem Blut identifizierten ^[13]. TNF- α gilt als potenter Mediator der Akute-Phase-Proteine

für lokale und systemische Entzündungsreaktionen^[53]. Dennoch deuteten *Treves* und ihre Mitautoren die Wirkung dieses Zytokins nicht als einen Widerspruch zur guten Biokompatibilität des Titans als Implantatmaterial, da es in der Gesamtbetrachtung beim Vergleich mit anderen Metallproben eine geringere Stimulation der Zellen zur Zytokin- und ICAM-1-Freisetzung aufzeigte^[13]. In der Untersuchung der vorliegenden Arbeit konnte hingegen die Tendenz herausgearbeitet werden, dass Titan hinsichtlich der absoluten Immunmarkerexpressionen von ICAM-1 und TNF- α weniger immunstimulierenden Einfluss auf PBMCs als auf die Zellen des Vollbluts hatte. Diese Ergebnisse blieben jedoch ohne erneute statistisch signifikante Bedeutung.

Weiterhin wies die Titan-Probe als Testmaterial bei der Inkubation in der Wellplatte mit den PBMCs die relativ höchste Stimulation zur IL-6-Expression auf. Im menschlichen Immunsystem erfüllt dieses Interleukin sowohl eine pro- als auch eine anti-inflammatorische Wirkung in Abhängigkeit vom jeweils aktivierten Signalweg und wird primär von Leukozyten gebildet^[64, 67]. Bei massiven Entzündungsreaktionen wird die sonst geringgehaltene Sekretion von IL-6 stark hochreguliert^[68]. Dieses Zytokin wird als ein entscheidender Faktor bei der Entstehung chronischer Entzündungen beschrieben und gilt als eines der am strengsten regulierten Signalproteine des menschlichen Körpers^[13, 68]. Sowohl in den Experimenten dieser Arbeit als auch in der Studie von *Høl et al.* erwies sich das IL-6 als geeigneter prädiktiver Genmarker aufgrund seiner Funktion als Aktivator einer frühen Immunantwort in den mononukleären Zellen. Schon nach weniger als 24 h hatten die Forscher einen signifikanten Anstieg der IL-6-Freisetzung registriert, welcher zeitgleich mit einer Hochregulation des ebenfalls pro-inflammatorisch wirksamen TNF- α verbunden war^[130].

Weiterhin postulierten auch *Wang et al.*, dass Titankontakt im menschlichen Blutkreislauf keinen Hinweis auf Metalltoxizität mit negativem Einfluss auf die Vitalität der PBMCs lieferte. Jedoch erhöhe das Risiko einer systemischen Entzündungsantwort und konnte so eine Dysfunktion des Immunsystem herbeiführen, sollte die Exposition zu diesem Metall zu lange anhalten^[14]. Damit widersprachen sie indirekt dem Einsatz von Titan als Implantatmaterial mit einer möglichen mehrjährigen bis lebenslangen Verweildauer. Diese Beobachtungen stützen die Forscher auf ihre Resultate zur Freisetzung von IL-6 aus LPS-stimulierten B- und T-Lymphozyten, auf welche ein Titankontakt einen signifikanten hemmenden Einfluss zeigte^[14]. Bei einer isolierten Betrachtung einer IL-

6-Genexpression in PBMCs im Vergleich der Titanprobe nur mit der Leerprobe konnte dieses signifikante Ergebnis auch in den Daten der vorliegenden Arbeit reproduziert werden.

Bei der Analyse der Expression von Interferon- γ nach Inkubation in der Wellplatte zeigte hingegen die mRNA den größten stimulierenden Einfluss auf dessen Freisetzung aus den PBMCs ^[134]. Dem γ -Subtyp wird in einer Studie von *Pollard et al.* eine Mitwirkung bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder Überempfindlichkeitsreaktionen zugeschrieben ^[135]: Seine größte Bedeutung wird dem IFN- γ im aktuellen Forschungsgeschehen als Parameter für den Grad einer mRNA-induzierten Immunaktivierung durch mRNA als zuteil ^[134]. Diese Erkenntnis ist nicht zuletzt auch vor dem Hintergrund des Ausbruchs der Corona-Virus-Pandemie im Jahr 2020 interessant, da mRNA als Hauptbestandteil neuartiger Impfstoffe eingesetzt wird. Der Kontakt zur synthetischen mRNA stimuliert über die Bindung an TLR die Freisetzung der Interferone aus der α -, β - und γ -Subfamilie ^[136]. In ihrer Publikation aus dem Jahr 2016 nutzten *Borch et al.* ein *in-vitro*-Modell mit PBMCs zur Überwachung der Entstehung von Immunität, die sie mit einer synthetischen mRNA transfizierten und anschließend die Freisetzung von IFN- γ als Surrogatparameter für den Grad der Immunaktivierung maßen ^[134]. Dabei nutzte die Gruppe zur Provokation der Entzündungsreaktion ein Stimulans der bakteriellen Zellmembran, ähnlich dem in dieser Arbeit hierfür verwendeten LPS. Ferner untersuchten *Tan et al.* die Eignung von mRNA-Vakzinen als Möglichkeit zur Immuntherapie und konnten zeigen, wie eine Limitation des Transports der mRNA zum Schutz vor dem enzymatischen Abbau durch Bindung an Vehikel auf Polymerbasis gelang ^[136]. Diese Polymere zeigten ein vielversprechendes Potenzial bei guter Biokompatibilität, weshalb die Gruppe eine tieferegehende Erforschung hinsichtlich eines möglichen klinischen Einsatzes empfahl ^[136]. Diese Ergebnisse ließen sich auch in den Experimenten dieser Arbeit bezüglich des Kontakts der Immunzellen zum hier getesteten Polymer reproduzieren: Während die erhöhte Baseline des IFN- γ bereits vor Materialkontakt auf eine Voraktivierung der empfindlichen Zellen schließen ließ, zeigte sich in der statischen Inkubation mit dem Polymer keine erhöhte IFN- γ -Ausschüttung. Dies deckte sich mit den Resultaten der Studie von *Michel et al.*, die nachwiesen, dass eine polymerverbundene mRNA weniger

Ausschüttung von Interferonen provozierte als eine nicht-komplexgebundene oder nicht-
enkapsulierte mRNA [22].

In einer Studie zur Interaktion von Immunzellen mit Metallen als Grundmaterial von
Endoprothesen konnten *Takebe et al.* grundsätzliche Wechselwirkungen von TGF- β mit
dem menschlichen Immunsystem studieren. Diese Erkenntnisse ließen sich auch auf die
Ergebnisse dieser Arbeit übertragen: Dieses Zytokin erfüllt dabei durch Ausschüttung aus
Makrophagen als Wachstumsfaktor unterschiedliche Funktionen, die von einer
Proliferationskontrolle der T-Lymphozyten bis hin zur Zelladhäsion reichen [69, 137]. In
ihrer Arbeit wies die Gruppe um *Takebe et al.* zudem mittels RT-qPCR nach, dass eine
Hochregulation der TGF- β -Freisetzung aus T-Lymphozyten mit einem positiven Einfluss
auf die Wundheilung korrelierte, wie dies für ein mögliches Einwachsen von Implantaten
in den Körper von Relevanz ist [137].

Darüber hinaus ist das Bacteriocin Lugdunin A aus nasalen Stämmen des grampositiven
Kokkus *Staph. lugdunensis* als immunstimulierend vorbeschrieben [35]. Daneben stammt
es aus derselben Staphylokokken-Familie wie *Staph. aureus*, mit dem es um Lebensraum
konkurriert [33, 35, 138] und kann weiterhin dessen klinische Manifestationen, wie
beispielsweise Infektionen von intravasalen Kathetern oder Verweilkanülen imitieren
[139]. Daher favorisierten *Egert et al.* eine topische Applikation des Lugdunins gegenüber
einer systemischen Anwendung [96]. So zeigten sich nach Inkubation dieses proteinösen
Toxins mit den PBMCs auch erhöhte Ausschüttungslevel u.a. für die Immunmarker CCL-
2 und IL-8. Diese Beobachtungen konnten die Analysen von *Pinto et al.* in ihrer Studie
zum Plantaricin A, einem Bacteriocin aus *Lactobacillus plantarum*, stützen. Darin
postulierten die Forscher eine relevante Reduktion der Freisetzung pro-inflammatorischer
Zytokine wie IL-8 durch das Bacteriocin bereits nach kürzerer Inkubationsdauer im
Zellmodell [140]. Der ebenfalls in ihrer Studie untersuchte Chemokin-Ligand CCL-2 zeigte
hierbei eine immunmodulierende Wirkung auf die Monozyten- und Makrophagen-
Rekrutierung bei der Entzündungsantwort und beeinflusste akute und chronische
Entzündungsgeschehen [141]. Dieser Immunmarker wird daher als potenter Stimulus für
die Freisetzung inflammatorischer Zytokine beschrieben [142]. Dieser Effekt in
Anwesenheit von Bacteriocin zeigte sich bei *Yu et al.* in einer CCL-2-Überexpression.
Die entgleiste Immunreaktion konnte letztendlich nur mit einer Reduktion des
Bacteriocins in der Probe unter zeitgleicher Antibiotika-Gabe unterdrückt werden [143]: In

diesem Zusammenhang mit den Experimenten dieser Arbeit könnte das Lugdunin als bakterielles Derivat im Prozess eine IFN- γ -Hochregulation induziert haben. In seiner immunmodulatorischen Wirkung gleicht das IFN- γ dem Immunmarker CCL-2 und regt T-Lymphozyten durch eine Erkennung synthetischer mRNA oder anderer körperfremder Strukturen über die Bindung an TLR zur defensiven Immunreaktion an [57, 134, 136]. Allerdings könnten die aufgezeigten Effekte auf die Expression der Immunmarker durch das Lugdunin auch aus einer Nebenwirkung des Trägermediums DMSO resultieren [109, 110]. Trotz der präventiven Verdünnung von DMSO wirkte dieses auch in geringen Dosierungen als toxische Substanz besonders auf die empfindlichen PBMCs ein [144]. Durch eine Einlagerung dieses Stoffes in die Zellmembranen der PBMCs wurden diese nach *Borch et al.* so fragil, dass eine Perforation der Zellhüllen bereits alleine durch Abzentrifugation möglich erschien [134]. In diesem Zusammenhang konnten *Xing et al.* in einer Studie zeigen, dass schon geringe Konzentrationen dieser DMSO-Lösung einen stimulierenden Einfluss auf die Interleukin-Produktion in dieser Zellpopulation hatte [145].

4.3.3 Vergleich des Immunaktivierungspotenzials zwischen Zellen des Blutes und den PBMCs

Die vorangegangenen Ergebnisse in den Einzelerperimenten in Vollblutzellen und PBMCs wiesen darauf hin, dass sowohl Art als auch Herkunft der Zellen sowie ihre Sensitivität gegenüber einzelnen Immunmarkern entscheidend für die Interpretation ihres Immunaktivierungspotenzials nach Materialkontakt waren [22]. Die Signalproteine IL-1 β und TGF- β waren zwar als geeignete Parameter für eine Vergleichsanalyse aufgefallen, doch zeigte sich beim Vergleich der Marker in den beiden Zellgruppen kein signifikanter Unterschied ihrer Expressionen in Abhängigkeit von der Zellpopulation und dem Inkubationsmodell. Eine zusätzliche Optimierung des Milieus für das Testmaterial durch die Isolation der immunaktiven PBMCs brachte somit keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn für diese beiden Immunmarker.

Vor diesem Hintergrund erforschten *Godoy-Ramirez et al.* die Stimulierbarkeit konventioneller Zelllinien wie PBMCs im Vergleich mit Vollblut-Proben hinsichtlich der Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und Interleukinen im Kontakt mit körperfremden Antigenen [97]. Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen wählte die Forschungsgruppe einen Versuchsaufbau, welcher

dem dynamischen Modell und dem Versuchsaufbau dieser Arbeit zur Testung in humanem Vollblut sehr nahekommt. So wurde heparinisieretes Blut eines kleinen Spenderkollektivs in aufsteigenden Verdünnungskonzentrationen mit einem RPMI- und Antibiotikum-basierten Medium in Polypropylenröhrchen angesetzt. Die weitere Isolierung der PBMCs erfolgte auch hier mit Dichtegradientenzentrifugation auf Histopaque®. Die Forscher konnten in ihren Analysen bestätigen, dass Zellkulturen aus Vollblutzellen für DNA-Untersuchungen den Goldstandard darstellten, wobei ein höherer T-Zell-basierter Zytokinausstoß in Proben mit höherer Verdünnung nachweisbar war. Diese Verwendung von Vollblut für den interzellulären Zytokinnachweis lieferte damit deutlich höhere Messwerte in der Population der Blutzellen als dies bei den PBMCs der Fall war. Diese Hypothese stützten auch die in dieser Arbeit vorliegenden Vergleiche der Experimente mit den Zellreihen. Dennoch betonten die Autoren, dass unterschiedliche Zytokine auch zeitlich variierende Höhepunkte ihrer Expression haben, was eine Optimierung der Inkubationszeit in Abstimmung der einzelnen Genmarker nötig machte [97]. Weiterhin zeigte sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die auch in der Studie von *Godoy-Ramirez et al.* angedeutete Überlegenheit der Vollblutzellen für DNA-Analysen auf intrazelluläre Zytokinproduktion gegenüber einer Zellkultur in PBMCs. Im Vergleich der Zellpopulationen präsentierte sich für die drei Immunmarker ICAM-1, IL-8 und TNF- α gleichsinnig eine Signifikanz hinsichtlich der beiden unterschiedlichen Zellmodelle für die Probe des PVC als Testmaterial. Dabei erwiesen sich deren Genexpressionen deutlich zugunsten der Blutzellen im dynamischen Inkubationsmodell gegenüber der Ausschüttung aus den PBMCs im statischen Modell als erhöht. Dies führte zu dem Schluss, dass eine Stimulation dieser Marker nach Polymerkontakt in der Blutzellpopulation deutlich der PBMC-Fraktion überlegen sein musste. Da die IL-8-Ausschüttung hingegen maßgeblich von Granulozyten abhängig ist, zeigte sich in der PBMC-Kultur lediglich eine nur niedrige Expression. Dies stützte die Resultate der Forschungsgruppe um *Godoy-Ramirez*, da diese Zellgruppe vor allem aus den Subtypen rundkerniger Zellen besteht und somit nicht die segment- oder stabkernigen Neutrophilen, wie sie in großer Zahl im Vollblut vorkommen, einschließt [18]. Zudem seien bei einer Stimulation der Zellen *in-vivo* meist mehrere Antigene als Aktivatoren beteiligt [132]. Daher sollte für den Gennachweis dieser Signalproteine ICAM-1, IL-8 und TNF- α entsprechend den Ergebnissen von *Godoy-Ramirez et al.* eine Kultur von Zellen

des Vollbluts für solche Analysen bevorzugt werden ^[97], zumal sie eine bessere Beurteilbarkeit und Interpretation der Resultate erlaubten ^[146].

Weiterhin erforschten auch *Hodge et al.* den Grad der Zytokinfreisetzung aus Vollblutzellen und PBMCs nach Zusatz eines externen Stimulans sowie den dadurch provozierten Zelluntergang ^[98]. In Folge ihrer Untersuchungen postulierten die Forscher eine Kultur aus Vollblutzellen als Goldstandard für die Analyse der Zytokinproduktion in humanen Zellen, zumal sie bei den aufwändig isolierten PBMCs eine höhere Apoptoserate im Laufe der für die Zellen toxischen Isolierungsprozesses festgestellt hatten. Dieser Umstand führte zu einer deutlich verringerten Zellzahl in diesen Zellreihen gegenüber dem Vollblut-Assay. Um diese unterschiedlichen Signalmoleküle aus der Familie der Zytokine optimal abzubilden und gleichzeitig die Lebensfähigkeit der Blutzellen zu gewährleisten, empfahlen sie daher eine verdünnte Blutzellkultur mit RPMI-Medium anzusetzen, welches trotz seines synthetischen Ursprungs das physiologische Milieu realitätsnah imitiere. Auch Ergebnisse anderer Forschungsgruppen wie *Deenadayalan et al.* ließen den Schluss zu, dass eine definierte Verdünnungslösung aus Vollblut als ein alternativer Assay die Isolierung und Kultivierung von PBMCs zum Nachweis von Zytokin-DNA als Surrogatparameter für deren Ausschüttungsgrad ersetzen könne ^[147].

Beim Vergleich beider Einzelexperimente dominierte bei dem CCL-2-Gennachweis die Inkubation mit der mRNA-Probe in der PBMC-Reihe. Diese Resultate standen im Widerspruch zu den Publikationen von *Godoy-Ramirez*, *Hodge* und *Deenadayalan*, welche die Vollblut- gegenüber der PBMC-Kultur für eine qPCR-Analyse bevorzugten ^[97, 98, 147]. Die für das Experiment gewählte synthetische mRNA diente als Antigenquelle, die Zellen des erworbenen Immunsystems aktivierte. Ihre Komplexierung war dabei ausschlaggebend für die immunstimulierende Wirkung des Produktes, da durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus über Aktivierung am TLR-7 auf Lymphozyten eine weitere RNA-Transkription unterdrückt wurde ^[148]. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls in einer geringeren RNA-Produktion in den vorliegenden Ergebnissen in der Vollblutkultivierung dieser Arbeit obwohl hier eine unkomplexierte mRNA mit Codierung für das Cas9-Protein angewandt wurde. Für einen direkten Nachweis der intrazellulären Zytokinsekretion auf Genebene, wie in dieser Arbeit herausgearbeitet, empfahlen die Experten hingegen eine Analyse der DNA aus einem unverdünnten Ansatz

von Vollblutzellen, da die geringe Zellzahl in der Dilution als problematisch für eine Bearbeitung mittels qPCR erachtet wurde ^[147]. Die deutliche Dominanz der Vollblutkultur gegen über der Kultur in PBMCs für DNA-Analysen eignete sich insbesondere für Inkubationen unter 6 h und Zugabe externer Stimuli ^[97]. Es galt jedoch noch zu beachten, dass eine Kultivierung über mehr als 24 h eine DNA-Analyse aus den Zellen weniger sensitiv werden ließ und mit fortschreitender Zeit die Überlebenszeit dieser Zellen sank ^[97, 149]. Eine verlängerte Inkubationszeit erhöhte somit in den Untersuchungen der Forscher nicht die Zahl auf Stimulus respondierender Zellen oder deren folgende Zytokin-Ausschüttung über ihren natürlichen Peak hinaus ^[150, 151]. Dies begründeten die Forschungsgruppen mit der Annahme, dass das Vollblut zahlreiche Erythrozyten und Granulozyten enthält, die deutlich verwundbarer als die restlichen enthaltenen Zellen sind und bei osmotischer Veränderung zu Grunde gingen ^[152]. Weiterhin fehlten den PBMCs bei *in-vitro*-Analysen, wie in dieser Arbeit als Modell verwendet wurden, unter statischer Inkubation im Brutschrank mit CO₂-Zufuhr die umweltbedingten Stimuli, denen sie im Körper stetig ausgesetzt sind. Zudem zeigten PBMCs eine Abhängigkeit vom Spender hinsichtlich Hormonhaushalt und Ernährungszustand sowie Stoffwechselaktivität ^[132]. Durch Spenderkollektive mit mehreren Probanden konnten die Unterschiede zwischen Individuen beim *in-vitro*-Modell reduziert und generelle Aussagen ermöglicht werden. Darüber hinaus galt es zu beachten, dass für eine Vergleichbarkeit der Zellzahlen beider Zellreihen eine höhere Materialkonzentration mit einem Probenvolumen von 2 ml im statischen Inkubationsmodell gewählt wurde. Im Vergleich mit dem Inhalt in den 8-ml-Polypropylenröhrchen des Vollblutes war ihre Konzentration somit in Relation viermal höher konzentriert. Dennoch blieben die Blutzellen im direkten Vergleich der Immunmarker-Genexpression den PBMCs aus oben genannten Gründen vor dem Hintergrund einer DNA-Analyse überlegen.

4.4 Ausblick

Die Resultate der in dieser Arbeit präsentierten Experimente zeigten vielversprechende Ergebnisse sowohl in Vollblut als auch in PBMCs hinsichtlich einzelner Immunmarker. Hervorzuheben sind hier insbesondere der Chemokin-Ligand CCL-2 nach Kontakt zur synthetischen mRNA in der Population der PBMCs sowie das Interleukin-8 nach

Inkubation des PVC in der Vollblutkultur. Aus diesen Beobachtungen lässt sich somit schließen, dass die Wahl des Testmodells in Abhängigkeit von der untersuchten Zellgruppe sowie der Testparameter nicht nur an die gewählten Immunmarker, sondern auch an die Beschaffenheit des (Bio-) Materials angepasst werden muss. Somit empfiehlt es sich, die hier vorgestellte Hämokompatibilitäts- und Materialtestung in der Zellreihe auf weitere Zytokine auszudehnen, um die Rolle der einzelnen Immunzellen und ihre wechselseitige Kommunikation betrachten zu können.

Zur ausführlichen Analyse des Immunaktivierungspotenzials der hier vorgestellten blutkontaktierenden Materialien wurde ein Verfahren mit zwei Inkubationsmodellen präsentiert, das zur präklinischen Testung unter standardisierten Bedingungen herangezogen werden kann. Allerdings löste dieser Versuchsaufbau nicht die Herausforderung, eine physiologische Gefäßintima bzw. Endothelschicht aus humanen Zellen und deren komplexe Interaktionen nachzubilden. Dies ließe sich künftig durch eine *in-vivo*-Studie beispielsweise im Tiermodell als Surrogat einer menschlichen Intima lösen. Bevor dieser nächste Schritt jedoch eingeleitet werden kann, empfiehlt es sich, die hier untersuchten Testmaterialien in einem optimierten Vollblutassay erneut zu evaluieren. Vorstudien konnten zeigen, dass Blutproben unterschiedlicher Verdünnungskonzentration erfolgreich als Assay für DNA-Analysen dienen. Dies deutete sich auch in den vorliegenden Experimenten im Vergleich der beiden Zellreihen an, indem bei ausgewählten Immunmarkern das Aktivierungspotenzial einzelner Testmaterialien im humanen Vollblut überwog. Diese Analysen in einer an die Anforderung der Materialtestung angepassten Verdünnung bieten eine lohnenswerte und auch ökonomisch nachhaltigere Lösung, die ein PMBC-Modell in bestimmten Versuchsprotokollen vollständig ersetzen kann und deren aufwändige Isolation aus Blutproben obsolet macht. Obwohl statistische Signifikanzen in den beiden Einzelerperimenten sowie im direkten Vergleich beider Einzelversuche für die Mehrzahl der getesteten Immunmarker fehlten, konnten in dieser Arbeit Hinweise auf die Provokation einer Hypersensitivitätsreaktion durch den Kontakt zu Titan sowie eine deutliche immunaktivierende Komponente mit Granulozytenstimulation durch das PVC herausgearbeitet werden. Diese Beobachtungen gewinnen auch in der medizinischen Forschung zunehmend an Aufmerksamkeit. Daher sollte der Einsatz beider Materialien künftig intensiver präklinischer Testung unterzogen und seine Anwendung im klinischen

Kontext reevaluiert werden. Vielversprechende Versuche mit komplexierter und damit nur gering immunogener mRNA sind aktuell Gegenstand der Forschung für Stentbeschichtungen. Hierbei ist zusätzlich die Methode der Kultivierung der Zellen für die Gewinnung stabiler Ergebnisse entscheidend, um falsch-negative Immunaktivierungsergebnisse durch schnellen mRNA-Abbau zu vermeiden. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten sich hier die aufgereinigten Zellen des Vollbluts als die aussichtsreichere Population. Das Peptid Lugdunin hingegen wies in niedriger Konzentration zwar ein geringes Immunaktivierungspotential auf, entfaltete dabei aber in den ELISAs der standardisiert durchgeführten Hämokompatibilitätsprüfung eine prothrombotische Wirkung. Seine Erforschung steht nach der Entdeckung im Jahr 2016 noch am Anfang. Für eine stentgebundene Anwendung bedarf es daher nach gegenwärtigem Forschungsstand weiterer intensiver *in-vitro*-Forschung insbesondere unter dem Aspekt der Blutverträglichkeit in höheren Konzentrationen.

Somit bleibt die Optimierung von blutkontaktierenden Materialien im klinischen Kontext ein multifaktorieller und dynamischer Prozess, der zwar ein großes therapeutisches Potenzial insbesondere für kardiovaskulär vorerkrankte Patienten bietet, aber noch weiterer (Grundlagen-) Forschung zum Verständnis einer Immunaktivierung und daraus resultierenden Biokompatibilität bedarf. Zur Beurteilung neuer Behandlungsmethoden und der Rolle der Immunkomponenten bei der Entstehung von Entzündungsgeschehen sollten neue *in-vitro*-Inkubationsmodelle mit Zellen eines angepassten Spenderkollektivs untersucht werden. Eine Ergänzung der Analyse um bisher noch gering in Studien präsenzte Zytokine kann das Spektrum der Grundlagenforschung zusätzlich erweitern: Insbesondere der Chemokin-Ligand CCL-2 birgt ein großes Potenzial für die Anwendung in künftigen Immunassays auf Grundlage einer PBMC-Kultur, während das Interleukin-8 in der Zellreihe des Vollbluts dominierte.

5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Inzidenz von Systemerkrankungen mit kardiovaskulärer Komponente gewinnen neuartige Biomaterialien synthetischer oder biologischer Herkunft zunehmend an Bedeutung. So wächst ihr Bedarf im klinischen Anwendungsfeld sowie die Erforschung ihrer Einsetzbarkeit als Medizinprodukt stetig. Damit ist es essenziell, dass sie sich in ihre Umgebung integrieren, ohne unerwünschte Wechselwirkungen mit den physiologisch ablaufenden Stoffwechselprozessen einzugehen. Um diese Effekte bei der Wechselwirkung von Blut mit Fremdoberflächen eingehender studieren zu können, lag das Ziel dieser Arbeit in der Etablierung einer Untersuchungsmethode zum Nachweis des immunaktivierenden Potenzials dieser Biomaterialien anhand ausgewählter Signaturgene. Anhand dieser Werte sollte gezeigt werden, welche Zytokine durch welches Implantatmaterial oder bioaktive Beschichtung verstärkt ausgeschüttet werden. Auf diese Weise sollte somit ein Testablauf entwickelt werden, der ergänzend zur herkömmlichen Hämokompatibilitätsprüfung eine Aktivierung des Immunsystems auf molekulargenetischer Ebene detektierbar machen sollte.

Um eine Aussage zur Genexpression der zehn ausgewählten Genmarker CCL-2, ICAM-1, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β und TNF- α zu treffen, wurden diese mit der Methode der Real-time-qPCR analysiert. Dazu sollten im humanen Vollblut und PBMC unabhängig voneinander nachgewiesen und quantifiziert: Nach der Inkubation mit den ausgesuchten Probematerialien Titan, PVC, Cas9-mRNA und Lugdunin in zwei *in-vitro*-Inkubationsmodellen wurden die Genexpression ausgewählter, in der Forschung etablierter, Immunmarker in humanem Vollblut und von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) gegenübergestellt. Durch dieses Procedere sollte somit untersucht werden, ob es für eine aussagekräftige Analyse ausreichend ist, die Testmaterialien im Vollblut zu inkubieren oder ob nur eine Testung mit isolierten PBMCs einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn zur Immunmarkerexpression bei Materialkontakt liefern könne.

In diesem Zusammenhang konnten die vorgestellten Ergebnisse in den beiden Zellgruppen zeigen, dass sowohl Art als auch Herkunft der Zellen sowie ihr Ansprechen auf Materialkontakt durch endogene Stimuli den Grad der Ausschüttung einzelner

Immunmarkern entscheidend beeinflusste: Während sich für den Nachweis der Genexpressionen in den Zellen des Vollbluts die Immunmarker IFN- γ und IL-6 als ungeeignete Parameter präsentierten, erwiesen sich die beiden Interferone- α und β als verzichtbar für den Gennachweis aus den PBMCs.

Insgesamt ließ sich aus den Resultaten dieser Analysen keine generelle Empfehlung für die Überlegenheit einer Vollblut- oder PBMC-Zellreihe für die Analyse des Immunaktivierungspotenzials blutkontaktierender Materialien ableiten. Die zusätzliche Optimierung des Milieus durch die Isolation der immunaktiven PBMCs brachte lediglich für einzelne Immunmarkern einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn und zeigte vielversprechende Ergebnisse in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellpopulation: Hierzu zählte die Expression von CCL-2 aus den PBMCs nach Kontakt zur synthetischen mRNA, wohingegen sich IL-8 als ein potenter Marker nach Polymer-Kontakt in den Vollblutzellen erwies.

Daneben deutete sich auch in diesem Vergleich beider Zellgruppen an, dass der Kontakt mit Titan und PVC mit einer verstärkten Genexpression dieser Signalmoleküle einherging, wobei der Kontakt zur mRNA prinzipiell einen gegenteiligen Effekt auslöste. Dabei reagierten die PBMC auf den Titankontakt verstärkt mit einer Interleukin-Ausschüttung wohingegen die Blutzellen diese Signalproteine insbesondere als Reaktion auf einen Kontakt zum Polymer PVC freisetzen.

Eine der gesetzlich vorgeschriebenen Qualitätskontrollen von Medizinprodukten, die Hämokompatibilitätsprüfung, wurde auch im Rahmen der hier vorgestellten Dissertation durchgeführt. Hierbei wurde die Verträglichkeit der biologischen und synthetischen Fremdstoffen- und -oberflächen mit dem Vollblut und dessen Zellen analysiert. In dieser Testung deutete sich an, dass der Blutkontakt mit den Testmaterialien zu einer generellen, deutlichen Aktivierung der Thrombozyten führte. Diesen Beobachtungen entgegenstehend, ließen die Werte der Leukozyten- und Erythrozytenzahlen bzw. Erythrozytenparameter keine Anzeichen für eine frühe Leukozytenstimulation oder eine *in-vitro*- Hämolyse nach Materialinkubation erkennen. Hierbei ließ sich auch der bereits zuvor angeklungene Einfluss des Titans auf die Thrombusbildung sowie die Granulozytenstimulation durch das PVC herausarbeiten. In den Immunoblots zeigte sich in der mit Titan inkubierten Probe eine signifikant erhöhte β -TG-Ausschüttung bzw. in

der Probe mit Blutkontakt zum PVC eine statistisch relevant gesteigerte TAT-Freisetzung. Die *in-vitro* hergestellte mRNA erlaubte im Kontakt mit humanem Vollblut im Gegensatz dazu sogar eine signifikante Reduktion der Thrombogenität im TAT-Immunoblot. Das PVC zeigte darüber hinaus eine Einflussnahme auf das Komplementsystem, indem es die Expression des SC5b-9-Komplexes sehr stark förderte. Die stetige Verbesserung und Anpassung von blutkontaktierenden Materialien und deren Analysemethoden an ihren Einsatz als medizinische Testmaterialien bleibt somit ein ebenso vielschichtiger und wie dynamischer Prozess, welcher weiterhin umfassender Forschung zum tieferen Verständnis der Biokompatibilität und Immunaktivierung bedarf. Eine Analyse mit bisher nur gering in Studien repräsentierten Zytokin-Subtypen kann das Spektrum dieser Grundlagenforschung zusätzlich erweitern. In diesem Zusammenhang empfiehlt sich eine Ergänzung der herkömmlichen Prüfung zur Hämokompatibilität um den anschließenden Nachweis des Immunaktivierungspotenzials durch die RT-qPCR besonders im Hinblick auf die Markerproteine CCL-2 und IL-8. Ein solcher Assay umfasst somit die entscheidenden Facetten des Immunaktivierungspotenzials bestimmter Testmaterialien bereits auf Genebene.

6 Literaturverzeichnis

1. Ackermann, H., et al., 1 Herz-Kreislauf-System, in AllEx - Alles fürs Examen, H. Ackermann, et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag.
2. Miksch, A. and T. Ledig, Kardiovaskuläre Erkrankungen, in AllEx - Alles fürs Examen, H. Ackermann, et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag.
3. [Bildquelle]. Angioplasty. 2013 [cited 2021 14.03.2021].
4. Badimon, L., T. Padró, and G. Vilahur, Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*, 2012. 1(1): p. 60-74.
5. Sigwart, U., et al., Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med*, 1987. 316(12): p. 701-6.
6. Singapore-medical-clinic, Singapore-medical-clinic. 2013.
7. Makaloski, V., T. Wyss, and J. Schmidli, Endovaskuläre Behandlung eines Bauchaortenaneurysmas. *Cardiovasc*, 2019. 18(3): p. 30-33.
8. Das, M., Drug-eluting Devices, in *Interventionelle Radiologie*, A.H. Mahnken, C. Thomas, and K. Wilhelm, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
9. Sabti, Z. and R. Jeger, Vollständig resorbierbare Stents – eine neue Ära in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit? *Praxis (Bern 1994)*, 2017. 106(2): p. 85-89.
10. Abraham, M.K., et al., In vitro Study of a Novel Stent Coating Using Modified CD39 Messenger RNA to Potentially Reduce Stent Angioplasty-Associated Complications. *PLoS One*, 2015. 10(9): p. e0138375.
11. Koenig, O., et al., RNA-Eluting Surfaces for the Modulation of Gene Expression as A Novel Stent Concept. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2017. 10(1).
12. Bolle, T., et al., Werkstoffe/Biomaterialien in der interventionellen und operativen Medizin– eine kurze Übersicht und aktuelle Trends. *Zentralblatt für Chirurgie-Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-und Gefäßchirurgie*, 2017. 142(02): p. 216-225.
13. Treves, C., et al., In vitro biocompatibility evaluation of surface-modified titanium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2010. 92(4): p. 1623-1634.
14. Wang, J.Y., et al., Inhibition of T and B cell proliferation by titanium, cobalt, and chromium: Role of IL-2 and IL-6. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 1996. 32(4): p. 655-661.
15. Hillen, U., et al., Evaluation of metal allergies in patients with coronary stents. *Contact dermatitis*, 2002. 47(6): p. 353-356.
16. Martínez-Rodríguez, N.L., S. Tavárez, and Z.I. González-Sánchez, In vitro toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. *Toxicology in Vitro*, 2019. 57: p. 54-61.
17. Hoffmann, J., et al., Aptamer-basierte Stammzelltechnologie zur Erhöhung der Hämokompatibilität. *Zeitschrift für Herz-, Thorax-und Gefäßchirurgie*, 2007. 21(4): p. 148-155.
18. Lappgård, K.T., et al., Role of granulocytes and monocytes in the polyvinyl chloride-induced synthesis of interleukin 8, monocyte chemoattractant protein 1, and leukotriene B4. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2005. 74(2): p. 230-236.
19. Petrachi, T., et al., Microscopic and chemical characterization of PVC tube used for dialysis lines: A new approach. *The International Journal of Artificial Organs*, 2020: p. 0391398820932178.
20. Gourlay, T., et al., Inflammatory response of rat and human neutrophils exposed to di-(2-ethyl-hexyl)-phthalate-plasticized polyvinyl chloride. *Artificial organs*, 2003. 27(3): p. 256-260.

21. Avci-Adali, M., et al., Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression. *Journal of Biological Engineering*, 2014. 8(1): p. 8.
22. Michel, T., et al., Efficient reduction of synthetic mRNA induced immune activation by simultaneous delivery of B18R encoding mRNA. *Journal of biological engineering*, 2019. 13(1): p. 40.
23. Hohmann, J.D., et al., Delayed targeting of CD39 to activated platelet GPIIb/IIIa via a single-chain antibody: breaking the link between antithrombotic potency and bleeding? *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2013. 121(16): p. 3067-3075.
24. Wang, Y., et al., CRISPR-Cas9 mediated gene knockout in human coronary artery endothelial cells reveals a pro-inflammatory role of TLR2. *Cell biology international*, 2018. 42(2): p. 187-193.
25. Marcu, C.B., D.V. Balf, and T.J. Donohue, Post-infectious pseudoaneurysm after coronary angioplasty using drug eluting stents. *Heart, Lung and Circulation*, 2005. 14(2): p. 85-86.
26. Deiparine, M.K., et al., Endovascular stent infection. *Journal of vascular surgery*, 1996. 23(3): p. 529-533.
27. Lorenz, U. and K. Ohlsen, Bakterielle Virulenz-Bedeutung für Infektionen in der Gefäßchirurgie. *Gefäßchirurgie*, 2012. 17(1): p. 23-28.
28. Ribeiro, M., F.J. Monteiro, and M.P. Ferraz, Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater*, 2012. 2(4): p. 176-194.
29. Ginestra, P., et al., Surface finish of Additively Manufactured Metals: biofilm formation and cellular attachment. 2021.
30. Badylak, S.F. and T.W. Gilbert. Immune response to biologic scaffold materials. in *Seminars in immunology*. 2008. Elsevier.
31. Ebnesajjad, S., *Handbook of biopolymers and biodegradable plastics: properties, processing and applications*. 2012: William Andrew.
32. Zipperer, A., et al., Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 2016. 535(7613): p. 511-6.
33. Bitschar, K., et al., Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 2730.
34. Saur, J.S., et al., Distinct Lugdunins from a New Efficient Synthesis and Broad Exploitation of Its MRSA-Antimicrobial Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021.
35. Kokkoliadis, L., Wirkstoff aus der Nase. Novel antibiotic made from bacteria in human nose. *Attempto (Forschungsmagazin der Universität Tübingen)*, 2021. 54/2021: p. 6-15.
36. Cutlip, D.E., et al., Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials. *Circulation*, 2001. 103(15): p. 1967-1971.
37. Joner, M., et al., Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006. 48(1): p. 193-202.
38. Kufner, S., et al., In-stent-neoatherosklerose nach perkutaner koronarintervention. *CardioVasc*, 2014. 14(2): p. 46-50.
39. Peng, G., et al., Surface modification of multiple bioactive peptides to improve endothelialization of vascular grafts. *Macromolecular Bioscience*, 2019. 19(5): p. 1800368.
40. Lee, M.S. and G. Banka, In-stent Restenosis. *Interventional cardiology clinics*, 2016. 5(2): p. 211-220.
41. Omeh, D.J. and E. Shlofmitz, Restenosis. 2019.
42. Polzer, C. and F. Horn, Laborwerte der Erythrozyten, in *Biochemie des Menschen*, F. Horn, Editor. 2020, Georg Thieme Verlag.
43. Füeßl, H., Leukozyten, in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2012, Georg Thieme Verlag.
44. Füeßl, H., Thrombozyten, in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2012, Georg Thieme Verlag.
45. Füeßl, H., Hämatokrit, in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2012, Georg Thieme Verlag.

46. Fießl, H., Hämoglobin (Hb), in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2012, Georg Thieme Verlag.
47. Stief, T. and J. Kurz, The natural anti-inflammatory agent PAI-2 suppresses the oxidative state of human blood. *Hemostasis Laboratory*, 2012. 5(2): p. 145.
48. Stief, T., K. Ulbricht, and M. Max, Circulating thrombin activity in sepsis. *Hemostasis Laboratory*, 2009. 2: p. 293-306.
49. Stief, T.W., et al., Analysis of hemostasis alterations in sepsis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007. 18(2): p. 179-86.
50. Horn, F., Die Hämostase, in *Biochemie des Menschen*, F. Horn, Editor. 2020, Georg Thieme Verlag.
51. Schneider, N., Das Komplementsystem, in *Biochemie des Menschen*, F. Horn, Editor. 2020, Georg Thieme Verlag.
52. Herold, G.e.a., *Innere Medizin*. 2020, Köln (DE): Gerd Herold.
53. Dinarello, C.A., Proinflammatory Cytokines. *Chest*, 2000. 118(2): p. 503-508.
54. Hemmerich, S., et al., Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry*, 1999. 38(40): p. 13013-25.
55. Voss, A., G. Bode, and C. Kerckhoff, Double-stranded RNA induces IL-8 and MCP-1 gene expression via TLR3 in HaCaT-keratinocytes. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012. 11(5): p. 397-405.
56. Stark, George R. and James E. Darnell, The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity*, 2012. 36(4): p. 503-514.
57. Fabregat, A., et al., Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics*, 2017. 18(1): p. 142.
58. Imada, K. and W.J. Leonard, The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*, 2000. 37(1): p. 1-11.
59. Belardelli, F., Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis*, 1995. 103(1-6): p. 161-179.
60. Belardelli, F., et al., Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2002. 13(2): p. 119-134.
61. Makowska, A., et al., Interferon beta induces apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells via the TRAIL-signaling pathway. *Oncotarget*, 2018. 9(18): p. 14228.
62. Dastan, F., et al., Subcutaneous administration of interferon beta-1a for COVID-19: A non-controlled prospective trial. *International immunopharmacology*, 2020. 85: p. 106688.
63. Mogensen, K.E., et al., The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1999. 19(10): p. 1069-1098.
64. Akdis, M., et al., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011. 127(3): p. 701-721.e70.
65. Mai, W. and Y. Liao, Targeting IL-1 β in the Treatment of Atherosclerosis. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 589654.
66. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. *Sci Signal*, 2010. 3(105): p. cm2.
67. Luo, Y. and S.G. Zheng, Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 2016. 7(604).
68. Wolf, J., S. Rose-John, and C. Garbers, Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 2014. 70(1): p. 11-20.
69. Sanjabi, S., S.A. Oh, and M.O. Li, Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017. 9(6).
70. Horn, F. and I. Moc, Zelladhäsionsmoleküle, in *Biochemie des Menschen*, F. Horn, Editor. 2018, Georg Thieme Verlag.
71. Ramos, T.N., D.C. Bullard, and S.R. Barnum, ICAM-1: isoforms and phenotypes. *The Journal of Immunology*, 2014. 192(10): p. 4469-4474.
72. Staunton, D.E., et al., Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 1988. 52(6): p. 925-933.

73. Bloemen, P.G., et al., Adhesion molecules: a new target for immunoliposome-mediated drug delivery. *FEBS Lett*, 1995. 357(2): p. 140-4.
74. Muro, S. and V.R. Muzykantov, Targeting of antioxidant and anti-thrombotic drugs to endothelial cell adhesion molecules. *Current pharmaceutical design*, 2005. 11(18): p. 2383-2401.
75. Abbate, A., et al., Recurrent angina after coronary revascularization: a clinical challenge. *European heart journal*, 2007. 28(9): p. 1057-1065.
76. Undas, A., K.E. Brummel-Ziedins, and K.G. Mann, Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood*, 2007. 109(6): p. 2285-2292.
77. Schafer, A.I., Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1995. 35(3): p. 209-219.
78. Brown III, C.H., et al., The hemostatic defect produced by carbenicillin. *New England Journal of Medicine*, 1974. 291(6): p. 265-270.
79. Norris, L.A. and J. Bonnar, 9 Haemostatic changes and the oral contraceptive pill. *Baillière's clinical obstetrics and gynaecology*, 1997. 11(3): p. 545-564.
80. Martinez, M. and D. Tsakiris, Thromboserisiko und kombinierte orale Kontrazeption. *Journal für Gynäkologische Endokrinologie*, 2015. 9(2): p. 6-8.
81. Millar, C. and M. Laffan, Hemostatic changes in normal pregnancy, in *Disorders of Thrombosis and Hemostasis in Pregnancy*. 2012, Springer. p. 1-13.
82. Weber, M., et al., Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018. 6: p. 99.
83. Engvall, E. and P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971. 8(9): p. 871-874.
84. [Gebrauchsanweisung]. PMN-Elastase-ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel (DE). 2016 [cited 2021].
85. [Gebrauchsanweisung]. Enzygnost TAT micro, Siemens Healthcare, Marburg (DE). 2015 [cited 2021].
86. [Gebrauchsanweisung]. Asserachrom® β -TG, Diagnostica Stago Inc., Parsippany, New Jersey (USA) 2015 [cited 2021].
87. [Gebrauchsanweisung]. MicroVue SC5b-9 Plus EIA, Quidel Corporation, San Diego (USA). 2015 [cited 2021].
88. [Gebrauchsanweisung]. QIAamp® RNA Blood Mini Handbook. 2021.
89. [Gebrauchsanweisung]. Aurum™ Total RNA Mini Kit. 2021.
90. Mullis, K., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
91. Holzapfel, B. and L. Wickert, Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*, 2007. 37(2): p. 120-126.
92. Link, A., et al., Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow. *J Vis Exp*, 2020(157).
93. Van Oeveren, W., Obstacles in haemocompatibility testing. *Scientifica*, 2013. 2013.
94. Maitz, M.F., et al., Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2017. 13(8): p. 2633-2642.
95. Betsou, F., et al., Biospecimen science of blood for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) functional applications. *Current Pathobiology Reports*, 2019. 7(2): p. 17-27.
96. Egert, M., R. Simmering, and C.U. Riedel, The association of the skin microbiota with health, immunity, and disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2017. 102(1): p. 62-69.
97. Godoy-Ramirez, K., et al., Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2004. 292(1): p. 1-15.
98. Hodge, G., S. Hodge, and P. Han, INCREASED LEVELS OF APOPTOSIS OF LEUKOCYTE SUBSETS IN CULTURED PBMCs COMPARED TO WHOLE BLOOD AS SHOWN BY ANNEXIN V BINDING: RELEVANCE TO CYTOKINE PRODUCTION. *Cytokine*, 2000. 12(12): p. 1763-1768.

99. Riedhammer, C., D. Halbritter, and R. Weissert, Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture, in *Multiple Sclerosis*. 2014, Springer. p. 53-61.
100. Mohan, C.C., K.P. Chennazhi, and D. Menon, In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications. *Acta Biomaterialia*, 2013. 9(12): p. 9568-9577.
101. Blok, S.L.J., G.E. Engels, and W. van Oeveren, In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. *Biointerphases*, 2016. 11(2): p. 029802.
102. Pearson, J.D., Endothelial cell function and thrombosis. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 1999. 12(3): p. 329-341.
103. Michel, T., et al., Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017. 8: p. 459-468.
104. Link, A., et al., In vitro investigation of an intracranial flow diverter with a fibrin-based, hemostasis mimicking, nanocoating. *Biomed Mater*, 2020. 16(1): p. 015026.
105. Lippi, G., et al., Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost*, 2012. 38(6): p. 565-75.
106. Guder, W., Blutentnahme, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019, Springer. p. 461-462.
107. Mayer, A., et al., The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology*, 2009. 258(2-3): p. 139-147.
108. Benowitz, N.L., et al., Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *Journal of the American College of Cardiology*, 1993. 22(4): p. 1159-1167.
109. De Abreu Costa, L., et al., Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules*, 2017. 22(11): p. 1789.
110. Kloverpris, H., et al., Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following coincubation for more than two hours. *Journal of immunological methods*, 2010. 356(1-2): p. 70-78.
111. Dasgupta, A., et al., Rapid estimation of whole blood everolimus concentrations using architect sirolimus immunoassay and mathematical equations: comparison with everolimus values determined by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2011. 25(3): p. 207-211.
112. Lammer, J., et al., Pharmacokinetic analysis after implantation of everolimus-eluting self-expanding stents in the peripheral vasculature. *Journal of Vascular Surgery*, 2012. 55(2): p. 400-405.
113. Lee, K.-J., et al., Pharmacokinetics of sirolimus-eluting stents implanted in the neonatal arterial duct. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 2015. 8(5): p. e002233.
114. Li, J.-J., et al., Randomized comparison of early inflammatory response after sirolimus-eluting stent vs bare metal stent implantation in native coronary lesions. *Clinica Chimica Acta*, 2008. 396(1): p. 38-42.
115. Vetrovec, G.W., et al., Sirolimus PK trial: A pharmacokinetic study of the sirolimus-eluting Bx Velocity stent in patients with de novo coronary lesions. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2006. 67(1): p. 32-37.
116. Matzdorff, A., M. Duckert, and D. Fritze, Die Blutzellen, in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2018, Georg Thieme Verlag.
117. Weimann, A., et al., Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run/Leukozyten, Neutrophile, unreife Granulozyten und Interleukin-6 sind zum Nachweis geringgradiger Entzündungen Procalcitonin, C-reaktivem Protein und Delta-He überlegen: Ergebnisse aus einer Untersuchung von Marathonläufern. *LaboratoriumsMedizin*, 2010. 34(1): p. 53-59.

118. Ertel, W., et al. Proinflammatorische Zytokine regulieren die Apoptose von Granulozyten während der systemischen Entzündung. in *Chirurgisches Forum'97 für experimentelle und klinische Forschung*. 1997. Springer.
119. Braune, S., et al., Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials? *Biointerphases*, 2013. 8(1): p. 33.
120. Fröhlich, E., Hemocompatibility of inhaled environmental nanoparticles: Potential use of in vitro testing. *J Hazard Mater*, 2017. 336: p. 158-167.
121. Tsyganov, I., et al., Hemocompatibility of titanium-based coatings prepared by metal plasma immersion ion implantation and deposition. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2007. 257(1-2): p. 122-127.
122. Hong, J., et al., Material-specific thrombin generation following contact between metal surfaces and whole blood. *Biomaterials*, 2005. 26(12): p. 1397-1403.
123. Kopp, R., K. Mottaghy, and M. Kirschfink, Mechanism of complement activation during extracorporeal blood-biomaterial interaction: effects of heparin coated and uncoated surfaces. *Asaio Journal*, 2002. 48(6): p. 598-605.
124. Bennet, W., et al., Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Upsala journal of medical sciences*, 2000. 105(2): p. 125-133.
125. Watkins, N.A., et al., A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2009. 113(19): p. e1-e9.
126. Hamlet, S., et al., The effect of hydrophilic titanium surface modification on macrophage inflammatory cytokine gene expression. *Clinical oral implants research*, 2012. 23(5): p. 584-590.
127. Harloff, T., et al., Titanium allergy or not? *health*, 2010. 2(04): p. 306.
128. Willert, H.-G., et al., Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints: a clinical and histomorphological study. *JBJS*, 2005. 87(1): p. 28-36.
129. Bruni, S., et al., Effects of surface treatment of Ti-6Al-4V titanium alloy on biocompatibility in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biomaterialia*, 2005. 1(2): p. 223-234.
130. Høi, P.J., et al., Novel nanoparticulate and ionic titanium antigens for hypersensitivity testing. *International journal of molecular sciences*, 2018. 19(4): p. 1101.
131. Thomas, P., et al., Intolerance of osteosynthesis material: evidence of dichromate contact allergy with concomitant oligoclonal T-cell infiltrate and TH1-type cytokine expression in the peri-implantar tissue. *Allergy*, 2000. 55(10): p. 969-972.
132. Kleiveland, C.R., Peripheral blood mononuclear cells. The impact of food bioactives on health, 2015: p. 161-167.
133. Repnik, U., M. Knezevic, and M. Jeras, Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *Journal of Immunological Methods*, 2003. 278(1): p. 283-292.
134. Borch, T.H., I.M. Svane, and Ö. Met, Immune monitoring using mRNA-transfected dendritic cells, in *Synthetic mRNA*. 2016, Springer. p. 245-259.
135. Pollard, K.M., et al., Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discov Med*, 2013. 16(87): p. 123-31.
136. Tan, L. and X. Sun, Recent advances in mRNA vaccine delivery. *Nano Research*, 2018. 11(10): p. 5338-5354.
137. Takebe, J., et al., Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A. 1 macrophage cell line. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2003. 64(2): p. 207-216.
138. Freney, J., et al., *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1988. 38(2): p. 168-172.

139. Frank, K.L., J.L.d. Pozo, and R. Patel, From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008. 21(1): p. 111-133.
140. Pinto, D., et al., Plantaricin A synthesized by *Lactobacillus plantarum* induces in vitro proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF- β 1, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes. *Peptides*, 2011. 32(9): p. 1815-1824.
141. Moadab, F., H. Khorramdelazad, and M. Abbasifard, Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sciences*, 2021. 269: p. 119034.
142. Rollins, B.J., A. Walz, and M. Baggiolini, Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*, 1991. 78(4): p. 1112-1116.
143. Yu, Z., et al., *Lactobacillus Casei* T1 Attenuates *Helicobacter Pylori*-Induced Inflammation in Mice. Available at SSRN 4092522.
144. Nazarpour, R., et al., Optimization of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cryopreservation. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2012. 1(2): p. 88.
145. Xing, L. and D.G. Remick, Mechanisms of dimethyl sulfoxide augmentation of IL-1 β production. *The Journal of Immunology*, 2005. 174(10): p. 6195-6202.
146. Appay, V. and S.L. Rowland-Jones, The assessment of antigen-specific CD8⁺ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *Journal of Immunological Methods*, 2002. 268(1): p. 9-19.
147. Deenadayalan, A., P. Maddineni, and A. Raja, Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. *BMC Research Notes*, 2013. 6(1): p. 120.
148. Fotin-Mleczek, M., et al., Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *Journal of immunotherapy*, 2011. 34(1): p. 1-15.
149. Bueno, C., et al., Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: Comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2001. 46(1): p. 33-40.
150. Asanuma, H., et al., Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *The Journal of infectious diseases*, 2000. 181(3): p. 859-866.
151. North, M., et al., Intracellular cytokine production by human CD4⁺ and CD8⁺ T cells from normal and immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour flow cytometry. *Clinical & Experimental Immunology*, 1996. 105(3): p. 517-522.
152. Gaines, H., L. Andersson, and G. Biberfeld, A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 1996. 195(1): p. 63-72.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Frau Apl. Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Apl. Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski, Frau Dr. rer. nat. Tatjana Michel und Frau Dr. rer. nat. Antonia Theurer (geb. Link).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Tatjana Michel, Dr. rer. nat. Antonia Theurer, Sandra Bäurle, B. Sc. und Bernd Neumann von mir in Zusammenarbeit mit eben diesen und mit Unterstützung durch Erika Zinn durchgeführt.

Die venöse Blutnennahme der Spender erfolgte durch von Denis Canjuga, M. Sc. nach Genehmigung durch Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Schlensak, dem Ärztlichen Direktor der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Tübingen.

Die Methoden der ELISAs wurden von Melanie Wolf (PMN-Elastase, TAT), Pia Müllerbader, B. Sc. (β -TG) und Erika Zinn (SC5b-9) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Tatjana Michel und Dr. Antonia Theurer durch mich mittels GraphPad Prism (Version 8).

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung durch Apl. Prof. Dr. Stefanie Krajewski, Dr. Tatjana Michel und Dr. Antonia Theurer verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 05.06.2024

Julia Maria Braun (Doktorandin)

8 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben. Mein Dank gilt Frau Apl. Prof. Dr. Krajewski für die Annahme als Doktorandin im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen sowie ihre umfassende Betreuung auch aus der Elternzeit heraus. Ich danke ihr und Frau Prof. Dr. rer. nat. Meltem Avci-Adali für die Möglichkeit, meine Versuche im Forschungslabor durchzuführen, sowie die Bereitstellung der hierfür benötigten Materialien und Geräte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tatjana Michel, die mich bis zum Ausscheiden aus dem Labor betreut hat, sowie Frau Dr. Antonia Theurer für ihre umfangreiche Unterstützung sowie die unerschöpfliche Geduld bei Fragen und Problemen.

Zudem danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Klinischen Forschungslabors der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (THG) für die angenehme Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung. Hierbei sind es besonders bei Frau Erika Zinn, Frau Sandra Bäurle und Herrn Bernd Neumann denen ich für die Einweisung und Unterstützung bei meinen Versuchen danken möchte. Weiterhin war es auch die die Unterstützung von Frau Pia Müllerbader und Frau Melanie Wolff bei der Durchführung der ELISA und Herrn Denis Canjuga bei den Blutabnahmen der Spender, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben. In diesem Rahmen danke ich auch allen Freunden und Bekannten, die sich als Blutspender für meine Laborversuche zur Verfügung gestellt haben.

Weiterhin gebührt mein Dank dem Interdisziplinären Promotionskolleg Medizin (IZKF) der Universität Tübingen für das Promotionsstipendium und die wertvollen Erfahrungen, die ich in diesem Programm unter der Betreuung durch Frau Dr. rer. nat. Inka Montero und Frau Dr. rer. nat. Tanja Rieß sammeln durfte.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie. Ohne euch und eure liebevolle Unterstützung in so vieler Hinsicht wäre diese Arbeit und auch mein Studium nicht möglich gewesen. Ich danke euch für die Flügel, aber auch die Wurzeln, die ihr mir gegeben habt.