

Aus der Klinik für Chirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Hans-Peter Bruch)
und
dem Institut für Anatomie
(Direktor: Prof. Dr. Jürgen Westermann)
der Universität zu Lübeck

In-vitro Untersuchungen zur Interaktion alloplastischer Gefäßprothesenmaterialien mit humanen Zellkulturen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Andreas Schmidt
aus Itzehoe

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Broll

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Norbert Guldner

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.11.2009

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Gefäßersatz in der Chirurgie.....	1
1.1.1. Geschichte des Gefäßersatzes	1
1.1.2. Einteilung der Gefäßersatzmaterialien	3
1.1.3. Alloplastische Prothesenmaterialien.....	3
1.1.3.1. Polyethylenterephthalat (PET)	4
1.1.3.2. Polyurethan (PUR).....	5
1.1.3.3. Polytetrafluorethylen (PTFE)	6
1.1.4. Wahl des Gefäßersatzmaterials	6
1.2. Anatomie der Arterie	8
1.3. Einheilung der Prothesen	9
1.3.1. Verlauf der Inkorporation	9
1.3.2. Spezifische Probleme der alloplastischen Prothesen.....	10
1.4. In-vitro Modell zur Material-Zell-Interaktion	11
1.4.1. Vorarbeiten mit Herniennetzen	11
1.4.2. Zellzahlbestimmung mit dem AlamarBlue Assay.....	12
1.4.3. Proliferationsindexbestimmung mit dem Ki-67-Antikörper.....	13
1.4.4. Apoptoseratebestimmung mit dem Annexin V Assay	13
1.5. Aufgabenstellung.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Zellen	16
2.1.1. Endothelzellen.....	16
2.1.2. Muskelzellen	16

2.1.3. Fibroblasten.....	16
2.1.4. Kultivierung der Zellen.....	16
2.2. Prothesenmaterialien	17
2.3. Versuchsanordnungen	17
2.3.1. Vorbereitung der Materialien	18
2.3.2. Zellzahlbestimmung	19
2.3.3. Proliferationsindex.....	20
2.3.4. Apoptoserate	21
2.3.5. Rasterelektronenmikroskopie	21
2.3.5.1. Vorbereitung der Präparate	21
2.3.5.2. Aufarbeitung und Analyse der Präparate	22
2.3.6. Massenspektrometrische Untersuchungen	22
2.3.6.1. Vorbereitung der Präparate	22
2.3.6.2. Aufarbeitung und Analyse der Präparate	23
2.4. Statistik.....	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Zellzahlbestimmung.....	24
3.1.1. Endothelzellen.....	24
3.1.2. Glatte Muskelzellen.....	25
3.1.3. Fibroblasten.....	26
3.2. Proliferationsindex.....	28
3.2.1. Endothelzellen.....	28
3.2.2. Glatte Muskelzellen.....	29
3.2.3. Fibroblasten.....	30
3.3. Apoptoserate.....	32
3.3.1. Endothelzellen.....	32
3.3.2. Glatte Muskelzellen.....	33
3.3.3. Fibroblasten.....	34
3.4. Rasterelektronenmikroskopie	37
3.4.1. Materialveränderungen	37
3.4.1.1. Polyethylentherephthalat	37

3.4.1.2. Polyurethan.....	39
3.4.1.3. verstrecktes Polytetrafluorethylen	40
3.4.2. Endothelzellbesiedlung	42
3.5. Massenspektrometrie	45
3.5.1. Versuchsansatz 1	45
3.5.2. Versuchsansatz 2	46
3.5.3. Versuchsansatz 3	47
3.5.4. Zusammenfassung der Ansätze	48
4. Diskussion.....	49
4.1. In-vitro-Modell.....	49
4.2. Zellzahlbestimmung.....	51
4.2.1. Endothelzellen.....	51
4.2.2. Glatte Muskelzellen.....	52
4.2.3. Fibroblasten.....	53
4.3. Proliferationsindex.....	54
4.3.1. Endothelzellen.....	54
4.3.2. Glatte Muskelzellen.....	54
4.3.3. Fibroblasten.....	55
4.4. Apoptoserate.....	55
4.4.1. Endothelzellen.....	55
4.4.2. Glatte Muskelzellen.....	56
4.4.3. Fibroblasten.....	56
4.5. Rasterelektronenmikroskopie	57
4.5.1. Materialveränderungen	57
4.5.2. Endothelzellbesiedlung	57
4.6. Massenspektrometrie	58
4.7. Schlussfolgerungen.....	60
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64

7. Anhang	78
7.1. Abkürzungen.....	78
7.2. Geräte	79
7.3. Materialien	80
7.3.1. Nährmedien.....	80
7.3.2. Lösungen.....	81
7.3.3. Chemikalien	81
7.3.4. Zelllinien	82
7.3.5. Prothesenmaterialien.....	82
7.4. Einzelwerte	83
7.4.1. Zellzahlbestimmung	83
7.4.1.1. Endothelzellen	83
7.4.1.2. Glatte Muskelzellen	84
7.4.1.3. Fibroblasten	85
7.4.2. Proliferationsindex.....	86
7.4.2.1. Endothelzellen	86
7.4.2.2. Glatte Muskelzellen	87
7.4.2.3. Fibroblasten	88
7.4.3. Apoptoserate	89
7.4.3.1. Endothelzellen	89
7.4.3.2. Glatte Muskelzellen	90
7.4.3.3. Fibroblasten	91
7.5. Zusatzstatistik zur Zellzahlbestimmung.....	83
7.5.1. Endothelzellen.....	83
7.5.2. Glatte Muskelzellen	83
7.5.3. Fibroblasten.....	83
8. Danksagung.....	94
9. Lebenslauf	96
10. Publikationen	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Polyethylenterephthalat (PET)	4
Abbildung 2: Prothesenmaterial aus Polyethylenterephthalat (PET)	4
Abbildung 3: Strukturformel von Polyurethan (PUR)	5
Abbildung 4: Dialyseshunt aus Polyurethan (PUR)	5
Abbildung 5: Strukturformel von Polytetrafluorethylen (PTFE)	6
Abbildung 6: Gefäßprothese aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE).....	6
Abbildung 7: schematische Darstellung einer muskulären Arterie	8
Abbildung 8: Darstellung der Funktionsweise des AlamarBlue Assays	12
Abbildung 9: Darstellung des Zellzyklus.....	13
Abbildung 10: Prinzip der Färbung mit Annexin V und Propidiumjodid	14
Abbildung 11: Beispiel eines Versuchsansatzes	19
Abbildung 12: relative Zellzahl EC in den Materialgruppen	25
Abbildung 13: relative Zellzahl VSMC in den Materialgruppen	26
Abbildung 14: relative Zellzahl FB in den Materialgruppen PET und PUR	27
Abbildung 15: relative Zellzahl FB in der Materialgruppe ePTFE	28
Abbildung 16: Proliferationsindex EC in den Materialgruppen.....	29
Abbildung 17: Proliferationsindex VSMC in den Materialgruppen.....	30
Abbildung 18: Proliferationsindex FB in der Materialgruppe PET.....	31
Abbildung 19: Proliferationsindex FB in der Materialgruppe PUR	31
Abbildung 20: Proliferationsindex der FB in der Materialgruppe ePTFE	32
Abbildung 21: Apoptoserate EC in den Materialgruppen.....	33
Abbildung 22: Apoptoserate VSMC in den Materialgruppen.....	34
Abbildung 23: Apoptoserate FB in der Materialgruppe PET.....	35
Abbildung 24: Apoptoserate FB in der Materialgruppe PUR.....	36
Abbildung 25: Apoptoserate FB in der Materialgruppe ePTFE.....	36
Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PET-Oberflächen im unbehandelten Zustand.....	37
Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PET-Oberflächen nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen	38
Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PUR-Oberflächen in unbehandeltem Zustand	39

Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PUR-Oberflächen nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen	40
Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der ePTFE-Oberflächen in unbehandeltem Zustand	41
Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der ePTFE-Oberflächen nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen	42
Abbildung 32: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des EC-Besiedlungsergebnis von ePTFE	43
Abbildung 33: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des EC-Besiedlungsergebnis von PET	44
Abbildung 34: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des EC-Besiedlungsergebnis von PUR	44
Abbildung 35: Massenspektren der Proben aus Ansatz 1	46
Abbildung 36: Massenspektren der Proben aus Ansatz 2	47
Abbildung 37: Massenspektren der Proben aus Ansatz 3	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: relative Zellzahl EC in den Materialgruppen.....	25
Tabelle 2: relative Zellzahl VSMC in den Materialgruppen.....	26
Tabelle 3: relative Zellzahl FB in den Materialgruppen PET und PUR	27
Tabelle 4: relative Zellzahl FB in der Materialgruppe ePTFE	27
Tabelle 5: Proliferationsindex (PI) der EC in den Materialgruppen.....	29
Tabelle 6: Proliferationsindex (PI) der VSMC in den Materialgruppen.....	29
Tabelle 7: Proliferationsindex (PI) der FB in der Materialgruppe PET.....	30
Tabelle 8: Proliferationsindex (PI) der FB in der Materialgruppe PUR	31
Tabelle 9: Proliferationsindex (PI) der FB in der Materialgruppe ePTFE	32
Tabelle 10: Apoptoserate (AR) der EC in den Materialgruppen.....	33
Tabelle 11: Apoptoserate (AR) der VSMC in den Materialgruppen.....	34
Tabelle 12: Apoptoserate (AR) der FB in der Materialgruppe PET	35
Tabelle 13: Apoptoserate (AR) der FB in der Materialgruppe PUR	35
Tabelle 14: Apoptoserate (AR) der FB in der Materialgruppe ePTFE	36
Tabelle 15: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung (Endothelzellen).....	83
Tabelle 16: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung (glatte Muskelzellen)	84
Tabelle 17: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung (Fibroblasten)	85
Tabelle 18: Einzelwerte der Proliferationsindexbestimmung (Endothelzellen)	86
Tabelle 19: Einzelwerte der Proliferationsindexbestimmung (glatte Muskelzellen).....	87
Tabelle 20: Einzelwerte der Proliferationsindexbestimmung (Fibroblasten).....	88-89
Tabelle 21: Einzelwerte der Apoptoseratebestimmung (Endothelzellen).....	89-90
Tabelle 22: Einzelwerte der Apoptoseratebestimmung (glatte Muskelzellen)	90-91
Tabelle 23: Einzelwerte der Apoptoseratebestimmung (Fibroblasten)	91-92
Tabelle 24: absolute Daten zur Zellzahlbestimmung EC.....	93
Tabelle 25: absolute Daten zur Zellzahlbestimmung VSMC.....	87
Tabelle 26: absolute Daten zur Zellzahlbestimmung FB	94

1. Einleitung

1.1. Gefäßersatz in der Chirurgie

Aus der modernen Gefäßchirurgie ist der Einsatz von Gefäßersatzmaterialien nicht mehr wegzudenken, sei es zur Beseitigung oder Umgehung eines Flußhindernisses, zur Ausschaltung eines Aneurysmas oder bei Gefäßtraumata. In vielen Fällen ist das Einbringen von kompatibelem Material zur Versorgung des entstandenen Defekts notwendig.

Dem Chirurgen steht heute eine Vielzahl von körpereigenen und körperfremden, sogenannten Biomaterialien zur Verfügung, die unter 1.1.2. beschrieben sind. Allen Materialien ist gemein, dass sie grundsätzlich zwar für eine lebenslange Implantation gedacht sind, den Anforderungen, die an Biomaterialien zu stellen sind, allerdings nicht zu 100 Prozent gerecht und teilweise insuffizient werden. So ist vor allem in niedrigkalibrigen Flußbereichen unter sechs Millimetern Innendurchmesser die Wiederverschlußrate nach arterieller Rekonstruktion besonders hoch [62, 137].

Die Wahl des besten Gefäßersatzmaterials ist trotz einer umfangreichen Studienlage und jahrzehntelanger Erfahrung in der Gefäßchirurgie bis heute schwierig und orientiert sich an den unter 1.1.4. dargestellten Gesichtspunkten.

Die Schwierigkeiten in der Auswahl zeigen, dass ein optimaler Gefäßersatz bisher nicht existiert. In Hinblick auf die epidemiologische Entwicklung in den Industrieländern und die Bedeutung des wichtigsten vaskulären Risikofaktors Atherosklerose, die bei Menschen in hohem Lebensalter eine Prävalenz von bis zu 95 Prozent aufweist, ist die Verbesserung der Therapie essentiell [8, 43, 79, 133]. Dies beinhaltet auch die Fortführung der Forschung an prothetischem Gefäßersatz.

1.1.1. Geschichte des Gefäßersatzes

Nachdem im 18. und 19. Jahrhundert die Grundlagen der Gefäßchirurgie wie Nahttechniken und Ligaturen gelegt worden waren, war es die Arbeit von Alexis Carrel (1873-1944) und Charles Claude Guthrie (1880-1963), die chirurgischen Methoden zur Gefäßnaht und Transplantation von Gefäßen zu standardisieren, wofür Carrel 1912 mit dem Nobelpreis geehrt wurde [46, 52, 114].

In Anlehnung an diese Arbeit begannen verschiedene Chirurgen weltweit, arterielle Aneurysmata durch Veneninterponate zu ersetzen, unter ihnen Goyanes, Jeger, Lexer, Pringle und Bernheim. Jean Kunlin, ein Schüler von Rene Leriche, führte 1948 einen

erfolgreichen Venenbypass durch, der vorher erstmalig 1913 von Ernst Jeger zur Aneurysmaausschaltung durchgeführt worden war, was allerdings erst deutlich später an die Öffentlichkeit gelang [46, 52, 83, 87, 110].

Als 1948 und 1949 von Robert Gross und Mitarbeitern der Einsatz eines Homografts, also einer Leichenprothese, beschrieben wurde, begann das Zeitalter der modernen Gefäßchirurgie. Jaques Oudot resezierte 1950 erstmalig die Aortenbifurkation und ersetzte sie durch einen arteriellen Homograft. Die Idee hierzu stammte von Leriche, der diesen Ersatz 1923 als ideale Therapie des thrombotischen Verschlusses der Aortenbifurkation bezeichnet hatte. Etwa zur gleichen Zeit ersetzte Dubost ein abdominelles Aortenaneurysma durch einen Homograft, 1953 erfolgte der Ersatz eines thorakalen Aneurysmas durch DeBakey und Cooley [46, 52, 114].

Es stellte sich im Verlauf heraus, dass sowohl autologe Venen als auch Leichenprothesen nicht immer einsetzbar waren. Homografts hatten eine eingeschränkte Verfügbarkeit und Venen konnten aufgrund ihrer Größe nicht im gesamten arteriellen Stromgebiet genutzt werden. Dies brachte den Wunsch nach künstlichem Gefäßersatz auf. Schon früher hatte zum Beispiel Carrel Glas- und Aluminiumröhren experimentell getestet. Diese Materialien erwiesen sich aber als minderwertig.

Voorhees, Jaretzki und Blakemore implantierten Vinyon-N Prothesen nach Tierversuchen erfolgreich in Menschen. Von diesem Zeitpunkt an begannen intensive Untersuchungen zu synthetisch hergestellten Prothesenmaterialien. 1958 stellte DeBakey seine „Dacron“-Prothese (PET) vor, Edwards fertigte erst Nylon-, später Teflonprothesen (PTFE). 1971 publizierte Sauvage eine Dacronvelourprothese mit verbesserten Einheilungseigenschaften. 1975 wurden gereckte Polytetrafluorethylen-Prothesen (ePTFE) klinisch eingeführt [27, 46, 52, 102, 114].

In den folgenden Jahren bis heute wurden unzählige biochemische Beschichtungen (z.B. Fibronektin, Gelatine, Heparin) experimentell oder klinisch getestet [28, 96, 126] und das Besiedeln der Prothesen mit verschiedenen Zellarten ausprobiert [23, 51, 89, 91, 109, 136], allerdings ohne wegweisende klinische Ergebnisse zu erreichen.

Desweiteren sind Polyurethane in den 1960er Jahren eingeführt worden. Diese Polymere gibt es in unterschiedlichen Verarbeitungsformen. Sie wurden in den letzten Jahren wieder deutlich populärer [62, 120].

Vielversprechende experimentelle Ansätze gibt es bis heute im Bereich des Tissue Engineerings von Gefäßersatz. Hierzu wurden Gefäßzellen oder im Blut zirkulierende Vorläuferzellen des Patienten gewonnen, diese in-vitro vermehrt und in eine geeignete

Matrix eingebracht. So soll in Zukunft dann eine Prothese entstehen, die dem Patienten implantiert werden könnte [5, 6, 9, 54, 82, 115, 131].

1.1.2. Einteilung der Gefäßersatzmaterialien

Grundsätzlich werden alle Materialien, die in den Körper eingebracht werden, nach der Beziehung zwischen Spender und Empfänger eingeteilt. Die folgende Übersicht gibt Aufschluss über die Nomenklatur [32, 56, 85]:

- autogen/autolog: Empfänger und Spender sind identisch.
- syngen/isolog: Empfänger und Spender sind genetisch identisch (z.B. eineiige Zwillinge).
- allogen/homolog: Empfänger und Spender sind genetisch verschieden, gehören aber derselben Spezies an (z.B. Leichengefäß oder Nabelschnurvene).
- xenogen/heterolog: Empfänger und Spender gehören unterschiedlichen Spezies an (z.B. Schweineherzklappenimplantation beim Menschen).

Diese Begriffe beziehen sich nur auf rein biologischen Gefäßersatz. Verwendet werden aktuell vor allem autologe Transplantate der Vena saphena magna, im Bereich der Kardiochirurgie auch arterielle Transplantate (A. radialis oder A. mammaria interna). Homologe oder xenogene Gefäßtransplantate sind im Vergleich Raritäten und vor allem zur Handhabung spezieller Komplikationen, wie z.B. Infektionen von synthetischem Gefäßersatz der Aorta, vorbehalten [10, 25].

Alternativ zu biologischem Ersatz existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen synthetischen, sogenannten alloplastischen Gefäßprothesenmaterialien. Die in der klinischen Routine eingesetzten Materialien bestehen aus polymeren Kunststoffen und basieren auf bzw. setzen sich aus Polyethylenterephthalat (PET), Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Polyurethan (PUR) zusammen [56, 62, 120, 137].

1.1.3. Alloplastische Prothesenmaterialien

Die Ansprüche, die an einen synthetischen Gefäßersatz zu stellen sind, sind hoch. Die drei nachfolgend beschriebenen Materialgruppen sind, obwohl immer noch Objekt intensiver Forschung, schon seit Jahrzehnten in der Gefäßchirurgie im routinemäßigen Einsatz.

1.1.3.1. Polyethylenterephthalat (PET)

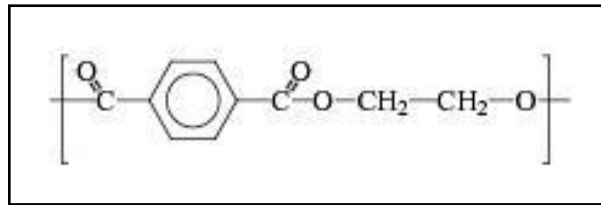


Abbildung 1: Strukturformel von Polyethylenterephthalat (PET)

PET ist als Gefäßersatzmaterial vor allem unter dem Handelsnamen Dacron[®] bekannt. Es handelt sich um ein Polymer aus Ethylenterephthalat, welches über Esterverbindungen entsteht. Somit ist es ein Polyester.

Der Kunststoff wird geschmolzen und zu dünnem Garn verarbeitet. Aus diesem Garn werden dann entweder gewebte oder gestrickte Prothesen hergestellt. Diese Formen unterscheiden sich vor allem in ihrer Porosität, die einen wichtigen Bestandteil der Eigenschaften der Prothese ausmacht, da sie stark für die Einheilung und Zellhaftung verantwortlich gemacht wird. Grundsätzlich gilt, je poröser eine Prothese ist, desto besser heilt sie ein. Die Porengröße ist aber auch bei der Dichtigkeit der Prothese entscheidend.

So ist die gewebte Prothese primär blutdicht, heilt aber schlechter ein, als das gestrickte PET, welches z.B. durch Beschichtungen oder das sogenannte Preclotting (Vorgerinnung: Durch das Eintauchen der Prothese in Patientenblut oder Fibrin werden die Poren verschlossen) abgedichtet werden muss, bevor es implantiert werden kann [56, 70, 72, 78]. Durch die insgesamt gute Inkorporation der PET-Prothesen hat sie im Bereich der großen Gefäße, vor allem im Bereich der Aorta und der Iliakalgefäße eine Vorrangstellung gegenüber den anderen Prothesenmaterialien [45, 56, 62, 70, 72, 78, 105].

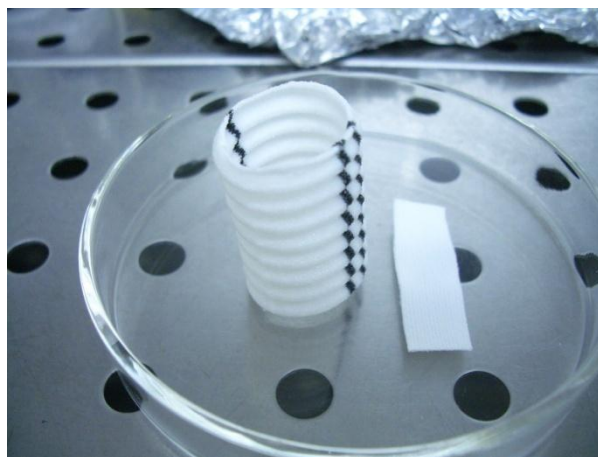


Abbildung 2: Prothesenmaterial aus Polyethylenterephthalat (PET): links Rohrprothese zum Aortenersatz, rechts Patchmaterial zur Einnah in die Gefäßwand

1.1.3.2. Polyurethan (PUR)

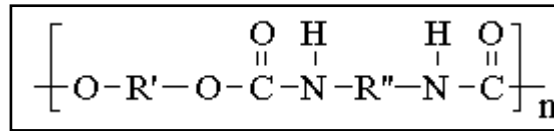


Abbildung 3: Strukturformel von Polyurethan (PUR)

Polyurethane entstehen durch Polymerisation von Urethanmolekülen, die in großer Vielfalt existieren. Daher können Polyurethane sowohl als harte als auch als weichelastische Produkte gefertigt werden.

Je nach Gefäßprothese wurden unterschiedliche Polyurethanverbindungen verwendet, zum Beispiel Polycarbonat-Urethan, Polyether-Polyurethan oder Polyester-Polyurethan. Nachweislich haben diese unterschiedlichen Verbindungen auch abweichende Eigenschaften. Polyester-Polyurethanprothesen der ersten Generation wurden nach Implantation teilweise abgebaut, von einigen Polyurethanen weiß man, dass sich ihr Abbauprodukt Toluylendiamin als karzinogen im Tierversuch erwies.

Neuere industrielle Entwicklungen im Bereich der Polyurethane, vor allem durch die Carbonatverbindungen, produzierten Gefäßersatzmaterialien mit deutlich verbesserter Haltbarkeit nach Implantation. Durch ihre guten hämodynamischen Eigenschaften erhofft man sich eine Verbesserung der Offenheitsraten von synthetischen Bypässen im niedrigkalibrigen Bereich. Daher ist ihr Einsatzgebiet vor allem in der peripheren Bypass- und der Dialyseshunt-Chirurgie lokalisiert [50, 62, 120, 122].

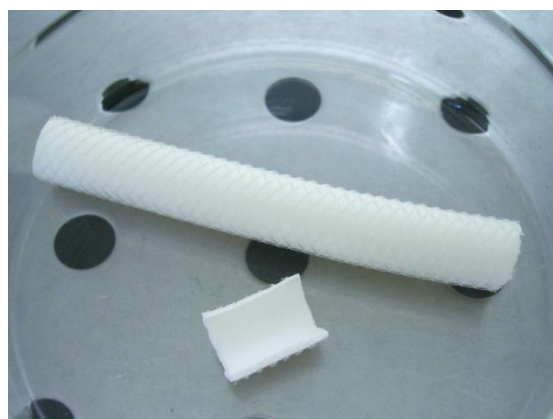


Abbildung 4: Dialyseshunt aus Polyurethan (PUR): vornliegend longitudinal eröffnet zur Innenansicht

1.1.3.3. Polytetrafluorethylen (PTFE)

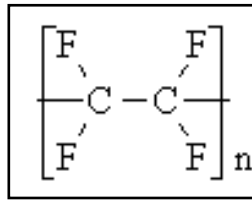


Abbildung 5: Strukturformel von Polytetrafluorethylen (PTFE)

Dieser polymere Kunststoff ist am geläufigsten unter den Handelsnamen Teflon[®] oder Gore-Tex[®]. PTFE wird heute zumeist als gereckte Form, dem sogenannten expanded-PTFE (ePTFE) verwendet. Das Grundgerüst der ePTFE-Prothesen besteht aus länglichen Knötchen, die miteinander durch zahlreiche Mikrofibrillen verbunden sind.

Die Prothesenwände weisen durch die beschriebene Struktur zwar Lücken auf, dennoch sind sie primär blutdicht. Die Lücken füllen sich sukzessiv mit Blut, welches dann gerinnt und die Spalten abdichtet, ohne dass es zu einem Blutaustritt in die Umgebung kommt.

Weiterhin dient dieser mikroporöse Aufbau der besseren Integration der Prothese in das Gefäßbett durch das Einwachsen von Körperzellen.

PTFE ist chemisch sehr reaktionsträge und hat eine stark wasserabweisende Wirkung durch seine elektronegative Innenoberfläche. Daher eignet es sich auch speziell für Implantationen im arteriellen Bereich mit geringeren Durchmessern, z.B. als femoropoplitealer Bypass [27, 45, 52, 56, 62, 78, 105, 137].



Abbildung 6: Gefäßprothese aus gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE): Einsatz im femoropoplitealen Gefäßersatz (Durchmesser 6 mm)

1.1.4. Wahl des Gefäßersatzmaterials

Die Entscheidung, welches Gefäßersatzmaterial eingesetzt werden sollte, ist nach der heutigen Studienlage noch immer relativ leicht zu treffen. Vor allem im Bereich der

peripheren Bypass-Chirurgie unterliegen die Offenheitsraten der synthetischen Bypässe über längere Zeiträume deutlich denen von biologischem Ersatz.

In einer Studie von Tilanus und Mitarbeitern im Jahr 1985 zeigte sich die 54-Monats-Offenheitsrate des verwendeten PTFE-Bypasses für femoro-popliteale Implantation mit 37 % im Vergleich zur autologen V. saphena magna mit 70 % hochsignifikant unterlegen [118]. Klinkert und Mitarbeiter veröffentlichten 2003 eine vergleichbare Studie und gelangten zu einem ähnlichen Ergebnis. Nach 5 Jahren waren hier noch 51,9 % der PTFE-Bypässe offen, wohingegen die Venenbypässe mit 75,6 % signifikant übertrafen [67]. Es zeigte sich also trotz des großen Zeitabstands zwischen den Veröffentlichungen, dass die Ergebnisse für den Gefäßersatz im Bereich der femoro-poplitealen Bypässe insgesamt zwar besser waren, die signifikanten Unterschiede zwischen PTFE und Vene aber nach wie vor bestanden. Klinkert et al. führten daraufhin eine systematische Literaturrecherche durch und zeigten, dass der PTFE-Bypass dem autologen Ersatz nach 5 Jahren mit 39 % zu 74 % unterlag [66].

Vergleicht man PET und PTFE für den femoro-poplitealen Bypass, so sind die Ergebnisse je nach verwendetem Prothesenfabrikat und Beobachtungszeitraum unterschiedlich. Die Studienlage zusammenfassend lässt sich sagen, dass PET bei längeren Zeiträumen entweder gleiche oder schlechtere Ergebnisse erzielt als PTFE [28, 77, 93, 96].

Polyurethane sind vor allem im Bereich der Hämodialyseshuntis in klinischen Tests untersucht worden. Hier haben sie den großen Vorteil, dass sie nach Herstellerangaben sofort punktiert werden können im Gegensatz zu den meisten PTFE-Shunts und nicht-synthetischen arteriovenösen Fisteln (Cimino-Fisteln). Die Offenheitsraten unterscheiden sich aber auch hier nicht signifikant von denen der PTFE-Shunts [41, 65, 73, 90].

Vergleicht man die PTFE-Offenheitsraten bei Dialyseshuntis mit denen von autologen Gefäßen, so zeigt sich vergleichbar zu den Ergebnissen bei femoro-poplitealen Bypässen eine schlechtere Langzeitfunktion. In einer Metaanalyse von 2003, die 34 Studien einschloss, wurde die primäre Offenheit nach 18 Monaten von PTFE-Shunts und autologen AV-Fisteln mit 33 % zu 51 % angegeben [58].

Es ist laut Literatur richtig zu sagen, dass der autologe Ersatz in Hinblick auf die Offenheitsraten zu bevorzugen ist. In fast allen Fällen dient hier die V. saphena magna als Ersatzgefäß. Sie ist allerdings nicht in allen Fällen einsetzbar, sei es, weil die Qualität der Vene z.B. aufgrund von Varikosis zu schlecht ist oder weil der Gefäßdurchmesser der Vene für den Ersatz nicht ausreicht. Dieses Problem liegt vor allem im aortalen Bereich

vor. Oft erscheint es auch sinnvoll, die Venen für einen Sekundäreingriff oder die koronare Bypasschirurgie zu schonen [33, 79].

Alternative biologische Materialien (Nabelschnurvene, Leichen- oder Tiergefäße) sind aufgrund geringerer Verfügbarkeit, möglicher immunologischer Reaktionen und potentieller Aneurysmabildung mittlerweile auf spezielle Indikationen beschränkt [10, 25, 56].

Daher bleibt es trotz der schlechteren Prognose auch heute in vielen Fällen unumgänglich, ein natives Gefäß durch synthetische Materialien zu ersetzen. Hieraus erklärt sich das große Interesse an den Gründen für die schlechteren Eigenschaften der Kunststoffe sowie an ihrer Verbesserung und der Entwicklung neuen Gefäßersatzes.

1.2. Anatomie der Arterie

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, baut sich eine Arterie aus drei Schichten auf: Tunica intima, Tunica media und Tunica externa oder Adventitia. Im allgemeinen Sprachgebrauch und somit auch in dieser Arbeit wird von Intima, Media und Adventitia gesprochen.

Diese Schichten bestehen aus unterschiedlichen Zellen bzw. Bestandteilen und dienen unterschiedlicher Funktionen, auch können sie noch genauer unterteilt werden.

Die innerste Schicht der Arterie ist die Intima. Sie besteht aus dem einzelligen Endothel, welches die Begrenzung der Gefäßwand zum Lumen darstellt.

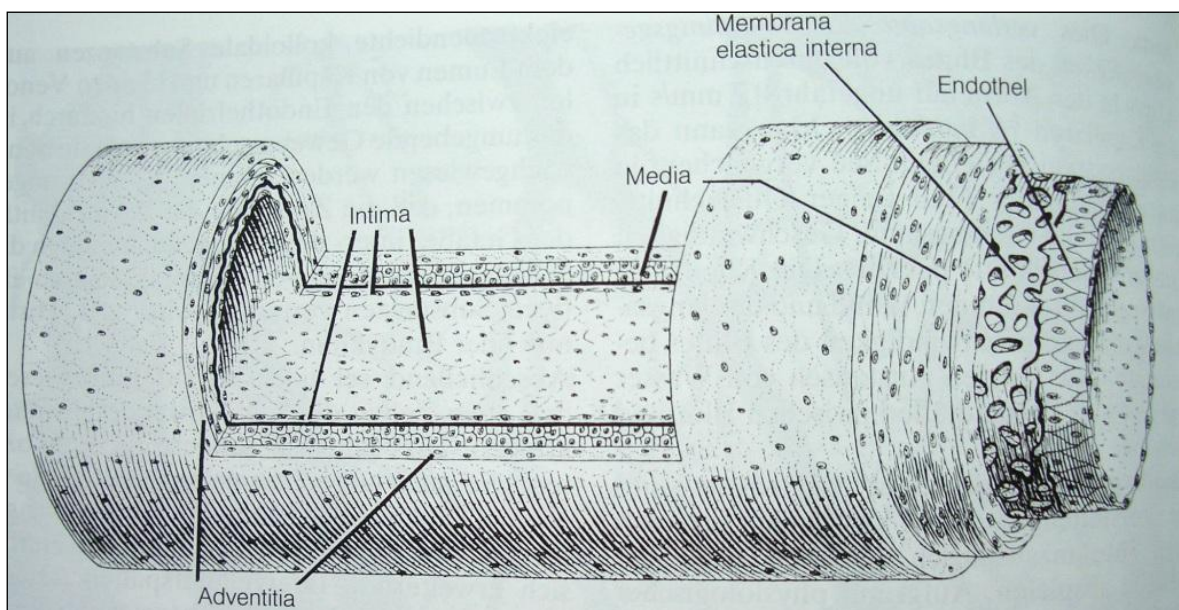


Abbildung 7: schematische Darstellung einer muskulären Arterie (aus Junqueira LC, Carneiro J: Histologie. 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1996)

Die Endothelzellen sind flach und liegen auf einer dünnen Basalmembran. Darunter schließt sich das Stratum subendotheliale an, welches aus lockerem Bindegewebe und gelegentlichen glatten Muskelzellen besteht und durch die Membrana elastica interna von der Media getrennt wird.

Die Endothelzellen und eine unversehrte Endothelschicht sind funktionell sehr bedeutsam. Bei Defekten kommt es zur Auslösung der Blutgerinnung, außerdem kontrolliert die Intima den Nährstoff- und Gasaustausch. Durch die Produktion von humoralen Faktoren und Signalmolekülen (z.B. Stickstoffmonoxid) nehmen die Endothelzellen auch an der Regulation des Gefäßwiderstands teil.

Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, die in zwei Subtypen vorkommen, dem kontraktilen und dem metabolisch aktiven oder synthetisierenden Typ [88, 94]. Abhängig von der Beanspruchung des Gefäßes liegen hier unterschiedliche Mengen an Elastin, Kollagen und Proteoglykanen. Die Media reguliert die Gefäßweite und stabilisiert die Wand gegen den Blutdruck.

In größeren Gefäßen trennt eine dünne Membrana elastica externa die Media von der Adventitia. In dieser äußeren Schicht, die die Arterie mit dem umliegenden Gewebe verbindet, befinden sich vor allem kollagenes Bindegewebe und Fibroblasten. Hier verlaufen vegetative, gefäßregulatorische Nerven und Vasa vasorum, die die äußere Media miternähren. Die inneren Schichten der Arterie werden per diffusionem von luminal ernährt [7, 61, 97, 104].

1.3. Einheilung der Prothesen

Implantiert man eine synthetische Gefäßprothese, so reagiert der Körper auf das Implantat, indem er versucht, die natürliche Gefäßwand, wie sie unter 1.2. beschrieben ist, nachzuahmen. Die Ergebnisse des alloplastischen Ersatzes sind aber bis heute schlechter als bei autologem Material (siehe 1.1.4.), was zum größten Teil auf eine unzureichende Einheilung zurückzuführen ist.

1.3.1. Verlauf der Inkorporation

Bereits in den 1970er Jahren fand man heraus, dass sich im Lumen einer alloplastischen Gefäßprothese eine Zellschicht bildet, wenn man sie implantiert, die der eines genuinen Gefäßes ähnelt [103, 112]. Schnell zeigte sich, dass eine gut besiedelte Oberfläche, die Neo- oder Pseudointima genannt wird, in Gefäßprothesen antithrombogen wirkt und die Wiederverschlußraten senkt. Diese Erkenntnisse führten unmittelbar dazu, dass man auf

der einen Seite versuchte, Prothesen mit Endothelzellen zu besiedeln [51, 89], auf der anderen Seite aber auch die Einheilung der Prothesen, die zur Besiedlung zu führen schien, untersuchte [21, 22, 51, 78].

Der Ursprung der Zellen, die die Neointima bilden, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Ursprünglich ging man davon aus, dass sich das neue Endothel von den Anastomosen her ausbildet und außerdem Zellen durch die porösen Prothesen einwachsen, die das Einheilen und die Neointimaformation unterstützen [18, 21, 22, 64, 100, 108]. Durch die Entdeckung der Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark, die im Blut zirkulieren, gilt es als gesichert, dass sie auch einen Anteil an der Bildung der Neointima durch Absiedlung an der luminalen Seite der Prothesen haben [13, 57, 95, 107].

Unabhängig vom Ursprung der Zellen der Neointima teilt sich die Einheilung der Prothesen morphologisch in drei Stadien ein: Frühstadium, Stadium der Organisation und Narbenstadium [22, 78, 112].

Das Frühstadium beginnt zum Zeitpunkt der Implantation und dauert etwa zwei Wochen. Dominiert wird das Geschehen von einem der Wundheilung ähnlichen Bild. Es kommt zu einer milden immunologischen Fremdkörperreaktion mit typischen Zellen der Entzündung (Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen) und zu einem periprothetischen Hämatom, welches über mehrere Tage resorbiert und von Granulationsgewebe organisiert wird. Dadurch kommt es zur ersten Anhaftung der Prothesenwand am umgebenden Gewebe.

Die nächste Phase, die bis zu sechs Monaten dauert, wird dominiert von bindegewebiger Proliferation, die sehr faserreich ist und die Prothesenwand penetriert. An der luminalen Oberfläche zeigen sich inselförmige Ablagerungen von Zellen. Zusätzlich wächst das Endothel von den Anastomosen her ein. Die Prothese ist fest verankert, man kann allerdings ihre Struktur noch genau erkennen.

Im Narbenstadium, welches nach etwa sechs Monaten einsetzt, nimmt die mesenchymale Aktivität deutlich ab. Es bleibt allerdings in vielen Fällen eine latente, chronische Fremdkörperreaktion und eine Lockerung der Prothese kann stattfinden.

1.3.2. Spezifische Probleme der alloplastischen Prothesen

Wie bereits ausführlich dargelegt, unterliegen die Langzeitoffenheitsraten der synthetischen Gefäßersatzmaterialien denen des biologischen Gefäßersatzes in den meisten Studien signifikant. Dies liegt vor allem daran, dass die Ansprüche an das Gefäßersatzmaterial sehr hoch sind. Es muss in seinen physikalischen Eigenschaften

(Stabilität, Elastizität und luminaler Flußwiderstand), seiner Biokompatibilität (immunologische Toleranz und Thrombogenität) und seiner Haltbarkeit dem ersetzten Gefäß möglichst gleichen [44].

Trotz der Verbesserung der Biomaterialien in den vergangenen 40 Jahren kommt es immer noch zu Komplikationen. Die meisten von ihnen können auch in biologischen Gefäßen auftreten, dennoch ist ihr Vorkommen bei synthetischen Materialien höher.

Die speziellen Komplikationen der alloplastischen Prothesen in der Gefäßchirurgie sind Fremdkörperreaktion und Serombildung [14, 15, 34, 86, 127], Infektionen und, bei weitem am wichtigsten, Wiederverschluß durch Thrombosierung oder Re-Stenosen.

Die Re-Stenosen in den Prothesen sind allerdings nicht Folge von Atherosklerose, sondern von einer Aktivierung der glatten Muskelzellen. Diese proliferieren und bilden Verdickungen der subendothelialen Schicht der Neointima. Dieses Phänomen wird als neointimale Hyperplasie bezeichnet. Der Pathomechanismus ist noch nicht abschließend geklärt, es gilt aber als gesichert, dass die Wandstruktur eine entscheidende Rolle spielt. Verletzungen oder unphysiologische Belastung der Zellen wie z.B. Dehnung der Prothesen- oder Gefäßwand können Ursachen sein [21, 24, 44, 55, 80, 81, 94, 98, 99, 139]. Das Verständnis für die Pathomechanismen der Komplikationen und das konsequente Ausschalten ihrer auslösenden Faktoren bilden den Schlüssel zur Verbesserung der synthetischen Prothesen und damit letztendlich der besseren Therapie der Gefäßerkrankungen.

1.4. In-vitro Modell zur Material-Zell-Interaktion

1.4.1. Vorarbeiten mit Herniennetzen

Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich weltweit mit der Erarbeitung von In-vitro-Modellen zum Einfluss von Biomaterialien auf humane Zellen. Die Arbeitsgruppe um Broll und Duchrow in Lübeck untersuchte verschiedene Netzmaterialien, die zum Verschluss von Bauchwandhernien benutzt werden. Sie untersuchten mit molekularbiologischen Markern den Einfluß der Netze auf Proliferation und Apoptose von HeLa-Zellen (einer Zervixkarzinomzelle) und Fibroblasten [17, 30].

Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate dieser Zellen bei gemeinsamer Inkubation mit einem Polypropylenetz im Vergleich zu Kontrollen signifikant anstieg [30]. Der Proliferationsindex fiel erst nach Resterilisation der Netze signifikant ab [17].

Rasterelektronische Untersuchungen von Polypropylenetzen nach Inkubation mit Fibroblasten ergänzten die In-vitro-Tests zur Material-Zell-Interaktion [12, 68].

Diese Methoden werden durch eine Zellzahlbestimmung und Tests zur Materialdegradation gut ergänzt und ergeben dann das in dieser Arbeit verwendete In-Vitro-Modell.

1.4.2. Zellzahlbestimmung mit dem AlamarBlue Assay

Der AlamarBlue Assay wurde entwickelt, um die Proliferation einer Zellmenge zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf einem Indikator, der zu einem geeigneten Wachstumsmedium hinzu gegeben wird. Dieser Indikator löst sich im Zellmedium und bestimmt dessen Farbe. Je mehr Medium von den Zellen verbraucht wird, desto größer ist der Farbumschlag des Mediums. Der Indikator verfärbt sich von dunkelblau nach rot in Abhängigkeit der chemischen Reduktion des Mediums (Reduktions-/Oxidationssystem).

Der Farbumschlag wird am Photometer anhand der Extinktionen bei 570 nm und 600 nm Wellenlänge bestimmt (siehe Abb. 8). Diese Extinktionen werden über die Versuchstage in festen Intervallen gemessen. Die gemessenen Extinktionen werden nach Herstellerangaben in Prozent Reduktion umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigungen dieser Kurven ergeben die prozentuale Reduktion pro Stunde, welche direkt mit der Zellzahl korreliert. Die Änderung der Zellzahlen über einen Untersuchungszeitraum entspricht dem positiven oder negativen Zellwachstum. [1].

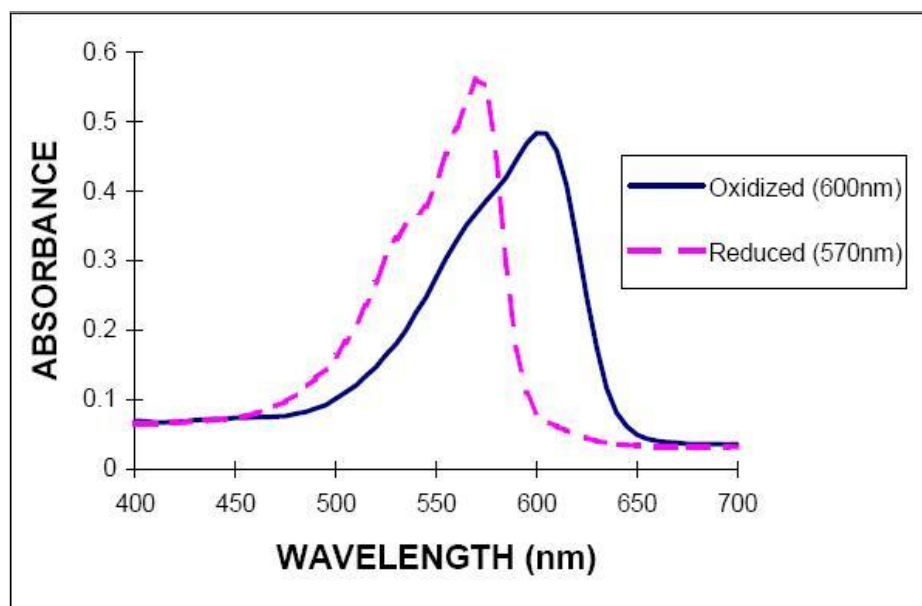


Abbildung 8: Darstellung der Funktionsweise des AlamarBlue Assays (aus der Produktbeschreibung der Firma Biosource, Solingen, Deutschland)

1.4.3. Proliferationsindexbestimmung mit dem Ki-67-Antikörper

Kontinuierlich proliferierende Zellen durchlaufen permanent einen festgelegten Zellzyklus. In diesem kommt es in definierten Phasen zur Verdopplung der DNA (Synthese-Phase - S) und zur Zellteilung (Mitose-Phase - M). Diese Phasen sind getrennt von einer G_1 - und einer G_2 -Phase (Gap). Befinden sich die Zellen in einem Ruhezustand, in dem keine Proliferation stattfindet, so bezeichnet man dies als G_0 -Phase. Der Ablauf ist in Abb. 9 dargestellt [121].

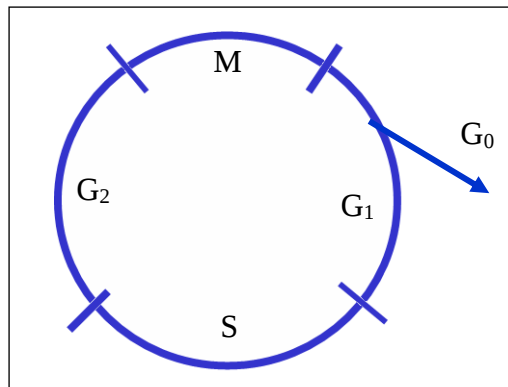


Abbildung 9: Darstellung des Zellzyklus: M – Mitosephase, G_0 , G_1 und G_2 – Gap-Phasen, S – Synthesephase

Das Ki-67-Protein kommt in allen proliferierenden humanen Zellen vor, dass heißt in jeder Zelle, die sich nicht in der G_0 -Phase befindet. Etabliert ist der monoklonale Antikörper Ki-67 sowohl für die durchflusszytometrische als auch die immunhistologische Darstellung des Proteins. In dieser Arbeit wurde per Durchflusszytometrie der Proliferationsindex, d.h. der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in Proliferation befinden, gemessen. Hierzu wurde das unter 2.3.3. beschriebene Verfahren angewendet, welches sich in der Literatur als eines der Standardverfahren bewährt hat [29, 31, 40, 106].

1.4.4. Apoptoseratebestimmung mit dem Annexin V Assay

Die Apoptose (programmierter Zelltod) einer Zelle läuft in Form eines genetisch festgelegten Procedere ab. Nach Verlust der Zellbindung und Herauslösen der Zelle aus dem Zellverband kommt es zur Zellschrumpfung und Veränderung der Zellmembran. Phosphatidylserin, ein Membranphospholipid, wird während der frühen Apoptose an der Aussenseite der Zellmembran exponiert [26] (siehe Abb. 10).

Annexin V ist ein calciumabhängiges phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Dieses bindet durch die unter 2.3.4. beschriebene Versuchsdurchführung an das Phosphatidylserin der untersuchten Zellen. Durch die

Kopplung an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) können diese Zellen in der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden.

Da aber auch bei nekrotischen Zellen die Zellmembran untergeht und Defekte entstehen, durch diese das Annexin V in die Zelle gelangt und bindet, gilt es, diese Zellen auszuschließen. Dies gelingt durch eine parallele Färbung mit Propidiumjodid, welches DNA färbt. Dies kann nur bei abgestorbenen Zellen angefärbt werden, da die Zellmembran die DNA schützt. Annexin V ist somit ein Marker der frühen Apoptose.

In der Durchflusszytometrie werden also die Annexin V positiven und Propidiumjodid negativen Zellen gezählt. Der prozentuale Anteil dieser Zellen zur Gesamtheit entspricht der Apoptoserate [124].

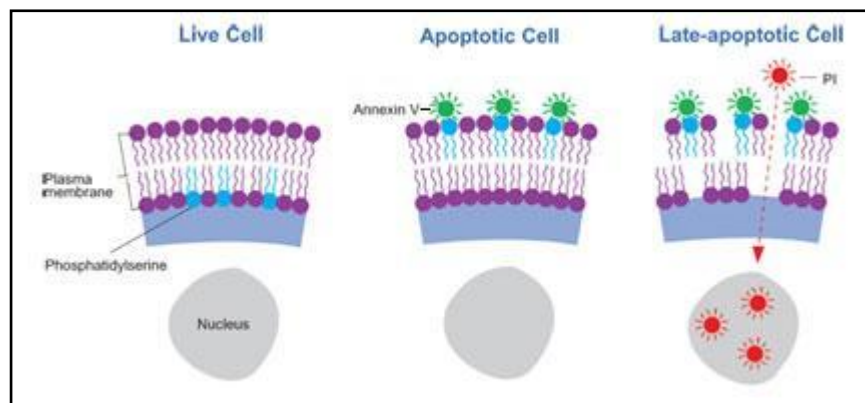


Abbildung 10: Prinzip der Färbung mit Annexin V und Propidiumjodid (aus der Produktbeschreibung der Firma Imgenex, San Diego, USA)

1.5. Aufgabenstellung

In der heutigen Zeit sind alloplastische Gefäßprothesen nicht mehr aus der modernen Chirurgie wegzudenken. Wie aber bereits unter 1.1.4. und 1.3.2. beschrieben, existiert auch heute noch kein optimales Material, welches dem autologen Ersatz eines arteriellen Gefäßes in Hinblick auf die Offenheitsrate und geringerem Maß an Komplikationen gleichkommt.

Obwohl es unzählige tierexperimentelle und klinische Studien zu den Prothesenmaterialien gibt, sind die Ursachen und auslösenden Mechanismen, die zu den schlechteren Langzeitergebnissen mit alloplastischen Gefäßersatzmaterialien führen, nicht suffizient erklärt. Vor allem die molekularbiologischen Interaktionen zwischen Material und Organismus sind bis heute nicht ausreichend verstanden. Die Notwendigkeit von weiteren In-vitro-Untersuchungen zur Darstellung dieser Zusammenhänge ist unbestritten.

Der Nachteil an laborexperimenteller Materialforschung liegt in dem nur unzureichend modellhaft darstellbaren, komplexen System des tierischen oder menschlichen

Organismus. Die Vielzahl an zellulären und humoralen Interaktionen lassen sich nur sehr bedingt nachahmen.

Ein Vorteil, der sich direkt aus diesem Problem ergibt, ist, dass der Untersucher sich auf ganz spezifische Aspekte der Interaktion zwischen Zelle und Material konzentrieren kann, ohne dass er interferierende Faktoren mit einbeziehen muss.

Inspiziert von den unter 1.4.1. beschriebenen Untersuchungen wurde das In-vitro-Modell, welches zur Bestimmung der Apoptoserate und des Proliferationsindex nach Inkubation von HeLa-Zellen und Fibroblasten mit Herniennetzmaterialien genutzt wurde, erweitert.

Mit Hilfe der Zellzahlbestimmung lassen sich indirekt die Mengen der Zellen in den Materialgruppen mit einer Kontrollgruppe zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten darstellen und vergleichen. Dies ergibt somit direkt eine Aussage zum Einfluss des Materials auf die Zellen der Kulturen. Apoptoserate und Proliferationsindex sind einzelne Aspekte, die eine niedrigere oder höhere Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen dann unter Umständen erklären können. Insofern stellt sich die Untersuchung mittels AlamarBlue Assay konzeptionell vor die Durchflusszytometrie mit Annexin V und Ki-67.

Die Hypothesen waren für diese Arbeit wie folgt zu stellen: Die Zellzahl der ausgesuchten humanen Gefäßzelllinien ist zu den untersuchten Zeitpunkten in den Proben mit alloplastischen Gefäßprothesenmaterialien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen ohne Prothesenkontakt reduziert. Ursächlich für diesen Effekt wurden eine erhöhte Apoptoserate und ein verminderter Proliferationsindex angenommen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Materialdegradationen stattfinden, wenn man die Polymere mit Flüssigkeit oder mit Zellen zusammenbringt. Hierzu wurden zwei Untersuchungen durchgeführt. Die Rasterelektronenmikroskopie sollte zeigen, ob Endothelzellen strukturelle Defekte an dem Material erzeugen, mit dem sie inkubiert werden. Auch konnten die Materialien in Hinblick auf unterschiedliche Endothelzellhaftung untersucht werden. Die Massenspektrometrie diente dem Nachweis von möglichen chemischen Bestandteilen, die sich nach Inkubation des Materials in Wasser aus dem Kunststoff herauslösen oder abspalten.

2. Material und Methoden

2.1. Zellen

In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden drei verschiedene humane Zellreihen verwendet. Wie unter 1.2. dargestellt, besteht ein Gefäß aus drei Schichten: Intima, Media und Adventitia. Aus jeder dieser Schichten wurde der vorherrschende Zelltyp zu den Versuchen herangezogen.

2.1.1. Endothelzellen

Die in der Intima vorherrschende Zelle ist die Endothelzelle. Als Zellreihe wurde hier HIAE-55 (Produktnummer CRL-2608 – Wistar Special Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) verwendet. Diese Zelllinie entstammt der gesunden Arteria iliaca communis einer 49 Jahre alten Frau.

2.1.2. Muskelzellen

In der Gefäßmedia findet man vor allem glatte Gefäßmuskelzellen. Die verwendete Zellreihe ist T/G HA-VSMC (Produktnummer CRL-1999, ATCC, Manassas, VA, USA). Diese gesunden glatten Muskelzellen haben ihren Ursprung in der Aorta eines elf Monate alten Mädchens.

2.1.3. Fibroblasten

Die Adventitia besteht in der Hauptsache aus Bindegewebe, daher ist der vorherrschende Zelltyp der Fibroblast. In diesen Untersuchungen wurde die Zelllinie MRC-5 (Produktnummer CCL-171, ATCC, Manassas, VA, USA) verwendet. Diese Zellreihe wurde aus der Lunge eines gesunden 14 Wochen alten männlichen Säuglings gewonnen.

2.1.4. Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden grundsätzlich nach den in [36] beschriebenen Techniken gehandhabt. Etwaige Abweichungen entstanden nur durch Angaben des Zelllieferanten oder durch laborinterne Arbeitsmethoden und sind gegebenenfalls angegeben.

Alle Zelllinien wurden in mit einprozentiger Schweinegelatinelösung (Sigma, Rödermark, Deutschland) beschichteten Gewebekulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Feuchtbrutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) in zellspezifischen Nährmedien (siehe Anhang) kultiviert.

Bei Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurde die Kultur passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS (PAA, Pasching, Deutschland) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Deutschland) für etwa sieben Minuten inkubiert. Durch die enzymatische Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche entstand eine Zellsuspension, die dann gleichmäßig auf zwei gleich große Kulturflaschen aufgeteilt und mit Kulturmedium beschickt wurde.

Dies geschah bei den Endothelzellen etwa einmal pro Woche, bei den glatten Muskelzellen und den Fibroblasten circa alle drei Tage.

Da die Endothelzellen nur einmal in der Woche subkultiviert wurden, musste zur Vitalitätserhaltung alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel stattfinden. Die anderen Zellreihen erhielten jeweils bei der Passagierung frisches Kulturmedium.

2.2. Prothesenmaterialien

Allgemeine Beschreibungen der alloplastischen Gefäßprothesenmaterialien wurden in 1.1.3. ausführlich dargelegt. Die in dieser Arbeit untersuchten Materialien sind:

- Gestricktes Polyethylenterephthalat (Bard Sauvage Filamentous Fabric, Bard Peripheral Vascular, Tempe, AZ, USA)
- Polyurethan (Expedia Vascular Heparinised Access Graft, LeMaitre Vascular, Wrexham, United Kingdom)
- verstrecktes Polytetrafluorethylen (Lifespan Reinforced Expanded PTFE Vascular Graft, Edwards Lifesciences, Irvin, CA, USA)

Alle Materialien wurden in den nachfolgend beschriebenen Versuchen der Originalverpackung entnommen und unter sterilen Bedingungen in unten beschriebene Stücke zerschnitten. Dementsprechend ist ihr Zustand vergleichbar zu dem einer Implantation in den Menschen.

2.3. Versuchsanordnungen

In dieser Arbeit wurden fünf Parameter der Zell-Material-Interaktion untersucht. Laborchemisch waren die relative Zellzahl, die Apoptoserate und der Proliferationsindex von Interesse. Es folgten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen hinsichtlich möglicher Materialveränderungen als Zeichen einer Degradierung der Prothesen durch Zellen, außerdem wurde hier das Anwachsen der Endothelzellen begutachtet. Schlussendlich folgte eine massenspektrometrische Analyse von angefertigten Lyophilisaten unter der Fragestellung, ob möglicherweise Abbauprodukte der

synthetischen Materialien in die Umgebung abgegeben werden. Wenn im Weiteren nicht ausdrücklich erwähnt wird, welcher Zelltyp oder welches Prothesenmaterial gemeint ist, ist davon auszugehen, dass die Beschreibungen für alle obigen Zelltypen und Materialien gelten und die Versuche auch mit diesen durchgeführt wurden.

2.3.1. Vorbereitung der Materialien

Jeder der unten aufgeführten Versuche wurde prinzipiell in gleicher Weise vorbereitet (Abweichungen sind im Detail bei den jeweiligen Arbeitsschritten aufgeführt.) und fand unter sterilen Bedingungen statt.

Die Prothesenmaterialien wurden den Verpackungen entnommen und in 1 cm² große Stücke zerschnitten. Diese wurden dann in mit 1% Gelatinelösung beschichtete 12-Loch Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegeben.

Bei Versuchsvorbereitung wurden nur Zellen verwendet, die in den Gewebekulturflaschen eine konfluente Schicht erreicht hatten. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA gelöst. Nach Zugabe von Kulturmedium wurde die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und für drei Minuten mit 213 g (1000 U/min) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 5 ml Kulturmedium wurde eine 10 µl große Probe mit 90 µl Trypanblaulösung (Sigma, Rödermark, Deutschland) gefärbt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zellsuspension wurde abschließend auf eine Konzentration von $0,5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml verdünnt. In jedes Loch der 12-Loch Platten wurde 1 ml der Zellsuspension pipettiert, so dass die Kunststoffprothesenstücke in Medium versenkt waren. Als Kontrollgruppe wurde jeweils 1 ml Zelllösung in ein Loch ohne Prothesenmaterial gegeben (siehe Abb. 11).

Die Ansätze wurden abgedeckt und in den Brutschrank gestellt, wo sie für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert wurden.

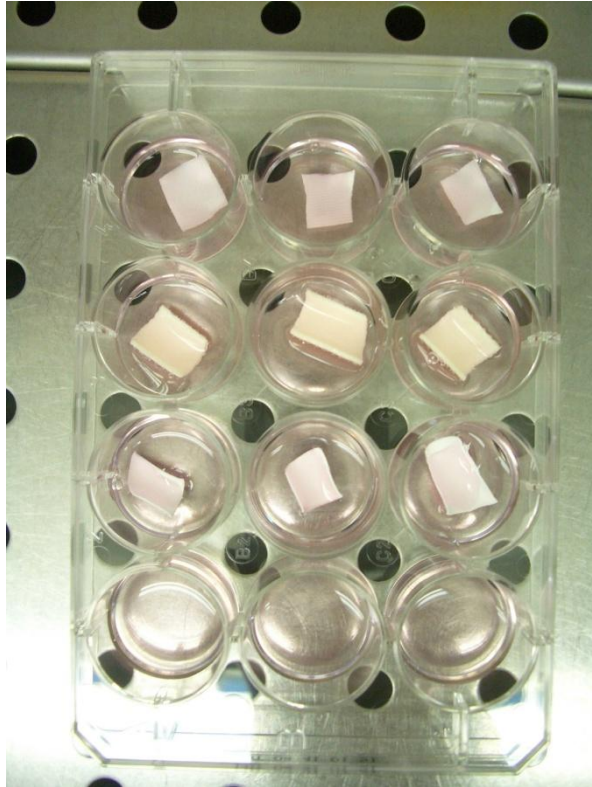


Abbildung 11: Beispiel eines Versuchsansatzes – Material und Kontrollen in einer 12-Lochplatte mit $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/Loch in Suspension mit Kulturmedium (von oben nach unten: PET, PUR, ePTFE, Kontrollen)

2.3.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit dem AlamarBlue Assay (Biosource, Solingen, Deutschland) durchgeführt, der unter 1.4.2 erklärt wurde. Hierfür wurden die Ansätze wie unter 2.3.1 beschrieben hergestellt und inkubiert. Nach dem ersten Inkubationszeitraum (24 h) wurde im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axioplan, Oberkochen, Deutschland) kontrolliert, ob sich die Zellen am Boden der Platte abgesetzt hatten und adhärent wuchsen, denn nur so war eine Messung technisch möglich.

Nun wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 2 ml eines phenolrotfreien Mediums (siehe Anhang) ersetzt. Die Ansätze wurden in den Brutschrank zurückgestellt, um das gewechselte Medium auf 37 °C zu erwärmen. Außerdem wurden jeweils 2 ml dieses Mediums in zwei Gewebekulturschalen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegeben, welche der Kontrollmessung dienten. Nach einer Stunde wurden jeweils 200 µl AlamarBlue zu den Ansätzen und einer der Kontrollen (Leerprobe) pipettiert und diese vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Die andere Kontrolle ohne AlamarBlue diente der Geräteeichung.

Aus jeder Probe wurden 100 µl entnommen und die Extinktionen am Photometer bei 570 und 600 nm gegen die Leerprobe gemessen. Dies wurde nach zwei, vier und sechs Stunden wiederholt. Nach der letzten Messung wurde das phenolrotfreie Medium abgesaugt und

durch zellspezifisches Kulturmedium ersetzt, die Ansätze wurden wieder in den Brutschrank gestellt.

Das gleiche Procedere wurde mit den Ansätzen an den beiden Folgetagen wiederholt, um eine Aussage über die Zellzahl nach 48 und 72 Stunden Inkubation zu ermöglichen.

Da die Methode technisch nur funktioniert, wenn die zu untersuchenden Zellen am Untergrund adhären, wird der Basiswert (bei Proliferationsindex und Apoptoserate Nullpunktbestimmung) bei 24 Stunden definiert, da sich die Zellen hier am Untergrund festgesetzt haben, was im Phasenkontrastmikroskop überprüft wurde. Die 24-Stunden-Werte weichen in den einzelnen Gruppen jedoch bereits voneinander ab. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen zu gewährleisten, werden die Messwerte der Zellzahlen relativiert, indem sie durch den jeweiligen Basiswert der Gruppe geteilt werden. So ist der relative 24-Stunden-Basiswert in jeder Gruppe 1 (was 100 % entspricht). Die folgenden relativen Zellzahlen sind auf den definierten Basiswert bezogen. Im Ergebnisteil werden daher die relativen Zellzahlen der Materialgruppen mit den Kontrollen zu einem definierten Zeitpunkt verglichen.

2.3.3. Proliferationsindex

Der Proliferationsindex ist in seinen Grundlagen unter 1.4.3. beschrieben und wurde nach 0, 24, 48 und 72 Stunden bestimmt.

Zur Nullpunktbestimmung wurde pro Probe 1 ml der Zellsuspension, wie sie unter 2.3.1. zum Versuchsansatz verwendet wurde, in ein FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt.

Für die Messungen nach obigen Inkubationszeiten wurden die Ansätze dem Brutschrank entnommen, die Proben mit PBS gespült und anschließend trypsinisiert. Nach dem Lösen der Zellen wurde das Trypsin durch Kulturmedium inaktiviert und die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen überführt.

Zur Färbung gegen das Ki-67-Antigen wurden die Röhrchen im ersten Schritt mit 306 g (1200 U/min) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgte ein Waschschriff mit einer 0,5 % Lösung aus fötalem Kälberserum (FKS - Gibco BRL, Berlin) in PBS (im Folgenden als FKS/PBS bezeichnet). Nun wurden die Zellen in 500 µl FKS/PBS resuspendiert und 500 µl frisch angesetzte, eiskalte 4 % Paraformaldehydlösung hinzu gegeben. Die Röhrchen wurden für 20 Minuten auf Eis gelagert, wodurch man eine Fixierung der Zellen erreichte. Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 306 g) und Abgießen

des Überstandes wurden die Zellen mit 0,25% Triton-X-100 Lösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert, um eine Penetration der Zellen zu ermöglichen.

Nach einem Waschschrift erfolgte die Färbung der Zellen mit 100 µl 1% FITC-konjugierter Ki-67 Antikörperlösung (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) auf Eis für 45 Minuten. Nach zwei weiteren Wachsritten wurden die gefärbten Zellen in BD FacsFlow-Lösung (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert und am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest Version 3.2 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

2.3.4. Apoptoserate

Die Färbung der Zellen zur Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mit dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Analog zu den Beschreibungen in 2.3.3. wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden geerntet und in FACS-Röhrchen überführt.

Danach erfolgten ein Waschschrift mit FKS/PBS und anschließend die Resuspension in 100 µl Binding Puffer. Zur Färbung wurden jeweils 5 µl Annexin V-FITC und Propidiumjodid hinzu gegeben. Nach 15minütiger Inkubation im Dunkeln wurden weitere 400 µl Binding Puffer hinzugefügt und die Lösung am Durchflusszytometer mit dem Programm CellQuest Version 3.2 gemessen und ausgewertet.

2.3.5. Rasterelektronenmikroskopie

2.3.5.1. Vorbereitung der Präparate

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Gefäßprothesenoberflächen wurde die unter 2.3.1. beschriebene Vorbereitung der Versuche etwas abgewandelt, um eine optimierte Anordnung zur Begutachtung von Materialveränderungen zu erreichen. Das Material wurde wie zuvor beschrieben geschnitten und in 12-Lochplatten gegeben. Nun wurden sterilisierte, speziell angefertigte Glasringe, die im äußeren Durchmesser den Aussparungen der Lochplatten entsprachen, auf das Material gelegt, um ein seitliches Ansiedeln der Zellen neben der Prothese, was unter den Anordnungen 2.3.2 – 2.3.4. durchaus erwünscht war, zu verhindern. Diese Glasringe wurden abschließend mit sterilen Metallringen beschwert, um die Position der Prothesenstücke am Boden der Platte zu festigen.

Auf den so vorbereiteten Platten wurden $2 \cdot 10^5$ Endothelzellen ausgesät und für sieben Tage inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Kulturmediumwechsel zur Vitalitätserhaltung.

2.3.5.2. Aufarbeitung und Analyse der Präparate

Nach dem Inkubationszeitraum wurde das Medium vorsichtig abpipettiert. Pro zu testendem Material wurden zwei Präparate hergestellt. Eine Probe wurde gründlich mit PBS gespült, wodurch eine zellfreie Oberfläche geschaffen wurde, die vollständig auf Materialveränderungen geprüft werden konnte. Diese Proben wurden an der Luft abgedeckt getrocknet. Die zweite Probe jedes Materials wurde unverändert durch Übergießen mit Fixationslösung nach „Monti-Grazia-Dei“ (siehe Anhang 7.3.2) konserviert. Hier konnte das Anwachsen der Endothelzellen auf den Prothesen beurteilt werden. Als Kontrollen dienten jeweils die Materialien nach steriler Entnahme aus der Packung ohne Veränderungen.

Zur Untersuchung wurden alle Proben getrocknet und mit Platin-Palladium (SCD 040, Balzers AG, Balzers, Liechtenstein) bedampft. Anschließend erfolgte die Rasterung der Präparate bei 10 bis 15 kV mittels Rasterelektronenmikroskop SEM505 (Philips/FEI, Eindhoven, Niederlande). Die Ergebnisse wurden digital gespeichert.

Anfertigung der Präparate und Rasterelektronenmikroskopie erfolgten unter freundlicher Anleitung und Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Thilo Wedel (ehemals Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck).

2.3.6. Massenspektrometrische Untersuchungen

2.3.6.1. Vorbereitung der Präparate

Die Probenvorbereitung variierte bei der Massenspektrometrie sehr im Vergleich zu den vorherigen Versuchen. Ziel dieser Untersuchung war die Darstellung etwaiger Abbauprodukte der Prothesen nach Inkubation für drei Tage. Da die Inkubation mit Zellen und deren Kulturmedien eine unergiebige Liste an Ausschlägen in der Spektrometrie ergeben würde, musste hier auf eine vereinfachte Form der Darstellung zurückgegriffen werden.

Die Materialien wurden zerschnitten, in gläsernen Reagenzgläsern platziert und mit sterilem bidestillierten Wasser übergossen. Bei diesem Versuch wurde bewusst jeder Kontakt zu Kunststoffen vermieden, um eine mögliche Verunreinigung der Proben auszuschließen. Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank wurde 1 ml des Wassers jeder Probe in ein kleineres Glasgefäß (Präparategläser 35 * 12 mm, Schütt Labortechnik

GmbH, Göttingen, Deutschland) überführt, welches verschlossen werden konnte. Diese Proben konnten anschließend durch Lyophilisation (Christ L1/Alpha 1, Christ, Osterode, Deutschland) über einen Zeitraum von 12 Stunden auf die gelösten Bestandteile reduziert werden, da die lyophile Trocknung unter Vakuum das Wasser verdunsten lässt. Es bleibt ein pulverförmiger Rest in den Gläschen. Die Präparategläser wurden verschlossen und gekühlt in das Forschungszentrum Borstel zu Herrn PD Dr. rer. nat. Buko Lindner (Abteilung für Biophysik) verschickt, mit dessen freundlicher Unterstützung die massenspektrometrische Analyse der Proben stattfand.

Als Vergleich dienten jeweils Kontrollen mit dem gleichen bidestilliertem Wasser, welches für die Proben mit den Materialien verwendet und ebenfalls für drei Tage inkubiert und anschließend lyophilisiert wurde.

2.3.6.2. Aufarbeitung und Analyse der Präparate

Alle Lyophilisate wurden mit dem Fourier-transform ion cyclotron resonance Massenspektrometer (FT-ICR MS, Apex II, Bruker-Daltonic, Billerica, Massachusetts, USA) analysiert. Hierzu wurden die lyophilisierten Proben wieder in Lösung gebracht und mit einer speziellen Elektrospraylösung verdünnt. Über eine Elektrospray-Ionenquelle wurde die Lösung mit einer Rate von 2 µl pro Minute in das Massenspektrometer gesprüht. Durch eine gerätespezifische externe Eichung mit Peptiden bekannter Masse wurde gewährleistet, dass alle Proben unter gleichen experimentellen Bedingungen massenspektrometrisch dargestellt und vergleichbar analysiert werden konnten.

2.4. Statistik

Zur Erhebung der deskriptiven und vergleichenden Statistik wurde das Programm SPSS Version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Zum Gruppenvergleich kam der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Für die im Anhang unter 7.5. dargestellten Ergebnisse zum Vergleich der Werte einer Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen angewendet. Ein $p\text{-Wert} \leq 0,05$ galt als signifikant.

Eine Anpassung des Alpha-Fehlers an die durchgeführten Tests wurde nicht vorgenommen. Deshalb verstehen sich alle inferenzstatistischen Tests letztlich nur deskriptiv.

3. Ergebnisse

3.1. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung mittels AlamarBlue Assay gibt primär indirekt die Zellzahl der lebenden Zellen wieder, da am Photometer mittels Absorptionsmessungen die Reduktion von AlamarBlue gemessen werden kann. Die Methode wird daher als indirekt bezeichnet, weil es ohne Eichung nicht möglich ist, die numerische Zellzahl (z.B. 2000 Zellen) zu bestimmen, und nur über die Absorptionen ein Vergleich angestellt werden kann. Daher sind alle gemessenen Ergebnisse (Anhang 7.4.1. und 7.5.) in der Einheit Prozent Reduktion pro Stunde angegeben, welche indirekt die Zellzahl widerspiegelt. Eine Eichung der Methode konnte zu den Zwecken dieser Versuche nicht sinnvoll durchgeführt werden, da davon auszugehen ist, dass die Reduktion von AlamarBlue und damit auch die Absorptionen sowohl von der Zellart als auch vor allem von der Zellpassage abhängig sind. Folglich hätte zu jeder Versuchsreihe eine umfangreiche Eichreihe mitlaufen müssen, was wegen der dafür benötigten Zellmengen unmöglich war.

Wie unter 2.3.2. beschrieben, wurden die Absorptionen nach Inkubation mit den Prothesenmaterialien für 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Der 24-Stunden-Wert wird als Basiswert definiert. Nach Bildung der relativen Zellzahlen (siehe 2.3.2.) lassen sich diese gut untereinander vergleichen. Die relativen Zellzahlen sind einheitslos und beziehen sich immer auf den 24-Stunden-Wert einer Gruppe. Ein Wert von 0,8 bedeutet daher, dass die absolute Zellzahl dem Basiswert in absoluten Zahlen multipliziert mit dem Faktor 0,8 entspricht.

Die absoluten Mittelwerte der Zellzahlbestimmung werden im Anhang unter Punkt 7.5. dargestellt. Desweiteren werden zur Darstellung der Ergebnisse deskriptive Aussagen getroffen (z.B. „die Zellzahl stieg über die Zeit an“). Die Zellzahlveränderungen innerhalb der einzelnen Gruppen wurden zu diesem Zweck ebenfalls statistisch untersucht. Da dies aber nicht zur Klärung einer Hypothese sondern beschreibend und zur Interpretation der Ergebnisse getan wurde, werden diese Daten daher tabellarisch im Anhang unter 7.5. dargestellt.

3.1.1. Endothelzellen

Die relativen Zellzahlen der humanen Endothelzellen bei Inkubation mit den untersuchten Materialien im Vergleich zu der Kontrollgruppe sind nachstehend in Abbildung 12 bzw. Tabelle 1 dargestellt.

In der Kontrollgruppe veränderte sich die Zellzahl über den Beobachtungszeitraum (zwischen 72 und 24 Stunden) nicht signifikant. In den Materialgruppen sah man eine deutliche Abnahme der Zellzahl über die untersuchte Zeit bei PUR und PET, das ePTFE zeigte hier ebenso wie die Kontrollgruppe keinen relevanten Unterschied (siehe Anhang 7.5.1.).

Im Vergleich der relativen Zellzahlen unterschieden sich sowohl das PET als auch das PUR nach 48 und 72 Stunden signifikant von der Kontrollgruppe. Ein Einfluss des ePTFE auf die relative Zellzahl konnte nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied (Tabelle 1).

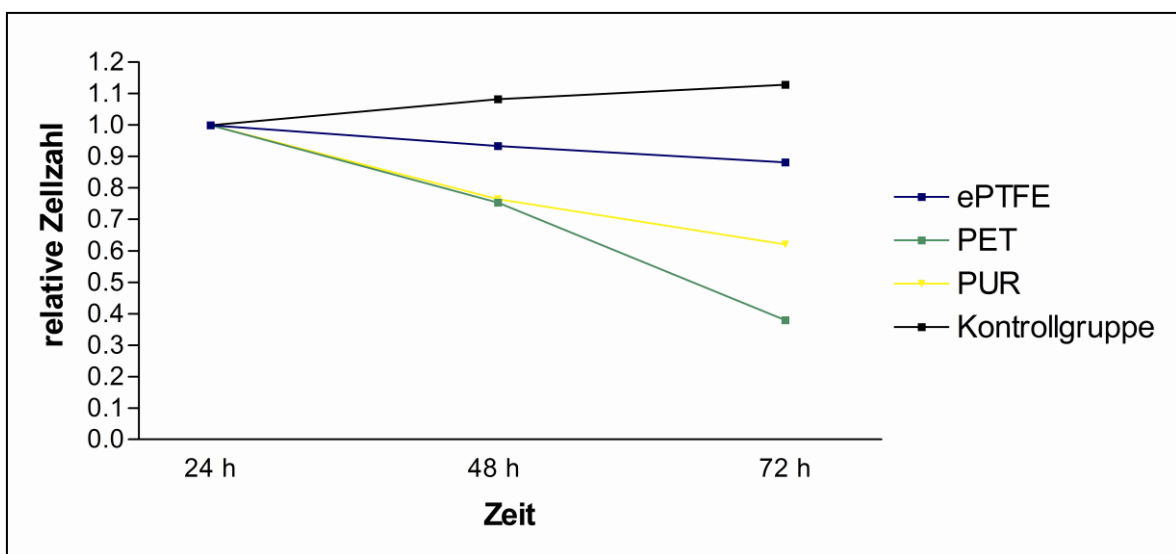


Abbildung 12: relative Zellzahl EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	PET		PUR		ePTFE	
	rel. Zellzahl (± SD)	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert
48h	1,083 (0,14)	0,754 (0,37)	0,009	0,765 (0,19)	0,004	0,934 (0,33)	0,102
72h	1,129 (0,32)	0,380 (0,21)	≤ 0,001	0,621 (0,25)	0,002	0,881 (0,30)	0,145

Tabelle 1: relative Zellzahl EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD) und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

3.1.2. Glatte Muskelzellen

Bei den Untersuchungen mit den glatten Muskelzellen zeigte sich sowohl für PET als auch PUR eine signifikant niedrigere relative Zellzahl verglichen mit der Kontrollgruppe nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Für das

ePTFE konnte erneut kein signifikanter Einfluss des Materials nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Um den signifikanten Einfluss von PET und PUR zu interpretieren (siehe 4.2.2.), lohnt der Blick auf den Kurvenverlauf innerhalb der einzelnen Gruppen. Vergleicht man in allen vier untersuchten Gruppen die absoluten Zellzahlen nach 72 Stunden mit denen nach 24 Stunden, so war nur bei PET die Zellzahl signifikant abgefallen. Im Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden fiel das PET ebenfalls ab. Das PUR zeigte auch in diesem Zeitraum keine relevante Veränderung, obwohl die relativen Zellzahlen von PUR und Kontrolle bei 48 Stunden signifikant differierten. In der Kontrollgruppe stieg jedoch die Zellzahl von 24 auf 48 Stunden signifikant an. Nach 72 Stunden war kein Wachstum mehr nachweisbar (siehe Anhang 7.5.2).

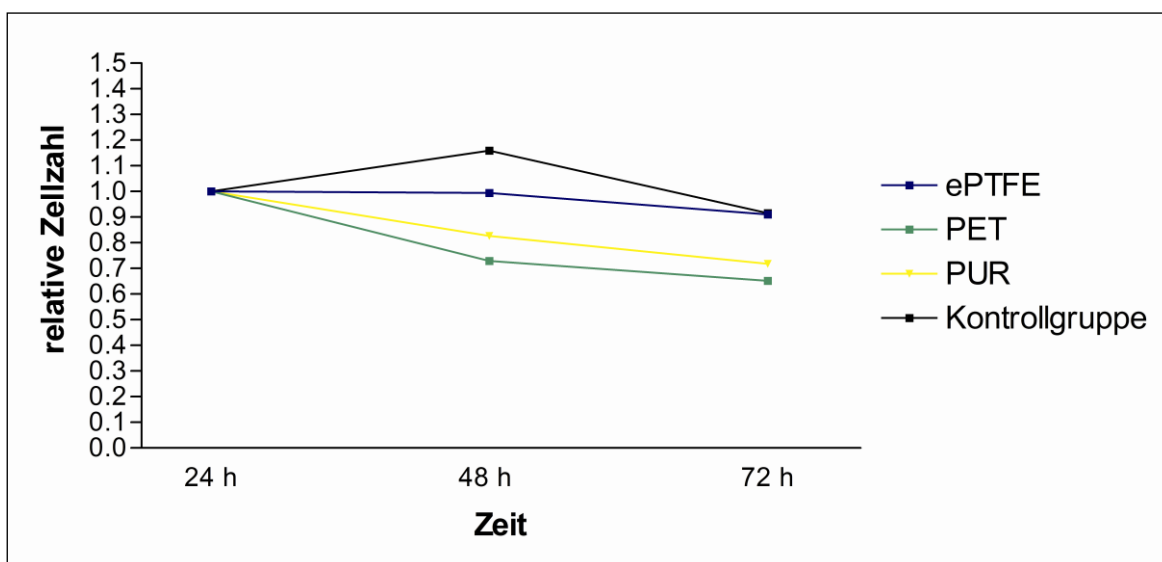


Abbildung 13: relative Zellzahl VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	PET		PUR		ePTFE	
	rel. Zellzahl (± SD)	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert
48h	1,160 (0,12)	0,730 (0,14)	≤ 0,001	0,827 (0,22)	0,003	0,995 (0,30)	0,085
72h	0,915 (0,35)	0,652 (0,19)	0,566	0,718 (0,35)	0,627	0,911 (0,41)	0,825

Tabelle 2: relative Zellzahl VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD) und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

3.1.3. Fibroblasten

Bei den Untersuchungen mit den Fibroblasten zeigte sich in allen Gruppen ein Anstieg der Zellzahlen von 24 auf 72 Stunden. Dieser verlief bei den Kontrollen gleichmäßiger. Bei

den drei Materialgruppen kam es zwischen 24 und 48 Stunden zu keiner signifikanten Änderung der Zellzahl, dann stiegen die Zahlen aber im zweiten untersuchten Intervall deutlich an (siehe Anhang 7.5.3).

Der Vergleich der Materialgruppen mit den Kontrollen ergab für alle Materialien und untersuchten Zeitpunkte eine signifikant geringere relative Zellzahl bei den Materialien. Anzumerken ist, dass bei den Versuchen mit den Fibroblasten die Materialgruppen zum Teil zeitlich versetzt untersucht werden mussten. Daher liegen unterschiedliche Kontrollgruppen vor, was hier und im folgenden (Proliferationsindex und Apoptoserate) zur getrennten Darstellung der Ergebnisse führte.

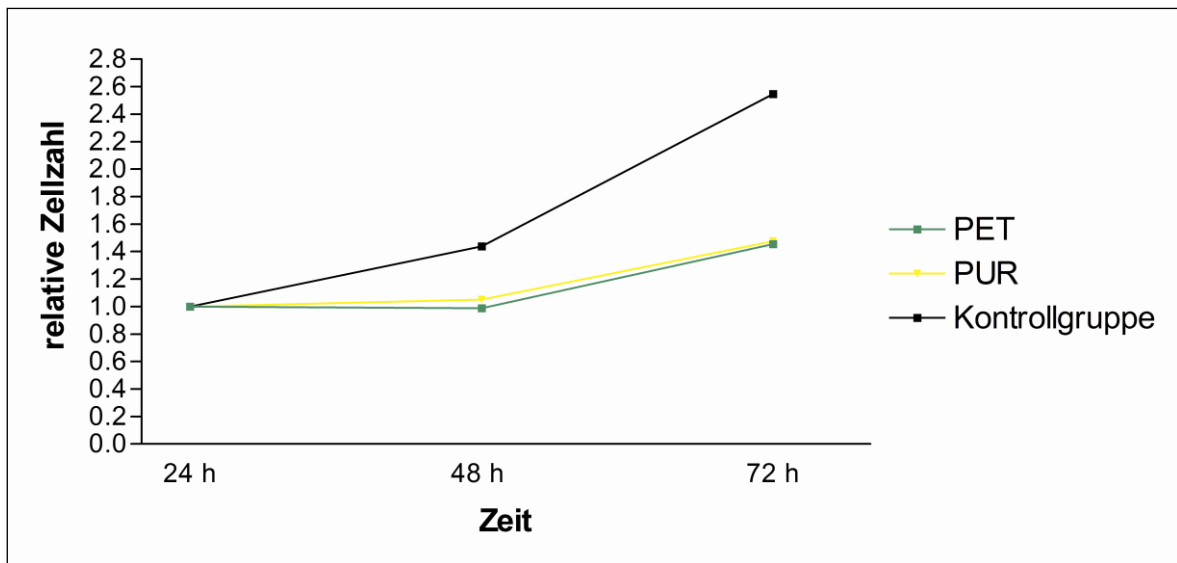


Abbildung 14: relative Zellzahl FB in den Materialgruppen PET und PUR im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

Zeit	Kontrolle	PET		PUR	
	rel. Zellzahl (± SD)	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert
48h	1,439 (0,33)	0,989 (0,12)	0,005	1,051 (0,16)	0,024
72h	2,548 (0,74)	1,454 (0,37)	0,004	1,477 (0,39)	0,005

Tabelle 3: relative Zellzahl FB in den Materialgruppen PET und PUR im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD) und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

Zeitraum	Kontrolle	ePTFE	
	rel. Zellzahl (± SD)	rel. Zellzahl (± SD)	p-Wert
48h	1,172 (0,08)	0,974 (0,18)	0,007
72h	1,707 (0,38)	1,225 (0,22)	0,002

Tabelle 4: relative Zellzahl FB in der Materialgruppe ePTFE im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n = 9) und Standardabweichung (SD) und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

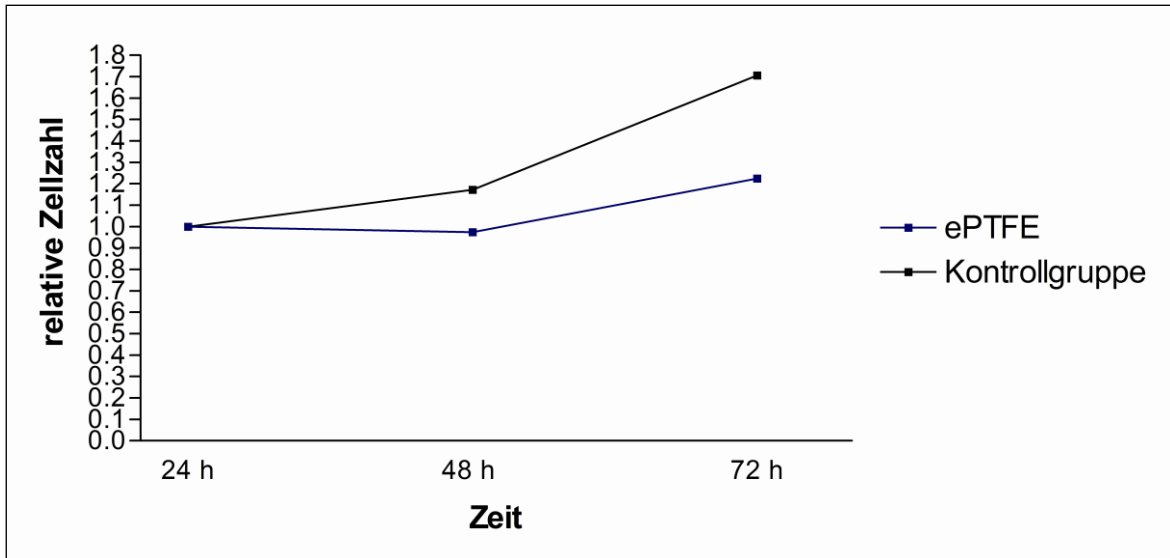


Abbildung 15: relative Zellzahl FB in der Materialgruppe ePTFE im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwerte bei n = 9)

3.2. Proliferationsindex

Wie unter 2.3.3. beschrieben wurde der Proliferationsindex zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Analog zur Zellwachstumsbestimmung wurde auch der Proliferationsindex der Zellen, die mit Material in Kontakt standen, zu dem von Zellen ohne Materialkontakt als Kontrollgruppe verglichen. Bei den Nullstundenwerten handelte es sich allerdings um Grundwerte, die den Proliferationsindices der Zellen entsprachen, die für den Ansatz des Versuchs verwendet wurden. Somit sind diese Werte in Material- und Kontrollgruppen identisch.

3.2.1. Endothelzellen

In Tabelle 5 und Abb. 16 sind die Ergebnisse der Proliferationsindexbestimmung der Endothelzellen nach Kontakt mit den polymeren Kunststoffen dargestellt. Es zeigten sich Zellen, die sich nur mit einer Ausnahme (PUR nach 48 h) immer mit über 90 % in Proliferation befanden.

Zeit	Kontrolle	PET		PUR		ePTFE	
	PI (± SD)	PI (± SD)	p-Wert	PI (± SD)	p-Wert	PI (± SD)	p-Wert
0h	93,787 (1,90)	93,787 (1,90)	1,000	93,787 (1,90)	1,000	93,787 (1,90)	1,000
24h	94,876 (1,46)	95,166 (1,88)	0,825	94,401 (1,78)	0,508	95,494 (1,34)	0,310
48h	90,637 (4,84)	90,173 (7,13)	0,724	89,460 (5,80)	0,757	91,434 (3,87)	0,757
72h	92,120 (1,89)	93,010 (1,29)	0,354	90,480 (2,53)	0,085	93,008 (2,84)	0,508

Tabelle 5: Proliferationsindex (PI) der EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=9) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

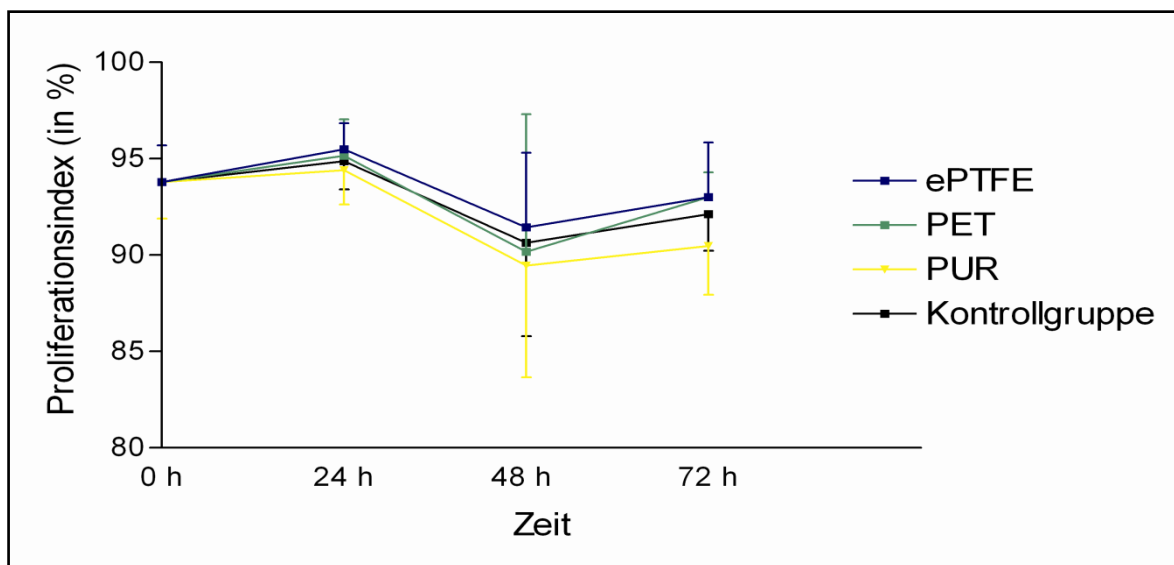


Abbildung 16: Proliferationsindex EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle

Für keines der Materialien ließ sich ein signifikanter Unterschied mit den Kontrollen im Proliferationsindex darstellen. Der untersuchte Proliferationsmarker pKi-67 wurde durch alle drei polymeren Kunststoffe unverändert bei den Endothelzellen analog zu den Kontrollen exprimiert.

3.2.2. Glatte Muskelzellen

In Abbildung 17 bzw. Tabelle 6 ist zu sehen, dass der Proliferationsindex der glatten Gefäßmuskelzellen nicht signifikant durch die drei Polymere beeinflusst wurde. Die Werte für die Materialien und die Kontrollgruppe verliefen gleichsinnig. Bis nach 48 Stunden unterschied sich der Proliferationsindex nicht wesentlich vom Ausgangswert. Auffällig war allerdings ein Abfall von über 10 % in jeder Gruppe zum Zeitpunkt 72 Stunden.

Zeit	Kontrolle	PET		PUR		ePTFE	
	PI (± SD)	PI (± SD)	p-Wert	PI (± SD)	p-Wert	PI (± SD)	p-Wert
0h	97,484 (2,08)	97,484 (2,08)	1,000	97,484 (2,08)	1,000	97,484 (2,08)	1,000
24h	97,203 (1,37)	97,317 (1,76)	0,507	96,735 (2,11)	0,817	97,689 (1,47)	0,184
48h	97,587 (1,55)	97,057 (2,36)	0,624	96,345 (2,02)	0,100	97,592 (1,53)	0,977
72h	88,886 (10,39)	84,804 (13,57)	0,309	85,510 (10,25)	0,268	87,353 11,06)	0,518

Tabelle 6: : Proliferationsindex (PI) der VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=11-12) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

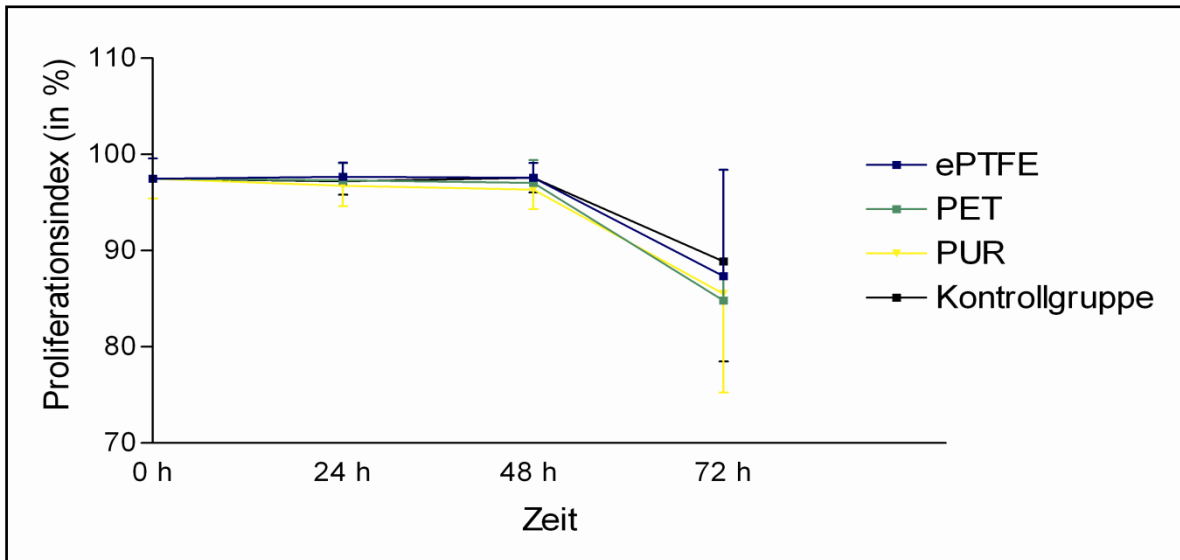


Abbildung 17: Proliferationsindex VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle

3.2.3. Fibroblasten

Wie in den Tabellen 7 bis 9 und Abbildungen 18 bis 20 zu sehen ist, lag der Proliferationsindex der Fibroblasten grundsätzlich bei den Kontrollgruppen minimal über den Indices der Testreihen mit Kontakt zu den polymeren Gefäßprothesenmaterialien (einzige Ausnahme: PET nach 24 Stunden). Dies erwies sich für das Polyurethan bei 24 Stunden als signifikant, wobei der Wert nur marginal unterschiedlich zur Kontrollgruppe war. Zusammenfassend muss auch bei den Fibroblasten davon ausgegangen werden, dass keine relevante Beeinflussung des Proliferationsindex stattfand.

Zeit	Kontrolle	PET	
	PI (± SD)	PI (± SD)	p-Wert
0h	97,112 (0,84)	97,112 (0,84)	1,000
24h	89,852 (15,52)	90,841 (13,98)	0,686
48h	95,731 (1,78)	89,641 (12,79)	0,073
72h	89,416 (8,89)	87,825 (9,67)	0,299

Tabelle 7: Proliferationsindex (PI) der FB in der Materialgruppe PET im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=12) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

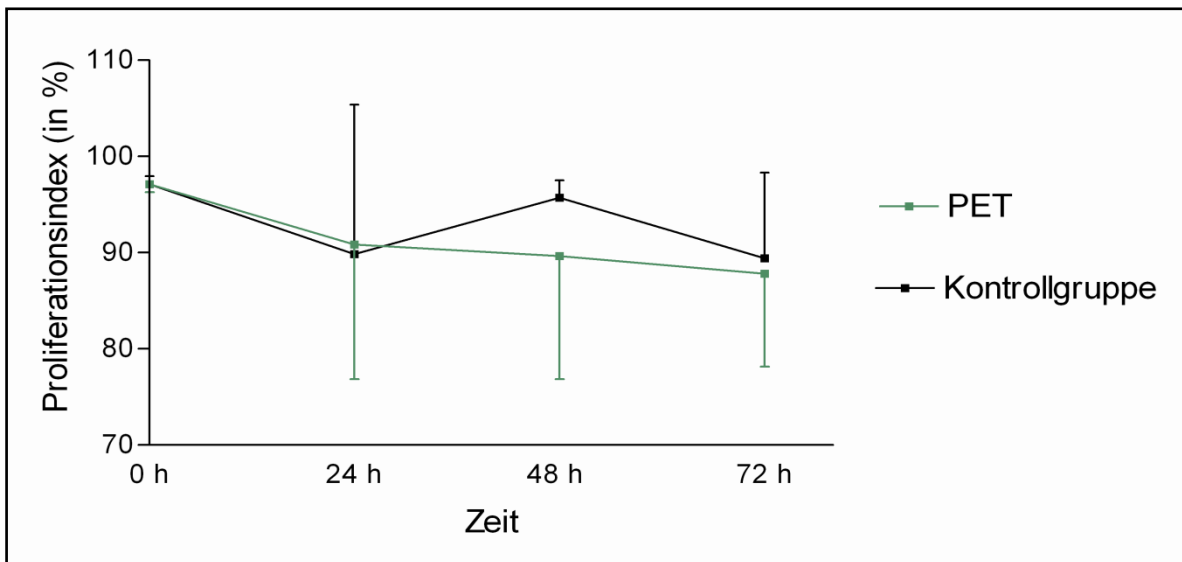


Abbildung 18: Proliferationsindex FB in der Materialgruppe PET im Vergleich zur Kontrolle

Zeit	Kontrolle	PUR	
	PI (± SD)	PI (± SD)	p-Wert
0h	97,973 (0,55)	97,973 (0,55)	1,000
24h	97,946 (1,00)	96,434 (1,53)	0,024
48h	97,671 (0,62)	96,693 (2,84)	0,691
72h	98,403 (0,88)	93,234 (15,70)	0,757

Tabelle 8: Proliferationsindex (PI) der FB in der Materialgruppe PUR im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=9) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

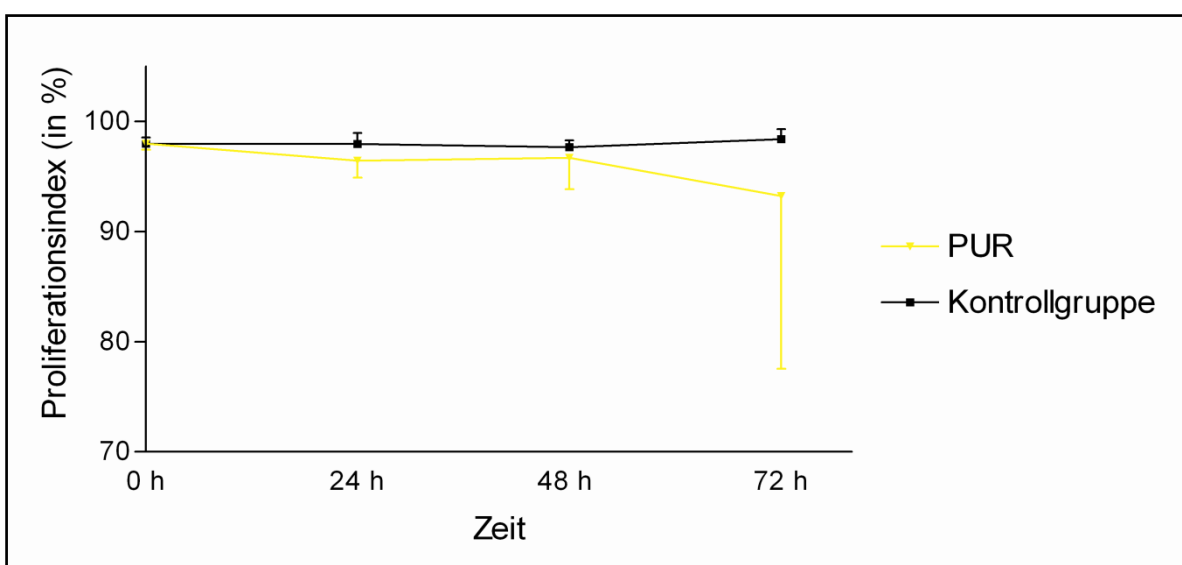


Abbildung 19: Proliferationsindex FB in der Materialgruppe PUR im Vergleich zur Kontrolle

Zeit	Kontrolle	ePTFE	
	PI ($\pm$ SD)	PI ($\pm$ SD)	p-Wert
0h	97,521 (1,16)	97,521 (1,16)	1,000
24h	97,142 (1,84)	96,303 (2,03)	0,453
48h	97,961 (0,80)	97,419 (1,88)	0,659
72h	96,348 (2,61)	95,564 (2,43)	0,233

Tabelle 9: Proliferationsindex (PI) der FB in der Materialgruppe ePTFE im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=9) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

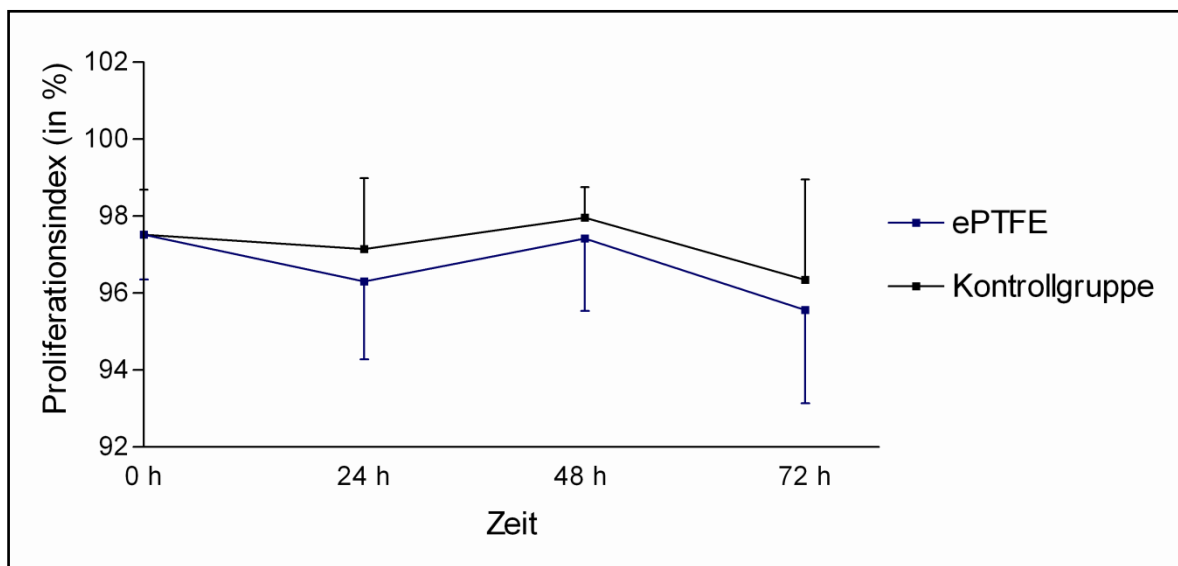


Abbildung 20: Proliferationsindex der FB in der Materialgruppe ePTFE im Vergleich zur Kontrolle

3.3. Apoptoserate

Die Bestimmung der Apoptoserate wurde wie unter 2.3.4. durchgeführt. Wie bei der Bestimmung des Proliferationsindex wurden auch hier Messungen bei 0, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt, wobei es sich bei der Nullstundenmessung wieder um den Grundwert der Zellen handelte, die beim Ansetzen des Versuches genutzt wurden.

Verglichen wurden die Proben analog zu den obigen Versuchen zu Kontrollen, die unter identischen Bedingungen gehandhabt wurden, allerdings keinen Kontakt zu Prothesenmaterialien hatten.

3.3.1. Endothelzellen

Die Apoptoserate der einzelnen Gruppen ist in Tabelle 10 bzw. Abbildung 21 dargestellt. Zu sehen war ein Anstieg des programmierten Zelltods in jeder Materialgruppe, wobei auch die Kontrollen vermehrte Apoptose zur Nullmessung zeigten. Die Rate lag allerdings für alle drei Polymere mit der Ausnahme Polyurethan bei 24 Stunden über der

Apoptoserate der Kontrollgruppe, was sich als signifikant bei Polyethylenterephthalat nach 48 und 72 Stunden herausstellte.

Vergleicht man die einzelnen Materialien untereinander, so hatte PET mit einer zur Kontrolle fast verdoppelten Rate nach 48 und 72 Stunden die größte Neigung, Apoptose zu induzieren. Polyurethan und Polytetrafluorethylen waren in ihrer Wirkung vergleichbar, wobei der Abstand zur Kontrollgruppe circa zwischen einem und zwei Prozent lag.

Zeit	Kontrolle	PET		PUR		ePTFE	
	AR ($\pm$ SD)	AR ($\pm$ SD)	p-Wert	AR ($\pm$ SD)	p-Wert	AR ($\pm$ SD)	p-Wert
0h	4,796 (0,68)	4,796 (0,68)	1,000	4,796 (0,68)	1,000	4,796 (0,68)	1,000
24h	6,179 (1,51)	8,218 (3,96)	0,402	6,177 (2,83)	0,508	6,702 (2,23)	0,310
48h	6,496 (2,02)	11,243 (2,08)	0,002	7,521 (2,05)	0,757	8,448 (1,58)	0,757
72h	7,057 (2,48)	12,709 (4,01)	0,005	8,360 (2,37)	0,085	8,326 (3,37)	0,508

Tabelle 10: Apoptoserate (AR) der EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=9) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

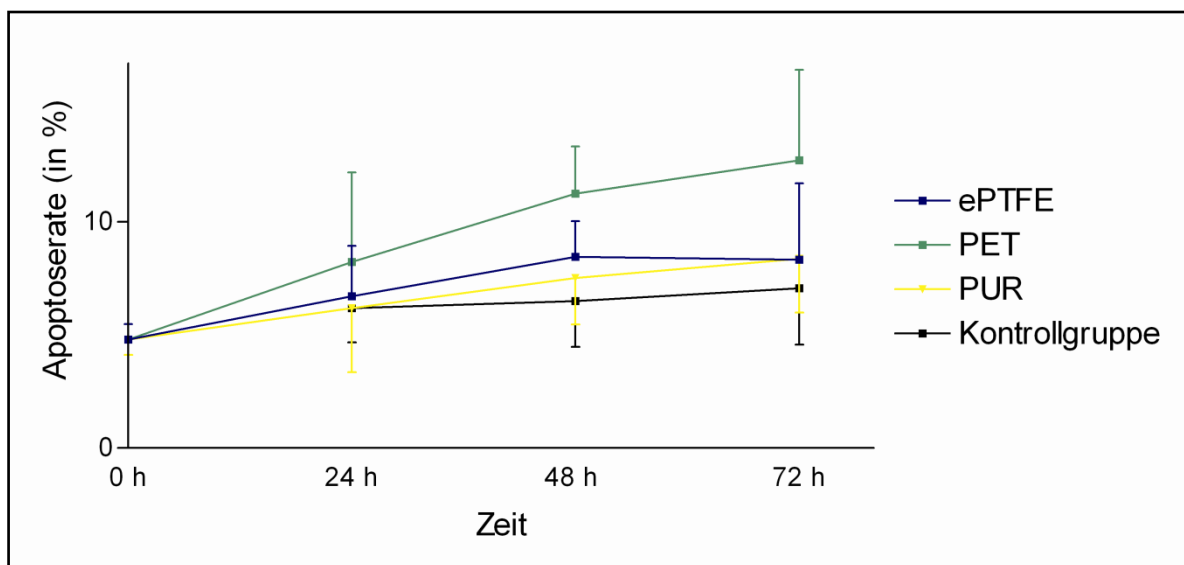


Abbildung 21: Apoptoserate EC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle

3.3.2. Glatte Muskelzellen

Die Ergebnisse der Apoptoseratenmessungen der glatten Gefäßmuskelzellen sind in Tabelle 11 und Abbildung 22 dargestellt.

Der einzige signifikante Unterschied zur Kontrollgruppe konnte im PET-Ansatz nach 48 Stunden gefunden werden. Insgesamt schwankten die Apoptoseraten der Zellen, die mit Kunststoffen in Kontakt waren, unwesentlich um die der Kontrollen. Dies war besonders bei PUR und ePTFE zu erkennen.

Auffällig war bei den Muskelzellen allerdings, dass in allen untersuchten Gruppen nach 24 Stunden der programmierte Zelltod gipfelte, um dann nach 48 und 72 Stunden in etwa wieder auf das Ausgangsniveau zurückzufallen.

Zeit	Kontrolle	PET		PUR		ePTFE	
	AR ($\pm$ SD)	AR ($\pm$ SD)	p-Wert	AR ($\pm$ SD)	p-Wert	AR ($\pm$ SD)	p-Wert
0h	3,552 (0,79)	3,552 (0,79)	1,000	3,552 (0,79)	1,000	3,552 (0,79)	1,000
24h	6,195 (1,31)	5,560 (1,61)	0,386	5,658 (1,65)	0,356	6,512 (2,06)	0,525
48h	3,639 (0,81)	4,326 (0,69)	0,016	3,855 (0,51)	0,389	3,952 (0,54)	0,310
72h	3,187 (0,51)	3,964 (1,98)	0,124	3,054 (0,46)	0,498	3,516 (0,88)	0,442

Tabelle 11: Apoptoserate (AR) der VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=11-12) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

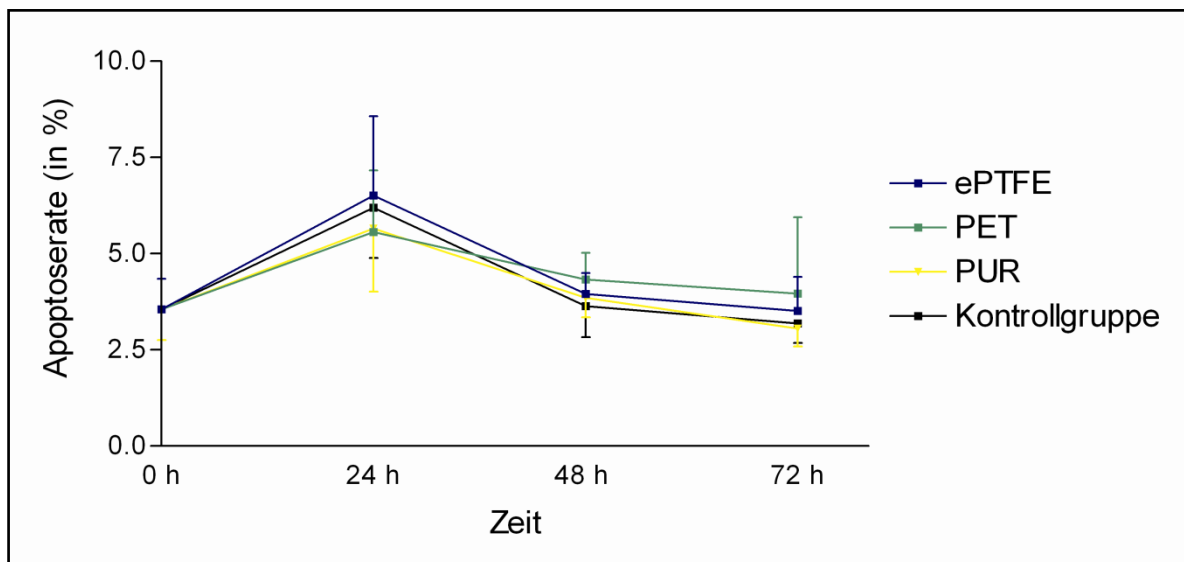


Abbildung 22: Apoptoserate VSMC in den Materialgruppen im Vergleich zur Kontrolle

3.3.3. Fibroblasten

Wie in den Tabellen 12 bis 14 und Abbildungen 23 bis 25 zu sehen ist, lagen die Apoptoseraten der Fibroblastenkulturen mit Materialien (mit der Ausnahme PUR bei 24 Stunden) höher als die Kontrollen. Signifikante Unterschiede ergaben sich hier wieder nur bei PET nach 24 und 72 Stunden Inkubation.

Nach 48 und 72 Stunden war bei den Materialgruppen PUR und ePTFE ein deutliches Ansteigen der Apoptoserate zu verzeichnen, was sich allerdings nicht als signifikant herausstellte.

Zeit	Kontrolle	PET	
	AR ($\pm$ SD)	AR ($\pm$ SD)	p-Wert
0h	2,704 (1,09)	2,704 (1,09)	1,000
24h	3,897 (1,40)	9,020 (3,39)	$\leq 0,001$
48h	4,196 (1,15)	4,557 (2,31)	$\geq 0,990$
72h	2,027 (1,00)	4,132 (2,46)	0,026

Tabelle 12: Apoptoserate (AR) der FB in der Materialgruppe PET im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=12) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

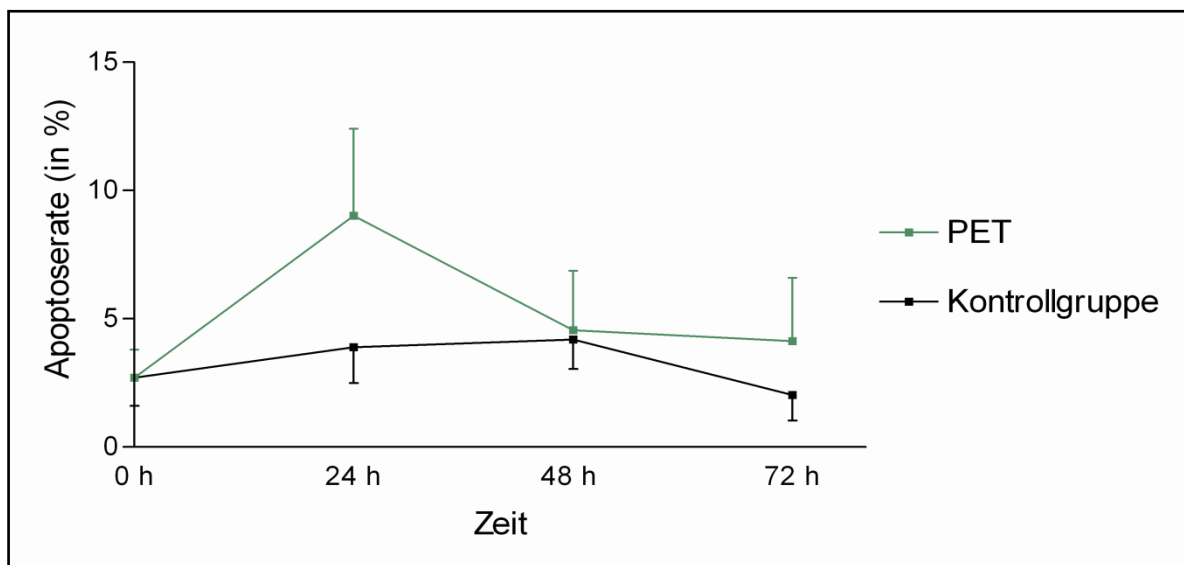


Abbildung 23: Apoptoserate FB in der Materialgruppe PET im Vergleich zur Kontrolle

Zeit	Kontrolle	PUR	
	AR ($\pm$ SD)	AR ($\pm$ SD)	p-Wert
0h	2,010 (0,87)	2,010 (0,87)	1,000
24h	4,248 (1,07)	2,962 (1,48)	0,085
48h	5,229 (2,28)	7,576 (5,32)	0,402
72h	4,838 (2,89)	7,598 (3,63)	0,070

Tabelle 13: Apoptoserate (AR) der FB in der Materialgruppe PUR im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=9) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

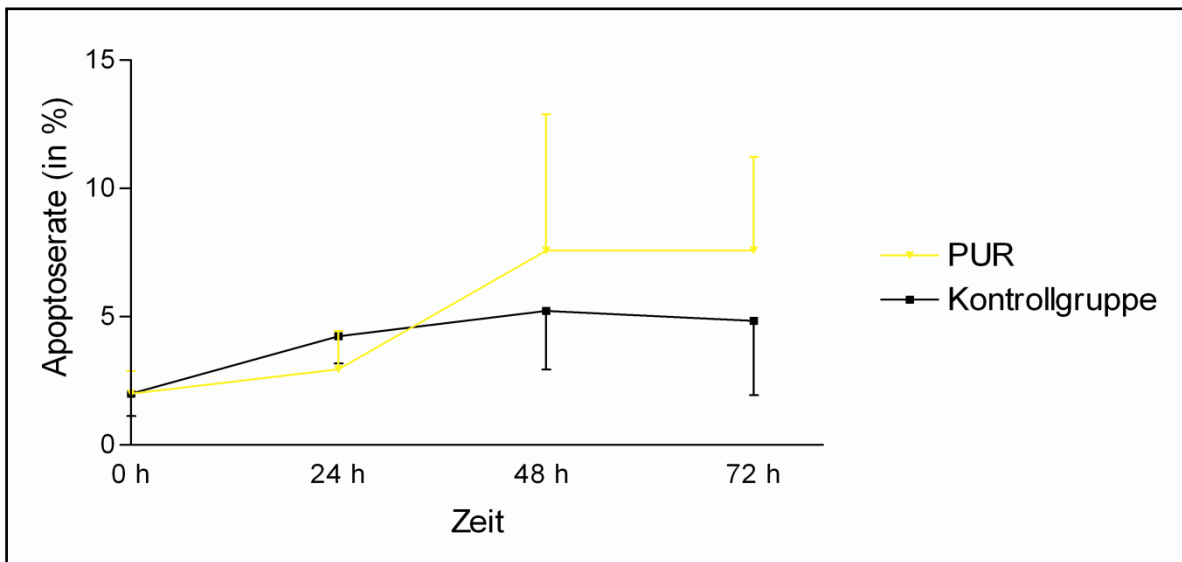


Abbildung 24: Apoptoserate FB in der Materialgruppe PUR im Vergleich zur Kontrolle

Zeit	Kontrolle	ePTFE	
	AR (± SD)	AR (± SD)	p-Wert
0h	1,773 (1,17)	1,773 (1,17)	1,000
24h	4,978 (3,15)	5,283 (2,10)	0,691
48h	4,251 (2,60)	5,658 (2,01)	0,171
72h	4,421 (2,43)	5,600 (2,43)	0,233

Tabelle 14: Apoptoserate (AR) der FB in der Materialgruppe ePTFE im Vergleich zur Kontrolle mit Mittelwert (n=9) und Standardabweichung (SD) in % und p-Wert der Signifikanzanalyse (Mann-Whitney-U-Test)

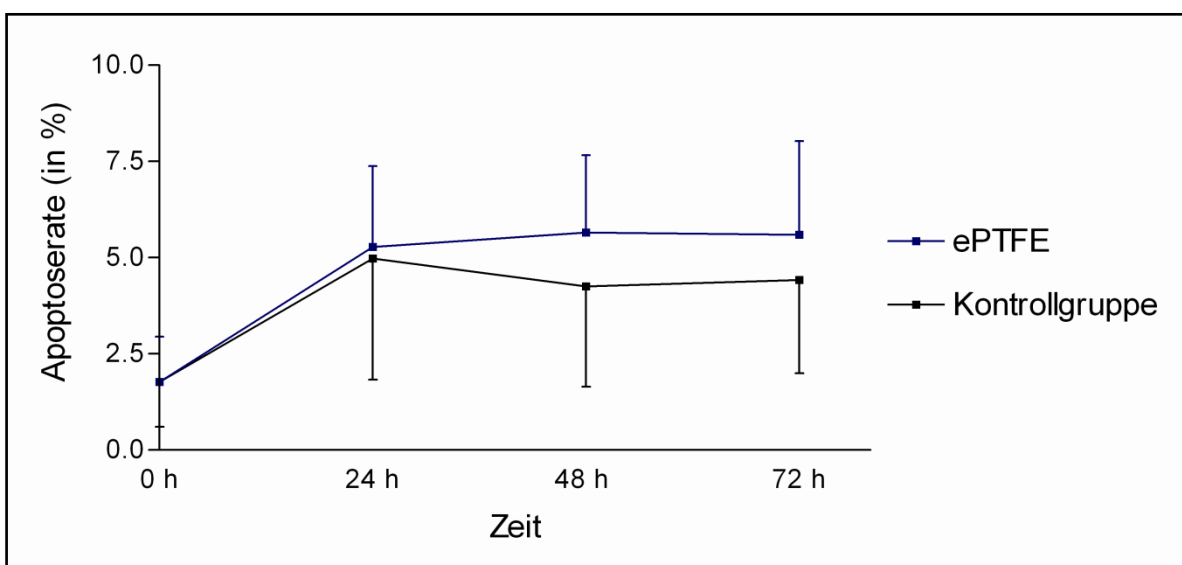


Abbildung 25: Apoptoserate FB in der Materialgruppe ePTFE im Vergleich zur Kontrolle

3.4. Rasterelektronenmikroskopie

Wie unter 2.3.5. beschrieben, wurden die drei Prothesenmaterialien PET, PUR und ePTFE mit Endothelzellen besiedelt und für sieben Tage inkubiert, um mögliche Materialveränderungen zu beurteilen und das Anwachsen der Zellen vergleichen zu können. Nach der Vorbereitung der Proben wurden die Oberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop systematisch begutachtet und in verschiedenen Vergrößerungen repräsentative Ausschnitte photographiert.

3.4.1. Materialveränderungen

3.4.1.1. Polyethylenterephthalat

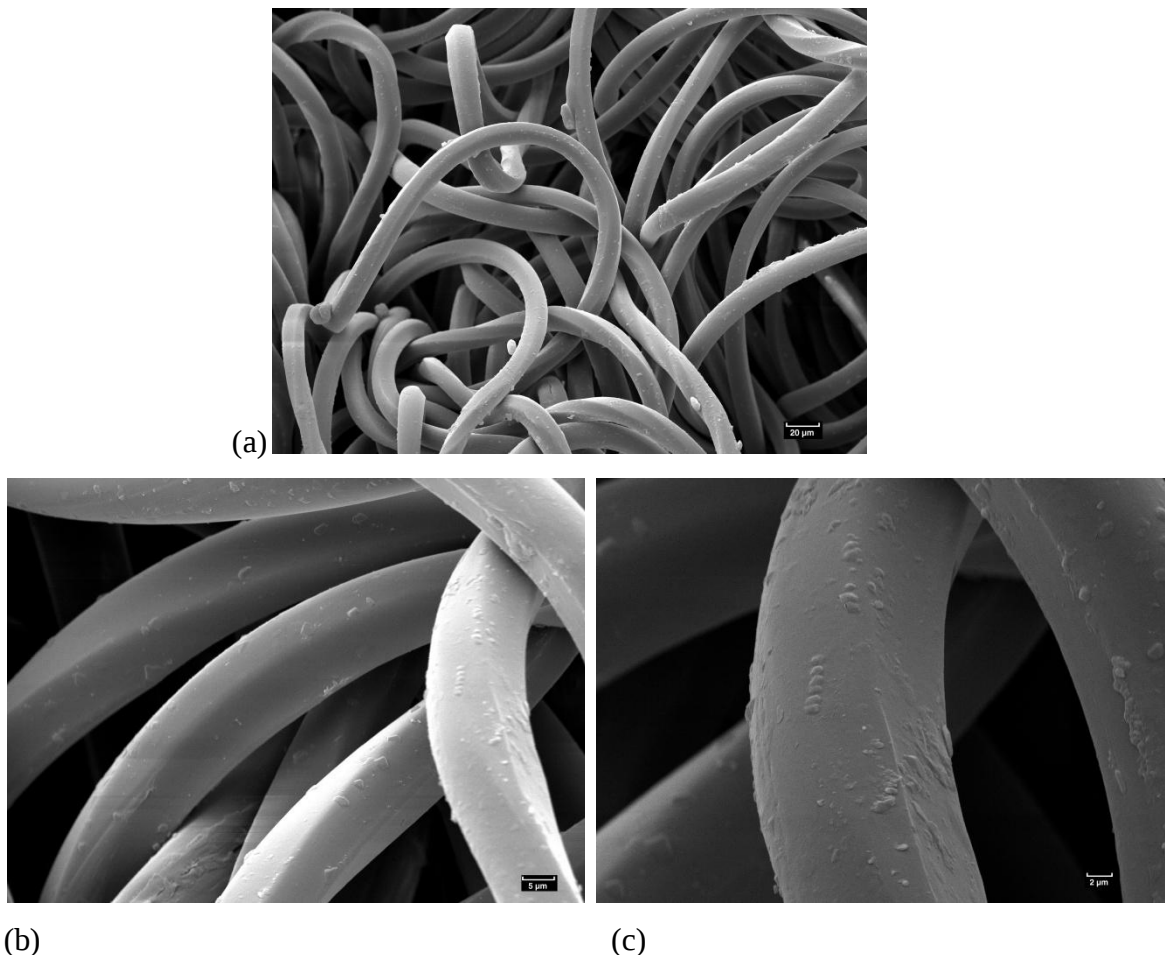


Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PET-Oberflächen im unbehandelten Zustand - Originalbilder (a) 356- (b) 1420- und (c) 2840-fach vergrößert (hier maßstabs-gerecht abgebildet)

Die Oberflächen der PET-Proben sind in den Abbildungen 26 und 27 zu sehen. Es sind jeweils drei unterschiedliche Vergrößerungen dargestellt. Man sieht in den Abbildungen sehr eindrucksvoll die filamentöse Struktur des gewebten Materials. In Abb. 26 sind die

Proben direkt nach Entnahme aus der Originalverpackung dargestellt. Hier erkennt man vor allen in den stark vergrößerten (b und c) Ausschnitten, dass die einzelnen Filamente in ihrer Integrität nicht beeinträchtigt gewesen sind. Auffallend sind nur bis circa 1,5 µm große blasige Strukturen, die vielfach gruppiert auf dem Material zu finden waren.

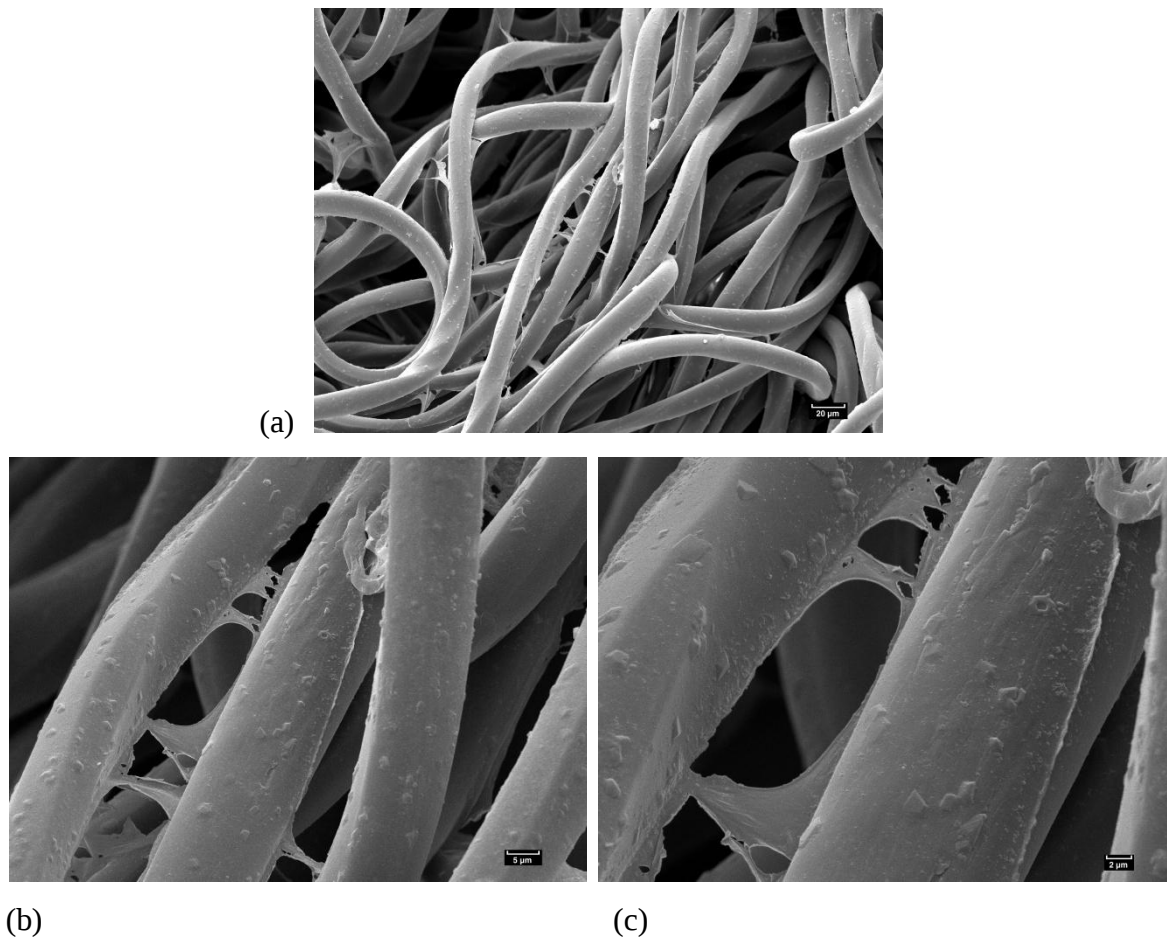


Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PET-Oberflächen nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen - Originalbilder (a) 372- (b) 1420- und (c) 2840-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

In Abbildung 27 zeigt sich die Materialoberfläche nach siebentägiger Inkubation und anschließendem Abspülen der Endothelzellen immer noch vollständig intakt. Bei Betrachtung der Präparate fiel auf, dass deutliche Rückstände der Zellen am Material anhafteten. Ebenfalls konnte eine leichte Zunahme der schon im unbehandelten Zustand aufgefallenen blasenartigen Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche beobachtet werden. Strukturelle Schäden am Material ließen sich aber nicht nachweisen.

3.4.1.2. Polyurethan

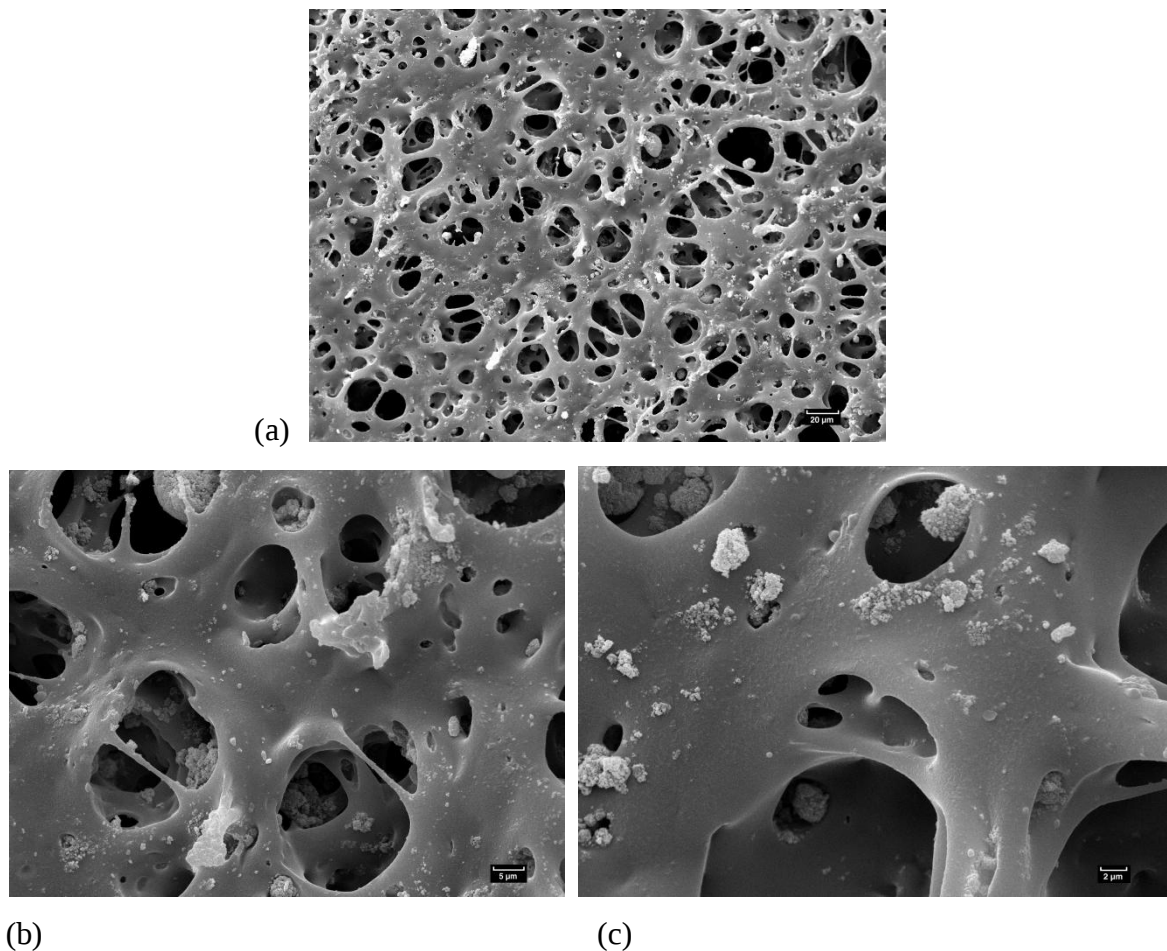
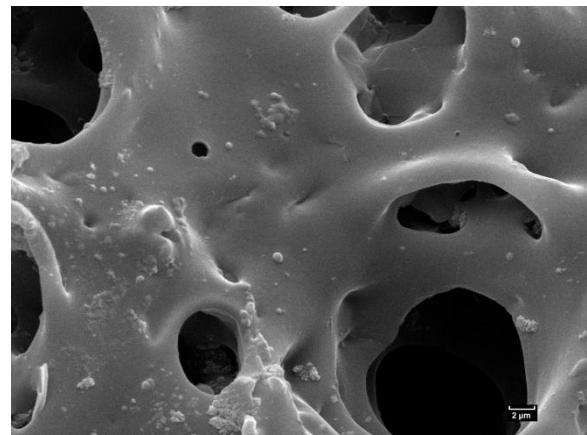
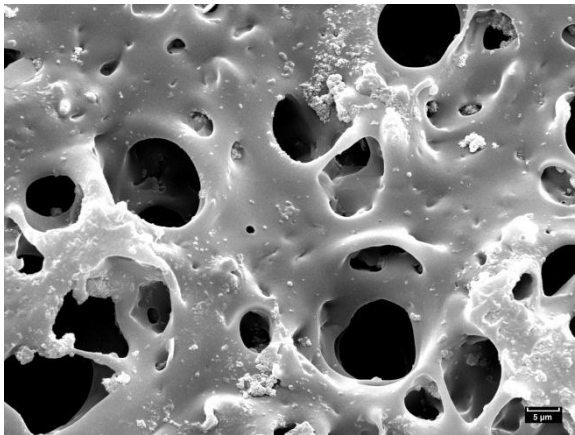
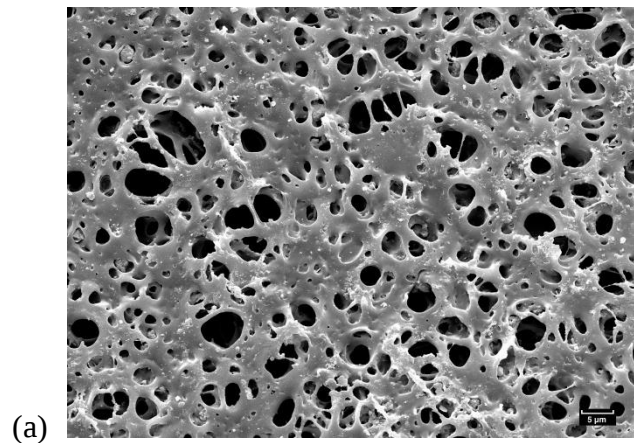


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PUR-Oberflächen in unbehandeltem Zustand - Originalbilder (a) 356- (b) 1420- und (c) 2840-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

In Abbildung 28 sind Ausschnitte der PUR-Präparate dargestellt. Es zeigte sich in unbehandeltem Zustand ein dreidimensionales festes Gerüst mit inhomogener, löchriger Durchsetzung des Materials. Eine filamentöse Struktur ähnlich dem Aufbau des PET oder ePTFE wies die PUR-Prothese nicht auf. Auffällig waren die dem Material anhaftenden, helleren Strukturen, die gewächsartig in unterschiedlicher Größe überall auf dem Material zu finden waren.

Diese Strukturen ließen sich aber unverändert auch nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen weiterhin auf dem Material darstellen (Abbildung 29). Veränderungen am Polyurethan durch die Zellen, z.B. in Form von Kratzern, Brüchen oder andersartigen Mazerationen konnten nicht nachgewiesen werden.



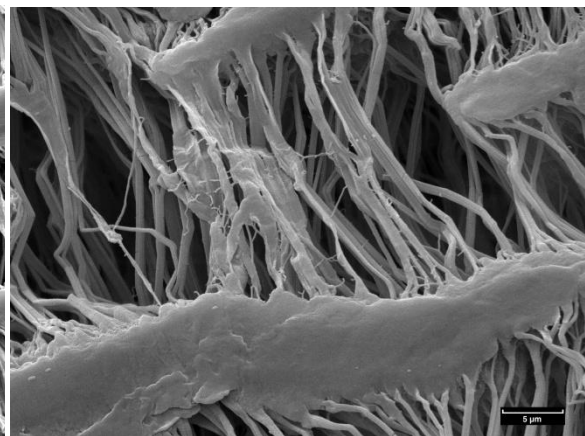
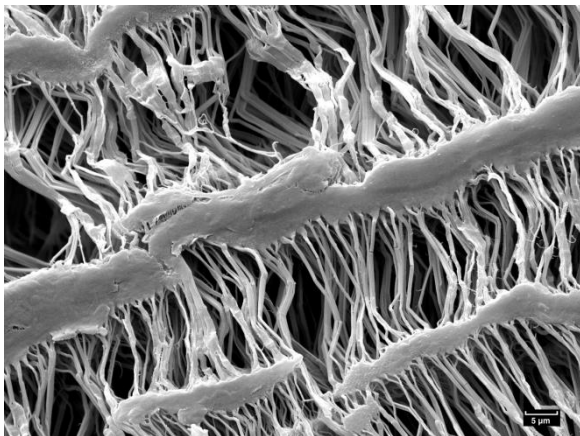
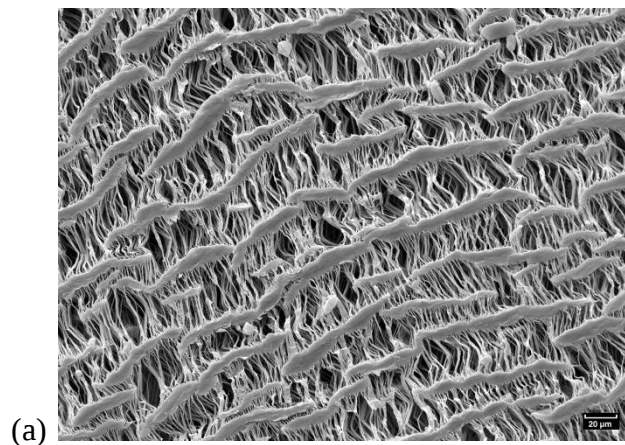
(b)

(c)

Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der PUR-Oberflächen nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen - Originalbilder (a) 356- (b) 1420- und (c) 2840-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

3.4.1.3. verstrecktes Polytetrafluorethylen

Ähnlich dem PET ist das verwendete ePTFE-Prothesenmaterial aus Filamenten zusammengesetzt, die aber, auch durch den Verarbeitungsprozess der Streckung bedingt, wirken, als würden die einzelnen Bestandteile wie durch Spinnengewebefäden miteinander verbunden sein. Dies ist sehr gut in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der ePTFE-Präparate zu sehen (Abbildung 30 und 31). Im Originalzustand (Abb. 30) zeigte sich die gleichmäßige Struktur des Materials. In den Vergrößerungen (b) und (c) waren die völlig ebene Oberfläche und die intakten, feinen Verbindungen bei der untersuchten Probe gut zu beurteilen.



(b)

(c)

Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der ePTFE-Oberflächen in unbehandeltem Zustand - Originalbilder (a) 356- (b) 1420- und (c) 2720-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

Bei der Untersuchung des für sieben Tage mit Endothelzellen inkubierten Präparates (Abbildung 31) fanden sich ebenfalls keine Veränderungen des Materials. Weder Kontinuitätsunterbrechungen der fragil wirkenden Fasern noch Mazerationen als Zeichen einer möglichen Degradation der Prothese konnten nachgewiesen werden.

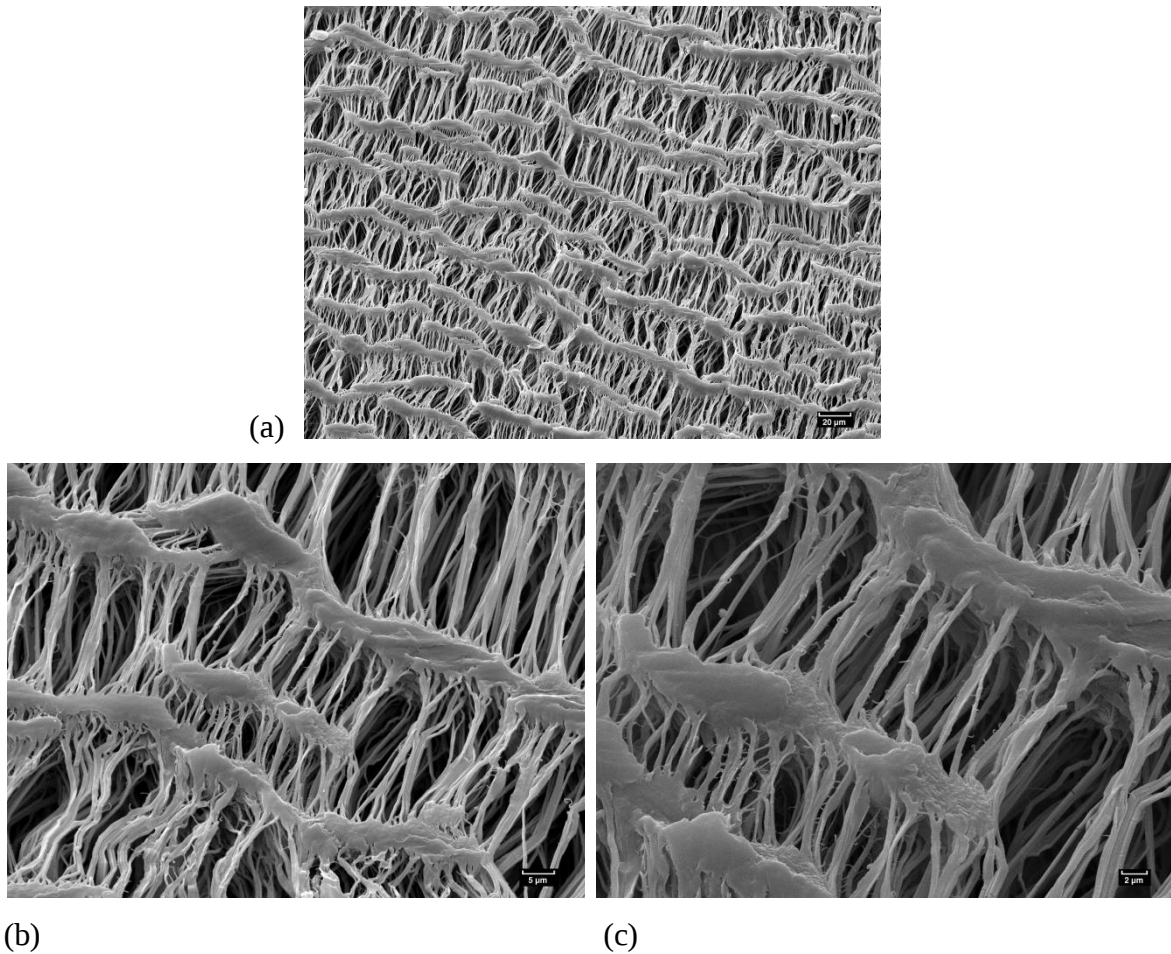


Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der ePTFE-Oberflächen nach siebentägiger Inkubation mit Endothelzellen - Originalbilder (a) 356- (b) 1420- und (c) 2840-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

3.4.2. Endothelzellbesiedlung

In den Abbildungen 32 bis 34 sind die Ergebnisse der Endothelzellbesiedlung dargestellt. Die Zellen wurden sieben Tage auf den Prothesen kultiviert und durch regelmäßige Kulturmediumwechsel mit Nährstoffen versorgt, so dass ein Absterben der Zellen allein auf Interaktion mit dem Material zurückzuführen sein sollte.

In Abb. 32 erkennt man, dass sich in regelmäßigen Abständen Endothelzellen auf dem ePTFE abgesiedelt hatten. Die Morphologie der Zellen entsprach den Erwartungen für Endothel, allerdings wurde ein konfluentes Monolayer, wie es optimal zu finden wäre, bei weitem nicht erreicht.

Auf PET (Abb. 33) zeigten sich nach 7 Tagen Inkubation fast überhaupt keine Zellen, die morphologisch einer funktionellen Endothelzelle entsprachen. Es sind vielmehr vereinzelt Zelltrümmer oder eventuell auch zusammengerollte Zellen wie in Abb. 33 (c) zu entdecken.

In Abbildung 34 lässt sich erkennen, dass die Besiedlung auf Polyurethan ohne Erfolg war. Es waren keinerlei Zellen auf der Oberfläche des Polymers adhären.

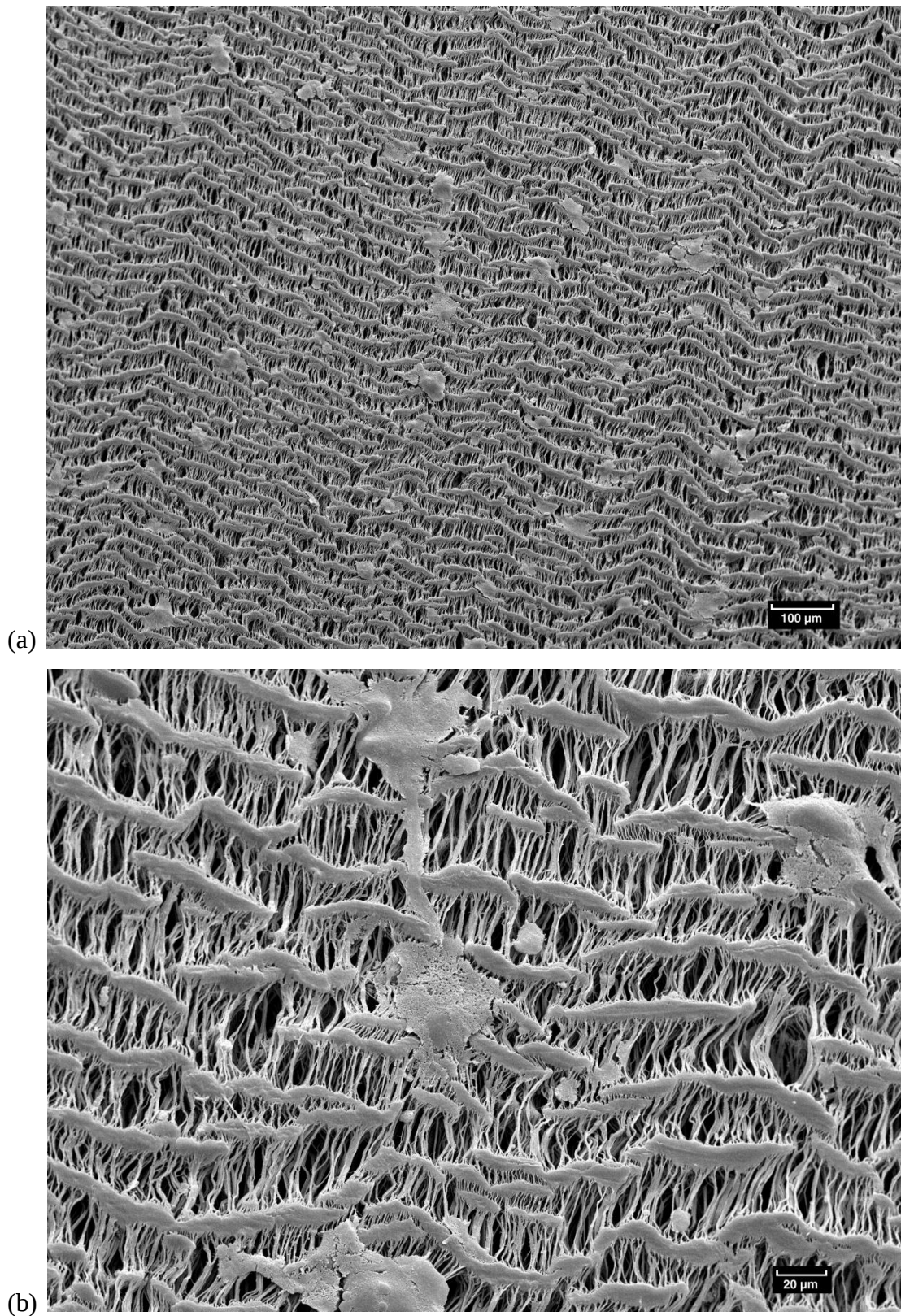


Abbildung 32: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des EC-Besiedlungsergebnis von ePTFE nach Inkubation für 7 Tage - Originalbilder (a) 93- und (b) 372-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

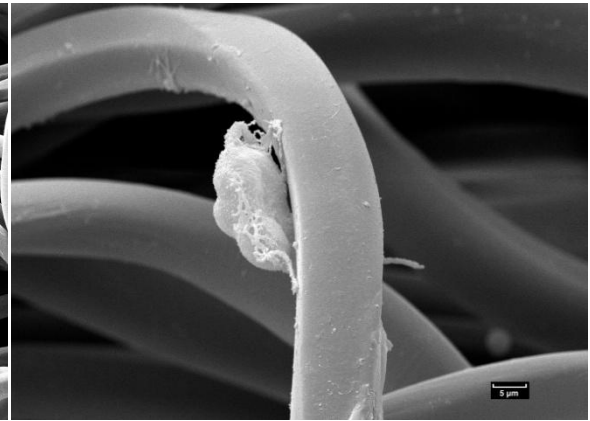
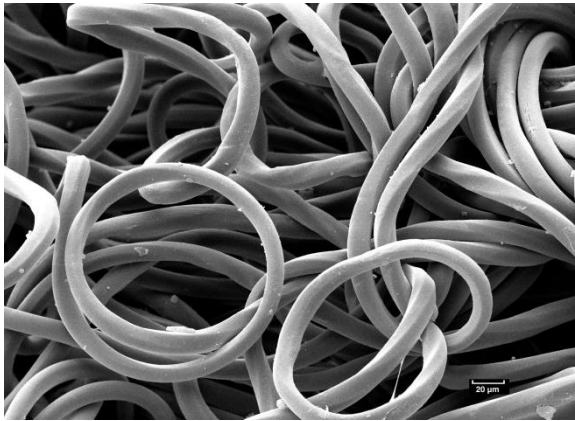
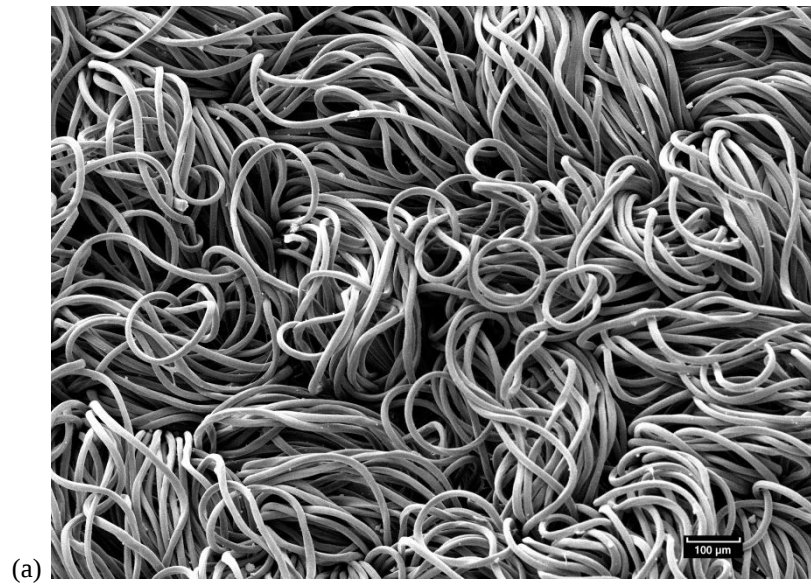


Abbildung 33: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des EC-Besiedlungsergebnis von PET nach Inkubation für 7 Tage - Originalbilder (a) 89-, (b) 356- und (c) 1490-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

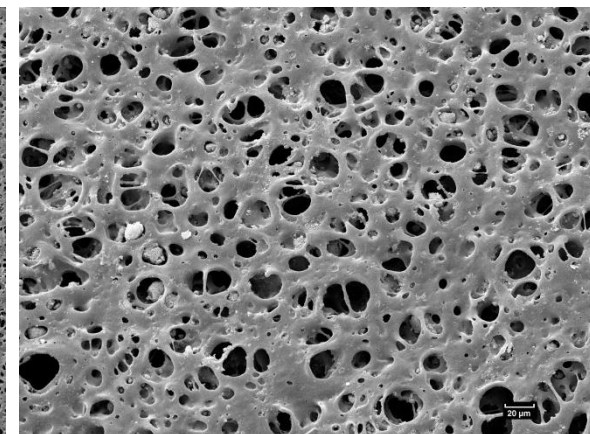
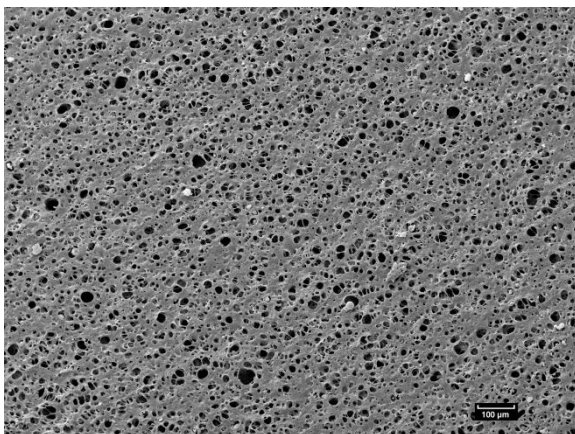


Abbildung 34: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des EC-Besiedlungsergebnis von PUR nach Inkubation für 7 Tage - Originalbilder (a) 82- und (b) 326-fach vergrößert (hier maßstabsgerecht abgebildet)

3.5. Massenspektrometrie

Für diese Untersuchung wurden die Gefäßprothesenmaterialien wie unter 2.3.6. beschrieben vorbereitet. Es sollte die Frage geklärt werden, ob sich durch die Inkubation der Kunststoffe mit bidestilliertem Wasser über drei Tage Abbauprodukte oder herausgelöste Substanzen nachweisen lassen.

Bei der Auswertung der Spektren ist zu beachten, dass keine Aussage über die genaue Zusammensetzung der Lösung getroffen werden konnte. Vielmehr wurden anhand der Verteilungen der Molekülmassen in den einzelnen Proben im Vergleich zu der jeweiligen Wasserkontrollprobe Veränderungen festgehalten. Diese Veränderungen zu beschreiben, war Gegenstand dieser Untersuchung. Die Inhaltsstoffe und deren mögliche biologische Wirkung zu identifizieren, bleibt Objekt fortführender Forschung.

Auf der Abszisse der Massenspektren sind die Molekülmassen der in Lösung befindlicher Stoffe aufgetragen, die Ordinate zeigt deren relative Menge orientiert am jeweiligen Maximum. So ist zur Interpretation vor allem die Verteilung der Massenspitzen wichtig und nicht so sehr ihre Höhe. Es wurden drei gleiche Versuchsansätze durchgeführt, bei denen die Materialien mit dem gleichen Wasser inkubiert wurden, welches ebenfalls als Kontrolle diente. Die Ergebnisse werden folgend dargestellt.

3.5.1. Versuchsansatz 1

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse des ersten Ansatzes dargestellt. Abb. 35 (a) zeigt die Kontrolle mit bidestilliertem Wasser. Es war eine im Spektrum anfängliche Spitze zwischen ca. 260 und 420 Molekülmassen zu sehen, gefolgt von einer Reihe Bestandteile in niedrigen Konzentrationen, die vernachlässigbar waren. Diese eine Spitze war erwartungsgemäß ebenfalls in den Spektren in Abb. 35 (b) und (c) zu sehen. In der PUR-Probe (d) zeigte sie sich nicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Massenanteil zwischen ca. 600 bis 1000 Molekülmassen so groß war, dass die frühe Spitze aus der Wasserkontrolle in der relativen Mengenskala nicht zur Ausprägung kam. Die PUR-Probe wies folglich eine sehr starke Veränderung in obigem Massenbereich auf. Auch die PET-Probe (b) zeigte einen zwar deutlich kleineren, aber in etwa im gleichen Bereich liegenden Anstieg der Stoffmengen. Die ePTFE-Probe (c) wich nur leicht von der Aqua-Kontrolle ab, was daher auch aufgrund der Mengen der Inhaltsstoffe vernachlässigbar war.

Zusammenfassend war für den ersten Ansatz zu sagen, dass vor allem die PUR- aber auch die PET-Probe deutlich von der Kontrolle zu unterscheiden waren.

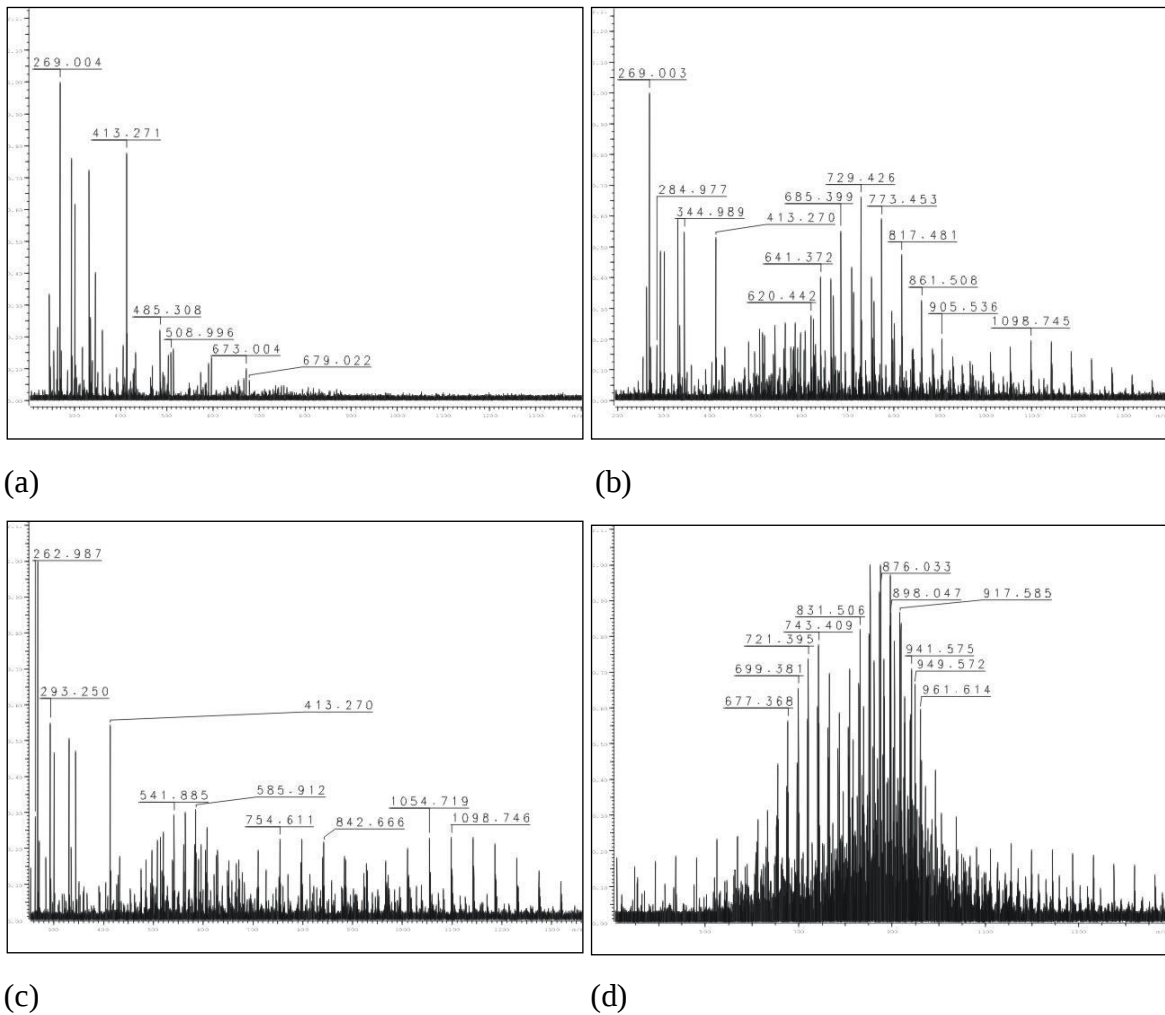


Abbildung 35: Massenspektren der Proben aus Ansatz 1 - (a) Aqua bidest. (b) PET (c) ePTFE (d) PUR

3.5.2. Versuchsansatz 2

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie dargestellt. Analog zu Ansatz 1 wurden die Materialproben jeweils mit der Aquakontrolle in ihren Spitzenbereichen verglichen.

Bei der Betrachtung fiel auf, dass sowohl PET (b) als auch ePTFE (c) keine relevanten Unterschiede zur Kontrolle in ihren Spektren aufwiesen, wohingegen das Massenspektrum für die PUR-Probe (d) wieder einen so großen Anstieg zwischen etwa 700 bis 1150 Molekülmassen zeigte, dass die Ausschläge, die im Wasser zu finden waren, sich in der Lösung des PUR-Ansatzes gar nicht mehr einzeln abzeichneten.

Somit war in diesem Ansatz nur die PUR-Probe in ihrer Zusammensetzung im Vergleich zu der Wasserkontrolle verändert.

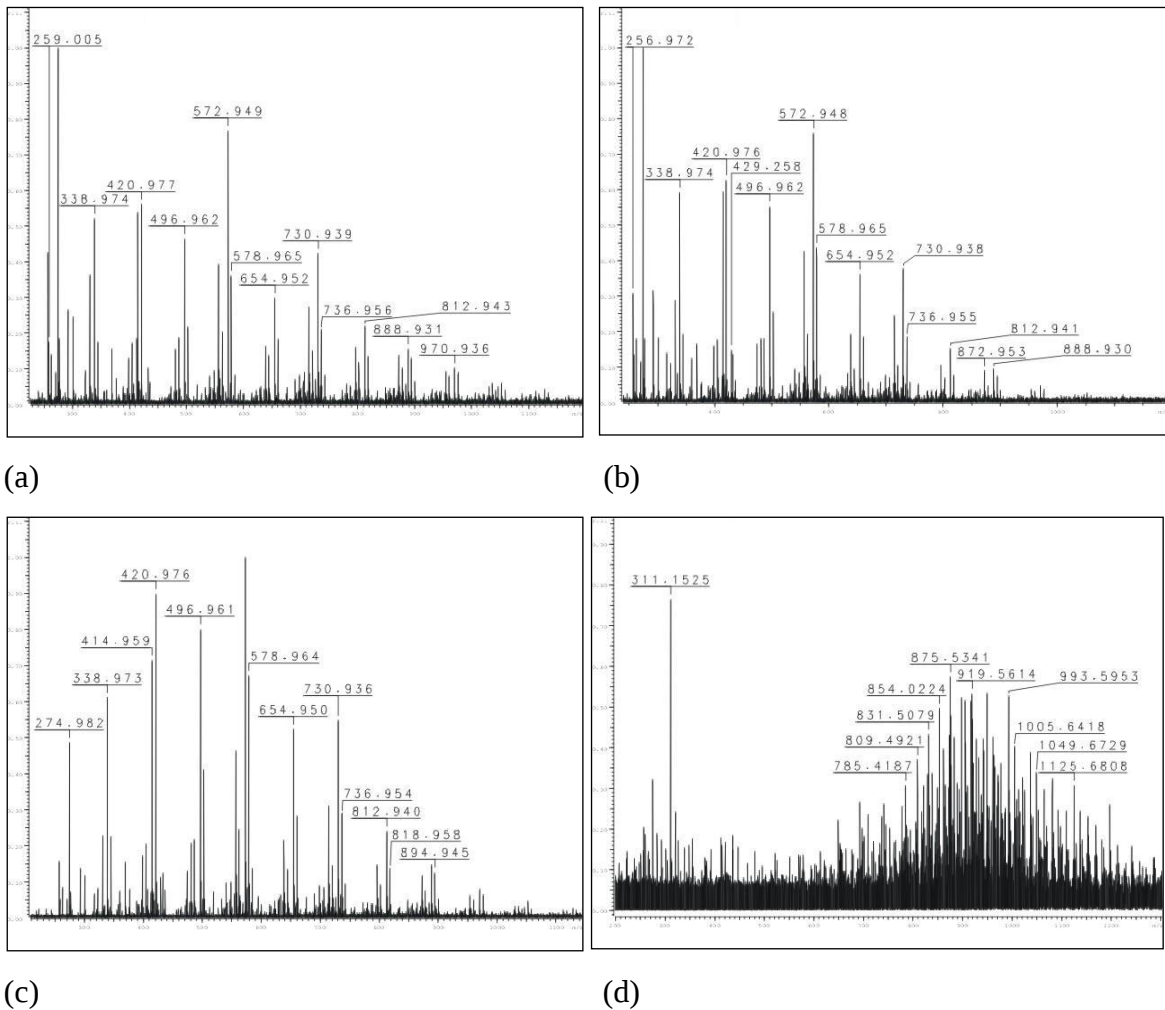


Abbildung 36: Massenspektren der Proben aus Ansatz 2 - (a) Aqua bidest. (b) PET (c) ePTFE (d) PUR

3.5.3. Versuchsansatz 3

Abbildung 37 stellt die Ergebnisse des dritten Ansatzes der Massenspektrometrie dar. Auch in diesem Ansatz zeigte das ePTFE (c) keine signifikant zu nennenden Unterschiede zu der Kontrollprobe mit bidestilliertem Wasser.

In der PET-Lösung (b) zeichnete sich aber ein Massenbereich von 500 bis 950 Molekülmassen ab, der in der Kontrolle nicht in der Menge zu finden war.

Bei dem PUR-Ansatz (d) zeigten sich 2 Mengenerhöhungen. Eine sehr deutliche Spitze lag im Bereich von circa 800 bis 1200, eine weitere kleinere zwischen 1400 und 1900 Molekülmassen.

Zusammenfassend konnten Unterschiede in der Lösungszusammensetzung wieder für PUR und ein weiteres Mal für PET gefunden werden.

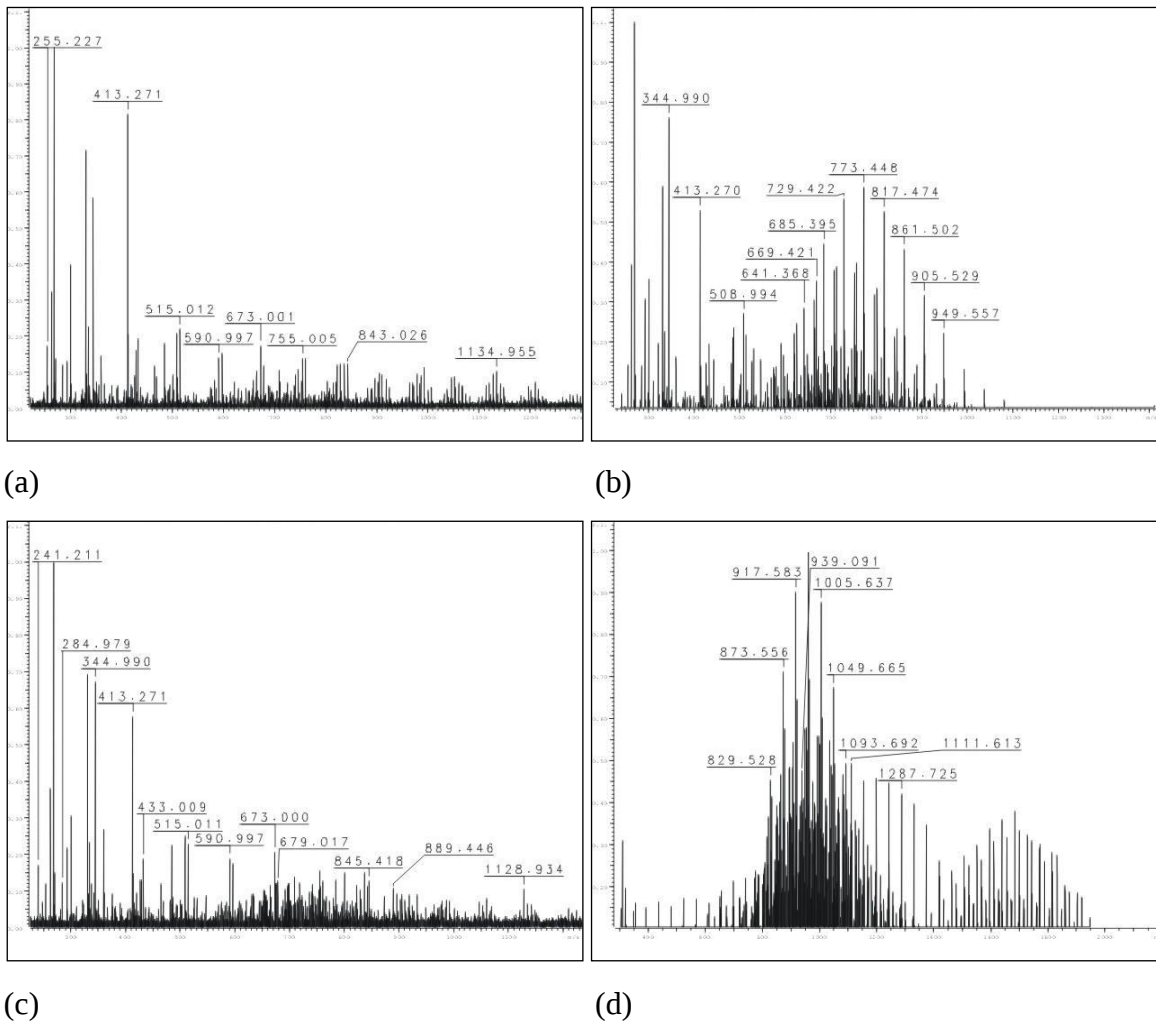


Abbildung 37: Massenspektren der Proben aus Ansatz 3 - (a) Aqua bidest. (b) PET (c) ePTFE (d) PUR

3.5.4. Zusammenfassung der Ansätze

In der Massenspektrometrie, die die einzelnen Materialproben gegen eine Wasserkontrolle verglich, erwies sich das ePTFE als das alloplastische Prothesenmaterial, welches von den drei untersuchten keine signifikante Abspaltungsprodukte oder in Lösung gehende Anteile enthielt.

Das PUR zeigte eindeutig Verschiebungen in den Massenspektren. Der Bereich, der herausgestellt war, war in den einzelnen Ansätzen etwas verschoben, allerdings fanden sich immer erhöhte Molekülmengen im Massenbereich um 800 bis 900.

Für PET divergierten die Ansätze in ihrer Aussage. In Ansatz 1 und 3 waren in der Lösung sicher Stoffe enthalten, die in der Kontrolle nicht vorhanden waren. Im zweiten Ansatz ließen sich diese aber nicht nachweisen.

4. Diskussion

4.1. In-vitro-Modell

Die Verwendung von Biomaterialien ist in der modernen Medizin alltäglich geworden. Die permanente Implantation, im Gegensatz zum vorübergehenden Einsatz von Produkten wie Venenverweilkanülen oder Kathetersystemen, dient im allgemeinen mehreren Zielsetzungen: Erhalt von Leben oder Extremität (Herzklappen, Gefäßprothesen), Wiederherstellung verlorener Funktionen (Gelenkprothesen) oder Unterstützung in der rekonstruktiven/ästhetischen Chirurgie (Ohrmuschelersatz, Brustaugmentation). In Anbetracht einer sinnvollen Risiko-Nutzen-Abwägung sollten die Materialien einen möglichst hohen Sicherheitsstandard für den Patienten bieten. Abzuwägen sind hier die physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften eines Materials, die im Idealfall der natürlichen Situation gleichkommen, gegen die biologische Reaktion, die der Organismus nach Implantation auf das Material zeigt. Diese Reaktion kann sowohl durch die veränderten funktionellen Eigenschaften (z.B. Compliance, Flusseigenschaften, Abrieb, Lebensdauer) als auch durch eine schlechte Biokompatibilität (z.B. immunologische Reaktion) ausgelöst werden.

Unabhängig von der Zulassung gemäß der geltenden gesetzlichen Richtlinien von Biomaterialien (Medizinproduktegesetz) ist die Verbesserung der Materialien sowie das Verständnis der Reaktionen des Organismus nach Implantation Ziel der Forschung. Da eine primäre Implantation in den Menschen aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist, dienen Tierversuche und In-vitro-Versuche als Modelle zur Einschätzung der Biofunktionalität und Biokompatibilität. Da der Mensch als Organismus in seiner Komplexität nicht vollwertig in ein In-vitro-Modell zu überführen ist, sind Tiermodelle der Goldstandard für Materialtestungen.

Sollen aber Fragestellungen in Hinblick auf ein spezielles Kriterium geklärt werden, bietet sich oft ein In-vitro-Modell an, da hier die Anzahl der störenden Variablen minimiert werden kann. Eine hohe Standardisierung der experimentellen Bedingungen und die oft schneller gewonnenen Ergebnisse relativieren die limitierte Übertragbarkeit auf den humanen Organismus. Gerade die Toxizität eines Stoffes lässt sich ideal im In-vitro-Versuch einschätzen. So bieten In-vitro-Untersuchungen eine Ergänzung tierexperimenteller Studien, die vor allem in Hinblick auf die Interaktion von Biomaterial und Organismus essentiell sind.

Das in dieser Arbeit verwendete In-vitro-Modell zur Prüfung von Material-Zell-Interaktionen hatte sich zum Teil schon in Vorarbeiten etabliert (siehe 1.4.1.).

In mehreren Studien zur Beeinflussung des Zellwachstums durch verschiedene Herniennetze hatte sich die durchflusszytometrische Messung von Proliferationsindex und Apoptoserate mit den hier genutzten Markern Ki-67 und Annexin V als gut geeignet erwiesen [12, 17, 30, 39].

Dieses Modell sollte ergänzt werden durch eine geeignete Methode zur Bestimmung und dem Vergleich der Zellzahl zu definierten Zeitpunkten. Neben der einfachen Zellzählung gibt es einige Assays, die sich zu obigem Zweck eignen, z.B. der MTT-Assay, der XTT-Assay und der AlamarBlue Assay. Der AlamarBlue Assay ergänzte das Modell aufgrund der praktisch fehlenden Interaktion mit dem Zellwachstum der untersuchten Zellen sowie der systematisch standardisierten Durchführbarkeit optimal [1, 4, 11, 42, 69, 125].

Durch die Erweiterung um die Zellzahlbestimmung verbesserte sich die Aussagefähigkeit des vorbeschriebenen Modells deutlich. Sowohl die Apoptoserate als auch der Proliferationsindex geben Parameter des Zellwachstums wieder, sie erlauben aber keine Aussage über die effektive Zellzahl.

Die Färbung gegen pKi-67 markiert alle Zellen, die sich in Proliferation befinden. Wie unter 1.4.3. beschrieben, sind das alle Zellen, die sich nicht in der G₀-Phase befinden [29, 40].

Verringert sich der Proliferationsindex, bedeutet dies, dass mehr Zellen in die G₀-Phase übergetreten sind. Dieses würde einem Materialeinfluss entsprechen, sollte sich der Proliferationsindex in der Kontrollgruppe nicht verändern. Ein natürlicher Abfall des Proliferationsindex entsteht durch Zellalterung.

Sollte sich die Proliferation der Zellen verringern, was über die Zellzahlbestimmung zu eruieren wäre, könnte dies auch ohne einen Abfall des Proliferationsindex ablaufen. Dieses Phänomen erklärt sich über eine Verlangsamung des Zellzyklus, der sich nicht im Proliferationsindex nach der Ki-67-Färbung widerspiegeln kann. Ein Beispiel könnte eine verlängerte Mitose- oder DNA-Synthesedauer sein. Diese Zeiten wirken sich unmittelbar auf die Dauer von Zellteilung zu Zellteilung aus und somit auf die absolute Zellzahl nach einem definierten Zeitraum. Eine Beeinflussung des Proliferationsindex findet sich bei dieser Überlegung hingegen nicht.

Die Gründe, die Apoptoserate als molekularbiologischen Marker für Material-Zell-Interaktionen zu testen, sind offensichtlich. Apoptose kann direkt durch die Interaktion der Kunststoffe mit den Zellen ausgelöst werden. Ob dies aufgrund des mechanischen Reizes,

chemischer Stimuli oder anderer Mechanismen ausgelöst wird, bleibt primär unklar. Grundsätzlich ist die Apoptoserate aber ein idealer Marker für eine Reaktion der Zellen auf das alloplastische Material. Analog zum Proliferationsindex kann aber auch eine verringerte Zellzahl ohne Erhöhung der Apoptoserate einhergehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Apoptoserate und Proliferationsindex geeignete Marker zur Untersuchung oder Begründung einer veränderten Zellzahl sind. Sind diese Marker aber unverändert, muss dies nicht auf einen fehlenden Einfluss des untersuchten Materials auf die humanen Zellkulturen schließen lassen.

Von Interesse waren dann noch zwei weitere Fragestellungen, die sich effektiv morphologisch mit dem Rasterelektronenmikroskop klären ließen. Zum einen werden Prothesen nach der Implantation in einen Organismus inkorporiert. Außerdem bildet sich eine Pseudointima aus [21, 22, 78, 112]. Daher wurden die Prothesenstücke mit Endothelzellen für sieben Tage inkubiert. Im Rasterelektronenmikroskop wurde dann beurteilt, ob die Besiedlung der Polymere gelungen ist und ob das Material durch die Zellen beschädigt bzw. abgebaut wurde.

Ob sich durch Inkubation mit Wasser aus den Gefäßprothesenmaterialien Spaltprodukte oder Produktionsreste lösen lassen, konnte in der massenspektrometrischen Untersuchung der Lyophilisate festgestellt werden. Eine Inkubation mit Zellen und Medium hätte sich der Situation im Organismus besser angenähert. Dies stellte sich aber in der Auswertung als zu komplex heraus, da eine unfassbar große Menge an Stoffen im Spektrum zu finden wäre, die eine Differenzierung der einzelnen Spektren mit und ohne Materialkontakt unmöglich gemacht hätte.

Zusammenfassend ergaben die hier durchgeführten Untersuchungen in ihren sich ergänzenden Aussagen ein standardisiert durchführbares, umfassendes Modell zur Darstellung von Material-Zell-Interaktionen in-vitro.

4.2. Zellzahlbestimmung

4.2.1. Endothelzellen

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, wichen die relativen Zellzahlen fächerförmig auseinander, wobei die Mittelwerte der Materialgruppen zu den beiden untersuchten Zeitpunkten jeweils niedriger lagen als die Werte der Kontrollen.

Die Analyse innerhalb der einzelnen Gruppen (Anhang 7.5.1.) konnte zeigen, dass über den untersuchten Zeitraum zwischen 24 und 72 Stunden jedoch keine signifikante

Zellzahländerung bei ePTFE und in der Kontrollgruppe vorlag. So überrascht es auch nicht, dass im Vergleich zwischen ePTFE und der Kontrollgruppe weder nach 48 noch nach 72 Stunden die relativen Zellzahlen signifikant voneinander abwichen.

Sowohl das PET als auch das PUR hatten einen signifikant negativen Einfluss auf die Zahl der Endothelzellen. Sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden lagen die relativen Zellzahlen niedriger als in der Kontrollgruppe ohne Prothesenmaterial. Zwischen 24 und 72 Stunden konnte sich hier ebenfalls ein deutlicher Rückgang der Zellzahlen gruppenintern ausmachen lassen, der in der Kontrollgruppe erwartungsgemäß nicht zu detektieren war.

Fest steht, dass ePTFE in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf die Entwicklung der Zellzahl von Endothelzellen in-vitro hatte.

4.2.2. Glatte Muskelzellen

Die glatten Muskelzellen zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede bei PET und PUR im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch nur bei 48 Stunden. Für das ePTFE ergab sich erneut wie bei den Endothelzellen kein signifikanter Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Um diese Ergebnisse zu erklären, lohnt der Blick auf die Entwicklung der Zellzahlen gruppenintern (Anhang 7.5.2.). In Kontrast zu den Endothelzelluntersuchungen, bei denen sich für PUR und PET eine signifikant niedrigere Zellzahl nach 72 Stunden als nach 24 Stunden nachweisen ließ, ergab sich diese Änderung nur für PET. In der ePTFE-Gruppe veränderte sich die Zellzahl nur unwesentlich. Das PUR zeigte zwar einen abgefallenen Mittelwert nach 48 und 72 Stunden, ein statistisch relevanter Effekt konnte ebenfalls nicht belegt werden. In der Kontrollgruppe hingegen kam es zwischen den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl.

So scheint der signifikante Unterschied von PET und PUR auf die glatten Muskelzellen im Vergleich zu den Kontrollen mit durch eine von 24 auf 48 h deutlich gestiegene Zellzahl in der Kontrollgruppe bedingt zu sein und nicht ausschließlich auf einem Rückgang der Zellzahl in den Materialgruppen analog zu den Endothelzellen zu beruhen. Fraglich ist nun, warum sich dieses Ergebnis nicht auch nach 72 Stunden fortsetzte. Dies lag vor allem an der Zellzahl der Kontrollgruppe, die nun nicht weiter stieg, sondern auf ein Niveau nahe des 24 Stunden-Werts abfiel. Der nach 48 Stunden signifikante Anstieg zum Basiswert war nach 72 Stunden nicht mehr erkennbar. So war auch ein Unterschied zu den Materialgruppen nicht mehr zu sehen.

Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder war ein großer Teil der Zellen abgestorben, ohne dass es dafür einen erkennbaren Grund gab, oder die Zellen hatten sich verändert und in dem veränderten Zustand weniger AlamarBlue reduziert. Letzteres Phänomen ist zu erklären über einen Wechsel des Phänotypen von proliferierend zu kontraktile. Fehlt eine Stimulation zur Proliferation begibt sich die Gefäßmuskelzelle in einen reinen Funktionszustand [20, 47, 48, 88, 101]. Es ist anzunehmen, dass der AlamarBlue-Umsatz im kontraktile Stadium geringer ist als im proliferierenden. Daher könnte sich der geringere Umsatz nach 72 h über eine Phänotypänderung erklären.

Die Frage, auf welchen Reiz sich der Phänotyp geändert haben sollte, bleibt ebenso wie die obige Annahme, dass dies der Grund für den geringeren Umsatz ist, nicht ganz zu klären. Es wäre denkbar, dass eine weitere Proliferation in der 12-Lochplatte räumlich nicht mehr möglich war und daher der Zustandswechsel stattfand. Des Weiteren bestand eine Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und den Ergebnissen des Proliferationsindex (siehe 4.3.2.).

Das ePTFE zeigte auch in der Gruppe der glatten Muskelzellen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl. Qualitativ zeigten sich die Reaktionen auf die Materialien bei den glatten Gefäßmuskelzellen also analog zu denen bei den Endothelzellen.

4.2.3. Fibroblasten

Bei den Fibroblasten lagen die relativen Zellzahlen zu allen untersuchten Zeitpunkten und für alle Materialgruppen signifikant niedriger als bei den Kontrollen.

Als Unterschied zwischen den Fibroblasten und den anderen untersuchten Zellreihen erwies sich, dass zwar alle Materialien eindeutig Einfluss auf die Zellen nahmen, sich die Populationen aber im Gegensatz zu den Endothel- oder glatten Muskelzellen auch in den Materialgruppen vergrößerten. Die Zellzahl war im Mittelwert zwischen 24 und 48 Stunden bei allen Polymeren unwesentlich gesunken, zwischen 48 und 72 h dann aber deutlich angestiegen. Dieses Phänomen zeigte die Kontrollgruppe nicht, hier war ein gleichmäßiger Anstieg zu verzeichnen (siehe Anhang 7.5.3.). Der Grund für dieses abweichende Verhalten blieb unklar, ist aber am ehesten den Polymeren zuzurechnen.

4.3. Proliferationsindex

4.3.1. Endothelzellen

Der Proliferationsindex der Endothelzellen lag in allen Gruppen und zu allen Zeitpunkten über 89 Prozent. Signifikante Abweichungen unter den zu vergleichenden Gruppen gab es nicht. Eine Beeinflussung des Proliferationsindex führt demnach nicht zu der in der Zellzahlbestimmung gemessenen Beeinflussung der Endothelzellen durch die untersuchten alloplastischen Materialien.

4.3.2. Glatte Muskelzellen

Die glatten Muskelzellen wurden ebenfalls nicht signifikant in ihrem Proliferationsindex durch die Materialien beeinflusst. Auffällig ist hier ein Abfall des Proliferationsindex in allen untersuchten Gruppen nach 72 h.

Wie unter 4.2.2. beschrieben, haben die glatten Muskelzellen die Möglichkeit, ihren Phänotypen zu ändern. Es wird angenommen, dass ein möglicher Reiz der mangelnde Platz zur Zellteilung in der Kulturschale sein könnte. In unseren Versuchen war durch das Phasenkontrastmikroskop betrachtet der Ausbreitungsraum nach 72 h Wachstum tatsächlich begrenzt. Aus diesem Grund fand während der Kultivierung zur Vorbereitung der Versuche nach drei Tagen eine Subkultivierung, d.h. eine Aufteilung der Zellen einer Kulturflasche auf zwei Flaschen, statt.

Unter 4.2.2. war die Phänotypmodulation zur Erklärung des Reduktionsrückgangs des AlamarBlue herangezogen worden. Beim Wechsel in den rein synthetisierenden Typ ohne Proliferation wäre ein Anstieg der Ki-67 negativen Zellen (durch ein Austreten aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase) zu erwarten. Dieser zeigte sich gleichermaßen in den Materialgruppen, die ihrerseits zwar die Zellzahl nicht vergrößerten, aber auch keinen den Kontrollen analogen Abfall von 48 h auf 72 h präsentierten.

Diese Diskrepanz erklären könnte die Möglichkeit, dass die glatten Muskelzellen bei einem Phänotypenwechsel nicht in die G₀-Phase austreten würden, sondern weiter das Ki-67-Protein exprimierten.

Stephenson und Mitarbeiter veröffentlichten 2003 eine Untersuchung an einem Mäusemodell, in dem sie diabetische und nicht-diabetische Mäuse nach arterieller Schädigung auf die Gefäßwandreaktion untersuchten. Bei den nicht-diabetischen Mäusen zeigte sich eine deutlichere Bildung von Neointima als bei den diabetischen Mäusen. In der Neointima gelang ebenfalls der Nachweis von glatten Gefäßmuskelzellen (siehe 1.3.2.).

Bei der immunhistochemischen Färbung gegen das Ki-67-Protein zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen [111].

In der Literatur finden sich ausreichend Veröffentlichungen, die beschreiben, dass glatte Muskelzellen auf verschiedene Reize ihren Phänotyp wechseln [20, 49, 53, 88, 116, 117, 134, 135]. Es wird ebenfalls ein Aus- oder Eintritt in den Zellzyklus belegt [53, 134].

Die Diskrepanz zwischen der Zellzahlbestimmung, in der nur die Kontrollgruppe einen niedrigeren Umsatz von AlamarBlue verzeichnete, und dem hier beschriebenen Abfall der Ki-67 positiven Zellfraktionen in allen Gruppen lässt sich durch diese Versuche nicht ausreichend erklären. Vielleicht ist entgegen der unter 4.2.2. dargestellten Annahme eines methodisch bedingten Artefakts von einem realen Rückgang der Zellzahl im Sinne eines Absterbens der glatten Muskelzellen auszugehen. Eine erhöhte Apoptose war nicht ursächlich (siehe 4.4.2.).

4.3.3. Fibroblasten

Bei den Fibroblasten lagen die Ergebnisse des Proliferationsindex bei allen Materialien eng bei den Kontrollgruppen ohne Materialkontakt. In der Tendenz war die Zellfraktion in der G₀-Phase bei den alloplastischen Materialien eher etwas größer, dies erwies sich jedoch außer bei PUR nach 24 h nicht als signifikant.

Der 24-Stunden-Vergleich bei PUR zeigte den Mittelwert um circa 1,5 Prozent erniedrigt. Aufgrund der bei einem Niveau von deutlich über 90 Prozent liegenden Werte sollte dieser statistischen Signifikanz nur begrenzt Bedeutung zugesprochen werden.

Zusammenfassend erklärt - wie schon bei den Endothelzellen und glatten Gefäß-muskelzellen - der Proliferationsindex die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung nicht.

4.4. Apoptoserate

4.4.1. Endothelzellen

Ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate zeigte sich nur in der PET-Gruppe nach 48 und 72 h. Hier war die Rate der Zellen, die in den programmierten Zelltod übergingen, in etwa doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe ohne Materialkontakt.

Die Zellzahl der Endothelzellen wurde durch PET ebenfalls deutlich beeinflusst. Es ist davon auszugehen, dass dies durch die erhöhte Apoptoserate mitbegründet ist. Was allerdings zu der erhöhten Rate führt, ist unklar. In der Literatur ist eine direkte Apoptoseinduktion durch PET bisher nicht beschrieben.

Eine mögliche Erklärung wäre eine schlechte Verankerung der Endothelzellen auf den Biomaterialien, speziell am PET. Frisch und Francis beschrieben 1994 die Induktion von Apoptose bei epithelialen Zellen, wenn bei diesen die Verbindung zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix unterbrochen wird [37]. Sie nannten diesen Vorgang „Anoikis“ – aus dem Griechischen für „heimatlos“. Bereits 1993 hatten Meredith und Mitarbeiter ein solches Phänomen für Nabelschnurendothelzellen beschrieben [75]. Die Zusammenhänge und Abläufe von Anoikis sind mittlerweile intensiver untersucht worden. Eine Reihe von Faktoren (z.B. Verlust von Zugkraftintegrität im Zellverband, Integrin-Beeinflussung, Degradation von Adhäsionsmolekülen) kann Anoikis auslösen, allen gemein ist das Ergebnis des Verlusts von Verbindungen zur extrazellulären Matrix mit der sich anschließenden Initiierung des Apoptoseablaufs [37, 38, 75, 76, 123].

Betrachtet man die Oberfläche der Materialien im Rasterelektronenmikroskop, so ist diese nicht glatt, sondern zeigt abhängig vom jeweiligen Material Unregelmäßigkeiten (siehe 3.4.). Der Aufbau eines Zellverbands ist sicherlich auf diesen Untergründen erschwert. Daher könnte es sein, dass eine Apoptose aufgrund des teilweise durch die Zellen nicht zu gewährleistenden Aufbaus einer Matrixstruktur zur Ansiedlung induziert wird, ähnlich dem Verlust der Adhäsion in der Matrix wie bei dem Anoikis-Phänomen. Die extrem dreidimensionale Struktur des PET erklärt die hier signifikant erhöhten Apoptoseraten.

4.4.2. Glatte Muskelzellen

Die Apoptoserate der untersuchten Materialgruppen zeigte sich nicht deutlich abweichend von der Apoptoserate der Kontrollgruppe. Die einzig signifikant gesteigerte Apoptoserate war bei PET in der 48 Stunden Messung zu finden.

Wenngleich ebenfalls das Phänomen der Anoikis bei glatten Gefäßmuskelzellen in der Literatur beschrieben ist [74, 76], so schienen die hier untersuchten Zellen resistenter gegen die Einflüsse, die eine Apoptose auslösen. Teilweise lagen die Apoptoseraten sogar unterhalb der Raten der Kontrollgruppen.

4.4.3. Fibroblasten

Mit einer Ausnahme (PUR bei 24 h) lagen die Apoptoseraten der Fibroblasten in den Materialgruppen über denen der Kontrollgruppen. Signifikanzen ergaben sich nach 24 und 72 h erneut für das PET. Hier war die Anzahl der apoptotischen Zellen etwa doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe.

Eine Erklärung, warum die 48 h Werte sich nicht signifikant unterschieden haben, fand sich nicht.

Interessant ist, dass PET offensichtlich in jeder der Zellreihen dieser Arbeit Apoptose induziert, wenngleich nicht überall so klar ausgeprägt wie bei den Endothelzellen. Ähnliche Mechanismen wie bei Anoikis (siehe 4.4.1.) könnten zu diesem Anstieg der apoptotischen Zellen geführt haben. Ob die dreidimensionale Struktur des PET und damit das Anoikis-Phänomen wirklich ursächlich für das schlechtere Abschneiden dieses Materials ist oder ob andere Einflussfaktoren eine Rolle spielen, bleibt noch durch zukünftige Untersuchungen zu klären.

4.5. Rasterelektronenmikroskopie

4.5.1. Materialveränderungen

Unter 3.4.1. sind repräsentative Ausschnitte der rasterelektronenmikroskopischen Aufarbeitung der Materialien nach Inkubation mit Endothelzellen für sieben Tage dargestellt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit PBS abgespült, um das Material genau beurteilen zu können.

An allen drei untersuchten Materialien konnten keine Strukturveränderungen oder Degradierungen nachgewiesen werden, die durch die Aussaat der Endothelzellen und deren Interaktion mit dem Material hätten entstanden sein können. Die Materialien stellten sich nach der Versuchsdurchführung unverändert dar.

In [12] wurden Herniennetze aus Polypropylen mit Fibroblasten für 48 h inkubiert und anschließend eine vergleichbare elektronenmikroskopische Studie durchgeführt. Hier zeigten sich bereits innerhalb des kurzen Inkubationszeitraums Spalten und Risse in den Polypropylenfilamenten.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen mehrere Rückschlüsse zu. Entweder sind die Gefäßersatzmaterialien hochwertiger und unterliegen keinem so leicht zu induzierenden Materialverschleiß oder die Endothelzellen interagieren nicht so stark mit dem Kunststoff wie Fibroblasten.

Es sollten sich zur weiteren Aufarbeitung dieser Ergebnisse noch ergänzende Untersuchungen anschließen, die sowohl eine längere Inkubationszeit als auch andere Zellen einschließen könnten.

4.5.2. Endothelzellbesiedlung

Es zeigte sich bei der Betrachtung der Prothesenoberflächen nach der Endothelzellbesiedlung, dass sich nur auf dem ePTFE nachweisbar Zellen abgesetzt hatten. Die

Untersuchung sowohl der PET- als auch der PUR-Oberfläche zeigte keine Zellen adhärent an dem Kunststoff.

Viele Autoren hatten in der Vergangenheit gezeigt, dass zumindest PET und ePTFE geeignete Materialien für eine Zellaussaat sind [23, 51, 89, 113, 126]. Fields und Mitarbeiter [35] gelang es auch, eine Polyurethanprothese zu besiedeln. Allerdings wurde der Vorgang elektrostatisch unterstützt. Die Techniken zur Besiedlung waren bei den Autoren teilweise unterschiedlich, auch gab es zahlreiche Veröffentlichungen über Verbesserungsmöglichkeiten der Zellhaftung auf den Prothesen [92, 119, 129, 136].

In dieser Arbeit wurden die Zellen in Suspension über das jeweilige Material ohne spezielle Vorbereitungen gegeben, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für die Prothesen aus PUR und ePTFE hätte dieser Zustand ebenfalls dem der Implantation in der klinischen Praxis entsprochen. Für das hier verwendete gestrickte PET hätte man ein Preclotting (siehe 1.1.3.1.) vor der Anwendung im Menschen durchgeführt. Diese Technik haben auch Herring und Mitarbeiter bei der Zellbesiedlung angewendet [51]. Eine Verbesserung der Ergebnisse für das PET in dieser Arbeit wäre dadurch auch zu erwarten. Das ePTFE zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten Polymeren keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl der Endothelzellen im untersuchten Zeitraum. Es muss daraus geschlossen werden, dass sich dies auch positiv auf die Aussaatsergebnisse auswirkte.

4.6. Massenspektrometrie

Die Biomaterialien wurden für diese Untersuchung über drei Tage mit bidestilliertem Wasser bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Wasser lyophilisiert und die Lyophilisate im Massenspektrometer untersucht. Als Kontrolle fungierte ein Lyophilisat aus dem Wasser, welches zur Inkubation genutzt wurde. Dieses war ebenfalls für drei Tage mit den gleichen Bedingungen behandelt worden.

Die Massenspektren der drei Ansätze wurden unter 3.5. verglichen. Die Spektren des ePTFE und der Kontrollen zeigten keine wesentlichen Unterschiede. Es ist davon auszugehen, dass dieses Material durch die Inkubation mit Wasser keine Abbauprodukte oder gelöste Schadstoffe abgibt.

Bei den Polyurethanproben fand sich eindeutig ein Peak in allen drei Spektren, der in der Wasserkontrolle nicht vorhanden war. Dieses zeigt, dass sich im Wasser gelöste Bestandteile fanden, die sich aus dem Polyurethan absetzten. Ob dies Stoffe sind, die aufgrund des Fertigungsprozesses (z.B. Weichmacher) oder direkt als Abbauprodukt aus

dem PUR entstanden sind, ließ sich mit dieser Untersuchung nicht klären. Für die ersten Generationen der Polyurethane gab es den Nachweis eines im Tierversuch karzinogenen Abbauprodukts, dem Toluyldiamin [50, 62]. Es ist allerdings nicht davon auszugehen, dass sich diese Substanz bei den aktuellen Produkten wie der hier verwendeten Prothese noch finden lässt.

Beim PET zeigten zwei von drei Spektren deutlichen Abweichungen im Vergleich zur jeweiligen Wasserkontrolle. Es kam folglich auch hier zur Darstellung ausgelöster Substanzen aus dem polymeren Kunststoff. Warum dieses in einer der drei Proben nicht der Fall war, ist unklar. Möglicherweise war das Material der einen Probe aus einer anderen Charge als das der beiden Proben, die die Abweichungen in den Spektren erzeugten. Die Stoffe, die sich in den Lyophilisaten fanden, könnten z.B. Reste von zur Verarbeitung oder Verpackung verwendeten Substanzen sein. Dann wäre bei einer eventuellen Änderung des Verarbeitungsvorgangs auch eine Änderung der Stoffbeimengungen zu erwarten. In dem Fall der hier untersuchten Proben ließ sich eine solche Veränderung z.B. über Chargennummern nicht mehr ausschließen.

Grundsätzlich könnten diese nachgewiesenen Substanzen einen proliferationshemmenden Einfluss auf die untersuchten Zelllinien durch das PUR und PET erklären.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen haben in dieser Arbeit eher einen Pilotcharakter. Der Zweck dieses Experiments lag in der Aufdeckung neuer Gebiete der Ursachenforschung für die Einflüsse, die die synthetischen Materialien auf die Zellen ausüben. So zeichnete sich ab, dass ePTFE offensichtlich keine Stoffe auslöst, die einen Einfluss haben könnten. Für dieses Material wurden auch keine erhöhte Apoptoserate und kein veränderter Proliferationsindex nachgewiesen. Auch im Bereich der Zellzahlbestimmung zeichnete sich dieses Material als am wenigsten beeinflussend aus.

Das PET beeinflusste die relative Zellzahl der untersuchten Zellreihen deutlich und zeigte als einziger untersuchter Kunststoff signifikante Einflüsse auf die Apoptoserate. Des Weiteren lösten sich hier in zwei von drei Proben Substanzen aus dem Material. Es werden aber weitere Studien benötigt, um zu beantworten, ob diese Substanzen die genannten Einflüsse auslösen oder ob überhaupt eine biologische Relevanz zu erkennen ist.

Für die Polyurethane sind Abspaltprodukte bekannt. In dieser Untersuchung ließen sich ebenfalls im Wasser gelöste Substanzen nachweisen. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie, so beeinflusste das untersuchte PUR die Zellzahlbestimmung analog zum PET, die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten keine maßgeblichen Auffälligkeiten.

Es sollten in jedem Fall weiterführende Untersuchungen folgen, um die massenspektrometrischen Ergebnisse der Lyophilisate des PUR und PET in größerem Umfang zu festigen. Außerdem muss Ziel weiterer Untersuchungen sein, die nachgewiesenen Substanzen zu identifizieren und deren biologische Wirksamkeit nachzuweisen.

4.7. Schlussfolgerungen

Bis heute existiert kein Gefäßersatz, der dem genuinen arteriellen Gefäß in seinen Eigenschaften vergleichbar ist. Wie unter 1.1.4. ausführlich dargestellt, sind synthetische Ersatzmaterialien oft die einzig passende Möglichkeit einer erfolgreichen Gefäßrekonstruktion. Die dafür verwendeten Polymere haben sich seit fast 50 Jahren kaum geändert, wurden aber umfangreich weiterentwickelt.

Die Suche nach dem „perfekten“ Ersatzgefäß ist bis heute nicht abgeschlossen. Regelmäßig werden weiter neue und veränderte Materialien zur Verbesserung der Offenheitsraten bei alloplastischem Gefäßersatz im Tierversuch getestet bzw. evaluiert [59, 60, 63, 71, 130]. Die Anzahl von klinischen Vergleichsstudien und Metaanalysen ist unüberschaubar, auch bei einer größeren Auswahl lassen sich nur begrenzt Vorschläge zum Einsatzgebiet der einzelnen Materialien festlegen [2, 3, 16, 28, 41, 58, 65-67, 73, 77, 93, 96, 118, 128]. In jedem Fall gilt, dass autologer Ersatz dem alloplastischen überlegen ist.

Die schlechteren Langzeitoffenheitsraten alloplastischer Prothesen sind maßgebender Antrieb für die Suche nach den Einflußfaktoren für den Wiederverschluß eines Gefäßes nach Rekonstruktion. Einige dieser Einflußfaktoren sind identifiziert [44, 55, 70, 72, 138, 139]. Noch immer ist allerdings zum größten Teil unklar, wie die Prothesenmaterialien auf molekularer Ebene mit humanen Zellen interagieren.

In [12, 17, 30, 39] wird ein In-vitro-Modell zur Testung von Herniennetzen vorgestellt. Im Bereich der Herniennetze, die zur Bauchdeckenrekonstruktion mit großem Erfolg in Hinblick auf die Rezidivrate implantiert werden, stellte sich vor allem die Frage einer potentiellen malignen Entartung der Zellen nach Kontakt mit dem Biomaterial, da diese Kunststoffe teilweise mehr als 50 Jahre im Patienten verbleiben. Trotz der einzelnen Fallberichte über Weichteilmalignome, die bei Patienten nach Implantation einer Gefäßprothese entstanden waren [19, 84, 132], stehen hier die Mechanismen, die zum Gefäßverschluß führen, im Vordergrund. Die Lebenserwartung der oft alten Patienten mit Gefäßersatz lässt in vielen Fällen die ohnehin seltene Tumorgenese im Bereich der Gefäße,

die bisher nicht in annehmbaren Zusammenhang mit polymerem Ersatzmaterial steht, in den Hintergrund treten.

Diese Arbeit bestätigt den Einfluss der untersuchten alloplastischen Materialien auf die humanen Zellkulturen. Ein In-vitro-Modell kann nie ganz auf die komplexen Bedingungen des lebenden Organismus übertragen werden. Dennoch konnte diese Studie zeigen, dass die reine Material-Zell-Interaktion ausreicht, einen Einfluss auf die humanen Zellen auszuüben. PET löste speziell bei Endothelzellen, aber auch partiell bei glatten Muskelzellen und Fibroblasten Apoptose aus.

Ob diese Einflüsse nun durch die Oberflächenstruktur des Materials oder durch abgespaltene bzw. herausgelöste Substanzen entstehen, wie sie in der Massenspektrometrie nachzuweisen waren, bleibt für nachfolgende Untersuchungen zu klären.

Für die implantierenden Chirurgen sollte bei der Wahl der Ersatzmaterialien in Zusammenschau der Literatur ergänzt durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiterhin eine den Möglichkeiten des Patienten angemessene Zurückhaltung in Hinblick auf alloplastischen Gefäßersatz gelten.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines In-vitro-Modells die Interaktion von synthetischen Gefäßersatzmaterialien mit humanen Zelllinien zu untersuchen. Hierzu wurden Stücke von Polyethylenterephthalat (PET), Polyurethan (PUR) und gerecktem Polytetrafluorethylen (ePTFE) separat mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten für 72 Stunden inkubiert. Photometrisch mittels AlamarBlue-Assay wurde nach 48 und 72 Stunden eine relative Zellzahl ermittelt, die auf den 24-Stundenwert bezogen wurde. Durchflußzytometrisch wurden nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Proliferationsindex und Apoptoserate gemessen. Als Vergleichswert diente für alle Tests eine analog behandelte Zellkontrolle ohne Kontakt zu Prothesenmaterial.

Des Weiteren wurden die Endothelzellanhaftung und mögliche Materialveränderungen mittels der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Für die morphologischen Analysen wurden die Materialien für sieben Tage mit Endothelzellen besiedelt. In einer Gruppe wurden die Zellen nach der Inkubation abgespült, um die Materialoberflächen ganz beurteilen zu können, in einer zweiten Gruppe wurden die Proben unverändert fixiert, um eine Zellabsiedlung zu evaluieren.

Abschließend wurden Proben von bidestilliertem Wasser nach 72-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Prothesenmaterialien lyophilisiert und massenspektrometrisch aufgearbeitet und mit einer Probe ohne Kunststoffkontakt verglichen, um mögliche Abbauprodukte zu identifizieren.

Die photometrische Zellzahlbestimmung zeigte im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringere relative Endothelzellzahlen nach Inkubation mit PET und PUR zu beiden Untersuchungszeitpunkten. Bei den glatten Muskelzellen ergab die Untersuchung bei PET und PUR einen signifikanten Einfluss nur nach 48 Stunden, die relative Zahl der Fibroblasten war bei allen drei Materialien nach 48 und 72 Stunden signifikant niedriger als die relative Zellzahl der Kontrollen.

Bei der durchflußzytometrischen Untersuchung des Proliferationsindex fand sich nur ein einziger signifikanter Unterschied bei den Fibroblasten für PUR nach 24 Stunden. Insgesamt zeigte sich dieser Proliferationsmarker im Gegensatz zur Apoptoserate unbeeinflusst. Hier konnte eine signifikante Induktion des programmierten Zelltods bei den Endothelzellen durch PET nach 48 und 72 Stunden belegt werden. Ebenso zeigte PET eine signifikant erhöhte Apoptoserate nach 48 Stunden bei den glatten Muskelzellen, bei den Fibroblasten nach 24 und 72 Stunden. PUR und ePTFE lösten keine Apoptose aus.

Die morphologischen Betrachtungen unter dem Rasterelektronenmikroskop konnten Materialveränderungen durch abgesiedelte Endothelzellen nach einem Inkubationszeitraum von sieben Tagen ausschließen. Des Weiteren fanden sich nur auf der ePTFE-Probe adhärente Endothelzellen.

In der Massenspektrometrie konnten sowohl bei PUR als auch bei PET Substanzen dokumentiert werden, die sich aus dem alloplastischen Prothesenmaterial gelöst hatten. Im Spektrum der ePTFE-Probe fanden sich keine abweichenden Massenwerte.

Zusammenfassend beeinflussen alle untersuchten Materialien die relative Zellzahl der humanen Zelllinien negativ, wenngleich das ePTFE nur auf die Fibroblasten signifikant einwirkte. PET induziert Apoptose bei allen Zelllinien, am deutlichsten bei den Endothelzellen. Das Material mit dem geringsten Einfluss auf die Zellen ist ePTFE. Ob dies daran liegt, dass sich hier in der Massenspektrometrie keine Substanzen in Lyophilisat fanden und ob dies auch der Grund für die bessere Zellabsiedlung auf der Oberfläche ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die schlechteren klinischen Ergebnisse und die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen allerdings erneut auf, dass die intensive Bemühung nach neuen oder verbesserten Gefäßersatzmaterialien sowie den pathophysiologischen Hintergründen für die Interaktionen zwischen Biomaterial und Organismus auch in Zukunft vorangetrieben werden müssen.

Um die in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse statistisch zu „beweisen“ ist eine Replikation mit konfirmatorischer Hypothesenprüfung zwingend.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Ahmed SA, Gogal RM, Jr., Walsh JE: A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211-224 (1994)
- [2] Albers M, Battistella VM, Romiti M, Rodrigues AA, Pereira CA: Meta-analysis of polytetrafluoroethylene bypass grafts to infrapopliteal arteries. *J Vasc Surg* 37, 1263-1269 (2003)
- [3] Albers M, Romiti M, Brochado-Neto FC, Pereira CA: Meta-analysis of alternate autologous vein bypass grafts to infrapopliteal arteries. *J Vasc Surg* 42, 449-455 (2005)
- [4] Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R: The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 22, 1304-1309 (2007)
- [5] Aper T, Schmidt A, Duchrow M, Bruch HP: Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 33, 33-39 (2007)
- [6] Aper T, Teebken OE, Steinhoff G, Haverich A: Use of a fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 28, 296-302 (2004)
- [7] Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H-J, Kühnel W, Schiebler TH, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K: Allgemeine Anatomie des Blutkreislaufs. Blut und Blutbildung (Kapitel 6). In: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: Anatomie. 8. Aufl., 153-169, Springer-Verlag, Berlin, 1999
- [8] Aronow WS: Management of peripheral arterial disease. *Cardiol Rev* 13, 61-68 (2005)
- [9] Bader A, Steinhoff G, Strobl K, Schilling T, Brandes G, Mertsching H, Tsikas D, Froelich J, Haverich A: Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. *Transplantation* 70, 7-14 (2000)
- [10] Barnabas G, Peter B, Zsolt K, Eva S, Gyorgy E, Lajos C, Peter Z, Tamas C: [Reconstructive vascular surgery with long-term refrigerated homografts]. *Magy Seb* 59, 388-392 (2006)

- [11] Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R: The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica Newsletter* (Roche Diagnostics Corporation) 4, 14-19 (1996)
- [12] Bethge T: In-vitro Untersuchungen zur Interaktion implantierbarer Kunststoffnetze aus Polypropylen mit humanen Fibroblastenkulturen. *Med. Diss. Lübeck*, 2004
- [13] Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, Storb RF, Sauvage LR, Hammond WP, Wu MH: Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells. *Blood* 95, 581-585 (2000)
- [14] Blumenberg RM, Gelfand ML, Dale WA: Perigraft seromas complicating arterial grafts. *Surgery* 97, 194-204 (1985)
- [15] Borrero E, Doscher W: Chronic perigraft seromas in PTFE grafts. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 29, 46-49 (1988)
- [16] Bosiers M, Deloose K, Verbist J, Schroe H, Lauwers G, Lansink W, Peeters P: Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for femoropopliteal and femorocrural bypass grafting: 1-year results. *J Vasc Surg* 43, 313-318; discussion 318-319 (2006)
- [17] Broll R, Bethge T, Windhovel U, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Duchrow M: [Influence of resterilized polypropylen meshes on growth of human fibroblasts--an experimental in vitro study.]. *Zentralbl Chir* 127, 589-593 (2002)
- [18] Bull DA, Hunter GC, Holubec H, Aguirre ML, Rappaport WD, Putnam CW: Cellular origin and rate of endothelial cell coverage of PTFE grafts. *J Surg Res* 58, 58-68 (1995)
- [19] Burns WA, Kanhouwa S, Tillman L, Saini N, Herrmann JB: Fibrosarcoma occurring at the site of a plastic vascular graft. *Cancer* 29, 66-72 (1972)
- [20] Campbell GR, Chamley-Campbell JH: Smooth muscle phenotypic modulation: role in atherogenesis. *Med Hypotheses* 7, 729-735 (1981)

- [21] Clowes AW, Gown AM, Hanson SR, Reidy MA: Mechanisms of arterial graft failure. 1. Role of cellular proliferation in early healing of PTFE prostheses. *Am J Pathol* 118, 43-54 (1985)
- [22] Clowes AW, Kirkman TR, Reidy MA: Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. *Am J Pathol* 123, 220-230 (1986)
- [23] Consigny PM: Endothelial cell seeding on prosthetic surfaces. *J Long Term Eff Med Implants* 10, 79-95 (2000)
- [24] Davies MG, Hagen PO: Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 81, 1254-1269 (1994)
- [25] De Bast Y, Creemers E: Infection of an abdominal aortic stent graft with suprarenal attachment. *Ann Vasc Surg* 20, 736-738 (2006)
- [26] Denk H, Zatloukal K: Zell- und Gewebsreaktionen (Kapitel 2). In: Böcker W, Denk H, Heitz P: *Pathologie*. 2. Aufl., 35-68, Urban & Fischer, München, Jena, 2001
- [27] Dennis C: Brief History of Development of Vascular Grafts (Kapitel 1). In: Sawyer PN: *Modern Vascular Grafts*. 1. Aufl., 1-26, McGraw-Hill, Inc., New York, 1987
- [28] Devine C, McCollum C: Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg* 40, 924-931 (2004)
- [29] Duchrow M: Klonierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens. *Med. Habil. Schr. Lübeck*, 2003
- [30] Duchrow M, Windhovel U, Bethge T, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Broll R: [Polypropylene synthetic mesh modifies growth of human cells in vitro. An experimental study]. *Chirurg* 73, 154-158; discussion 158-160 (2002)
- [31] Endl E, Hollmann C, Gerdes J: Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol* 63, 399-418 (2001)
- [32] Engst R, Fenski R, Pätzold C, Stecher J, Tshisuaka B, Witzel S, Braun R, Brehmer A, Buck-Gramcko D, Diehm C, Dietz K, Dörner T, Einhäupl K, Ekkernkamp A, Feldkamp

J, Fiedler K, Fleck C, Gaab M, Hetzer R, Hübner G, Kunze J, Lucke C, Martinius J, Messinger M, Meyer B, Moecke H, Mönch E, Pfitzmann R, Radke M, Schneider V, Schönberger B, Springer G, Stotz-Ingenlath G, Straube E, Straube E, Straube W, Stück B: Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, 2001

[33] Enzler MA: [Suggestion for differential use of graft materials in peripheral bypass operations]. Zentralbl Chir 118, 377-382 (1993)

[34] Feil E, Arnold G, Borowski A, Mennicken U: [Peri-graft reaction. A complication after implantation of a prosthesis shunt in children with congenital cyanotic heart defects]. Z Kardiol 81, 283-289 (1992)

[35] Fields C, Cassano A, Allen C, Meyer A, Pawlowski KJ, Bowlin GL, Rittgers SE, Szycher M: Endothelial cell seeding of a 4-mm I.D. polyurethane vascular graft. J Biomater Appl 17, 45-70 (2002)

[36] Freshney RI: Maintenance of the Culture - Cell Lines (Kapitel 12). In: Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique. 3. Aufl., 119 -128, Alan R. Liss, Inc., New York, 1983

[37] Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol 124, 619-626 (1994)

[38] Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY: Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. J Cell Biol 134, 793-799 (1996)

[39] Gehrts M: In-vitro Untersuchungen zum Einfluss von Kunststoffnetzen auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von humanen Monozyten. Med. Diss. Lübeck, 2006

[40] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133, 1710-1715 (1984)

[41] Glickman MH, Stokes GK, Ross JR, Schuman ED, Sternbergh WC, 3rd, Lindberg JS, Money SM, Lorber MI: Multicenter evaluation of a polyurethaneurea vascular access graft as compared with the expanded polytetrafluoroethylene vascular access graft in hemodialysis applications. J Vasc Surg 34, 465-472; discussion 472-463 (2001)

- [42] Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD: Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *J Immunol Methods* 252, 131-138 (2001)
- [43] Golomb BA, Dang TT, Criqui MH: Peripheral arterial disease: morbidity and mortality implications. *Circulation* 114, 688-699 (2006)
- [44] Greenwald SE, Berry CL: Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* 190, 292-299 (2000)
- [45] Hagemeyer TP: Aneurysmen von Gefäßprothesen - Morphologie und Pathogenese. Med. Diss. Bochum, 2001
- [46] Haimovici H: Landmarks and Present Trends in Vascular Surgery (Kapitel 1). In: Haimovici H, Callow AD, DePalma RG, Ernst CB, Hollier LH: *Haimovici's Vascular Surgery - Principles and Techniques*. 3. Aufl., 3-16, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1989
- [47] Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML: Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1510-1520 (2003)
- [48] Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML: Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1093-1099 (2002)
- [49] Hedin U, Sjolund M, Hultgardh-Nilsson A, Thyberg J: Changes in expression and organization of smooth-muscle-specific alpha-actin during fibronectin-mediated modulation of arterial smooth muscle cell phenotype. *Differentiation* 44, 222-231 (1990)
- [50] Henze U, Zwadlo-Klarwasser G, Klosterhalfen B, Höcker H, Richter H, Mittermayer C: Kunststoffe für den medizinischen Einsatz als Implantatmaterialien. *Dt Ärztebl* 96, A-979-986 (1999)
- [51] Herring M, Baughman S, Glover J, Kesler K, Jesseph J, Campbell J, Dilley R, Evan A, Gardner A: Endothelial seeding of Dacron and polytetrafluoroethylene grafts: the cellular events of healing. *Surgery* 96, 745-755 (1984)

- [52] Hildebrand A: Neointima und Neoendothel in Gefäßprothesen - Untersuchungsbefunde von Dacron- und Teflonprothesen. Med. Diss. Bochum, 2000
- [53] Hirst SJ, Twort CH, Lee TH: Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 335-344 (2000)
- [54] Hoenig MR, Campbell GR, Rolfe BE, Campbell JH: Tissue-engineered blood vessels: alternative to autologous grafts? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1128-1134 (2005)
- [55] Holubec H, Hunter GC, Putnam CW, Bull DA, Rappaport WD, Chvapil M: Effect of surgical manipulation of polytetrafluoroethylene grafts on microstructural properties and healing characteristics. *Am J Surg* 164, 512-516 (1992)
- [56] How TV: Mechanical Properties of Arteries and Arterial Grafts. In: Hastings GW: *Cardiovascular Biomaterials*. Aufl., 1-35, Springer-Verlag, London, 1992
- [57] Hristov M, Weber C: Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8, 498-508 (2004)
- [58] Huber TS, Carter JW, Carter RL, Seeger JM: Patency of autogenous and polytetrafluoroethylene upper extremity arteriovenous hemodialysis accesses: a systematic review. *J Vasc Surg* 38, 1005-1011 (2003)
- [59] Jeschke MG, Hermanutz V, Wolf SE, Koveker GB: Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg* 29, 168-176 (1999)
- [60] Jordan SW, Haller CA, Sallach RE, Apkarian RP, Hanson SR, Chaikof EL: The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt. *Biomaterials* 28, 1191-1197 (2007)
- [61] Junqueira LC, Carneiro J: *Mikroskopische Anatomie - Kreislauf* (Kapitel 13). In: *Histologie - übersetzt, überarbeitet und ergänzt von T. H. Schiebler*. 4. Aufl., 285-305, Springer-Verlag, Berlin, 1996

- [62] Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM: Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74, 570-581 (2005)
- [63] Karapinar K, Ulus AT, Tutun U, Aksoyek A, Apaydin N, Pamuk K, Can Z, Saritas Z, Kucukay F, Arda K, Katircioglu SF: Implantation of novel small-diameter polyurethane vascular prostheses interposed in canine femoral and carotid arteries. *Eur Surg Res* 36, 241-248 (2004)
- [64] Kim DI, Lee BB, Joh JW, Lee SK, Kim YI, Kim HH: Cells in pseudointimal hyperplasia is migrated from extravascular space. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 38, 277-281 (1997)
- [65] Kiyama H, Imazeki T, Kurihara S, Yoneshima H: Long-term follow-up of polyurethane vascular grafts for hemoaccess bridge fistulas. *Ann Vasc Surg* 17, 516-521 (2003)
- [66] Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH: Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 27, 357-362 (2004)
- [67] Klinkert P, Schepers A, Burger DH, van Bockel JH, Breslau PJ: Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized controlled trial. *J Vasc Surg* 37, 149-155 (2003)
- [68] Langer C, Schwartz P, Krause P, Mohammadi H, Kulle B, Schaper A, Fuzesi L, Becker H: [In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure]. *Chirurg* 76, 876-885 (2005)
- [69] Larson EM, Doughman DJ, Gregerson DS, Obritsch WF: A new, simple, nonradioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1929-1933 (1997)
- [70] Lepidi S, Sterpetti AV, Cucina A, Randone B, Palumbo R, Patrizi AL, Stipa F, D'Angelo LS, Cavallaro A: The degree of porosity influences the release of growth factors by healing polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 11, 36-41 (1996)

- [71] Marois Y, Paris E, Zhang Z, Doillon CJ, King MW, Guidoin RG: Vascugraft microporous polyesterurethane arterial prosthesis as a thoraco-abdominal bypass in dogs. *Biomaterials* 17, 1289-1300 (1996)
- [72] Marois Y, Sigot-Luizard MF, Guidoin R: Endothelial cell behavior on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment. *Asaio J* 45, 272-280 (1999)
- [73] Matsuda H, Miyazaki M, Oka Y, Nakao A, Choda Y, Kokumai Y, Kunitomo K, Tanaka N: A polyurethane vascular access graft and a hybrid polytetrafluoroethylene graft as an arteriovenous fistula for hemodialysis: comparison with an expanded polytetrafluoroethylene graft. *Artif Organs* 27, 722-727 (2003)
- [74] Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E: Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *Faseb J* 17, 1301-1303 (2003)
- [75] Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA: The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4, 953-961 (1993)
- [76] Michel JB: Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2146-2154 (2003)
- [77] Miyazaki K, Nishibe T, Sata F, Miyazaki YI, Kudo FA, Flores J, Yasuda K: Prosthetic grafts for above-knee femoropopliteal bypass. A multicenter retrospective study of 564 grafts. *Int Angiol* 21, 145-151 (2002)
- [78] Müller KM, Dasbach G: The pathology of vascular grafts. *Curr Top Pathol* 86, 273-306 (1994)
- [79] Neumayer C, Nanobashvili J, Panhofer P, Polterauer P: Therapie des Femoralisverschlusses: Indikation, Technik und Ergebnisse aus Sicht des Gefäßchirurgen. *Zeitschrift für Gefäßmedizin* 2, 4-11 (2005)
- [80] Neville RF, Sidawy AN: Myointimal hyperplasia: basic science and clinical considerations. *Semin Vasc Surg* 11, 142-148 (1998)
- [81] Newby AC, Zaltsman AB: Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 190, 300-309 (2000)

- [82] Niklason LE, Langer RS: Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transpl Immunol* 5, 303-306 (1997)
- [83] Nunn DB, Bunzendahl H, Handy JR: Ernst Jeger: a forgotten pioneer in cardiovascular surgery. *Surgery* 116, 569-575 (1994)
- [84] O'Connell TX, Fee HJ, Golding A: Sarcoma associated with dacron prosthetic material: case report and review of the literature. *J Thorac Cardiovasc Surg* 72, 94-96 (1976)
- [85] Padberg W, Schwemmler K: Transplantationschirurgie (Kapitel 22). In: Koslowski L, Bushe K-A, Junginger T, Schwemmler K: *Die Chirurgie*. 4. Aufl., 213-229, Schattauer, Stuttgart, 1999
- [86] Paes E, Vollmar JF, Mohr W, Hamann H, Brecht-Krauss D: Perigraft reaction: incompatibility of synthetic vascular grafts? New aspects on clinical manifestation, pathogenesis, and therapy. *World J Surg* 12, 750-755 (1988)
- [87] Paul U: [Erich Lexer]. *Zentralbl Chir* 102, 571-573 (1977)
- [88] Pauly RR, Bilato C, Cheng L, Monticone R, Crow MT: Vascular smooth muscle cell cultures. *Methods Cell Biol* 52, 133-154 (1997)
- [89] Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL: Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci* 9, 1412-1421 (2004)
- [90] Peng CW, Tan SG: Polyurethane grafts: a viable alternative for dialysis arteriovenous access? *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 11, 314-318 (2003)
- [91] Pierkes M, Chang BJ, Alt D, Prucker O, Ruhe J, Dahm M: [Cultivation of human cells on polymer covered biomaterial--a new concept to improve the implant characteristics. Results of an in-vitro-investigation]. *Herz* 29, 341-347 (2004)
- [92] Pislaru SV, Harbuzariu A, Agarwal G, Witt T, Gulati R, Sandhu NP, Mueske C, Kalra M, Simari RD, Sandhu GS: Magnetic forces enable rapid endothelialization of synthetic vascular grafts. *Circulation* 114, I314-318 (2006)
- [93] Post S, Kraus T, Muller-Reinartz U, Weiss C, Kortmann H, Quentmeier A, Winkler M, Husfeldt KJ, Allenberg JR: Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for

femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22, 226-231 (2001)

[94] Purcell C, Tennant M, McGeachie J: Neo-intimal hyperplasia in vascular grafts and its implications for autologous arterial grafting. *Ann R Coll Surg Engl* 79, 164-168 (1997)

[95] Roberts N, Jahangiri M, Xu Q: Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med* 9, 583-591 (2005)

[96] Robinson BI, Fletcher JP: Fluoropolymer coated Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicentre trial. *ANZ J Surg* 73, 95-99 (2003)

[97] Rohen J, Lütjen-Drecoll E: Funktionelle Histologie der Organsysteme (Mikroskopische Anatomie) - Rhythmisches Transport- und Verteilungssystem - Zirkulationssystem (Kapitel A 1). In: Funktionelle Histologie. 4. Aufl., 147-178, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 2000

[98] Rotmans JJ, Velema E, Verhagen HJ, Blankensteijn JD, Kastelein JJ, de Kleijn DP, Yo M, Pasterkamp G, Strokes ES: Rapid, arteriovenous graft failure due to intimal hyperplasia: a porcine, bilateral, carotid arteriovenous graft model. *J Surg Res* 113, 161-171 (2003)

[99] Roy-Chaudhury P, Kelly BS, Miller MA, Reaves A, Armstrong J, Nanayakkara N, Heffelfinger SC: Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts. *Kidney Int* 59, 2325-2334 (2001)

[100] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P: Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 89, 1111-1121 (2001)

[101] Sasaki Y, Suehiro S, Becker AE, Kinoshita H, Ueda M: Role of endothelial cell denudation and smooth muscle cell dedifferentiation in neointimal formation of human vein grafts after coronary artery bypass grafting: therapeutic implications. *Heart* 83, 69-75 (2000)

[102] Sauvage LR: A brief history of arterial prosthesis development. *J Invest Surg* 6, 221-225 (1993)

- [103] Sauvage LR, Berger K, Beilin LB, Smith JC, Wood SJ, Mansfield PB: Presence of endothelium in an axillary-femoral graft of knitted Dacron with an external velour surface. *Ann Surg* 182, 749-753 (1975)
- [104] Scanlon VC, Sanders T: The Vascular System (Kapitel 13). In: *Essentials of Anatomy and Physiology*. 4. Aufl., 275-303, F. A. Davis Company, Philadelphia, 2003
- [105] Schmid A: Gefäßchirurgie (Kapitel 24). In: Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B: *Chirurgie*. 2. Aufl., 873-945, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
- [106] Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H: Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods* 90, 65-70 (1986)
- [107] Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-367 (1998)
- [108] Shibuya T, Kambayashi J, Okahara K, Kim DI, Kawasaki T, Sakon M, Shiba E, Mori T: Subendothelial layer of pseudointima of polytetrafluoroethylene graft is formed by transformation of fibroblasts migrated from extravascular space. *Eur J Vasc Surg* 8, 276-285 (1994)
- [109] Stanley JC, Graham LM, Burkel WE: Endothelial Cell Seeding of Synthetic Vascular Prostheses (Kapitel 10). In: Sawyer PN: *Modern Vascular Grafts*. 1. Aufl., 191-214, McGraw-Hill Book Company, New York, 1987
- [110] Staudacher M: Die erste autologe Venentransplantation von Erich Lexer (1907). *Gefäßchirurgie* 9, 64-67 (2004)
- [111] Stephenson K, Tunstead J, Tsai A, Gordon R, Henderson S, Dansky HM: Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2027-2033 (2003)
- [112] Stewart GJ, Essa N, Chang KH, Reichle FA: A scanning and transmission electron microscope study of the luminal coating on Dacron prostheses in the canine thoracic aorta. *J Lab Clin Med* 85, 208-226 (1975)

- [113] Sugawara Y, Miyata T, Sato O, Kimura H, Namba T, Makuuchi M: Rapid postincubation endothelial retention by Dacron grafts. *J Surg Res* 67, 132-136 (1997)
- [114] Szilagyi DE: Arterial substitutes: thirty years of success and failure. *Ann Vasc Surg* 1, 357-363 (1986)
- [115] Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A: Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 19, 381-386 (2000)
- [116] Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10, 966-990 (1990)
- [117] Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A: Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res* 276, 263-271 (1994)
- [118] Tilanus HW, Obertop H, Van Urk H: Saphenous vein or PTFE for femoropopliteal bypass. A prospective randomized trial. *Ann Surg* 202, 780-782 (1985)
- [119] Tiwari A, Kidane A, Salacinski H, Punshon G, Hamilton G, Seifalian AM: Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 25, 325-329 (2003)
- [120] Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G: New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg* 10, 191-197 (2002)
- [121] Trümper L, Pfreundschuh M: Wachstumsregulation und Neoplasie (Kapitel 6). In: Pfreundschuh M, Schölmerich J: *Pathophysiologie, Pathobiochemie*. 1. Aufl., 49-59, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2000
- [122] Turner RJ: Vascular Graft Development: An Industrial Perspective (Kapitel 3). In: Sawyer PN: *Modern Vascular Grafts*. 1. Aufl., 75-103, McGraw-Hill Book Company, New York, 1987
- [123] Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP: Anoikis. *Biochem Soc Trans* 32, 421-425 (2004)

- [124] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51 (1995)
- [125] Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR: Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51, 2515-2520 (1991)
- [126] Vohra R, Thomson GJ, Carr HM, Sharma H, Walker MG: The response of rapidly formed adult human endothelial-cell monolayers to shear stress of flow: a comparison of fibronectin-coated Teflon and gelatin-impregnated Dacron grafts. *Surgery* 111, 210-220 (1992)
- [127] Vollmar JF, Guldner NW, Mohr W, Paes E: Perigraft-reaction after implantation of vascular prostheses. Pathogenesis, clinical picture and treatment. *Int Angiol* 6, 287-293 (1987)
- [128] Walluscheck KP, Bierkandt S, Brandt M, Cremer J: Infrainguinal ePTFE vascular graft with bioactive surface heparin bonding. First clinical results. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 46, 425-430 (2005)
- [129] Walluscheck KP, Steinhoff G, Kelm S, Haverich A: Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 12, 321-330 (1996)
- [130] Walpoth BH, Zammaretti P, Cikirikcioglu M, Khabiri E, Djebaili MK, Pache JC, Tille JC, Aggoun Y, Morel D, Kalangos A, Hubbell JA, Zisch AH: Enhanced intimal thickening of expanded polytetrafluoroethylene grafts coated with fibrin or fibrin-releasing vascular endothelial growth factor in the pig carotid artery interposition model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133, 1163-1170 (2007)
- [131] Weinberg CB, Bell E: A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231, 397-400 (1986)
- [132] Weinberg DS, Maini BS: Primary sarcoma of the aorta associated with a vascular prosthesis: a case report. *Cancer* 46, 398-402 (1980)

- [133] Weitz JI, Byrne J, Clagett GP, Farkouh ME, Porter JM, Sackett DL, Strandness DE, Jr., Taylor LM: Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: a critical review. *Circulation* 94, 3026-3049 (1996)
- [134] Yamamoto M, Nakamura H, Yamato M, Aoyagi M, Yamamoto K: Retardation of phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells in three-dimensional primary culture. *Exp Cell Res* 225, 12-21 (1996)
- [135] Yamamoto M, Yamamoto K, Noumura T: Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp Cell Res* 204, 121-129 (1993)
- [136] Yu H, Dai W, Yang Z, Kirkman P, Weaver FA, Eton D, Rowe VL: Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg* 38, 557-563 (2003)
- [137] Zdrahala RJ: Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art. *J Biomater Appl* 10, 309-329 (1996)
- [138] Zhang Z, Wang Z, Liu S, Kodama M: Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. *Biomaterials* 25, 177-187 (2004)
- [139] Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A, Terlecki P, Guinault AM, Muscatelli-Groux B, Michalak J, Melliére D, Becquemin JP, Allaire E: Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit* 7, 316-324 (2001)

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AR	Apoptoserate
Aufl.	Auflage
AV	arteriovenös
BD	Firma Becton Dickinson
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
ePTFE	expanded (gerecktes) Polytetrafluorethylen
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FB	Fibroblasten
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gravitationskonstante
g	Gramm
G ₀	Gap 0/Austritt aus dem Zellzyklus
G ₁	Gap 1
G ₂	Gap 2
h	Stunde/Stunden
i.U.	Internationale Einheiten (Units)
kV	Kilovolt

l	Liter
M	Mitose(phase)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
n	Anzahl der Tests
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate Buffered Saline (Pufferlösung)
PET	Polyethylenterephthalat
PI	Proliferationsindex
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUR	Polyurethan
rel.	Relativ(e)
S	Synthese(phase)
SD	Standardabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells)
z.B.	zum Beispiel

7.2. Geräte

Durchflusszytometer	FACScan Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Feuchtbrutschrank	Firma Heraeus, Hanau, Deutschland
Lyophilisation	Christ L1/Alpha 1 Firma Christ, Osterode, Deutschland
Massenspektrometer	Fourier-transform ion cyclotron resonance Massenspektrometer (FT-ICR MS), Apex II Firma Bruker-Daltonics, Billerica, Massachusetts, USA
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss Axioplan Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Photometer	DU-640 Firma Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Programm CellQuest	Version 3.2 Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Programm SPSS	Version 13.0 Firma SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
Rasterelektronenmikroskop	SEM505 Firma Philips/FEI, Eindhoven, Niederlande
Zentrifuge	Rotanta/TR Hettich Firma Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

7.3. Materialien

7.3.1. Nährmedien

Endothelzellen:

Kaighn's Modifikation von Ham's F12 Medium (F12K) mit 2 mM L-Glutamin und 1,5 g/l Natriumbikarbonat ergänzt mit 10 % FKS, 0,1 mg/ml Heparin, 0,03 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement und 100 i.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin

Fibroblasten:

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) mit 2mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 0,1 mM Non Essential Amino Acids sowie 1,5 g/l Natriumbikarbonat ergänzt mit 10 % FKS und 100 i.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin

Glatte Muskelzellen:

Kaighn's Modifikation von Ham's F12 Medium (F12K) mit 2 mM L-Glutamin und 1,5 g/l Natriumbikarbonat ergänzt mit 10 % FKS, 0,01 mg/ml Insulin, 0,01 mg/ml Transferrin, 10 ng/ml Natriumselenit, 0,03 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, 0,05 mg/ml Ascorbinsäure, 10 mM HEPES, 10 mM TES und 100 i.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin

Phenolrotfreies Medium für den AlamarBlue Assay:

Dulbecco's Medium ohne Phenolrot ergänzt durch 10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Glucose und 6mM HEPES und 100 i.U./ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin

7.3.2. Lösungen

Schweinegelatinelösung	1 % Schweinegelatine gelöst in PBS
FKS/PBS-Lösung	0,5 % FKS gelöst in PBS
PFA-Lösung	4 % Paraformaldehyd gelöst in PBS
Triton X 100-Lösung	0,25 % Triton-X 100 gelöst in bidestilliertem Wasser
Ki-67-FITC-Antikörper-Lösung	1 % FITC-konjugierter Ki-67 Antikörper gelöst in PBS
Fixierlösung Monti-Grazia-Dei	2 % Glutaraldehyd und 2 % Paraformaldehyd gelöst in 0.1 M Na-Cacodylat Puffer (pH 7.4)

7.3.3. Chemikalien

AlamarBlue Assay	Biosource, Solingen, Deutschland
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Binding Puffer, Annexin V-FITC, Propidiumjodid)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma, Rödermark, Deutschland
BD FACSFlow-Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's Medium ohne Phenolrot	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
EMEM-Medium	ATCC, Manassas, Virginia, USA
Endothelial Cell Growth Supplement	Sigma, Rödermark, Deutschland
F12K-Medium	ATCC, Manassas, Virginia, USA
FITC-konjugierter Ki-67 Antikörper	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
fötales Kälberserum	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
Glucose	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma, Rödermark, Deutschland

Heparin	Sigma, Rödermark, Deutschland
HEPES	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
Insulin	Sigma, Rödermark, Deutschland
L-Glutamin	Gibco BRL, Berlin, Deutschland
Natriumselenit	Sigma, Rödermark, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma, Rödermark, Deutschland
PBS	PAA, Pasching, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	ATCC, Manassas, Virginia, USA
Platin-Palladium	SCD 040, Balzers AG, Balzers, Liechtenstein
Schweinegelatine	Sigma, Rödermark, Deutschland
TES	Sigma, Rödermark, Deutschland
Transferrin	Sigma, Rödermark, Deutschland
Triton-X 100	Sigma, Rödermark, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Rödermark, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Deutschland

7.3.4. Zelllinien

Endothelzellen	Zelllinie HIAE-55 Firma ATCC, Manassas, Virginia, USA Produkt-Nr. CRL-2608 – Wistar Special Collection
Fibroblasten	Zelllinie MRC-5 Firma ATCC, Manassas, Virginia, USA Produkt-Nr. CCL-171
Glatte Gefäßmuskelzellen	Zelllinie T/G HA-VSMC Firma ATCC, Manassas, Virginia, USA Produkt-Nr. CRL-1999

7.3.5. Prothesenmaterialien

Polyethylenterephthalat	Bard Sauvage Filamentous Fabric (gestricktes PET) Firma Bard Peripheral Vascular, Tempe, Arizona, USA
Polyurethan	Expedial Vascular Heparinised Access Graft Firma LeMaitre Vascular, Wrexham, United Kingdom
verstrecktes Polytetrafluorethylen	Lifespan Reinforced Expanded PTFE Vascular Graft Firma Edwards Lifesciences, Irvin, California, USA

7.4. Einzelwerte

7.4.1. Zellzahlbestimmung

7.4.1.1. Endothelzellen

Gruppe/Messzeitpunkt	24h	48h	72h
PET	3,2047	1,8752	1,1462
	4,1113	3,1294	2,0753
	3,9063	3,5535	0,9268
	2,3958	1,3817	1,0217
	1,783	2,8045	1,2581
	3,5539	0,6484	0,6952
	2,3064	1,5732	0,5372
	3,3174	2,8069	2,154
	2,83092	1,8935	0,3111
ePTFE	3,8523	3,2096	2,8903
	3,4564	2,1267	2,2403
	4,8362	2,4206	2,0638
	3,8531	2,9776	3,1595
	2,3483	3,5629	3,0347
	2,6801	3,6687	3,7419
	4,9233	4,1715	3,9447
	4,5639	4,5726	4,5395
	4,9619	4,7039	3,9806
PUR	4,4869	2,0775	1,1307
	4,353	2,8487	2,3581
	4,6793	2,2503	2,0756
	3,6372	3,2079	2,2967
	4,0823	3,702	3,1698
	3,7528	3,5885	4,4184
	4,2592	3,6705	2,6923
	4,1301	3,844	2,5352
	4,5325	3,3946	2,361
Kontrolle	5,5528	4,7811	4,427
	5,3357	4,7455	4,8465
	4,9092	4,9288	6,1529
	4,6456	5,6157	3,6894
	4,7312	5,4519	7,7225
	4,5527	5,3542	7,3517
	5,004	6,0393	5,8315
	5,399	6,463	6,096
	6,6584	7	5,7944

Tabelle 15: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung (Endothelzellen)

7.4.1.2. Glatte Muskelzellen

Gruppe/Messzeitpunkt	24h	48h	72h
PET	4,2081	3,1569	3,303
	3,9457	3,6968	2,6909
	4,2384	3,685	3,2692
	1,9442	1,2017	0,7153
	2,4364	1,4986	1,2555
	2,1149	1,2309	0,9187
	4,1639	3,666	4,1318
	4,3635	3,0749	2,9831
	6,3627	3,887	4,0352
ePTFE	5,283	5,284	3,1411
	5,1186	6,5577	5,2088
	5,4468	4,4386	4,5486
	3,5897	1,7404	1,5012
	4,1739	3,7468	2,968
	3,9955	3,2427	1,8188
	4,7238	7,1857	7,3456
	5,4922	5,5881	7,4063
	5,56	6,2452	7,0104
PUR	4,9737	3,9635	3,1196
	5,4127	3,8032	3,8978
	5,6342	4,5718	3,4052
	2,8091	2,5415	1,5761
	2,981	2,0163	1,3875
	2,9972	1,179	0,3998
	3,9801	4,463	5,0151
	4,6179	4,3697	4,7316
	4,3981	4,7824	4,6767
Kontrolle	6,1027	6,6461	2,1137
	5,8033	6,6771	2,1207
	6,4195	7,9986	6,0226
	3,8443	4,6969	2,4019
	4,0841	5,7026	3,481
	4,8208	4,9296	1,9376
	5,2327	6,2412	9,2308
	6,1091	6,4014	8,836
	5,7322	6,1777	8,5738

Tabelle 16: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung (glatte Muskelzellen)

7.4.1.3. Fibroblasten

Gruppe/Messzeitpunkt	24h	48h	72h
PET	4,5563	3,8751	6,5617
	4,4362	3,9515	5,8315
	5,2013	4,6971	6,8552
	1,6626	1,8573	3,1733
	2,3333	2,7965	4,1715
	2,424	2,2984	1,8296
	0,8251	0,7167	0,9387
	1,2105	1,3099	2,1296
	1,0263	1,066	1,7095
PUR	4,4062	4,053	4,9965
	4,8056	3,9942	4,8336
	3,2343	2,7418	3,1304
	2,1617	2,3171	3,7762
	2,1233	2,1581	2,7263
	2,0568	2,4251	3,7023
	1,0015	1,1397	1,8428
	1,0584	1,2625	1,6338
	1,0865	1,3681	2,1402
Kontrolle PET/PUR	3,9163	4,1004	7,7285
	6,278	6,8717	9,6552
	6,2146	6,1743	10,1774
	3,3764	5,2125	8,2515
	3,2646	4,8754	8,632
	3,2126	5,5361	9,8063
	1,3815	2,0855	3,5876
	1,5842	3,0816	5,3611
	1,4689	2,3569	5,376
ePTFE	2,3361	1,355	1,8612
	2,3536	2,0893	3,2244
	2,6241	3,1816	2,4249
	5,9519	5,5683	6,952
	8,0423	7,9586	10,2023
	7,8522	7,3364	10,7288
	6,0029	6,3572	7,896
	6,2209	6,3856	8,4773
	6,0577	6,8963	8,8025
Kontrolle ePTFE	4,1916	4,9145	10,6246
	5,2089	6,8928	7,5888
	5,3726	5,7596	10,3861
	7,4739	8,2236	11,7536
	7,3901	8,1432	12,2227
	7,8627	8,8723	11,6572
	7,9917	10,02	10,7217
	7,6602	9,328	15,0126
	8,0485	9,5032	11,4775

Tabelle 17: Einzelwerte der Zellzahlbestimmung (Fibroblasten)

7.4.2. Proliferationsindex

7.4.2.1. Endothelzellen

Gruppe/Messzeitpunkt	0 h	24 h	48 h	72 h
PET	96,14	98,37	79,7	93,01
	96,04	96,91	82,49	95
	94,73	97,09	80,46	94,74
	94,14	93,58	93,91	92,09
	94,04	94,5	93,03	92,57
	94,22	94,4	93,9	94,03
	92,59	94,26	96,71	91,68
	90,41	92,57	94,21	91,56
	91,77	94,81	97,15	92,41
PUR	96,14	97,15	83,42	94,49
	96,04	95,53	81,11	92,55
	94,73	96,53	81,39	90,96
	94,14	93,63	91,7	90,07
	94,04	91,62	93,61	91,36
	94,22	94,02	92,72	90,73
	92,59	94,53	94,04	90
	90,41	94,04	95,77	88,86
	91,77	92,56	91,38	85,3
ePTFE	96,14	97,27	89,56	92,66
	96,04	96,05	84,97	96,33
	94,73	96,55	85,76	96,28
	94,14	93,91	94,45	94,41
	94,04	96,65	96,09	95,42
	94,22	93,08	93,6	90,02
	92,59	95,15	92,09	88,25
	90,41	95,52	93,38	91,28
	91,77	95,27	93,01	92,42
Kontrolle	96,14	95,91	87,58	93,05
	96,04	96,08	81,89	93,55
	94,73	95,25	86,17	94,99
	94,14	95,8	91,68	91,86
	94,04	91,55	93,03	92,94
	94,22	94,52	89,36	88,26
	92,59	94,94	95,52	91,03
	90,41	96,02	97,07	91,29
	91,77	93,81	93,43	92,11

Tabelle 18: Einzelwerte der Proliferationsindexbestimmung (Endothelzellen)

7.4.2.2. Glatte Muskelzellen

Gruppe/Messzeitpunkt	0 h	24 h	48 h	72 h
PET	98,84	98,59	93,72	79,51
	98,08	98,75	92,5	80,21
	97,89	99	93,55	xxx
	95,74	94,29	99,34	94,71
	95,71	95,18	98,23	93,03
	91,92	94,36	98,99	92,65
	98,7	98,29	97,75	68,76
	98,68	97,4	97,73	67,37
	98,25	96,73	97,84	62,78
	99,25	98,4	98,07	97,78
	98,54	98,62	98,55	98,66
	98,21	98,2	98,41	97,39
PUR	98,84	98,65	97,82	82,36
	98,08	98,54	95,33	78,75
	97,89	97,55	96,41	75,06
	95,74	95,38	98,26	92,16
	95,71	92,03	98,35	94
	91,92	93,25	98,73	93,74
	98,7	97,61	94,92	71,97
	98,68	98,08	93,83	75,05
	98,25	97,22	92,04	73,38
	99,25	97,44	96,4	96,36
	98,54	98,16	96,49	97,68
	98,21	96,91	97,56	95,61
ePTFE	98,84	99,27	95,51	84,18
	98,08	98,05	95,61	84,63
	97,89	98,61	94,54	84,03
	95,74	94,71	98,92	95,3
	95,71	97,56	98,45	95,56
	91,92	98,28	99,16	94,29
	98,7	98,7	97,48	71,82
	98,68	98,83	97,71	73,05
	98,25	98,23	98,3	69,63
	99,25	97,61	98,84	99,1
	98,54	94,79	98,09	98,37
	98,21	97,63	98,5	98,28
Kontrolle	98,84	98,47	95,3	84,1
	98,08	98,62	95,91	85,84
	97,89	96,99	94,5	xxx
	95,74	93,86	99,04	95,57
	95,71	95,78	99,03	96,38
	91,92	96,8	99,16	95,2
	98,7	97,41	98,38	73,05
	98,68	98,27	97,19	73,75
	98,25	98,56	98,54	77,43
	99,25	97,65	97,82	98,88
	98,54	97,48	97,95	98,86
	98,21	96,55	98,23	98,69

Tabelle 19: Einzelwerte der Proliferationsindexbestimmung (glatte Muskelzellen)

7.4.2.3. Fibroblasten

Gruppe/Messzeitpunkt	0 h	24 h	48 h	72 h
ePTFE	97,52	93,34	97,7	93,54
	95,88	93,9	98,21	90,41
	95,62	94,19	97,82	93,98
	98,12	98,14	98,91	97,7
	98,48	98,52	98,32	97,27
	98,29	98,28	98,94	97,35
	98,71	97,24	92,91	96,75
	96,74	97,12	96,16	96,63
	98,33	96	97,8	96,45
Kontrolle ePTFE	97,52	97,1	97,7	92,9
	95,88	97,65	97,81	92,12
	95,62	92,93	97,96	93,91
	98,12	98,87	98,95	98,25
	98,48	99,06	98,52	98,32
	98,29	98,44	96,98	98,62
	98,71	96,65	98,95	97,05
	96,74	97,18	98,13	98,32
	98,33	96,4	96,65	97,64
PET	97,82	98,37	64,94	98,25
	97,82	96,91	92,19	97,51
	97,49	97,09	96,14	97,7
	97,92	97,11	60,02	94,09
	97,64	98,22	94,56	97,12
	97,57	97,01	96,74	96,65
	97,67	95,21	96,22	80,26
	96,99	94,84	96,04	81,46
	96,96	55,74	94,42	81,07
	95,72	67,15	94,79	78,1
	95,96	96,07	94,51	75,64
	95,78	96,37	95,12	76,05
Kontrolle PET	97,82	98,43	97,69	98,34
	97,82	97,74	97,4	97,58
	97,49	94,94	96,75	99,06
	97,92	97,71	97,02	97,73
	97,64	99,19	97,22	95,84
	97,57	96,29	96,87	98,17
	97,67	95,05	92,91	79,79
	96,99	94,9	95,76	81,56
	96,96	53,07	96,3	83,59
	95,72	60,88	93,22	79,54
	95,96	95,5	93,72	78,49
	95,78	94,52	93,91	83,3

PUR	97,37	96,36	98,37	98,27
	97,89	94,7	97,77	98,66
	97,66	94,32	98,7	97,16
	98,79	98,65	99,02	99
	97,05	97,44	97,1	99,18
	98,48	97,76	97,49	99,49
	98,3	97,76	89,73	98,11
	98,29	95,55	95,34	97,83
	97,93	95,37	96,72	51,41
Kontrolle PUR	97,37	97,96	96,95	97,07
	97,89	97,71	97,95	98,17
	97,66	98,69	97,91	97,26
	98,79	96,23	97,67	99,16
	97,05	98,13	96,52	98,87
	98,48	96,73	98,21	99,57
	98,3	99,42	98,03	98,69
	98,29	98,79	98,42	99,07
	97,93	97,85	97,38	97,77

Tabelle 20: Einzelwerte der Proliferationsindexbestimmung (Fibroblasten)

7.4.3. Apoptoserate

7.4.3.1. Endothelzellen

Gruppe/Messzeitpunkt	0 h	24 h	48 h	72 h
PET	4,71	6,01	9,94	9,67
	5,64	6,53	7,55	6,85
	4,77	6,23	10,66	6,6
	3,97	6,3	13,61	16,12
	3,65	4,63	12,33	15,05
	4,7	6,08	11,94	12,67
	4,85	9,63	9,12	15,11
	5,17	11,31	13,7	15,47
	5,7	17,24	12,34	16,84
PUR	4,71	4,89	5,83	7,92
	5,64	4,67	5,82	5,71
	4,77	3,27	6,34	5,43
	3,97	4,11	7,07	8,34
	3,65	4,22	7,99	8,59
	4,7	6,06	11,24	7,32
	4,85	7,75	5,83	8,45
	5,17	12,19	10,56	13,36
	5,7	8,43	7,01	10,12

ePTFE	4,71	4,72	7,68	5,07
	5,64	6,38	6,08	5,69
	4,77	5,56	7,49	6,01
	3,97	5,03	9,23	9,29
	3,65	5,42	8,87	7,8
	4,7	5,61	11,27	9,45
	4,85	7,79	9,28	16,32
	5,17	8,03	9,29	7,09
	5,7	11,78	6,84	8,21
Kontrolle	4,71	4,56	5,62	5,31
	5,64	4,21	4,38	5,1
	4,77	4,49	4,13	4,47
	3,97	6,96	8,5	9,48
	3,65	5,46	9,35	12
	4,7	7,31	8,51	7,18
	4,85	7,51	5,5	8,36
	5,17	6,91	4,73	6,38
	5,7	8,2	7,74	5,23

Tabelle 21: Einzelwerte der Apoptoseratebestimmung (Endothelzellen)

7.4.3.2. Glatte Muskelzellen

Gruppe/Messzeitpunkt	0 h	24 h	48 h	72 h
PET	2,94	2,68	4,61	3,1
	3,32	4,61	5,51	4,32
	3,68	6,94	5,75	9,82
	2,91	4,52	3,98	1,77
	5,47	6,53	4,14	3,69
	4,44	6,47	3,62	4,43
	3,61	4,39	4,64	3,21
	3,61	8,2	3,8	3,43
	3,72	7,01	3,82	3,84
	2,35	4,64	3,89	3,01
	3,22	4,13	4,39	2,94
	3,36	6,6	3,76	4,01
PUR	2,94	3,96	4,47	2,88
	3,32	4,31	4,12	4,02
	3,68	4,45	4,08	2,89
	2,91	5,75	3,5	2,89
	5,47	6,07	3,75	2,77
	4,44	8,06	4,2	2,88
	3,61	5,9	3,21	2,69
	3,61	5,06	4,07	2,62
	3,72	5,79	3,23	3,85
	2,35	7,03	3,12	3,45
	3,22	8,54	3,82	2,99
	3,36	2,98	4,69	2,72

ePTFE	2,94	7,78	4,57	5,28
	3,32	10,51	4,04	4,84
	3,68	7,52	4,27	3,9
	2,91	8,01	3,62	3,21
	5,47	6,58	3,23	3,91
	4,44	7,18	4,22	2,67
	3,61	6,47	3,52	2,75
	3,61	5,9	3,35	2,33
	3,72	5,97	3,3	2,91
	2,35	5,31	4,56	3,82
	3,22	4,94	4,8	3,23
	3,36	1,97	3,95	3,34
Kontrolle	2,94	3,94	4,27	3,31
	3,32	5,01	3,7	3,97
	3,68	5,88	3,48	xxx
	2,91	7,26	3,79	2,84
	5,47	8,3	4,03	2,91
	4,44	8,36	3,64	3,04
	3,61	6,18	3,25	3,27
	3,61	5,57	3,15	2,71
	3,72	5,1	xxx	2,47
	2,35	6,62	1,93	3,88
	3,22	6,32	3,54	3,8
	3,36	5,8	5,25	2,86

Tabelle 22: Einzelwerte der Apoptoseratebestimmung (glatte Muskelzellen)

7.4.3.3. Fibroblasten

Gruppe/Messzeitpunkt	0 h	24 h	48 h	72 h
ePTFE	0,5	5,72	7,03	4,37
	0,35	6,55	8,03	4,24
	0,43	6,61	4,63	3,3
	1,39	1,98	2,29	4,7
	2,14	2,99	3,61	6,73
	2,49	5,64	4,82	5,73
	2,09	3,69	5,7	3,92
	3,5	5,52	6,59	6,02
	3,07	8,85	8,22	11,39
Kontrolle ePTFE	0,5	10,55	2,85	2,44
	0,35	9,14	3,33	2,06
	0,43	6,92	7,78	2,15
	1,39	3,31	2,33	3,43
	2,14	2	0,02	4,88
	2,49	1,68	3,36	3,27
	2,09	3,55	4,51	6,78
	3,5	4,07	6,36	9,24
	3,07	3,58	7,72	5,54

PET	1,74	16,88	6,4	3,81
	3,36	5,48	6,79	1,17
	2,71	7,86	2,87	1,21
	1,59	7,82	3,31	4,78
	1,83	11,48	1,71	1,83
	1,33	4,61	4,61	8,89
	3,05	12,94	3,8	2,46
	3,78	9,54	9,12	2,57
	5,2	8,19	7,18	7,41
	2,15	7,31	3,98	5,16
	2,91	9,18	2,02	4,25
	2,8	6,95	2,89	6,04
Kontrolle PET	1,74	2,87	6,23	0,66
	3,36	3,05	3,28	1,34
	2,71	2,73	4,19	1,6
	1,59	2,29	3,73	1,17
	1,83	3,05	3,26	1,54
	1,33	2,51	4,99	1,62
	3,05	6,17	4,26	3,87
	3,78	6,02	5,8	3,22
	5,2	5,69	5,1	3,03
	2,15	4,29	2,47	3,06
	2,91	3,77	2,97	1,65
	2,8	4,33	4,07	1,56
PUR	1,3	2,22	6,91	10,08
	1,75	3,18	18,59	12,09
	2,04	2,66	8,48	12,12
	2,13	1,75	12,84	7,9
	3,62	1,24	7,24	4,6
	3,13	1,77	6,29	9,97
	0,91	3,28	2,67	2,76
	1,86	5,14	2,25	4,97
	1,35	5,42	2,91	3,89
Kontrolle PUR	1,3	5,3	7	9,06
	1,75	4,9	2,76	7,86
	2,04	5,57	9,93	8,05
	2,13	2,92	5,15	3,37
	3,62	3,16	5,46	3,36
	3,13	3,69	6,19	5,83
	0,91	5,06	3,79	1,84
	1,86	2,92	2,86	2,34
	1,35	4,71	3,92	1,83

Tabelle 23: Einzelwerte der Apoptoseratebestimmung (Fibroblasten)

7.5. Zusatzstatistik zur Zellzahlbestimmung

Wie unter 3.1. dargestellt wurde, folgt hier die Darstellung der absoluten Mittelwerte mit Standardabweichungen zur Zellzahlbestimmung zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden. Desweiteren wurden hier zur Diskussion der Ergebnisse deskriptiv die Veränderung der absoluten Werte der Zellzahlbestimmung über die Zeit statistisch aufgearbeitet. Die Werte sind als Absorptionszahlen in der Einheit % Reduktion pro Stunde angegeben und korrelieren mit der absoluten Zellzahl. Statistisch verglichen wurden die Zeitpunkte 72 h gegen 24 h, 48 h gegen 24 h und 72 h gegen 48 h.

7.5.1. Endothelzellen

	24 h	48 h	72 h	p-Werte		
Gruppe	Mittelwert ($\pm$ SD)	Mittelwert ($\pm$ SD)	Mittelwert ($\pm$ SD)	72h - 24h	48h - 24h	72h - 48h
PET	3,045 (0,78)	2,185 (0,94)	1,125 (0,63)	0,008	0,066	0,011
PUR	4,213 (0,35)	3,176 (0,65)	2,560 (0,89)	0,011	0,008	0,028
ePTFE	3,942 (0,97)	3,490 (0,90)	3,288 (0,83)	0,110	0,314	0,110
Kontrolle	5,199 (0,65)	5,598 (0,78)	5,768 (1,30)	0,441	0,086	0,859

Tabelle 24: absolute Daten zur Zellzahlbestimmung EC mit Mittelwert (n = 9) in % Reduktion pro Stunde mit Standardabweichung (SD) und p-Werte der Signifikanzanalyse zwischen den einzelnen Zeitpunkten gruppenintern (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen)

7.5.2. Glatte Muskelzellen

	24 h	48 h	72 h	p-Werte		
Gruppe	Mittelwert ($\pm$ SD)	Mittelwert ($\pm$ SD)	Mittelwert ($\pm$ SD)	72h - 24h	48h - 24h	72h - 48h
PET	3,753 (1,39)	2,789 (1,14)	2,589 (1,31)	0,008	0,008	0,214
PUR	4,200 (1,08)	3,521 (1,29)	3,134 (1,66)	0,051	0,066	0,086
ePTFE	4,820 (0,73)	4,892 (1,76)	4,550 (2,34)	0,678	0,953	0,374
Kontrolle	5,350 (0,92)	6,163 (0,99)	4,969 (3,19)	0,594	0,008	0,374

Tabelle 25: absolute Daten zur Zellzahlbestimmung VSMC mit Mittelwert (n = 9) in % Reduktion pro Stunde mit Standardabweichung (SD) und p-Werte der Signifikanzanalyse zwischen den einzelnen Zeitpunkten gruppenintern (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen)

7.5.3. Fibroblasten

	24 h	48 h	72 h	p-Werte		
Gruppe	Mittelwert ($\pm$ SD)	Mittelwert ($\pm$ SD)	Mittelwert ($\pm$ SD)	72h - 24h	48h - 24h	72h - 48h
PET	2,631 (1,68)	2,508 (1,42)	3,689 (2,26)	0,015	0,314	0,015
PUR	2,437 (1,42)	2,384 (1,08)	3,198 (1,23)	0,015	0,953	0,008
ePTFE	5,271 (2,26)	5,236 (2,41)	6,730 (3,38)	0,021	0,859	0,015
Kontrolle 1*	3,411 (1,86)	4,477 (1,69)	7,620 (2,33)	0,008	0,011	0,008
Kontrolle 2*	6,800 (1,46)	7,962 (1,76)	11,272 (1,95)	0,008	0,008	0,008

Tabelle 26: absolute Daten zur Zellzahlbestimmung FB mit Mittelwert (n = 9) in % Reduktion pro Stunde mit Standardabweichung (SD) und p-Werte der Signifikanzanalyse zwischen den einzelnen Zeitpunkten gruppenintern (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen)

*Kontrolle 1 war die Kontrollgruppe zu PET und PUR, Kontrolle 2 war die Kontrollgruppe zu ePTFE (vergleiche auch 3.1.3.)

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in tiefer Erinnerung Herrn PD Dr. Michael Duchrow für die Überlassung des Themas und seine immer wohlwollende, konstruktive und aufmunternde Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Broll für die ihm so selbstverständliche Übernahme der Doktorvaterschaft, seine stets freundliche und hilfreiche Unterstützung und seine Anregungen bedanken.

Im Besonderen geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. H.-P. Bruch, Direktor der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck, sowie an Herrn Prof. Dr. J. Westermann, Direktor des Instituts für Anatomie der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel im chirurgischen Forschungslabor und die Arbeiten am Rasterelektronenmikroskop.

Vielen Dank an Frau Dr. Birgit Wulff für die Entwicklung der Idee zur Arbeit und die großartige Betreuung, die immer konstruktiven und unterstützenden Diskussionen und das Einbringen der wichtigen klinischen Aspekte. Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. T. Wedel, ehemals Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck, für seine Bemühungen zur Rasterelektronenmikroskopie und konzeptionellen Anregungen zur Arbeit. Ebenfalls danken möchte ich Herrn PD Dr. B. Lindner aus dem Forschungszentrum Borstel für die Unterstützung und Bereitstellung des Massenspektrometers.

Für seine große Hilfe und Expertise im Bereich der laborexperimentellen gefäßchirurgischen Forschung danke ich Herrn Dr. Thomas Aper, Klinikum Oststadt-Heidehaus in Hannover.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Claudia Killaitis für die freundliche Unterstützung in Hinblick auf die statistische Auswertung bedanken.

Besonders herzlich danke ich allen Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors, ganz besonders Frau Annemarie Aumüller, Frau Elke Gheribi, Frau Vera Grobleben, Frau Gisela Grosser-Pape und Frau Regina Kaatz für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen und das tolle Arbeitsklima, das mir sicher in unvergesslicher Erinnerung bleiben wird.

9. Lebenslauf

Name:	Andreas Schmidt	
Geburtsdatum:	10.05.1979	
Geburtsort:	Itzehoe	
Eltern:	Herrmann Schmidt Brigitte Schmidt, geb. Lüders	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Konfession:	evangelisch	
Wohnort:	Mönkhofer Weg 68a 23562 Lübeck	
Schul Ausbildung:	1985-1989	Grundschule Kremperheide
	1989-1995	Auguste-Viktoria-Schule zu Itzehoe
	1995-1996	E.A.Laney High-School, Wilmington, North Carolina, USA
	1996-1999	Auguste-Viktoria-Schule zu Itzehoe
Schulabschluß:	25.06.1999	allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst:	1999-2000	Sanitätsregiment 6 in Breitenburg/Nordoe
Studium:	2000-2007	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
	12.09.2002	ärztliche Vorprüfung
	05/2004	Beginn der Dissertationsarbeit
	WS 2004/05	Urlaubssemester aus Promotionsgründen
	22.05.2007	ärztliche Prüfung
Berufliche Laufbahn:	23.05.2007	Approbation als Arzt
	seit 07/2007	Assistenzarzt der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)

10. Publikationen

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Kongreßbeiträge mit veröffentlichten Abstracts:

Schmidt A, Duchrow M, Aper T, Wedel T, Franke C, Bruch H-P, Wulff B

“Synthetic Vascular Prostheses Influence the Growth Behavior of Human Vascular Cells in vitro”

Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology, Rostock, Germany, September 15–17, 2005; Poster

Abstract publiziert in: J Vasc Res 2006; 43(1):27–60

Schmidt A, Wulff B, Aper T, Wedel T, Lindner B, Bruch H-P, Duchrow M

“Synthetic Vascular Prostheses Influence the Growth Behavior of Human Vascular Cells in vitro”

41st Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Rostock, Germany, May 17–20, 2006; Oral Presentation

Abstract publiziert in: Eur Surg Res 2006; 38(suppl 1):1-158

Originalarbeit:

Wulff B, Schmidt A, Duchrow M, Bruch H-P

“Alloplastisches Material zum Gefäßersatz – Gewebeverträglichkeit und Einfluss auf das Zellwachstum in vitro“

Biomaterialien – Interdisciplinary Journal of Functional Materials, Biomechanics, and Tissue Engineering 2007; 8 (S1): 88-89