



Lehrstuhl für Medizintechnik
Technische Universität München

Hämatogene Wachstumsfaktoren: Isolation, Applikation und biologische Wirkung

Sabine Wacker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Rafael Macián-Juan, Ph.D.

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel

2. Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff

Die Dissertation wurde am 03.07.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 14.10.2013 angenommen.

Für Feli

(Das beste Wellness-Büro aller Zeiten)

Überblick

Eine effiziente Versorgung chronischer und großflächiger Wunden gewinnt infolge der demographischen Entwicklung an Bedeutung. Die Zunahme systemischer Erkrankungen in industriellen Ländern bedarf der Entwicklung innovativer therapeutischer Konzepte. Infolgedessen werden hämatogene autologe Wachstumsfaktoren, gewonnen aus Thrombozyten, zunehmend als Heilungsinitiatoren diskutiert. Deren Isolierung aus patienteneigenem Vollblut mittels Zentrifugations- und Separationstechniken stellt eine prozesstechnisch etablierte Möglichkeit dar. Kommerziell erhältliche Systeme zur Trennung der Blutplättchen weisen jedoch hinsichtlich der sterilen Verarbeitung sowie einer geeigneten Applikationsmöglichkeit essentielle Defizite auf. Zudem sind eine Reihe der Studien zur biologischen Wirksamkeit der Blutpräparate mitunter als unzureichend und lückenhaft anzusehen.

Infolgedessen wird ein neuer Zentrifugenrotor konzipiert und hinsichtlich der maximalen Thrombozytenausbeute optimiert. Neben der Variation der Zentrifugationsparameter ist auch der Einfluss ausgewählter Antigerinnungsmittel Teil der Untersuchung.

Darüber hinaus wird zur Applikation des gewonnenen Thrombozytenkonzentrats auf Wundflächen ein Hand-Applikator entwickelt. Die gleichmäßige Verteilung kleiner Volumina auf großflächigen Wunden soll bei der Auftragung des Konzentrats gewährleistet sein. Hierzu werden die Zerstäubungsvorgänge charakterisiert, sowie die unterschiedlichen Sprühbilder analysiert. Zudem wird das System an die Tauglichkeit im Operationssaal adaptiert.

Abschließend wird der Einfluss der Zentrifugation und der Applikation auf die Qualität des Thrombozytenkonzentrats biologisch evaluiert. Hierfür findet die Untersuchung des Aktivierungszustands der Thrombozyten mittels durchflusszytometrischer Methoden statt, wodurch Rückschlüsse auf die Verlustrate an Wachstumsfaktoren während des Herstellungsprozesses gezogen werden. Anhand eines optimierten Zellkulturtestsystems erfolgt die Beurteilung des Einflusses des Konzentrats auf die Proliferation humaner Fibroblasten, der zellulären Initiatoren beim Heilungsvorgang großflächiger Wunden.

Abstract

Hematogenous, autologous platelet derived growth factors represent a promising new wound care concept. Optimized preparation of platelet concentrate from patient's whole blood and an innovative hand-held device for application to wound surfaces is developed. Subsequently the biological activity is evaluated in vitro. Correlations between preparation process, state of platelet activation and the proliferation-promoting effect of the concentrates are worked out.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Prof. Wintermantel danken, der es mir durch die spannende Fragestellung und die stetige Unterstützung ermöglicht hat diese Arbeit anzufertigen. Zudem gilt mein Dank Prof. Wolff für die Übernahme des Koreferats meiner Arbeit, sowie Prof. Macián-Juan für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Desweiteren möchte ich mich bei der Firma Andreas Hettich GmbH & Co. KG., insbesondere bei Anke Lenz, Jovan Dobos und K.-G. Eberle für die sehr angenehme und produktive Zusammenarbeit während der letzten Jahre bedanken.

Während meiner über fünf Jahre am Lehrstuhl durfte ich mit sehr vielen, sehr tollen Kollegen sehr viel Zeit verbringen. Für diese Jahre, in denen wir viel gearbeitet, aber auch viel gefeiert haben, möchte ich mich sehr sehr herzlich bedanken. Die vielen Stunden mit euch, ob bei langen Jour Fixes, den Brotzeiten, Lehrstuhlausflügen oder einfach nur bei spontanen Bürositzungen habe ich sehr genossen und werde mich immer gern an die Zeit zurück erinnern. Wir haben viele schöne Erlebnisse gehabt, viel gelacht, und auch schwere Zeiten zusammen durchgestanden. Die Freundschaften, die dabei entstanden sind, haben meine Zeit am Lehrstuhl bereichert und für den nötigen Ausgleich neben der Arbeit gesorgt. Ich bin mir sicher, dass sie auch in der Zeit nach MedTech Bestand haben werden.

Triumvirat forever ☺

Allen Studenten, die mir bei der Durchführung der zahlreichen Versuche und Fragestellungen geholfen haben, möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Nur durch die vielen Semester-, Bachelor-, Master-, und Diplomarbeiten konnte die Thematik in der Tiefe abgedeckt werden. Daher möchte ich Aline Mundt, Andrea Wegele, Andreas Brehm, Boris Bergmann, Christian Bozsak, Christine Diessl, Claudia Wittkowske, Felicitas Lanzl, Franz Fasel, Janette Witte, Jenny Schwarz, Johannes Mayer, Jonas Ingeramnn, Julia Schilling, Julius Arzner, Katharina Werner, Kerstin Götz, Martina Dzharova, Martina Müller, Mathias Höllige, Max Utzinger, Melanie Spornraft, Philipp Hoellein, Philippe Lennertz, Sebastian Eggert, Sebastian Greding, Simon Brückl, Simone Keller, Simone Link, Stefan Grott, Steffi Recht, Tanja Kern, Tanja Lätsch, Tatiana Fass, Thomas Wolff und Vroni Grünerbel ganz herzlich danken.

Neben den studentischen Arbeiten waren mir Andi, Franz, Janette, Julia, Max, und Sarah, die in diesem Projekt tätigen studentischen und wissenschaftlichen Hilfskräfte, eine enorme Hilfe bei der Durchführung der zahlreichen Zellkulturversuche und Zentrifugationsreihen.

Es hat mir immer sehr viel Spaß gemacht mit euch in unserem schönen und gemütlichen Biolabor zu arbeiten. Danke für euer großes Engagement während der ganzen Zeit.

Meinen Freunden daheim, zu denen ich immer gehen konnte wenn es mal nicht so lief und die mir auch längere Zeiten ohne ein Lebenszeichen nicht übel genommen haben, möchte ich auch meinen großen Dank aussprechen. Schön, dass es euch gibt!

Der größte Dank gilt meinen Eltern, Schwestern und Michi. Sie haben mich während der ganzen Zeit mit wirklich jeder Laune ertragen, mich stets unterstützt und ermutigt. Hierdurch habt ihr mir den Rückhalt gegeben, den ich bei der Fertigstellung der Arbeit gebraucht habe. Danke!

München, Januar 2014

Sabine Wacker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Medizinische und technische Grundlagen	4
2.1	Physiologie der Wundheilung.....	4
2.2	Thrombozyten.....	6
2.3	Pathophysiologie und Wundtherapie	9
2.3.1	Wundheilungsstörungen.....	9
2.3.2	Wundversorgung	10
2.4	Gewinnung autologer Thrombozytenkonzentrate.....	11
2.5	Systeme zur Herstellung von Thrombozytenkonzentrat	13
2.6	Applikation von Thrombozytenkonzentrat.....	14
2.7	Wirksamkeitsnachweis.....	19
3	Optimierte Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten	21
3.1	Probandenauswahl	21
3.2	Herstellung von Thrombozytenkonzentrat.....	21
3.2.1	Manueller Herstellungsprozess.....	22
3.2.2	Automatisierter Herstellungsprozess	22
3.3	Etablierung der Prozessparameter	24
3.3.1	Studiendesign.....	24
3.3.2	Auswertungsmethoden.....	26
3.4	Ergebnisse	28
3.4.1	Thrombozytenausbeute im Platelet Rich Plasma (PRP)	28
3.4.2	Bewertungsschema.....	33
3.4.3	Thrombozytenausbeute im Thrombozytenkonzentrat.....	40
3.5	Diskussion	42
3.5.1	Auswahl des Antigerinnungsmittels	42
3.5.2	Effektivitätsbetrachtung des neuen Zentrifugationsverfahrens (RotiSan)	44
4	Applikationssystem	47
4.1	Technische Spezifikationen	47
4.1.1	Düse	48
4.1.2	Treibmedium	49
4.2	Evaluation des Zerstäubungsprozesses.....	51

4.2.1	Sprühkegelevaluation	53
4.2.2	Tröpfchengrößenbestimmung	54
4.3	Prototyp-Konfiguration	54
4.4	Ergebnisse	58
4.4.1	Düse	58
4.4.2	Applikator	69
4.5	Diskussion	75
4.5.1	Sprühbilduntersuchungen	75
4.5.2	Applikator	77
5	Biologische Evaluation	81
5.1	Aktivierungsuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie	82
5.2	In Vitro Wirksamkeitsnachweis.....	82
5.2.1	Entwicklung eines angepassten Zellkultur-Testsystems	84
5.2.2	Co-Inkubationsversuche.....	90
5.3	Ergebnisse	91
5.3.1	Aktivierungsuntersuchungen	91
5.3.2	Zellkultursystem	93
5.3.3	Co-Inkubation.....	103
5.4	Diskussion	110
5.4.1	Aktivierungszustand der Thrombozyten.....	110
5.4.2	Validierung des Zellkultursystems	112
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	117
	Literaturverzeichnis.....	120
	Abkürzungen und Begriffserläuterungen.....	132
	Formelzeichen	135
	Anhang.....	136
A	Zellbiologische Untersuchungen.....	136
B	Evaluierung des Zellkultursystems	140
C	Co-Inkubationsversuche	145
D	Parameterstudie.....	147
E	Produktdokumentation	153
F	TK-Systeme	154
G	Konstruktionszeichnungen.....	156

1 Einleitung

Die effiziente Wundversorgung stellt für viele klinische Bereiche eine wichtige Aufgabe dar, ob Chirurgie, Innere Medizin oder Dermatologie. Forschungs- und Entwicklungstätigkeiten hinsichtlich innovativer und ökonomischer Therapiekonzepte repräsentieren einen wesentlichen Bereich der Medizintechnik. Insbesondere die Versorgung von Wunden mit verzögertem bis stagnierendem Heilungsverlauf bedeutet dabei eine spezielle Herausforderung [14, 51].

Die Folgen einer Wundheilungsstörung können sehr unterschiedlich sein, je nach Ursache und in welcher Phase des Heilungsprozesses die Störung auftritt: Bei systemischen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, verlängert sich die Entzündungsphase und es kann sich eine chronische Wunde entwickeln [63]. Ist dagegen die reparative Phase der Wundheilung gestört, so können sich hypertrophe Narben oder Keloide, Bindegewebswucherungen, bilden [138]. Begünstigt durch die demographische Entwicklung und die steigende Zahl von Patienten mit systemischen Grunderkrankungen, steigt auch die Anzahl von Patienten mit Wundheilungsstörungen stetig an [63].

Wirtschaftlich betrachtet stellt die Entwicklung neuer Therapieformen für eine effiziente Wundheilung ein erhebliches Potential dar. Allein die geschätzten Behandlungskosten für chronische Wunden von jährlich 35 Milliarden US \$ [132] bei einer Prävalenz von 2,5 % der Bevölkerung in Europa, Amerika und Japan [122], sowie die geschätzten Gesamtkosten für die Behandlung von Narbengewebe von 12 Milliarden US \$ [132] zeigen die wirtschaftliche Bedeutung der Wundversorgungsthematik.

Seit Ende der 1990er Jahre wird der Einsatz von Eigenblutpräparaten zur Wundheilungsförderung klinisch vorangetrieben [91]. Die Vergleichbarkeit der Studien gestaltet sich aufgrund der Variation der eingesetzten Produkte jedoch schwierig und ein abschließender wissenschaftlicher Nachweis der Wirksamkeit ist derzeit nicht gegeben [39]. Die Bandbreite der Präparate erstreckt sich von Wachstumsfaktorkonzentraten, bei welchen die Wachstumsfaktoren aus induziert aktivierten Thrombozyten freigesetzt und anschließend alle zellulären Bestandteile des Blutes abgetrennt werden, über nicht aktivierte Thrombozytenkonzentrate bis hin zu thrombozytenreichem Fibrinigel [165]. Im Gegensatz zu den Wachstumsfaktorkonzentraten, bei welchen einmalig ein Maximalwert an Wachstumsfaktoren gemessen und angewendet wird [41, 59, 84, 89, 98, 146, 159], können nicht aktivierte Thrombozytenkonzentrate die Wachstumsfaktoren sukzessive über mehrere Tage freisetzen [79, 104].

Die Bereitstellung eines Konzentrats mit möglichst inaktiven Thrombozyten soll in dieser Arbeit umgesetzt werden. Der physiologische Aktivierungsprozess auf der Wundfläche soll die Abgabe wundheilungsfördernder Faktoren in geeignetem Maß über einen längeren Zeitraum gewährleisten.

Zielsetzung zur Entwicklung eines Rotorsystems, eines Applikators und der Gewinnung von Wachstumsfaktoren

Für die effiziente Versorgung schlecht heilender sowie großflächiger Wunden wird ein System für die optimierte Herstellung und Applikation von autologem Thrombozytenkonzentrat entwickelt. Zur Sicherstellung der Qualität wird das Konzentrat anschließend *in vitro* untersucht und die Ergebnisse evaluiert. Insbesondere der Einfluss des Herstellungs- und Applikationsprozesses auf den Aktivierungszustand der Thrombozyten sowie die proliferationsfördernde Wirkung auf humane Fibroblasten wird dabei untersucht.

Der Herstellungsprozess zur Gewinnung von autologem Thrombozytenkonzentrat gliedert sich in Zentrifugations- und Separationsschritte und kann mittels eines neuen Rotorkonzepts automatisiert durchgeführt werden. Die Optimierung dieses Verfahrens hinsichtlich der Thrombozytenausbeute erfolgt durch Variation der Zentrifugationsparameter (Drehzahl, Zeit etc.), sowie durch die Untersuchung des Einflusses ausgewählter Antigerinnungsmittel (z.B. Heparin) auf die Ausbeute im Konzentrat. Dazu fungiert als Referenz die manuelle Separierung der Blutkomponenten nach erfolgter Zentrifugation.

Für die anschließende Applikation der Thrombozytenpräparate auf eine Wundfläche wird ein Applikatorsystem entwickelt, das im Gegensatz zu manuell bedienbaren Zweispritzensystemen das Konzentrat mittels Zweistoffdüse appliziert und eine gleichmäßige Verteilung auf dem Wundgebiet ermöglicht. Der Fokus bei der Entwicklung des Hand-Applikators liegt dabei auf der eigenständigen Bedienbarkeit des Systems. Im Unterschied zu bestehenden Applikatoren soll auf jegliche Art externer Verbindungen (Druckluftschläuche, Stromkabel o.Ä.) verzichtet und hierdurch eine ungebundene Anwendbarkeit im OP-Saal erzielt werden bei Erhalt der Sterilität des Applikators.

Bei der abschließenden biologischen Validierung des Endprodukts wird insbesondere der Aktivierungszustand der Thrombozyten mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden untersucht. Der Einfluss von Blutpräparaten auf die Proliferation humaner Bindegewebszellen *in vitro* dient dabei als erster richtungsweisender Anhaltspunkt im Hinblick auf die klinische Anwendung. Hierfür wird ein geeignetes Zellkultursystem entwickelt, mit dem Ziel der Co-Inkubation des Thrombozytenkonzentrats und humaner Fibroblasten. Die räumliche Trennung der korpuskulären Blutbestandteile und der adhärent wachsenden Fibroblasten bei simultan möglicher Diffusion von Wachstumsfaktoren stellt das Grundprinzip des

Zellkultursystems dar. Verschiedene Werkstoff- und Fertigungskombinationen werden dabei hinsichtlich ihrer Biokompatibilität sowie Diffusionseigenschaften analysiert. Zu Evaluationszwecken werden abschließend Co-Inkubationsversuche durchgeführt.

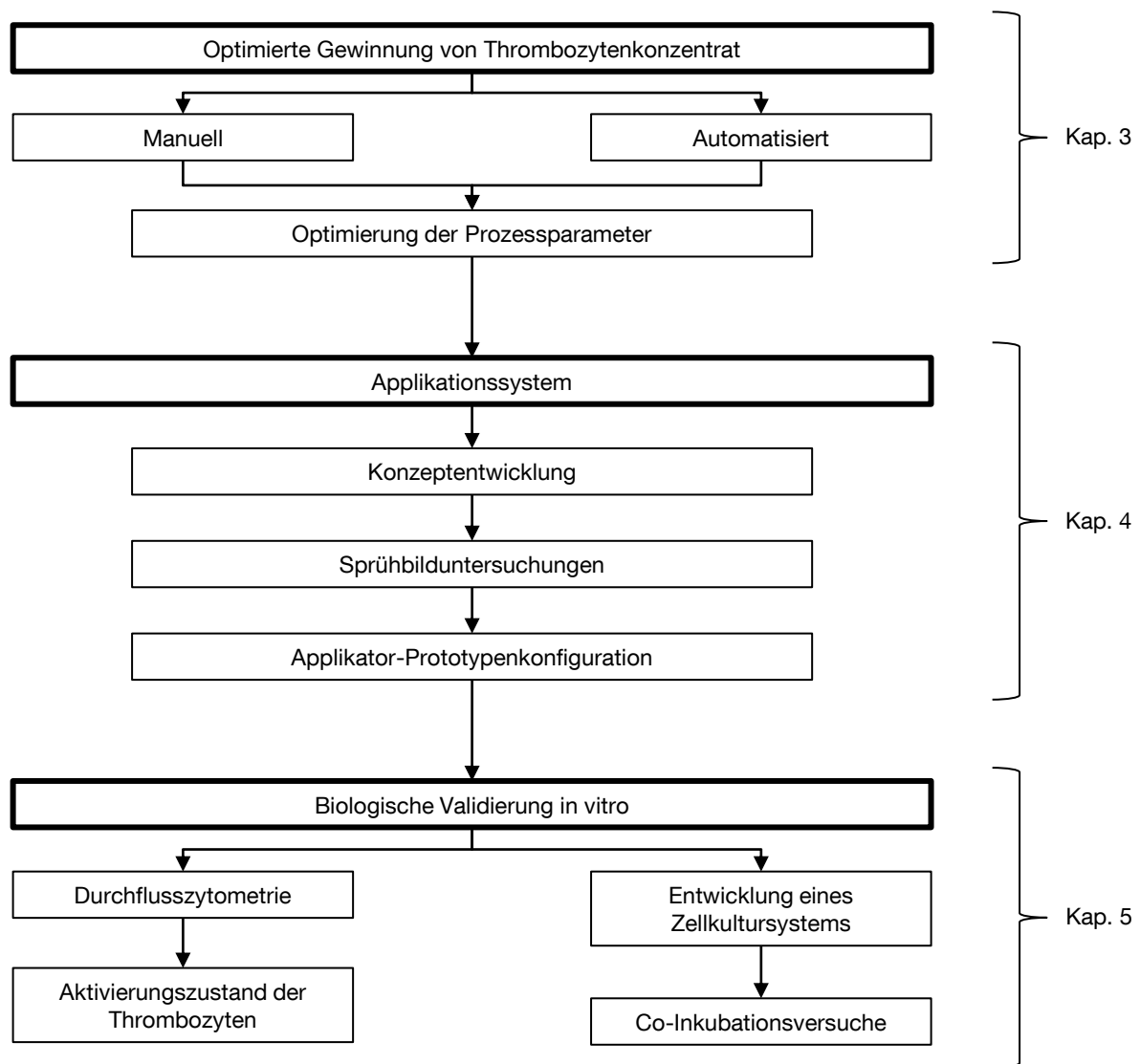


Abb. 1.1: **Thematischer Überblick**

Kapitel drei umfasst die Optimierung der Prozesstechnik zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat. Zur Wundaufrtragung der Thrombozytenpräparate wird ein Applikator-Prototyp entwickelt (Kap.4) und anschließend die Wirksamkeit biologisch evaluiert (Kap.5). Insbesondere wird der Einfluss der Prozessschritte auf den Aktivierungszustand der Thrombozyten, sowie die Wirkung des Konzentrats auf das Proliferationsverhalten humaner Fibroblasten während der Co-Inkubation in einem neu entwickelten Zellkultursystem betrachtet.

2 Medizinische und technische Grundlagen

2.1 Physiologie der Wundheilung

Eine Wunde ist definiert als eine „Unterbrechung des Zusammenhangs von Körpergewebe mit oder ohne Substanzverlust, die durch mechanische Verletzung oder physikalisch bedingte Zellschädigung verursacht wird“ [114]. Anhand der Entstehungsart der Wunde werden drei Typen unterschieden: traumatische Wunden, durch äußere Gewalteinwirkung hervorgerufen, iatrogene Wunden, die bewusst im Zuge von operativen oder diagnostischen Eingriffen verursacht werden, sowie chronische Wunden. Letztere entstehen aus akuten Wunden, welche auch nach vier Wochen keine oder eine unzureichende Heilungstendenz aufweisen [83].

Unabhängig vom Schweregrad der Verletzung verläuft die physiologische Wundheilung grundsätzlich in drei sich teilweise überlappenden Phasen [14, 24, 138] (vgl. Abb. 2.1). Die Dauer der Wundheilung hängt vom Schweregrad der Verletzung ab. Das Auftreten von Wundheilungsstörungen kann die einzelnen Phasen stark verlängern oder sogar zum Stagnieren des Wundheilungsprozesses führen (siehe Kap. 2.3.1).

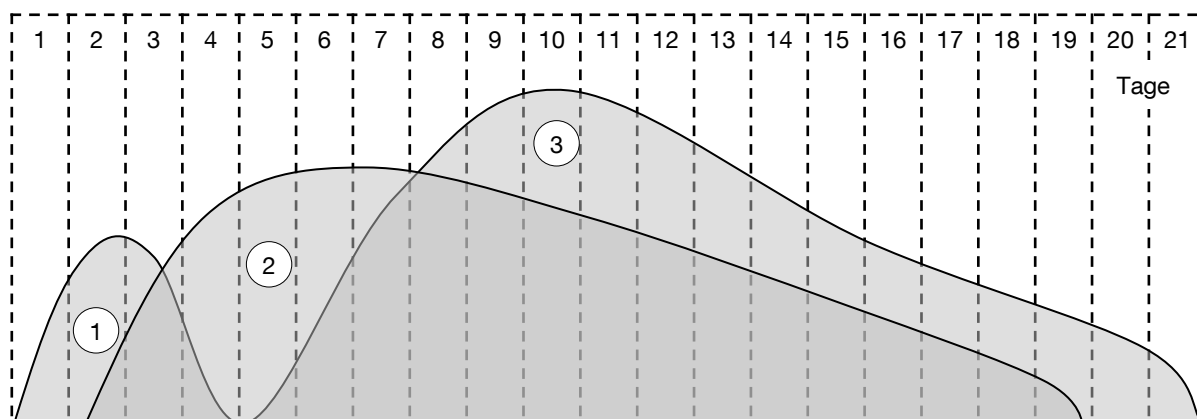


Abb. 2.1 **Zeitlicher Verlauf der Wundheilungsphasen**

Die Entzündungsphase (1) dient der Wundreinigung, Blutgerinnung und Infektabwehr. Während der Proliferationsphase (2) wandern Fibroblasten in die Wunde ein und es bildet sich Granulationsgewebe. Die reparative Phase (3) ist gekennzeichnet durch das Annähern der Wundränder sowie der Bildung von neuem Epithelgewebe. [modifiziert nach 15]

Zu Beginn steht die Inflammations- oder Entzündungsphase. Diese wird teilweise noch unterteilt in exsudative und resorptive Phase [70, 72, 83]. Die Einwanderung von Thrombozyten und die Bildung eines Pfropfs aus Fibrin und Thrombozyten induzieren die primäre Hämostase. Durch sezernierte Mediatoren der aktivierten Thrombozyten wandern

anschließend Fibroblasten und Entzündungszellen in das Wundgebiet ein. Zelltrümmer und Bakterien sowie nekrotische Wundränder und Fibringerinnsel werden von Granulozyten und Makrophagen durch phagozytäre Vorgänge abgebaut. [14, 24, 83, 138, 148]

Die zweite Phase, die Granulations- oder Proliferationsphase, ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Fibroblasten-Einwanderung in den Wundraum, was die Produktion extrazellulärer Matrix hervorruft. Diese bildet zusammen mit den Bindegewebszellen das Granulationsgewebe [72], welches schrittweise das Fibrinnetz ersetzt und so die Reißfestigkeit des Gewebes erhöht. Zudem wird die Neoangiogenese, die Bildung neuer Kapillaren, durch die Einwanderung von Angioblasten in das Wundgebiet induziert. Gleichzeitig startet die Reepithelisierung des Wundgebiets durch epidermale Zellen wie Keratinozyten [14, 72, 83].

Den Abschluss der Wundheilung bildet die sogenannte regenerative oder reparative Phase. Diese beginnt bereits parallel zur Proliferationsphase, kann jedoch bis zu einem Jahr andauern. Es kommt zur vermehrten Bildung von Kollagen und der Ausreifung des Typ-III-Kollagens zum stabileren Typ-I-Kollagen. Die Ausdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten führt zur Wundkontraktion, wobei sich die Wundränder einander annähern und das Wundvolumen verkleinert wird [9, 72, 83, 135, 148].

Neben den Entstehungsarten einer Wunde werden auch die Heilungsvorgänge typisiert. Dabei wird zwischen primärer und sekundärer Wundheilung unterschieden, jedoch sind beide Heilungstypen als qualitativ identisch anzusehen. Differenziert werden sie anhand der Heilungsdauer und der Ausprägung der unterschiedlichen Gewebereaktionen [83]. Insbesondere beim Ausmaß der Bindegewebsneubildung im Zuge der Defektfüllung unterscheidet sich die primäre von der sekundären Wundheilung [14]. Chirurgisch verschlossene, komplikationslos heilende Wunden [83], sowie Defekte mit glatten, nicht klaffenden Wundrändern und einem gut durchbluteten Wundgebiet [14] sind der primären Wundheilung zuzuordnen. Die Wundheilungsphasen verlaufen sehr kurz und stark überlappend. Die Epithelialisierung ist hier schon nach etwa zwei Tagen zu erkennen. [83] Besteht ein hoher Kontaminationsgrad der Wunde, zerklüftete Wundränder, große Weichteildefekte oder systemische Erkrankungen (z.B. Durchblutungsstörungen) kann kein Primärverschluss vorgenommen werden. Im Zuge einer offenen Wundheilung muss sich vom Wundgrund ausgehend Granulationsgewebe bilden und den Defekt auffüllen. Erst danach kann die abschließende Reepithelisierung stattfinden. Der Heilungsprozess nimmt im Vergleich zu primär heilenden Wunden eine deutlich längere Zeit in Anspruch und hinterlässt häufig ausgeprägte Narben [14, 83, 162].

2.2 Thrombozyten

Alle Wundheilungsphasen, insbesondere die Inflammations- und die Proliferationsphase, werden maßgeblich durch Thrombozyten beeinflusst und gesteuert. Zunächst durch die physische Anwesenheit der Thrombozyten bei der primären Hämostase, später durch die von den Blutplättchen sezernierten Mediatoren [83].

Zur Verdeutlichung der essenziellen Rolle der Thrombozyten bei der Wundheilung werden Struktur der Thrombozyten, sowie ihre Funktion in der primären und sekundären Hämostase im Folgenden näher erläutert.

Thrombozytenstruktur

Thrombozyten werden im Knochenmark durch Membranabschnürungen aus Megakaryozyten gebildet [9]. Sie besitzen keinen Zellkern und haben im peripheren Blutstrom eine physiologische Lebensdauer von durchschnittlich 7-10 Tagen [49, 110]. Im nicht aktivierten Zustand liegen Blutplättchen in einer typischen diskoiden Form vor mit einem Durchmesser von 2-5 μm und einer Dicke von 0,5 μm [164]. Die Ultrastruktur der Thrombozyten kann in vier morphologische Zonen eingeteilt werden (vgl. Abb. 2.2): Die periphere Zone, die Strukturzone, die Zone der Organellen und das Membransystem [47, 164].

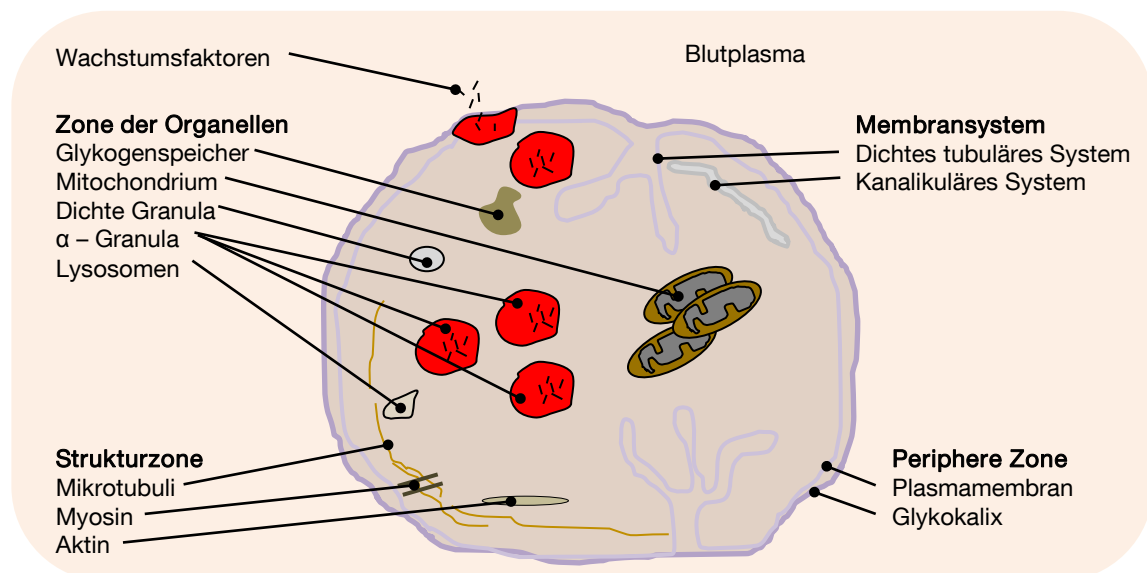


Abb. 2.2 **Schematischer Aufbau der Ultrastruktur eines Thrombozyten**
Eingeteilt in die vier morphologischen Zonen: Periphere Zone, Strukturzone, Zone der Organellen und Membransystem. Die α -Granula enthalten eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren. Diese werden im Falle einer Thrombozytenaktivierung in das umgebende Blutplasma sezerniert [modifiziert nach 47].

Die periphere Zone besteht aus der Plasmamembran, die typischerweise aus einer polarisierten Lipiddoppelschicht aufgebaut ist. In die Membran integrierte Proteine fungieren als Rezeptoren für Agonisten wie Adenosindiphosphat (ADP) und Thrombin oder für Adhäsionsproteine wie Fibrinogen [47]. Die Strukturzone besteht aus Mikrotubuli und weiteren Strukturproteinen, die zusammen das Zytoskelett der Blutplättchen formen. Dieses kontraktile System, das größtenteils aus Actin besteht, ist bei der Formveränderung der Thrombozyten nach erfolgter Aktivierung von großer Bedeutung [47, 164]. Im Zytoplasma befindet sich die Zone der Organellen. Bestandteil dieser Zone sind Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei unterschiedliche Speichergranula. Die α -Granula enthalten vasokonstriktorische Substanzen wie Serotonin, Enzyme, adhäsionsfördernde Proteine (z.B. Fibronectin), Blutgerinnungsfaktoren und Wachstumsfaktoren, auf die später noch genauer eingegangen werden soll. Die dichten Granula enthalten Substanzen zur Förderung der Thrombozytenaggregation, wie z.B. Calcium (Ca^{2+}) und ADP. In den Lysosomen finden sich hydrolytische Enzyme wie Elastasen und Kollagenasen [9, 47, 110]. Die vierte morphologische Zone stellt das Membransystem dar. Hierzu gehören das offene kanalikuläre System und das dichte tubuläre System. Das dichte tubuläre System ist einer der Hauptspeicher von Ca^{2+} , das eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung spielt [47, 164].

Primäre Hämostase

Bei einer Gefäßverletzung werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, an welche ein im Blut gelöstes Protein, der von-Willebrand-Faktor (vWF), andocken kann. Über den Membranrezeptor GP Ib-V-IX stellen anschließend die Thrombozyten eine Bindung zu diesem Adapterprotein her. Mit der Adhäsion der Thrombozyten an den Wundgrund startet der Aktivierungsprozess, welcher durch Sekretion, Formveränderung (engl.: shape change) und Aggregation gekennzeichnet ist [9].

Die Sekretion von Agonisten wie ADP, Thromboxan und Serotonin aus adhären Thrombozyten dient hierbei der Anlockung weiterer Thrombozyten für die Bildung des primären Wundverschlusses, dem Thrombozytenpfropf. Adhären Thrombozyten durchlaufen anschließend eine Morphologieveränderung aufgrund eines Überschusses an Ca^{2+} und eines hierdurch induzierten Überganges des globulären Aktins hin zu langgestrecktem fibrillärem Aktin [9, 47, 60]. Die Formwandlung beinhaltet die Ausbildung von Pseudopodien, was zu einer Oberflächenvergrößerung und anschließender Verzahnung der Blutplättchen führt. Des Weiteren wird auf der Membranoberfläche der Thrombozyten CD62P (P-Selektin) präsentiert, an das weitere Thrombozyten binden können [47]. Zeitgleich mit der Formwandlung wird der Inhalt aus den α -Granula der Thrombozyten ausgeschüttet. Die wichtigsten von Thrombozyten sezernierten Wachstumsfaktoren und ihre Wirkung sind in Tab. 2.1 aufgeführt:

Wachstumsfaktor	Wirkung
Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)	Stimulation der Proliferation mesenchymaler und hämatopoetischer Zellen [74] sowie von Fibroblasten [13, 109]. Chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen [123] und glatte Muskelzellen [74].
Transforming-Growth-Factor β (TGF- β)	Chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen, sowie mitogene Wirkung auf Fibroblasten [74].
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen, fördert die Angiogenese [13].
Fibroblast Growth Factors (FGF)	Chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten, mitogener Effekt auf glatte Muskelzellen, Endothelzellen [9, 13], Keratinozyten und Osteoblasten [74].
Epidermal Growth Factor (EGF)	Wirkt mitogen auf Fibroblasten, chemotaktisch auf Endothelzellen und stimuliert die Matrixsynthese durch Keratinozyten [74].

Tab. 2.1 **Die wichtigsten thrombozytären Wachstumsfaktoren und ihre Wirkung auf Zellen und Wundheilungsvorgänge**

Mit den Wachstumsfaktoren werden auch Fibrinogen (Faktor I) sowie die Gerinnungsfaktoren V und VIII (fördern die lokale Thrombinbildung) sekretiert, welche bei der lokalen Gerinnungskaskade eine entscheidende Rolle spielen [9]. In vitro kann die freigesetzte Menge an Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β als Maß für die Thrombozytenaktivierung angesehen werden [34, 42]. Eine anderer Ansatz ist die durchflusszytometrische Quantifizierung des Oberflächenmarkers CD62P [124, 133].

Die Aggregation, also die Zusammenlagerung der Thrombozyten, ist der dritte und letzte Schritt der Aktivierungskaskade und resultiert in der Bildung eines Thrombozytenthrombus. Die Bildung des sogenannten weißen Thrombus ist in der Regel innerhalb von 2-4 Minuten abgeschlossen und gewährleistet einen ersten Wundverschluss [9].

Sekundäre Hämostase

Der erste, nicht sehr stabile Thrombozytenpfropf, wird in der sekundären Hämostase zu einem irreversiblen Verschluss umgewandelt [9].

Während der Aktivierungsphase wird Prothrombin in seine aktive Form Thrombin umgewandelt. Die Aktivität der Prothrombinase, die für den Umwandlungsvorgang ausschlaggebend ist, wird hierbei maßgeblich durch Ca^{2+} begünstigt [9, 47]. In der anschließenden Koagulationsphase spaltet das enzymatisch aktive Thrombin aus Fibrinogen niedermolekulare Peptide ab, wodurch Fibrinmonomere entstehen. Diese lagern sich zu einem Fibrinpolymer zusammen und durch den Einfluss des Faktors XIII entstehen stabile, kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Monomeren [47, 117]. Die Retraktionsphase beendet die sekundäre Hämostase. Die Fibrinfäden schließen Thrombozyten sowie Erythrozyten ein und durch die kontrahierenden Thrombozyten zieht sich der Thrombus auf einen Bruchteil seines ursprünglichen Volumens zusammen. Dies führt schließlich zu einer erhöhten mechanischen Stabilität des Wundverschlusses [9, 72, 117].

2.3 Pathophysiologie und Wundtherapie

2.3.1 Wundheilungsstörungen

Treten während einer Wundheilungsphase allgemeine oder lokale Störfaktoren auf, so verzögert sich die Wundheilung oder wird sogar dauerhaft gestört [83, 122, 163]. Zu den allgemeinen Störeinflüssen gehören Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus), sowie der Ernährungszustand, das Lebensalter und der Immunstatus des Patienten. Zudem haben Gefäßerkrankungen wie beispielsweise arterielle Durchblutungsstörungen einen negativen Einfluss auf den Wundheilungsverlauf [83, 138]. Durch diese systemischen Grunderkrankungen wird das Wundmilieu dahingehend verändert, dass einige Wachstumsfaktoren in reduzierter Anzahl und zum Teil biologisch inaktiv im Wundsekret vorliegen [101, 138].

Lokale Störfaktoren wie im Wundgebiet verbliebene Fremdkörper, die Lokalisation der Wunde [83] oder eine hochgradige Weichteilverletzung können zu lokalen Durchblutungsstörungen und dadurch zur verzögerten Wundheilung beitragen [162]. Iatrogene Ursachen für Wundheilungsstörungen sind eine unzureichende Operationstechnik und mangelhafte Weichteilbehandlung mit unter Zugspannung stehenden Nähten, Quetschungen der Wundränder oder Schädigung von Blutgefäßen [83, 162].

2.3.2 Wundversorgung

Eine Wunde wird, bevor diese medizinisch versorgt wird, anhand ihrer Entstehungsart, der Lokalisation und der Ausdehnung beurteilt und klassifiziert. Zudem werden der Allgemeinzustand des Patienten untersucht und eventuelle Begleitverletzungen oder -erkrankungen dokumentiert. Kann die Wunde nicht primär verschlossen werden, stehen unterschiedliche Behandlungsmethoden zur Verfügung. Häufig muss vorab ein chirurgisch durchgeführtes Wunddébridement (Wundreinigung) durchgeführt werden. [83]

Das Prinzip der feuchten Wundbehandlung wird nach klinischer Auffassung als Standard für alle sekundär heilenden Wunden angewendet [14, 138]. Hierbei eingesetzte Verbandmaterialien und Therapiesysteme sollten folgende Anforderungen erfüllen [14]:

- Gewährleistung eines feuchten Wundmilieus,
- Entfernung von überschüssigem Wundsekret und toxischen Bestandteilen,
- Gewährleistung des Gasaustauschs,
- Wärmeisolation,
- Abwehr- bzw. Barrierefunktion für Mikroorganismen,
- Atraumatischer Verbandwechsel und -abnahme,
- Vermeidung von Irritationen und allergischen Reaktionen.

Im Gegensatz zu passiven Wundauflagen (traditionelle Kompressen aus Baumwoll-Mull und Vliesstoffen) ermöglicht der Einsatz von Hydrogelen, Hydrokolloiden und Schaumstrukturen die Bereitstellung von interaktiven Verbandmaterialien wie z.B. Superabsorbent, die ein konstant feuchtes Wundmilieu schaffen [14, 51, 83]. Ergänzend werden bei entsprechender Indikation Therapiekonzepte wie die Vakuumtherapie angewendet, bei der überflüssiges Exsudat und toxische Stoffe aus der Wunde entfernt und die Zellproliferation durch die mechanische Stimulation angeregt werden [72, 153].

Aktive oder bio-aktive Wundauflagen bilden die dritte Gruppe der Verbandmaterialien. Hierzu zählen sowohl autologe Haut und autologe Keratinozytenkulturen als auch Wundverbände, welche mit Wachstumsfaktoren imprägniert sind [83]. Neben rekombinanten Wachstumsfaktoren [40, 149] kommen auch hämatogene, autologe Wachstumsfaktoren zum Einsatz, was die Gefahr einer Immunreaktion reduziert [66, 92, 95]. Zudem stimulieren autologe Wachstumsfaktorpräparate das Zellwachstum stärker als eine Wachstumsfaktorlösung aus rekombinantem TGF- β (rhTGF- β) und PDGF-AB (rhPDGF-AB) [59].

2.4 Gewinnung autologer Thrombozytenkonzentrate

Thrombozytenkonzentrate, bestehend aus Thrombozyten in einem Restvolumen Blutplasma, werden durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen [96]. Die Blutbestandteile werden dabei aufgrund der Dichteunterschiede in separate Lagen getrennt (spezifisches Gewicht: Erythrozyten: $1,09 \text{ N/m}^3$; Buffy Coat (BC): $1,03 \text{ N/m}^3$; Blutplasma: $1,03 \text{ N/m}^3$) [111]. Die Aufkonzentrierung erfolgt durch einen ein- oder zweistufigen Zentrifugationsprozess (vgl. Abb. 2.3).

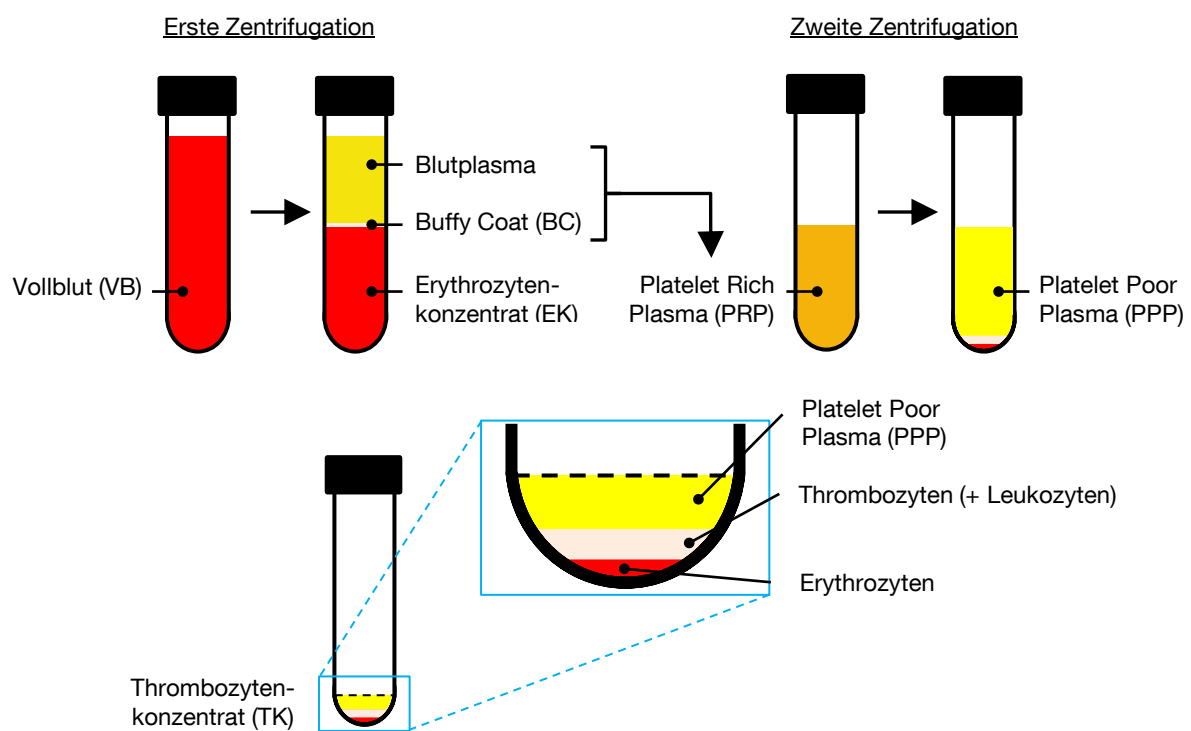


Abb. 2.3 Schematischer Ablauf des Zentrifugationsprozesses

Vollblut wird durch die Zentrifugation in Erythrozytenkonzentrat (EK), Buffy Coat (BC) und Blutplasma aufgetrennt. Der Buffy Coat ist eine dünne, weißliche Schicht zwischen EK und Blutplasma und beinhaltet Thrombozyten und Leukozyten. Zusammen mit dem Blutplasma wird der BC in ein neues Röhrchen überführt. Das so entstandene Platelet Rich Plasma (PRP), welches eine im Vergleich zum Vollblut deutlich erhöhte Thrombozytenkonzentration aufweist [5], wird anschließend erneut zentrifugiert (Aufkonzentration). Der Überstand, das Platelet Poor Plasma (PPP) enthält $< 1 \cdot 10^4$ Thrombozyten pro μl und wird bis auf ein kleines Restvolumen verworfen. Die aufkonzentrierten Thrombozyten werden im verbliebenen Restvolumen resuspendiert. Das so gewonnene Thrombozytenkonzentrat (TK) kann anschließend verwendet werden.

Das Vollblut wird durch die erste Zentrifugation in drei Schichten getrennt. Erythrozyten lagern sich basal als Erythrozytenkonzentrat (EK) ab. Direkt darüber befindet sich der sogenannte Buffy Coat (BC), eine dünne, weißliche Schicht bestehend aus Thrombozyten und Leukozyten. Die oberste Schicht, das Blutplasma und der Buffy Coat, wird anschließend manuell oder automatisiert vom EK getrennt und bildet so das plättchenreiche Plasma (engl.: platelet rich plasma, PRP). Dieses wird entweder direkt angewandt oder im Anschluss für eine weitere Aufkonzentrierung ein zweites Mal zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt resultiert in einem Thrombozytenpellet am Gefäßboden und dem darüberliegenden plättchenarmen Plasma (engl.: platelet poor plasma, PPP). Lediglich der Thrombozytenanteil wird in einem kleinen Volumen an PPP resuspendiert und ist als Thrombozytenkonzentrat (TK) anwendbar.

Der Aufkonzentrierungsprozess kann mit einer diskontinuierlich arbeitenden Tischzentrifuge oder kontinuierlich durch Apherese erfolgen [141]. Bei dieser, meist in Blutbanken für die Herstellung allogener Konzentrate angewandten Technik [17], werden nicht benötigte Blutbestandteile sofort wieder dem Patientenkreislauf zugeführt, wodurch insgesamt größere Volumina an Thrombozytenkonzentrat generiert werden können. Nachteilig ist dabei der erhöhte Zeitaufwand von 60-90 Minuten und damit die erhöhte Belastung des Patienten [114, 137]. Kleinere Mengen von autologem Thrombozytenkonzentrat werden oft „on demand“, also direkt im Operationssaal, in der Arztpraxis oder im Krankenzimmer mit einer Tischzentrifuge hergestellt.

Als Antigerinnungsmittel werden für die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten häufig Citrat-Präparate verwendet. Diese finden unter anderem auch in Blutkonserven [44] und in der Gerinnungsdiagnostik zur Untersuchung der Blutsenkungsgeschwindigkeit in vitro Anwendung [36]. Citrat-Moleküle bilden mit Calciumionen des Blutes einen Chelatkomplex [67], wodurch diese für die Blutgerinnungskaskade nicht mehr zur Verfügung stehen und so die Gerinnungsfähigkeit herabgesetzt wird.

Weitere in dieser Arbeit verwendete Antikoagulantien sind Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Heparin. Die gerinnungshemmende Wirkung von EDTA basiert, vergleichbar mit der Wirkungsweise des Citrats, auf der Komplexbildung von Ca^{2+} aus dem Blut [85].

Das Glucosaminoglykan Heparin wird in vivo zur Thromboseprophylaxe und -therapie sowie für die Blutgasanalytik in vitro eingesetzt [36, 85]. Heparin bindet an das Antithrombin III wodurch dessen Aktivität in vitro bis zu 1000-fach erhöht wird. Antithrombin hemmt wiederum die Wirkung von Thrombin, welches im Zuge der Blutgerinnung Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Zudem wird zusätzlich der Faktor Xa gehemmt, welcher die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin induziert. Hierdurch kommt es zu einer Verzögerung der Gerinnungskaskade des Blutes [18, 44, 80, 85].

2.5 Systeme zur Herstellung von Thrombozytenkonzentrat

Die Vielzahl an kommerziell erhältlichen Systemen für die Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten unterscheidet sich vorwiegend im Automatisierungsgrad, dem benötigten Vollblutvolumen, den Prozessparametern sowie der Thrombozyten- und Wachstumsfaktorausbeute im Endprodukt [20, 39, 170]. Beispielhaft sind einzelne Systeme und deren Merkmale in Tab. 2.2 aufgeführt (eine ausführliche Tabelle befindet sich in Anhang F).

Produktname	Zentrifugationsparameter	Thrombozytenausbeute	Trennvorgang
PRP-Kit	2400 U/min x 10 min 3600 U/min x 15 min	~20 % [159]	Manuell / offen
GPS® III-Gravitational Platalet Separation System	1100 g x 15 min	22,6 % [20]-43 % [152]	Manuell / geschlossen
PCCS-Platelet Concentrate Collection System	3000 U/min x 3,45 min 3000 U/min x 13 min	67 % [79]	Manuell / geschlossen
Magellan® Autologous Platelet Separator	1200 g x 17 min	65,5 % [20]	Automatisiert
Vivostat® System		~17 % [79, 152] ~17 %	Automatisiert
Angel-PRP System	4000 U/min x 11 min 3000 U/min x 2 min	47 % [15]	Automatisiert

Tab. 2.2 **Auswahl kommerziell erhältlicher Systeme zur Herstellung von Thrombozytenpräparaten**

Die Thrombozytenausbeute bezieht sich jeweils auf das eingesetzte Vollblut.

Die Komplexität der in Tab. 2.2 aufgeführten Systeme reicht von einfachen, kommerziell erhältlichen Blutabnehmeröhrchen (PRP-Kit), bis zum speziell für die Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat entwickelten Stand-Alone-System (Vivostat®-System). Dieses ist mobil zwischen den Operationssälen verfahrbar und kann ausschließlich mit speziellem Zubehör betrieben werden. Der Automatisierungsgrad spiegelt sich meist im Preis der Produkte wider. Bei einer Beurteilung muss der hohe Präparationssaufwand günstiger Systeme, verursacht durch viele manuelle und im unsterilen Zustand durchgeführte Zubereitungsschritte gegen ein minimiertes Kontaminationsrisiko und hohe Reproduzier-

barkeit der automatisierten und damit kostenintensiveren Systeme abgewogen werden. In zahlreichen Studien wurden die unterschiedlichen Herstellungsmethoden und -systeme im Hinblick auf die Thrombozyten-/Wachstumsfaktorausbeute sowie das Handling, insbesondere die Einhaltung der Sterilbarriere während des Herstellungsprozesses, verglichen [15, 20, 38, 39, 43, 79, 154–156, 158–161, 170].

Eine allgemein gültige Aussage zum klinischen Einsatz ist aufgrund der Vielfalt an Herstellungs- und Validierungsmethoden nicht möglich, dennoch kann die Angabe zu benötigtem Vollblutvolumen, Effizienz der Thrombozytenausbeute sowie Wachstumsfaktorgehalt den Klinikern als Entscheidungshilfe bei der Systemwahl für unterschiedliche Indikationen, wie Wundheilungsförderung oder Knochenaufbau dienen [20].

2.6 Applikation von Thrombozytenkonzentrat

Systeme zur Applikation von Thrombozytenkonzentraten sind derzeit nur wenige am Markt erhältlich. Bei der Mehrheit der Systeme liegt das Endprodukt nach dem Herstellungsprozess in einer herkömmlichen Spritze vor [154] und wird perkutan injiziert bzw. aufgetragen [97, 127, 150]. Um größere, offene Wundflächen mit Thrombozytenkonzentrat zu behandeln, stehen spezielle Applikatoren zur Verfügung, die eine gleichmäßige, flächige Verteilung des Konzentrats ermöglichen (vgl. Abb. 2.4).

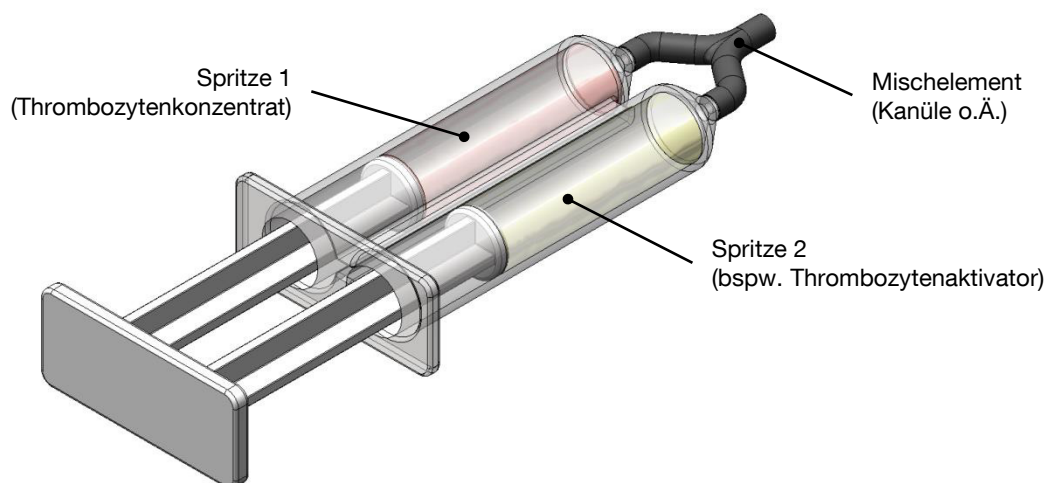


Abb. 2.4 **Schematische Darstellung eines Doppelspritzen-Applikators**
Die simultane Applikation von zwei unterschiedlichen Komponenten ist durch die Verbindung der Spritzenkolben möglich. Die Durchmischung findet während der Applikation im Mischkopf (z.B. Schneckenmischer, Kanüle o.ä.) statt.

Das SmartPReP-, das GPS-II-System und das RegenPRP-Kit sind jeweils mit dualen Spritzenapplikatoren kombinierbar, die das simultane Auftragen von Thrombozytenkonzentrat und einem Thrombozytenaktivator aus separierten Spritzen erlauben. Die Durchmischung wird hierbei durch den an der Spritze angebrachten Mischkopf (z.B. Kanüle oder Schneckenmischer) erzielt. Hauptanwendung solcher dualen Spritzensysteme stellt unter anderem die Applikation von Fibrinkleber dar [90]. Die manuelle Bedienung des Kolbens, welche bei dieser Darreichungsform die Applikationsgeschwindigkeit bestimmt, erschwert jedoch die gleichmäßige Verteilung kleinerer Volumina an TK.

Um eine gleichmäßige Auftragung zu gewährleisten, sind Applikationssysteme mit automatisierter Verdüsung der Komponenten mittels Druckluft erhältlich (z.B. Vivostat®-System, Vivostat®, Dänemark). Hierbei wird Druckluft durch einen externen, mobilen Kompressor erzeugt und über ein mehrlumiges Schlauchsystem an den Handapplikator geführt. Auch das Thrombozytenkonzentrat wird über das Schlauchsystem an das Handstück geleitet und dort mit der Druckluft zusammengeführt, gemischt und anschließend auf die Wundfläche versprüht. Der Sprühvorgang kann mit drei unterschiedlichen Geschwindigkeiten (0,7-1,4 ml/min) betrieben werden. [46]

Diese Stand-Alone-Applikationseinheiten ermöglichen eine reproduzierbare und gleichmäßige Verteilung von Thrombozytenkonzentrat [33] auf Wundflächen von bis zu 80 cm², jedoch behindern die hierfür benötigte Kompressoreinheit sowie die Verbindungsschläuche und -kabel das Operationsumfeld in erheblichem Maße. Zudem muss der Übergang von der unsterilen Drucklufteinheit hin zum sterilen Operateur durch aufwändige Handlungen bewerkstelligt werden.

Zerstäuben von Flüssigkeiten

Durch die Übertragung von Energie auf eine Flüssigkeit kann diese desintegriert und dadurch zerstäubt werden [11, 121]. Die Einteilung der Zerstäuber bzw. der Zerstäubertechnik kann wie folgt vorgenommen werden: Einstoff-Düsen, Zweistoff-Düsen, mechanische Zerstäuber-Düsen und Sonderformen.

Für die Entwicklung des TK-Applikators werden nur Ein- und Zweistoff-Düsen näher betrachtet. Bei Einstoff-Düsen wird die nötige Energie zur Zerstäubung des Fluides durch das direkte Aufbringen von Druck zur Verfügung gestellt. Hierdurch wird die Flüssigkeit durch eine Düse in die Umgebung transportiert und je nach Geometrie der verwendeten Düse entsteht ein Fluidstrahl oder eine Lamelle [11]. Die Desintegration des Applikats wird durch die turbulente Zerstäubung an der Umgebungsluft ausgelöst [121].

Bei der Zerstäubung von Flüssigkeit mit einer Zweistoff-Düse wird ein an den Einsatzort angepasstes Treibfluid verwendet. Dieses durchströmt die Düse und stellt die zur Zerstäubung notwendige Energie zur Verfügung, wobei das Applikat entweder über Gravitations- oder Druckkräfte dem Zerstäuber zugeführt oder durch einen erzeugten Unterdruck angesaugt wird.

Folgende Prinzipien zur Durchmischung von Flüssigkeiten und Treibfluiden können bei Zweistoff-Düsen unterschieden werden: Das Venturi-Prinzip, die äußere Mischung und der Parfüm-Zerstäuber, welcher eine Sonderform der äußeren Mischung darstellt [167]. Alle drei Düsentypen können durch die geometrische Auslegung als selbstansaugende Düse betrieben werden. Das Treibfluid wird dabei durch einen Kanal mit Querschnittsverjüngung geleitet, was zu einer Beschleunigung des Gases (vgl. (Gl. 2.1) mit gleichzeitigem Druckabfall (Gl. 2.2) führt.

$$\dot{m} = \rho \cdot v \cdot A = konst. \quad (\text{Gl. 2.1})$$

$$\frac{v^2}{2} + \frac{p}{\rho} = konst. \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$$\dot{m} = \text{Massenstrom} \left[\frac{kg}{s} \right]$$

$$\rho = \text{Dichte} \left[\frac{g}{cm^3} \right]$$

$$v = \text{Strömungsgeschwindigkeit} \left[\frac{m}{s} \right]$$

$$A = \text{Querschnittsfläche} [m^2]$$

$$p = \text{Druck} [bar]$$

Bei einer Venturi-Düse (vgl. Abb. 2.5) mündet der Flüssigkeitskanal an der Querschnittsverjüngung in den Treibgaskanal. Durch den entstehenden Unterdruck wird das Applikat angesaugt und mit dem Treibgas durchmischt. An der Austrittsöffnung kommt es anschließend zur Verdüsung der Flüssigkeit in die Umgebung.

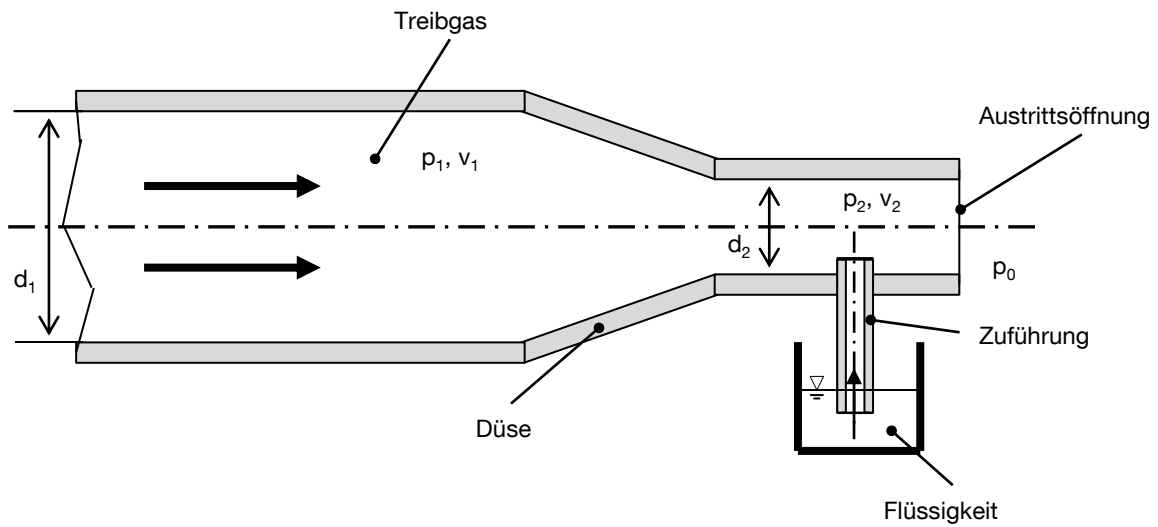


Abb. 2.5 **Prinzipskizze einer Venturi-Düse**

Das Treibgas wird durch die Querschnittsverkleinerung ($d_2 < d_1$) beschleunigt ($v_2 > v_1$), was in einem Druckabfall resultiert ($p_2 < p_1$). Die Flüssigkeit wird hierdurch angesaugt, vermischt sich mit dem Treibgas und wird als Aerosol versprüht.

Bei einer Düse mit äußerer Mischung (vgl. Abb. 2.6) findet das Ansaugen und die Vermengung von Flüssigkeit und Treibgas direkt nach deren Austritt in die Umgebung statt. Der Flüssigkeitskanal ist bei diesem Düsentyp koaxial zum Treibmittelkanal angeordnet.

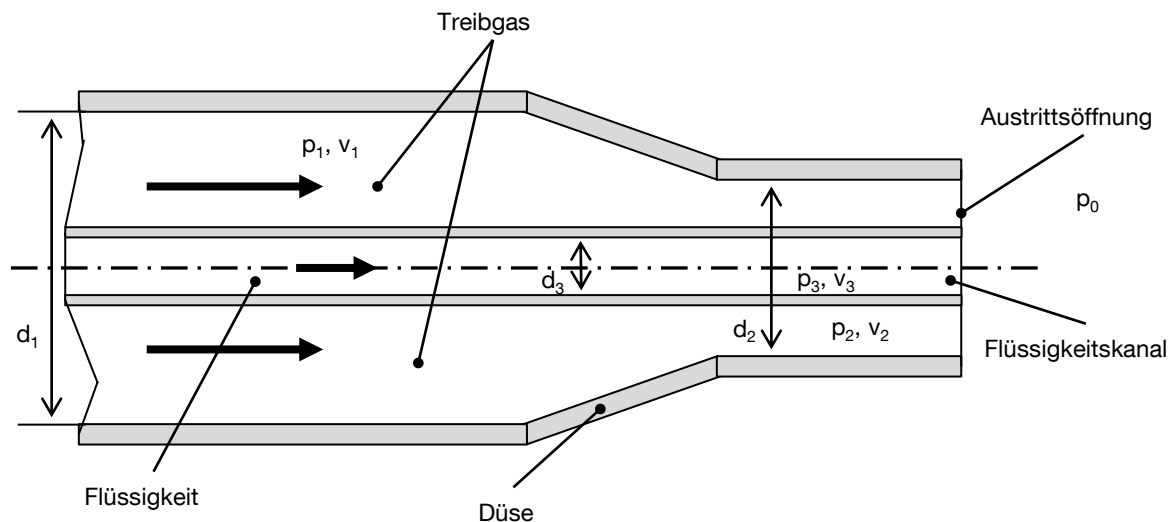


Abb. 2.6 **Prinzipskizze einer Düse mit äußerer Mischung**

Das im äußeren Mantel strömende Treibgas wird an der Querschnittsverengung beschleunigt ($v_2 > v_1$), wodurch an der Austrittsöffnung ein Unterdruck entsteht ($p_2 < p_1$, p_3). Die Flüssigkeit wird angesaugt und bildet am Austritt des Flüssigkeitskanals eine Lamelle, welche durch die Turbulenzen am Düsenaustritt zu Tröpfchen desintegriert wird.

Das dritte Düsenprinzip, der Parfüm-Zerstäuber (vgl. Abb. 2.7), stellt eine Abwandlung des Typs äußere Mischung dar.

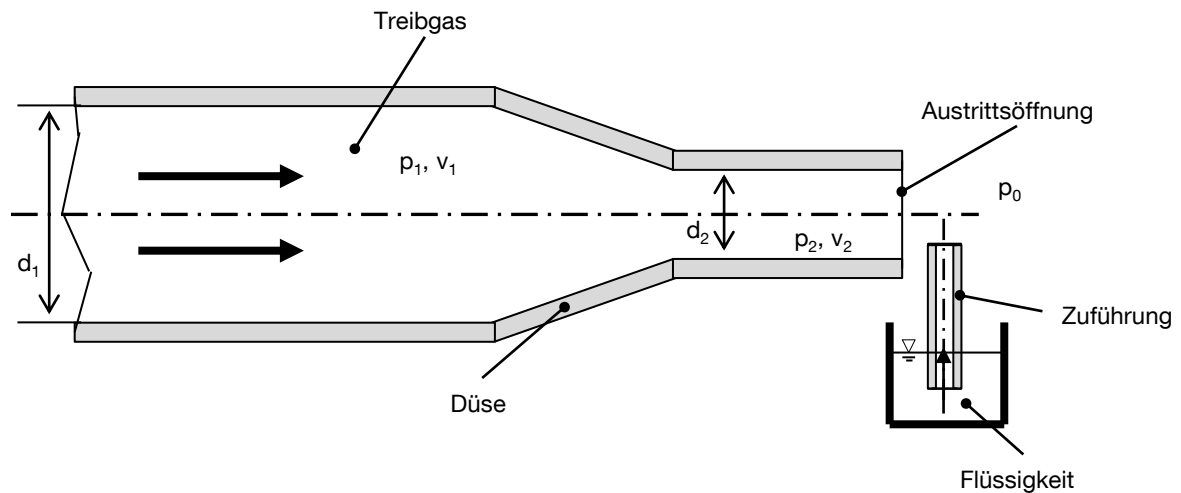


Abb. 2.7 **Prinzipskizze eines Parfüm-Zerstäubers**

Durch die horizontale Beschleunigung des Treibgases ($v_2 > v_1$), kann die Flüssigkeit am Düsenende durch den entstehenden Unterdruck ($p_2 < p_1, p_0$) vertikal angesaugt werden.

Die Besonderheit liegt hier in der Anordnung der Komponenten. Der Applikatkanal mündet im Austrittsstrahl des Gases mit einem gewissen Abstand zur Austrittsöffnung. Das Treibgas wird ebenfalls beschleunigt, wodurch am Düsenaustritt ein Unterdruck entsteht ($p_2 < p_1, p_0$) und die Flüssigkeit angesaugt und zerstäubt wird. Sowohl der horizontale, als auch der vertikale Abstand zwischen Düsenaustritt und Applikatkanal, sowie deren Neigungswinkel können dabei variiert werden.

Vorteil aller beschriebenen Prinzipien ist die Möglichkeit der Verdüsung auch sehr geringer Flüssigkeits-Volumenströme. Die geförderte Flüssigkeitsmenge sowie das Volumen an benötigtem Treibgas hängen dabei maßgeblich von der Dimensionierung der Fluidkanäle ab.

2.7 Wirksamkeitsnachweis

Nach den ersten richtungsweisenden Untersuchungen zum Einsatz von Blutpräparaten in der Wundheilung wurden zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien veröffentlicht.

In vitro Nachweis

Als *in vitro* Testobjekte werden sowohl Zelllinien, als auch Primärzellen verwendet. Beide Ansätze sind als Modellsystem für die Untersuchung der Zellproliferation sowie -migration geeignet [53], können aber aufgrund der Vereinfachungen in der Abbildung des Wundmilieus und des fehlenden Gewebekomplexes *in vivo* Untersuchungen nicht ersetzen [99]. Jedoch lassen sich multiple Ansätze simultan untersuchen und stellen eine kostengünstige Untersuchungsmethode dar.

Die in der Literatur beschriebenen Studien diskutieren den Einsatz von Thrombozytenpräparaten kontrovers: Wachstumsfördernde Effekte durch Thrombozyten werden sowohl für Fibroblasten-Primärzellen [50, 55] als auch Fibroblasten-Zelllinien gemessen [84, 146]. Martineau et al. [89] und Frechette et al. [45] publizieren einen positiven Einfluss von Thrombozytenkonzentrat auf die Proliferation von Endothelzellen. Beide Studien verwenden dabei den zellfreien Überstand von aktiviertem Thrombozytenkonzentrat, welchen sie in einer Maximalkonzentration von 10 % (v/v) in das Zellkulturmedium von subkonfluenten Zellen geben [45, 89]. Thrombozytenreiches Fibrinnetz findet Anwendung als eine Art Zellträger (Scaffold) für die Kultivierung von Knochenmarkszellen der Ratte [34]. Die proliferationsfördernde Wirkung von Thrombozytenkonzentrat wird außerdem für Knochenzellen [25, 26, 45, 55], humane Primärzellen der Wurzelhaut [59], sowie mesenchymale Stammzellen vom Schaf [35] beschrieben.

Oft wird der positive Einfluss der Blutpräparate auf das Zellwachstum als konzentrationsabhängig dargestellt [26, 55, 59, 89], wobei die Vergleichbarkeit der Studien aufgrund teilweise lückenhafter Angaben zum untersuchten Thrombozytenkonzentrat und unterschiedlicher Test-Settings schwierig bleibt.

In vivo Nachweis

Die Applikationsform von Blutpräparaten variiert in *in vivo* Studien stark. In Untersuchungen zum Knochenaufbau wurde das Thrombozytenkonzentrat entweder alleine [22, 91, 126, 139, 157], in Kombination mit Knochenersatzmaterial, autogenem Knochen [142] oder integriert in einem Scaffold aus beispielsweise Gelatine [62] appliziert.

Sarkar et al. [129] beschreiben einen ähnlichen Ansatz, nämlich die Kombination des Thrombozytenkonzentrats mit einem Kollagen-Trägermaterial, eingebracht in große Knochendefekte. Eine verbesserte Heilung konnte nicht beobachtet werden. Auch Schaaf et al. [130] detektierten keinen positiven Effekt beim Knochenaufbau durch die Applikation von Thrombozytenkonzentrat während einer Sinuslift Operation. Dieser kieferchirurgische Eingriff dient zur Knochenaugmentation für die Implantatsetzung im Oberkiefer, wobei durch Anheben der Schleimhaut in Richtung Kieferhöhle ein Hohlraum geschaffen wird, welcher anschließend mit Knochenersatzmaterial aufgefüllt werden kann. Lindeboom et al. [81] dagegen konnten einen positiven Effekt auf die Schleimhautregeneration durch das Einbringen von Thrombozytenkonzentrat bei Patienten mit diesem Eingriff erzielen. Die Integration von TK in einem Kollagen-Scaffold ist im Hinblick auf die Wundheilungsförderung bei Verletzungen des vorderen Kreuzbands untersucht worden. Dabei soll durch die Kollagenmatrix die Freisetzung der Wachstumsfaktoren in das Wundgebiet zeitlich verzögert und verlängert werden [100]. Kajikawa et al. [69] konnten durch die Injektion eines Thrombozytenkonzentrats eine beschleunigte Heilung der Patellasehne im Rattenmodell dokumentieren.

Der Einsatz von TK im Bereich der chronischen Wunden wird zwar durchaus positiv beurteilt [75, 116], allerdings kann aufgrund der ungenügenden Datenlage zur Effizienz ein routinemäßiger Einsatz aus wissenschaftlichen und ökonomischen Gründen nicht empfohlen werden [149]. Gründe für die kontroversen Studienergebnisse können die nicht standardisierten Studienprotokolle [54], die Variationen in der eingesetzten Thrombozytenkonzentration der Präparate [43] oder die unzureichenden Angaben zur Konstitution, insbesondere zum Aktivierungszustand der eingebrachten Thrombozyten sein [2].

3 Optimierte Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten

Ein bestehendes Rotorkonzept wird so modifiziert, dass eine möglichst effiziente Gewinnung von hoch-angereichertem Thrombozytenkonzentrat in einer Standardzentrifuge möglich ist. Im Besonderen wird in Kooperation mit einem Industriepartner (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) das Winkel-Design erarbeitet und technisch realisiert mittels Prototypenbau (siehe Abb. 3.1).

3.1 Probandenauswahl

Die Studie wird ausschließlich mit frischem Vollblut freiwilliger Probanden durchgeführt, um möglichst realitätsnahe Bedingungen zu erreichen. Die Erfassung der Blutparameter (Thrombozytenanzahl, Hämoglobinkonzentration etc.) erfolgt mit dem Hämatologie-Analysator KX-21 (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt). Zudem werden von jedem Probanden vor jeder Spende neben Alter und Geschlecht die Vitalfunktionen, insbesondere Blutdruck, Puls und Temperatur, überprüft und verschlüsselt dokumentiert. Zusätzlich ist jeder Proband verpflichtet vor jeder Spende mittels Unterschrift seine Einwilligung zur Studienteilnahme zu bestätigen. Es wird eine maximal mögliche Varianz der Studienteilnehmer bezüglich Alter, Geschlecht und körperlicher Konstitution angestrebt.

Insgesamt werden für diese Studie über 35 Liter Vollblut prozessiert von mehr als 50 freiwilligen Spendern, die sich zu annähernd gleichen Teilen in männliche und weibliche aufteilen. Die Blutabnahme erfolgt unter Genehmigung der lokalen Ethikkommission (Projekt-nummer 2998/10) nach den geltenden Richtlinien [16].

3.2 Herstellung von Thrombozytenkonzentrat

Für die optimierte Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat aus Vollblut mittels zweistufiger Zentrifugation (vgl. Kap.2.4) werden die Prozessparameter für beide Zentrifugationsläufe variiert. Da die erste Zentrifugation mit zugehörigem Separationsschritt den größten Einfluss auf die Thrombozytenausbeute hat, wird dieser Prozessschritt verstärkt betrachtet. Es wird der automatisierte Herstellungsprozess und, als Referenz für die erste Zentrifugation, die manuelle Herstellungsmethode angewendet. Letztere erfordert eine offene, also unsterile Verarbeitung des Bluts. Als Antigerinnungsmittel kommen Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Lithium-Heparin, sowie Acid-Citrate-Dextrose (ACD) zum Einsatz, welche in den jeweiligen Blutentnahmeröhrchen (Vacuetten®, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) vorliegen.

3.2.1 Manueller Herstellungsprozess

Die manuelle TK-Herstellung erfolgt mit einer Universal Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Universal 320, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Venöses Vollblut wird hierzu in Blutentnahmeröhrchen (Vacuette® K2EDTA, Vacuette® Lithium-Heparin und Vacuette® ACD-A, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster) mit Hilfe eines Butterflys (Sicherheitsblutentnahmeset-LA, 23Gx10cm; Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster) entnommen. Nach der ersten Zentrifugation liegt das Vollblut separiert in drei Schichten vor und das Blutplasma kann inklusive des Buffy Coats in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt werden. Anschließend findet der zweite Zentrifugationsschritt statt, nach welchem die Thrombozyten als Pellet am Gefäßboden vorliegen und das PPP darüber. Letzteres wird bis auf ein geringes Restvolumen, in welchem die Thrombozyten resuspendiert werden, verworfen (vgl. Abb. 2.3).

3.2.2 Automatisierter Herstellungsprozess

Beim automatisierten Prozess wird im Gegensatz zur manuellen Methode kein Ausschwingrotor, sondern ein Scheibenrotor verwendet. Grundlage des Systems ist das TACSI (Terumo BCT Europe N.V., Belgien, entwickelt in Kooperation mit Andreas Hettich GmbH und Co. Kg, Tuttlingen), welches in Blutbanken für die Zentrifugation und Auftrennung von gepoolten (gesammelten) Buffy Coats zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat Anwendung findet [128].

Wie auch bei der manuellen Methode, wird Vollblut in Blutentnahmeröhrchen mit Antigerinnungsmittel (EDTA, Citrat, Heparin) abgenommen, anschließend jedoch in 10 ml Spritzen (SOFT-JECT®, Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen) überführt. Mittels eines Schlauchverbinders (Übergangsstück, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen) wird die befüllte Spritze (siehe Abb. 3.1, Spritze 1A) mit einer zweiten, leeren Spritze (Spritze 1B) über Luer-Lock-Anschlüsse verbunden und in den Rotor eingelegt. Das neu entwickelte Winkel-System ermöglicht die zeitgleiche Verarbeitung von zwei Spritzenpaaren. Der Rotor beinhaltet vier separate Motoren, welche durch ein Zahnrad-Schienen-System die jeweiligen Spritzenkolben individuell antreiben. Die Bewegung der beiden Kolben eines Doppelsystems (Abb. 3.1, 1A und 1B) erfolgt dabei simultan, was eine Überdruck bedingte Kompression und damit eine mögliche Schädigung der Thrombozyten verhindert.

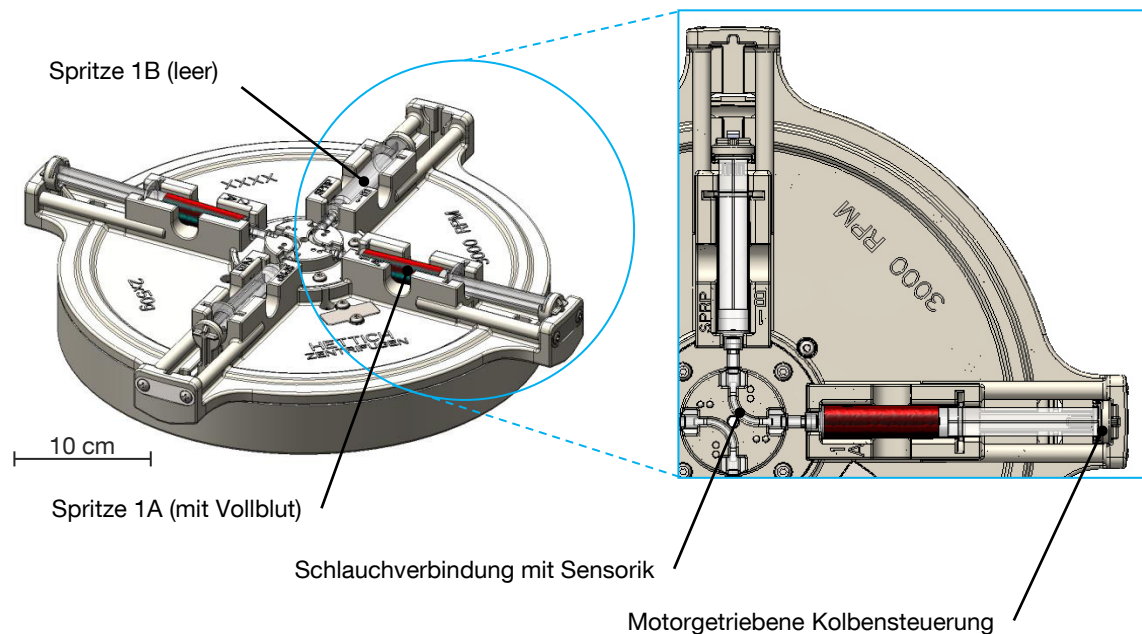


Abb. 3.1 **Zentrifugenrotor zur automatischen Herstellung von Thrombozyten-konzentrat**
 Die mit Vollblut befüllte Spritze (Spritze 1A) wird über einen Schlauch mit einer leeren Spritze (Spritze 1B) verbunden und in den Rotor eingelegt. Insgesamt können aufgrund der entwickelten Winkel-Anordnung zwei Spritzensysteme gleichzeitig prozessiert werden. Nach der ersten Zentrifugation wird das zentrumsnah liegende PRP in die leere Spritze überführt, wobei der Kolben der leeren Spritze simultan mit der dazugehörigen Blutspritze verfahren wird um eine Überdruck-induzierte Kompression der Thrombozyten zu vermeiden. Der in der Schlauchführung integrierte Sensor steuert den Überpressvorgang durch Detektion der Schlauchtransmission. Bei Erreichen eines Schwellenwertes, bedingt durch die Erythrozyten, stoppt der Separierungsvorgang und die zweite Zentrifugation beginnt. Abschließend wird das PPP aus Spritze 1B in Spritze 1A abgepresst, wobei der Vorgang weggesteuert und somit das TK-Endvolumen variabel einstellbar ist.

Die verschiedenen Parameter für die zweistufige Zentrifugation können per Computersteuerung verändert und an den Versuchsplan angepasst werden. Neben der Zentrifugationsdauer und -beschleunigung der zwei Separationsschritte kann sowohl die Zentrifugationsbeschleunigung während der automatisiert ablaufenden Überpressvorgänge variiert als auch die Sensorsensibilität angepasst werden. Diese spielt beim ersten Trennungsvorgang eine entscheidende Rolle, da das Überpressen anhand der Transmission in den Schläuchen von den Sensoren detektiert und gesteuert wird. Sobald der voreingestellte Schwellenwert, bedingt durch die Erythrozyten, erreicht wird, stoppt der erste Überpressvorgang und die zweite Zentrifugation beginnt. Der anschließende zweite Separierungsprozess wird weggesteuert durchgeführt, wodurch sich das Endvolumen des Thrombozytenkonzentrats variabel einstellen lässt.

3.3 Etablierung der Prozessparameter

Ein erstes wesentliches Qualitätskriterium des Konzentrats stellt die erzielte Thrombozytenausbeute im Endprodukt dar. Dabei können sowohl die Zentrifugationsparameter wie Dauer und Beschleunigung, als auch das verwendete Antigerinnungsmittel einen erheblichen Einfluss haben [66, 78, 104, 170]. Generell kann die Leistungsfähigkeit eines Herstellungssystems in Bezug auf die erzielte Thrombozytenausbeute wie folgt klassifiziert werden:

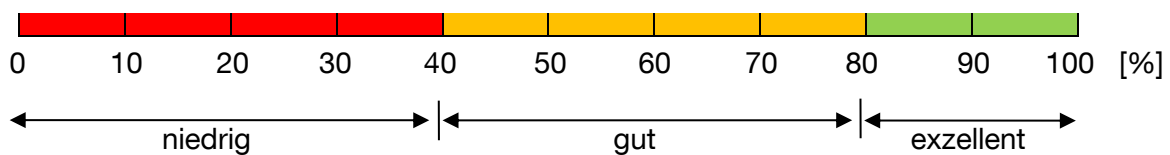


Abb. 3.2 **Klassifizierung der Thrombozytenausbeute im Endprodukt**

Die Thrombozytenausbeute im Endprodukt bezieht sich auf das Vollblut (100 %) [modifiziert nach 34].

Es wird der Einfluss von Zentrifugationsdauer und -beschleunigung sowie die Auswirkung des eingesetzten Antigerinnungsmittels auf die Thrombozytenausbeute untersucht. Dabei werden die Antigerinnungsmittel EDTA, Heparin und Citrat miteinander verglichen.

3.3.1 Studiendesign

Der erste Zentrifugationsschritt wird sowohl mit der automatisierten Methode als auch mit der manuellen Herstellungsmethode (Benchmark) durchgeführt. Die Variation der Parameter Zentrifugationszeit, Beschleunigung und Antigerinnungsmittel ist hierbei identisch.

Da die zweite Zentrifugation im Vergleich zum ersten Separationsschritt einen geringeren Einfluss auf die Thrombozytenausbeute hat und vorwiegend einer Aufkonzentrierung durch Reduzierung des Plasmavolumens dient, findet die Optimierung hierfür ausschließlich orientierend mit der automatisierten Methode statt.

Für die erste Versuchsreihe wird EDTA als Antigerinnungsmittel eingesetzt. Die Beschleunigung der ersten Zentrifugation wird in 200 g-Inkrementen von 200 bis 1600 g und die Zentrifugationszeit in 2 Minuten-Schritten von 3 bis 9 Minuten erhöht. Dadurch ergeben sich 32 Parameterkombinationen (vgl. Tab. 3.1). Beim anschließenden zweiten Zentrifugationsschritt wird die Beschleunigung in 500 g-Schritten von 500 auf 1500 g und die Zeit in 2 Minuten-Inkrementen von 3 auf 7 Minuten erhöht. Die Thrombozytenzahl im

PRP/TK und EK wird mittels Hämatologie-Analysator ermittelt und die Thrombozytenausbeute im Vergleich zum Vollblut bestimmt.

	1. Zentrifugation	2. Zentrifugation
Zentrifugationszeit	3 min, 5 min, 7 min, 9 min	3 min, 5 min, 7 min
Zentrifugalbeschleunigung	200 g, 400 g, 600 g, 800 g, 1000 g, 1200 g, 1400 g, 1600 g	500 g, 1000 g, 1500 g
Parameterkombinationen	32 Kombinationen	9 Kombinationen
Probanden	n ≥ 5	n = 3

Tab. 3.1: **Parameteroptimierung zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat aus Vollblut mittels zweistufiger Zentrifugation (EDTA)**

Die Parametervariationen für die 1. Zentrifugation werden sowohl mit der manuellen, als auch mit der automatisierten Herstellungsmethode durchgeführt. Der Optimierungsprozess für die 2. Zentrifugation erfolgt ausschließlich mit der automatisierten Herstellung.

Anschließend an die Versuchsreihe mit EDTA als Antigerinnungsmittel werden Heparin und Citrat als alternative Antigerinnungsmittel für den Herstellungsprozess untersucht. Der Versuchsplan kann hierbei auf die in Tab. 3.2 genannten Parameterkombinationen gekürzt werden, da die Tendenz der Thrombozytenausbeute in Vorversuchen bestätigt werden konnte.

Sowohl bei der manuellen, als auch bei der automatisierten Herstellungsmethode wird die Beschleunigung des ersten Zentrifugationsschrittes in 400 g-Inkrementen von 200 g auf 1400 g erhöht und zusätzlich die Beschleunigung von 1600 g untersucht. Die Zeit erhöht sich wie bei der EDTA-Versuchsreihe in 2-Minuten-Inkrementen von 3 bis maximal 9 Minuten. Der zweite Zentrifugationsschritt wird ausschließlich orientierend durchgeführt (vgl. Tab. 3.2).

	1. Zentrifugation	2. Zentrifugation
Zentrifugationszeit	3 min, 5 min, 7 min, 9 min	3 min, 5 min, 7 min
Zentrifugal- beschleunigung	200 g, 600 g, 1000 g, 1400 g, 1600 g	500 g, 1000 g
Parameter- kombinationen	20 Kombinationen	5 Kombinationen
Probanden	n ≥ 5	n = 1

Tab. 3.2: **Parameteroptimierung zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat aus Vollblut mittels zweistufiger Zentrifugation (Heparin / Citrat)**

Die Parametervariationen für die 1. Zentrifugation werden sowohl mit der manuellen als auch mit der automatisierten Herstellungsmethode durchgeführt. Die 2. Zentrifugation wird ausschließlich orientierend untersucht (Probanden: n = 1, Antigerinnungsmittel: Citrat).

Allgemein gilt für alle Versuchsreihen mit der automatisierten Methode, dass für die Überpressvorgänge zwischen erster und zweiter Zentrifugation und nach der zweiten Zentrifugation eine konstante Beschleunigung von 20 g gehalten, die maximale, mit diesem Motor erzielbare Bremsleistung eingebracht und die Sensorsensibilität auf einem mittleren Wert konstant gehalten wird. Diese Werte wurden in Vorversuchen ermittelt.

3.3.2 Auswertungsmethoden

Die Thrombozytenzahl in den Blutfraktionen wird mittels Hämatologie-Analysator ermittelt und anschließend die Thrombozytenausbeute im Vergleich zum Vollblut errechnet (Gl. 3.1).

$$\text{Thrombozytenausbeute [\%]} = \frac{c_{\text{Thrombozyten (TK)}} \cdot V_{\text{TK}} \left[\frac{1}{\mu\text{l}} \cdot \mu\text{l} \right]}{c_{\text{Thrombozyten (VB)}} \cdot V_{\text{VB}} \left[\frac{1}{\mu\text{l}} \cdot \mu\text{l} \right]} \cdot 100 \% \quad (\text{Gl. 3.1})$$

c – Konzentration

V – Volumen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt deskriptiv (Anzahl n, Median, 1. und 3. Quartil, Minimum, Maximum). Zudem wird der Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung allgemeiner Mittelwertsunterschiede eingesetzt. Diese einfaktorielle Varianzanalyse ist für mehrere unabhängige Stichproben geeignet und setzt, wie auch der nachfolgend durchgeführte Mann-Whitney-U-Test keine normalverteilte Grundgesamtheit voraus [73]. Anhand dieses

Post-hoc-Tests werden im paarweisen Vergleich der Gruppen signifikante Unterschiede in der Thrombozytenausbeute untersucht (Signifikanzwert: $p < 0,001$).

Bei der Ermittlung der optimalen Prozessparameter für die erste Zentrifugation werden zusätzlich zur Thrombozytenausbeute die Faktoren Reproduzierbarkeit und Prozesszeit berücksichtigt. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt anhand einer gewichteten Punktebewertung, wobei der Variationskoeffizient als Maß für die Reproduzierbarkeit des Prozesses eingesetzt wird (vgl. (Gl. 3.2)).

$$\text{Variationskoeffizient} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

s – Standardabweichung

\bar{x} – Mittelwert

In Tab. 3.3 ist die Punkteverteilung sowie die Gewichtung der einzelnen Einflussfaktoren für die 1. Zentrifugation abgebildet.

	4 Punkte	3 Punkte	2 Punkte	1 Punkt	Gewichtung
Ausbeute	≥ 95 %	≥ 90 %	≥ 85 %	≥ 80 %	0,3
Variationskoeffizient	≤ 5 %	≤ 10 %	≤ 15 %	≤ 20 %	0,5
Prozesszeit	3 min	5 min	7 min	9 min	0,2

Tab. 3.3 **Bewertungsmatrix zur Ermittlung der optimalen Zentrifugationsparameter**
 Als Grundlage zur Bewertung der optimalen Parameter dienen die Thrombozytenausbeute, der Variationskoeffizient als Indikator der Reproduzierbarkeit sowie die Prozesszeit. (Maximalpunktzahl: 4)

3.4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Parameterstudie gliedern sich primär in die Thrombozytenausbeute im PRP nach einstufiger und in die Thrombozytenausbeute im TK nach zweistufiger Zentrifugation. Desweiteren erfolgt eingangs für den ersten Zentrifugationsschritt eine Betrachtung der erzielten Ausbeutewerte in Abhängigkeit der eingesetzten Antigerinnungsmittel sowie der Herstellungsmethoden. Anschließend werden die Ergebnisse unter Einbezug des Variationskoeffizienten und der Prozesszeit bewertet.

3.4.1 Thrombozytenausbeute im Platelet Rich Plasma (PRP)

In Abb. 3.3 sind zusammenfassend die mit der automatisierten Herstellungsmethode erzielten mittleren Ausbeuten im PRP, unterteilt in die vier Prozesszeiten, abgebildet.

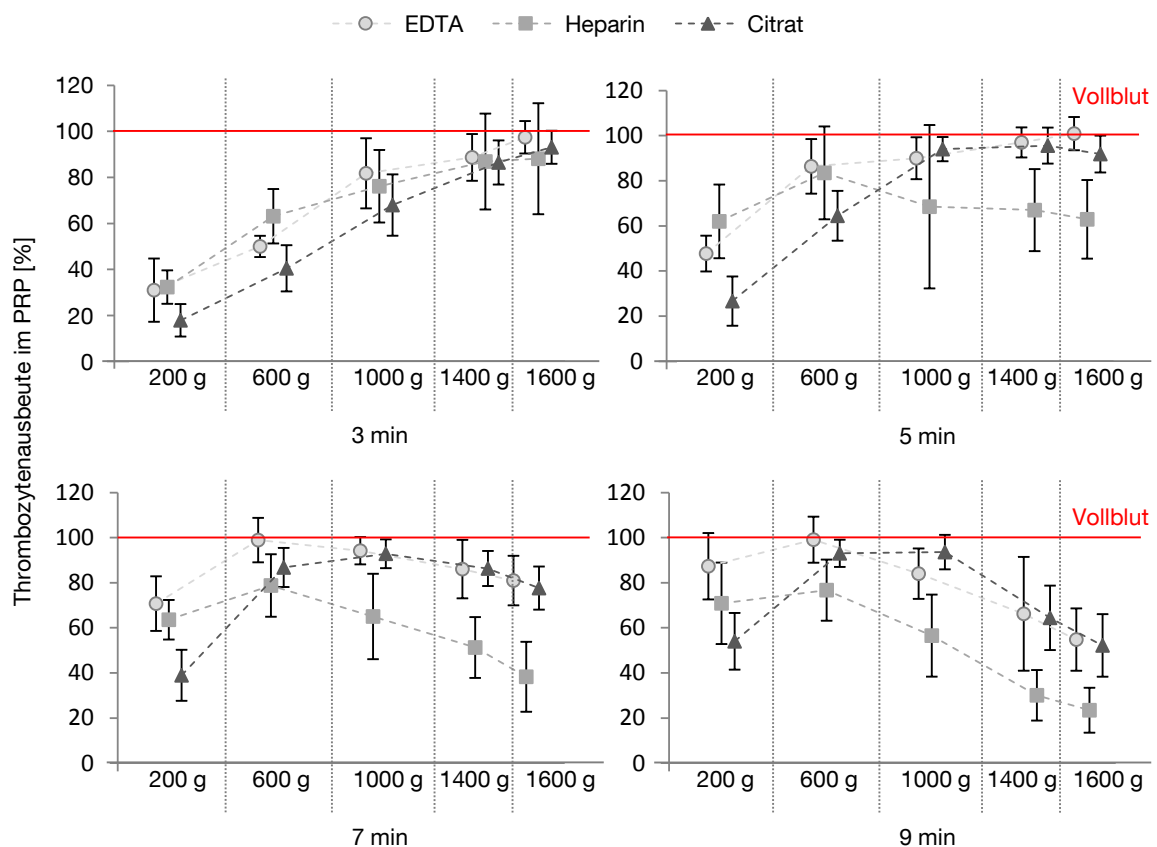


Abb. 3.3 **Thrombozytenausbeuten im PRP (automatisierte Methode)**

Die Ausbeuten im PRP steigen für alle Antigerinnungsmittel mit Zunahme der Beschleunigung bei einer Zentrifugationszeit von 3 Minuten annähernd linear an. Bei steigender Zentrifugationsdauer stagnieren die Ausbeuten mit zunehmender Beschleunigung und sinken bei 7 bzw. 9 Minuten mit Beschleunigungen von ≥ 1000 g stark ab ($n \geq 5$; 2 Proben/Proband; Mittelwerte mit Standardabweichung).

Die drei Graphen pro Diagramm repräsentieren die eingesetzten Antigerinnungsmittel. Eine Korrelation zwischen Ausgangsgröße (Thrombozytenausbeute) und der beiden Eingangsgrößen (Zentrifugationszeit und -beschleunigung) ist bei 3 Minuten mit allen Antigerinnungsmitteln deutlich zu erkennen (EDTA $R^2 = 0,93$; Heparin $R^2 = 0,87$; Citrat $R^2 = 0,96$). Die steigende Thrombozytenausbeute bei zunehmender Beschleunigung ist in dieser Gruppe signifikant ($p \leq 0,001$).

Bei einer Prozesszeit von 5 Minuten kann sowohl im EDTA-PRP als auch im Citrat-PRP eine Annäherung an die 100 %-Ausbeutemarke beschrieben werden. Ab einer Zentrifugationszeit von 7 Minuten ist mit steigender Beschleunigung ein Absinken der Thrombozytenausbeute im PRP zu beobachten, wobei diese im EDTA- und Citrat-PRP dennoch deutlich im exzellenten Bereich, also $> 80\%$ Ausbeute, liegen (vgl. dazu Abb. 3.2). Unter Verwendung von Heparin kann hingegen bei einer Zentrifugationsdauer von 7 Minuten nur noch ein Maximalwert von 79% (600 g) und bei 9-minütiger Zentrifugation eine Ausbeute von 77% (600 g) erzielt werden, was in den Bereich einer guten Ausbeute einzuordnen ist. Die maximalen Thrombozytenausbeuten mit den jeweiligen Antigerinnungsmitteln werden bei folgenden Parameterkombinationen erzielt: EDTA: $1600\text{ g}/5\text{ min}$ (100%); Heparin: $1600\text{ g}/3\text{ min}$ (88%); Citrat: $1400\text{ g}/5\text{ min}$ (96%).

Der Thrombozytenausbeutetrend mit der manuellen Herstellungsmethode korrespondiert weitgehend mit dem der automatisierten Methode (vgl. Abb. 3.4). Mit EDTA wird bei einer Zentrifugationszeit von 9 Minuten und einer Beschleunigung von 600 g eine maximale Thrombozytenausbeute von 102% erzielt. Der Spitzenwert unter Verwendung von Heparin liegt dahingegen lediglich bei $78,8\%$ (Parameterkombination: 600 g , 7 Minuten). Im Citrat-PRP wird wiederum ein exzellenter Maximalwert von 95% bei 1400 g und 7 Minuten erreicht. Allgemein kann bei Beschleunigungen über 1000 g und einer Zentrifugationsdauer von ≥ 7 Minuten mit allen Antigerinnungsmitteln eine rückläufige Thrombozytenausbeute im PRP beobachtet werden.

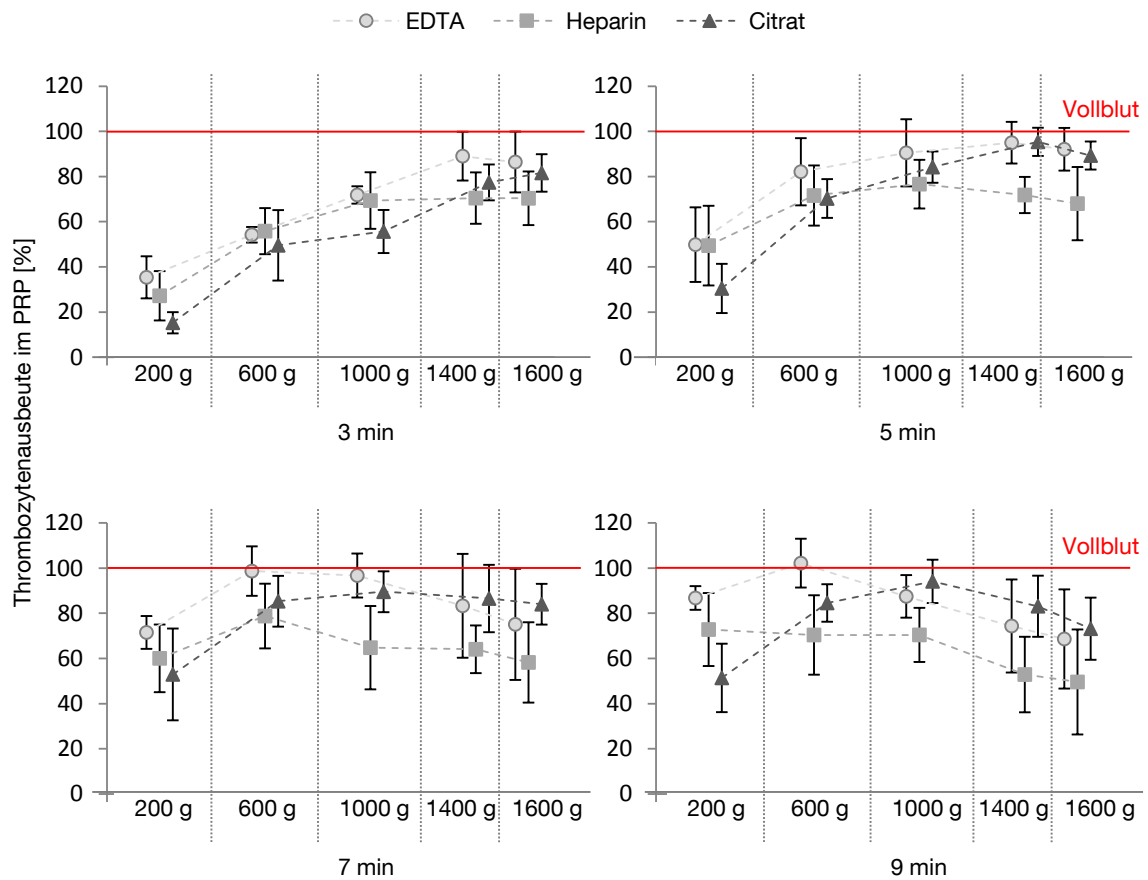


Abb. 3.4 **Thrombozytenausbeuten im PRP (manuelle Methode)**

Die Ausbeute im PRP steigt mit allen Antigerinnungsmitteln mit Zunahme der Beschleunigung bei einer Zentrifugationszeit von 3 Minuten. Mit zunehmender Prozesszeit wird die maximale Ausbeute bei geringerer Beschleunigung erreicht. 5 Minuten: 1400 g (EDTA, Citrat) und 1000 g (Heparin); 7 Minuten: 600 g (EDTA, Heparin), 1000 g (Citrat); 9 min: 600 g (EDTA), 1000 g (Heparin, Citrat) ($n \geq 5$; 2 Proben/Proband; Mittelwerte mit Standardabweichung).

Die Separierung der Thrombozyten aus Vollblut mittels Zentrifugation stellt ein etabliertes Verfahren her, wobei die optimalen Parameter für das jeweilig eingesetzte System meist empirisch durch Variation von Zentrifugationszeit und -beschleunigung ermittelt werden [39]. Zu gering gewählte Parameter führen hierbei zu schlechten Ausbeutewerten, was durch eine unvollständige Trennung von Erythrozytenkonzentrat (EK) und Platelet Rich Plasma (PRP) verursacht sein könnte, wobei die maximalen Parameterkombinationen (hohe g-Zahl, lange Zentrifugationszeit) ähnlich geringe Ausbeutewerte zur Folge haben. Grund hierfür könnte einerseits eine Sedimentation der Thrombozyten im EK sein oder andererseits auf eine Aktivierung der Thrombozyten hindeuten [64]. Die Überprüfung der Gesamtanzahl an Thrombozyten (PRP+EK) kann Aufschluss über den, während der Prozessierung auftretenden Thrombozytenverlust, und damit über eine nicht erwünschte, vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten [64], geben (vgl. Abb. 3.5).

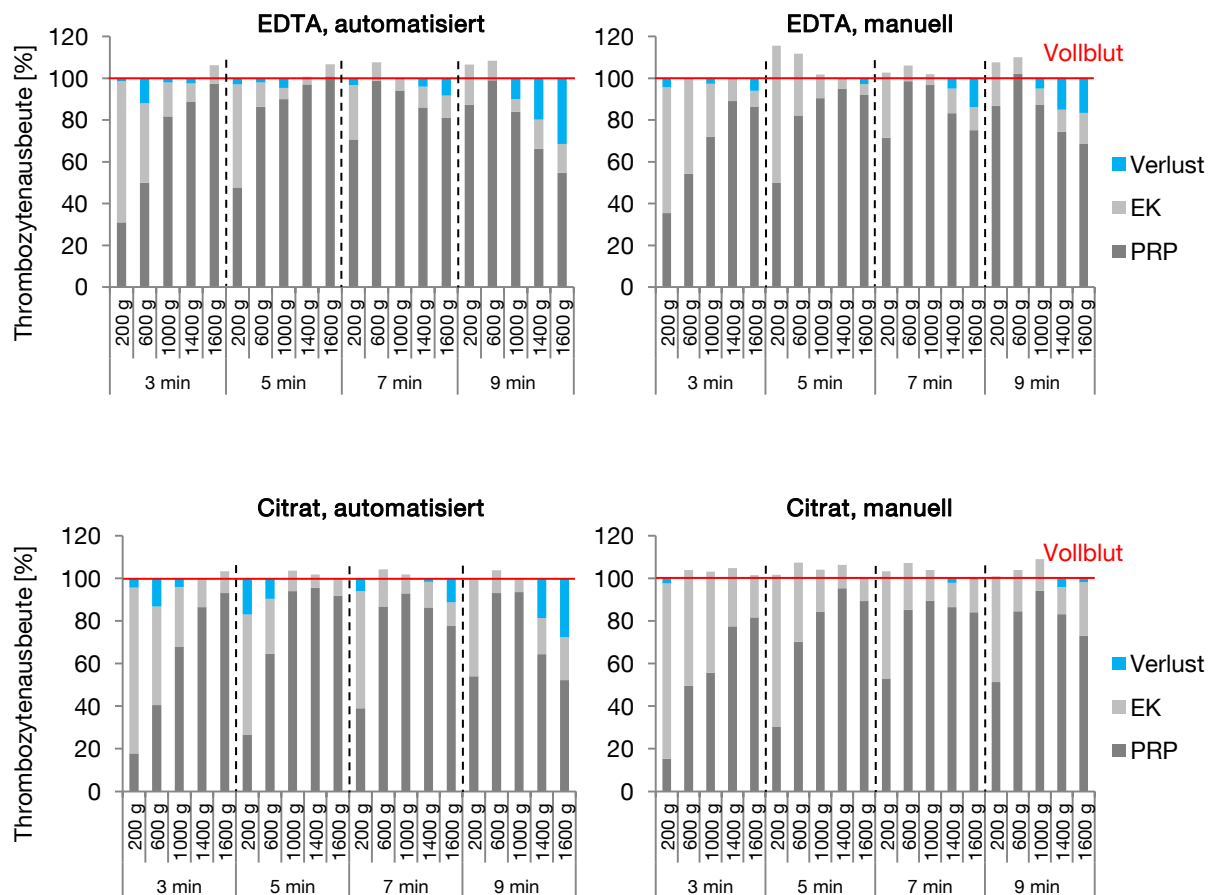


Abb. 3.5 **Vergleich der Thrombozytenverteilung in PRP und EK mit EDTA und Citrat**
 Bei Parameterkombinationen mit geringer Beschleunigung und kurzer Prozesszeit findet eine unvollständige Separierung der Thrombozyten in das Plasma statt. Werden beide Zentrifugationsparameter maximiert, bewirkt dies eine Separation der Thrombozyten ins EK, was wiederum zu einer niedrigeren Thrombozytenausbeute im PRP führt. Zudem kann hier eine Reduzierung der Gesamtanzahl an Thrombozyten (PRP+EK) detektiert werden (blaue Markierungen).

Weder mit EDTA noch mit Citrat ist ein wesentlicher Verlust an Thrombozyten während des Zentrifugationsvorgangs zu erkennen. Ausnahmen bilden Zentrifugalbeschleunigungen > 1000 g bei einer Laufzeit von 9 Minuten. Hier ist ein Defizit an Thrombozyten im Vergleich zur Ausgangskonzentration des Vollbluts messbar (Abb. 3.5, blaue Markierung).

Mit Heparin hingegen reduziert sich die Thrombozytengesamtzahl schon bei niedrigeren Parameterkombinationen. Insbesondere bei der manuellen Herstellungsmethode ist ein persistenter Thrombozytenverlust über alle Parameterkombinationen zu verzeichnen (siehe Abb. 3.6). Dies könnte für eine Thrombozytenaktivierung während des Zentrifugationsprozesses sprechen könnte [64].

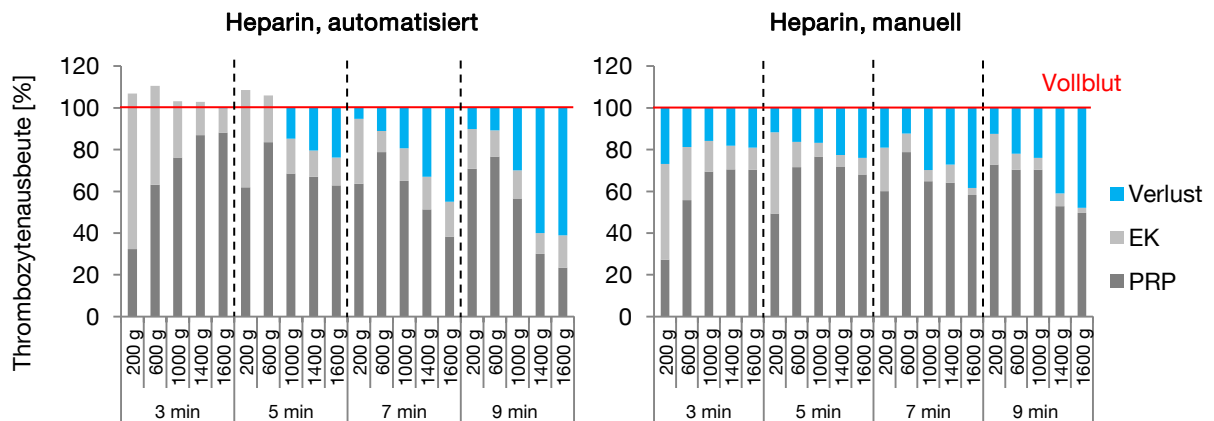


Abb. 3.6 **Vergleich der Thrombozytenverteilung im PRP und EK mit Heparin**
 Ab einer Zentrifugationszeit von 5 Minuten und Beschleunigungen ≥ 1000 g ist bei der automatisierten Herstellungsmethode ein deutlicher Rückgang der Ausbeute sowie der Gesamtanzahl an Thrombozyten zu messen. Die manuelle Verarbeitung weist nach der Zentrifugation durchweg eine Reduzierung der Thrombozytenanzahl auf.

Zusammenfassend sind in Tab. 3.4 die erzielten Maximalwerte der Thrombozytenausbeute im PRP mit den jeweiligen Parameterkombinationen abgebildet. Mit den Antigerinnungsmitteln EDTA und Citrat sind keine Unterschiede in der Ausbeute bei den unterschiedlichen Herstellungsmethoden nachzuweisen. Mit Citrat wird sowohl mit der automatisierten als auch mit der manuellen Methode bei einer Parameterkombination von 1400 g und 5 Minuten ein maximaler Thrombozytenausbeutewert von 95 % erzielt. Die Ausbeute im EDTA-PRP erreicht sogar Maximalwerte um 100 % (manuelle Herstellung, Zentrifugationsdauer: 9 Minuten, Beschleunigung: 600 g/automatisierte Methode, Zentrifugationsdauer: 5 Minuten, Beschleunigung: 1600 g). Im Vergleich zu den exzellenten Ausbeutewerten mit EDTA und Citrat sinkt die Leistung unter Verwendung von Heparin deutlich, kann jedoch mit der automatisierten Methode (bei 1600 g und 3 Minuten) noch 88 % und damit einen Wert im exzellenten Ausbeutebereich erreichen. Dahingegen ist mit der manuellen Methode die mittlere Ausbeute von 79 % (bei 600 g und 7 Minuten) im Vergleich zu den Ausbeutewerten im EDTA-PRP und Citrat-PRP signifikant niedriger ($p < 0,001$) und kann nur noch dem guten Ausbeutebereich zugeordnet werden.

Antigerinnungsmittel	Methode	Maximale Ausbeute	Parameter [g/min]
EDTA	manuell	102 %	600 / 9
	automatisiert	100 %	1600 / 5
Heparin	manuell	79 %	600 / 7
	automatisiert	88 %	1600 / 3
Citrat	manuell	95 %	1400 / 5
	automatisiert	95 %	1400 / 5

Tab. 3.4 **Übersicht der Parameterkombinationen für eine optimale Thrombozytenausbeute im PRP**

Mit dem Antigerinnungsmittel EDTA können bei beiden Herstellungsarten die höchsten Thrombozytenausbeuten im PRP erzielt werden. Unter Verwendung von Citrat werden exzellente Ausbeuten von 95 % erzielt, sowohl mit der manuellen als auch der automatisierten Methode. Einzig bei Kombination von Heparin und der manuellen Gewinnung erreichen die Ausbeutewerte lediglich einen guten aber dennoch ausreichenden Ausbeutebereich. Mit Hilfe der automatisierten Methode kann jedoch die Ausbeute auf 88 % und somit in den exzellenten Leistungsbereich angehoben werden.

3.4.2 Bewertungsschema

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe der gewichteten Punktebewertung (vgl. Tab. 3.3), welche neben der erzielten Thrombozytenausbeute im PRP sowohl den Variationskoeffizienten als auch die Prozesszeit mit einbezieht. Zur Visualisierung der Messwert-Streuung (Reproduzierbarkeit) werden die Antigerinnungsmittel spezifischen Ergebnisse (EDTA, Heparin, Citrat) im Boxplot-Diagramm dargestellt. Abgebildet sind hier der Median (waagerechter Strich innerhalb der Box), Minimal- und Maximalwert (Fehlerindikatoren), sowie das 1. und 3. Quartil, wobei der Interquartilsabstand 50 % der gemessenen Werte beinhaltet (Box).

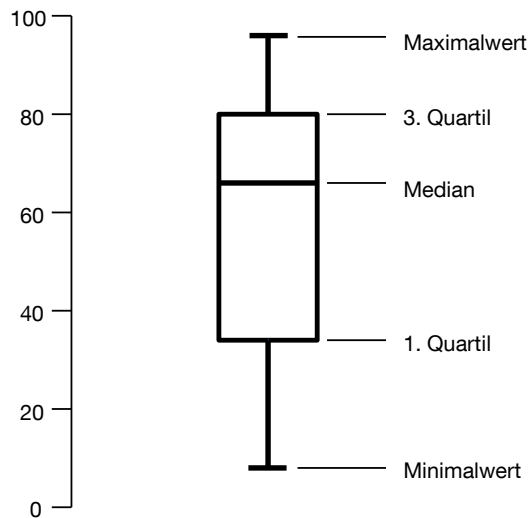


Abb. 3.7 **Ergebnisdarstellung im Boxplot Diagramm**

Der Boxplot beinhaltet folgende Streuungs- und Lagemaße: Median (waagerechte Linie innerhalb der Box), Minimal- und Maximalwert (Fehlerindikatoren), 1. und 3. Quartil (der Interquartilsabstand beinhaltet 50 % der gemessenen Werte).

Da das System für möglichst viele Patienten anwendbar sein soll ist das Ziel eine möglichst geringe Messwertstreuung, also eine schmale Box mit naheliegenden Minimal- und Maximalwerten, und gleichzeitig hohe Thrombozytenausbeuten über alle Probanden hinweg zu erzielen. Der Einfluss des Antigerinnungsmittels auf die Thrombozytenausbeute und insbesondere auf die Reproduzierbarkeit wird folgend näher betrachtet.

EDTA zur Antikoagulation

Abb. 3.8 verdeutlicht die Thrombozytenausbeute im PRP für die automatisierte Herstellung unter Verwendung von EDTA. Anhand der Fehlerindikatoren ist die Streubreite der gemessenen Ausbeuten bereits abzuschätzen. Der Variationskoeffizient spiegelt dieses Ergebnis wider. So wird beispielsweise bei der Parameterkombination 200 g und 3 Minuten ein hoher Koeffizient von 44 % errechnet, was, neben der geringen Ausbeute, negativ in die Punktebewertung mit einfließt.

Der Maximalwert von 100,9 % wird bei der Parameterkombination 1600 g und 5 Minuten gemessen (Variationskoeffizient: 7 %). Jedoch erreicht die Kombination mit 1600 g und 3 Minuten aufgrund der gewichteten Matrix (vgl. Tab. 3.3) die höchste Gesamtbewertung (3,5 Punkte). Die Thrombozytenausbeute und der Variationskoeffizient belaufen sich dabei auf 97 % bzw. 7 %, allerdings mit einer vorteilhaften Bewertung durch die kürzere Prozesszeit von 3 Minuten.

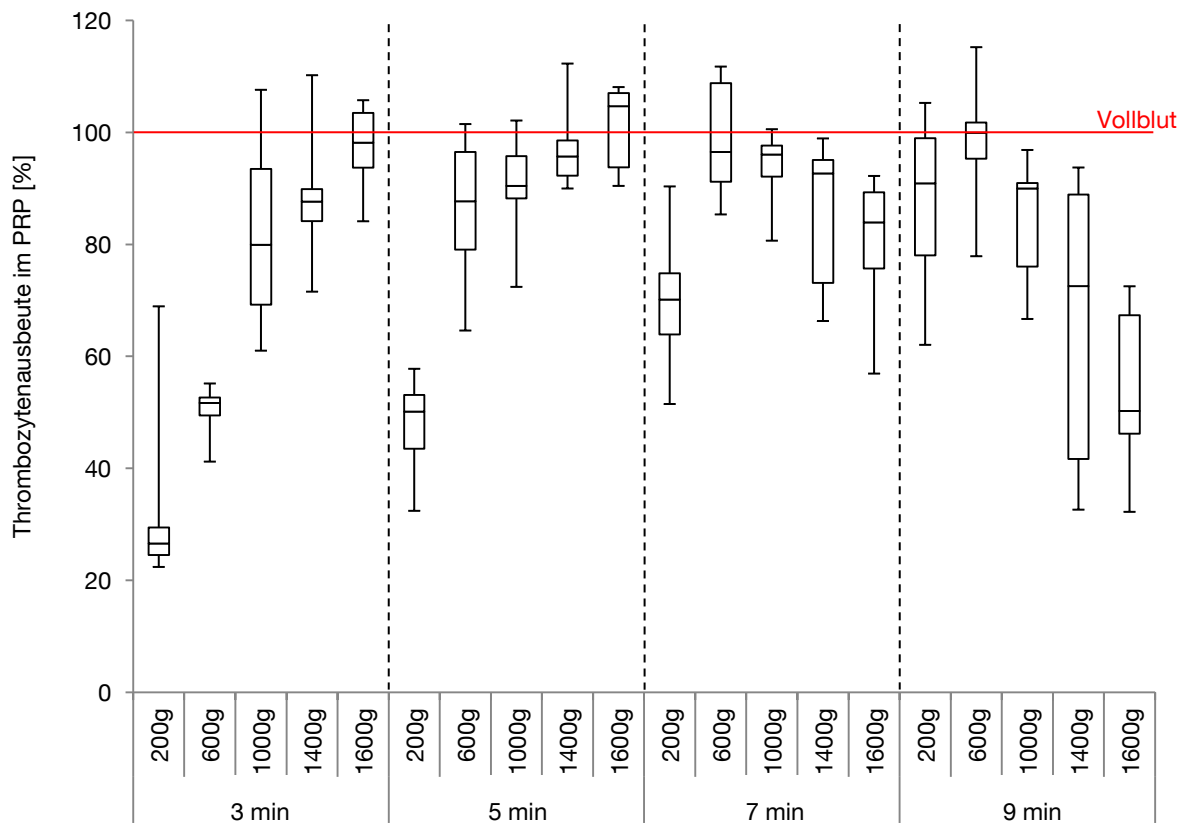


Abb. 3.8 **Thrombozytenausbeute im PRP (automatisierte Methode, EDTA)**

Die Streuung der erzielten Messwerte spiegelt sich in den Fehlerindikatoren wider. Mit den Parametern 1600 g und 3 min bzw. 5 min werden sehr gute Ausbeuten erzielt. Ähnlich gute Werte können zwar auch bei 600 g und 7 min bzw. 9 min ermittelt werden, die Streuung der Werte fällt hier jedoch wesentlich höher aus ($n \geq 5$; 2 Proben/Proband; Median mit Min./Max. sowie 1. und 3. Quartil).

Mittels manueller Herstellungsmethode wird mit 102 % ein etwas höherer Maximalwert gemessen, der Variationskoeffizient von 11 % und die Prozesszeit von 9 Minuten wirken sich hierbei jedoch negativ aus. Somit resultiert das beste Ergebnis der manuellen Versuchsreihe (3,1 Punkte von maximal 4 Punkten) aus der Parameterkombination 1200 g und 7 Minuten. Die Thrombozytenausbeute beträgt hierbei im Mittel 96 % mit einem Variationskoeffizienten von 6 %.

Heparin zur Antikoagulation

Die Thrombozytenausbeute nach der ersten Zentrifugation (automatisierte Methode) unter Verwendung von Heparin ist in Abb. 3.9 dargestellt. Im Vergleich zur EDTA-Versuchsreihe lässt Heparin eine insgesamt größere Streuung der Messwerte erkennen. Allein vier Parameterkombinationen erzielen in der Bewertungsmatrix gute Werte beim Variations-

koeffizienten (200 g und 7 Minuten sowie 600 g und 3, 7 bzw. 9 Minuten). Die allgemein geringere Thrombozytenausbeute im Vergleich zu EDTA- und Citrat-PRP (vgl. Abb. 3.10) ergibt folglich eine niedrigere Gesamtbewertung.

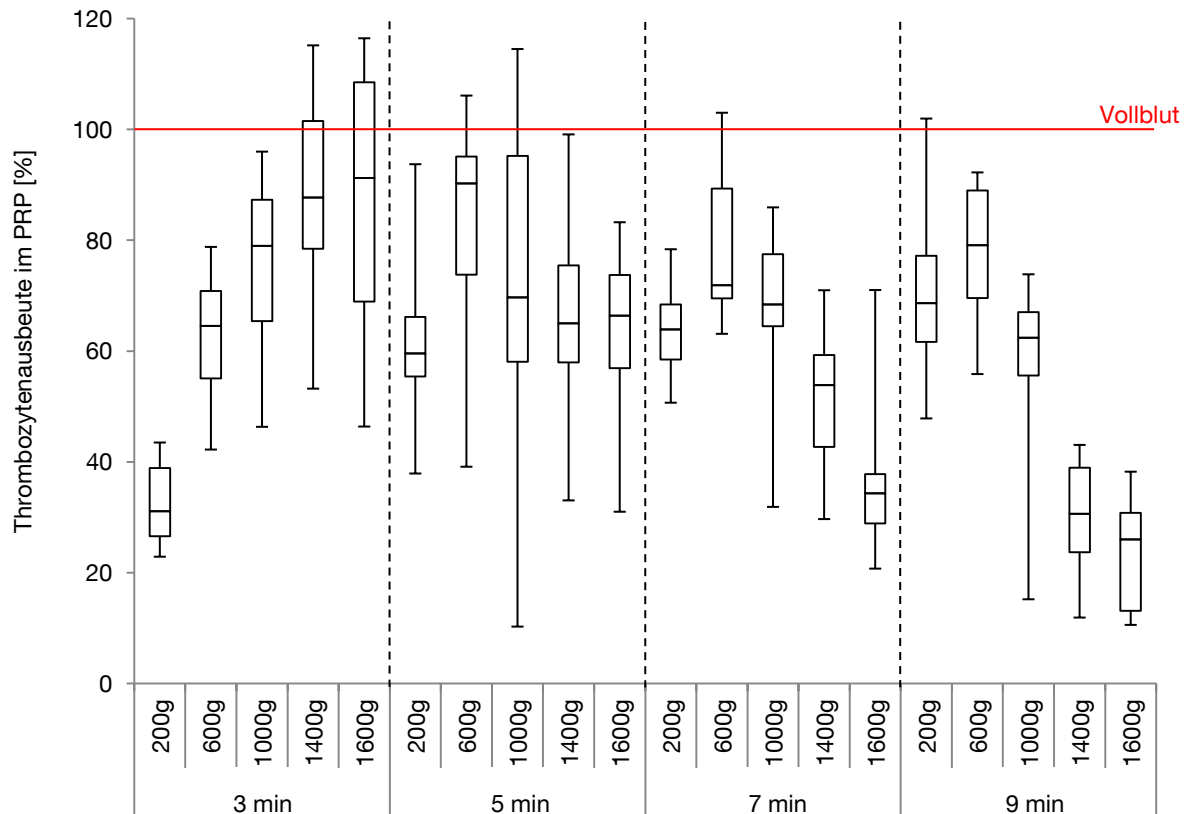


Abb. 3.9 **Thrombozytenausbeute im PRP (automatisierte Methode, Heparin)**

Insgesamt ist die Streubreite der Werte bei den Versuchen mit Heparin deutlich größer als bei der EDTA-Versuchsreihe. Die Messwerte für den Variationskoeffizienten des maximalen Ausbeutewerts von 88 % (bei 1600 g und 3 Minuten) weisen sogar einen Variationskoeffizienten von 27 % auf und erzielen daher keine Punkte in der Bewertungsmatrix. Alleine vier Parameterkombinationen erzielen überhaupt einen Wert in dieser Kategorie ($n \geq 5$; 2 Proben/Proband; Median mit Min./Max. sowie 1. und 3. Quartil).

Drei Parameterkombinationen erreichen eine maximale Punktzahl von 1,4: 1400 g und 1600 g bei 3 Minuten sowie 200 g bei 7 Minuten. Die mit den jeweiligen Zentrifugationsparametern ermittelten Thrombozytenausbeuten differieren dabei stark untereinander. Bei 1600 g und 3 Minuten wird mit 88 % die maximale Ausbeute der Versuchsreihe erreicht. Auch bei 1400 g und 3 Minuten wird ein exzellentes Ergebnis (87 %) erzielt. Der signifikant ($p < 0,05$) geringerer Ausbeutewert von 66 % bei 200 g und 7 Minuten wird durch den im Vergleich niedrigen Variationskoeffizienten von 14 % ausgeglichen. Dieser fällt hingegen für die beiden höchsten Ausbeuten mit 27 % und 24 % deutlich höher aus.

Mittels manueller Herstellungsmethode kann bei 5 Minuten und 1000 g sowie 1400 g zwar eine insgesamt höhere Punktzahl erreicht werden (1,6), die maximale Thrombozytenausbeute liegt mit 79 % (600 g, 7 min) allerdings unter dem Wert der automatisierten Methode und zudem nur im guten Ausbeutebereich. Der etwas höhere Punktwert kommt durch den insgesamt kleineren Variationskoeffizienten zustande. Dieser beträgt für die optimierten Prozessparameter 14 % und 11 %.

Citrat zur Antikoagulation

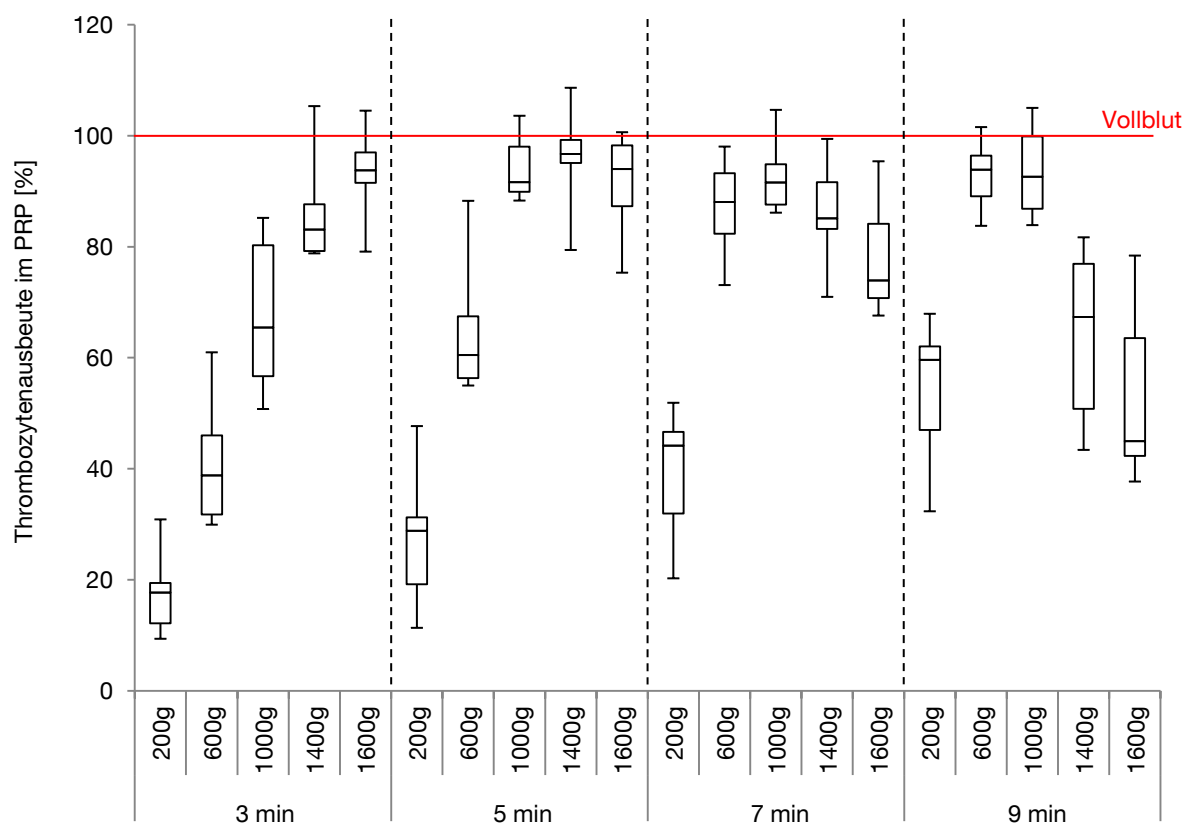


Abb. 3.10 **Thrombozytenausbeute im PRP (automatisierte Methode, Citrat)**

Mit dem Antigerinnungsmittel Citrat können reproduzierbar exzellente Thrombozytenausbeuten im PRP erzielt werden. Der kleinste Variationskoeffizient von nur 6 % wird bei den Parametern 1000 g und 5 Minuten generiert. Bei einer Beschleunigung von 1400 g und 5 Minuten Zentrifugation stellt sich die maximale Thrombozytenausbeute von 95,6 % mit einem gleichzeitig niedrigen Variationskoeffizient (8 %) ein ($n \geq 5$; 2 Proben/Proband; Median mit Min./Max. sowie 1. und 3. Quartil).

Die maximale Thrombozytenausbeute im PRP (95 %) bei der automatisierten Herstellung unter Verwendung von Citrat (vgl. Abb. 3.10) wird bei einer Zentrifugationsdauer von 5 Minuten und einer Beschleunigung von 1400 g erzielt. Der Variationskoeffizient beträgt hierbei 8 %, wodurch sich nach der Bewertungsmatrix ein Maximalwert von 3,3 Punkten errechnet.

Der Höchstwert der manuellen Herstellung beträgt ebenfalls 3,3 Punkte, erzielt bei 1400 g und 5 Minuten. Die mittlere Thrombozytenausbeute beträgt dabei identisch zur automatisierten Methode 95 % (Variationskoeffizient: 7 %).

Die statistische Gegenüberstellung der Thrombozytenausbeuten im PRP mit jeweils optimierten Prozessparametern zeigt, dass ausschließlich die manuelle Herstellung und Heparin einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) im Vergleich zu EDTA- und Citrat-PRP aufweist (vgl. Abb. 3.11).

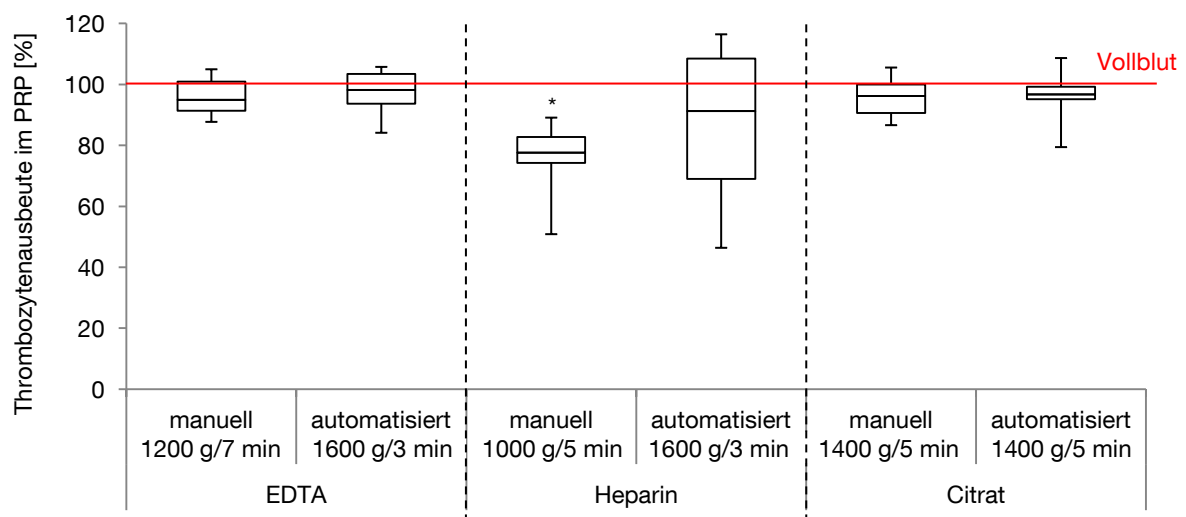


Abb. 3.11 Vergleich der Maximalwerte der ersten Zentrifugation

Mit allen drei Antigerinnungsmitteln ergeben sich mit der automatisierten Methode exzellente Thrombozytenausbeuten im PRP, wobei die Streuung der Werte unter Verwendung von Heparin deutlich größer ist im Vergleich zu EDTA und Citrat. Mit Heparin wird bei manueller Herstellung eine signifikant niedrigere Ausbeute erzielt. Der mittlere Ausbeutewert von 77 % wird dennoch als „gut“ klassifiziert. ($n \geq 5$; 2 Proben/Proband; Median mit Min./Max. sowie 1. und 3. Quartil; * $p < 0,001$ zu EDTA und Citrat).

Umfassend betrachtet wird sowohl mit der manuellen, als auch mit der automatisierten Herstellungsmethode eine sehr gute Thrombozytenausbeute im PRP nach einmaliger Zentrifugation erzielt. Einzig im Heparin-PRP und der manuellen Anwendung wird lediglich eine gute Ausbeute erreicht (vgl. Abb. 3.12).

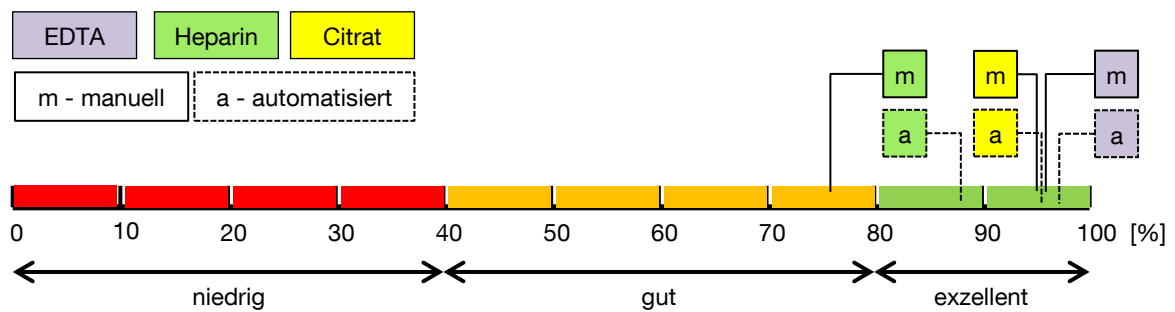


Abb. 3.12 **Erzielte maximale Thrombozytenausbeute im Platelet Rich Plasma in Abhängigkeit des Antigerinnungsmittels und des Herstellungsprozesses**
Mit den verwendeten Antigerinnungsmitteln werden nach einmaliger Zentrifugation sehr gute Ausbeutewerte im PRP erzielt. Die Ausnahme bildet Heparin bei der manuellen Verarbeitung. Hier beträgt der Wert lediglich 77 % und fällt so in den Bereich der guten Ausbeute.

Tab. 3.5 fasst die Ergebnisse der Parameterstudie (1. Zentrifugation) zusammen. Die Punktevergabe leitet sich durch die in 3.3.2 festgelegte gewichtete Bewertungsmatrix ab (die ausführlichen Ergebnisse sind in Anhang D aufgeführt).

Antigerinnungsmittel	Herstellungsmethode	Parameter [g/min]	Ausbeute	Variationskoeffizient	Punktzahl
EDTA	manuell	1200 / 7	96 %	6 %	3,1
	automatisiert	1600 / 3	97 %	7 %	3,5
Heparin	manuell	1000 / 5	77 %	14 %	1,6
	automatisiert	1600 / 3	88 %	27 %	1,4
Citrat	manuell	1400 / 5	95 %	7 %	3,3
	automatisiert	1400 / 5	95 %	8 %	3,3

Tab. 3.5 **Gewichtete Ergebnisbewertung zur Parameterstudie für die 1. Zentrifugation**
Abhängig von der Herstellungsmethode und des eingesetzten Antigerinnungsmittels variieren die bestmöglichen Parameterkombinationen für die 1. Zentrifugation. Die Gesamtpunktzahl ist abhängig von der Ausbeute, dem Variationskoeffizienten sowie der Prozesszeit. Das beste Ergebnis wird mit der automatisierten Methode und EDTA erzielt (3,5 Punkte). Auch Citrat erreicht mit beiden Herstellungsmethoden 3,3 von 4 möglichen Punkten. Heparin als Antigerinnungsmittel ist aufgrund der insgesamt niedrigeren Ausbeutewerte sowie der großen Messwertschwankung nur bedingt zu empfehlen.

3.4.3 Thrombozytenausbeute im Thrombozytenkonzentrat

Die zweite Zentrifugation hat, im Vergleich zum ersten Prozessschritt bestehend aus Zentrifugation und Separation, einen geringeren Einfluss auf die Thrombozytenausbeute. Es handelt sich um eine Separierung der Thrombozyten mit dem Ziel der prozentualen Aufkonzentrierung. Einige kommerziell erhältliche Systeme verzichten vollständig auf einen zweiten Zentrifugationsschritt und favorisieren die Anwendung des PRP [5, 20].

Die orientierenden Versuche zum zweiten Zentrifugationsschritt werden mit den festgelegten, optimierten Parametern während des ersten Zentrifugationsschritts durchgeführt (EDTA: 1600 g/3 Minuten; Citrat: 1400 g/5 Minuten). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 dargestellt.

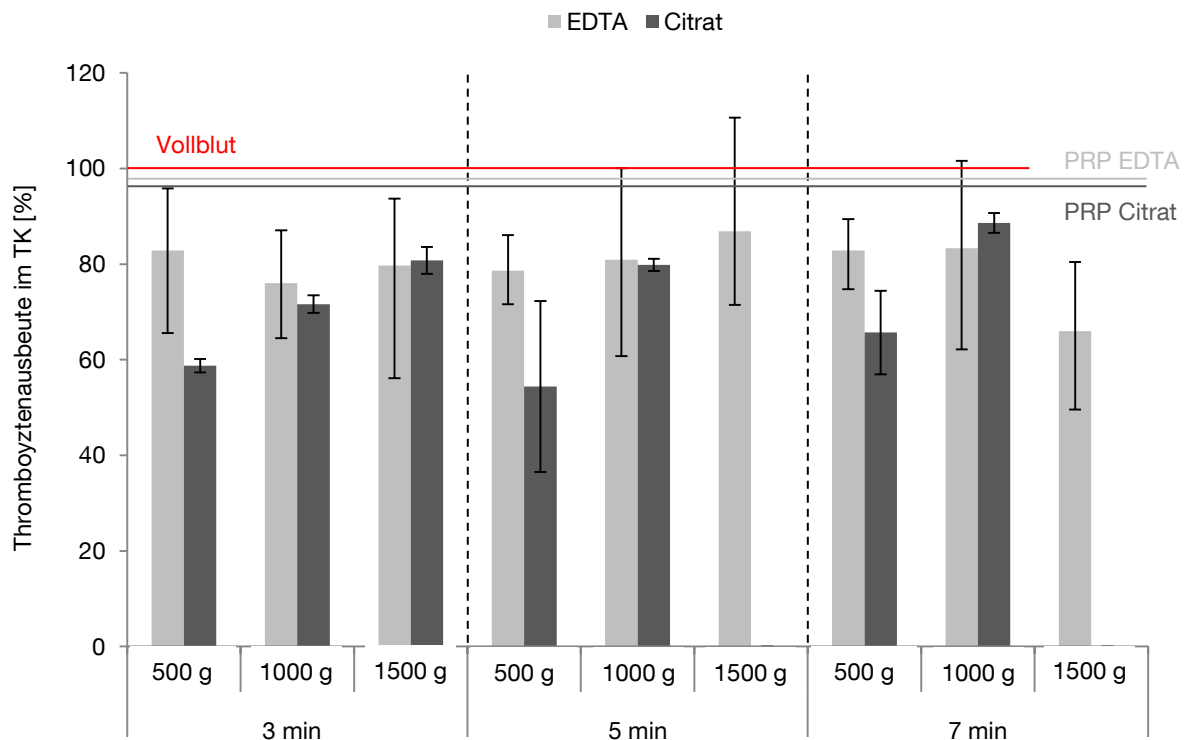


Abb. 3.13 **Thrombozytenausbeute im TK nach zweistufiger Zentrifugation**

Die Ausbeutewerte im TK bewegen sich bei EDTA um einen Mittelwert von 80 % wobei keine signifikanten Unterschiede durch die jeweiligen Prozessparameter auftreten. Der Maximalwert beträgt 87 % bei 1500 g und 5 Minuten.

Citrat erreicht einen höheren maximalen Wert von 89 % bei einer Zentrifugationsdauer von 7 Minuten und einer Beschleunigung von 1000 g (EDTA n = 3; 2 Proben/Proband, Citrat n = 1; 2 Proben/Proband; Mittelwerte mit Min./Max.).

Beim Einsatz von EDTA kann kein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenausbeute bei Variation der Zentrifugationsparameter detektiert werden. Die Ausbeute im TK schwankt um einen mittleren Wert von ca. 80 %. Mit einer Beschleunigung von 1500 g und 5 Minuten Zentrifugationsdauer kann ein Maximalwert von 87 % erzielt werden, was im Vergleich zur Ausbeute im PRP (97 %) zwar einen Verlust bedeutet, aber dennoch einer exzellenten Ausbeute entspricht. Mit Citrat beträgt die maximale Thrombozytenausbeute 89 % bei 1000 g und 7 Minuten. Die Differenz zur maximalen Ausbeute nach der ersten Zentrifugation (96 %) ist vergleichbar zu der mit EDTA.

Die Evaluation der Thrombozytengesamtanzahl ergibt keine signifikante Reduzierung der Thrombozyten während der zweiten Zentrifugation. Alleine mit EDTA und Beschleunigungen ab 1000 g sowie einer Prozesszeit von 7 Minuten wird eine Differenz der Thrombozytengesamtanzahl im Vergleich zum Vollblut detektiert (vgl. Abb. 3.14).

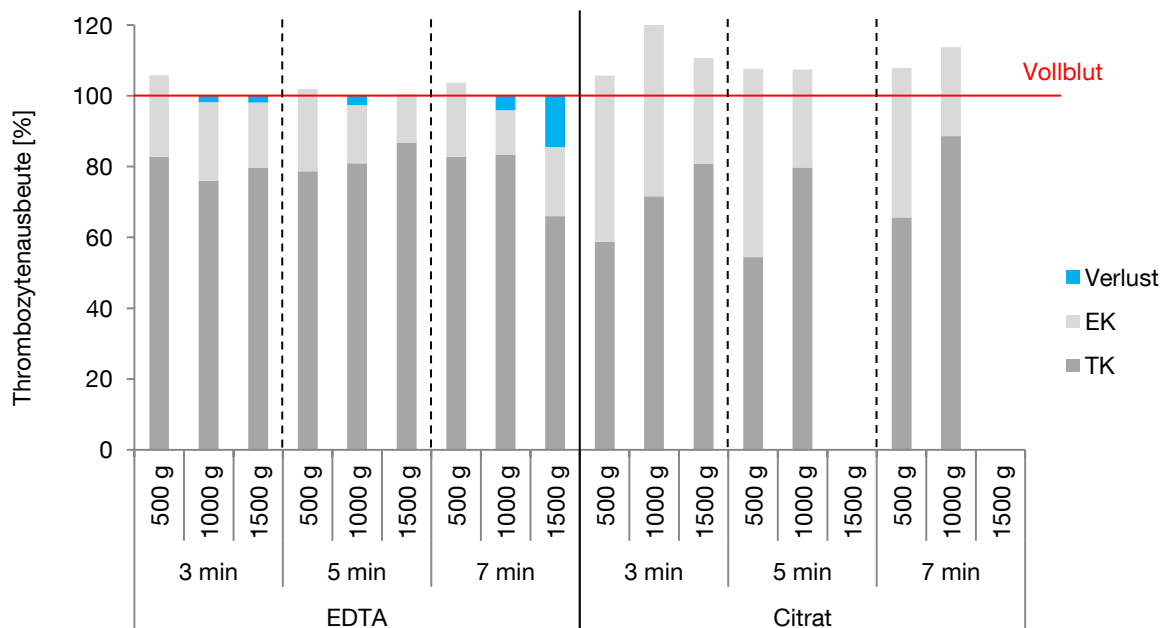


Abb. 3.14 **Vergleich der Thrombozytenverteilung im TK und EK mit EDTA und Citrat**
Die ursprüngliche Thrombozytenzahl des Vollbluts bleibt über den zweistufigen Aufkonzentrierungsprozess erhalten. Allein mit EDTA und einer Zentrifugationszeit von 7 Minuten ist ab einer Beschleunigung von 1000 g ein Verlust zu detektieren.

Diese Ergebnisse können aufgrund der geringen Probandenanzahl ($n = 3$ bzw. 1) ausschließlich orientierend betrachtet werden, lassen jedoch vermuten, dass für eine möglichst hohe Thrombozytenausbeute im zweiten Aufkonzentrierungsschritt tendenziell höhere Beschleunigungen (≥ 1000 g) und längere Zentrifugationszeiten (≥ 5 Minuten) nötig sind.

3.5 Diskussion

Aufgrund der durchgeführten Parameterstudie können Empfehlungen bezüglich Antigerinnungsmittel spezifischer, optimaler Zentrifugationsparameter zur Erzielung einer exzellenten Thrombozytenausbeute gegeben werden. Im direkten Vergleich mit der manuellen Herstellungsmethode, kann mit der automatisierten eine äquivalente und zum Teil auch höhere Ausbeute erreicht werden. Zudem läuft der automatisierte Prozess in einem geschlossenen, sterilen System ab.

3.5.1 Auswahl des Antigerinnungsmittels

In kommerziell erhältlichen Systemen werden überwiegend Citrat-Präparate als Antigerinnungsmittel bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentrat eingesetzt (vgl. Anhang E). Andere gerinnungshemmende Agenzien, wie EDTA oder Heparin, wurden bisher zur Herstellung von Thrombozytenpräparaten nur vereinzelt evaluiert [38, 78]. Ein Vorteil von EDTA und Heparin gegenüber Citrat liegt in der Möglichkeit, diese als Feststoff auf die Innenwand des Blutentnahmegefäßes aufzudampfen. Dies stellt eine attraktive Alternative zum bisher praktizierten und zeitlich aufwändigen manuellen Aufziehen des flüssigen Citrats in das Entnahmesystem dar.

Mit den drei verwendeten Antigerinnungsmitteln und der automatisierten Herstellungsmethode können exzellente Ausbeuten im PRP erzielt werden. Die Steigerung der Zentrifugalbeschleunigung bei gleichbleibender Prozesszeit führt mit allen Agenzien zu ähnlichen Thrombozytenausbeuten im PRP: eine lineare Zunahme bei 3 Minuten Zentrifugationsdauer mit steigender Beschleunigung, sowie eine Reduktion ab Zentrifugationszeiten > 7 Minuten bei gleichzeitig hohen Beschleunigungen (> 1000 g). Mit längerer Zentrifugationszeit und steigender Beschleunigung wird ein Absinken der Thrombozytenausbeute im PRP beobachtet (vgl. Kap. 3.4.1). Die Analyse der Thrombozytengesamtanzahl aus PRP und EK lässt für EDTA und Citrat zum einen eine unzureichende Trennung von EK und PRP bei niedrigen Zentrifugationsparametern, sowie einen Übergang der Thrombozyten in das EK bei zu hohen Beschleunigungen und langer Prozesszeit vermuten. Bei Beschleunigungen > 1000 g tritt jedoch ein Thrombozytenverlust auf, welcher mit Heparin sogar persistent über alle Parameterkombinationen zu verzeichnen ist (vgl. Abb. 3.5 und Abb. 3.6).

Diese Abnahme kann auf eine Aktivierung der Thrombozyten hindeuten, hervorgerufen durch die Verarbeitungsschritte [64]. Eine weitere Ursache für diese potentielle Thrombozytenaktivierung können neben den auftretenden Scherkräften während der Zentrifugation auch die Antigerinnungsmittel selbst sein [78, 86]. EDTA bewirkt dabei nicht

zwangsläufig eine Aggregatbildung und Ausschüttung der Wachstumsfaktoren [102]. Die Thrombozyten werden zwar geschädigt [2], die Membranintegrität und somit die Detektierbarkeit im Hämatologie-Analysator bleibt jedoch bestehen [102]. Im Gegensatz hierzu kann mit Heparin insbesondere bei der manuellen Herstellungsmethode bei hohen Beschleunigungen (1600 g) die Bildung eines Thrombozytenaggregats auf der Erythrozytenschicht beobachtet werden (Abb. 3.15).

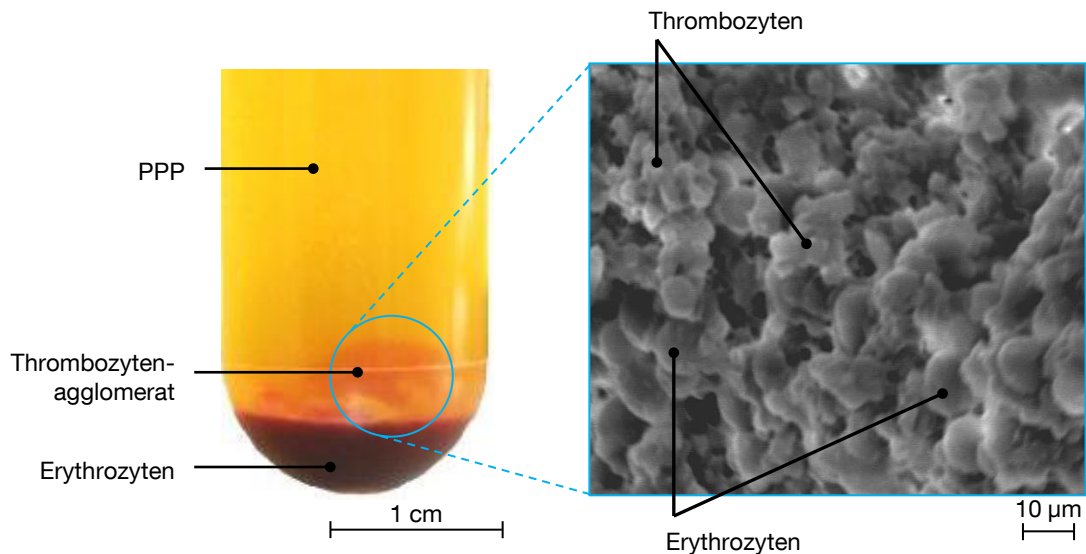


Abb. 3.15 **Aufnahme eines Thrombozytenagglomerats**

Bei Beschleunigungen > 1000 g kann die Ausbildung eines Thrombozytenagglomerats beobachtet werden. Aktivierte Blutplättchen aggregieren zu einem Pellet und werden so in der Analyse nicht berücksichtigt.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (JSM-5400, Jeol, München), 2000-fache Vergrößerung (2000 x), Beschleunigungsspannung von 15 kV.

Vorwiegend aktivierte Thrombozyten bilden einen festen Verbund unter Einschluss einiger Erythrozyten. Diese irreversible Aktivierung führt zu einem Absinken der Thrombozytenausbeute, da die Blutplättchen, welche sich in diesem Verbund befinden, vom Hämatologie-Analysator nicht mehr detektiert werden können.

Zu dem Antigerinnungsmittel Heparin liegen keine Ergebnisse für den zweiten Zentrifugationsschritt und der automatisierten Methode bezüglich der Thrombozytenausbeute vor. Orientierende Versuche mit der manuellen Herstellungsmethode zeigen einen deutlichen Abfall der Thrombozytenausbeute im TK im Vergleich zum PRP (vgl. Abb. 5.26). Diese Tendenz lässt auf eine zunehmende Aktivierung der Thrombozyten während des Aufkonzentrierungsprozesses schließen. Um die Qualität des Konzentrats evaluieren zu können wird der Aktivierungszustand zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Prozesskette mittels durchflusszytometrischer Methoden untersucht (siehe Kap. 5.3.1).

3.5.2 Effektivitätsbetrachtung des neuen Zentrifugationsverfahrens (RotiSan)

Tab. 3.6 stellt die Systeme, die über eine automatisierte Auftrennungsmethode der Blutbestandteile verfügen, gegenüber. Der Aufkonzentrierungsprozess dieser Systeme findet ausschließlich mittels zweistufiger Zentrifugation statt, wobei die Anzahl der zusätzlich benötigten manuellen Arbeitsschritte variiert. Bis auf das RotiSan-System, welches Standard-10 ml-Spritzen mit einem herkömmlichen Schlauchverbinder verwendet, zeigen Untersuchungen, dass andere Systeme oft kostenintensives Prozesszubehör (z.B. spezielle Zentrifugationsgefäße) benötigen [39].

Vergleichend mit anderen Herstellungssystemen (siehe Tab. 3.6) können mit dem RotiSan-System exzellente Werte der Thrombozytenausbeute erzielt werden.

Name	System	Volumen VB	Volumen TK	Ausbeute	Manuelle Schritte
RotiSan	Doppelspritzen-system	11,5 ml	1,5-ca. 6 ml (variabel)	ca. 80 %	3
SmartPReP®2 APC+™	Doppelbehälter	20 ml/ 60 ml	3 ml/7 ml/ 10 ml	63,4 % [155]	3-5
Magellan® Autologous Platelet Separator	Zylinder- Schlauch-System	26 ml/35 ml/ 44 ml/52 ml	3 ml-10 ml (variabel)	65,5 % [20]	3-5
Vivostat® System	Zylinder- Schlauch-System	120 ml	ca. 3 ml-5 ml	16,75 % [79]	>5
Angel-PRP System	Beutel-Schlauch- System	40 ml-180 ml	5 ml-18 ml	47 % [15]	>5

Tab. 3.6 **Vergleichende Betrachtung der Effizienz des RotiSan-Systems mit Wettbewerbern**

Alle Systeme verfügen über eine automatisierte Separierungsmethodik zur Auftrennung der Blutbestandteile. Die Aufkonzentrierung der Thrombozyten findet durch einen zweistufigen Zentrifugationsprozess statt. Die manuellen Schritte werden exklusive Blutabnahme und Endapplikation betrachtet.

Die Gegenüberstellung der prozentualen Ausbeute im Vergleich zum Vollblut bestätigt die Effizienz der sensorgesteuerten Separierung von Erythrozytenkonzentrat und Platelet Rich Plasma. Diese Methode, welche auch im Magellan[®]-System (Arteriocyte Medical Systems, USA) eingesetzt wird, ermöglicht, unabhängig vom Hämatokrit, eine reproduzierbare Auftrennung der Blutbestandteile. Ein weiteres Verfahren zur Hämatokrit-unabhängigen Auftrennung wird im GPS[®]-System (Fa. Biomet, USA) mittels Bojenmechanismus umgesetzt. Die Boje umschließt während der Zentrifugation aufgrund der Dichteunterschiede den Buffy Coat, was zu einer sauberen Trennung führt. Mit Ausbeutewerten von 23 %-43 % [152] liegt die Effizienz jedoch weit unter der hier vorgestellten Methode.

Ein wesentliches Unterscheidungskriterium der Systeme besteht in dem benötigten Vollblutvolumen, das zur Aufkonzentrierung der Thrombozyten dem Patienten entnommen wird. Mit dem RotiSan- vergleichbare Wettbewerber-Systeme benötigen, bis auf das ACP (Arthrex, USA), bis zu 240 ml Vollblut pro Anwendung (vgl. Anhang F). Mit 11,5 ml liegt das RotiSan-System somit weit unter diesem Bereich und kann trotz der hierdurch geringeren Thrombozytenausgangsmenge ein hervorragendes Endprodukt generieren mit Thrombozytenausbeutewerten von ca. 80 %. Zusätzlich kann das Endvolumen beim RotiSan- sowie beim Magellan[®]-System je nach Anwendung variabel eingestellt werden.

Des Öfteren werden der Anreicherungsfaktor im Vergleich zum Vollblut oder die therapeutische Anzahl von Thrombozyten/ μl (plt/ μl) als Beurteilungskriterien angegeben. Über die optimale Konzentration für die Wundheilungsförderung liegt jedoch noch keine einheitliche Meinung vor [59]. Eine 4- bis 5-fache Aufkonzentrierung [93] wird ebenso wie eine Konzentration von 1000×10^3 plt/ μl [43, 157] empfohlen. Das RotiSan-System erzielt im PRP einen Anreicherungsfaktor von 1,9 (EDTA), 1,7 (Citrat) und 2,0 (Heparin) und im TK ein Faktor von 3,4 (EDTA) und 4,5 (Citrat). Allerdings ist die Angabe eines wirksamen Anreicherungsfaktors eher skeptisch zu betrachten, da sich die Thrombozytenanzahl im Vollblut in einem Bereich von $150 \cdot 10^3$ bis $450 \cdot 10^3$ pro μl bewegt [110]. Somit kann eine 4-fache Anreicherung im PRP oder TK eine Absolut-Thrombozytenzahl von entweder $600 \cdot 10^3$ plt/ μl oder $1800 \cdot 10^3$ plt/ μl bedeuten.

Die mittleren Thrombozytenzahlen im PRP belaufen sich beim RotiSan-System auf $574 \cdot 10^3$ plt/ μl (EDTA), $410 \cdot 10^3$ plt/ μl (Heparin) und $323 \cdot 10^3$ / μl (Citrat). Im TK werden mit EDTA $757 \cdot 10^3$ plt/ μl und mit Citrat $1145 \cdot 10^3$ plt/ μl gemessen. Bei der Betrachtung der Thrombozytenzahlen muss zusätzlich das TK-Volumen beachtet werden. Dieses beträgt bei EDTA durchschnittlich 3 ml und bei Citrat 2,25 ml. Diese Differenz von 0,75 ml erklärt den etwas niedrigeren Thrombozytenwert bei EDTA. Somit kann mit Citrat sowohl die empfohlene Konzentration von $1 \cdot 10^6$ plt/ μl als auch eine optimale Aufkonzentrierung (4,5-fach) erzielt werden. Auch mit EDTA könnten vermutlich diese favorisierten Parameter durch Reduzierung des TK-Endvolumens erreicht werden. Allein mit Heparin ist eine weitere

Aufkonzentrierung des PRP eher nicht zu empfehlen, da die orientierenden Versuche einen signifikanten Abfall der Thrombozytenzahlen im TK, verursacht durch Aggregatbildung während der zweiten Zentrifugation, gezeigt haben. Eine Anpassung der Zentrifugationsparameter hinsichtlich einer schonenderen Prozessierung, also geringere g-Zahlen und dafür längere Zentrifugationszeiten könnte jedoch eine Verbesserung der Thrombozytenausbeuten durch eine reduzierte Aktivierung ermöglichen. Für Indikationen, die große Applikationsvolumen erfordern, ist der Einsatz von Heparin-PRP aufgrund der sehr guten Ausbeutewerte nach einmaliger Zentrifugation sicherlich weiter in Betracht zu ziehen.

4 Applikationssystem

Zur Applikation des gewonnenen Thrombozytenkonzentrats auf ein Wundgebiet wird ein Konzept für einen Hand-Applikator entwickelt und mittels Prototypenbau realisiert.

Um großflächige Wunden mit Thrombozytenkonzentrat versorgen zu können, ist eine gleichmäßige Verteilung des Volumens wünschenswert. Bei einer ungleichmäßigen Applikation können durch den geringen Volumen-Ertrag nur sehr kleine Wundgebiete ausreichend versorgt werden. Dies tritt häufig beim Einsatz von Spritzensystemen (vgl. Kap. 2.6) aufgrund der manuellen Bedienung des Spritzenkolbens auf.

Das Zerstäuben durch eine Düse ermöglicht eine feine Verteilung des Thrombozytenkonzentrats. Hierzu stehen verschiedene Düsenkonzepte zur Auswahl: Das Einstoff-Düsenprinzip (vgl. Kap.2.6) stellt einerseits eine konstruktiv einfache Möglichkeit dar, birgt andererseits jedoch aufgrund der hohen Druckbelastung durch die Kompression der Flüssigkeit die Gefahr einer irreversiblen Schädigung der Blutplättchen. Da sich das Erzielen eines geringen Volumenstroms mit einer Einstoffdüse ebenfalls schwierig gestaltet, wird dieses Prinzip nicht weiter verfolgt.

Der Vivostat[®]-Applikator arbeitet mittels Zweistoff-Düsenprinzip und Druckluft als Treibfluid. Dies ermöglicht eine feine Verteilung sowie einen sehr geringen Applikat-Volumenstrom. Bei der Entwicklung eines neuen Applikationskonzepts dient das Vivostat[®]-Systems zwar als Referenz im Hinblick auf die Verdüsung des Applikats mittels Zweistoffdüse, die Nachteile wie der externe Druckluftbehälter sowie die Notwendigkeit von Verbindungsschläuchen vom Kompressor zum Applikator und somit in das Operationsfeld sollen jedoch umgangen werden.

4.1 Technische Spezifikationen

Die Möglichkeit der einhändigen Bedienung sowie die Vermeidung externer Anschlüsse stellen zwei Hauptanforderungen an das Applikationssystem dar. Die Aufrechterhaltung eines möglichst geschlossenen Systems von der Blutabnahme bis zur Auftragung auf die Wundfläche nimmt im Hinblick auf die Sterilität einen hohen Stellenwert ein. Die Verdüsung des Konzentrats soll dem Anwender eine gleichmäßige und reproduzierbare Verteilung auf der zu versorgenden Wunde ermöglichen. Als weiteres Qualitätskriterium sollte der Aktivierungszustand der Thrombozyten evaluiert werden (siehe Kap.5) [78].

Diese Anforderungen werden im Folgenden spezifiziert und auf die benötigten Einzelkomponenten separiert. Abb. 4.1 zeigt einen schematischen Aufbau des Applikators.

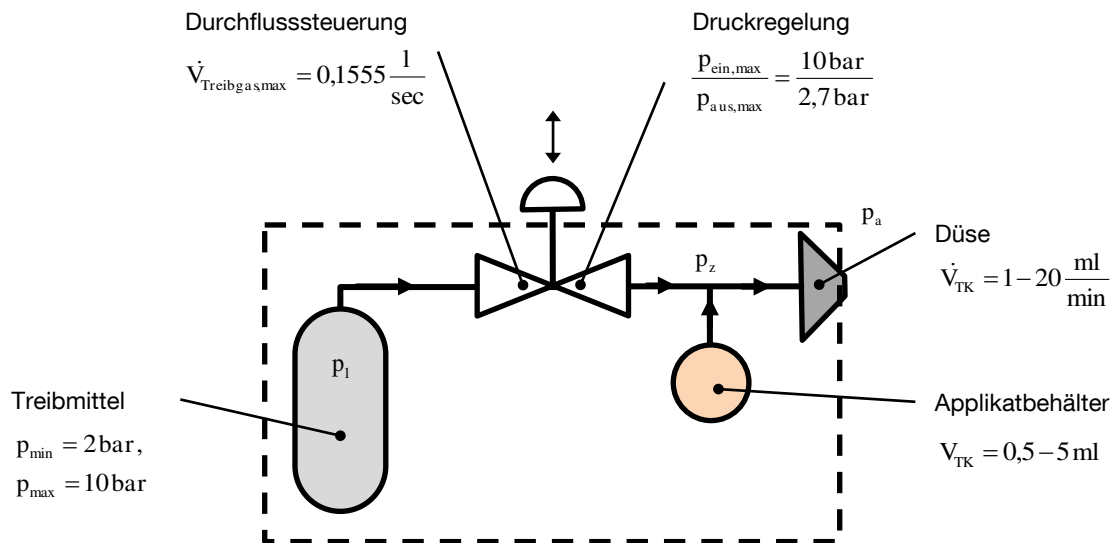


Abb. 4.1 **Schematische Prinzipskizze des Applikationskonzepts**

Die Anforderungen an die Einzelkomponenten orientieren sich an bestehenden Systemen sowie offiziellen Sicherheitsrichtlinien, wie FDA-Verordnungen und DIN-Normen [10, 29].

Das Treibmittel sollte sowohl medizinisch zugelassen als auch nicht entflammbar sein, sowie einen konstanten Druck während der Applikation ermöglichen. Die Treibgaszufuhr wird über einen Schalter, zum Beispiel einen Druckknopf, vom Anwender gesteuert. Der Applikatbehälter muss eine Anschlussmöglichkeit für die 10 ml Spritze, in welcher das TK nach dem Aufkonzentrierungsprozess vorliegt, aufweisen. Desweiteren ist eine gute Entleerbarkeit des Behältnisses ein wesentliches Kriterium, um Verluste während der Auftragung zu vermeiden. Die Applikation des Thrombozytenkonzentrats soll zudem möglichst lageunabhängig sein, ein Kippen des Applikators während des Sprühvorgangs sollte also zu keiner Unterbrechung des Applikatstroms führen. Die Homogenität des Sprühbilds sowie die erzielte Tröpfchengrößenverteilung werden mittels Sprühbildanalyse evaluiert (vgl. Kap.4.2).

4.1.1 Düse

Die Düse soll, in Anlehnung an das Zweistoffdüsenprinzip, so konzipiert werden, dass durch die Geometrie des Treibfluidkanals das Thrombozytenkonzentrat mittels selbstständiger Ansaugung appliziert wird. Die Zuführung des Applikats über Gravitations- oder Druckkräfte wird aufgrund der hierfür benötigten Zusatzkomponenten (elektronisch oder mechanisch gesteuerte Zuführung) nicht betrachtet. Die Selbstansaugung gewährleistet, bei konstantem Treibmittelstrom, eine gleichmäßige Verdüsung des Konzentrats. Zur Erfüllung der in Abb. 4.1 angeführten Anforderungen an den Thrombozytenkonzentrat-Volumenstrom

($\dot{V}_{TK} = 1 - 20 \frac{ml}{min}$) müssen geeignete Durchmesser für den Treibmittel- und den Applikatkanal ermittelt werden.

4.1.2 Treibmedium

In Vorversuchen wurde die Möglichkeit untersucht, Druckluft als Treibfluid zu verwenden (vergleiche Vivostat®-System). Da der Einsatz eines externen Kompressors oder der Hausdruckluftleitung aufgrund der Anforderung zur Vermeidung von Verbindungsschläuchen nicht geeignet ist, wurde die Möglichkeit eines sich am Applikator befindlichen Druckgefäßes evaluiert. Die Gewährleistung eines über mehrere Sekunden andauernden Sprühvorgangs setzt dabei einen über diese Zeitspanne konstanten Treibfluiddruck voraus. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Luft erfordert dies allerdings entweder einen sehr hohen Kompressionsdruck oder ein sehr großes Luftbehältnis. Beides lässt sich mit den Anforderungen an einen Handapplikator nicht vereinbaren.

Aus oben genannten Gründen wird der Einsatz eines alternativen Treibfluids untersucht. Gase mit einem Sättigungsdampfdruck < 10 bar bei Raumtemperatur sollen hierbei besonders beachtet werden. Das Vorliegen eines Phasengemischs bei Raumtemperatur (thermodynamisches Gleichgewicht von Gas- und Flüssigphase) gewährleistet die Aufrechterhaltung eines konstanten Drucks bis zur fast vollständigen Entleerung des Treibfluidbehälters. Sobald Gas ausströmt, kommt es zu einer Gleichgewichtsreaktion: Flüssiges Gas verdampft und expandiert dabei, was wiederum zu einer Aufrechterhaltung des Drucks im Behälter führt. Insbesondere Fluorkohlenwasserstoffe (FKW) sollen hierbei betrachtet werden, da aus dieser Stoffklasse einige Gase für medizinische Anwendungen zugelassen sind [88]. Beispiele sind der Einsatz in Inhalatoren für die Medikamentengabe über die Lunge [32, 57, 71, 103, 115] oder die Verwendung zur pulmonalen Lungenfunktionsmessung [28].

Die Fluorkohlenwasserstoffen 1,1,1,2,3,3,3-Heptafluorpropan (Kurzbezeichnung R227ea) und 1,1,1,2-Tetrafluorethan (Kurzbezeichnung R134a) werden zwar hauptsächlich als Kältemittel in Kühlschränken, Klimaanlage oder Dampfturbinen eingesetzt [65], sind jedoch auch mit medizinischer Zulassung beziehbar und im Gegensatz zu anderen Gasen mit günstigem Sättigungsdampfdruck (z.B. Butan), nicht brennbar. Der in Tab. 4.1 aufgeführte GWP-Wert (Global Warming Potential) gibt Auskunft darüber, wie stark eine bestimmte Menge an Gas zum Treibhauseffekt beiträgt. Vergleichswert ist hierbei das Treibhauspotential von CO_2 (während eines festgelegten Zeitraums), welches den Wert 1 hat. Der praktische Grenzwert bezeichnet die höchste Konzentration in einem Personen-Aufenthaltsbereich, die noch keine plötzlich auftretenden, beeinträchtigenden Auswirkungen auf das Fluchtvermögen der Personen hat [29].

In Tab. 4.1 sind die wichtigsten Kenndaten von zwei Stoffen dieser Klasse aufgeführt.

	R227ea	R134a
Sättigungsdampfdruck	3,9 bar (bei 20°C)	5,7 bar (bei 20°C)
GWP-Wert (Global Warming Potential)	3500	1010
Praktischer Grenzwert nach DIN EN 378-1	0,59 kg/m ³	0,06 kg/m ³

Tab. 4.1 **Kenndaten der Fluorkohlenwasserstoffen R227ea und R134a**
 Beide Gase (R227ea=1,1,1,2,3,3,3-Heptafluorpropan; R134a=1,1,1,2-Tetrafluorethan) sind für medizinische Anwendungen zugelassen [29, 56]. Der GWP-Wert stellt einen Bezug zum Treibhauspotential der Gase her und der praktische Grenzwert gibt Auskunft über das Gefährdungspotential der Stoffe für den Menschen.

Beide Stoffe sind für die Anwendung in einem Thrombozytenkonzentrat-Applikator vorstellbar. Werden die Sättigungsdampfdrücke betrachtet, zusammen mit der Tatsache, dass über einen längeren Zeitraum Gas entnommen werden soll, liegt der Einsatz von R134a nahe. Mit Entnahme von Gas aus dem Vorratsbehälter, verdampft ein Teil des flüssig vorliegenden Treibmediums um das Phasengleichgewicht wieder herzustellen. Hierbei wird Energie in Form von Wärme benötigt, was zu einem Temperaturabfall des Behälters sowie ein damit einhergehender Druckabfall bei längerer Entnahme führt. [56] Durch den höheren Sättigungsdampfdruck von R134a ist dieses Treibfluid für die Bereitstellung eines konstanten Drucks über einen längeren Zeitraum zu bevorzugen.

Der GWP-Wert von R134a beträgt zudem weniger als ein Drittel des Wertes von R227ea, was positiv zu bewerten ist. Zu beachten ist jedoch der in Tab. 4.1 aufgeführte praktische Grenzwert. Dieser ist bei R134a mit 0,06 kg/m³ niedriger als bei R227ea (0,59 kg/m³) und muss bei der Auslegung des Applikators im Bezug auf den maximal erlaubten Volumenstrom an Treibgas während der Anwendung berücksichtigt werden. Mit Hilfe der DIN 1946-4 sowie den Kenndaten von R134a kann dieser ermittelt werden. Damit ist in Raumluftechnischen Anlagen in Gebäuden und Räumen des Gesundheitswesens, in welchen der Applikator Verwendung finden soll, eine Außenluftzufuhr von 40 m³/h je Person vorgeschrieben. Dieser Wert bezieht sich auf Patientenzimmer und sonstige Räume, die nicht unter die Operationsräume fallen. Bei OP-Sälen ist eine wesentlich höhere Außenluftzufuhr vorgeschrieben, was den Einsatz des Treibgases dort unkritischer macht.

Der maximal zulässige Volumenstrom an R134a kann folgendermaßen ermittelt werden:

$$\dot{m}_{R134a \max} = 0,06 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 40 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} = 2,4 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

$\dot{m}_{R134a \max}$ = maximal zulässiger R134a – Massenstrom

$$\dot{V}_{R134a \max} = \frac{\dot{m}_{R134a \max}}{\delta_{R134a(20^\circ\text{C}, 1 \text{ bar})}} = \frac{2,4 \frac{\text{kg}}{\text{h}}}{4,278 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}} = 0,56 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} = 0,16 \frac{\text{l}}{\text{s}} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

$\dot{V}_{R134a \max}$ = maximal zulässiger R134a – Volumenstrom

δ_{R134a} = Dichte von R134a bei 20°C und Umgebungsdruck (1bar) [151]

Damit ergibt sich für R134a ein maximal zulässiger Volumenstrom von 0,16 l/s.

Treibfluidregelung

Der Austrittsdruck, mit dem das Thrombozytenkonzentrat aus dem Applikator ausströmt und auf das Wundgebiet appliziert wird, darf laut FDA-Regelung, bedingt durch die Gefahr der Entstehung einer Luft- bzw. Gasembolie, den Grenzwert von 2,7 bar nicht überschreiten. [10] Um den Volumenstrom des Treibmediums dementsprechend zu regulieren wird ein geeignetes Bedienelement entwickelt, das ein Ventil am Druckbehälter steuert und den Austrittsdruck dosiert.

Applikatorreservoir

Das gewonnene Thrombozytenkonzentrat soll durch einen geeigneten Konnektor in ein Reservoir im Applikator überführt werden. Die Sterilbarriere zwischen Spritze (unsteril) und sterilem Applikator muss dabei besonders berücksichtigt werden. Aufgrund des geringen TK-Volumens ist eine vollständige Entleerung des Reservoirs entscheidend. Zudem muss das Ausströmen des Konzentrats in jeder Lageposition möglich sein.

4.2 Evaluation des Zerstäubungsprozesses

Aus ethischen sowie sicherheitstechnischen Gründen in den hier durchgeführten Versuchen (potentiell infektiöses Material) wird das Spenderblutvolumen so gering wie möglich gehalten und stattdessen vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) für die Evaluation der Zerstäubung verwendet. Hierzu wird aufgrund ähnlicher rheologischer Eigenschaften von

Wasser und Blutplasma [105] eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Thrombozytenkonzentrat angenommen, da dieses aus einer Suspension von Blutplasma und Blutplättchen besteht. Die Nicht-Newtonschen Eigenschaften von Vollblut werden hauptsächlich den Erythrozyten zugeschrieben [105] und können deshalb hier zunächst vernachlässigt werden. Darüber hinaus wird, statt des Fluorkohlenwasserstoffs R134a, auch Druckluft als Treibmittel verwendet, um eine zeitlich unbegrenzte und konstante Gasversorgung zu ermöglichen. Dies ist zur Durchführung repetitiver Versuchsreihen entscheidend.

Die Charakterisierung des Sprühbilds gliedert sich in Sprühkegel- und Tröpfchengrößenbestimmung. Die Untersuchung des Sprühkegels (Winkel und Durchmesser) hat zum Ziel, einen geeigneten Arbeitsabstand sowie den Treibfluid-Betriebsdruck zu definieren. Die Tröpfchengrößenbestimmung dient der Quantifizierung der flüssigen Dispersionsbestandteile des Aerosols.

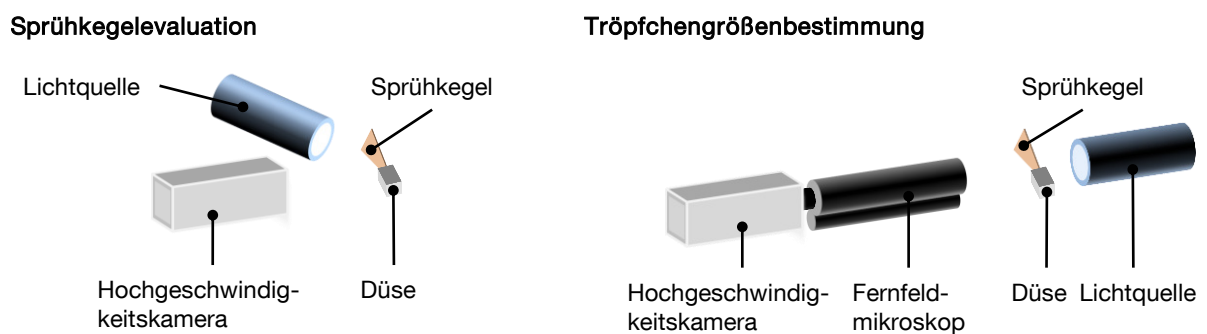


Abb. 4.2 **Prinzipskizze des Messaufbaus zur Sprühkegelevaluation und zur Tröpfchengrößenbestimmung**

Für die Sprühbilduntersuchung (Kegelwinkel und Durchmesser) wird die Lichtquelle im 60°-Winkel zur Hochgeschwindigkeitskamera positioniert. Zur Bestimmung der Tröpfchengröße wird die sog. Schattendarstellung (engl. Shadowgraphy) verwendet. Hierfür wird ein Fernfeldmikroskop vor die Hochgeschwindigkeitskamera platziert und die Lichtquelle koaxial hinter der Düse platziert.

Zur Untersuchung des Sprühbilds und der Tröpfchengrößen werden zwei Messanordnungen mit unterschiedlichen Geräten (Hochgeschwindigkeitskamera, Lichtquelle, Fernfeldmikroskop) verwendet (vgl. Abb. 4.2).

4.2.1 Sprühkegelevaluation

Anhand der Aufnahmen des Sprühkegels mittels High-Speed-Kamera mit bis zu 462 Bildern/Sekunde (HCC-1000 1GB, max. 462 Bilder pro Sekunde (fps), VDS Vosskühler) kann der Kegelwinkel manuell ausgemessen werden. Der Durchmesser des Sprühkegels wird düsennah, 10 mm vor dem Düsenaustritt, ermittelt (siehe Abb. 4.3). Der Treibfluiddruck wird am Eingang der Düse über ein externes Druckregelventil variiert (1,6-2,0 bar). Zusätzlich werden mit eingefärbtem Wasser Sprühabdrücke aus unterschiedlichen Entfernungen ($s = 2$ bis 15 cm) auf einem horizontal angeordneten Tintenstrahldruckerpapier abgebildet und der mittlere Kegeldurchmesser ermittelt (vgl. Abb. 4.3).

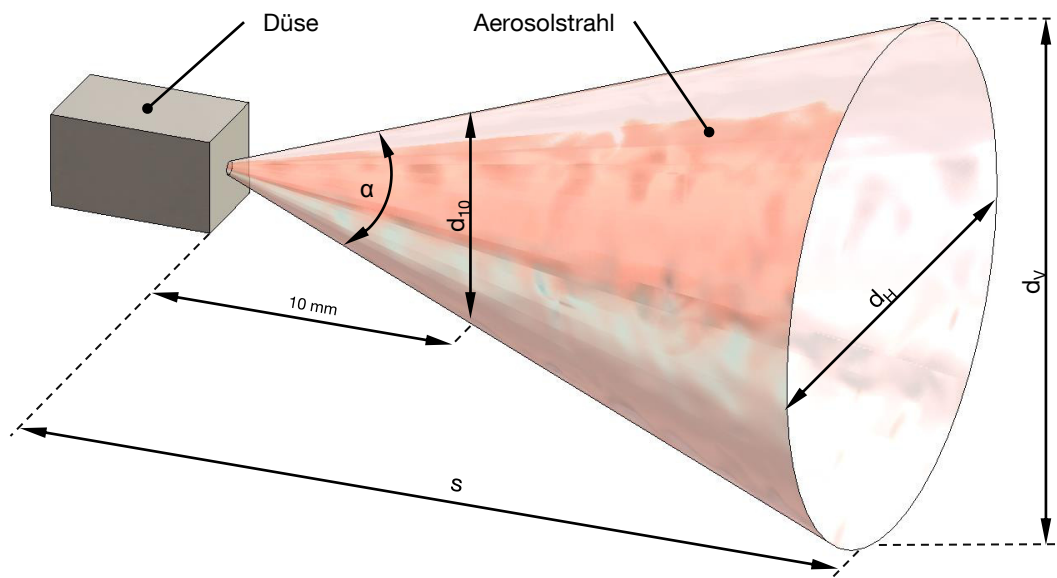


Abb. 4.3 **Ermittlung des düsennahen Sprühkegeldurchmessers und -winkels sowie des Sprühabdruckdurchmessers**

Anhand der High-Speed-Kamera-Aufnahmen kann der Sprühkegelwinkel (α) im stationären Sprühvorgang ermittelt werden. Ebenso wird der Kegeldurchmesser im Abstand von 10mm zum Düsenaustritt bestimmt.

Die horizontalen (d_H) und vertikalen (d_V) Durchmesser werden in den jeweiligen Sprühabdrücken (variierender Sprühabstand s) gemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

Anhand des Sprühabdrucks kann neben der Berechnung des mittleren Durchmessers die Qualität des Sprühbilds beurteilt werden.

$$\bar{d} = \frac{d_H + d_V}{2} \quad (\text{Gl. 4.3})$$

\bar{d} – mittlerer Durchmesser

d_H – horizontaler Durchmesser

d_V – vertikaler Durchmesser

Insbesondere wird die Homogenität betrachtet, das heißt das Auftreten von Abdrücken außerhalb des Kreisumfangs. Qualitativ wird die Ausbildung des Sprühkegels im stationären Zustand bezüglich der Gleichmäßigkeit der Kegelgeometrie sowie der Schärfe der Abtrennung von Kern- zu Randzone beurteilt. Neben dem quasi-stationären Sprühvorgang werden Start- und Endphase dokumentiert. Diese Untersuchungen finden sowohl mit Thrombozytenkonzentrat, als auch mit Wasser statt.

4.2.2 Tröpfchengrößenbestimmung

Die Tröpfchengrößenbestimmung wird ausschließlich mit Druckluft und vollentsalztem Wasser durchgeführt. Die Vermessung des Aerosols erfolgt mit Hilfe der Hochgeschwindigkeitskamera (Fastcam SA1.1, max. 5000 fps, Photron High Speed Cameras, Japan) und vorgeschaltetem Fernfeldmikroskop (QM100, Questar Corporation, USA) in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Verbrennungskraftmaschinen der TU München. Die Tröpfchendurchmesser werden durch ein Softwareprogramm bestimmt. Die diskrete Häufigkeitsverteilung der Durchmesser sowie die Berechnung des Mittelwerts basiert auf den Aufnahmen düssenah und in 5 cm Abstand zum Düsenaustritt. Mit einbezogen werden aufgrund des Auflösungsvermögens der Software (7,2 µm) ausschließlich alle Tröpfchen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 100 µm. Der Düseneingangsdruck beträgt für alle Versuche 2 bar.

4.3 Prototyp-Konfiguration

Anhand der in Kap. 4.2 ermittelten Ergebnisse wird ein Prototyp zur Applikation von Thrombozytenkonzentrat konzipiert. Die Vorgaben zu Treibgas- und TK-Volumenströmen werden auf das System übertragen und ein geeigneter Applikat- und Treibmittelbehälter mit Durchflusssteuerung implementiert und anschließend experimentell evaluiert.

Durchflusssteuerung und Druckregelung

Die Durchflusssteuerung des Treibgas-Volumenstroms wird durch ein Auslassventil reguliert, das über einen Druckknopf bedient werden kann. Als Treibgasspeicher wird eine handelsübliche CO₂-Kartusche (38 g, 1-CO₂ 38US, Fa. Sostechnic, Kiel) verwendet, die mit einem Retrofit-Adapter, integrierbarem Ventil (065-006, Lexxan, Emsdetten) und einer Servicekupplung (Lexxan, Emsdetten) modifiziert wird. Hierdurch lässt sich die Kartusche mit dem Fluorkohlenwasserstoff R134a (SCS-Tec, Wackerdorf) befüllen. Die Servicekupplung wird zur Applikation durch das neu entwickelte Bedienelement (Druckknopf) mit Ventilöffnungsfunktion ausgetauscht. Die Auslassöffnung regelt dabei den ausströmenden Gas-Massenstrom sowie den Düseneingangsdruck p_z des Treibmittels, der basierend auf der Erfassung der geeigneten Volumenströme sowie den Sprühbild-untersuchungen 2 bar betragen soll.

Zur Dimensionierung der Auslassöffnung wird der Treibgasmassenstrom experimentell ermittelt. Hierzu wird eine Gaskartusche über einen Druckregler mit 2 bar Düseneingangsdruck an die Düse angeschlossen und das Gewicht des Gesamtsystems vor und nach Ausströmen des Treibgases bestimmt.

Der Massenstrom ist definiert als

$$\dot{m} = \rho_0 \cdot A \cdot v \quad (\text{siehe Gl.2.1})$$

mit

ρ_0 – Dichte des Treibgases in der Umgebung

A – Querschnittsfläche der Auslassöffnung

v – Ausströmgeschwindigkeit

Die Ausströmgeschwindigkeit v kann im Fall geltender Freistrahbedingungen und einer reibungsfreien, isentropen Zustandsänderung über die Ausflussformel von Saint-Venant und Wantzel berechnet werden [134].

$$v = \frac{\sqrt{2\rho_1 \cdot p_1}}{\rho_0} \cdot \Psi \quad (\text{Gl. 4.4})$$

ρ_1 – Dichte des Treibgases im Druckbehälter

p_1 – Druck im Behälter

Ψ repräsentiert dabei die Ausflussfunktion und ist definiert als

$$\Psi = \sqrt{\frac{\kappa}{\kappa - 1} \left[\left(\frac{p_0}{p_1} \right)^{\frac{2}{\kappa}} - \left(\frac{p_0}{p_1} \right)^{\frac{\kappa+1}{\kappa}} \right]} \quad \text{mit} \quad \kappa = \frac{c_p}{c_v} \quad (\text{Gl. 4.5})$$

κ – Isentropenexponent

c_p – isobare Wärmekapazität

c_v – isochore Wärmekapazität

Der Einfluss von Reibungseffekten sowie der Strahlkontraktion wird durch die Ausflusszahl μ berücksichtigt. Diese ist abhängig von den Eigenschaften der Auslassöffnung (Geometrie, Rauigkeit) und nimmt in realen Strömungsvorgängen einen Wert < 1 an. Dadurch ergibt sich für den Massestrom folgende Gleichung:

$$\dot{m} = \mu \cdot \Psi \cdot A \cdot \sqrt{2 \cdot p_1 \cdot \rho_1} \quad (\text{Gl. 4.6})$$

μ = Ausflusszahl

Die Ausflussfunktion ist maßgeblich vom Verhältnis zwischen Innen- und Außendruck abhängig und erreicht bei einem kritischen Druckverhältnis einen konstanten Wert:

$$\left(\frac{p_0}{p_1} \right)_{krit} = \left(\frac{2}{\kappa + 1} \right)^{\frac{\kappa}{\kappa - 1}} \quad (\text{Gl. 4.7})$$

Wird dieses kritische Druckverhältnis unterschritten findet ein überkritischer Ausströmvorgang mit $\Psi = \Psi_{max}$ und $\dot{m} = \dot{m}_{max}$ statt:

$$\Psi = \Psi_{max} = \sqrt{\frac{\kappa}{\kappa - 1} \left[\left(\frac{p_0}{p_1} \right)_{krit}^{\frac{2}{\kappa}} - \left(\frac{p_0}{p_1} \right)_{krit}^{\frac{\kappa+1}{\kappa}} \right]} = const \quad \text{für} \quad \left(\frac{p_0}{p_1} \right) \leq \left(\frac{p_0}{p_1} \right)_{krit} \quad (\text{Gl. 4.8})$$

$$\dot{m} = \dot{m}_{max} = \Psi_{max} A \sqrt{2 p_1 \rho_1} = const \quad (\text{Gl. 4.9})$$

Die Ausströmfläche und damit der Durchmesser der Auslassbohrung für den erforderlichen Düseneingangsdruck $p_z = 2$ bar errechnet sich somit aus

$$A = \frac{\dot{m}}{\mu \Psi \sqrt{2 p_1 \rho_1}} \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Applikatreservoir

Um eine vollständige Entleerung des Applikatreservoirs zu ermöglichen, wird ein kollabierbarer Silikonbeutel implementiert. Dieser wird im Tauchverfahren aus 2-Komponenten-Silikon (SILPURAN 2430, Wacker Chemie AG, München) gefertigt. Hierzu wird eine konisch zulaufende, zylindrische Form in das Silikon eingetaucht und das offene Ende nach Entfernung des Kerns mit Silikonklebstoff (SILPURAN® 4200, Wacker Chemie AG, München) versiegelt. Stirnseitig wird während des Tauchvorgangs ein Silikonschlauch befestigt und ebenfalls mit abgeformt. Die hierdurch entstehende Auslassöffnung ermöglicht den Anschluss des Reservoirs an einen 3-Wege-Hahn, welcher anschließend mit der Düse verbunden wird (vgl. Abb. 4.4).

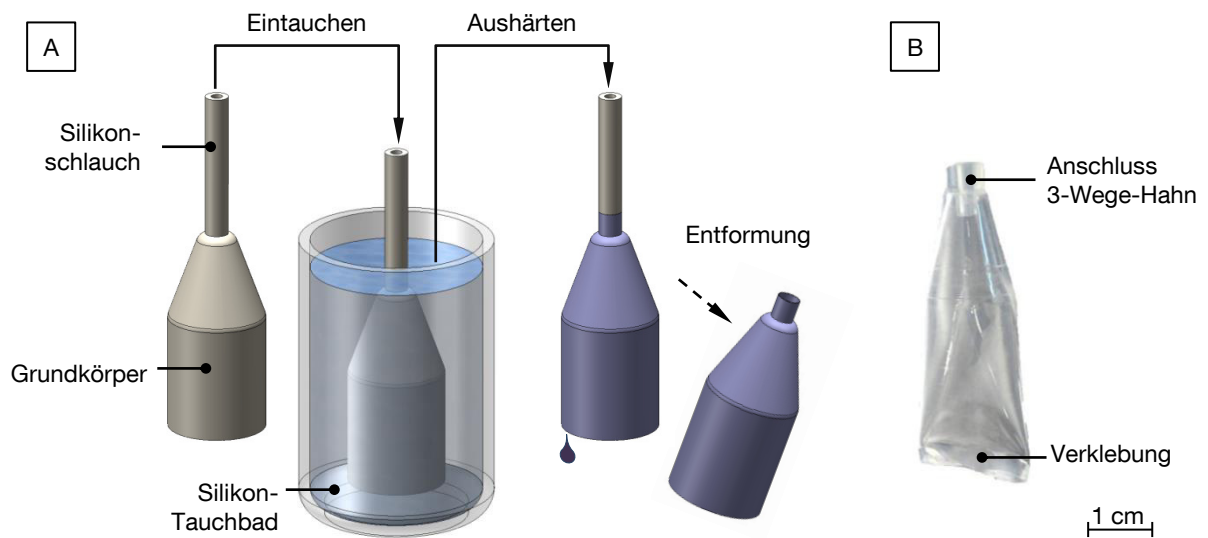


Abb. 4.4 **Fertigung des Applikatreservoirs im Tauchverfahren**

A: Ein konisch zulaufender Zylinder mit stirnseitig integriertem Silikonschlauch wird in Silikon getaucht und anschließend im Wärmeofen ausgehärtet.
 B: Nach Entfernung des Formkerns wird das offene Ende des Reservoirs mit Klebstoff versiegelt. Der fertige Applikatbeutel wird mit einem Luer-Lock-Adapter an den 3-Wege-Hahn angeschlossen.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Düse

Der Aufbau und die Geometrie des Düsenkopfs ist in Abb. 4.5 dargestellt. Mit den entsprechenden Durchmessern d_1 bis d_4 werden die Anforderungen an den Applikatvolumenstrom ($\dot{V}_{TK} = 1 - 20 \frac{ml}{min}$) und den Treibmittelvolumenstrom ($\dot{V}_{R134a\ max} = 0,16 \frac{l}{s}$) erfüllt.

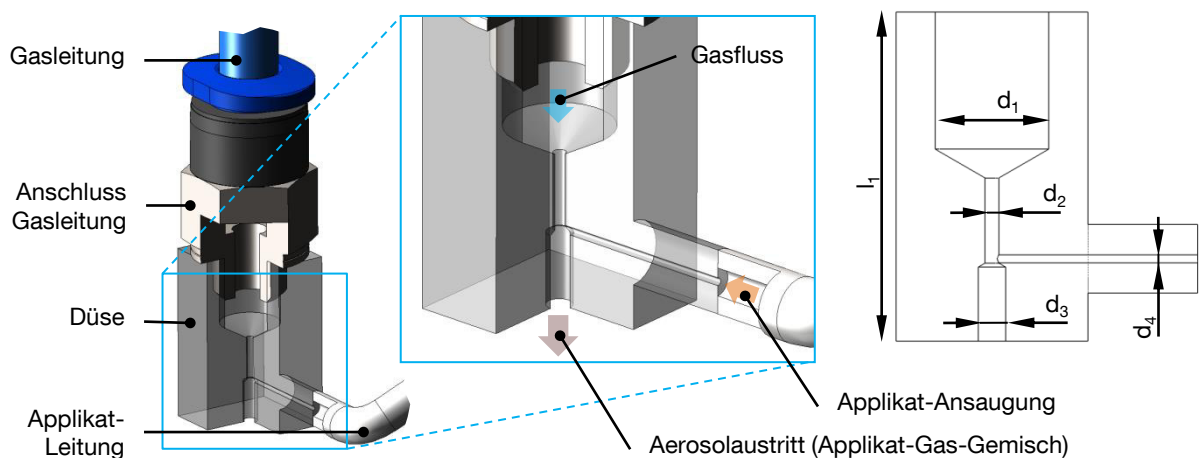


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der Düse

Der Düsenkopf besitzt eine Gesamtlänge von 12 mm (l_1) und wird über einen Schlauch mit dem Druckgasbehälter verbunden. Das Treibmittel durchströmt den Treibmittelkanal ($d_2=0,5$ mm) und wird beschleunigt. Durch den entstehenden Unterdruck wird das Applikat angesaugt ($d_4=0,3$ mm) und zusammen mit dem Treibmittel über den Mischkanal ($d_3=1$ mm) in die Umgebung versprüht.

Ähnlich einer Lavaldüse verjüngt sich der Querschnitt des Treibmittelkanals ($d_1/d_2 = 8,2$) und weitet sich anschließend im Mischkanal wieder geringfügig auf. Dies bewirkt eine Beschleunigung des Treibmittels und es entsteht ein Unterdruck, der das Thrombozytenkonzentrat durch den Applikatkanal ansaugt und über den Mischkanal in die Umgebung verdüst.

Volumenströme

Mit Erhöhung des Düseneingangsdrucks von 1,6 bar auf 2 bar nimmt der Applikatvolumenstrom konstant zu. Dabei ist kein signifikanter Einfluss des Treibmittels (R134a bzw. Druckluft) zu erkennen (vgl. Abb. 4.6). Beide Treibgase erzielen die geforderten Applikat-

Volumenströme. Treibmitteldrücke $< 1,6$ bar führen zu einem unregelmäßigen Sprühverhalten (vgl. Abb. 4.9) mit temporären Unterbrechungen der Applikatansaugung. Somit kann ein Grenzwert von 1,6 bar festgelegt werden, mit welchem ein Flüssigkeitsvolumenstrom von 7,2 ml/min (bei R134a) bzw. 6,6 ml/min (bei Druckluft) realisiert wird.

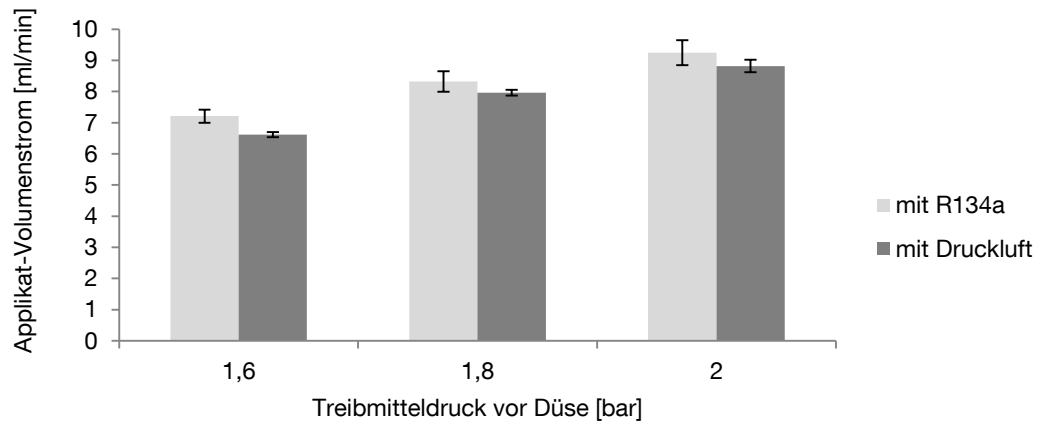


Abb. 4.6 **Applikat-Volumenstrom in Abhängigkeit des Eingangsdrucks**

Der Treibmitteldruck am Düseneingang hat einen direkten Einfluss auf das angesaugte Applikatvolumen. Beide Treibgase, sowohl Druckluft, als auch Fluorkohlenwasserstoff R134a, erreichen jeweils die geforderten Volumenströme (Mittelwert mit Standardabweichung; $n = 5$).

Der Volumenstrom von R134a ist, bei gleichem Düseneingangsdruck, im Vergleich zum Druckluft-Volumenstrom um ca. 50 % geringer (vgl. Abb. 4.7).



Abb. 4.7 **Treibmittel-Volumenströme in Abhängigkeit des Eingangsdrucks**

Sowohl bei Druckluft als auch beim Fluorkohlenwasserstoff R134a erhöht sich der Volumenstrom mit zunehmendem Düseneingangsdruck. Im Vergleich liegt der R134a-Volumenstrom jedoch bei den gemessenen Drücken bei nur ca. 48 % des Druckluft-Volumenstroms.

Der maximale R134a-Volumenstrom von 0,035 l/s (bei 2 bar Eingangsdruck) liegt weit unter dem vorgeschriebenen gesetzlichen Grenzwert von 0,16 l/s (siehe (Gl. 4.2) und kann somit gefahrlos eingesetzt werden.

Sprühbilduntersuchung

Die Untersuchung des Sprühkegels bei variierendem Düseneintrittsdruck zeigt eine gut ausgebildete Kernzone ab Drücken von 2 bar, sowohl mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) als auch mit Thrombozytenkonzentrat (vgl. Abb. 4.8).

Vollentsalztes Wasser

TK

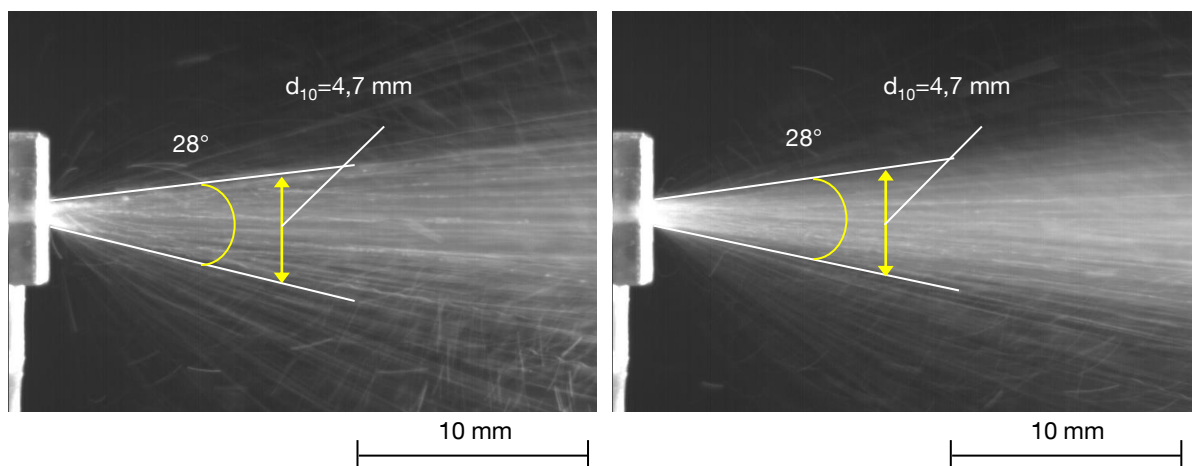


Abb. 4.8 **Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der Sprühkegel von VE-Wasser und TK**
Bei einem Treibmitteldruck von 2 bar (am Düseneingang) bildet sich sowohl bei VE-Wasser (demineralisiert) als auch bei TK im stationären Sprühvorgang eine deutlich abgrenzbare Kernzone aus. Der Sprühkegel beträgt bei beiden Fluiden 28°, der Kegeldurchmesser in 10 mm Abstand zur Düse misst 4,7 mm (Belichtungszeit 4,3 ms; 230 fps; Blendenzahl 4).

Bei Drücken < 2 bar bildet sich im stationären Sprühvorgang keine differenzierbare Kernzone aus. Die Divergenz des Sprühkegels ist in Abb. 4.9 deutlich zu erkennen. Eine korrekte und reproduzierbare Bestimmung des Kegelwinkels sowie des -durchmessers ist hierbei nicht mehr möglich.

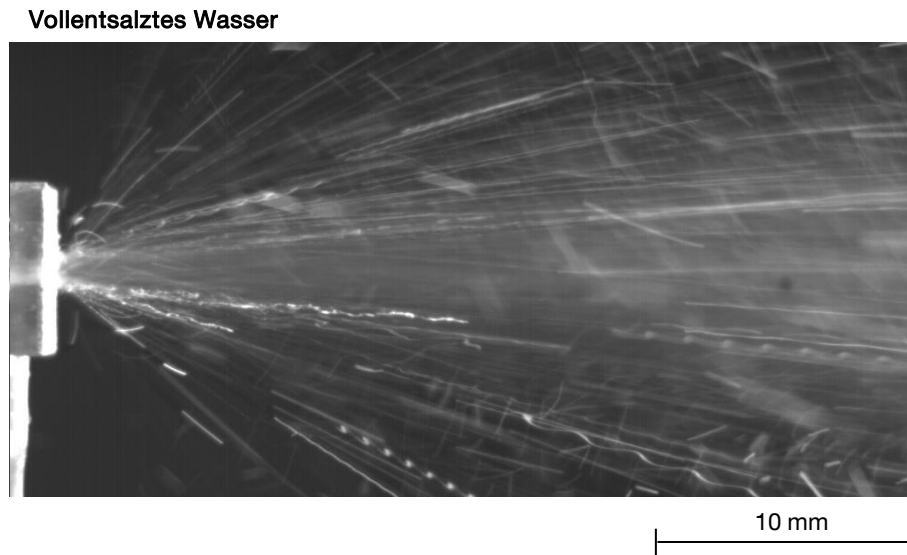


Abb. 4.9 **Unzureichende Sprühkegelbildung bei einem Applikationsdruck von 1,6 bar**
Der Sprühkegel im stationären Zustand ist bei einem Druck von 1,6 bar breit und diffus, mit einer größeren Streubreite der Tröpfchen. Eine klare Abgrenzung des Kernbereichs kann nicht bestimmt werden. (Belichtungszeit 4,3 ms; 230 fps; Blendenzahl 4)

Die Erhöhung des Drucks am Düseneintritt auf > 2 bar führt zu einer noch präziseren Abgrenzung der Kernzone. Allerdings steigt dadurch auch der Applikatvolumenstrom über das als sinnvoll erachtete Maß an.

Die Bildung eines vollständig aufgebauten, stabilen Sprühkegels dauert, vom Start des Sprühvorgangs an, etwa 30 ms. Zu Beginn können größere Tröpfchen, sichtbar als dickere Striche, detektiert werden (vgl. Abb. 4.10-Bilder C bis E). Nach ca. 30 ms ist die Sprühkegel-Kernzone vollständig ausgebildet, mit einem homogenen Erscheinungsbild.

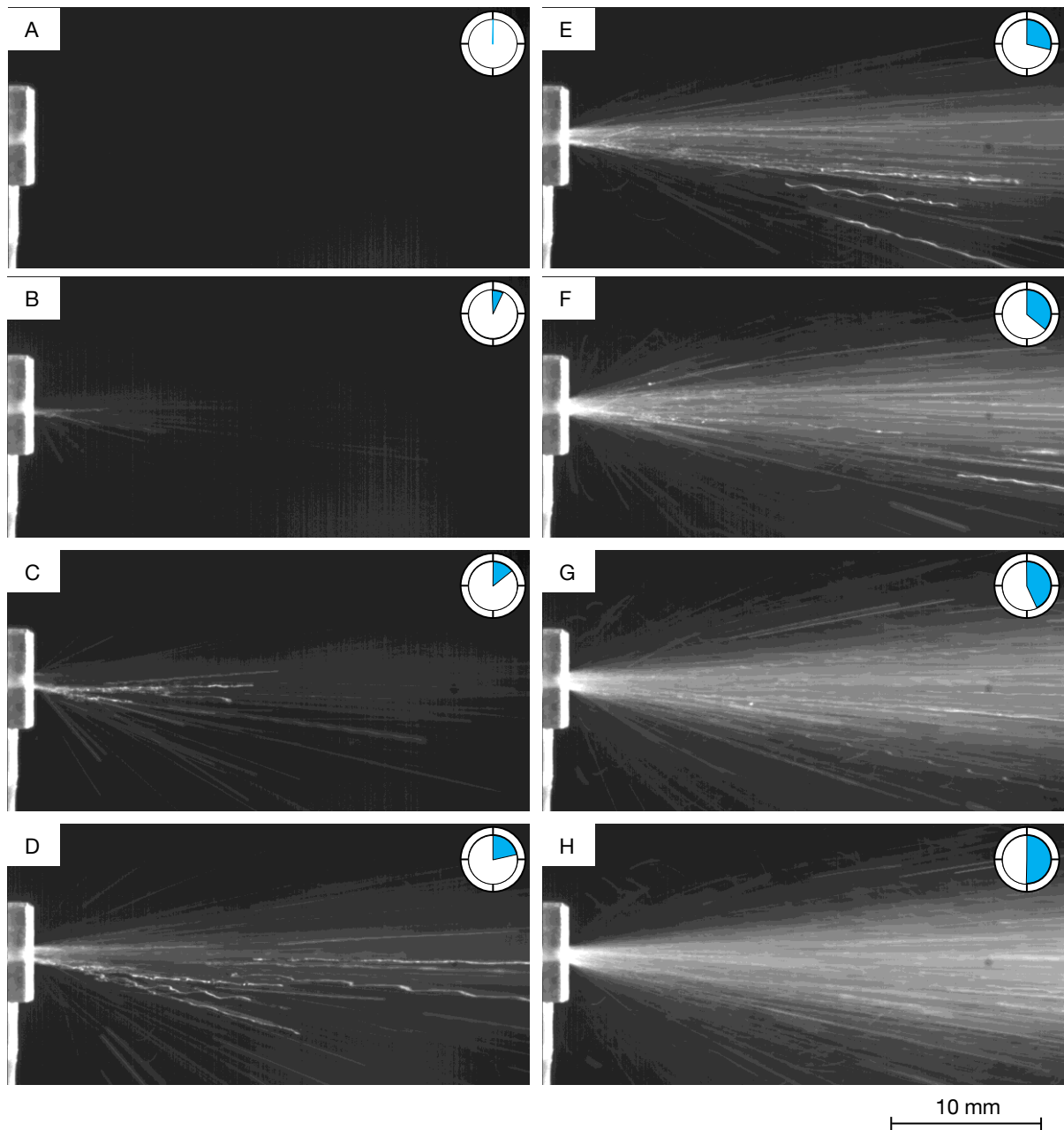


Abb. 4.10 **Entstehung eines vollausgebildeten Sprühkegels**
Bis zur Ausbildung eines vollständigen Sprühkegels dauert es ca. 30 ms. In der Startphase werden teilweise größere Tröpfchen versprüht (Bilder C bis E). Bei ausgebildeter Kernzone ist eine homogene Verteilung und Tropfengröße erkennbar (Zeitintervall zwischen den einzelnen Aufnahmen: 4,3 ms).

Die Vermessung der Sprühabdrücke erfolgt bei variierendem Applikationsabstand (2 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm) sowie steigendem Applikationsdruck (1,6 bis 2,2 bar, Inkrement 0,2 bar).

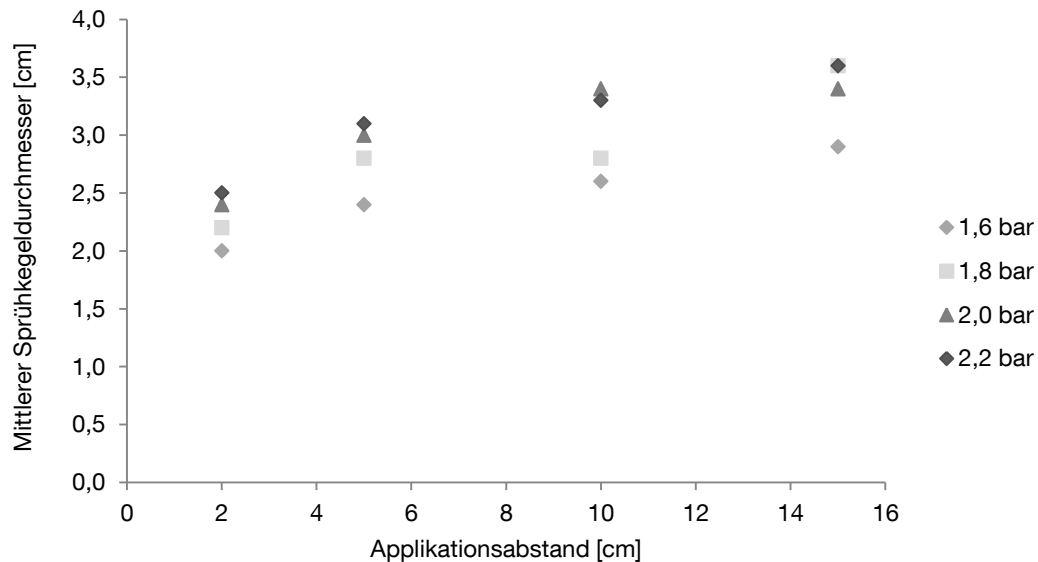


Abb. 4.11 **Durchmesser der Sprühabdrücke in Abhängigkeit des Applikations-abstands und des Applikationsdrucks**

Mit steigendem Applikationsdruck sowie größerem Abstand zwischen Düse und Applikationsfläche nimmt der mittlere Durchmesser des Sprühabdrucks zu. Der Maximalwert von 3,6 cm wird für einen Druck von 2,2 bar bei einem Applikationsabstand von 15 cm gemessen (Mittelwerte; $n = 2$).

Bei steigendem Applikationsabstand wird eine zunehmende Tröpfchenstreuung beobachtet und zudem bildet sich kein präzise abgrenzbarer Sprühabdruck mehr. Hierdurch können die Durchmesser des Abdrucks bei einem Düseneingangsdruck von 2 bar und Applikationsabständen von 10 cm und 15 cm nicht reproduzierbar bestimmt werden (vgl. Abb. 4.12).

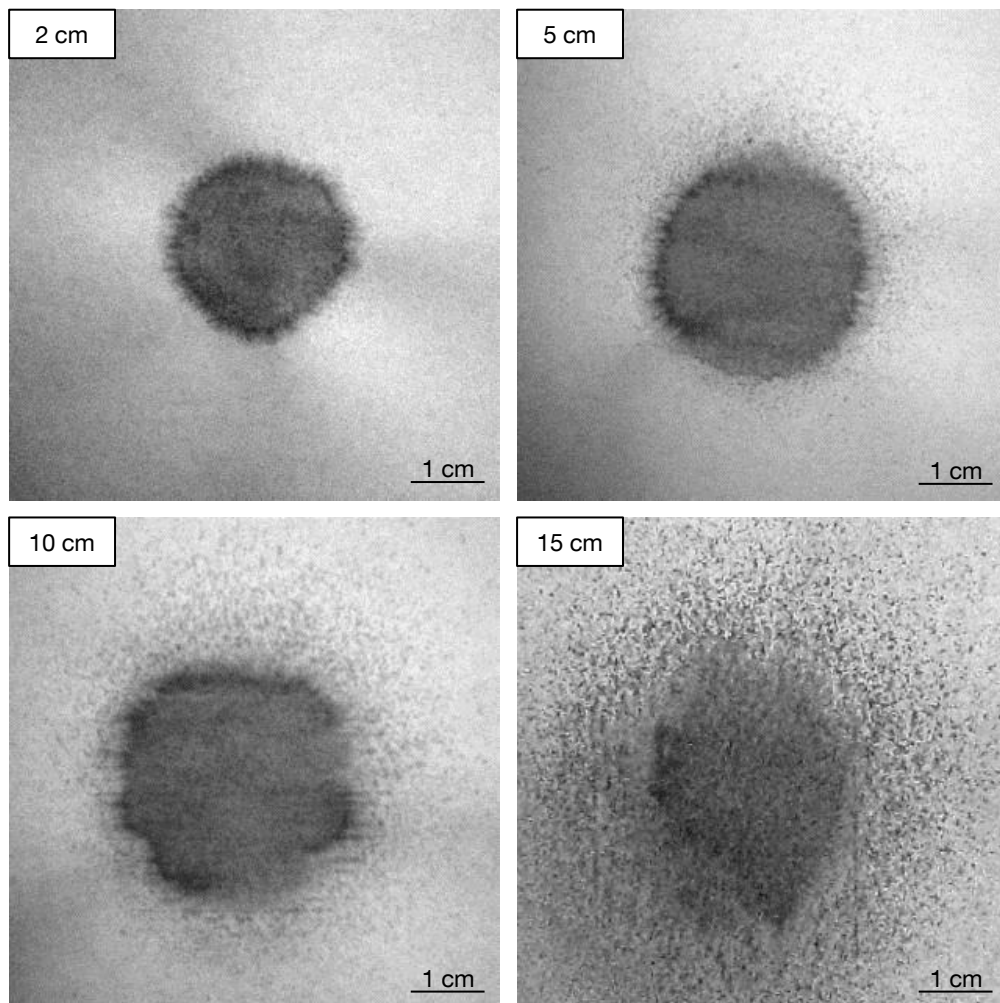


Abb. 4.12 **Sprühabdrücke bei konstantem Applikationsdruck (2 bar) und zu-nehmendem Applikationsabstand**

Ab einem Applikationsabstand von 10 cm bildet sich ein diffuser Sprühabdruck. Die Bestimmung des Abdruckdurchmessers ist bei 15 cm nicht mehr möglich. Bei Abständen von 2 cm und 5 cm bildet sich hingegen ein klar abgrenzbarer Sprühabdruck aus.

Bei konstantem Applikationsabstand (5 cm) und Variation des Applikationsdrucks tritt bei einem Druck von 1,6 bar eine deutliche Streuung der Tröpfchen in Richtung des oberen Düsenrands auf (vgl. Abb. 4.13), die sich durch Steigerung des Applikationsdruck reduziert. Ab einem Druck von 2,2 bar ist ein konzentrisch verlaufender Rand um den primären Sprühabdruck zu erkennen. Dies resultiert aus dem erhöhten Applikatvolumenstrom.

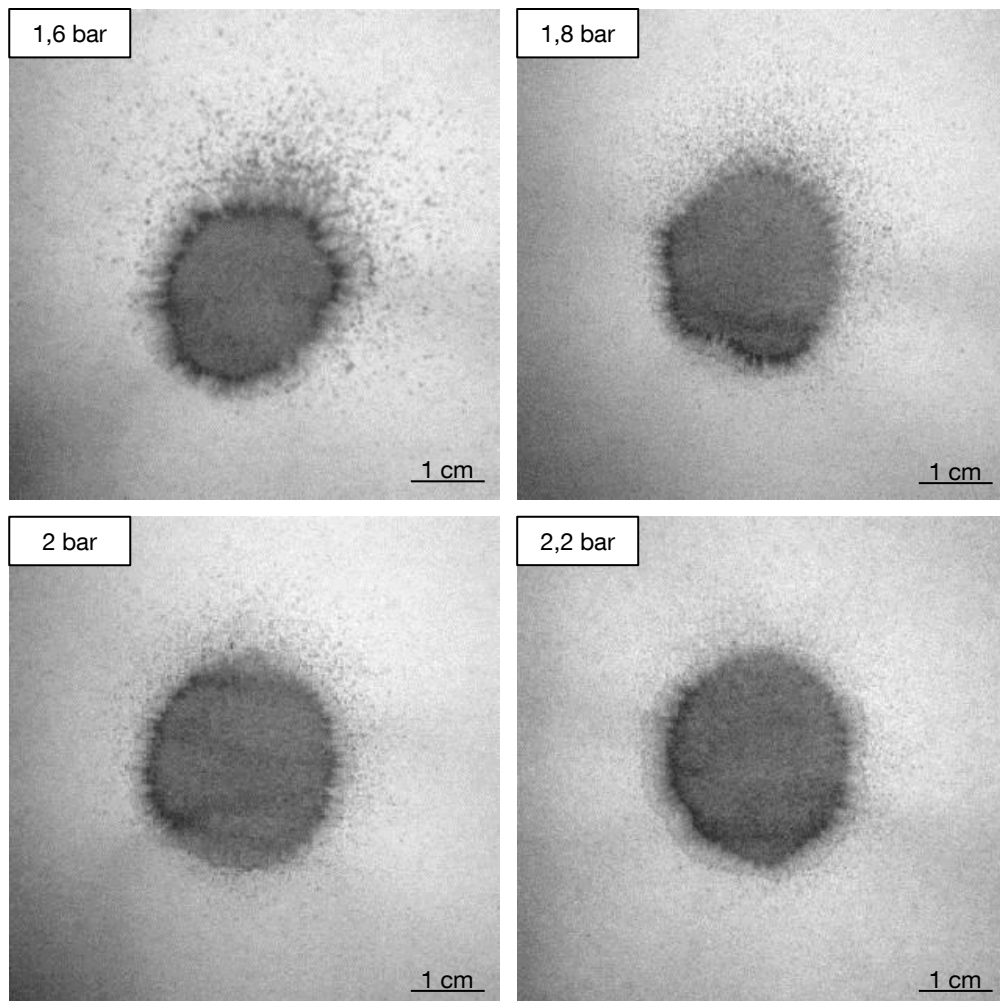


Abb. 4.13 **Sprühabdrücke bei konstantem Applikationsabstand (5 cm) und steigendem Applikationsdruck**

Bei 1,6 bar streuen die Tröpfchen zum oberen Düsenrand hin, was durch den ansteigenden Druck reduziert werden kann. Mit 2,2 bar ist ein deutlicher Flüssigkeitsrand um den Sprühabdruck zu erkennen, der durch den höheren Applikat-Volumenstrom hervorgerufen wird.

Die Auswertung der Tröpfchengrößenverteilung erfolgt mittels Bildauswertesoftware (vgl. Abb. 4.14). Es ist zu erkennen, dass sich aufgrund der hohen Strömungsgeschwindigkeit eine turbulente Strömung am Düsenende ausbildet und die Flüssigkeit verdunstet wird. Der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung verursacht dabei teilweise eine transversale, wellenförmige Schwingung des Flüssigkeitsstrahls (vgl. Abb. 4.14-Bild C und D). Dies wird auch Zerwellung genannt [68] und ist gekennzeichnet durch den Strahlzerfall kurz nach Düsenaustritt [144].

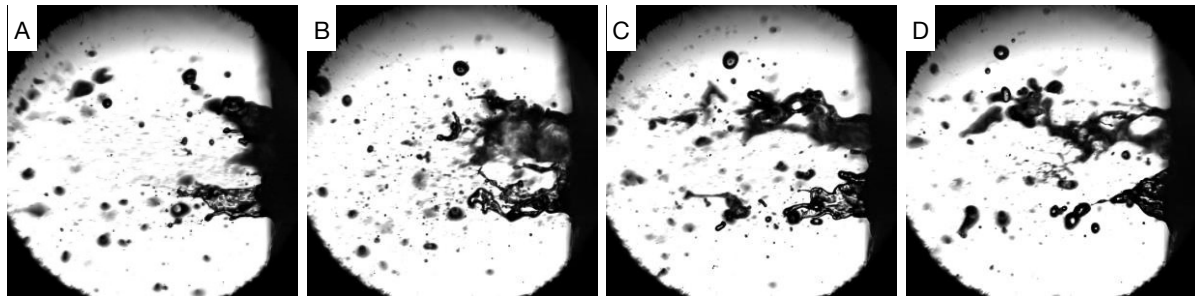


Abb. 4.14 **Ausbildung einer turbulenten Strömung am Düsenausgang**
Der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung am Düsenaustritt bewirkt eine Zerwellung des Flüssigkeitsstrahls (Bilder C und D). Kurz nach Verlassen der Düse zerfällt der Flüssigkeitsstrahl in einzelne Tröpfchen.

Die Bildauswertesoftware detektiert Tröpfchen, die sich in der Fokusebene befinden und markiert diese (vgl. Abb. 4.15). Dabei können, abhängig von der Bildaufnahmequalität und der Softwareeinstellungen teilweise fehlerhafte Abgrenzungen auftreten (vgl. Abb. 4.22). Anschließend werden die Messpunkte automatisiert von der Software statistisch ausgewertet.

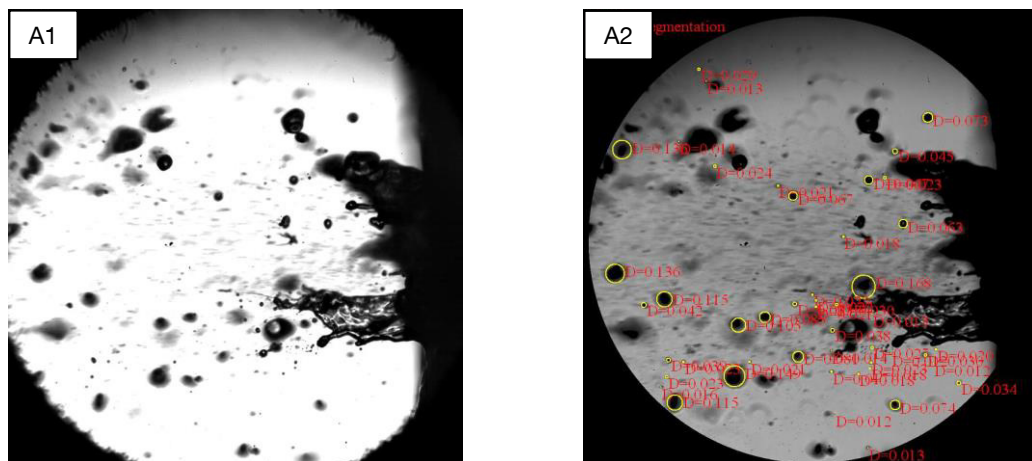


Abb. 4.15 **Tröpfchengrößenbestimmung mittels Bildsoftware**
Tröpfchen, die sich innerhalb der Fokusebene befinden, werden detektiert, markiert (Markierung in A2) und statistisch berechnet. Insgesamt werden 540 Einzelbildaufnahmen je Durchlauf ausgewertet (düsenah und mit 5 cm Düsenabstand bei 2 bar Düseneingangsdruck).

Für die Analyse wird ein Ergebnis verwendet, bei welchem düsenah 12.551 Tröpfchen und in 5 cm Abstand zur Düse 5.632 Tröpfchen erfasst und in die Auswertung eingeschlossen werden. Die reduzierte Anzahl der düsenfernen Tröpfchen wird dabei wahrscheinlich durch die Kegelaufweitung während des Sprühvorgangs verursacht. Eine gleichmäßige Verdüsung

des Applikats kann für beide Fokuspunkte nachgewiesen werden. 39 % der düsennahen Tröpfchen und 33 % der detektierten Tröpfchen in 5 cm Abstand besitzen einen Durchmesser in der Größenordnung von 10 bis 15 μm . Der anschließende steile Abfall der diskreten Häufigkeitsverteilung ist in Abb. 4.16 dargestellt.

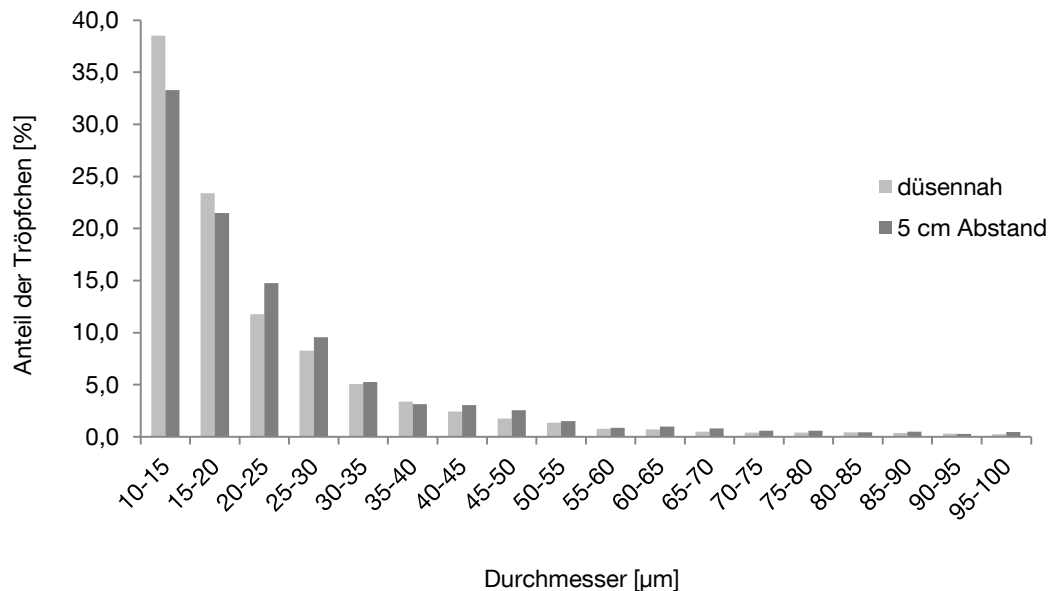


Abb. 4.16 **Diskrete Häufigkeitsverteilung der Tröpfchendurchmesser düsennah und in einem Abstand von 5 cm**

Insgesamt werden in dieser Messung düsennah 12.551 und in 5 cm Abstand 5.632 Tröpfchen ausgegeben und in die softwaregestützte Auswertung aufgenommen. Für diese wird ein Intervall von 10 bis 100 μm Durchmesser festgelegt. Die steil abfallende Kurve der Tröpfchengrößenverteilung mit einem deutlichen Maximum bei 10-15 μm repräsentiert eine gleichmäßige Zerstäubung des Fluids sowohl direkt nach Düsenaustritt, als auch in 5 cm Abstand zur Düse (Applikationsdruck: 2 bar).

Insgesamt wird ein mittlerer Tröpfchendurchmesser von 21,4 μm düsennah und 26,7 μm in 5 cm Abstand zur Düse ermittelt. Die Minimalwerte liegen für beide Einstellungen bei 7,6 μm , da dies die Auflösungsgrenze der Software darstellt, und die Maximalwerte bei 351,2 μm (düsennah) und 309,9 μm (5 cm).

Das Ergebnis der Tröpfchengrößenverteilung spricht für die erwartete Homogenität des Applikats, wobei beachtet werden muss, dass die Versuche ausschließlich mit Wasser durchgeführt wurden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Thrombozytenkonzentrat muss daher kritisch betrachtet werden. Zwar ist Blutplasma aus rheologischer Sicht vergleichbar mit Wasser [105], dennoch wird die Viskosität durch die im TK enthaltenen korpuskulären Bestandteile, insbesondere durch die restlichen Erythrozyten, erhöht [9]. Dies wirkt sich auf die Fließeigenschaften und damit auch potentiell auf die Sprühcharakteristik

aus. Die TK-Verteilung auf einer ebenen Fläche wird daher mittels rasterelektronischer Aufnahmen überprüft (Abb. 4.18).

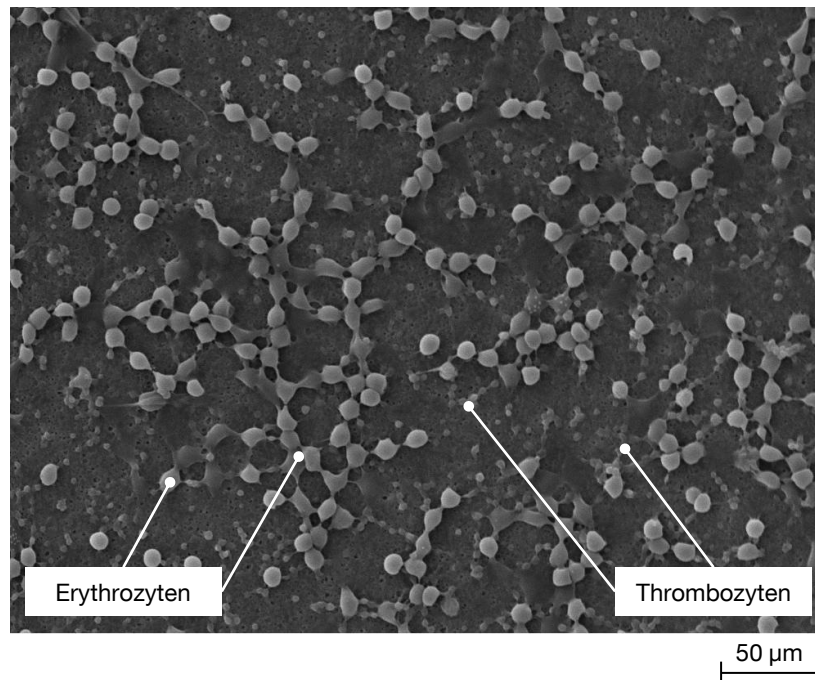


Abb. 4.17 Verteilung des applizierten Thrombozytenkonzentrats (mit EDTA) auf einer Polyethersulfonmembran

Die Blutbestandteile werden durch den Sprühvorgang homogen auf der Oberfläche verteilt. Neben den Thrombozyten liegen auch verbliebene Erythrozyten überwiegend vereinzelt, ohne ausgeprägte Agglomerate, vor. (750 x; 15 kV)

Die Untersuchung des Sprühbilds zeigt, dass sich die Blutbestandteile homogen auf der Oberfläche verteilen.

4.4.2 Applikator

Durchfluss- und Drucksteuerung

Zur Steuerung des Treibgasstroms wird ein Retrofit-Adapter mit integriertem Ventil, welches über ein eigens konstruiertes Druckknopfsystem (siehe Abb. 4.18) bedient wird, am Treibmittelbehälter konnektiert.

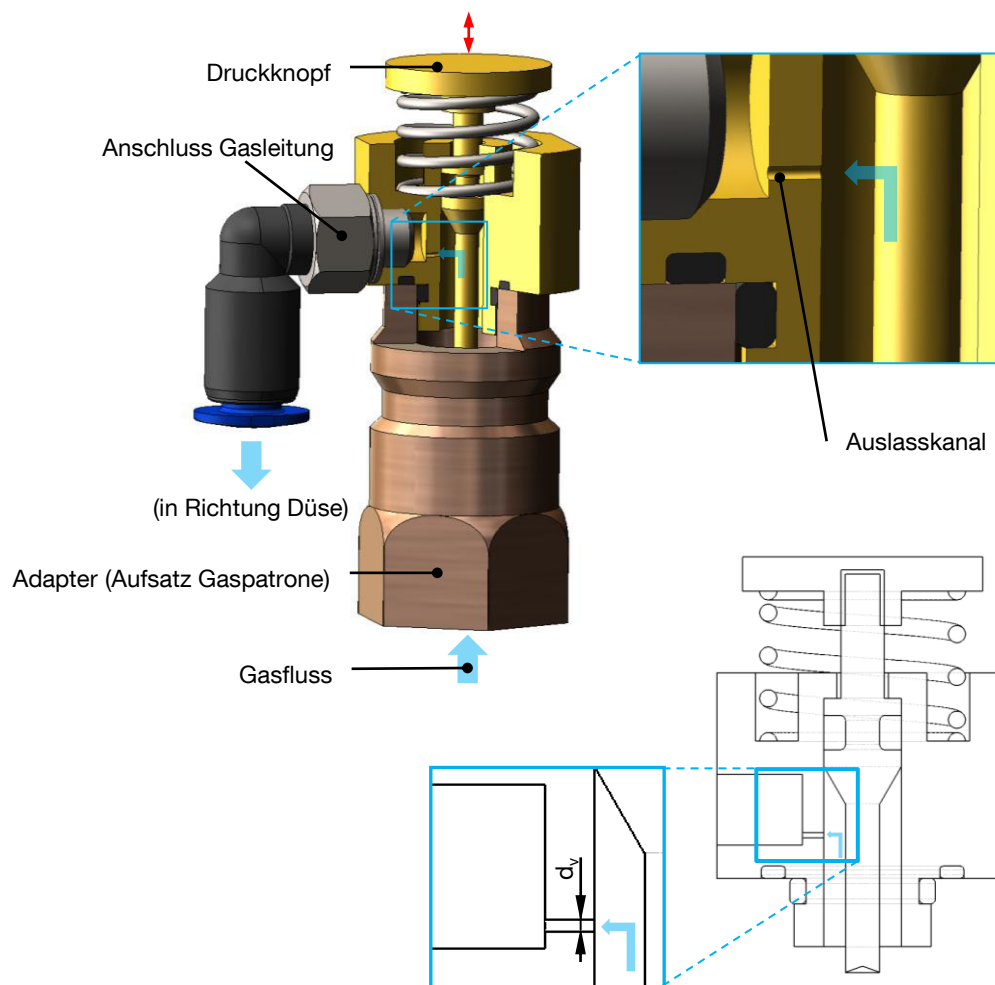


Abb. 4.18 **Bedienelement zur Steuerung des Gas-Auslassventils**
Durch die Betätigung des Druckknopfs wird der Gasfluss aktiviert. Der Durchmesser der Auslassöffnung (d_v) bestimmt dabei den ausströmenden Gas-Massestrom sowie den Druck am Düseneingang. Das Bedienelement wird auf den Retrofit-Adapter (mit integriertem Ventil) aufgeschraubt. Eine detaillierte technische Zeichnung des Bedienelements ist in Anhang G zu finden.

Zur anwendungsbezogenen Auslegung der Gas-Auslassöffnung (d_v) werden die in Tab. 4.2 gelisteten Werte herangezogen. Der Druck wird zunächst zwischen Behälterdruck (p_1) und dem Druck zwischen Ventil und Düse (p_z) verglichen und anschließend die Bedingungen des Zwischenbereichs denen der Umgebung (p_a) gegenübergestellt (vgl. Abb. 4.1).

Bezeichnung		Wert	Einheit	Erläuterung
Behälter-Innendruck	p_1	5,7	[bar]	Sättigungsdampfdruck von R134a bei 20°C [56]
Gasdichte im Druckbehälter	ρ_1	27,78	[kg / m ³]	Dichte der Gasphase von R134a bei 20°C und Sättigungsbedingungen [56]
Umgebungsdruck	p_a	1	[bar]	Atmosphärischer Druck
Zwischendruck	p_z	2	[bar]	Optimaler Eingangsdruck vor der Düse (vgl.4.4.1)
Querschnittsfläche des Treibgaskanals	A_D	0,196	[mm ²]	Bohrungsdurchmesser des Treibgaskanals der Düse: 0,5 mm
Treibgas-Massestrom	\dot{m}	9,77	[g/min]	Orientierender Versuch zum Treibgasverbrauch
Isentropenexponent	κ	1,1215	[-]	Nach (Gl. 4.5) und mit Wärmekapazitäten von R134a bei 20°C, 1 bar [166]
Ausflusszahl	μ	1	[-]	Reibung wird vernachlässigt.

Tab. 4.2 **Kennwerte zur Dimensionierung der Auslassöffnung**
Die Gas-Auslassöffnung beeinflusst den Zwischendruck vor dem Düseneintritt und somit den Applikat-Volumenstrom.

Das Druckverhältnis von Behälterinnendruck zu Zwischendruck (vor Düseneingang) errechnet sich zu 0,35. Der Vergleich mit dem kritischen Druckverhältnis zeigt mit

$$\left(\frac{p_z}{p_1}\right)_{krit} = 0,58 > \left(\frac{p_z}{p_1}\right) = 0,35 \quad (\text{Gl. 4.11})$$

ein überkritisches Ausströmverhalten. Mit (Gl. 4.10), dem orientierend ermittelten Treibgas-Massestrom von 9,77 g/min, dem erwünschten Zwischendruck von 2 bar und der maximalen Ausflussfunktion von 0,45 errechnet sich die Querschnittsfläche zu $A = 0,065 \text{ mm}^2$ und somit zu einem Durchmesser der Auslassöffnung (d_v) von 0,29 mm.

Zur Überprüfung der Eignung eines Auslassdurchmessers von 0,3 mm werden der auftretende Zwischendruck sowie Massestrom rechnerisch bestimmt.

Der Treibgas-Massestrom durch das Auslassventil ist aufgrund des überkritischen Ausströmvorgangs unabhängig von p_z und ergibt 10,74 g/min. Zur Bestimmung des dazugehörigen Zwischendrucks wird die Düse betrachtet. Hier kann ab $p_z > 1,72 \text{ bar}$ ebenfalls ein überkritischer Ausflussvorgang angenommen werden (siehe (Gl. 4.3)).

$$\left(\frac{p_a}{p_z}\right)_{krit} = 0,58 > \left(\frac{p_a}{p_z}\right) \text{ wenn } p_z > 1,72 \text{ bar} \quad (\text{Gl. 4.12})$$

Da der in Vorversuchen empirisch ermittelte Gas-Massestrom mit 9,77 g/min bei 2 bar (p_z) kleiner als der theoretische Massestrom des Prototypen ist (10,74 g/min), kann von einem Düseneingangsdruck $> 2 \text{ bar}$ und somit von einem überkritisches Ausflussverhalten mit einem konstanten Massestrom von 10,74 g/min ausgegangen werden.

Durch Variation des Zwischendrucks mit gleichzeitig angepasster Dichteänderung in der Formel

$$\dot{m} = \mu * \Psi_{max} * A * \sqrt{2 * p_z * \rho_z} \quad (\text{Gl. 4.13})$$

ergibt sich bei einem Druck von $p_z = 2,1 \text{ bar}$ ein Näherungswert für den Treibgas-Massestrom von 10,6 g/min.

Die experimentelle Überprüfung des R134a-Massestrom bestätigt die theoretischen Überlegungen mit geringen Abweichungen. Der experimentell ermittelte mittlere Treibgas-Massestrom beträgt 8,95 g/min, wobei die Differenz durch den auftretenden Reibungsverlust erklärt werden kann, der in der theoretischen Betrachtung nicht berücksichtigt wurde ($\mu = 1$).

Der Gasvolumenstrom \dot{V} lässt sich infolgedessen mit

$$\dot{V} = \frac{\dot{m}}{\rho_0} \quad \text{mit} \quad \rho_0 = 4,25 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \quad (\text{Gl. 4.14})$$

zu 0,035 l/s berechnen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Vorversuchen aus Kap. 4.4.1 (0,035 l/s) und verifiziert den auftretenden Zwischendruck von ca. 2 bar.

Der experimentell ermittelte Applikatvolumenstrom des Prototypen beträgt 10,8 ml/min und bestätigt mit einem rechnerisch bestimmten Düseneingangsdruck von 2,1 bar die Abhängigkeit des Applikat-Volumenstroms vom Treibgasdruck am Düseneingang (vgl. Abb. 4.19).

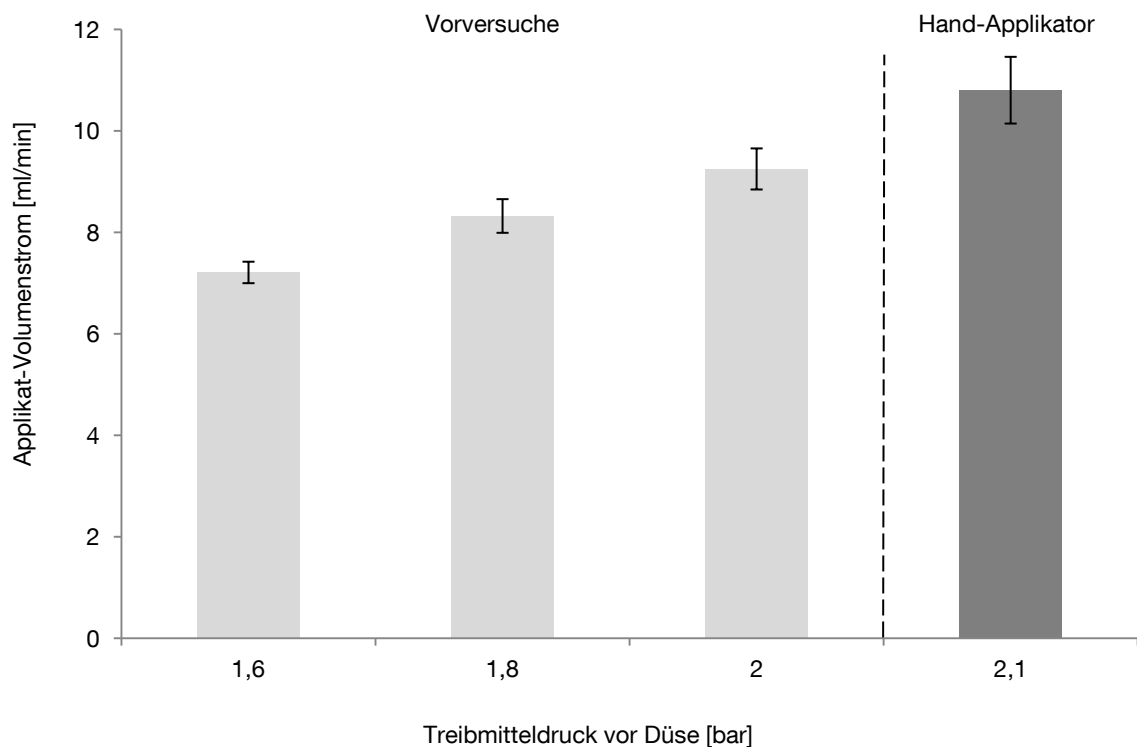


Abb. 4.19 **Vergleich der Applikat-Volumenströme aus den Vorversuchen und des Prototyps**

Der gemessene Volumenstrom des Applikator-Prototyps bestätigt die in den Vorversuchen ermittelten Werte und den linearen Zusammenhang von Eingangsdruck und Applikat-Volumenstrom. (Mittelwerte mit Standardabweichung; n = 5).

Applikatbehälter

Um das in der Spritze vorliegende Thrombozytenkonzentrat in das Reservoir des Applikators zu überführen, wird ein 3-Wege-Hahn am Verbindungsschlauch zwischen Düse und Reservoir integriert. Durch das Safeflow-Ventil (409100H, BBraun, Melsungen) kann die 10 ml Standard-Spritze mit Luer-Lock sicher konnektiert werden. Das Reservoir kann durch den 3-Wege-Hahn erst evakuiert und anschließend mit dem Applikat befüllt werden. Dadurch wird eine Lage- und Füllstandunabhängige Entleerung des Silikonreservoirs gewährleistet.

Versuche bei einem Düseneingangsdruck von 2 bar bestätigen die Funktionalität des Reservoirs. Lediglich ein marginales Restvolumen von durchschnittlich 73 μ l bleibt nach dem Sprühvorgang im Behälter zurück.

Gehäuse

Beim Aufbau des Gesamtsystems stehen insbesondere die Platzierung der Düse und die damit vorgegebene Sprührichtung sowie die Anordnung der übrigen Komponenten im Vordergrund. Kritischster Punkt ist bei Betrachtung der lageunabhängigen Sprühfunktion die Vorgabe zur Handhabung der Gaskartusche, die ein Verkippen um mehr als 90° nicht zulässt. Andernfalls besteht die Gefahr, dass das flüssige Gas aus dem Behälter austritt und mit dem Operateur oder dem Patient in Kontakt kommt. Dies könnte, aufgrund der durch die Expansion der Flüssigkeit entstehenden Abkühlung, zu gesundheitlichen Schäden (z.B. Kälteschäden) führen. Um trotz dieser Einschränkung eine maximale Lageveränderung während der Applikation zu realisieren, wird die Düse an der Unterseite des Applikators und die Gaskartusche in vertikaler Richtung dahinter platziert (vgl. Abb. 4.20). Somit kann das Thrombozytenkonzentrat großflächig und gefahrlos in der horizontalen Ebene und mit einer Neigung bis zu $\pm 90^\circ$ verteilt werden.

Das Gehäuse des Prototyps wird mittels Selektivem-Laser-Sintern gefertigt und anschließend auf seine Funktionalität hin überprüft (siehe Abb. 4.21). Das Laser-Sinter-Verfahren wird als schnelle Produktionsmethodik für Prototypen und Funktionsmuster zur Überprüfung von Design und Funktionalität von Bedienelementen, sowie, bei geeigneter Materialwahl, auch zur Fertigung belastbarer Bauteile eingesetzt (Rapid Prototyping) [48, 147].

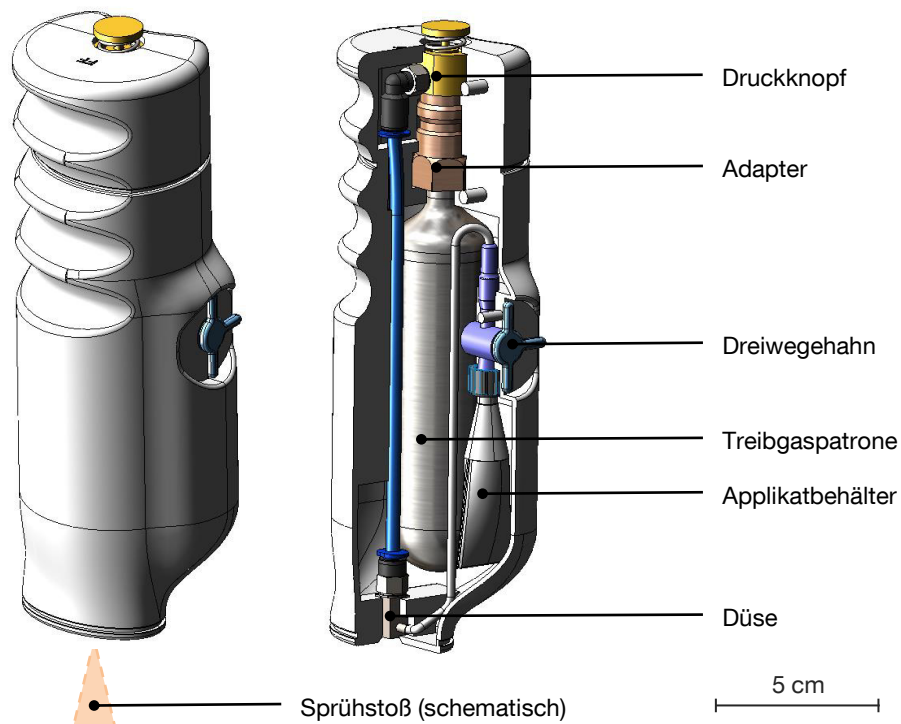


Abb. 4.20 **Gesamtaufbau des Handapplikators**

Der Applikator beinhaltet neben der Treibgaspatrone den Applikatbehälter, einen Druckknopf zur Steuerung des Sprühvorgangs, sowie die an der Unterseite integrierte Düse. Die Applikation auf das Wundgebiet erfolgt in vertikaler Richtung, wobei eine Verkippung des Applikators um $\pm 90^\circ$ durch die Anordnung der Komponenten gegeben ist (Zeichnung siehe Anhang G).

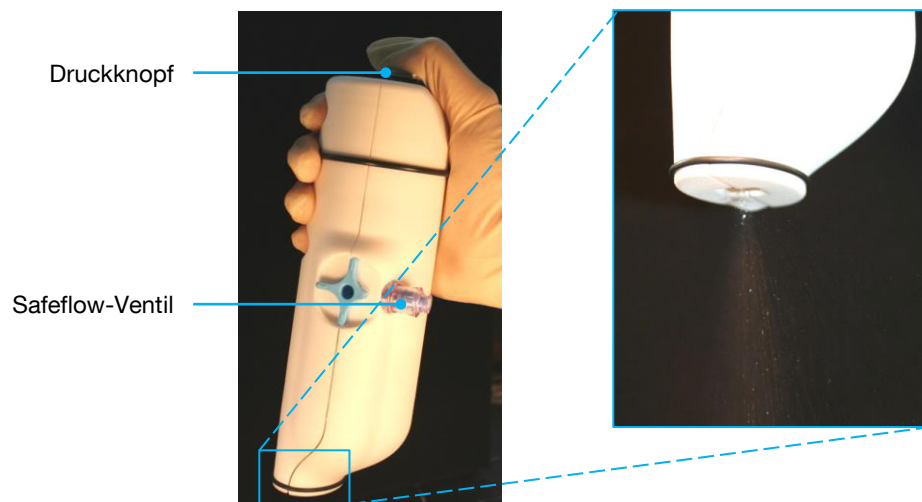


Abb. 4.21 **Sprühvorgang mit dem Hand-Applikator**

Nach Befüllen des Applikators über ein nadelfreies Infusionssystem (Safeflow-Ventil, BBraun, Melsungen), kann das Thrombozytenkonzentrat über einen einfachen Druckknopf gleichmäßig auf eine Wundfläche appliziert werden.

4.5 Diskussion

4.5.1 Sprühbilduntersuchungen

Die Abbildungen des Sprühkegels sowie der Sprühabdrücke bei Variation des Applikationsdrucks und -abstands verdeutlichen den Einfluss der Eingangsgrößen auf die Homogenität des Sprühbildes. Ab einem Applikationsdruck von 2 bar bildet sich eine Kernzone mit erhöhter Tröpfchendichte aus, bei Applikationsabständen > 5 cm ist allerdings eine deutliche Tröpfchenstreuung im Sprühabdruck zu erkennen, welche sich hauptsächlich in Richtung des oberen Randes ausbildet. Mit steigendem Druck kann die Divergenz des Sprühkegels auch für größere Applikationsabstände reduziert werden, jedoch steigt dabei simultan der Applikations-Volumenstrom aufgrund der höheren Treibmittelgeschwindigkeit. Um das Sprühbild ohne Druckerhöhung zu optimieren könnte eine zusätzliche Senkbohrung zur Führung des Flüssigkeitsstrahls im Austrittskanal eingebracht werden. Im Hinblick auf die klinische Anwendung sind Sprühabstände von 5 Zentimetern jedoch als realistisch anzusehen und somit kann ein Applikationsdruck von 2 bar als sinnvoll empfohlen werden.

Die Bestimmung der Tröpfchengrößenverteilung soll Aufschluss darüber geben, ob ein homogenes Aerosol während des Sprühvorgangs entsteht. Die automatisierte Bilderkennung detektiert jedoch partiell fehlerhafte Tröpfchendurchmesser oder nimmt Tropfen in der Fokusebene nicht mit in die Auswertung auf (vgl. Abb. 4.22).

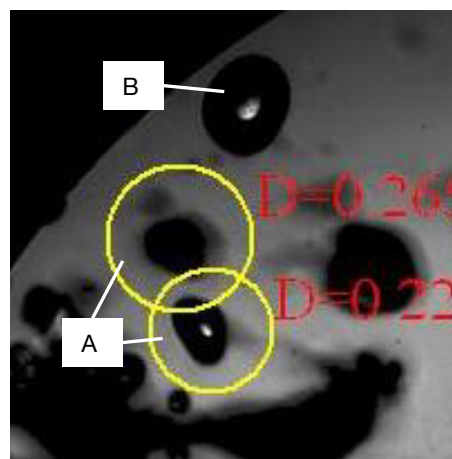


Abb. 4.22 Fehlerhafte Detektion von Tröpfchendurchmessern

Die softwaregestützte Bildauswertung erfasst und bewertet teilweise falsche Tropfendurchmesser (A) bzw. Tröpfchen, die sich zwar in der Fokusebene befinden, jedoch nicht in die Bewertung mit eingehen (B).

Aufgrund der beträchtlichen Gesamttropfenanzahl (> 12.000), die in die Bewertung einfließt, ist dieser Fehler wahrscheinlich als statistisch marginal zu beurteilen, eine Anpassung der Softwareparameter hinsichtlich einer präziseren Detektion erscheint dennoch sinnvoll. Tröpfchen mit Durchmessern von über $100\ \mu\text{m}$ werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da diese großen, meist direkt am Düsenausgang entstehenden Tropfen im weiteren Verdünnungsprozess, im sog. Sekundärzerfall, meist in kleinere Tröpfchen zerfallen [68]. Ebenfalls können Tröpfchendurchmesser von 5 bis $10\ \mu\text{m}$ nicht berücksichtigt werden, da die Auflösungsgrenze der verwendeten Software bei $7,2\ \mu\text{m}$ liegt und so das Intervall (5 bis $10\ \mu\text{m}$) nicht komplett abgebildet werden kann.

Die Tröpfchengrößenverteilung bei einem Druck von $2\ \text{bar}$ deutet auf die Entstehung eines homogenen Aerosols hin. Gut $60\ \%$ der detektierten Tröpfchen weisen einen Durchmesser zwischen 10 und $20\ \mu\text{m}$ auf (vgl. Abb. 4.16). Durch den Zerfall der Flüssigkeitslamelle in überwiegend kleine Tröpfchen, entsteht zum einen eine vergrößerte Flüssigkeitsoberfläche, und zum anderen ist eine gleichmäßige Verteilung der Thrombozyten zu vermuten, da bei einem mittleren Tröpfchendurchmesser von ca. $24\ \mu\text{m}$ eine homogene Verteilung der Blutplättchen, Durchmesser 2 bis $5\ \mu\text{m}$, im umgebenden Blutplasma gewährleistet sein sollte. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des versprühten TK auf einer Fläche (vgl. Abb. 4.17) unterstützt diese Annahme. Die korpuskulären Blutbestandteile werden erwartungsgemäß vereinzelt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Zusammen mit der Vergleichbarkeit der Sprühbilder von Wasser und TK (siehe Abb. 4.8) sowie des annähernd identischen Applikat-Volumenstroms bei gleichem Eingangsdruck (siehe Abb. 4.6), kann größtenteils von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse von Wasser auf TK ausgegangen werden.

Eine weitere Vereinfachung der Versuchsdurchführung stellt die Verwendung von Druckluft anstatt des später vorgesehenen Tetrafluorethans (R134a) als Treibmittel dar. Unterschiede in der Gasdichte haben einen Einfluss auf die Geschwindigkeit und damit auch auf den Volumenstrom des Gases (vgl. Gl. 4.4) und (Gl. 2.1). Versuche zum Vergleich der Volumenströme von R134a und Druckluft zeigen einen signifikant erhöhten Durchfluss für Druckluft bei fest eingestelltem Düseneingangsdruck von $2\ \text{bar}$ (Abb. 4.7). Da der Applikat-Volumenstrom (Abb. 4.6) jedoch annähernd identisch ausfällt, kann die Verwendung von Druckluft anstatt Tetrafluorethan für die Untersuchungen des Sprühbilds und des Applikatvolumenstroms akzeptiert werden.

4.5.2 Applikator

Der entwickelte Handapplikator erfüllt sämtliche gestellten Anforderungen (vgl. Kap. 4.1): Die eingesetzte Zweistoffdüse generiert ein homogenes Sprühbild und gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung des Thrombozytenkonzentrats auf ein Wundgebiet. Der Applikatvolumenstrom liegt mit 10,8 ml/min bei einem Düseneingangsdruck von rund 2,1 bar ebenso in den geforderten technischen und sicherheitsrelevanten Spezifikationen, wie auch der Treibmittel-Volumenstrom. Darüber hinaus ist eine Regulierung des Applikatvolumenstroms, ähnlich wie beim Vivostat®-System, denkbar. Durch Modifikation des Dreiwegehahns, beispielsweise mit Hilfe einer integrierten Blende, könnte der TK-Volumenstrom für verschiedene Applikationsgeschwindigkeiten variiert werden (Abb. 4.23).

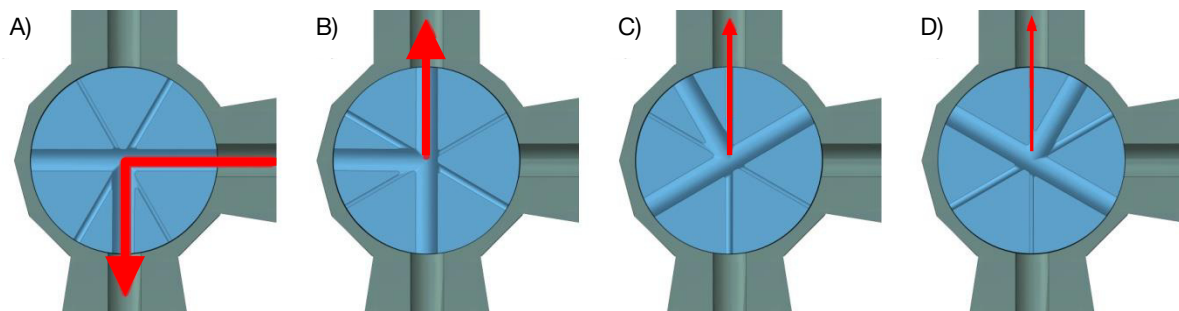


Abb. 4.23 **Konzept zur Regulierung des Applikat-Volumenstroms**

Die Regulierung des TK-Volumenstroms kann über eine, im 3-Wege-Hahn integrierte Blende realisiert werden. Nach Befüllung des Reservoirs (A) kann zwischen drei unterschiedlichen Volumenströmen gewählt werden: hoher (B), mittlerer (C) und geringer Volumenstrom (D).

Alternativ könnte statt einer Drehscheibe das Irisblenden-Prinzip zur weiteren Reduzierung des Applikat-Volumenstroms eingesetzt werden.

Die Eignung von Tetrafluorethan (R134a) als Treibmittel kann bestätigt werden, jedoch mit geringen Einschränkungen: Ein Nachteil des Fluorkohlenwasserstoffs stellt der limitierte Bewegungsraum des Applikators während der Anwendung dar. Bei einer Neigung der handelsüblichen Gaspatrone von mehr als 90° zur Horizontalen kann es zum Austreten des flüssigen Gases kommen und damit zu einer potentiellen Gefährdung des Anwenders und des Patienten. Hierzu ist eine Optimierung der Gaskartusche erforderlich. Denkbar ist die Integration eines Steigrohres (vgl. Abb. 4.24).

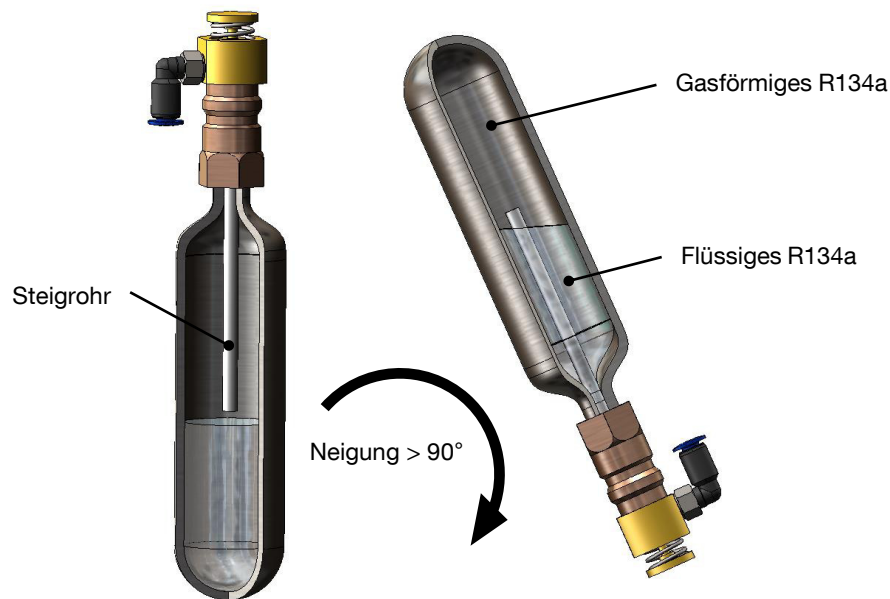


Abb. 4.24 **Konzept zur Integration eines Steigrohrs**

Zur Erzielung einer uneingeschränkten Bewegungsfreiheit während der Applikation kann ein Steigrohr zur Gasentnahme in den Druckbehälter integriert werden. Hierdurch wird sichergestellt, dass auch bei einer Verkippung des Applikators um $> 90^\circ$ kein flüssiges Gas auf die Wundfläche appliziert wird.

Durch das in der Patrone konzentrisch angeordnete Rohr kann bei zu großer Neigung der Entnahme von flüssigem Treibgas aufgrund des Gleichgewichtszustandes (von Flüssig- zu Gasanteil) entgegengewirkt werden da das Steigrohr stets in der Gasphase endet.

Für den klinischen Einsatz des Handapplikators müssen bestimmte Anforderungen bei der Handhabung, insbesondere die Einhaltung der Sterilkette während der gesamten Anwendung, beachtet werden. Die Befüllung des integrierten Reservoirs mit Thrombozytenkonzentrat kann durch die direkte Konnektierung der Spritze an das Safeflow-Ventil (Luer-Lock-Konnektor) anwenderfreundlich und unter Beibehaltung der Sterilität bewerkstelligt werden. Die Trennung von unsteriler Spritze und sterilem Applikator muss dabei jedoch unbedingt durch das medizinische Personal sichergestellt werden.

Aufgrund des geringen TK-Gesamtvolumens sollte der Verlust während der Applikation so gering wie möglich gehalten werden. Mittels Überschlagsrechnungen sowie Herstellerangaben wird daher der Gesamtverlust an TK durch die Applikation abgeschätzt und prozentual auf die Bauteilkomponenten verteilt (vgl. Tab. 4.3).

Komponente	TK-Restvolumen	Anteil am Gesamtverlust
Applikatreservoir	73 μ l	17 %
Verbindungsschlauch (Applikatreservoir→3-Wege-Hahn→Düse)	79 μ l	18 %
Safeflow-Ventil	90 μ l	21 %
3-Wege-Hahn und Luer-Lock-Adapter	190 μ l	44 %
Summe	432 μ l	100 %

Tab. 4.3 **Prozentuale Aufteilung des TK-Gesamtverlusts während der Applikation**
 Mit einem verbleibenden Restvolumen von ca. 190 μ l im 3-Wege-Hahn und dem angekoppelten Luer-Lock-Adapter stellen diese Bauteilkomponenten mit 44 % den größten Anteil des Gesamt-TK-Verlusts dar.

Die Entleerbarkeit des Reservoirs ist durch den evakuierten, kollabierbaren Silikonbehälter weitestgehend optimiert worden. Mit einem durchschnittlichen Restvolumen von 73 μ l repräsentiert dieser Anteil jedoch lediglich 17 % des maximalen TK-Rückstands. Die Integration des Safeflow-Ventils in den 3-Wege-Hahn [119] könnte neben der Reduzierung des im Applikator verbleibenden TK-Volumens zusätzlich einen Montageschritt ersparen. Das kritischste Bauteil stellt der 3-Wege-Hahn mit Luer-Lock-Adapter zum Anschluss des Applikatreservoirs dar. Die Umsetzung der Applikat-Volumensteuerung mittels integrierter Blende, sowie der Verzicht auf den Luer-Lock-Adapter durch die Modifizierung der Anschlussstelle zwischen Applikatbehälter und 3-Wege-Hahn (z.B. feste Verschweißung) könnten jedoch zu einer deutlichen Reduzierung des Gesamtverlusts beitragen.

Die Applikation des potentiell infektiösen Blutpräparates erfordert zudem die sicherheitstechnische Betrachtung des Gesamtsystems. Die Wiederaufbereitung des Komplettsystems muss dabei aufgrund schwer zugänglicher und kleiner Kanäle in der Düse sowie im Leitungssystem kritisch betrachtet werden. Die Konzipierung des Applikators als Einwegprodukt für die klinische Anwendung ist daher in Erwägung zu ziehen. Auch eine Aufteilung des Applikators in zwei Kompartimente ist denkbar: Ein als Einmalprodukt ausgelegtes Applikat-Segment, bestehend aus Reservoir und Düse, sowie dem wiederverwendbaren Treibmittelbereich mit integrierter, nachfüllbarer Treibmittelpatrone und Bedienelementen. Ein Vorteil hiervon wäre ökonomisch betrachtet die Möglichkeit, die Druckregelung des Treibgases statt über die Auslassöffnung mittels Druckregler zu steuern. Hierdurch würden einmalig zwar zusätzliche Kosten anfallen, allerdings könnte so der geforderte Düseneingangsdruck unabhängig vom Innendruck des Druckbehälters aufrecht erhalten werden. Mit dem jetzigen System dienen ca. 80 % des Treibgases lediglich der

Pufferung des Druckabfalls, welcher während der Applikation durch die Abkühlung des Gasbehälters auftritt. Mit einem Druckregler könnte die benötigte Treibgasmenge und damit der Bauraum für den Druckbehälter deutlich reduziert werden.

Die Herausforderung bei einer zweiteiligen Applikatorlösung stellt jedoch die Zusammenführung von aufbereitetem und Einmalsegment dar. Hier sollte auf eine intuitiv durchführbare Montage sowie eine sichere und kontaminationsfreie Konnektierung der beiden Kompartimente geachtet werden. Zur Aufbereitung der Gaskartusche müsste entweder ein geeigneter Gas-Vorratsbehälter mit Anschlussmöglichkeit für die Applikator-Patrone konzipiert werden (z.B. Schnellkupplungssystem ähnlich einem Gas-Feuerzeug), welcher dem Anwender zur Verfügung gestellt wird, oder ein externes Wiederaufbereitungssystem realisiert werden, was sich logistisch zwar aufwendiger gestalten würde, jedoch aus klinischer Sicht wahrscheinlich die komfortablere Lösungsalternative darstellt. Abgesehen von dem weiterverfolgten Prinzip, muss die Fertigbarkeit der Einzelkomponenten betrachtet werden. Neben Zukaufteilen wie z.B. dem Druckbehälter, ist eine Fertigung des Applikatorgehäuses mittels Spritzgießen denkbar, wobei die Geometrie angepasst und die Machbarkeit mittels Füllstudienimulationen überprüft werden sollte.

5 Biologische Evaluation

Die Qualität von Thrombozytenkonzentraten wird, neben der größtmöglichen Ausbeute, auch durch deren biologische Wirksamkeit definiert. Insbesondere spielen hierbei der Aktivierungszustand der Blutplättchen nach der Aufkonzentrierung [39] sowie die Wirkung auf humane Zellen und Gewebe eine entscheidende Rolle. Ziel ist die Bereitstellung von Thrombozyten in einer für eine wirksame Wundbehandlung ausreichend hohen Konzentration. Zudem soll die Thrombozytenaktivierung während des Herstellungsprozesses möglichst gering gehalten werden. Andererseits würde ein Großteil der thrombozytären Wachstumsfaktoren bei Auftragung auf das Wundgebiet nicht mehr zur Verfügung stehen [76, 111], da ca. 95 % der Wachstumsfaktoren bereits 60 Minuten nach erfolgter Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden [93].

Mittels in vitro Untersuchungen (Duchflusszytometrie) wird der Einfluss der Zentrifugationsprozesse sowie des anschließenden Sprühvorgangs auf den Aktivierungszustand der Blutplättchen untersucht. Durch die beiden Vorgänge unterliegen die Thrombozyten einer massiven mechanischen Belastung, insbesondere einer hohen Scherbeanspruchung, die zu einer vorzeitigen Aktivierung führen kann [107].

Für den in vitro Wirksamkeitsnachweis wird der physiologische Aktivierungsprozess anhand von Co-Inkubationsversuchen mit nicht aktiviertem Thrombozytenkonzentrat und humanen Zellen simuliert. Die Freisetzung der Wachstumsfaktoren soll möglichst erst nach der Applikation auf die Wundfläche auf physiologische Weise sukzessiv erfolgen und so über einen längeren Zeitraum die Wundheilungsvorgänge unterstützen. Als Modell des Wundgewebes dienen humane Fibroblasten der Zelllinie Hs27 (CRL-1643™, ATCC®, UK). Fibroblasten wandern in vivo bei einer auftretenden Verletzung als erste in die Wunde ein (vgl. 2.1) und sind ein wichtiger Bestandteil des Füllgewebes [152]. Bei vorangegangenen Untersuchungen zur Wirksamkeit des Thrombozytenkonzentrats am Lehrstuhl für Medizintechnik der TU München wurden kommerzielle Zellkultureinsätze (ThinCert 24-Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) für Co-Inkubationsversuche eingesetzt. Die proliferationsfördernde Wirkung des Konzentrats konnte zwar prinzipiell bestätigt werden [104], jedoch wurden die Ergebnisse durch das ungeeignete Zellkultursystem beeinflusst. Infolgedessen wird ein angepasstes Zellkultursystem konzipiert, hergestellt und anschließend validiert.

Die Präparation der Blutproben, welche von freiwilligen Spendern bezogen werden (siehe Kap. 3.1), erfolgt mittels der manuellen Herstellungsmethode (vgl. 3.2.1). Auf diese Weise können bis zu 16 Blutproben simultan verarbeitet und das benötigte Blutvolumen reduziert werden (9 ml statt 11,5 ml je Blutentnahmeröhrchen). Die Vergleichbarkeit zur automatisierten Herstellung konnte auf Basis der in Kap. 3 erzielten Ausbeute-Ergebnisse gezeigt werden.

5.1 Aktivierungsuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein analytisches Messverfahren, welches auf der Lichtemission einzelner Zellen beim Passieren eines Laserstrahls basiert. Die Vereinzelnung der Zellen findet dabei durch hydrodynamische Fokussierung mittels eines Hüllmediums statt. Das Streulicht, das bei einer Zellpassage detektiert wird, kann in Vorwärtsstreulicht (FSC - Forward Scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC - Side Scatter) unterteilt werden. Die Intensität des Vorwärtsstreulichtsignals korreliert dabei mit der Größe und das SSC-Signal mit der Granularität der Zelle. Neben der Erfassung des Streulichtdiagramms können auch Fluoreszenzsignale detektiert werden. Mittels antikörperbasierter Fluoreszenzmarkierung können Membranproteine der Thrombozyten untersucht werden. Zur Charakterisierung des Aktivierungszustandes der Blutplättchen wird die Expression der Oberflächenproteine CD41 und CD62P untersucht. CD41 wird auf allen Thrombozyten, unabhängig vom Aktivierungsstatus, exprimiert und dient zur Identifizierung der Thrombozytenpopulation [7]. Wie auch in DIN EN ISO 10993-4 [30] empfohlen, wird CD62P (P-Selektin) als aktivierungsspezifischer Marker für Thrombozyten eingesetzt. Dieser erscheint erst durch die morphologische Formänderung der Thrombozyten nach erfolgter Aktivierung, insbesondere durch die Degranulation der α -Granula, an der Membranoberfläche.

Um eine mögliche Beeinflussung des Aktivierungsstatus der Thrombozyten durch den Zentrifugationsprozess sowie die anschließende Applikation zu ermitteln, werden durchflusszytometrische Untersuchungen des Thrombozytenkonzentrats vor (TK_{vor}) und nach (TK_{nach}) dem Sprühvorgang sowie, als Vergleichswert, des unbehandelten Vollbluts durchgeführt. Zur Differenzierung des Einflusses der Zentrifugationsschritte (erste und zweite Zentrifugation) wird das Platelet Rich Plasma ebenfalls betrachtet. Die ausführliche Versuchsbeschreibung befindet sich in Anhang A.

5.2 In Vitro Wirksamkeitsnachweis

Die Co-Inkubation humaner Fibroblasten mit Thrombozytenkonzentrat stellt spezifische Anforderungen an das Zellkultursystem: Die direkte Zugabe von Blutpräparaten zu adhärent wachsenden Fibroblasten hat sich aufgrund der im Verlauf der Kultivierung einsetzenden Gerinnungsreaktion in Vorversuchen (Versuchsdauer 7 Tage) als nicht praktikabel herausgestellt. Hohe Absterberaten lassen vermuten, dass der dabei entstehende Blutpfropf einen geregelten Gasaustausch in der Zellkulturschale verhindert und eine ausreichende Versorgung der adhärent wachsenden Fibroblasten mit Nährstoffen, aufgrund der schlechten Diffusionsverhältnisse, nicht gewährleistet werden kann.

Die räumliche Trennung von Fibroblasten und korpuskulären Blutbestandteilen ist somit eine essentielle Voraussetzung des zu entwickelnde Zellkultursystems. Darüber hinaus muss der Austausch von Proteinen, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren gewährleistet werden, um den Einfluss des Thrombozytenkonzentrats und der sezernierten Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der Fibroblasten untersuchen zu können.

Konventionelle Zellkultureinsätze, die eine o.g. räumliche Trennung erlauben, sind beispielhaft in Abb. 5.1 dargestellt.

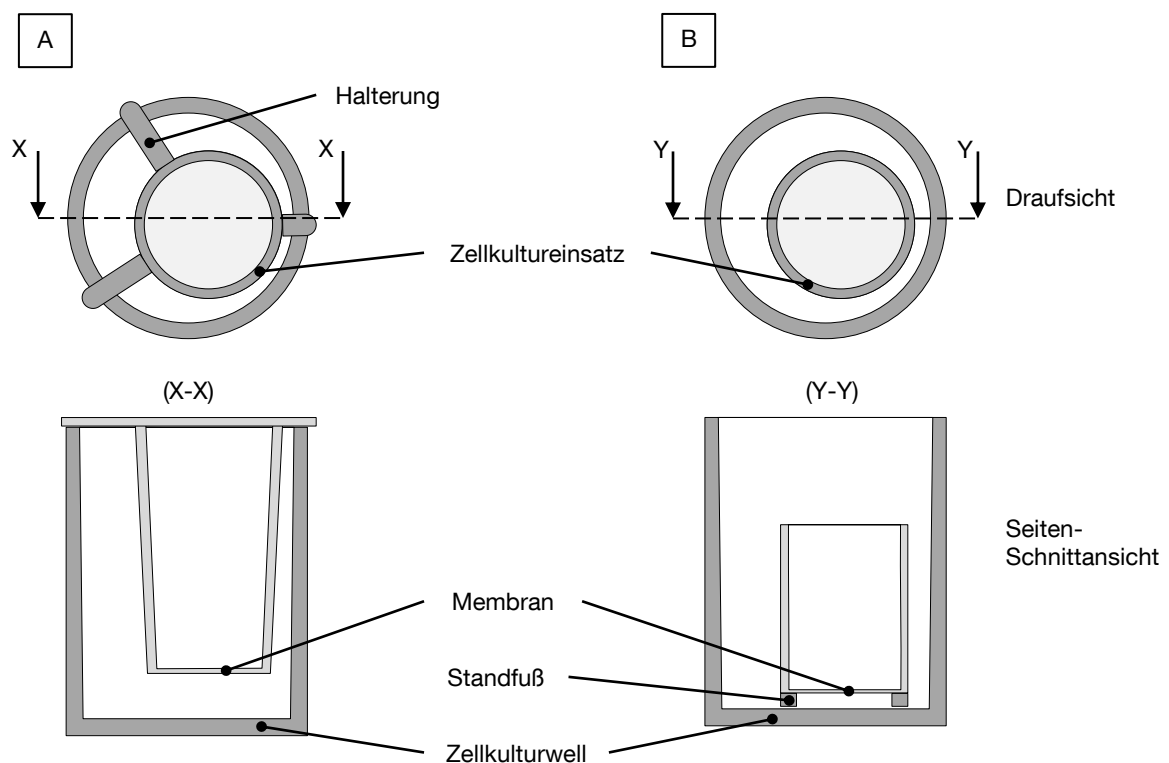


Abb. 5.1 **Schematische Darstellung kommerziell erhältlicher Zellkultureinsätze**

Die Zellkultureinsätze können entweder in Standard-Zellkulturplatten eingehängt (A) oder stehend platziert werden (B). Der Boden der Einsätze besteht aus einer Membran mit definierter Porengröße. Beide Varianten teilen das Zellkulturwell horizontal in die jeweiligen Kompartimente.

Die Unterteilung des Zellkulturwells erfolgt bei allen verfügbaren Einsätzen anhand einer horizontal ausgerichteten, porösen Membran. Dabei wird der Zellkultureinsatz entweder in das Well einer Standard-Zellkulturplatte eingehängt [94, 125] oder auf dem Grund des Wells stehend positioniert [8, 106]. Die Membran aus Polyethylenterephthalat (PET), Polycarbonat (PC), Celluloseester oder Polytetrafluorethylen (PTFE), ist mit Porengrößen von 0,4 bis 8 μm erhältlich. Diese Systeme ermöglichen eine Co-Inkubation der Fibroblasten entweder am Wellboden oder im Zellkultureinsatz (vgl. Abb. 5.2). Das Thrombozytenkonzentrat wird im

jeweils anderen Kompartiment zugegeben. Der Austausch der freigesetzten Wachstumsfaktoren erfolgt durch die Membran mit definierter Porengröße.

In einer vorangegangenen Studie [104] des Lehrstuhls für Medizintechnik konnten unter Verwendung dieser kommerziellen Zellkultureinsätze (Membran: PET, Porengröße: 1 µm) erste positive Ergebnisse zum Einfluss von Thrombozytenkonzentrat auf die Proliferation humaner Fibroblasten erzielt werden. Die Zellen wurden dabei im Einsatz kultiviert und die zu untersuchenden Blutpräparate im Well eingebracht. Neben unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen wurde auch das Antigerinnungsmittel variiert (EDTA, Heparin, Citrat). Zusammenfassend kann, entgegen der u.a. unzureichenden Versorgung der Zellen (vgl. Kap.5.2.1), anhand dieser in vitro Versuchen eine für humane Fibroblasten optimale Thrombozytenkonzentration von $500 \cdot 10^3$ plt/µl empfohlen werden. Mit dieser Konzentration konnten bei Co-Inkubationsversuchen signifikant höhere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden, wobei die Ergebnisse aufgrund der Versuchsbeeinträchtigung durch das eingesetzte Zellkultursystem ausschließlich orientierend betrachtet werden sollten [104].

5.2.1 Entwicklung eines angepassten Zellkultur-Testsystems

Die herkömmlichen Einsätze weisen für die Anwendung der Co-Inkubation von Fibroblasten mit Thrombozytenkonzentrat beträchtliche Defizite auf: So stellt während der Versuchsdurchführung die horizontale Trennung der Kompartimente ein erhebliches Problem dar.

Werden die Fibroblasten auf der Membran des Zellkultureinsatzes kultiviert und das Thrombozytenkonzentrat direkt in das Well gegeben (vgl. Abb. 5.2, Prinzip A), kann während der siebentägigen Exposition keine optische Kontrolle der Zellen durchgeführt werden, da die korpuskulären Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten) den Wellboden bedecken und dadurch die Sicht behindern. Zudem muss der Einsatz zur Auswertung mittels CCK-8-Test vor Zugabe des Testreagenz herausgenommen und mit Parafilm abgedichtet werden. Das zweite Verfahren (Abb. 5.2, Prinzip B) erlaubt zwar eine mikroskopische Kontrolle während der Versuchsdauer, jedoch wird die Diffusion der Wachstumsfaktoren durch sich auf der Membran absetzende Erythrozyten und Thrombozyten massiv beeinträchtigt. Zudem ist das Wachstum der Fibroblasten direkt unter dem Zellkultureinsatz stark eingeschränkt.

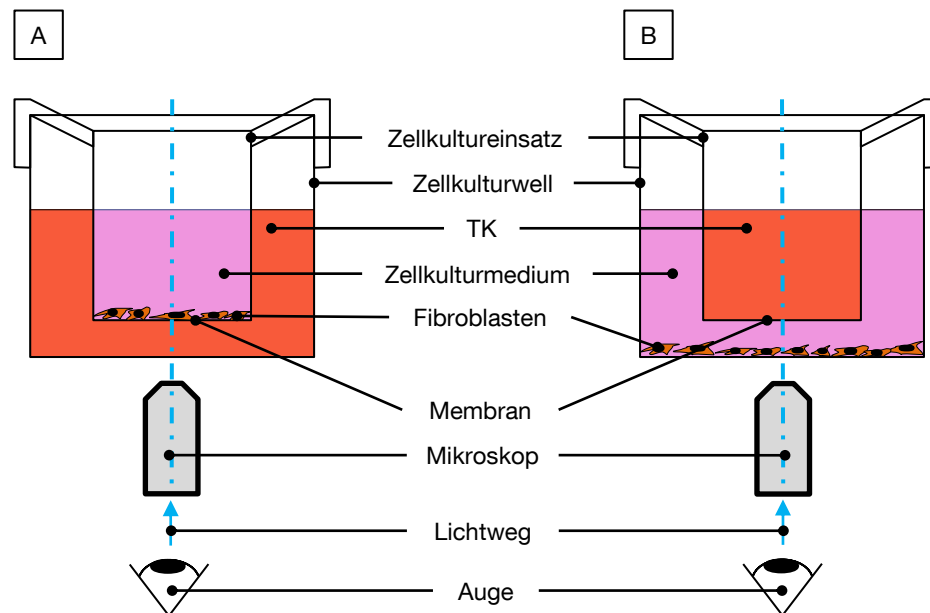


Abb. 5.2 **Schematische Darstellung der jeweiligen Verfahren zur Co-Inkubation von TK mit humanen Fibroblasten**

(Prinzip A) Das TK befindet sich im Zellkulturwell, die Zellen werden im Einsatz, direkt auf der Membran kultiviert. Eine mikroskopische Beobachtung der Fibroblastenmorphologie ist während des laufenden Versuchs nicht möglich. (Prinzip B) Das TK befindet sich im Zellkultureinsatz und die Fibroblasten direkt im Well. Die Erythrozyten im TK decken die Poren der Membran ab und behindern somit die Diffusion von Wachstumsfaktoren.

Um bestmögliche Bedingungen für die Co-Inkubationsversuche von Thrombozytenkonzentrat mit humanen Fibroblasten zu ermöglichen, wird nun ein optimiertes Zellsystem entwickelt:

Anforderungen und Konzeption

Aus den genannten Beschränkungen der kommerziell erhältlichen Systeme ergeben sich die Anforderungen an das zu konzipierende Co-Inkubationssystem:

- Vertikale Trennung der Kompartimente,
- Optimales Diffusionsverhalten der Membran,
- Reproduzierbare Fertigung,
- Sichere Positionierung im Well,
- Zytokompatibilität,
- Sterilisierbarkeit (autoklavierbar).

Eine vertikale Trennung des Zellkulturwells in zwei Kompartimente gewährleistet die optische Kontrolle der Fibroblasten während der Versuchsdauer. Darüber hinaus kann die Diffusion der Wachstumsfaktoren durch Adaption der Membranporosität eingestellt werden. Die Geometrie des Einsatzes wird maßgeblich durch die Standard-24-Well-Platte vorgegeben (vgl. Abb. 5.3).

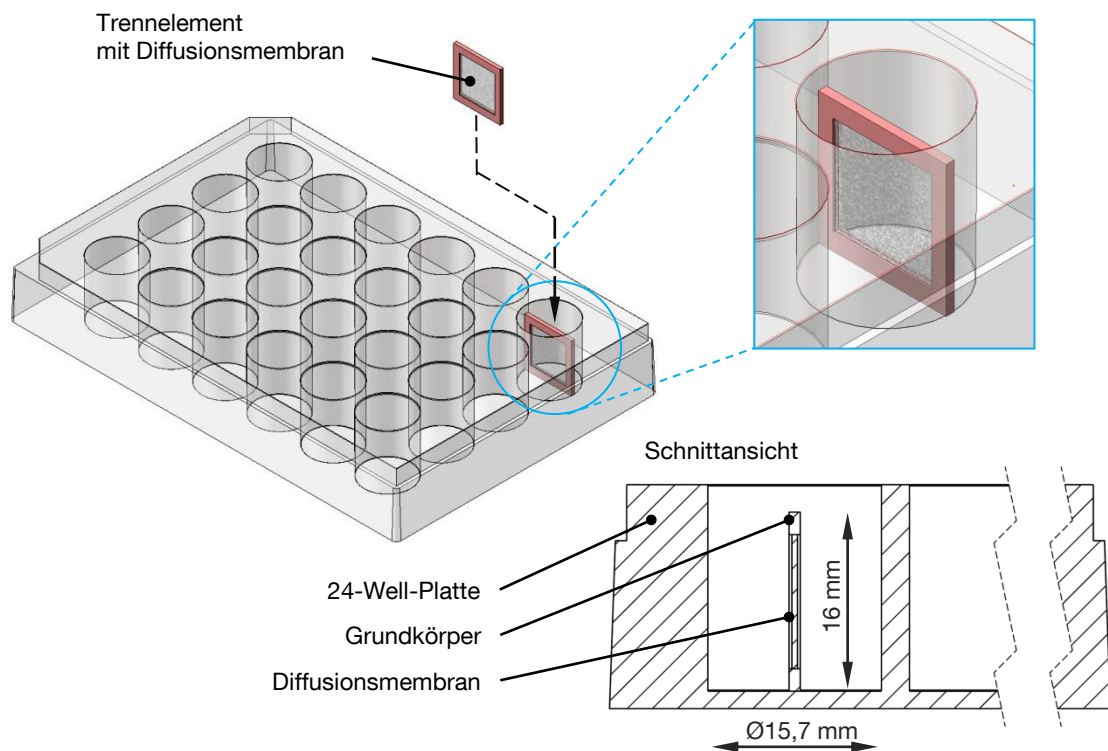


Abb. 5.3 **Grundprinzip eines optimierten Zellkultureinsatzes**
 Das vertikale Trennelement besteht aus einem Grundkörper und einer Diffusionsmembran. Die geometrischen Maße orientieren sich an den Abmessungen einer Standard-24-Wellplatte (Wachstumsfläche 1,92 cm²).

Membranauswahl

An die Diffusionsmembran werden spezifische, auf das Gesamtsystem abgestimmte, Anforderungen gestellt. Die jeweiligen Evaluationsverfahren sind in Tab. 5.1 aufgelistet.

Zwei Membranen werden auf die o.g. Eigenschaften hin überprüft: Eine Cellulose-nitratmembran mit einer Porengröße von 1,2 µm (11303-47-N, Sartorius Stedim biotech, Göttingen) und eine Membran aus Polyethersulfon mit einer Porengröße von 0,45 µm (15406-50-N, Sartorius Stedim biotech, Göttingen).

Anforderung	Testverfahren
Biokompatibilität	Zytotoxizitätstest
Gute Diffusion von Wachstumsfaktoren	PDGF-AB ELISA
Porengröße $\leq 1,5 \mu\text{m}$ (Zurückhalten korpuskulärer Blutbestandteile)	Herstellerangaben
Autoklavierbarkeit	Herstellerangaben

Tab. 5.1: **Anforderungen an die Membran**
Korpuskuläre Blutbestandteile müssen bei der Co-Inkubation mit TK von den Fibroblasten getrennt werden, die Diffusion von Wachstumsfaktoren jedoch gleichzeitig möglich sein.

Gemäß DIN EN ISO 10993-5 [31] wird zunächst die Zytotoxizität der Membranen getestet. Dabei wird im Hinblick auf die spätere Anwendung ein Testaufbau mit Direktkontakt von Membranen und Fibroblasten gewählt (Versuchsbeschreibung: siehe Anhang B).

Die Diffusionseigenschaften der Membranen werden im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen Zellkultureinsatz (ThinCert 24-Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) bewertet. Ein Thrombozytenkonzentrat mit definierter Menge an Thrombozyten wird zu diesem Zweck in den zu testenden Systemen inkubiert und nach 24, 72 und 168 Stunden die Quantität der diffundierten PDGF-AB mittels ELISA bestimmt (Versuchsbeschreibung: siehe Anhang A).

Werkstoffe und Fertigungsmethode

Zur Herstellung des Zellkulturelementes werden zwei Ansätze verfolgt: Zum einen die Fertigung mittels eines, bei Raumtemperatur vernetzenden, Zwei-Komponenten-Silikons (RTV 2K-Silikon), wobei die Membran direkt bei der Verarbeitung in ein Gusswerkzeug eingefasst und mit Silikon umgossen wird. Zum anderen die Herstellung mittels Thermoplast-Spritzgießverfahren. Hierbei ist aufgrund der Temperaturentwicklung während des Spritzgießprozesses ein nachträglicher Montageschritt notwendig, bei dem die Membran mit dem Grundkörper verklebt wird.

Die Positionierung des Zellkultureinsatzes im Well definiert maßgeblich die Wachstumsfläche der Fibroblasten. Zur Durchführung aussagekräftiger Co-Inkubationsversuche muss daher eine definierte und reproduzierbare Anordnung gewährleistet werden. Dies wird durch die Geometrie des Grundkörpers realisiert, einem Halbzylinder, der die Hälfte der Grundfläche des Wells ($0,95 \text{ cm}^2$) einnimmt. Damit die Zellsuspension während der Einsaat nicht unter dem Trennelement hindurch dringt, muss darauf geachtet werden, dass der

Werkstoff des Grundkörpers zuverlässig die Kompartimente voneinander trennt und abdichtet.

Silikon-Abformung

Zur Evaluation der Funktionalität ausgewählter Silikone werden die in Abb. 5.4 skizzierten aufeinanderfolgenden Prozessschritte und Untersuchungen durchgeführt:

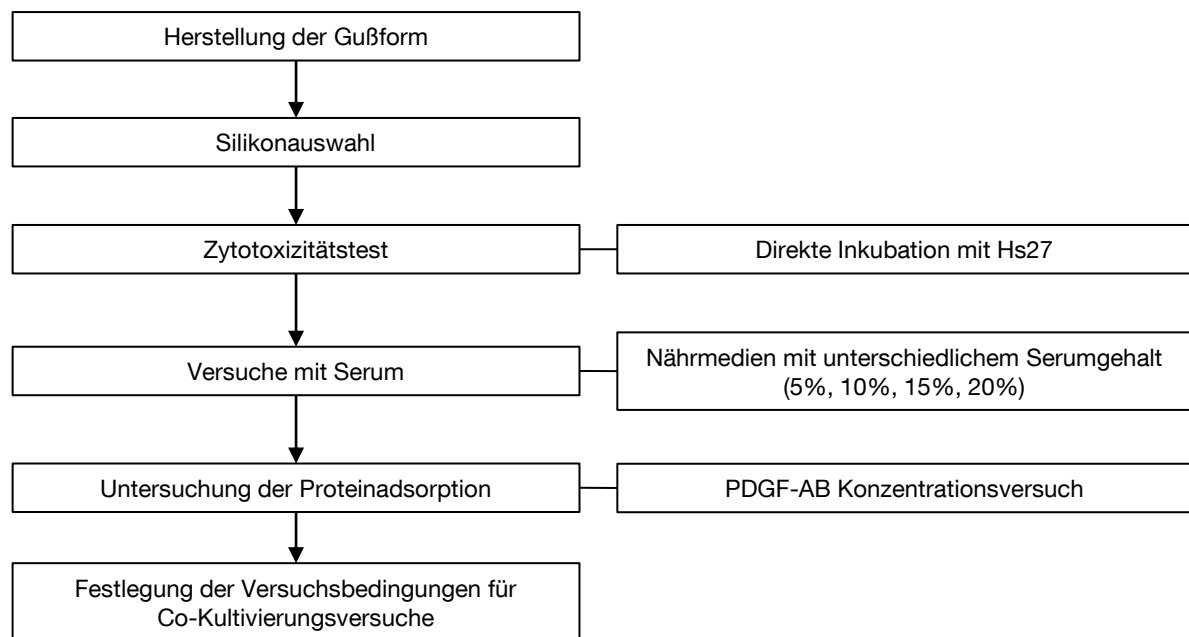


Abb. 5.4 **Evaluation ausgewählter Silikone als Grundkörperwerkstoff**

Für die Herstellung des Zellkultureinsatzes aus Silikon werden, neben der Fertigung der Gussform weitere Untersuchungen, wie Zytotoxizitätstests etc. durchgeführt. Ziel ist die Evaluation eines geeigneten Silikons und die Festlegung optimierter Versuchsbedingungen zur Co-Inkubation humaner Fibroblasten mit Thrombozytenkonzentrat.

Evaluieren werden zwei RTV 2K-Silikone: SILPURAN 2430 und SILPURAN 2438 (Wacker Chemie AG, München). Beide Werkstoffe sind nach DIN EN ISO 10993-5 und USP Class VI biokompatibel und für Medizinprodukte (bis Klasse IIb) zugelassen.

Während der direkten Inkubation von Hs27 mit den Silikon-Grundkörpern unter Verwendung des Standard-Zellkulturmediums (DMEM, 5 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % Patr.) wurde in Vorversuchen ein stark eingeschränktes Zellwachstum beobachtet. Die Ursache dafür wird in einem Nährstoffmangel vermutet, verursacht durch Proteinadsorption des Silikons. Daher werden auf den Zytotoxizitätstests aufbauend weitere Untersuchungen (Versuche mit

Serum, Analyse der Proteinadsorption) durchgeführt (Versuchsbeschreibungen: siehe Anhang B).

Thermoplast-Spritzgießen

Aufgrund der Temperaturentwicklung während des Spritzgießprozesses, wird die Diffusionsmembran nicht direkt mit dem Kunststoff umspritzt, sondern nachträglich mit dem fertigen Grundkörper verklebt. Deshalb müssen auf die Membran abgestimmte und kompatible Polymere und Klebstoffe gewählt werden. Neben der Konstruktion des Spritzgießwerkzeugs werden ausgewählte Kunststoffe auf deren Zytotoxizität hin überprüft. In gleicher Weise werden die verschiedenen Klebstoffe (Loctite 3926, Loctite 3921, Loctite 3301, Loctite 3311, Loctite 3321, Henkel AG & Co. kgaA, Düsseldorf) verifiziert, sowie deren Haftungseigenschaften zwischen den Kunststoffen und der Membran evaluiert. Abschließend wird die Biokompatibilität des Gesamtsystems ermittelt (vgl. Abb. 5.5).

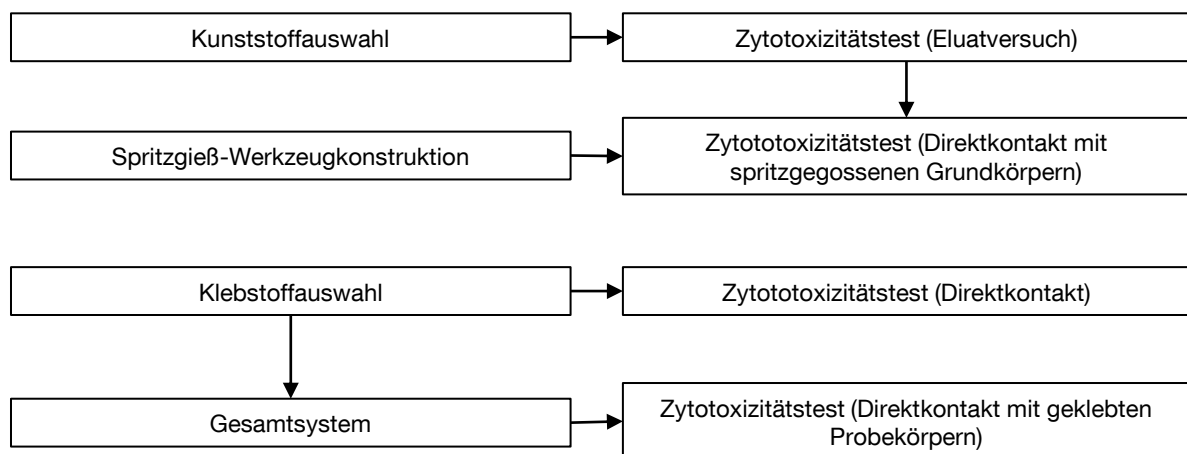


Abb. 5.5 **Testschema zur Evaluation eines spritzgegossenen Zellkultureinsatzes**
Neben der Konstruktion des Spritzgießwerkzeugs erfolgt die Auswahl eines geeigneten Polymers sowie die Klebstoffauswahl. Das Gesamtsystem wird abschließend mittels Zytotoxizitätstest mit Direktkontakt evaluiert.

Da der Grundkörper keinen hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt ist, kann bei der Werkstoffauswahl auf sog. Standard- und Konstruktions-Polymere mit entsprechender medizinischer Zulassung zurückgegriffen werden. In die Evaluation fließen folgende Polymere ein:

- PET (Polyethylenterephthalat, Eastar™ Copolyester MN021, Eastman, USA)
- MABS (Methyl-Methacrylat-Acrylnitril-Butadien-Styrol, Terluc®, BASF Plastics, Ludwigshafen)
- POM (Polyoxymethylen, Hostaform®, Ticona, Höchst)

5.2.2 Co-Inkubationsversuche

Die beiden Zellkultursysteme, Silikon- und Thermoplasteinsatz, werden einer abschließenden Validierung unterzogen. Dabei wird sowohl Thrombozytenkonzentrat direkt nach der Zentrifugation als auch versprühtes Konzentrat eingesetzt. Aufbauend auf die von Novotny et al. durchgeführten Studien [104] mit kommerziellen Zellkultureinsätzen, wird die Thrombozytenkonzentration auf $500 \cdot 10^3$ plt/ μ l festgelegt. Als Antigerinnungsmittel kommen Citrat, Heparin und EDTA zum Einsatz.

Neben der Untersuchung des Einflusses des Thrombozytenkonzentrats auf humane Fibroblasten wird zusätzlich die Wachstumsfaktorfreisetzung, insbesondere PDGF-AB, untersucht (Ausführliche Versuchsbeschreibung: Anhang C).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Aktivierungsuntersuchungen

Der Aktivierungszustand der Thrombozyten wird in vier Blutpräparaten untersucht: Vollblut, Platelet Rich Plasma, Thrombozytenkonzentrat vor (TK_{vor}), sowie nach der Applikation (TK_{nach}). Es zeigt sich, dass während der Aufbereitung des Bluts eine stetige Zunahme der Thrombozytenaktivierung stattfindet, wobei das Ausmaß auch vom eingesetzten Antigerinnungsmittel abhängt (vgl. Abb. 5.6).

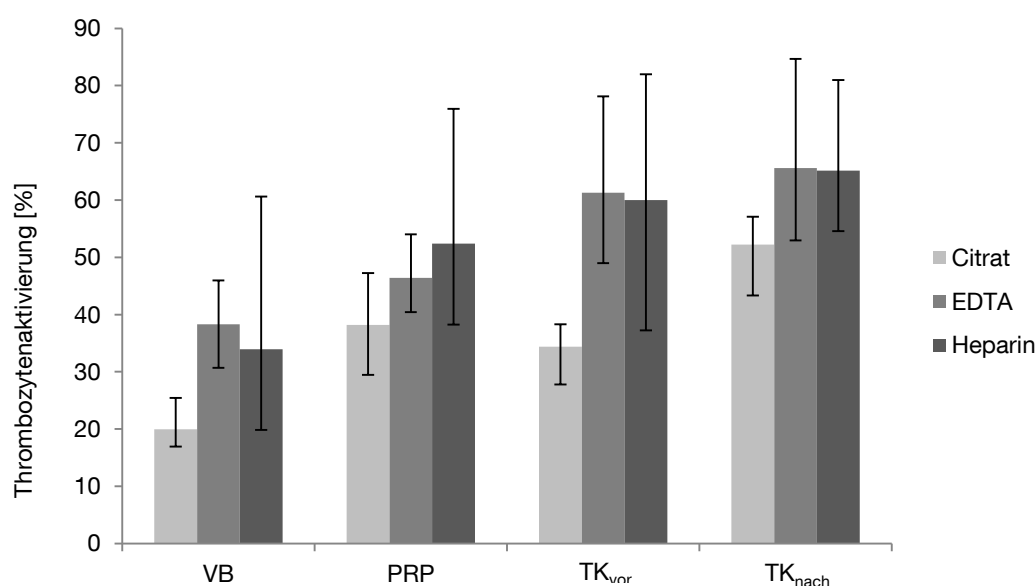


Abb. 5.6 **Aktivierungszustände unterschiedlicher Blutpräparate**

Die Aktivierung der Thrombozyten nimmt während der Aufbereitung stetig zu. Im Vergleich zum Vollblut (VB) erhöht sich im applizierten TK (TK_{nach}) mit allen Antigerinnungsmitteln die Aktivierung um ca. +30 %. Insgesamt fällt die Aktivierung bei Citrat in allen Fraktionen niedriger aus als bei EDTA und Heparin (Mittelwerte mit Min./Max.; $n = 5$).

Die Ergebnisse bestätigen die erwartete niedrigere Thrombozytenaktivierung mit Citrat im Vergleich zu EDTA und Heparin [52]. Bereits im Vollblut tritt hier eine deutlich geringere Aktivierung (20 %) als mit EDTA (38 %) und Heparin (34 %) auf. Durch den Zentrifugationsprozess nimmt diese zwar ebenfalls zu, bleibt jedoch durchweg unter den Werten der anderen Antigerinnungsmittel. Insbesondere nach der zweiten Zentrifugation (Citrat: $TK_{vor} = 34$ %) ergibt sich eine signifikante Differenz zu EDTA (61 %; $p < 0,01$) wie auch Heparin (60 %; $p < 0,05$).

Rasterelektronische Aufnahmen der applizierten, also versprühten Konzentrate (siehe Abb. 5.7) verdeutlichen die unterschiedlichen Aktivierungsverhältnisse.

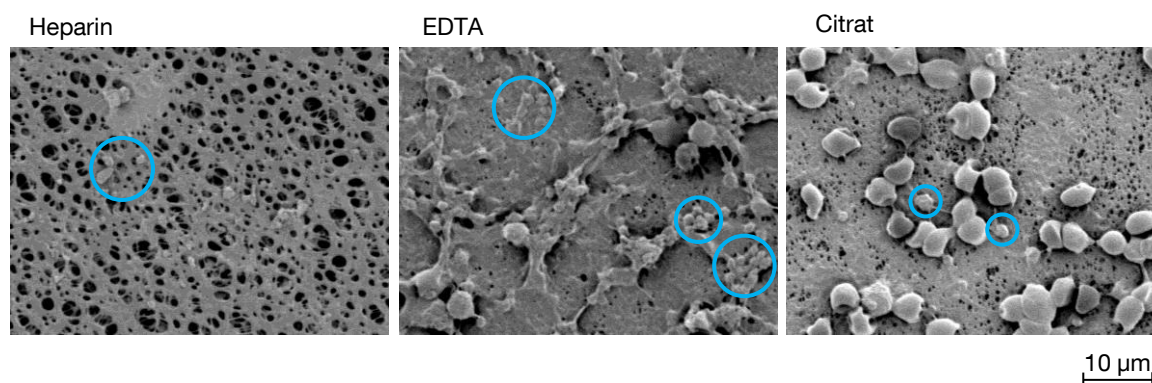


Abb. 5.7 **Aktivierungszustände der Thrombozyten nach Applikation (nach Versprühen) in Abhängigkeit der Antigerinnungsmittel**

Das Konzentrat mit Heparin lässt nur vereinzelte Blutbestandteile auf der Membran erkennen. Mit EDTA werden die meisten aktivierten Thrombozyten detektiert (blaue Markierung). Diese sind aggregiert und bilden ein dichtes Netzwerk auf der Membran. Bei Citrat sind nur vereinzelt aktivierte Thrombozyten vorhanden. Hauptsächlich befinden sich die im TK enthaltenen Rest-Erythrozyten auf der Membran.

Der gesteigerte Aktivierungszustand bei appliziertem EDTA-TK ist anhand des dichten Netzwerkes anhaftender und aggregierter Thrombozyten (vgl. Abb. 5.7, blaue Markierung) deutlich zu erkennen. Die REM-Aufnahme des Citrat-TK hingegen zeigt lediglich vereinzelt aktivierte Thrombozyten. Bei Heparin können nahezu keine Blutbestandteile nach dem Versprühen auf der Membran detektiert werden. Dies könnte zwar für eine niedrige Aktivierung der Thrombozyten sprechen, jedoch muss diese Aussage aufgrund der vermutlich bereits während der Zentrifugation auftretenden Agglomeratbildung (vgl. Abb. 3.15) kritisch erörtert werden.

Die Betrachtung des Aktivierungszuwachses während des Prozesses zeigt, dass mit jedem durchgeführten Prozessschritt bei EDTA und Heparin eine zusätzliche Thrombozytenaktivierung stattfindet. Im Gegensatz dazu ergeben sich bei Citrat jedoch annähernd identische Werte im PRP und TK_{vor} . Erst durch die Verdüsung erhöht sich die Aktivierungsrate um weitere 14 % auf einen Endwert von 52 %. EDTA erreicht, wie Heparin im TK_{nach} , einen durchschnittlichen Maximalwert von 65 % aktivierter Thrombozyten, wobei Heparin-TK durchweg die größten Messwertschwankungen mit stark probandenabhängigen Aktivierungswerten liefert.

5.3.2 Zellkultursystem

Membranauswahl

Die an die Membran gestellten grundlegenden Anforderungen wie Autoklavierbarkeit, Biokompatibilität etc. (vgl. Kap. 5.2.1) werden durch die gewählte Polyethersulfonmembran mit Porengröße 0,45 μm und die Cellulosenitratmembran (Porengröße: 1,2 μm) erfüllt.

Die Ergebnisse der Co-Inkubation (vgl. Abb. 5.8) mit humanen Fibroblasten zeigen nach sieben Tagen keinen zytotoxischen Einfluss der Membranen.

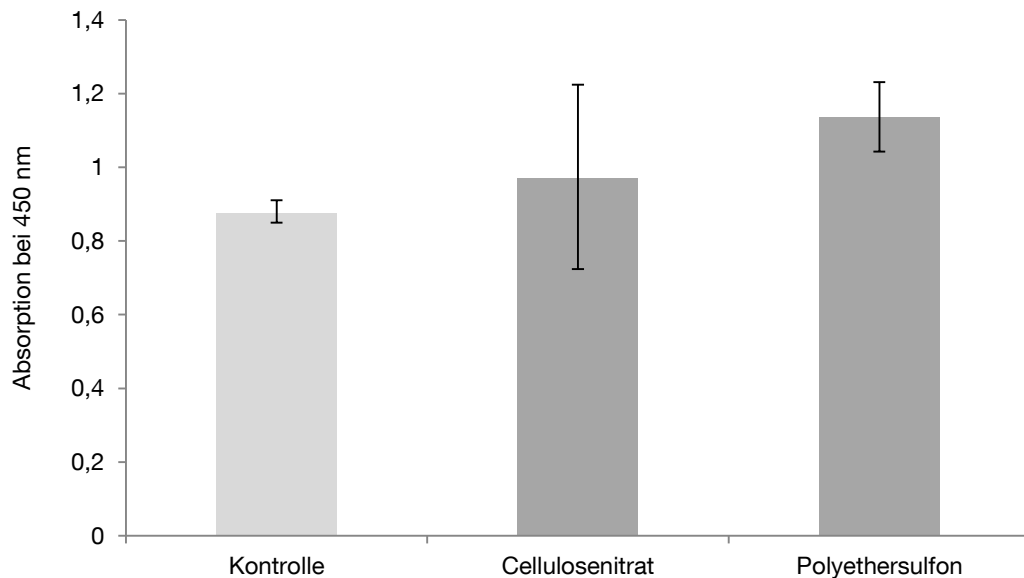


Abb. 5.8 **Auswertung des Proliferationstests mit Cellulosenitrat- und Polyethersulfonmembran**

Beide Membranen zeigen zur Kontrolle vergleichbare Absorptionswerte und somit ein biokompatibles Verhalten (Co-Inkubation mit humanen Fibroblasten. Auswertung: CCK-8-Test an Tag 7. Mittelwerte mit Min./Max.; n = 6).

Die bei 450 nm photometrisch detektierten Absorptionswerte, welche mit der Zellzahl korrelieren, liefern für die Cellulosenitratmembran sowie für die Polyethersulfonmembran äquivalente Ergebnisse (Cellulosenitrat: 1,0; Polyethersulfon: 1,1; Kontrolle: 0,9).

Die im Vergleich zum kommerziellen Zellkultursystem etwa doppelt so große Diffusionsfläche im neuen Zellkultureinsatz mit PES- und Cellulosenitratmembran hat den erwartet positiven Einfluss auf die PDGF-AB Diffusion (vgl. Abb. 5.9).

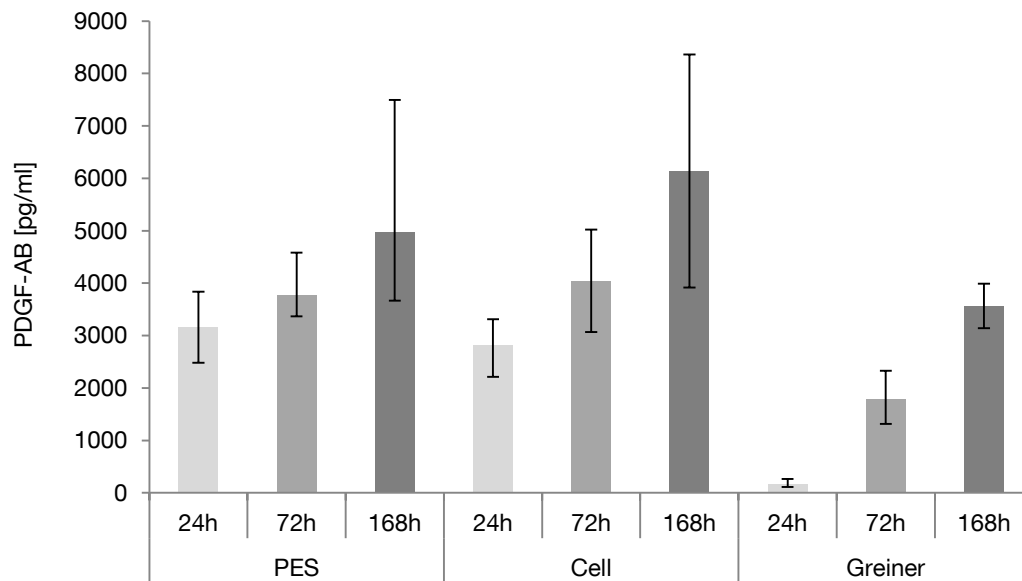


Abb. 5.9 **Vergleich des Membran-Diffusionsverhaltens**

Die Halbzylinder mit PES- bzw. Cellulosenitratmembran sowie das Well mit Zellkultureinsatz (Fa. Greiner) wird mit Thrombozytenkonzentrat ($490 \cdot 10^3$ plt/ μ l) befüllt und jeweils nach 24, 72 und 168 Stunden eine Probe aus dem gegenüberliegenden Kompartiment entnommen. Die Untersuchung der PDGF-AB Diffusion zeigt, dass beim Zellkultureinsatz (Greiner) im Vergleich zur Polyethersulfonmembran (PES) und der Cellulosenitratmembran (Cell) die Diffusion deutlich verzögert ist. Alle drei Membranen weisen eine zeitabhängige Wachstumsfaktordiffusion über die Dauer von sieben Tagen auf (Mittelwerte mit Min./Max.; $n \geq 3$).

Nach 24 Stunden Inkubation mit Thrombozytenkonzentrat erreicht die PDGF-AB Konzentration im konventionellen Zellkultureinsatz 170 pg/ml, was nur ca. einem sechszehntel der PDGF-AB Menge entspricht, die nach 24 Stunden well-seitig mit der Cellulosenitratmembran detektiert wird (2811 pg/ml). Die maximale Diffusion (3158 pg/ml) wird nach 24 Stunden mit der Polyethersulfonmembran erzielt. Nach sieben Tagen (168 h) werden Werte von 3564 pg/ml (Greiner), 6138 pg/ml (Cellulosenitrat) und 4971 pg/ml (Polyethersulfon) erreicht.

Da hinsichtlich Fertigung und Montage der Zellkultureinsätze die mechanischen Eigenschaften (bspw. Ausreichende Reißfestigkeit) eine wichtige Rolle spielen, wird infolge die PES-Membran für alle weiteren Versuche präferiert.

Silikon-Grundkörper

Die poröse Trennmembran wird in die Membran-Aufnahme eingelegt, die 3-teilige Gussform verschraubt und das flüssige Silikon eingegossen (vgl. Abb. 5.10). Nach der vollständigen Aushärtung wird der entformte Zellkultureinsatz mit Heißdampf sterilisiert.

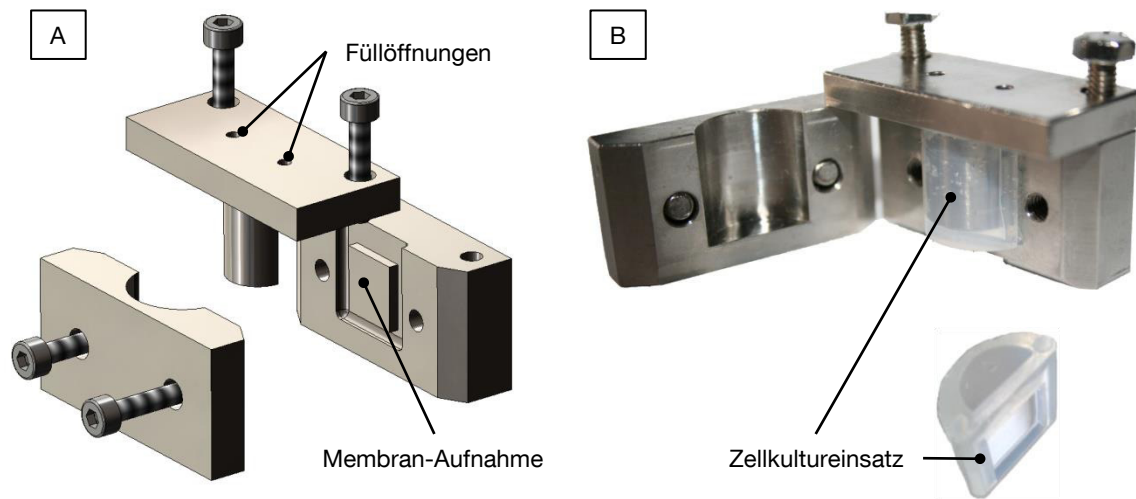


Abb. 5.10 **Silikon-Gussform zur Fertigung des Zellkultureinsatzes mit integrierter Membran**

A: Explosionsdarstellung der Gussform. Die Trenn-Membran wird direkt in der Gussform platziert, durch die Montage der Gussform fixiert und anschließend mit Silikon umgossen.

B: Aufgeklappte Gussform mit ausgehärtetem Zellkultureinsatz. Nach der Entformung wird der Zellkultureinsatz autoklaviert.

Die technische Zeichnung der Gussform ist in Anhang G zu finden.

Versuche mit Serum

Bei ersten Co-Inkubationsversuchen von humanen Fibroblasten mit Zellkultureinsätzen aus Silikon wird ab Tag 3 ein unerwartetes Absterben der Zellen beobachtet. Aufgrund der ausgewiesenen Biokompatibilität der Silikone liegt die Vermutung eines Nährstoffmangel-induzierten Zellsterbens nahe [4, 118]. Die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher FBS-Konzentrationen im Nährmedium bei der Co-Inkubation wird daher als erster Anhaltspunkt untersucht. Nach 7 Tagen Co-Inkubation der Fibroblasten mit Silikon-Halbzylindern kann ein deutlich eingeschränktes Zellwachstum bei 5 % und 10 % FBS detektiert werden (Abb. 5.11). Im Vergleich zur Kontrolle (1,0 bei 15 %, 1,1 bei 20 %) werden auch bei der Verwendung von 15 % und 20 % FBS etwas geringere Absorptionswerte gemessen (SILPURAN 2430: 0,7 bei 15 %, 1,0 bei 20 %; SILPURAN 2438: 0,9 bei 15 %, 0,8 bei 20 %).

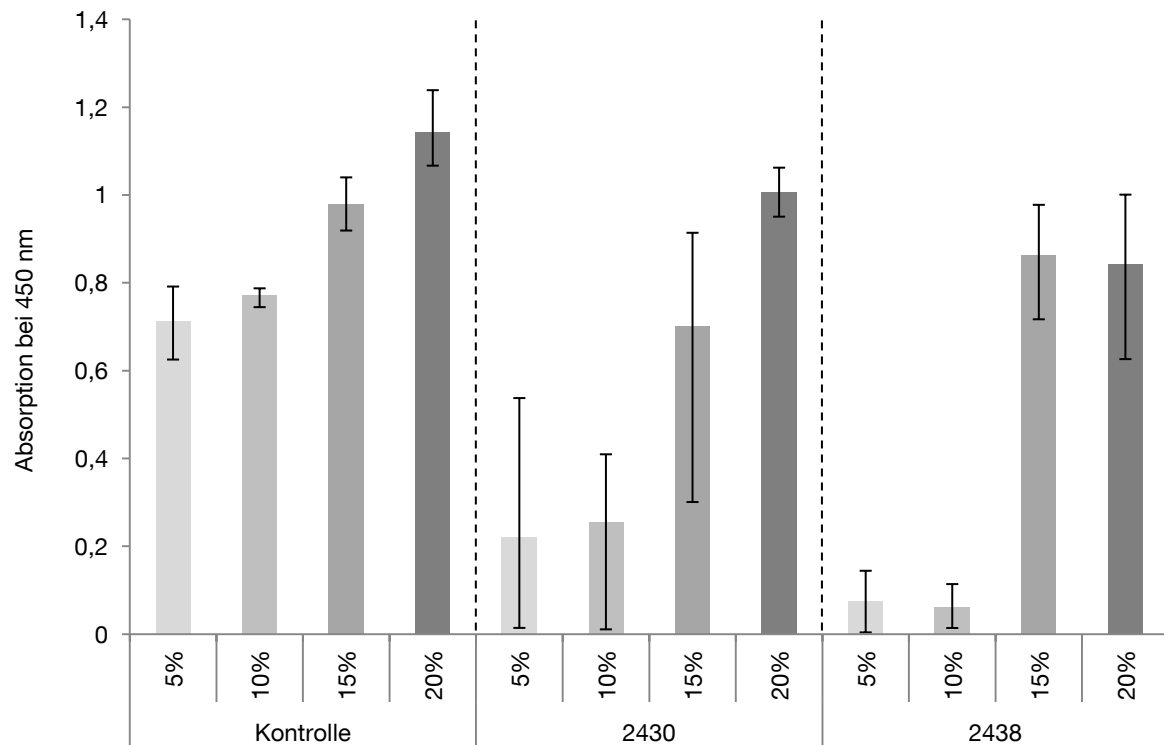


Abb. 5.11 **Zellviabilität nach Co-Inkubation von humanen Fibroblasten mit Halbzylindern aus SILPURAN 2430 und 2438**

Einsatz von Nährmedium mit unterschiedlicher FBS-Konzentration. Auswertung mittels CCK-8-Test an Tag 7. Im Vergleich zur Kontrolle (ohne Halbzylinder) ist das Zellwachstum bei der Co-Inkubation mit Silikon-Zellkultursystemen sowohl mit 5 % als auch mit 10 % FBS stark eingeschränkt. Ab einer FBS-Konzentration von 15 % nähert sich die Absorption der Co-Inkubationsansätze denen der Kontrolle an (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 3).

Die morphologische Betrachtung der Zellen lässt dennoch ein zur Kontrolle vergleichbares Zellwachstum bei den höheren FBS-Konzentrationen erkennen (vgl. Abb. 5.12). Zwischen den getesteten Silikonen ist kein signifikanter Unterschied erkennbar. Für weitere Versuche wird daher ausschließlich das SILPURAN 2430 verwendet.

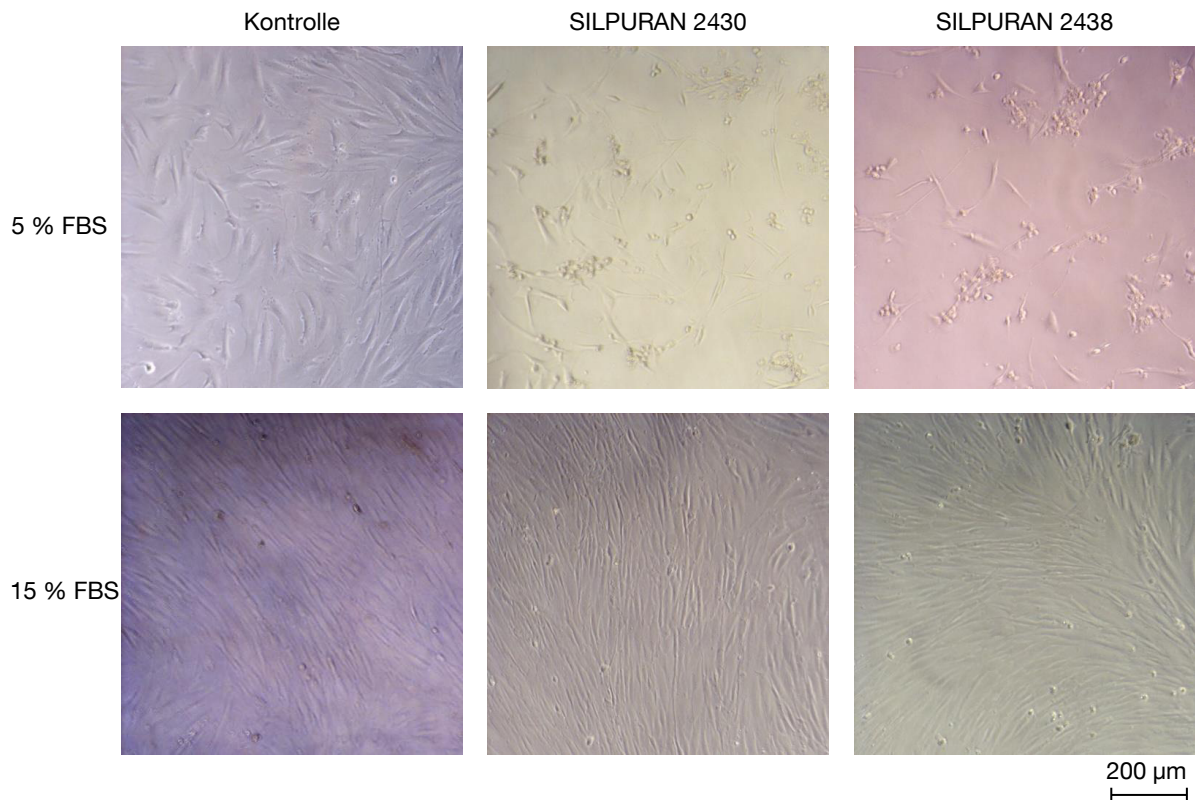


Abb. 5.12 **Morphologische Betrachtung der Fibroblasten nach 7 Tagen Co-Inkubation mit Halbzylindern aus SILPURAN 2430 und SILPURAN 2438**

Bei Verwendung von Standard-Nährmedium mit 5 % FBS ist ein deutliches Abkugeln der Fibroblasten sowohl bei Inkubation mit Halbzylindern aus SILPURAN 2430 als auch SILPURAN 2438 zu beobachten. Dies spricht für eine erhöhte Absterberate im Vergleich zur Kontrolle. Dort präsentieren sich die Zellen elongiert in der für Fibroblasten typischen Dreiecksform. Ab einem Zusatz von 15 % FBS kann morphologisch kein Unterschied zur Kontrolle detektiert werden. Bei beiden Zellkultursystemen liegen die Fibroblasten nach siebentägiger Kultivierung in der charakteristischen spindelförmigen Form konfluent im Zellkulturwell vor.

Protein-Adsorption

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse aus den Versuchen mit Serum, welche einen sukzessive aufkommender Nährstoffmangel während der siebentägigen Versuchsdauer vermuten lassen, werden die Adsorptionseigenschaften von SILPRUAN 2430 eingehender untersucht. Hierfür wird die Adsorption von PDGF-AB über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht (vgl. Abb. 5.13).

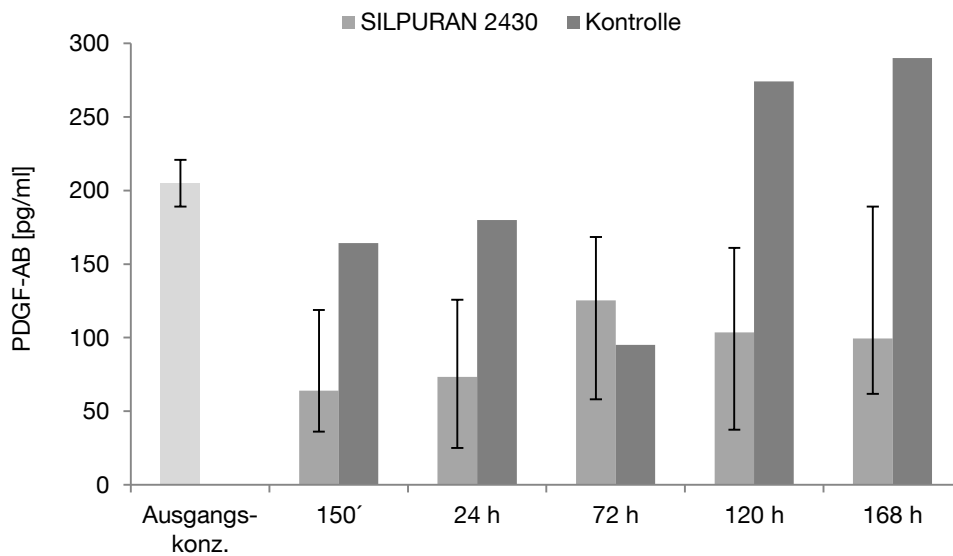


Abb. 5.13 **PDGF-AB Adsorption an SILPURAN 2430**

Halbzylinder aus SILPURAN 2430 werden in eine PDGF-AB Stocklösung (205 pg/ml) eingelegt und eine Woche im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle fungiert die PDGF-AB Lösung ohne Silikoneinsatz. Die Auswertung erfolgt mittels PDGF-AB ELISA. Zu fünf Zeitpunkten wird 50 µl Probe gezogen und mittels ELISA die PDGF-AB Konzentration ermittelt. Bereits nach 150 Minuten Inkubation ist die detektierte PDGF-AB Konzentration auf ca. $\frac{1}{4}$ der Ausgangsmenge abgesunken. Während der Inkubationszeit schwankt die PDGF-AB Menge zwischen 64 pg/ml (min. nach 150 min) und 125 pg/ml (max. nach 72 h), bleibt aber konstant deutlich unter dem Ausgangswert von 205 pg/ml. Der PDGF-AB Gehalt der Kontrolllösung weist zwar auch große Messschwankungen auf, bleibt jedoch im Mittel über die Inkubationszeit konstant (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 5, Kontrolle n = 1).

Die Auswertung des Adsorptionsversuchs zeigt, dass die PDGF-AB Konzentration während der Co-Inkubation mit Silikon-Halbzylindern stark abnimmt. Nach 150 Minuten wird mit 64 pg/ml lediglich ein Viertel des Ausgangswertes detektiert. Während der siebentägigen Versuchsdauer schwankt die PDGF-AB Konzentration um einen Mittelwert von 93 pg/ml mit einem Minimum nach 150 Minuten und einem Maximum von 125 pg/ml nach 72 Stunden. Im Kontrollansatz treten zwar auch große Messunterschiede an den Testtagen auf, jedoch beträgt der mittlere PDGF-AB Gehalt 200 pg/ml, was vergleichbar zur Ausgangskonzentration ist.

Thermoplast-Grundkörper

Das Spritzgießwerkzeug wird für die Spritzgießmaschine Microsystem 50 (Fa. Wittmann-Battenfeld GmbH, Kottlingbrunn, Österreich) konzipiert und konstruiert. Da diese mit einem maximalen Schussgewicht von 1cm³ für die Produktion von Mikrobautteilen ausgelegt ist, muss die Grundkörpergeometrie für eine optimale Abformung angepasst werden (vgl. Abb. 5.14).

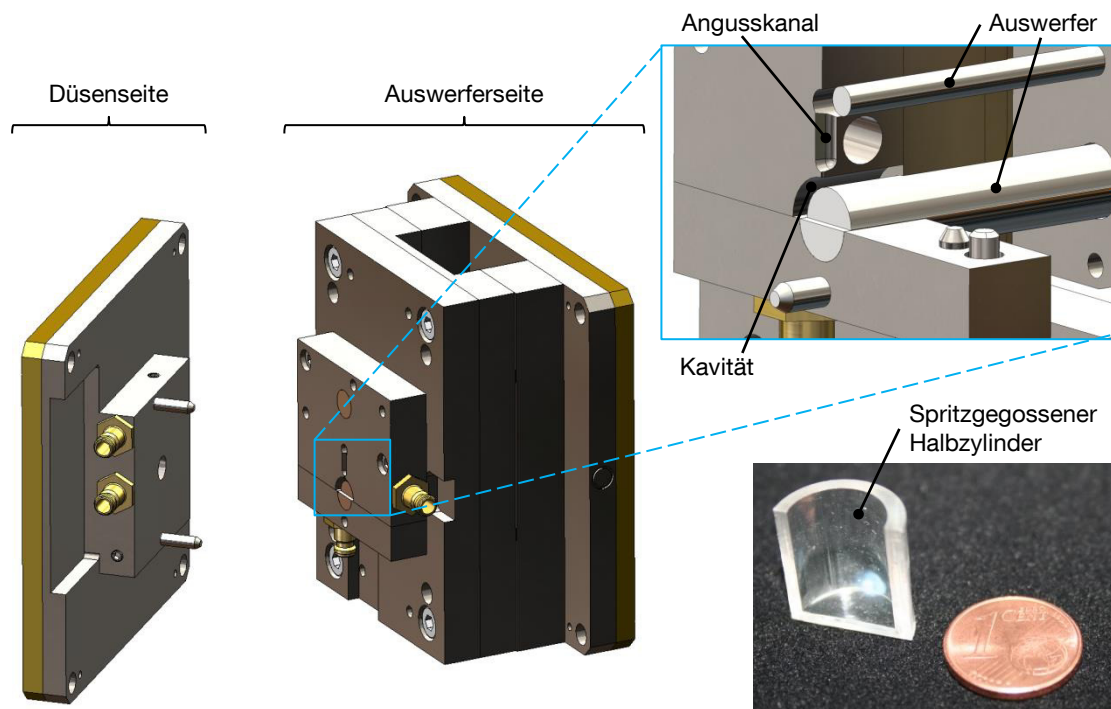


Abb. 5.14 **Spritzgießwerkzeug zur Fertigung der Halbzylinder**
Fertigung des Zellkultursystem-Grundkörpers mittels Spritzgießen auf einer Microsystem 50 (Fa. Wittmann-Battenfeld GmbH, Kottlingbrunn, Österreich).

Polymerauswahl

Das Beimpfen von humanen Fibroblasten mit Eluaten der Kunststoffe hat keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum. Bei der Absorptionsmessung an Tag 7 werden für alle Ansätze zur Kontrolle vergleichbare Werte erzielt (Abb. 5.15). Somit sind alle ausgewählten Kunststoffe als Grundkörperwerkstoff vorerst als geeignet anzusehen.

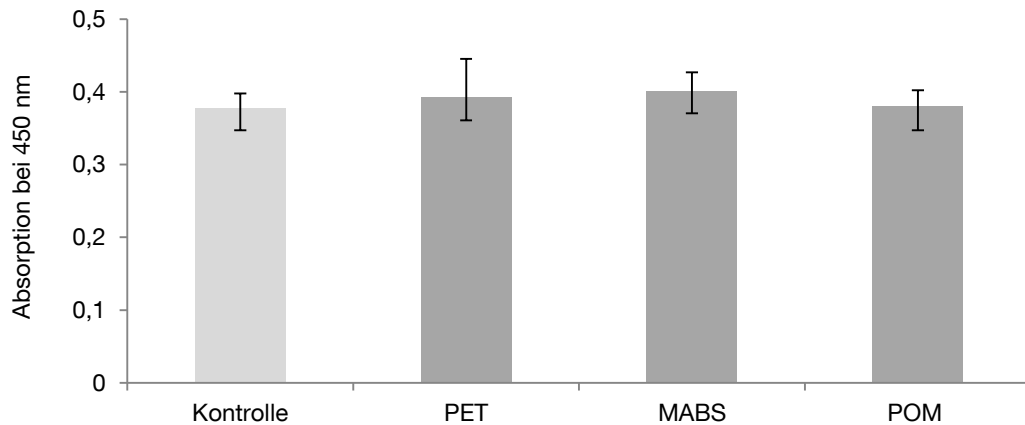


Abb. 5.15 **Zytotoxizitätstest mit Kunststoffgranulat**

Untersucht wird der Einfluss unterschiedlicher Kunststoffgranulate auf das Wachstum humaner Fibroblasten. Auswertung mittels CCK-8-Test an Tag 7. Keines der getesteten Kunststoff-Eluate weist einen zytotoxischen Einfluss auf (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 10).

Der Direktkontaktversuch mit spritzgegossenen Zellkultureinsätzen zeigt hingegen ein konträres Bild (vgl. Abb. 5.16).

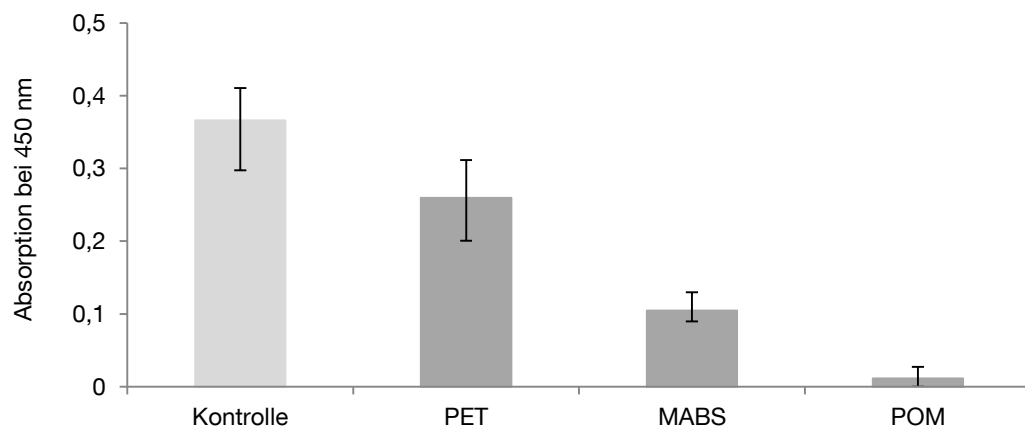


Abb. 5.16 **Zytotoxizitätstest mit spritzgegossenen Grundkörpern**

Während der Co-Inkubation mit spritzgegossenen Zellkultureinsätzen haben sowohl POM als auch MABS eine zytotoxische Wirkung. Der Absorptionswert bei MABS erreicht nach 7 Tagen Co-Inkubation nur 29 % im Vergleich zur Kontrolle und bei POM sind fast keine lebenden Zellen mehr zu detektieren. Alleine die Grundkörper aus PET haben mit einem Absorptionswert von 0,3 im Vergleich zur Kontrolle (0,4) keinen signifikanten Einfluss auf die Fibroblasten (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 5).

Sowohl POM mit einem Absorptionswert von annähernd 0 und MABS mit 0,1 zeigen eine signifikant zytotoxische Wirkung. Alleine die Grundkörper aus PET haben mit einem Absorptionswert von 0,3 (71 % im Vergleich zur Kontrolle, 0,4) keine negative Auswirkung auf das Zellwachstum und werden somit für die weiteren Versuche ausgewählt.

Klebstoffauswahl

Die Zytotoxizität der gewählten Klebstoffe Loctite 3926, 3921, 3301, 3311 und 3321, die laut Herstellerangaben nach DIN 10993-5 auf Zytotoxizität geprüft wurden, werden per Direktkontakt mit humanen Fibroblasten auf ihre Tauglichkeit hin überprüft (Testaufbau siehe Anhang B).

Der Direktkontaktversuch von humanen Fibroblasten mit den Klebstoffen bestätigt biokompatible Eigenschaften für Loctite 3926 und 3321. Die Absorptionswerten von 0,96 bzw. 0,99 zeigen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (0,97). Dagegen haben insbesondere Loctite 3921 und 3311 eine stark zytotoxische Wirkung (vgl. Abb. 5.17).

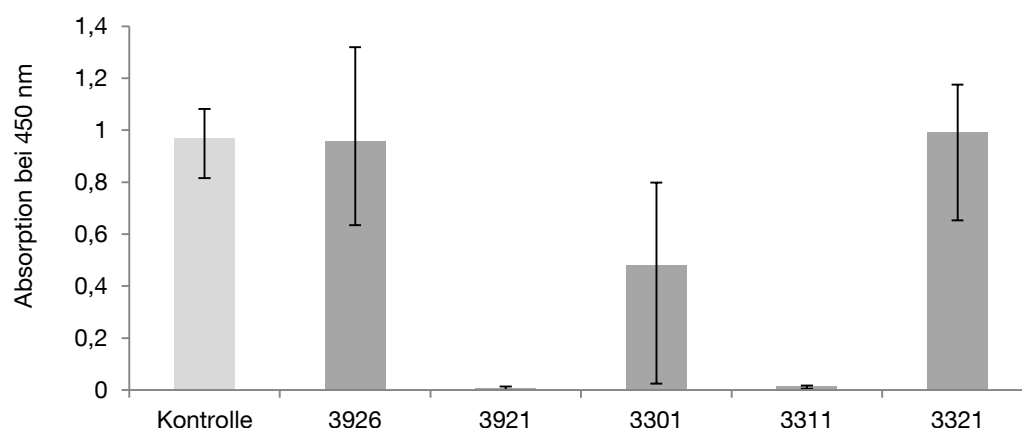


Abb. 5.17 **Zytotoxizitätstest mit unterschiedlichen Klebstoffen**

Die Klebstoffe werden mit humanen Fibroblasten inkubiert. Auswertung mittels CCK-8-Test an Tag 7. Sowohl Loctite 3926, als auch 3321 zeigen ein biokompatibles Verhalten. Bei Loctite 3301 ist der erzielte Absorptionswert um etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. 3921 und 3311 weisen ein stark zytotoxisches Verhalten auf (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 10).

Anhand dieses Ergebnisses kann Loctite 3926 und Loctite 3321 zur Montage der Membran empfohlen werden. Beide Klebstoffe zeigen eine gleichwertige zytokompatible Eigenschaft. Für die weiteren Versuche wird ausschließlich Loctite 3926 verwendet.

Gesamtsystem aus spritzgegossenem Grundkörper mit aufgeklebter Membran

Für das spritzgegossene Gesamtsystem wird aufgrund der durchgeführten Evaluationstests (vgl. Abb. 5.16, Abb. 5.17) PET als Grundkörper-Werkstoff und Loctite 3926 zur Montage der Membran ausgewählt. Die Verklebung der Membran auf dem spritzgegossenen Halbzylinder erfolgt durch manuelles Auftragen des Klebstoffs auf dem Rahmen des HZ und anschließender Montage der Membran. Die Aushärtereaktion wird durch UV-Licht induziert, welches mittels Lichtleiter (Loctite 97324 $\varnothing 8 \times 1500 \text{ mm}$, Henkel AG & Co. kgaA, Düsseldorf) in einer UV Kabine (Loctite 97057, Henkel AG & Co. kgaA, Düsseldorf) fokussiert auf das Bauteil appliziert wird (Intensität: 650 mW/cm^2). Das Zellsystem wird insgesamt 140 Sekunden in vier Positionen belichtet.

Der Validierungsversuch mit dem spritzgegossenen Komplettsystem zeigt ein signifikant zytotoxisches Verhalten (vgl. Abb. 5.18, links). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Zellsystem (0,6) wird mit den Halbzylindern lediglich ein Absorptionswert von 0,2 erreicht, was einer Reduzierung der Zellzahl um ca. 70 % bedeutet. Innerhalb der Halbzylindergruppe treten zudem große Schwankungen auf (vgl. Abb. 5.18, rechts).

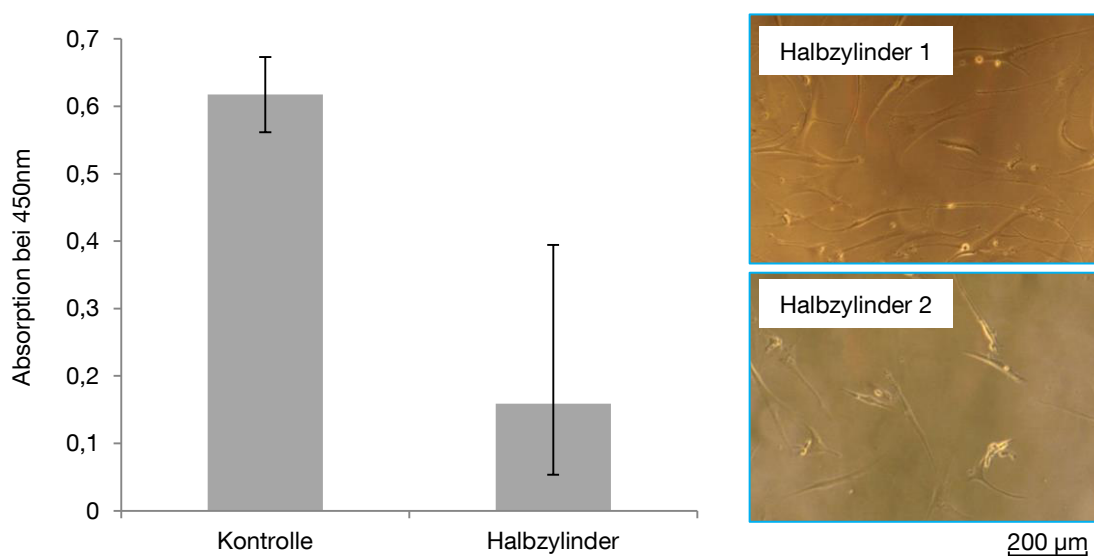


Abb. 5.18 **Einfluss des spritzgegossenen Gesamtsystems auf humane Fibroblasten, Direktkontaktversuch mit Zellkultureinsätzen aus PET und aufgeklebter Membran**

Im Vergleich zur Kontrolle ist das Wachstum der Fibroblasten bei Co-Inkubation mit spritzgegossenen Halbzylindern aus PET und aufgeklebter Membran in Standard-Zellkulturmedium im Mittel deutlich (ca. 70 %) eingeschränkt. Zudem treten innerhalb der Ansätze mit den Halbzylindern sehr große Schwankungen auf (Mittelwerte mit Min./Max.; $n = 6$). Bei einigen Ansätzen wird das Zellwachstum kaum beeinflusst (Halbzylinder 1) wohingegen in anderen Zellsystemen ein deutliches Abkugeln der Zellen zu beobachten ist (Halbzylinder 2).

5.3.3 Co-Inkubation

Die abschließenden Co-Inkubationsversuche werden mit Zellkultursystemen aus Silikon (SILPURAN 2430) und PET mit PES-Membran durchgeführt. Das Thrombozytenkonzentrat wird mittels manueller Methode hergestellt und anschließend entweder direkt nach der zweiten Zentrifugation (TK_{vor}) oder nach dem Versprühen (TK_{nach}) getestet. Abb. 5.19 zeigt das Ergebnis der CCK-8-Test Messung an Tag 7 der Co-Inkubation von nicht versprühtem TK mit Fibroblasten im Zellkultursystem aus Silikon.

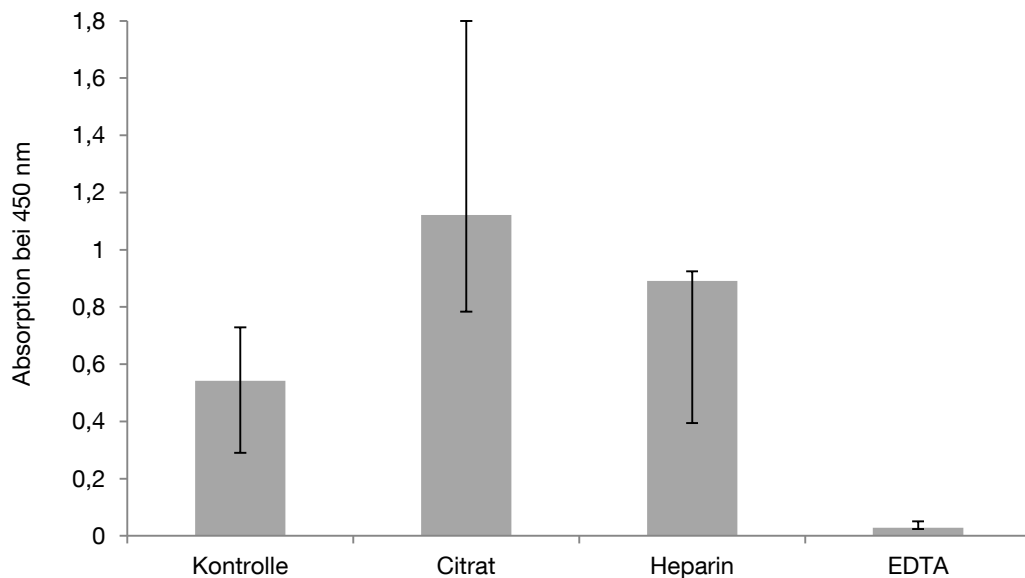


Abb. 5.19 **Co-Inkubation von nicht versprühtem TK mit humanen Fibroblasten im Silikon-Zellkultursystem**

Auswertung mittels CCK-8-Test-Test an Tag 7. Mit Citrat und Heparin als Antigerinnungsmittel bei der Herstellung von TK kann mit Absorptionen von 1,12 bzw. 0,89 eine deutlich proliferationssteigernde Wirkung des TK im Vergleich zur Kontrolle (0,54) gemessen werden. Das EDTA-TK hingegen bewirkt ein Absterben der Zellen, was in einem sehr niedrigen Absorptionenwert von 0,03 an Tag 7 resultiert (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 12).

Die Thrombozytenkonzentrate mit Citrat und Heparin bewirken einen deutlichen Anstieg der Zellzahl. Mit Absorptionen von 1,12 und 0,89 im Vergleich zu 0,54 der Kontrolle kann eine Proliferationssteigerung der humanen Fibroblasten um ca. 100 % bzw. 65 % erzielt werden. Dahingegen wird bei EDTA als Antigerinnungsmittel ein Zellsterben beobachtet (vgl. Abb. 5.20).

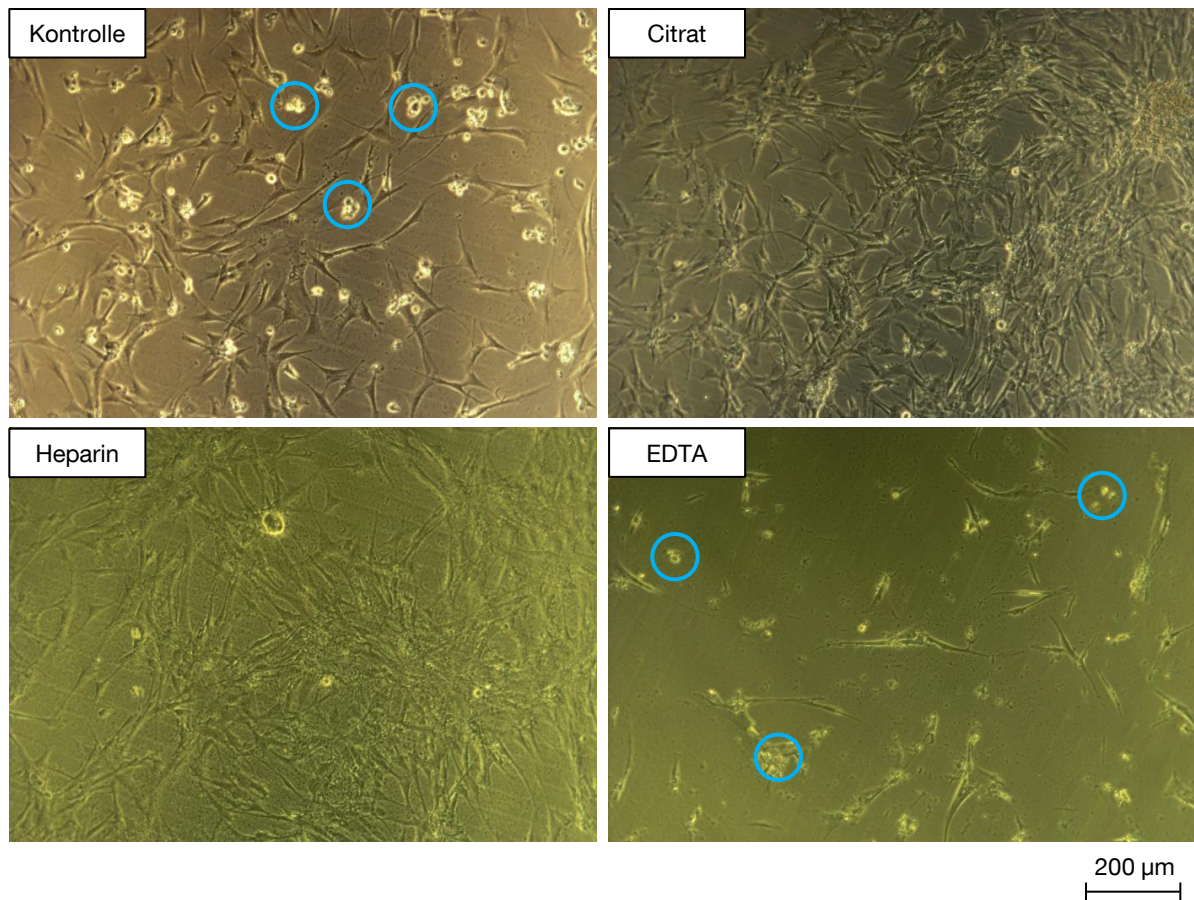


Abb. 5.20 **Co-Inkubationsversuch mit Fibroblasten und Thrombozytenkonzentrat mit Variation des Antigerinnungsmittels**

Im Vergleich zu Heparin und Citrat ist die Zellzahl bei EDTA-TK deutlich reduziert. Trotz des Einsatzes von 15 % FBS ist auch bei der Kontrolle eine erhöhte Anzahl toter Zellen (einzelne als Beispiel markiert) zu erkennen. Die Co-Inkubation der Fibroblasten mit Citrat- und Heparin-TK hat eine proliferationsfördernde Wirkung. Die Zellen bilden ein dichtes, nach sieben Tagen zu ca. 80 % konfluentes Netzwerk aus.

Die Co-Inkubation humaner Fibroblasten mit TK im spritzgegossenen Zellkultureinsatz aus PET und aufgeklebter Membran zeigt eine proliferationsfördernde Wirkung von Heparin-TK und Citrat-TK sowohl vor (TK_{vor}), als auch nach (TK_{nach}) der Applikation (siehe Abb. 5.21).

Mit TK_{vor} werden Absorptionswerte von 0,26 (Heparin) und 0,33 (Citrat) gemessen, was eine Zellzahlerhöhung um 44 % bzw. 79 % im Vergleich zur Kontrolle (0,18) bedeutet. Mit versprühtem TK werden sogar noch höhere Werte von 0,34 (Heparin) und 0,4 (Citrat) erzielt, welche sich allerdings aufgrund der relativ hohen Standardabweichung nicht signifikant von den TK_{vor} -Werten unterscheiden. Die Kultivierung mit EDTA-TK hat, wie auch bei der Co-Inkubation im Silikon-System, ein Absterben der Zellen zur Folge.

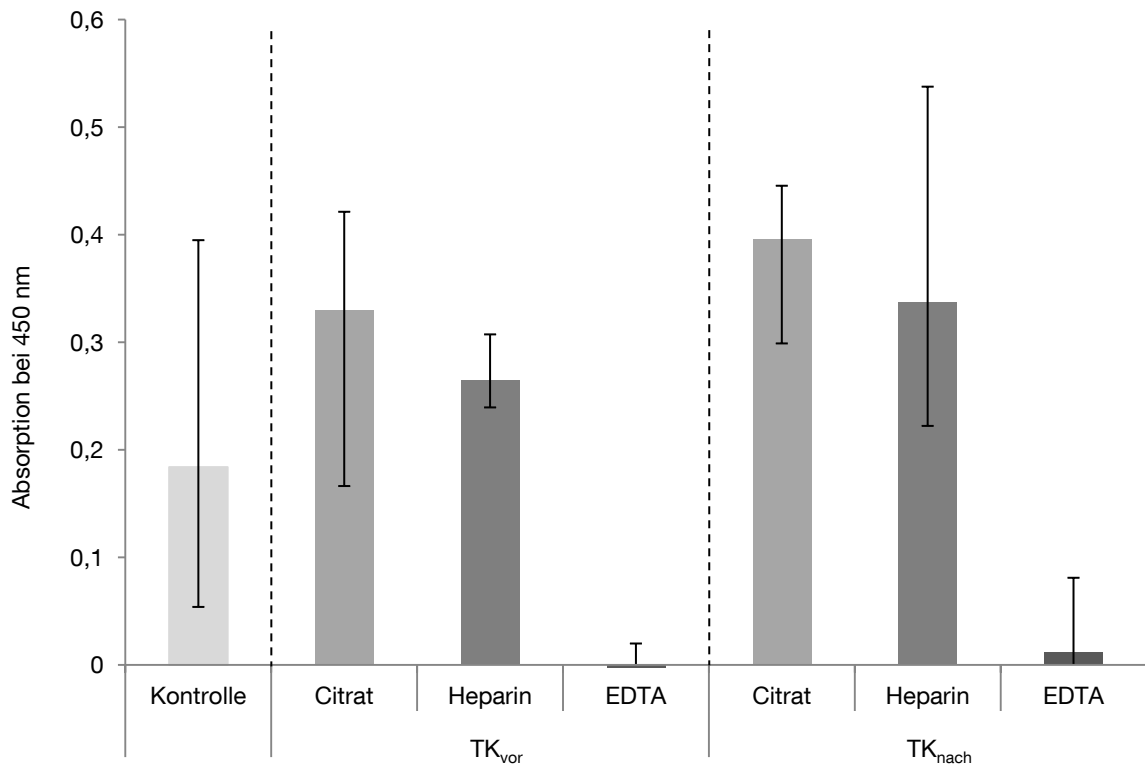


Abb. 5.21 **Einfluss von Thrombozytenkonzentrat (vor und nach Verdüsung) auf humane Fibroblasten (Co-Inkubation im spritzgegossenen Zellkultur-system)**
 Auswertung mittels CCK-8-Test an Tag 7. Sowohl mit versprühtem (TK_{nach}) als auch nicht versprühtem TK (TK_{vor}) kann mit Citrat und Heparin eine deutliche Zellzahlerhöhung an Tag 7 detektiert werden. Die Absorptionswerte erreichen bei Heparin 0,26 (TK_{vor}) und 0,34 (TK_{nach}), bei Citrat 0,33 (TK_{vor}) und 0,4 (TK_{nach}). Im Vergleich zur Kontrolle (0,18) bedeutet das eine Zunahme um 44-115 %. Mit EDTA hingegen kann kein positives Signal, also keine vitalen Zellen, gemessen werden (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 3).

Die PDGF-AB Freisetzung wird zu drei Zeitpunkten überprüft: Nach 24 h, 72 h und 168 h Co-Inkubation. Da PDGF-AB von den Fibroblasten gebunden wird [61] und so mittels ELISA nicht mehr detektiert werden kann, wird jeweils ein Zellkultursystem ohne Fibroblasten mitgeführt. Die Differenz des PDGF-AB Wertes zwischen den beiden Ansätzen (mit / ohne Fibroblasten) steht für die, von den Zellen verbrauchte PDGF-AB Menge.

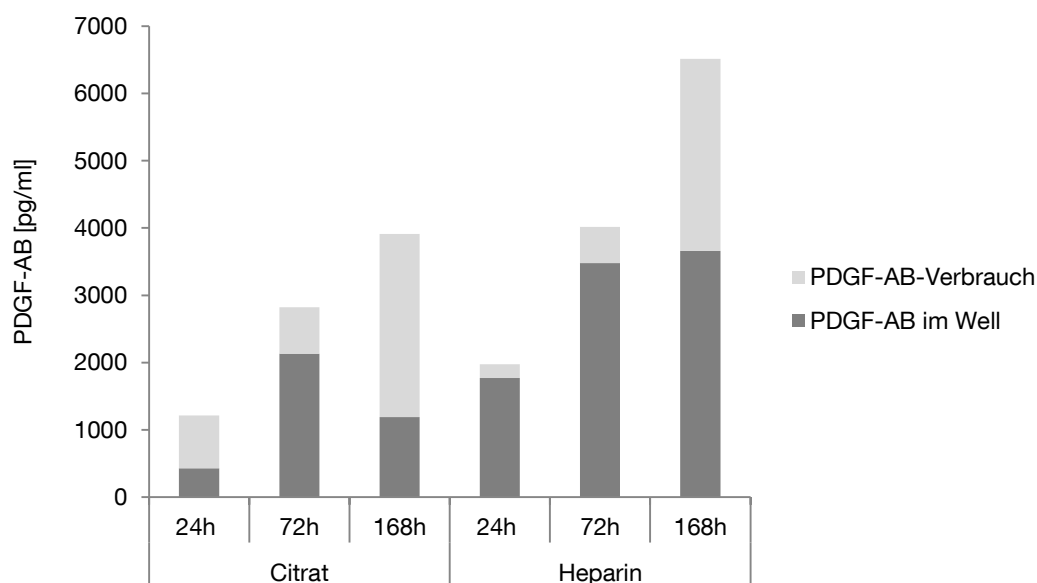


Abb. 5.22 **PDGF-AB Freisetzung aus den Thrombozyten**

Insgesamt wird vom Heparin-TK eine größere Menge an PDGF-AB freigesetzt (6515 pg/ml) als aus dem Citrat-TK (3913 pg/ml). Der PDGF-AB-Verbrauch der Fibroblasten ist jedoch vergleichbar. Nur in den ersten 24 h wird, im Vergleich zum Heparin-TK (204 pg/ml), bei der Co-Inkubation mit Citrat-TK fast das Vierfache an PDGF-AB von den Zellen aufgenommen (786 pg/ml) (Mittelwerte, n = 3, Doppelbestimmung).

Der PDGF-AB Verbrauch der Fibroblasten ist bei Co-Inkubation mit Citrat-TK in den ersten 24 h mit einem Mittelwert von 786 pg/ml annähernd um das Vierfache höher im Vergleich zum Heparin-TK (204 pg/ml). Nach 72 h Co-Inkubation nähert sich die Menge an aufgenommenem PDGF-AB an (Citrat: 690 pg/ml; Heparin: 541 pg/ml) und erreicht nach 168 h mit 2725 pg/ml (Citrat) und 2854 (Heparin) etwa gleiche Werte. Insgesamt wird vom Heparin-TK während der Versuchsdauer ein höherer Maximalwert an PDGF-AB freigesetzt (6515 pg/ml), verglichen mit Citrat-TK (3913 pg/ml). Die vom EDTA-TK freigesetzte PDGF-AB Menge liegt mit 4404 pg/ml in dem Bereich des Citrat-TKs, jedoch kann, aufgrund des Zellsterbens, kein PDGF-AB Verbrauch durch die Zellen detektiert werden.

Der Vergleich der PDGF-AB Freisetzung aus TK_{vor} (TK vor dem Versprühen) und TK_{nach} (TK nach dem Versprühen) ergibt eine reduzierte Freisetzungskinetik aus versprühtem TK (siehe Abb. 5.23). Dennoch liegt die Wachstumsfaktorfreisetzung auch beim verdünten Konzentrat in dem für Fibroblasten als optimal bezeichneten Bereich von 1000-2000 pg/ml [140].

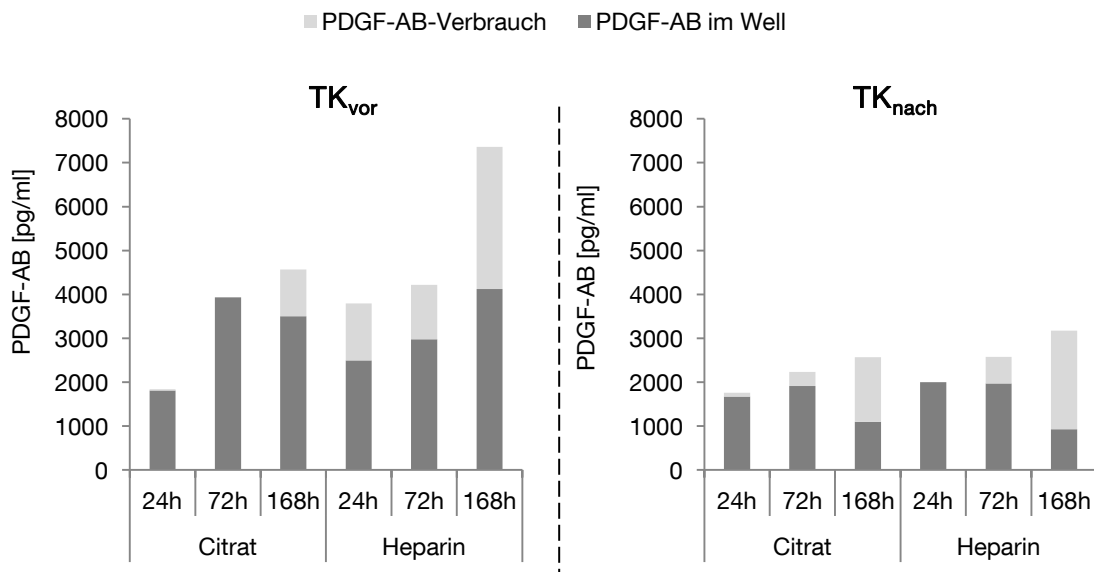


Abb. 5.23 **PDGF-AB Freisetzung aus TK_{vor} und TK_{nach}**

Aus versprühtem TK (TK_{nach}) wird durchgängig weniger PDGF-AB während der 7-tägigen Versuchsdauer freigesetzt. Bei Citrat wird nach 168 h mit 2568 pg/ml beim TK_{nach} nur gut 50 % der PDGF-AB Menge des nicht versprühten TK's (TK_{vor}) erreicht (4568 pg/ml). Aus Heparin-TK wird im Vergleich insgesamt eine größere Menge an PDGF-AB aus nicht versprühtem TK sezerniert, wobei auch hier aus TK_{vor} mit 7362 pg/ml mehr als doppelt so viel PDGF-AB detektiert wird als bei TK_{nach} (3176 pg/ml) (n = 1, Doppelbestimmung).

Über die Versuchsdauer von 168 h wird im Vergleich von TK_{vor} und TK_{nach} sowohl bei Citrat als auch bei Heparin deutlich mehr PDGF-AB aus TK_{vor} sezerniert. Der Maximalwert nach 168 h beträgt bei beiden Antigerinnungsmitteln bei TK_{nach} nur ca. 50 % der PDGF-AB Menge aus TK_{vor} . Der Vergleich von Citrat und Heparin zeigt bei TK_{vor} einen deutlich höheren Maximalwert von 7362 pg/ml bei Heparin. Bei Citrat wird dagegen lediglich ein Maximalwert von 4568 pg/ml gemessen. Werden die Werte der Antigerinnungsmittel im TK_{nach} gegenübergestellt, so ergeben sich hier nach 168 h mit 2568 pg/ml (Citrat) und 3176 pg/ml (Heparin) ähnliche Werte. Aus EDTA-TK wird mit 4018 pg/ml (TK_{vor}) und 3233 pg/ml (TK_{nach}) eine zu Citrat vergleichbare Menge an PDGF-AB detektiert, jedoch kann auch hier aufgrund des eingeschränkten Zellwachstums kein Bezug zum Wachstumsfaktorverbrauch durch die Fibroblasten hergestellt werden.

Während des Co-Inkubationsversuchs zeigt der optische Vergleich von versprühtem und nicht versprühtem Thrombozytenkonzentrat eine deutliche well-seitige Rotfärbung bei versprühtem TK (vgl. Abb. 5.24). Dies legt die Vermutung nahe, dass während des Sprühvorgangs eine Hämolyse der Erythrozyten auftritt, was zur Freisetzung von Hämoglobin führt

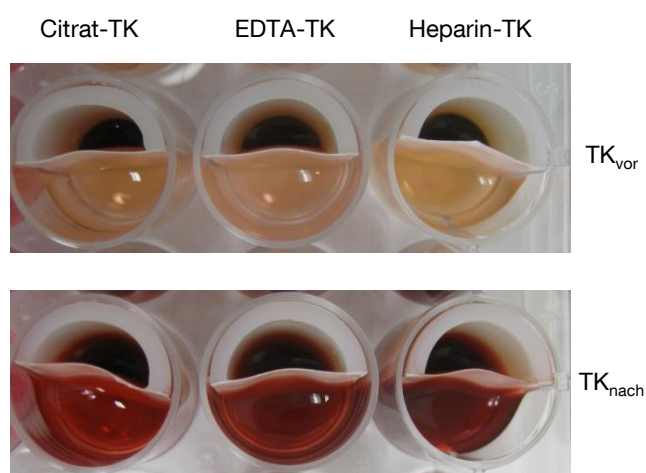
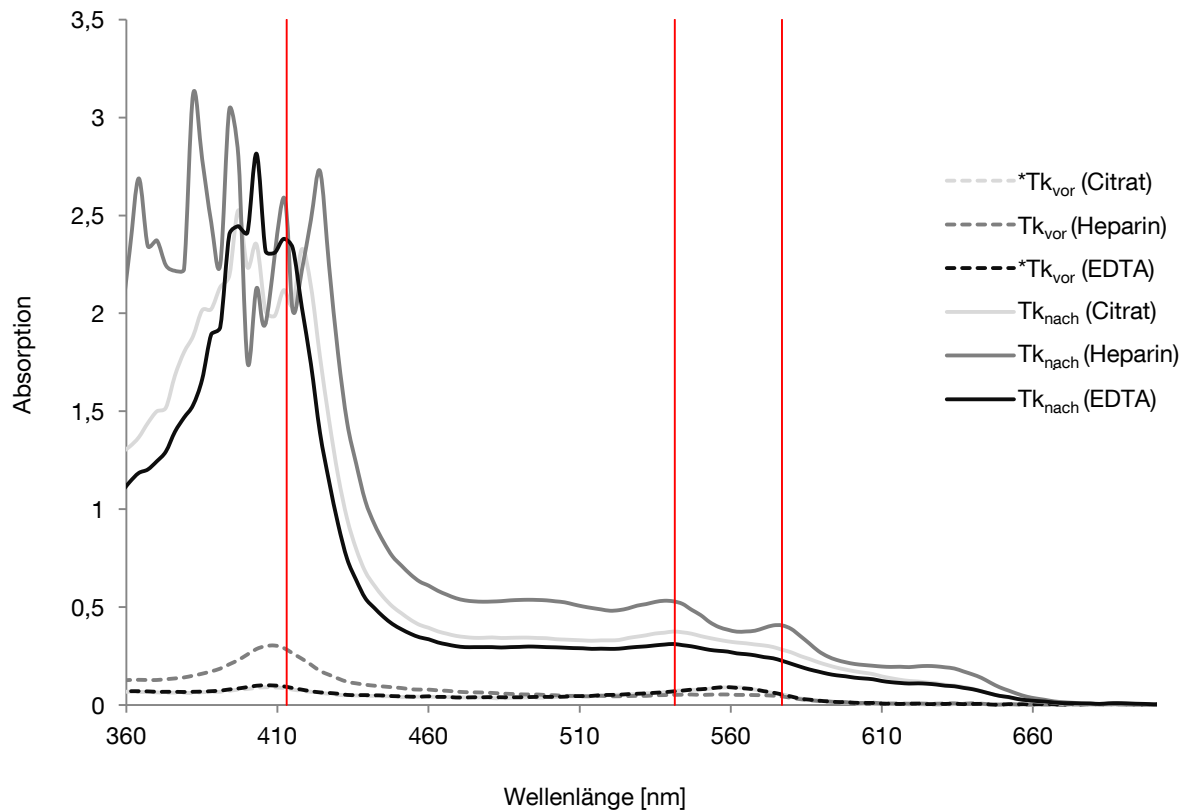


Abb. 5.24 **Optische Kontrolle des Co-Inkubationsversuchs von versprühtem und nicht versprühtem TK**

Die deutliche Rotfärbung well-seitig bei versprühtem TK (TK_{nach}) im Vergleich zu nicht versprühtem TK (TK_{vor}) spricht für eine hohe Schädigung der Erythrozyten und dadurch verursachte Freisetzung des Hämoglobins.

Mittels spektroskopischer Untersuchung des Hämoglobingehalts (NanoDrop 3300, Thermo Scientific, USA) soll diese These überprüft werden. Im Absorptionsspektrum besitzt Oxyhämoglobin charakteristische Bande bei den Wellenlängen 413 nm, 541,5 nm und 577 nm [87]. Die orientierende Analyse zeigt bei allen versprühten TK (TK_{nach}) einen deutlichen Ausschlag bei 413 nm. Im nicht versprühten TK dagegen ist nur bei Heparin-TK ein Ausschlag bei 413 nm zu detektieren (vgl. Abb. 5.25).



* deckungsgleich

Abb. 5.25 **Spektroskopische Bestimmung des Hämoglobingehalts von TK_{vor} (vor dem Verprühen) und TK_{nach} (nach dem Versprühen)**

Bei allen Antigerinnungsmitteln verursacht der Sprühvorgang eine deutliche Hämolyse (Freisetzung von Hämoglobin). Bei Heparin kann im Gegensatz zu Citrat und EDTA (TK_{vor} annähernd deckungsgleich) auch im TK_{vor} eine leichte Erhöhung des Absorptionswerts bei 413 nm detektiert werden (Die senkrechten Geraden markieren die für Hämoglobin charakteristischen Wellenlängen).

Diese Ergebnisse implizieren eine durch die Verdüsung des TK verursachte Hämolyse mit allen Antigerinnungsmitteln. Auffällig ist der leichte Ausschlag bei Heparin-TK_{vor}, der für eine geringe Hämoglobin-Freisetzung und somit Hämolyse schon während des Zentrifugationsprozesses spricht. Bei EDTA und Citrat dagegen kann im TK_{vor} kein Ausschlag gemessen werden.

5.4 Diskussion

5.4.1 Aktivierungszustand der Thrombozyten

Mit allen Antigerinnungsmitteln wird von Vollblut zu versprühtem Thrombozytenkonzentrat ein Anstieg der Thrombozytenaktivierung um ca. 30 % detektiert. Die Grundaktivierung im Vollblut ist dabei stark vom jeweiligen Antigerinnungsmittel abhängig. Im Vergleich der drei Antigerinnungsmittel ist Citrat vor den beiden anderen zu favorisieren. Ausschlaggebend hierfür ist die um 18 % bzw. 14 % geringere Grundaktivierung der Thrombozyten im Vergleich zu EDTA (38 %) bzw. Heparin (34 %). Zudem bleibt während des gesamten Aufbereitungsprozesses sowie der Applikation die Thrombozytenaktivierung bei Citrat durchgehend niedriger als bei EDTA und Heparin. Diese Ergebnisse korrelieren mit Literaturangaben, welche insbesondere EDTA und Heparin eine aktivierungsinduzierende Wirkung bescheinigen [52].

Die Absolutwerte der gemessenen Thrombozytenaktivierung sind jedoch nur unter Vorbehalt zu betrachten, da die Pobenpräparation für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verschiedene Verdünnungsreihen, sowie einen Fixiervorgang mit Paraformaldehyd beinhalten und jeder dieser Schritte einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung haben kann [19, 58, 131]. Die Gegenüberstellung der Antigerinnungsmittel sowie der unterschiedlichen Blutfraktionen innerhalb der Prozesskette kann aufgrund der identisch durchgeführten Bearbeitungsschritte aller Proben dennoch aussagekräftig durchgeführt werden.

Obwohl bei Heparin in allen Fraktionen eine zu EDTA vergleichbare Thrombozytenaktivierung gemessen wird, müssen diese Ergebnisse besonders kritisch interpretiert werden. Insbesondere im TK_{vor} und TK_{nach} fließen sehr viel weniger Thrombozyten in die Auswertung mit ein als bei den beiden anderen Antigerinnungsmitteln. (siehe Abb. 5.26). Grund hierfür könnte die beobachtete Ausbildung von Thrombozytenagglomeraten (vgl. Abb. 3.15), verursacht durch eine Thrombozytenaktivierung während der Zentrifugation sein [64]. Die irreversibel aggregierten Thrombozyten können nach der Zentrifugation nicht mehr im Plasma resuspendiert, also vereinzelt werden, was dazu führt, dass diese offensichtlich aktivierten Thrombozyten nicht mehr in die Analyse mit eingeschlossen werden. Dies hat neben einer sehr niedrigen Thrombozytenausbeute im Heparin-TK (37 %) (vgl. Abb. 5.26) vermutlich auch ein verfälschtes Ergebnis der Aktivierungsuntersuchung zur Folge.

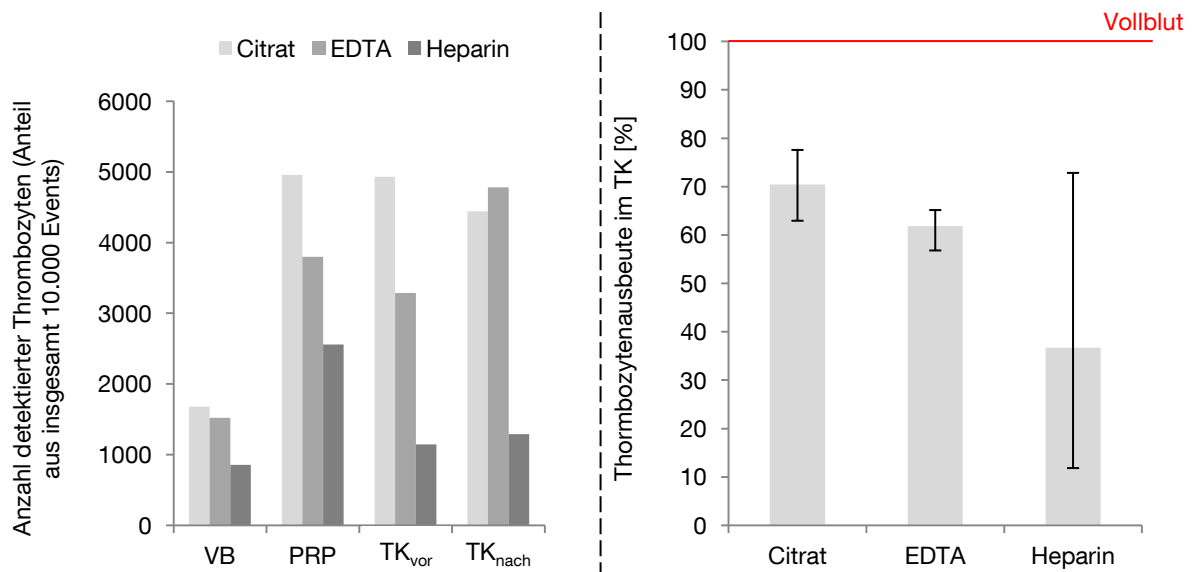


Abb. 5.26 **Anzahl der betrachteten Thrombozyten sowie die Thrombozytenausbeute im TK**

Links: Insgesamt werden für die Auswertung eine Gesamtanzahl von 30.000 (VB) bzw. 10.000 (PRP, TK_{vor}, TK_{nach}) Events detektiert. Hier mit eingeschlossen sind neben den Thrombozyten auch Erythrozyten und Leukozyten. Die hierbei detektierten Thrombozyten werden anschließend auf den Aktivierungsmarker (P-Selektin) hin untersucht (vgl. Kap. 5.3.1). Mit dem Antigerinnungsmittel Heparin ist der Anteil registrierter Thrombozyten im Vergleich zu Citrat und EDTA durchweg in allen Blutfraktionen um mindestens 50 % reduziert.

Rechts: Die Analyse der Thrombozytenausbeute ergibt einen niedrigen Wert von nur knapp 37 % im Heparin-TK im Vergleich zu 70 % (Citrat-TK) und 62 % (EDTA-TK). Zudem treten sehr große, probandenabhängige Schwankungen mit Heparin auf (Min. = 12 %, Max. = 73 %) (Mittelwerte mit Min./Max.; n = 5).

Resultierend daraus ist anzunehmen, dass die Thrombozytenaktivierung bei Heparin deutlich höher ist als gemessen, was mit den Ergebnissen von O'Brian et. al. korrelieren würde. In dieser Studie wurde die Scherstress-induzierte Thrombozytenaggregation, in Abhängigkeit des Antigerinnungsmittels (EDTA, Citrat, Heparin) und verschiedener Medikamente, untersucht, wobei mit Heparin eine deutlich schnellere Aggregation der Thrombozyten detektiert wurde [107]. Die im Vergleich zu Citrat hohe Thrombozytenaktivierung mit EDTA trotz einer gleichbleibenden Anzahl detektierter Thrombozyten kann mit dem Einfluss des Antigerinnungsmittels erklärt werden. EDTA kann zwar eine erhöhte Thrombozytenaktivierung induzieren, muss jedoch nicht unbedingt eine Aggregatbildung und Ausschüttung der Wachstumsfaktoren zur Folge haben muss. Hierdurch bleibt die Membranintegrität und Detektierbarkeit der Thrombozyten erhalten [102].

5.4.2 Validierung des Zellkultursystems

Das neu entwickelte Zellkultursystem erfüllt die Anforderungen für die Co-Inkubation von humanen Fibroblasten und Thrombozytenkonzentrat. Die vertikale Trennung des Zellkulturwells in zwei Kompartimente ermöglicht die well-seitige Kultivierung der Fibroblasten und die Zugabe der Blutpräparate in den Halbzylinder. Die korpuskulären Bestandteile des Bluts werden durch die Membran zurückgehalten, wobei die Diffusion von Wachstumsfaktoren durch die Porenstruktur gewährleistet ist. Im Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Zellkultursystem (Porengröße 1 μm) ist die Menge an diffundierten Wachstumsfaktoren bei der PES-Membran (0,45 μm), und der Cellulosenitrat-Membran (1,2 μm) deutlich höher. Ursache hierfür könnte die vertikale anstatt der horizontalen Trennung darstellen, da die Diffusion mit der horizontalen Trennung gegen die Schwerkraft stattfinden muss. Zudem ist die Diffusionsfläche des neuen Systems bei einem Füllvolumen von insgesamt 1ml um ca. 100 % erhöht (0,63 cm^2 statt 0,34 cm^2 des kommerziellen Einsatzes). Aufgrund unterschiedlicher Protein-Adsorptionseigenschaften [1] könnte auch der Membranwerkstoff die Menge diffundierter Proteine beeinflussen, abhängig von der Affinität der Proteine zu den Materialien.

Silikon-Grundkörper

In zahlreichen in vitro und in vivo Anwendungen wird Silikon aufgrund der fertigungstechnischen Möglichkeiten und biokompatiblen Eigenschaften als Werkstoff gewählt [112]. Gleichzeitig wird jedoch die Eignung von Silikon für in vitro Anwendungen aufgrund der Adsorptionseigenschaften auch häufig in Frage gestellt [108, 113].

Die ersten Kultivierungsversuche unter Standard-Bedingungen mit dem in dieser Arbeit entwickelten Silikon-Grundkörper zeigen ein stark eingeschränktes Zellwachstum ab Tag 3. Erst durch Zugabe von 15 % statt 5 % FBS kann ein Überleben der Fibroblasten über die siebentägige Versuchszeit erreicht werden. Innerhalb von 150 Minuten wird ein PDGF-AB Abfall um ca. 40 % der Ausgangskonzentration gemessen, was sich mit ähnlichen Versuchen zur Östrogen-Adsorption von Silikon deckt [118]. Es wird vermutet, dass diese Proteinadsorption längerfristig zu einem Nährstoffmangel und ein hierdurch induziertes Absterben der Zellen führt, wodurch die Versuchsergebnisse sehr kritisch zu betrachten sind.

Die Hydrophobizität der hier verwendeten Silikone (Kontaktwinkel $> 100^\circ$) könnte dabei die Proteinadsorption begünstigen [168] wobei diese Eigenschaft hinsichtlich einer verringerten Adsorption angepasst werden könnte. Geeignete Verfahren zur Oberflächenmodifizierung sind beispielsweise die Plasmabehandlung [23], die Pfropfreaktion (engl.: grafting), also die

Veränderung der Oberfläche mittels Anbindung funktioneller Polymergruppen [37], sowie die Passivierung der Oberfläche mit irreversibel gebundenen Proteinen [145]. Letztgenannte Methode befindet sich jedoch aufgrund des noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegten molekularen Verständnisses der Proteinadsorptionsvorgänge im Grundlagenforschungsstadium und wird kontrovers diskutiert [118, 143].

Thermoplast-Grundkörper

Die untersuchten Polymere zur Fertigung des Grundkörpers mittels Spritzgießen erweisen sich im Eluatversuch als geeignet, jedoch zeigen sich im Direktkontaktversuch mit den fertigen Halbzylindern deutliche Unterschiede in der Proliferation der Fibroblasten. Alle Ansätze mit den Halbzylindern zeigen im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Zellzahlen. Ein Grund hierfür könnte das Test-Setup sein. Aufgrund der fehlenden Trennmembran könnten bei der Einsaat einige Zellen auf den Boden des eingesetzten Zellkultureinsatzes gelangen. Die im Vergleich zum Zellkulturwell ungünstigeren Oberflächeneigenschaften verhindern die Anhaftung der Zellen. Dies führt verglichen mit den Kontrollwells ohne Einsatz zu einer insgesamt niedrigeren Ausgangszellzahl. Das Absterben der Zellen während der Versuchsdauer bei den Grundkörpern aus POM und MABS ist jedoch auf den Einfluss der Materialien zurückzuführen.

Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Eluat- und Direktkontaktversuch lassen sich durch den intensiveren Kontakt der Zellen mit den Werkstoffen während des Direktkontaktversuchs erklären. Im Gegensatz zum Eluatversuch, in welchem lediglich das für 72h zusammen mit Kunststoffgranulat inkubierte Medium zu adhärent wachsende Fibroblasten gegeben wird, stehen die Fibroblasten im Direktkontaktversuch vom Zeitpunkt der Zellaussaat während der kompletten Versuchsdauer (7 Tage) mit den Werkstoffen in Kontakt. Da der angedachte Einsatz der Zellkultursysteme der Versuchsanordnung des Direktkontaktversuchs entspricht, kann anhand der erzielten Ergebnisse somit lediglich PET als Grundkörper-Werkstoff empfohlen werden.

Die getesteten Klebstoffe unterscheiden sich allein im Mischungsverhältnis der enthaltenen Komponenten, was sich in unterschiedlichen Viskositäten bemerkbar macht:

- Loctite 3926: 5000 mPas
- Loctite 3321: 5000 mPas
- Loctite 3311: 300 mPas
- Loctite 3301: 150 mPas
- Loctite 3921: 150 mPas

Der Direktkontaktversuch für die Überprüfung der Biokompatibilität der Klebstoffe zeigt ein toxisches Verhalten des Loctite 3921 und Loctite 3311. Dahingegen bestätigen die Klebstoffe mit der höchsten Viskosität (Loctite 3926 und Loctite 3321) ihre biokompatiblen Eigenschaften. Ein Grund hierfür könnte in der Fertigung der Testklebungen liegen. Die Aushärtung der Klebpunkte in der Multiwellplatte erfolgt mit einer punktförmigen Lichtquelle (UV-Lichtleiter, Ø 8 mm, Spektrum 320-450 nm), die in ihrem Kernbereich eine Intensität von 650 mW/cm² aufweist. Bei den Klebstoffen mit niedrigerer Viskosität kann es zu zwei Effekten aufgrund der höheren Fließeigenschaften kommen: Die Ausbildung eines flachen Tropfens durch die bessere Fließfähigkeit kann zur Folge haben, dass sich der Randbereich des Tropfens möglicherweise außerhalb des Lichtleiterkegels befindet und nicht vollständig ausreagiert. Die große Oberfläche des flachen Tropfens kann zusätzlich einen verzögernden Effekt auf die Reaktion haben. Freie Radikale, welche bei der Aushärtung entstehen, können an der Oberfläche mit Sauerstoffatomen reagieren und sich so der Polymerisation entziehen [120].

Während die ausgewählten Einzelkomponenten (PET-Grundkörper, PES-Membran, Loctite 3926) des spritzgegossenen Zellkultursystems in den separaten Untersuchungen keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben, zeigt sich während der Validierung des Gesamtsystems eine deutlich zytotoxische Wirkung. Da sich weder Grundkörper noch Membran im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen unterscheiden, wird vermutet, dass die erhöhte Absterberate durch die Klebung verursacht wird. Durch die geometrische Gestaltung der Klebefläche und die manuelle Klebung könnte überschüssiger Klebstoff, welcher in das Lumen des Zellkultureinsatzes fließt, ungenügend belichtet werden. Dies führt zu einer unvollständigen Polymerisation des Klebstoffs und damit zum Vorhandensein freier Rest-Monomere, welche einen toxischen Effekt auf die Fibroblasten haben können [169]. Die Problematik einer unvollständigen Belichtung könnte durch Verwendung eines durch Luftfeuchtigkeit aushärtenden Cyanacrylat-Klebstoffes, wie z.B. Histoacryl® (BBraun, Melsungen) oder Indermil® (Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf), umgangen werden. Die Eignung dieser Gewebeklebstoffe für die beschriebene Applikation muss jedoch überprüft werden, denn trotz der medizinischen Zulassung wird das zytotoxische Potential, insbesondere bei in vitro Anwendungen, nach wie vor kontrovers diskutiert [6, 27, 77].

Die manuelle Auftragung des Klebstoffs auf den Rahmen des Einsatzes kann zudem zu einer ungleichmäßigen sowie lückenhaften Klebung und damit zu einer unzureichenden Ausprägung der Klebefuge zwischen Grundkörper und Membran führen (vgl. Abb. 5.27).

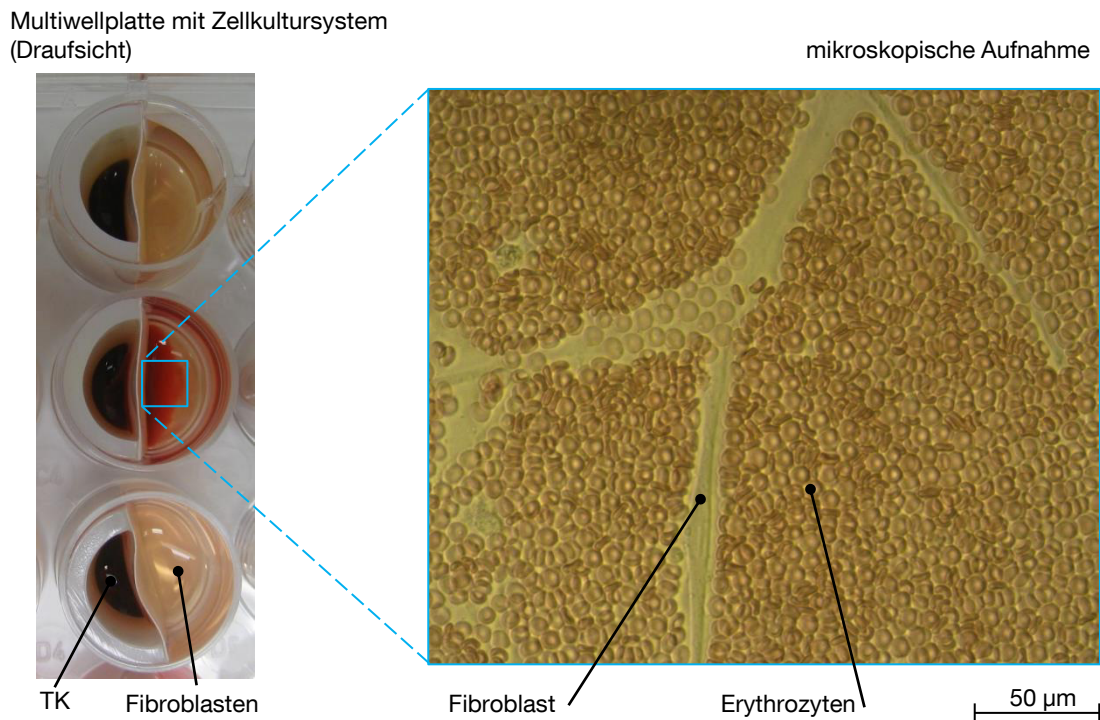


Abb. 5.27 **Übertreten korpuskulärer Blutbestandteile aufgrund einer unzu-reichenden Klebefuge zwischen Membran und Grundkörper**
Aufgrund der manuellen Montage der Membran auf dem Grundkörper kann es zu einer ungenügenden Abdichtung und hierdurch zu einem Übertreten korpuskulärer Blutbestandteile zu den well-seitig angesiedelten Fibroblasten kommen. Dies behindert die Proliferation der Zellen und verfälscht so das Versuchsergebnis.

Für eine reproduzierbare Fertigung sollte die Montage der Membran auf dem spritzgegossenen Zellkultureinsatz daher mittels Klebestation automatisiert und die optimale Aushärtezeit in weiteren Versuchsreihen evaluiert werden.

Co-Inkubation

Die Co-Inkubationsversuche von Fibroblasten mit TK im Silikon- sowie PET-Zellkultureinsatz zeigen eine wachstumssteigernde Wirkung der Konzentrate, hergestellt mit Citrat oder Heparin als Antigerinnungsmittel. Einzig mit EDTA wird ein negatives Ergebnis erzielt. Die Fibroblasten erfahren hierbei während der Versuchsdauer eine morphologische Veränderung und nach einer siebentägigen Kultivierungsdauer können keine lebenden Zellen detektiert werden. Dieser Effekt könnte durch einen Mangel an Ca^{2+} im Nährmedium ausgelöst werden. Durch die Bildung eines Chelatkomplexes mit EDTA [85] könnte das für die Anhaftung adhärent wachsender Zellen notwendige Calcium [82] nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Ein weiterer Grund könnte die

Membrangängigkeit von EDTA darstellen, wodurch die intrazelluläre Calciumkonzentration der Fibroblasten verändert [86] und die Nekrose verursacht werden könnte.

Mit einer durchschnittlich um 70 % erhöhten Zellzahl zur Kontrolle liegt die hier gezeigte proliferationsfördernde Wirkung des Heparin- und Citrat-TK in einem vergleichbaren Bereich zu anderen *in vitro* Studien [12]. Jedoch muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass allein die Zugabe von 15 % statt 5 % FBS in das Kulturmedium die Durchführung der Co-Inkubationsversuche in einem Silikon-Einsatz erlaubt. Aufgrund der Proteinadsorption durch das Silikon ist das Zellwachstum gehemmt, was sich in teilweise stark schwankenden Kontrollwerten äußert. Die Co-Inkubation in spritzgegossenen Zellkultursystemen aus PET mit aufgeklebter Membran kann hingegen mit Standard-Zellkulturmedium (5 % FBS) durchgeführt werden, allerdings wird das Zellwachstum auch hier deutlich beeinträchtigt. Die stark schwankenden Kontrollwerte können wiederum nur mit Einschränkungen als Vergleichswerte betrachtet werden.

Die Menge an freigesetztem PDGF-AB wird im Hinblick auf eine proliferationsfördernde Dosis untersucht. Demnach sollen die Wachstumsfaktoren, unabhängig von der Darreichungsform, in optimaler Konzentration und physiologischer Zusammensetzung angewendet werden [50, 89]. Die mitogene PDGF-Konzentration für Fibroblasten liegt bei 500-2000 pg/ml [136, 140]. Dies wird durch die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Mit durchschnittlich 2400 pg/ml von den Fibroblasten gebundenem PDGF-AB wird eine deutliche Proliferationssteigerung erzielt. In einigen Studien wird die Auffassung vertreten, dass zu hohe Konzentrationen das Zellwachstum wiederum einschränken und zudem pathologische Vorgänge verursachen können [3, 59, 109]. In den *in vitro* Untersuchungen konnte dies nicht bestätigt werden, da insgesamt nach 168 h weit mehr als 2000 pg/ml PDGF-AB aus TK freigesetzt wurde. Die PDGF-AB Gesamtmenge nach 168 h von ca. 4000 pg/ml bei versprühtem Citrat-TK beträgt zwar nur ca. ein Drittel im Vergleich zu anderen Studien [111], jedoch wurden diese Untersuchungen mit aktiviertem Thrombozytenkonzentrat durchgeführt. Die gemessene PDGF-AB Konzentration im Heparin-TK ist mit einem Wert von durchschnittlich 7000 pg/ml deutlich höher, was durch die aggregationsfördernde Wirkung von Heparin verursacht werden könnte [21].

Für eine endgültige Aussage zur klinischen Wirksamkeit sollten die unterschiedlichen Blutpräparate (Heparin, Citrat, EDTA) *in vivo* im Rahmen einer klinischen Studie evaluiert werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Konzept zur Wundheilungsförderung mit autologen hämatogenen Wachstumsfaktoren wurde evaluiert und ein Gesamtsystem zur Gewinnung und Applikation der thrombozytären Wachstumsfaktoren entwickelt. Grundbausteine des Versorgungsmodells sind ein optimierter Zentrifugationsprozess für die Aufkonzentrierung therapeutisch wirksamer Wachstumsfaktoren, deren geeignete Applikation auf großflächigen Wunden, sowie die biologische Evaluierung des Endprodukts mit Fokus auf der Ermittlung eines adäquaten Antigerinnungsmittels.

Der neue Zentrifugenrotor ermöglicht durch den individuell einstellbaren, motorgesteuerten Antrieb der Spritzenkolben während des Aufkonzentrierungsprozesses und durch die winkelförmige Anordnung der Doppelspritzensysteme die automatische Separierung der Blutkomponenten. Die sensorgesteuerte erste Separation gewährleistet dabei eine hämatokritunabhängige Trennung und das Endvolumen des Thrombozytenkonzentrats (TK) kann anwendungsbezogen festgelegt werden. Mit den Antigerinnungsmitteln Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) und Citrat werden nach einmaliger automatisierter Zentrifugation exzellente Thrombozytenausbeuten von bis zu 97 % im Platelet Rich Plasma (PRP) erzielt. Proben mit Heparin als Antikoagulans hingegen erreichen nur eine maximale Thrombozytenausbeute von 88 % im PRP, wobei deutlich höhere probandenabhängige Messwertschwankungen auftreten. Aufgrund einer optisch sichtbaren Bildung von Thrombozytenagglomeraten während des Zentrifugationsprozesses liegt hier die Vermutung einer vorzeitigen Thrombozytenaktivierung nahe, was die niedrigeren Ausbeuten erklärt. Mit dem zweiten Zentrifugationsschritt werden wiederum mit EDTA und Citrat exzellente Ausbeutewerte im Thrombozytenkonzentrat erzielt, wobei der maximale Ertrag von 89 % mit Citrat erreicht wird.

Das Zerstäuben des gewonnenen Konzentrats mit einer Zweistoffdüse unter Verwendung eines Treibmittels gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung des Applikats auf der Wundfläche. Der neu entwickelte Hand-Applikator ermöglicht bei einem Applikatvolumen von 3 ml die Versorgung einer Wundfläche von über 200 cm², bei einer rechnerisch ermittelten Schichtdicke von 14 µm. Das realisierte Kartuschenkonzept vermeidet eine durch Anschlussleitungen den OP-Ablauf störende externe Gaszufuhr. Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften eignet sich Tetrafluorethan (R134a) dabei als Treibmittel. Der Sättigungsdampfdruck von 5,7 bar (bei 20°C) gewährleistet eine konstante Druckversorgung während des gesamten Sprühvorgangs. Ab einem Düseneingangsdruck von 2 bar bildet sich ein homogenes Sprühbild mit einer scharf abgegrenzten Kernzone bei einem optimalen Applikat-Volumenstrom von ca. 10 ml/min. Rund 60 % der dabei entstehenden Tröpfchen weisen einen Durchmesser von 10 bis 20 µm auf, wodurch eine gleichmäßige Verteilung der

Thrombozyten auf der Applikationsfläche garantiert wird. Basierend auf den durchgeführten Sprühbilduntersuchungen kann ein optimaler Applikationsabstand von fünf Zentimetern empfohlen werden.

Die biologische Evaluation zeigt, dass durch Citrat die geringste Thrombozytenaktivierung induziert wird. Gegenüber EDTA und Heparin tritt hierbei eine um ca. 16 % geringere Aktivierung im Vollblut auf. Dieser Trend ist auch systematisch nach zweimaliger Zentrifugation und nach dem Sprühvorgang zu erkennen. Insgesamt erhöht sich mit allen Antigerinnungsmitteln die Thrombozytenaktivierung vom originären Vollblut bis zum versprühten TK um ca. +30 %. Die Ergebnisse von Heparin sind aufgrund sehr großer, probandenabhängiger Messschwankungen, sowie einer reduzierten Anzahl analysierbarer Thrombozyten infolge der Bildung von Agglomeraten allerdings kritisch zu betrachten.

Das neu konzipierte Zellkultursystem zur Co-Inkubation von Thrombozytenkonzentrat mit humanen Fibroblasten gewährleistet durch die vertikale Trennung des Zellkulturwells in zwei Kompartimente eine mikroskopische Betrachtung der well-seitig angesiedelten Bindegewebszellen während der Versuchslaufzeit. Die in den Grundkörper des Zellkultureinsatzes implementierte Polyethersulfon-Membran trennt die korpuskulären Blutbestandteile des Thrombozytenkonzentrats zuverlässig ab. Gleichzeitig ermöglicht die poröse Membranstruktur die Diffusion der Wachstumsfaktoren, die sukzessive von den Thrombozyten sezerniert werden. Bei der Evaluation geeigneter Werkstoffe für den Grundkörper des Zellkultureinsatzes zeigt sich bei Silikon ein durch Nährstoffmangel induziertes Absterben der Zellen ab dem dritten Tag. Durch eine erhöhte Zugabe von FBS (fetales Kälberserum) kann jedoch ein Überleben der Zellen sichergestellt werden. Zur Fertigung der Halbzylinder mittels Spritzgießen und anschließendem Verkleben der Membran werden zwar Werkstoffe mit entsprechend biokompatiblen Eigenschaften verwendet, dennoch zeigt sich bei den Co-Inkubationsversuchen ein deutlich eingeschränktes Zellwachstum. Vermutlich gelangt während der manuellen Montage der Membran ein Teil des UV-aushärtenden Klebstoffs in das Lumen des Zellkultureinsatzes und wird daher ungenügend belichtet. Hierdurch können zytotoxische Monomere in das Zellkulturmedium diffundieren, was als wahrscheinlichste Ursache für die proliferationshemmende Wirkung identifiziert werden kann. Die automatisierte Fertigung sowie die Evaluation alternativer Klebstoffe können als Lösungsalternativen eruiert werden.

Die Zugabe von Thrombozytenkonzentrat bewirkt nach siebentägiger Co-Inkubation eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhte Zellzahl bei Citrat- und Heparin-TK. Hingegen lösen sich bei EDTA-TK die Zellen nach ca. 3 Tagen ab, mutmaßlich aufgrund eines, durch EDTA induzierten, Calciummangels. Eine Aussage zur wachstumsfördernden Wirkung des Thrombozytenkonzentrats kann jedoch auch für die Antigerinnungsmittel Citrat und Heparin

infolge der Beeinträchtigung der Proliferation durch das Zellkultursystem nur qualitativ getroffen werden.

Insgesamt bilden der entwickelte Prozess zur Gewinnung von autologen Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten, der realisierte Handapplikator sowie die biologische Evaluation *in vitro* eine wesentliche Grundlage zur Weiterentwicklung des Systems für einen verbreiteten klinischen Einsatz. Die patientenoptimierte Verarbeitung von lediglich 11,5 ml Vollblut stellt einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu Wettbewerbssystemen dar. Die automatisierte Verarbeitung gewährleistet die Bereitstellung eines therapeutisch wirksamen Produkts auch aus sehr geringen Ausgangsvolumina. Als Antigerinnungsmittel kann dabei Citrat aufgrund der exzellenten Thrombozytenausbeute von annähernd 90 % mit gleichzeitig geringer Thrombozytenaktivierung, sowie der proliferationssteigernden Wirkung *in vitro* empfohlen werden. Eine weiterführende *in vivo* Untersuchung ist dennoch unerlässlich, um diese Annahme zu bestätigen. Die Optimierung der Prozessparameter des zweiten automatisierten Zentrifugationsschritts hinsichtlich einer scherstress-reduzierten und somit zellschonenden Prozessierung durch Anpassung der Zentrifugationsparameter könnte zudem zu einer Steigerung der Ausbeutewerte und einer verringerten Thrombozytenaktivierung mit Heparin führen. Die homogene Wundauftragung des Applikats kann mit dem neu entwickelten Hand-Applikator reproduzierbar durchgeführt werden. Das Gaskartuschenkonzept ermöglicht mit der neu entwickelten Zweistoffdüse die Realisierung eines ungebundenen Systems und die feine Verdüsung des Thrombozytenkonzentrats mit einem sparsamen Applikat-Volumenstrom. Eine vertriebsorientierte Optimierung des Applikators könnte hinsichtlich der Umsetzung als Einweg- oder Mehrwegartikel, der weiterführenden strömungstechnischen Anpassung der Zweistoffdüse sowie eines individuell einstellbaren Applikat-Volumenstroms angedacht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Absolom, D.R., Zingg, W., Neumann, A.W., Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. *Journal of biomedical materials research*, 21(2), 1987, S. 161–71
- [2] Alsousou, J., Thompson, M., Hulley, P., et al., The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 91(8), 2009, S. 987–96
- [3] Alvarez, R., Kantarjian, H., Cortes, J., *Biology of Platelet-Derived Growth Factor and Its Involvement in Disease. Mayo Clin Prot.*, 81(9), 2006, S. 1241–1257
- [4] Anderson, J.M., Ziats, N.P., Azeez, A., et al., Protein adsorption and macrophage activation on polydimethylsiloxane and silicone rubber. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 7(2), 2012, S. 159–169
- [5] Arnoczky, S.P., Delos, D., Rodeo, S. a., *What Is Platelet-Rich Plasma? Operative Techniques in Sports Medicine*, 19(3), 2011, S. 142–148
- [6] Azevedo, C.L. de, Marques, M.M., Bombana, A.C., Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an in vitro analysis. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17(2), 2003, S. 113–118
- [7] Bagamery, K., Kvell, K., Landau, R., et al., Flow cytometric analysis of CD41-labeled platelets isolated by the rapid, one-step OptiPrep method from human blood. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 65(1), 2005, S. 84–7
- [8] Barker, S., Becton Dickinson and Company, US5652142.pdf, 1997
- [9] Bauer, C., *Blut: Ein flüssiges Organ.*In: Klinker, R., Silbernagel, S. (Hrsg.) *Lehrbuch der Physiologie*. S. 185–212, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000
- [10] Baxter Healthcare Corporation, *Artiss-Highlights of prescribing information*, 2011
- [11] Bayvel, L., Orzechowski, Z., *Liquid Atomization*. Taylor & Francis, Washington D.C, 1993, S. 462
- [12] Berg, C., Hammarström, S., Herbertsson, H., et al., Platelet-induced growth of human fibroblasts is associated with an increased expression of 5-lipoxygenase. *Thromb Haemost*, 96, 2006, S. 652–659
- [13] Brill, A., Varon, D., *Angiogenesis.*In: Michelson, A.D. (Hrsg.) *Platelets*. S. 757–768, Academic Press, Burlington, San Diego, London, 2007

- [14] Bruggisser, R., Potzmann, I., Dudler, M., Wundversorgung. In: Wintermantel, E., Ha, S.-W. (Hrsg.) *Medizintechnik Life Science Engineering*. S. 993–1021, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009
- [15] Buchwald, D., Reber, D., Kaltschmidt, C., et al., Validierung eines Verfahrens zur Herstellung von autologem Thrombozyten-Gel. *Kardiotechnik*, 3, 2008, S. 67–70
- [16] Bundesärztekammer, Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 47(2), 2010, S. 1–113
- [17] Burgstaler, E. a, Blood component collection by apheresis. *Journal of clinical apheresis*, 21(2), 2006, S. 142–51
- [18] Béguin, S., Keularts, I., On the Coagulation of Platelet-Rich Plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 29(1), 1999, S. 50–57
- [19] Cahill, M.R., Macey, M.G., Newland, A.C., Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P selectin (CD62) and GP53 (CD63). *British journal of haematology*, 84(3), 1993, S. 527–9
- [20] Castillo, T.N., Pouliot, M. a, Kim, H.J., et al., Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *The American journal of sports medicine*, 39(2), 2011, S. 266–71
- [21] Chen, J.H., Karlberg, K.E., Sylvén, C., Heparin and low molecular weight heparin but not hirudin stimulate platelet aggregation in whole blood from acetylsalicylic acid treated healthy volunteers. *Thrombosis research*, 63(3), 1991, S. 319–29
- [22] Chenchev, I., Opportunities the use of platelet-rich plasma presents for increasing osteno-genesis in oral surgery. *Journal of IMAB*, 2, 2005, S. 26–28
- [23] Chu, P.K., Chen, J.Y., Wang, L.P., et al., Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering*, 36, 2002, S. 143–206
- [24] Clark, R.A.F., *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Plenum Press, New York, 1996, S. 636
- [25] Clausen, C., Hermund, N.U., Donatsky, O., et al., Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. *Cells, tissues, organs*, 184(2), 2006, S. 68–75
- [26] Creeper, F., Lichanska, a M., Marshall, R.I., et al., The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. *Journal of periodontal research*, 44(2), 2009, S. 258–65
- [27] DeRenzis, F.A., Aleo, J.J., An in vitro bioassay of cyanoacrylate cytotoxicity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 30(6), 1970, S. 803–808

- [28] Dicks, B.-M., Koch, J., Patent EP 1759634 B1 Verwendung von 1,1,1,2-Tetrafluorethan zur Lungenfunktionsmessung, 2007
- [29] DIN EN 378-1 Kälteanlagen und Wärmepumpen - Sicherheitstechnische und umweltrelevante Anforderungen, , 2012
- [30] DIN EN ISO 10993-4 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 4: Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut, , 2009
- [31] DIN EN ISO 10993-5 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität, , 2009
- [32] Ditzinger, G., Zott, W., Patent EP0655237A1 Medizinische Aerosolformulierung, 1995
- [33] Dodd, R.A., Cornwell, R., Holm, N.E., et al., The Vivostat® application system: A comparison with conventional fibrin sealant application systems. *Technology and Health Care*, 10(5), 2002, S. 401–411
- [34] Van den Dolder, J., Mooren, R., Vloon, A.P.G., et al., Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue engineering*, 12(11), 2006, S. 3067–73
- [35] Drengk, A., Zapf, A., Stürmer, E.K., et al., Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells, tissues, organs*, 189(5), 2009, S. 317–26
- [36] Dörner, K., Dörner, R., Deufel, T., *Klinische Chemie und Hämatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009, S. 14
- [37] Ebara, M., Hoffman, J.M., Stayton, P.S., et al., Surface modification of microfluidic channels by UV-mediated graft polymerization of non-fouling and “smart” polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(8-9), 2007, S. 1409–1413
- [38] Efeoglu, C., Akcay, Y., Erturk, S., A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(11), 2004, S. 1403–1407
- [39] Ehrenfest, D.M.D., Rasmusson, L., Albrektsson, T., Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*, 27(3), 2009, S. 158–67
- [40] Eming, S., Smola, H., Krieg, T., Treatment of Chronic Wounds: State of the Art and Future Concepts. *Cells Tissues Organs*, 172(2), 2002, S. 105–117
- [41] Eppley, B.L., Woodell, J.E., Higgins, J., Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 114(6), 2004, S. 1502–1508

- [42] Everts, P. a M., Hoffmann, J., Weibrich, G., et al., Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 16(5), 2006, S. 363–8
- [43] Everts, P., Knape, J., Weibrich, G., et al., Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra Corpor Techn.*, 38, 2006
- [44] Forth, W., Heuschler, D., Rummel, W., et al., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag, München, 2003, S. 444–450
- [45] Frechette, J.-P., Martineau, I., Gagnon, G., Platelet-rich Plasmas: Growth Factor Content and Roles in Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 84(5), 2005, S. 434–439
- [46] Garbasch, A., Hvid, N., Cianciolo, D., Patent US 6,234,356 Applicator and electromechanical applicator drive system, 2001
- [47] Gawaz, M., *Blood Platelets*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001, S. 1–49
- [48] Gebhardt, A., *Generative Fertigungsverfahren: Rapid Prototyping - Rapid Tooling - Rapid Manufacturing*. Hanser Verlag, München, 2007, S. 1–22
- [49] George, J.N., Platelets. *The Lancet*, 355, 2000, S. 1531–1539
- [50] Giacco, F., Perruolo, G., D'Agostino, E., et al., Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), 2006, S. 2402–4
- [51] Gillitzer, R., *Modernes Wundmanagement*. *Der Hautarzt*, 53(2), 2002, S. 130–147
- [52] Golanski, J., Pietrucha, T., Baj, Z., et al., Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood - various anticoagulants are not equal. *Thrombosis Research*, 83(3), 1996, S. 199–216
- [53] Gottrup, F., Agren, M.S., Karlsmark, T., Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), 2000, S. 83–96
- [54] Grageda, E., Platelet-Rich Plasma and Bone Graft Materials : A Review and a Standardized Research Protocol. *Implant Dentistry*, 13(4), 2004, S. 301–309
- [55] Graziani, F., Ivanovski, S., Cei, S., et al., The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clinical oral implants research*, 17(2), 2006, S. 212–9
- [56] Grote, K.-H., Beitz, W., *Dubbel Taschenbuch Fur Den Maschinenbau*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001, S. D40

- [57] Grzelewska-rzymowska, I., Malolepszy, J., Molina, M. De, et al., Equivalent asthma control and systemic safety of inhaled budesonide delivered via HFA-134a or CFC propellant in a broad range of doses. *Respiratory Medicine, Supplement*, 2003, S. 10–19
- [58] Hagberg, I. a, Lyberg, T., Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets*, 11(3), 2000, S. 137–50
- [59] Han, J., Meng, H.X., Tang, J.M., et al., The effect of different platelet-rich plasma concentrations on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Cell proliferation*, 40(2), 2007, S. 241–52
- [60] Hartwig, J.H., The Platelet Cytoskeleton. In: Michelson, A.D. (Hrsg.) *Platelets*. S. 75–97, Academic Press, Burlington, San Diego, London, 2007
- [61] Heldin, C., Backstrom, G., Ostman, A., et al., Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. *The EMBO Journal*, 7(5), 1988, S. 1387–1393
- [62] Hokugo, A., Ozeki, M., Kawakami, O., et al., Augmented Bone Regeneration Activity of Platelet-Rich Plasma by Biodegradable Gelatin Hydrogel. *Tissue Engineering*, 11(7), 2005, S. 1224–33
- [63] Horch, R.E., Nord, D., Augustin, M., et al., Economic aspects of surgical wound therapies. *Der Chirurg*, 79(6), 2008, S. 518–25
- [64] Hornsey, V.S., McColl, K., Drummond, O., et al., Extended storage of platelets in SSP platelet additive solution. *Vox sanguinis*, 91(1), 2006, S. 41–6
- [65] Hundy, G.H., Trott, A.R., Welch, T.C., *Refrigeration and Air-Conditioning*. Butterworth-Heinemann, , 2008, S. 38–40
- [66] Jameson, C., Autologous Platelet Concentrate for the Production of Platelet Gel. *Laboratory Medicine*, 38(1), 2007, S. 39–42
- [67] Janiak, C., Meyer, H.-J., Gudat, D., et al., *Riedel Moderne Anorganische Chemie*. Walter de Gruyter, Tübingen, 2012, S. 495–497
- [68] Joos, F., *Technische Verbrennung: Verbrennungstechnik, Verbrennungsmodellierung, Emissionen*. Springer DE, Berlin, Heidelberg, New York, 2007, S. 438–447
- [69] Kajikawa, Y., Morihara, T., Sakamoto, H., et al., Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *Journal of cellular physiology*, 215(3), 2008, S. 837–45
- [70] Kapp, H., Smola, H., *Regulation der Wundheilung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine*. HARTMANN WundForum, 1, 2006, S. 8–14

- [71] Keller, M., Herzog, K., Patent EP0504112A2 Pharmazeutische Aerosolformulierungen, 1992
- [72] Kujath, P., Michelsen, A., Wounds - from physiology to wound dressing. *Deutsches Ärzteblatt international*, 105(13), 2008, S. 239–48
- [73] Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P., *Biostatistik*. Springer DE, , 2007, S. 95–105; 181–185
- [74] Köveker, G., Coerper, S., Wachstumsfaktoren und Wundheilung. *HARTMANN WundForum*, 3, 1994, S. 18–21
- [75] Lacci, K.M., Dardik, A., Review Platelet-Rich Plasma: Support for Its Use in Wound Healing. *Yale Journal of biology and medicine*, 83, 2010, S. 1–9
- [76] Landesberg, R., Roy, M., Glickman, R.S., Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 58(3), 2000, S. 297–300; discussion 300–1
- [77] Leggat, P.A., Kedjarune, U., Smith, D.R., Toxicity of cyanoacrylate adhesives and their occupational impacts for dental staff. *Industrial Health*, 42, 2004, S. 207–211
- [78] Lei, H., Gui, L., Xiao, R., The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clinical biochemistry*, 42(13-14), 2009, S. 1452–60
- [79] Leitner, G.C., Gruber, R., Neumüller, J., et al., Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox sanguinis*, 91(2), 2006, S. 135–9
- [80] Li, W., Johnson, D.J.D., Esmon, C.T., et al., Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature structural & molecular biology*, 11(9), 2004, S. 857–62
- [81] Lindeboom, J., Mathura, K., Aartman, I., et al., Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clinical oral implants research*, 18(1), 2007, S. 133–9
- [82] Lindl, T., Gstraunthaler, G., *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2008, S. 97–99
- [83] Lippert, H., *Wundatlas. Wunde, Wundheilung und Wundbehandlung*. J.A. Barth Verlag in MVH Medizinverlage Heidelberg GmbH & Co. KG, Heidelberg, 2006, S. 7–91
- [84] Liu, Y., Kalén, A., Risto, O., et al., Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 10(5), 2002, S. 336–40

- [85] Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006, S. 196–98, 560–62
- [86] Macey, M., McCarthy, D., Azam, U., et al., Ethylenediaminetetraacetic acid plus citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (EDTA-CTAD): a novel anticoagulant for the flow cytometric assessment of platelet and neutrophil activation ex vivo in whole blood. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 51(1), 2003, S. 30–40
- [87] Malinauskas, R. a, Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artificial organs*, 21(12), 1997, S. 1255–67
- [88] Marek, S., Smyth, H., Garcia-Contreras, L., et al., Medical and pharmaceutical aerosols. In: Ruzer, L.S., Harley, N.H. (Hrsg.) *Aerosols Handbook: Measurement, Dosimetry, and Health Effects*. S. 1–30, CRC Press, Boca Raton, 2013
- [89] Martineau, I., Lacoste, E., Gagnon, G., Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials*, 25(18), 2004, S. 4489–502
- [90] Marx, G., Evolution of Fibrin Glue Applicators. *Transfusion Medicine Reviews*, 17(4), 2003, S. 287–298
- [91] Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., et al., Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 85(6), 1998, S. 638–46
- [92] Marx, R.E., D.M.D., A.K.G., Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. Quintessence Pub. Co., , 2005, S. 154
- [93] Marx, R.E., Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62, 2004, S. 489–496
- [94] Matthes, H., Oxyphen AG, De 000010240787 A1, 2004
- [95] Mehta, S., Watson, J.T., Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *Journal of orthopaedic trauma*, 22(6), 2008, S. 432–8
- [96] Menitove, J.E., *Standards for blood banks and transfusion services*. Bethesda, 1999
- [97] Mishra, A., Pavelko, T., Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *The American journal of sports medicine*, 34(11), 2006, S. 1774–8
- [98] De Mos, M., Van der Windt, A.E., Jahr, H., et al., Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *The American journal of sports medicine*, 36(6), 2008, S. 1171–8
- [99] Moulin, V., Castilloux, G., Jean, A., et al., In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns*, 22(5), 1996, S. 359–362

- [100] Murray, M.M., Spindler, K.P., Ballard, P., et al., Enhanced Histologic Repair in a Central Wound in the Anterior Cruciate Ligament with a Collagen–Platelet-Rich Plasma Scaffold. *Journal of Orthopaedic Research*, 25, 2007, S. 1007–1017
- [101] Mutschler, W., *Physiologie und Pathophysiologie der Heilung von Defektwunden*. *Der Unfallchirurg*, 115(9), 2012, S. 767–73
- [102] Nishioka, T., Yokota, M., Tsuda, I., et al., Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clinical and Laboratory Haematology*, 24(2), 2002, S. 115–119
- [103] Noakes, T., Medical aerosol propellants. *Journal of Fluorine Chemistry*, 118, 2002, S. 35–45
- [104] Novotny, F., Wacker, S., Eblenkamp, M., et al., Anticoagulant for autologous platelet concentrates. *EWMA Journal*, 12(2 Supplement), 2012
- [105] Oertel, H., Krittian, S., Krittian, S.B.S., *Modelling the Human Cardiac Fluid Mechanics*. 4th ed. KIT Scientific Publishing, Karlsruhe, 2012, S. 125
- [106] Oresta, F.N., Becton Dickinson and Company, US5578492, 1996
- [107] O'Brien, J.R., Salmon, G.P., Shear stress activation of platelet glycoprotein IIb/IIIa plus von Willebrand factor causes aggregation: filter blockage and the long bleeding time in von Willebrand's disease. *Blood*, 70(5), 1987, S. 1354–61
- [108] Park, J.Y., Yoo, S.J., Lee, E.-J., et al., Increased poly(dimethylsiloxane) stiffness improves viability and morphology of mouse fibroblast cells. *BioChip Journal*, 4(3), 2010, S. 230–236
- [109] Peterson, T.C., Isbrucker, R. a, Hooper, M.L., In vitro effect of platelet-derived growth factor on fibroproliferation and effect of cytokine antagonists. *Immunopharmacology*, 28(3), 1994, S. 259–70
- [110] Petrides, P.E., *Blut*. In: Georg Löffler, Peter Heinrich, P.P. (Hrsg.) *Biochemie & Pathobiochemie*. S. 952–999, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- [111] Pietrzak, W.S., Eppley, B.L., *Scientific Foundations Platelet Rich Plasma: Biology and New Technology*. *The Journal of craniofacial surgery*, 16(6), 2005, S. 1043–1054
- [112] Polyzois, G.L., Hensten-pettersen, A., Kullmanc, A., Effects of RTC-silicone maxillofacial prosthetic elastomers on cell cultures. (May), 1994, S. 505–510
- [113] Polyzois, L., Hensten-pettersen, A., An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 71(5), 1994, S. 500–504
- [114] Pschyrembel, W., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, 2007, S. 2082,1504

- [115] Purewal, T.S., Greenleaf, D.J., Patent EP0372777A2 Medicinal Aerosol Application, 1990
- [116] Rafael Derossi, Carolina, A., Oliveira, A. De, et al., Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses 1 Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas na cicatrização de feridas cirúrgicas na pele de cavalos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 24(4), 2009, S. 276–281
- [117] Rassow, J., *Duale Reihe Biochemie: Reaktionen auf Verletzungen (Blutstillung und Blutgerinnung)*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2008, S. 736–737
- [118] Regehr, K.J., Domenech, M., Koepsel, J.T., et al., Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab on a chip*, 9(15), 2009, S. 2132–9
- [119] Regev, I., Shlezinger, A., Marvelous™ Elcam Medical 's New & Innovative Minimal Residual Volume Luer Activated Stopcock, 2011
- [120] Reis, P., Grundmüller, S., Cowdrey, S., *Loctite Worldwide Design Handbook*. Düsseldorf, 1998, S. 454
- [121] Richter, T., *Zerstäuben von Flüssigkeiten: Düsen und Zerstäuber in Theorie und Praxis*. Expert-Verlag GmbH, Renningen, 2008, S. 159
- [122] Riedel, K., Ryssel, H., Koellensperger, E., et al., Pathophysiologie der chronischen Wunde. *Der Chirurg*, 79(6), 2008, S. 526–34
- [123] Robson, M.C., Growth factors as wound healing agents. *Current opinion in biotechnology*, 2(6), 1991, S. 863–7
- [124] Ruf, A., Patscheke, H., Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 21(2), 1995, S. 146–51
- [125] Sabeu Kunststoffwerk Northeim GmbH, De 202011003049 U1, 2011
- [126] Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., et al., Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 63(6), 2005, S. 766–70
- [127] Sampson, S., Gerhardt, M., Mandelbaum, B., Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 1(3-4), 2008, S. 165–74
- [128] Sandgren, P., Hild, M., Sjödin, a, et al., Storage of Buffy-coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects on platelets prepared by the novel TACSI system and stored in plastic containers with different gas permeability. *Vox sanguinis*, 99(4), 2010, S. 341–7

- [129] Sarkar, M.R., Augat, P., Shefelbine, S.J., et al., Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Bone*, 27, 2006, S. 1817–1823
- [130] Schaaf, H., Streckbein, P., Lendeckel, S., et al., Topical use of platelet-rich plasma to influence bone volume in maxillary augmentation: a prospective randomized trial. *Vox sanguinis*, 94(1), 2008, S. 64–9
- [131] Schmidt, V., Hilberg, T., Franke, G., et al., Paraformaldehyde fixation induces a systematic activation of platelets. *Platelets*, 14(5), 2003, S. 287–294
- [132] Sen, C.K., Gordillo, G.M., Roy, S., et al., Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 17(6), 2009, S. 763–71
- [133] Shattil, S.J., Cunningham, M., Hoxie, J.A., Detection of activated platelets in whole blood using activation- dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 70, 1987, S. 307–315
- [134] Siekmann, H.E., Thamsen, P.U., *Strömungslehre Für Den Maschinenbau: Technik und Beispiele*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009, S. 71
- [135] Singer, A.J., Clark, R.A.F., Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*, 341(10), 1999, S. 738–746
- [136] Singh, J.P., Chaikin, M.A., Pledger, W.J., et al., Persistence of the Mitogenic Response to Platelet-derived Growth Factor (Competence) Does Not Reflect a Long-term I nteraction between the G rowth Factor and the Target Cell. *The Journal of cell biology*, 96(5), 1983, S. 1497–1502
- [137] Singh, R.P., Marwaha, N., Malhotra, P., et al., Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. *Asian journal of transfusion science*, 3(2), 2009, S. 86–94
- [138] Smola, H., Eming, S.A., Hess, S., et al., Wundheilung und Wundheilungsstörungen: Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*, 98(43), 2001, S. 2802–09
- [139] Sommeling, C.E., Heyneman, A., Hoeksema, H., et al., The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: A systematic review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, , 2012, S. 1–11
- [140] Stiles, C.D., The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 33(3), 1983, S. 653–5
- [141] Stroncek, D.F., Rebull, P., Policlinico, M., et al., *Transfusion Medicine 2 Platelet transfusions*. , 2007, S. 427–438

- [142] Thorwarth, M., Wehrhan, F., Schultze-Mosgau, S., et al., PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone*, 38(1), 2006, S. 30–40
- [143] Toepke, M.W., Beebe, D.J., PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab on a chip*, 6(12), 2006, S. 1484–6
- [144] Troesch, H.A., Die Zerstäubung von Flüssigkeiten. *Chemie Ingenieur Technik - CIT*, 26(6), 1954, S. 311–320
- [145] Von Vacano, B., Xu, R., Hirth, S., et al., Hydrophobin can prevent secondary protein adsorption on hydrophobic substrates without exchange. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(7), 2011, S. 2031–40
- [146] Valeri, C.R., Saleem, B., Ragno, G., Release of platelet-derived growth factors and proliferation of fibroblasts in the releasates from platelets stored in the liquid state at 22 degrees C after stimulation with agonists. *Transfusion*, 46(2), 2006, S. 225–9
- [147] Venuvinod, P.K., Ma, W., *Rapid Prototyping: Laser-Based and Other Technologies*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2004, S. 1–21
- [148] Voggenreiter, G., Dold, C., *Wundtherapie: Wunden professionell beurteilen und erfolgreich behandeln*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004, S. 1–16
- [149] Vogt, P.M., Peter, F.W., Topsakal, E., et al., Zum Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Therapie chronischer Wunden. *Chirurg*, 69, 1998, S. 1197–1206
- [150] Vos, R.J. De, Weir, A., Schie, H.T.M. Van, et al., Platelet-Rich Plasma Injection for Chronic Achilles Tendinopathy. *JAMA*, 303(2), 2010, S. 144–149
- [151] Wagner, W., *VDI-Wärmeatlas, Band 1*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006
- [152] Wasterlain, A.S., Braun, H.J., Dragoo, J.L., Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 22(1), 2012, S. 33–42
- [153] Webb, L.X., Schmidt, U., Wundbehandlung mit der Vakuumtherapie. *Unfallchirurg*, 104(10), 2001, S. 918–926
- [154] Weibrich, G., Buch, R.S.R., Kleis, W.K.G., et al., Eigenherstellung von Platelet-rich Plasma mit dem Platelet-Concentrate-Collection-System. *Z Zahnärztl Implantol*, 17(3), 2001, S. 116–123
- [155] Weibrich, G., Buch, R.S.R., Kleis, W.K.G., et al., Herstellung von Platelet-rich Plasma mittels SmartPReP. *Z Zahnärztl Implantol*, 18(3), 2002, S. 160–166
- [156] Weibrich, G., Buch, R.S.R., Weibrich, T., et al., Das PRGF-System nach Anitua zur Anreicherung von Thrombozyten und Wachstumsfaktoren im Plasma. *Z Zahnärztl Implantol*, 18(2), 2002, S. 84–90

- [157] Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., et al., Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34(4), 2004, S. 665–71
- [158] Weibrich, G., Kleis, W.K.G., Buch, R., et al., The Harvest Smart PReP TM system versus the Friudent-Schütze platelet-rich plasma kit. *Clin. Oral Impl. Res*, 14, 2003, S. 233–239
- [159] Weibrich, G., Kleis, W.K.G., Hafner, G., et al., Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical oral implants research*, 14(3), 2003, S. 357–62
- [160] Weibrich, G., Kleis, W.K.G., Curasan PRP kit vs . PCCS PRP system - Collection efficiency and platelet counts of two different methods of the preparation of platelet-rich plasma. *Clin. Oral Impl. Res*, (13), 2002, S. 437–443
- [161] Weibrich, G., Streckbein, P., Weibrich, T., Übersicht über verschiedene Eigenherstellungsverfahren von Thrombozytenkonzentraten. , 2008, S. 1–9
- [162] Weise, K., Hirner, A., *Chirurgie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008, S. 32–43
- [163] Weise, K., Schäffer, M., *Behandlungsstrategien bei Wundheilungsstörungen*. Unfallchirurg, 103(2), 2000, S. 100–109
- [164] White, J.G., Platelet Structure. In: Michelson, A.D. (Hrsg.) *Platelets*. S. 45–74, Academic Press, Burlington, San Diego, London, 2007
- [165] Whitman, D.H., Berry, R.L., Green, D.M., Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 55(11), 1997, S. 1294–9
- [166] Wischnewski, Bernd, [www. peacesoftware. de/einigewerte/r134a. htm.](http://www.peacesoftware.de/einigewerte/r134a.htm), Peace Software
- [167] Wozniak, G., *Zerstäubungstechnik: Prinzipien, Verfahren, Geräte*. Springer DE, , 2003, S. 69–82
- [168] Xu, L.-C., Siedlecki, C. a, Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28(22), 2007, S. 3273–83
- [169] Yoshii, E., Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *Journal of biomedical materials research*, 37(4), 1997, S. 517–24
- [170] Zimmermann, R., Jakubietz, R., Jakubietz, M., et al., Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*, 41, 2001, S. 1217–1224

Abkürzungen und Begriffserläuterungen

ADP	Adenosindiphosphat
Angiogenese	Neubildung von Blutgefäßen
autolog/autogen	Empfänger und Spender identisch
BC	Buffy Coat
Buffy Coat	Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten
Ca ²⁺	Calcium
CCK	Cell Counting Kit
chemotaktisch	Beeinflussung der Fortbewegungsrichtung von Lebewesen oder Zellen durch Stoffkonzentrationsgradienten
Diabetes mellitus	Zuckerkrankheit, Glukosestoffwechselstörung
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor
EK	Erythrozytenkonzentrat
EtOH	Ethanol
FBS	fötales bovines Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fibroblasten	Bindegewebszellen
FKW	Fluorkohlenwasserstoffe
FSC	Forward Scatter (Durchflusszytometrie)
GWP	Global Warming Potential
Hämostase	Blutstillung

hypertroph	Vergrößerung von Geweben oder Organen durch Zunahme des Zellvolumens
HZ	Halbzylinder (Zellkultursystem)
iatrogen	durch den Arzt verursacht
in vitro	ausserhalb des lebenden Organismus
in vivo	in einem lebenden Organismus
Keloid	Wulstnarbe
Konfluenz	lückenlose Bedeckung der Oberfläche eines Zellkulturgefäßes it adhärent wachsenden Zellen
MABS	Methyl-Methacrylat-Acrylnitril-Butadien-Styrol
mitogen	induziert die Zellteilung
n	Anzahl
Patellasehne	Kniescheibenband
Patr.	Patricin
PC	Polycarbonat
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PESU	Polyethersulfon
PET	Polyethylenterephthalat
Phagozytose	Aufnahme fester Partikel in das Zellinnere
plt	Platelets (Thrombozyten, Blutplättchen)
POM	Polyoxymethylen
PPP	Platelet Poor Plasma
Prävalenz	Anzahl der Erkrankungsfälle einer bestimmten Krankheit
Proliferation	Vermehrung, Wachstum
PRP	Platelet Rich Plasma

R ²	Bestimmtheitsmaß
R134a	1,1,1,2-Tetrafluorethan
R227ea	1,1,1,2,3,3,3-Heptafluorpropan
REM	Rasterelektronenmikroskop
rh	human recombinant
RTV	Raumtemperatur vernetzend
Scaffold	Zellträger
SSC	Side Scatter (Durchflusszytometrie)
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TK	Thrombozytenkonzentrat
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vasokonstriktion	Engstellung der Gefäße
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

Formelzeichen

A	Querschnittsfläche
c_p	Isobare Wärmekapazität
c_v	Isochore Wärmekapazität
d	Durchmesser
g	Beschleunigung
p	Druck
v	Geschwindigkeit
\dot{m}	Massestrom
\dot{V}	Volumenstrom
κ	Isentropenexponent
μ	Ausflusszahl
ρ	Dichte
Ψ	Ausflussfunktion

Anhang

A Zellbiologische Untersuchungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden, wenn nicht abweichend beschrieben, in einer Laminar Flow Kabine durchgeführt. Dabei wird auf die Einhaltung aseptischer Bedingungen geachtet. Die Inkubation der Zellen während der Versuche erfolgt bei 37°C in einem Brutschrank mit 10 % CO₂ Begasung.

Passagieren von Zellen

Alle Zellkulturversuche werden mit der Zelllinie Hs27 (CRL-1643™, ATCC®, UK) durchgeführt. Die Zellen werden für die Versuche in den Passagen p5-p15 verwendet. Als Nährmedium wird Dulbeccos Modified Eagle medium (DMEM) (FG0435, Biochrom AG, Berlin) mit 1 % Patricin (A2812, Biochrom AG, Berlin) und 1 % Penicillin/Streptomycin (A2213, Biochrom AG, Berlin) genutzt. Wenn nicht anders angegeben wird standardmäßig 5 % fötales bovines Serum (FBS) (S0115/1231T, Biochrom AG, Berlin) zugesetzt. Für die Versuche und die weitere Zellexpansion werden die Zellen im konfluenten Stadium nach Lindl [82] passagiert. Vor der Aussaat wird die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Biochrom AG, Berlin) bestimmt.

CCK-8-Test (Cell Counting Kit 8)

Der Cell Counting Kit-8 (CK04-11, Dojindo EU GmbH, München) wird nach Herstellerangaben durchgeführt und die Absorption, welche proportional zur Zellzahl ist, nach erfolgter Inkubationszeit von 1h mittels Photometer (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA) gemessen.

Fixierung biologischer Proben für Rasterelektronische Aufnahmen

Die Fixierung biologischer Proben für rasterelektronische Aufnahmen erfolgt durch Inkubation der Proben für 24h in 3 %-igem Glutaraldehyd. Anschließend werden die Proben einmal mit PBS gewaschen und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

- 50 % EtOH (15 min)
- 70 % EtOH (15 min)
- 80 % EtOH (15 min)
- 99 % EtOH (24 h)

Anschließend wird der Alkohol vollständig abgezogen und nach erfolgter Verdampfung des Rest-Ethanol werden die Proben für die REM-Aufnahmen mit Gold besputtert (40 mA/60 sec)

PDGF-AB ELISA

Die PDGF-AB-Konzentration wird mittels ELISA bestimmt. Der Test wird laut Herstellerangaben durchgeführt (Human PDGF-AB Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA).

Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen werden mit einem FACSCalibur™ (BD Biosciences, USA) durchgeführt. Alle Proben werden hierfür auf eine Thrombozytenkonzentration von $1 \cdot 10^5/\mu\text{l}$ mit PBS verdünnt. Anschließend werden 10 μl Anti-CD62P-PE (62pPE-100T, Dianova GmbH, Hamburg) und 6 μl Anti-CD41-APC (41A-100T, Dianova GmbH, Hamburg) pro Probe zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierung der Proben erfolgt anschließend durch die Zugabe von 100 μl einer 1 %-igen Paraformaldehyd-Lösung und 10-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur. Der darauffolgende Waschschrift der Proben erfolgt durch Zugabe von 1000 μl PBS je Probe, nachfolgender Zentrifugation bei 520 g für 10 min, dekantieren von 1000 μl Überstand und resuspendieren der Probe in 500 μl frischem PBS. Für die anschließende Messung werden folgende Geräteparameter verwendet:

Parameter	Einstellung
FSC	E00
SSC	350
FL1	500
FL2	607
FL3	650
FL2_A	-
FL4	730
Threshold:	
Primary Parameter	FSC
Value	180

Ordinaten und Abszissen werden logarithmisch skaliert. Die Anzahl der pro Sekunde analysierten Zellen wird auf ca. 300 begrenzt um Koinzidenzen zu vermeiden. Die Gesamtzahl der registrierten Ereignisse wird pro Messung auf $n = 30000$ (VB) und $n = 10000$ (PRP, TK) begrenzt. Nach Erreichen dieses Schwellenwertes wird die Messung automatisch beendet. In folgender Tabelle sind die für die Messung verwendeten Fluorochrome mit den jeweiligen Eigenschaften aufgelistet:

Name (Abkürzung)	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
R-Phycoerythrin (R-PE)	565 nm	578 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

Für die Identifizierung der Thrombozytenpopulation wird mittels backgating im Streulichtdiagramm ein Plättchen-Cluster definiert. Dies erfolgt durch die Eingrenzung der CD41 positiven Zellen im Punktdiagramm (R1) (FL4-H vs. SSC-H) (vgl. Abb. 6.1, B) und anschließender Übertragung der angewählten Messpunkte in das Streulichtdiagramm (FSC-H vs. SSC-H), in welchem die Auswahl verfeinert wird (R2) (siehe Abb. 6.1, A). Alleine die in R2 markierten Zellen werden in die Aktivierungsuntersuchung mittels CD62P Marker mit eingeschlossen.

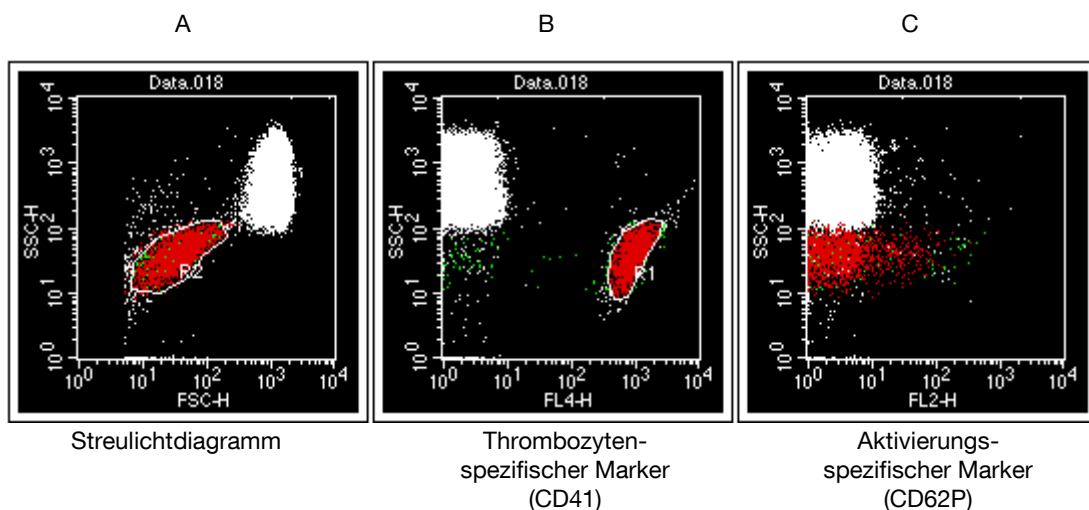


Abb. 6.1 Identifizierung der Thrombozytenpopulation mittels backgating
 Der thrombozytenspezifische Marker CD41 ermöglicht die eindeutige Abgrenzung der Plättchenpopulation zu den restlichen Blutzellen (B). Die in R1 markierten Zellen werden im Streulichtdiagramm identifiziert. Die verfeinerte Auswahl R2 wird anschließend für die aktivierungsspezifische Analyse (C) verwendet.

Mit Hilfe von Histogrammen kann das Fluoreszenzsignal des aktivierungsspezifischen Markers (CD62P, Darstellung SSC-H über FL2-H, siehe Abb. 6.1, C) ausgewertet werden. Eine Isotypkontrolle dient jeweils als Negativkontrolle. Diese wird identisch zu den Proben hergestellt, allerdings werden statt der Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Anti CD62P Lösung 10 µl PE-gekoppelter IgG2b-Antikörper zugegeben um die Häufigkeit unspezifischer Protein-Protein-Bindungen zu detektieren. Im Histogramm (Counts über FL2-H, dieser Isotypkontrolle wird ein Diskriminator (M1) so gewählt, dass 95 % der Ereignisse links davon liegen (negativ), also 5 % als falsch positiv deklariert werden. In den Proben-Histogrammen können durch Setzen eines identischen Diskriminators die positiven Ereignisse, also die aktivierten Thrombozyten im Vergleich zur Negativkontrolle abgegrenzt werden (vgl. Abb. 6.2).

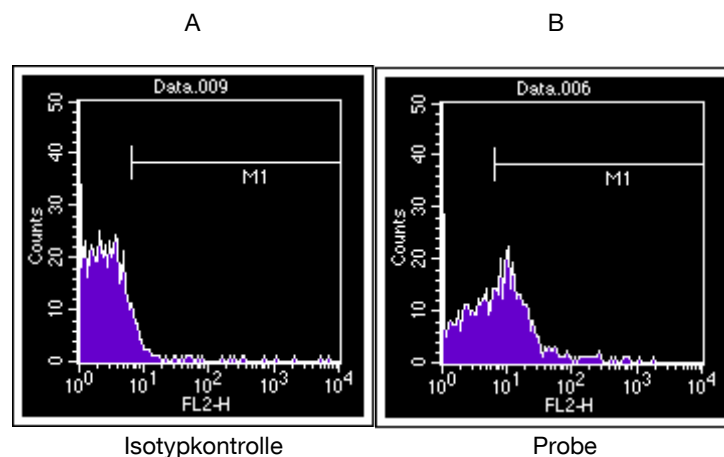


Abb. 6.2 **Histogrammauswertung des aktivierungsspezifischen Markers**
In der Isotypkontrolle wird ein Diskriminator (M1) so gesetzt, dass 95 % der Ereignisse links davon liegen, also als negativ gewertet werden. Durch Übertragung des Diskriminators auf die Probenhistogramme kann die prozentuale Anzahl aktivierter Thrombozyten im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt werden.

B Evaluierung des Zellkultursystems

Membranauswahl

Zytotoxizitätstest Membrane

Testobjekte	Cellulosenitratmembran (11303-47-N, Sartorius Stedim biotech, Göttingen), Polyethersulfonmembran (15406-50-N, Sartorius Stedim biotech, Göttingen)
Versuchsart	Direktkontakt
Zellkultursystem	24 Well Platte
Einsaatdichte	2500 Zellen/cm ² (Hs27)
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	CCK-8-Test

Die Zellaussaat (Hs27) erfolgt an Tag 0. Nach 24 h Inkubation wird pro Well ein 1 cm² großes Membranstück zugegeben. Diese werden zuvor bei 121°C und 2 bar für 15 min autoklaviert. Die Cellulosenitratmembran muss dabei vor dem Autoklaviervorgang nach Herstellerangaben mit Wasser befeuchtet werden. Nach 7 Tagen Inkubation wird die Zellzahl mittels CCK-8-Test (A) bestimmt.

Diffusionsversuch

Testobjekte	Cellulosenitratmembran in HZ aus SILPURAN 2430 Polyethersulfonmembran in HZ aus SILPURAN 2430, Greiner Cell Culture Insert
Versuchsart	Diffusionsversuch
Zellkultursystem	24 Well Platte
Einsaatdichte	Ohne Hs27
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	PDGF-AB ELISA

Die hergestellten Halbzylinder aus SILPURAN 2430 mit den beiden Membranen aus Cellulosenitrat bzw. Polyethersulfon werden nach dem Autoklavieren (121°C, 2 bar, 15 min) ebenso wie die Cell Culture Inserts (ThinCert 24-Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) in eine 24 Well Platte eingesetzt. Anschließend wird Thrombozytenkonzentrat mittels zweistufiger Zentrifugation und manuellem Pipettieren aus Vollblut mit folgenden Parametern und Eigenschaften hergestellt:

Thrombozytenkonzentrat

Antigerinnungsmittel	Heparin
Erste Zentrifugation	1000 g/5 min
Zweite Zentrifugation	2250 g/9 min
Thrombozyten/ μ l	$431 \cdot 10^3$

Jeweils 400 μ l Thrombozytenkonzentrat werden in die Halbzylinder gegeben und anschließend das Well mit 600 μ l Medium (DMEM + 5 % FBS) aufgefüllt. Bei den hängenden Zellkultureinsätzen werden 400 μ l des Konzentrats direkt ins Well und anschließend 600 μ l des Mediums auf Einsatz und Well verteilt. Nach 24 h, 72 h und 196 h werden jeweils 50 μ l Probe aus der Wellseite bei den Halbzylindersystemen und 50 μ l aus dem Zellkultureinsatz von Greiner genommen, im Kühlschrank gelagert und die PDGF-AB Konzentration bestimmt. (A).

Silikonauswahl

Erste Direktkontaktversuche von humanen Fibroblasten und Halbzylindern aus Silikon zeigten ein Zellsterben ab Tag 3 (Nährmedium mit 5 % FBS). Aufbauend auf diesen Ergebnissen soll der Einfluss unterschiedlicher FBS-Konzentrationen im Medium bei der Co-Inkubation untersucht werden.

Serumversuch

Testobjekte	HZ aus SILPURAN 2430 (Wacker Chemie AG, München), HZ aus SILPURAN 2438 (Wacker Chemie AG, München)
Versuchsart	Direktkontakt mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen im Medium
Zellkultursystem	24 Well Platte
Einsaatdichte	2500 Z/cm ²
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	CCK-8-Test

Die Halbzylinder werden aus SILPURAN 2430 und SILPURAN 2438 mit PES-Membran hergestellt und anschließend autoklaviert (121°C, 2 bar, 15 min). Nach Einsetzen der Halbzylinder in eine 24-Well Platte werden humane Fibroblasten auf der Wellseite ausgesät wobei Nährmedien versetzt mit 5 %, 10 %, 15 % und 20 % FBS verwendet wird. Nach 168 h Kultivierungsdauer erfolgt die Auswertung mittels CCK-8-Test. Als Kontrolle dienen Zellen, welche in der 24-Well Platte ohne Halbzylinder kultiviert werden.

Das Proteinadsorptionsverhalten der Silikon-Halbzylinder soll näher untersucht werden, da aufgrund der Ergebnisse des Serumversuchs vermutet wird, dass die Silikone Nährstoffe aus dem Medium adsorbieren und so einen Nährstoffmangel mit daraus resultierendem Zellsterben verursachen.

Proteinadsorption

Testobjekte	HZ aus SILPURAN 2430
Versuchsart	PDGF-Adsorption
Zellkultursystem	24 Well Platte
Einsaatdichte	Ohne Hs27
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	PDGF-AB ELISA

Halbzylinder aus SILPURAN 2430 werden in eine PDGF-Stocklösung (Konzentration 205 pg/ml) eingelegt und nach 150 min, 24 h, 72 h, 120 h und 168 h wird jeweils 50 µl Probe genommen. Diese wird im Kühlschrank gelagert und anschließend der PDGF-AB Gehalt mittels ELISA gemessen.

Kunststoffauswahl

Eluatversuch/Direktkontaktversuch

Testobjekte	PET (Polyethylenterephthalat, Eastar™ Copolyester MN021, Eastman, USA) MABS (Methyl-Methacrylat-Acrylnitril-Butadien-Styrol, Terluc®, BASF Plastics, Ludwigshafen) POM (Polyoxymethylen, Hostaform®, Ticona, Höchst)
Versuchsart	Eluatversuch mit Kunststoffgranulaten Direktkontakt mit spritzgegossenen Grundkörpern
Zellkultursystem	96-Well-Platte 24-Well-Platte
Einsaatdichte	3000 Z/cm ²
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	CCK-8-Test

Der Eluatversuch wird nach den Bestimmungen der DIN EN ISO 10993-5 und DIN EN ISO 10993-12 durchgeführt. Hierfür werden die Kunststoffgranulate abgewogen, mit 70 %-igem EtOH desinfiziert, in definiertem Oberflächen-Volumen-Verhältnis in Nährmedium eingelegt (0,2 g/ml) und 72 h unter regelmäßigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Fibroblasten werden in einer 96-Well Platte ausgesät, 24 h inkubiert und anschließend wird das normale Nährmedium durch jeweils 100 µl des Eluats ersetzt. Nach 7 Tagen Inkubation erfolgt die Auswertung mittels CCK-8-Test. Als Kontrolle werden Zellen in Nährmedium (5 % FBS, 1 % Pen./Strep., 1 % Patr.) kultiviert.

Für den Direktkontaktversuch werden die spritzgegossenen Grundkörper nach der Fertigung im Ultraschallbad gereinigt, diejenigen aus PET und POM autoklaviert (121°C, 2 bar, 15 min) und die aus MABS mit 70 %-igem EtOH desinfiziert. Nachdem die

Zellkultureinsätze in eine 24-Well Platte eingesetzt wurden, findet die Aussaat humaner Fibroblasten auf der freien Wellseite statt (3000 Z/cm²). Nach 7 Tagen erfolgt die Auswertung mittels CCK-8-Test.

Klebstoffauswahl

Direktkontakt

Testobjekte	Loctite 3926, Loctite 3921, Loctite 3301, Loctite 3311, Loctite 3321 (Henkel AG & Co. kgaA, Düsseldorf)
Versuchsart	Direktkontakt mit Klebstoffen
Zellkultursystem	12-Well-Platte
Einsaatdichte	2500 Z/cm ²
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	CCK-8-Test

Für die direkte Co-Inkubation von Fibroblasten mit den ausgewählten Klebstoffen werden Klebstoffpunkte direkt in 12-Well Platten gesetzt (UV-Aushärtung 3 x 10 sec). Anschließend werden diese Wells mit 70 %-igem EtOH desinfiziert und die Zellen direkt zu den Klebstoffpunkten gesät. Nach 7 Tagen Co-Inkubation erfolgt die Auswertung mittels CCK-8-Test wobei als Kontrolle Fibroblasten ohne Fremdkörperkontakt dienen.

C Co-Inkubationsversuche

Die Co-Inkubationsversuche von Thrombozytenkonzentraten mit humanen Fibroblasten der Zelllinie Hs27 werden wie folgt durchgeführt:

Co-Inkubationsversuche

Testobjekte	Polyethersulfonmembran in HZ aus SILPURAN 2430, Polyethersulfonmembran auf HZ aus PET mit Loctite 3926
Versuchsart	Co-Inkubationsversuche
Zellkultursystem	24-Well-Platte
Einsaatsdicht	2500 Z/cm ² (Silikon); 3500 Z/cm ² (PET)
Kultivierungsdauer	7 Tage
Auswertemethode	CCK-8-Test, PDGF-AB Elisa

Nach Fertigstellung werden die Halbzylinder bei 120°C / 2 bar / 15 min autoklaviert und in eine 24-Well Platte platziert. Die Zellen werden jeweils auf die Wellseite in 15 %-FBS Medium (Silikon-HZ) oder 5 %-FBS Medium (PET-HZ) ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank werden nach vorherigem Abziehen des kompletten Mediums die Halbzylinder mit jeweils 400 µl Thrombozytenkonzentrat und die Wellseite mit 600 µl des jeweiligen Mediums aufgefüllt. Bei den Kontrollwells wird das Thrombozytenkonzentrat durch Medium ersetzt.

Das Thrombozytenkonzentrat wird mittels zweistufiger Zentrifugation und manuellem Pipettieren aus Vollblut hergestellt. Anschließend findet eine Verdünnung des Konzentrats auf eine Thrombozytenzahl von ca. $500 \cdot 10^3$ plt/µl statt. Im Silikon-System wird ausschließlich nicht versprühtes TK getestet, wohingegen im spritzgegossenen Zellkultursystem sowohl TK vor dem Versprühen, als auch danach eingesetzt wird.

	Silikon HZ	PET HZ
Antigerinnungsmittel	Citrat, Heparin, EDTA	Citrat, Heparin, EDTA
Erste Zentrifugation	1760 g/6 min	1400 g/5 min
Zweite Zentrifugation	2250 g/9 min	1000 g/7 min
Thrombozyten / μ l		
Citrat	$454 \cdot 10^3 \pm 44 \cdot 10^3$	$1285 \cdot 10^3$ (vor Verdünnung)
Heparin	$394 \cdot 10^3 \pm 102 \cdot 10^3$	$651 \cdot 10^3$ (vor Verdünnung)
EDTA	$459 \cdot 10^3 \pm 21 \cdot 10^3$	$1428 \cdot 10^3$ (vor Verdünnung)

Nach 7 Tagen Co-Inkubation erfolgt die Auswertung mittels CCK-8-Test.

Neben der Zellzahl wird die PDGF-Freisetzung aus den Thrombozytenkonzentraten mittels Immunoassay untersucht. 50 μ l Probe werden hierfür nach 24 h, 72 h und 168 h aus der Wellseite gezogen. Zur Untersuchung der PDGF-AB Aufnahme durch die humanen Fibroblasten wird jeweils ein Ansatz ohne Fibroblasten mitgeführt (HZ mit TK ohne Fibroblasten), aus welchem zu den gleichen Testzeitpunkten 50 μ l Probe entnommen wird.

D Parameterstudie

Zentrifugationsparameter [Zeit / Beschleunigung]	Ausbeute [%]	Variationskoeffizient [%]	Prozesszeit [min]	Summe
3' / 200 g	35,39	26,33	3	0,8
3' / 400 g	44,14	8,02	3	2,3
3' / 600 g	54,22	6,36	3	2,3
3' / 800 g	64,63	6,29	3	2,3
3' / 1000 g	71,85	5,36	3	2,3
3' / 1200 g	80,47	10,70	3	2,1
3' / 1400 g	89,04	12,14	3	2,4
3' / 1600 g	86,44	15,58	3	1,9
5' / 200 g	49,86	33,13	5	0,6
5' / 400 g	71,28	23,01	5	0,6
5' / 600 g	82,13	18,11	5	1,4
5' / 800 g	91,96	10,66	5	2,5
5' / 1000 g	90,50	16,43	5	2
5' / 1200 g	93,40	9,11	5	3
5' / 1400 g	94,99	9,71	5	3
5' / 1600 g	92,08	10,27	5	2,5
7' / 200 g	71,51	10,17	7	1,4
7' / 400 g	82,66	22,63	7	0,7
7' / 600 g	98,66	11,10	7	2,6
7' / 800 g	99,78	14,28	7	2,6
7' / 1000 g	96,70	10,07	7	2,6
7' / 1200 g	96,00	6,35	7	3,1
7' / 1400 g	83,30	27,60	7	0,7
7' / 1600 g	75,09	32,77	7	0,4
9' / 200 g	86,76	6,04	9	2,3
9' / 400 g	90,77	10,08	9	2,1
9' / 600 g	102,19	10,57	9	2,4
9' / 800 g	97,01	16,82	9	1,9
9' / 1000 g	87,47	10,78	9	1,8
9' / 1200 g	86,06	14,34	9	1,8
9' / 1400 g	74,37	27,70	9	0,2
9' / 1600 g	68,62	32,00	9	0,2

Tab. 6.1

1. Zentrifugation manuell mit EDTA

Auswertung der gewichteten Punktbewertung. Das beste Ergebnis wird bei 1200 g und 7 min erzielt (siehe Kap. 3.4.1).

Zentrifugationsparameter [Zeit / Beschleunigung]	Ausbeute [%]	Variationskoeffizient [%]	Prozesszeit [min]	Summe
3' / 200 g	30,98	44,36	3	0,8
3' / 400 g	46,31	35,19	3	0,8
3' / 600 g	49,99	9,22	3	2,3
3' / 800 g	68,19	22,24	3	0,8
3' / 1000 g	81,76	18,64	3	1,8
3' / 1200 g	88,42	11,11	3	2,8
3' / 1400 g	88,67	11,47	3	2,8
3' / 1600 g	97,42	7,24	3	4,3
5' / 200 g	47,72	16,62	5	1,1
5' / 400 g	79,65	27,37	5	0,6
5' / 600 g	86,39	14,02	5	2,6
5' / 800 g	90,38	12,89	5	3,1
5' / 1000 g	90,00	10,33	5	2,6
5' / 1200 g	95,31	8,63	5	4,1
5' / 1400 g	97,01	6,87	5	4,1
5' / 1600 g	100,91	7,30	5	4,1
7' / 200 g	70,74	17,11	7	0,9
7' / 400 g	86,89	15,19	7	1,9
7' / 600 g	98,91	9,96	7	3,9
7' / 800 g	96,78	11,75	7	3,4
7' / 1000 g	94,20	6,43	7	3,4
7' / 1200 g	91,49	13,15	7	2,9
7' / 1400 g	86,04	15,05	7	1,9
7' / 1600 g	80,96	13,56	7	1,9
9' / 200 g	87,32	16,86	9	1,7
9' / 400 g	88,08	12,63	9	2,2
9' / 600 g	99,08	10,31	9	3,2
9' / 800 g	93,69	6,51	9	3,2
9' / 1000 g	84,02	13,31	9	1,7
9' / 1200 g	75,72	18,48	9	0,7
9' / 1400 g	66,22	38,11	9	0,2
9' / 1600 g	54,80	25,23	9	0,2

Tab. 6.2

1. Zentrifugation automatisiert mit EDTA

Auswertung der gewichteten Punktebewertung. Das beste Ergebnis wird bei 1600 g und 3 min erzielt (siehe Kap. 3.4.1).

Zentrifugationsparameter [Zeit / Beschleunigung]	Ausbeute [%]	Variationskoeffizient [%]	Prozesszeit [min]	Summe
3' / 200 g	27,22	40,11	3	0,8
3' / 600 g	55,83	18,28	3	1,3
3' / 1000 g	69,37	18,05	3	1,3
3' / 1400 g	70,46	16,15	3	1,3
3' / 1600 g	70,38	16,87	3	1,3
5' / 200 g	49,42	35,69	5	0,6
5' / 600 g	71,59	18,60	5	1,1
5' / 1000 g	76,63	14,05	5	1,6
5' / 1400 g	71,83	11,16	5	1,6
5' / 1600 g	68,02	23,84	5	0,6
7' / 200 g	60,04	24,94	7	0,4
7' / 600 g	78,77	18,18	7	0,9
7' / 1000 g	64,76	28,49	7	0,4
7' / 1400 g	64,05	16,48	7	0,9
7' / 1600 g	58,23	30,54	7	0,4
9' / 200 g	72,80	22,19	9	0,2
9' / 600 g	70,39	24,97	9	0,2
9' / 1000 g	70,42	17,01	9	0,7
9' / 1400 g	52,87	31,62	9	0,2
9' / 1600 g	49,59	46,87	9	0,2

Tab. 6.3

1. Zentrifugation manuell mit Heparin

Auswertung der gewichteten Punktebewertung. Das beste Ergebnis wird bei 1000 g oder 1400 g und 5 min erzielt (siehe Kap. 3.4.1).

Zentrifugationsparameter [Zeit / Beschleunigung]	Ausbeute [%]	Variationskoeffizient [%]	Prozesszeit [min]	Summe
3' / 200 g	32,32	22,51	3	0,8
3' / 600 g	63,11	18,74	3	1,3
3' / 1000 g	76,14	20,70	3	0,8
3' / 1400 g	86,88	23,98	3	1,4
3' / 1600 g	88,10	27,38	3	1,4
5' / 200 g	61,99	26,35	5	0,6
5' / 600 g	83,51	24,65	5	0,9
5' / 1000 g	68,51	52,88	5	0,6
5' / 1400 g	66,99	27,15	5	0,6
5' / 1600 g	62,91	27,72	5	0,6
7' / 200 g	63,59	13,79	7	1,4
7' / 600 g	78,77	17,59	7	0,9
7' / 1000 g	65,04	29,11	7	0,4
7' / 1400 g	51,28	26,31	7	0,4
7' / 1600 g	38,29	40,51	7	0,4
9' / 200 g	70,88	25,48	9	0,2
9' / 600 g	76,71	17,68	9	0,7
9' / 1000 g	56,55	32,17	9	0,2
9' / 1400 g	30,09	37,24	9	0,2
9' / 1600 g	23,47	42,44	9	0,2

Tab. 6.4

1. Zentrifugation automatisiert mit Heparin

Auswertung der gewichteten Punktebewertung. Das beste Ergebnis wird bei 1400 g und 1600 g und 3 min sowie 200 g und 7 min erzielt (siehe Kap. 3.4.1).

Zentrifugationsparameter [Zeit / Beschleunigung]	Ausbeute [%]	Variationskoeffizient [%]	Prozesszeit [min]	Summe
3' / 200 g	15,26	30,81	3	0,8
3' / 600 g	49,55	31,49	3	0,8
3' / 1000 g	55,67	17,14	3	1,3
3' / 1400 g	77,40	10,26	3	1,8
3' / 1600 g	81,59	10,17	3	2,1
5' / 200 g	30,46	35,76	5	0,6
5' / 600 g	70,29	12,22	5	1,6
5' / 1000 g	84,18	8,24	5	2,4
5' / 1400 g	95,36	6,54	5	3,3
5' / 1600 g	89,30	6,96	5	2,7
7' / 200 g	52,92	38,40	7	0,4
7' / 600 g	85,32	13,18	7	2
7' / 1000 g	89,53	10,11	7	2
7' / 1400 g	86,52	17,23	7	1,5
7' / 1600 g	84,00	10,74	7	1,7
9' / 200 g	51,38	29,48	9	0,2
9' / 600 g	84,55	9,82	9	2
9' / 1000 g	94,12	10,18	9	2,1
9' / 1400 g	83,11	16,28	9	1
9' / 1600 g	73,16	18,81	9	0,7

Tab. 6.5

1. Zentrifugation manuell mit Citrat

Auswertung der gewichteten Punktebewertung. Das beste Ergebnis wird bei 1400 g und 5 min erzielt (siehe Kap. 3.4.1).

Zentrifugationsparameter [Zeit / Beschleunigung]	Ausbeute [%]	Variationskoeffizient [%]	Prozesszeit [min]	Summe
3' / 200 g	17,88	39,47	3	0,8
3' / 600 g	40,48	24,82	3	0,8
3' / 1000 g	67,97	19,62	3	1,3
3' / 1400 g	86,47	11,09	3	2,4
3' / 1600 g	93,08	7,72	3	3,2
5' / 200 g	26,64	41,01	5	0,6
5' / 600 g	64,48	17,13	5	1,1
5' / 1000 g	94,04	5,71	5	3
5' / 1400 g	95,60	8,35	5	3,3
5' / 1600 g	91,86	8,90	5	3
7' / 200 g	38,95	29,04	7	0,4
7' / 600 g	86,78	9,99	7	2,5
7' / 1000 g	92,85	6,88	7	2,8
7' / 1400 g	86,32	9,00	7	2,5
7' / 1600 g	77,63	12,31	7	1,4
9' / 200 g	54,03	23,26	9	0,2
9' / 600 g	93,04	6,49	9	2,6
9' / 1000 g	93,58	8,16	9	2,6
9' / 1400 g	64,44	22,17	9	0,2
9' / 1600 g	52,20	26,58	9	0,2

Tab. 6.6

1. Zentrifugation automatisiert mit Citrat

Auswertung der gewichteten Punktebewertung. Das beste Ergebnis wird bei 1400 g und 5 min erzielt (siehe Kap. 3.4.1).

E Produktdokumentation

1. Arterioocyte Medical Systems, MAGELLAN Produktbroschüre, www.arterioocyte.com, 2012
2. Arthrex, Arthrex ACP Doppelspritze Produktbroschüre, 2011
3. Biolink Implant Systems, Fibrinet, Produktbroschüre, www.selphyl.com, 2012
4. Biomet Biologics, GPS II - System Produktbroschüre, www.bmetbiologics.com, 2006
5. Bti Biotechnology Institute, PRGF System Produktbroschüre, www.bti-implants.us, 2012
6. Curasan, ATR Set Produktbroschüre, www.curasan.de, 2010
7. Cytomedix, Angel Produktbroschüre, www.cytomedix.com, 2010
8. Exactech, Accelerate Produktbroschüre, www.exac.com, 2007
9. ReGen Lab, RegenKit Produktbroschüre, www.regenlab.com, 2012
10. Smith&nephew, Caption Produktbroschüre, www.smith-nephew.com, 2007

F TK-Systeme

Name	Hersteller	Endprodukt	System	Volumen VB	Volumen Endprodukt	Thrombozyten- ausbeute	Überpress- vorgang	Manuel l Schritte	Methode	Dauer	Zentrifugations- parameter
PRP-Kit	Curasan AG, Kleinostheim, D	Thrombozyten- konzentrat	CPDA-Monovetten (Sarstedt)	8,5ml	0,3ml-0,5ml	ca. 20%	Manuell / offen	>5	zweistufige Zentrifugation		2400 U/min X 10 min 3600 U/min X 15 min
ATR® - Advanced Tissue Regeneration	Curasan AG, Kleinostheim, D	Wachstumsfaktor- konzentrat	Komplettsystem	8ml	2ml		Manuell / geschlossen	>5	Sedimentation	ca. 80 min	
GPS® III - Gravitational Platelet Separation System	Biomet Inc., Warsaw, Indiana, USA	Thrombozyten- konzentrat	Zylinder mit schwimmender Boje für die Abgrenzung des BC	27ml/54ml/ 106ml (2*54ml)	3ml/6ml/12ml (2*6ml)	22,6%-43%	Manuell / geschlossen	>5	einstufige Zentrifugation	ca. 25 min	
Caption - Disposable Platelet Concentrator	Orthopaedic Trauma & Clinical Therapies, Smith & Nephew, Memphis, TN, USA	Thrombozyten- konzentrat	Komplettsystem mit integrierten Filtern	55ml	10ml	4-fache Anreicherung	Manuell / geschlossen	>5	Filtration	ca. 30 min	
PCCS - Platelet Concentrate Collection System	3i (Implant Innovation Incorporated)	Thrombozyten- konzentrat	Doppelbeutel	54ml	ca. 5ml	67%	Manuell / geschlossen	>5	zweistufige Zentrifugation	ca. 40 min	3000 U/min X 3 min 45 sec 3000 U/min X 13 min
ACP - Autologous Conditioned Plasma	Arthrex, Inc., Naples, Florida, USA	Thrombozyten- konzentrat	Doppelspritze	15ml	ca. 4ml	2-fache Anreicherung	Manuell / geschlossen	2	einstufige Zentrifugation	ca. 15 min	1500 U/min X 5 min
RegenPRP-Kit	RegenLab (Stryker), Mollens, CH	Platelet Gel		8ml	5ml	65%	Manuell / geschlossen		zweistufige Zentrifugation	ca. 20 min	1500 g X 10 min
GenesisCS PRP	EmCyte, Fort Myers, Florida, USA	Thrombozyten- konzentrat	Zylinder mit schwimmender Boje für die Abgrenzung des BC	30ml - 240ml	15ml-60ml	60-70%	Manuell / geschlossen	>5	einstufige Zentrifugation		2400 rpm X 12 min

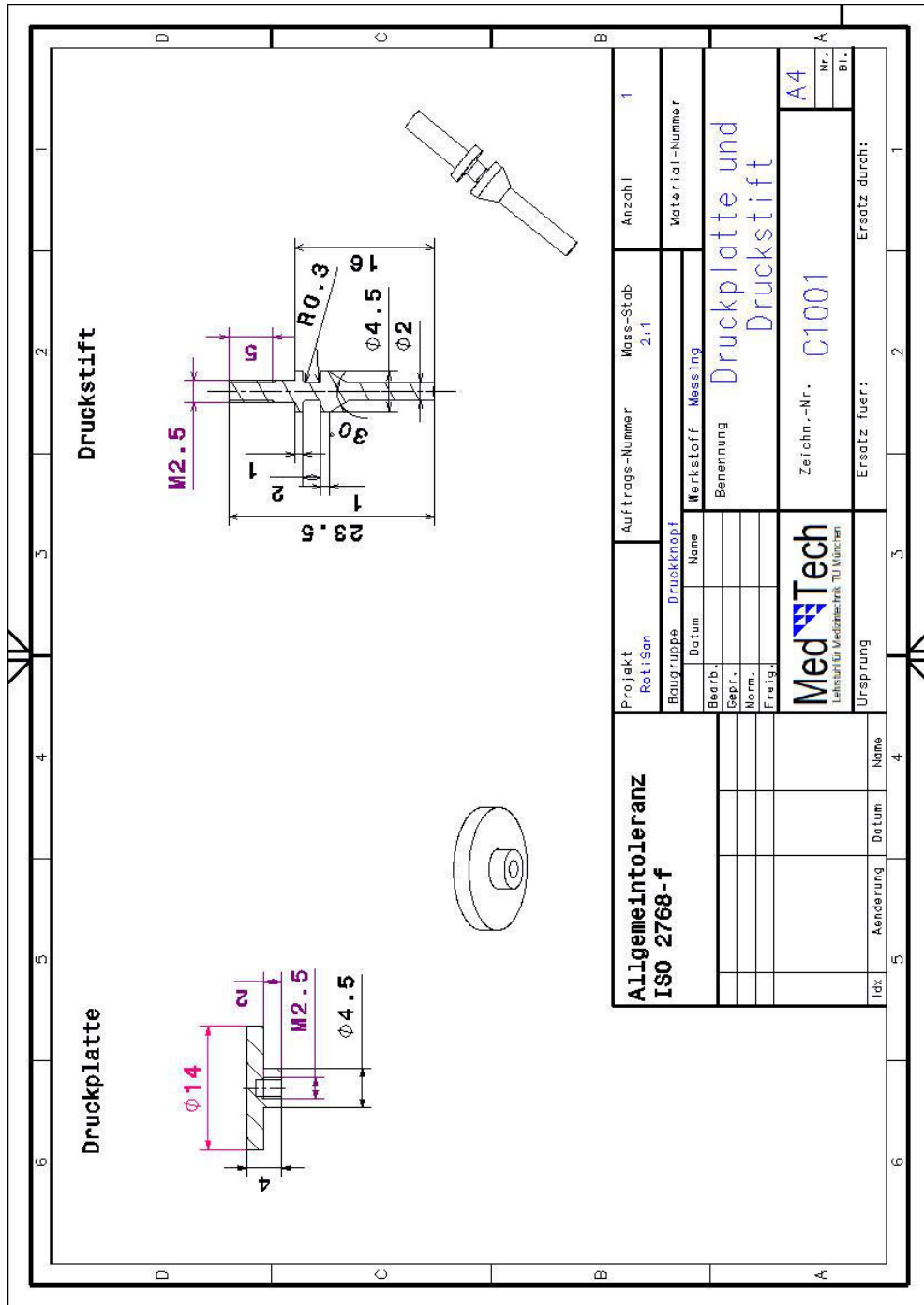
[15, 20, 38, 39, 43, 79, 154–156, 158–161, 170]

Name	Hersteller	Endprodukt	System	Volumen VB	Volumen Endprodukt	Thrombozyten- ausbeute	Überpress- vorgang	Manuel l Schritte	Methode	Dauer	Zentrifugations- parameter
Cascade	MTF Sports Medicine, Edison, New Jersey, USA	Platelet Rich Fibrin Matrix Platelet Rich Fibrin Membrane Platelet Rich Plasma	Herkömmliches Standard- Blutabnahme röhrchen mit Trenngel	9ml	4,5ml	68%	Manuell / offen		einstufige Zentrifugation		1100 g X 6 min
Selphyl® System (Früher Fibrinet)	Selphyl, Bethlehem, PA, USA	Platelet Gel		9ml	2ml	65,56%	Manuell / geschlossen		zweistufige Zentrifugation	ca. 40 min	1100 g X 10 min 1500 g X 15 min
SmartPRP®2 APC™	Harvest Technologies Corporation / Terumo, Plymouth, MA, USA	Thrombozyten- konzentrat	Doppelbehälter	20ml/60ml	3ml/7ml/10ml	63%	Automatisiert	3 - 5	zweistufige Zentrifugation	ca. 20 min	
Magellan® Autologous Platelet Separator	Arterocyte medical Systems, Cleveland, Ohio, USA	Thrombozyten- konzentrat	Zylinder - Schlauch - System	26ml/35ml/ 44ml/52ml	3ml-10ml (individuell einstellbar)	65,50%	Automatisiert	3 - 5	zweistufige Zentrifugation		
Vivostat® System	Vivostat A/S, Alleroed, DK	Platelet Rich Fibrin	Zylinder - Schlauch - System	120ml	ca.3ml-5ml	16,75%	Automatisiert	>5	zweistufige Zentrifugation	ca. 60 min	
Angel - PRP System	Cytomedix, Inc., Gaithersburg, MD, USA	Thrombozyten- konzentrat	Beutel - Schlauch - System	40ml- 180ml	5ml-18ml	47%	Automatisiert	>5	zweistufige Zentrifugation	ca. 25 min - 4000 rpm 40 min X 11 min 3000 rpm X 2 min	
Autogel System	Cytomedix, Inc., Gaithersburg, MD, USA	Platelet Gel		5ml-30ml					zweistufige Zentrifugation	ca. 15 min	

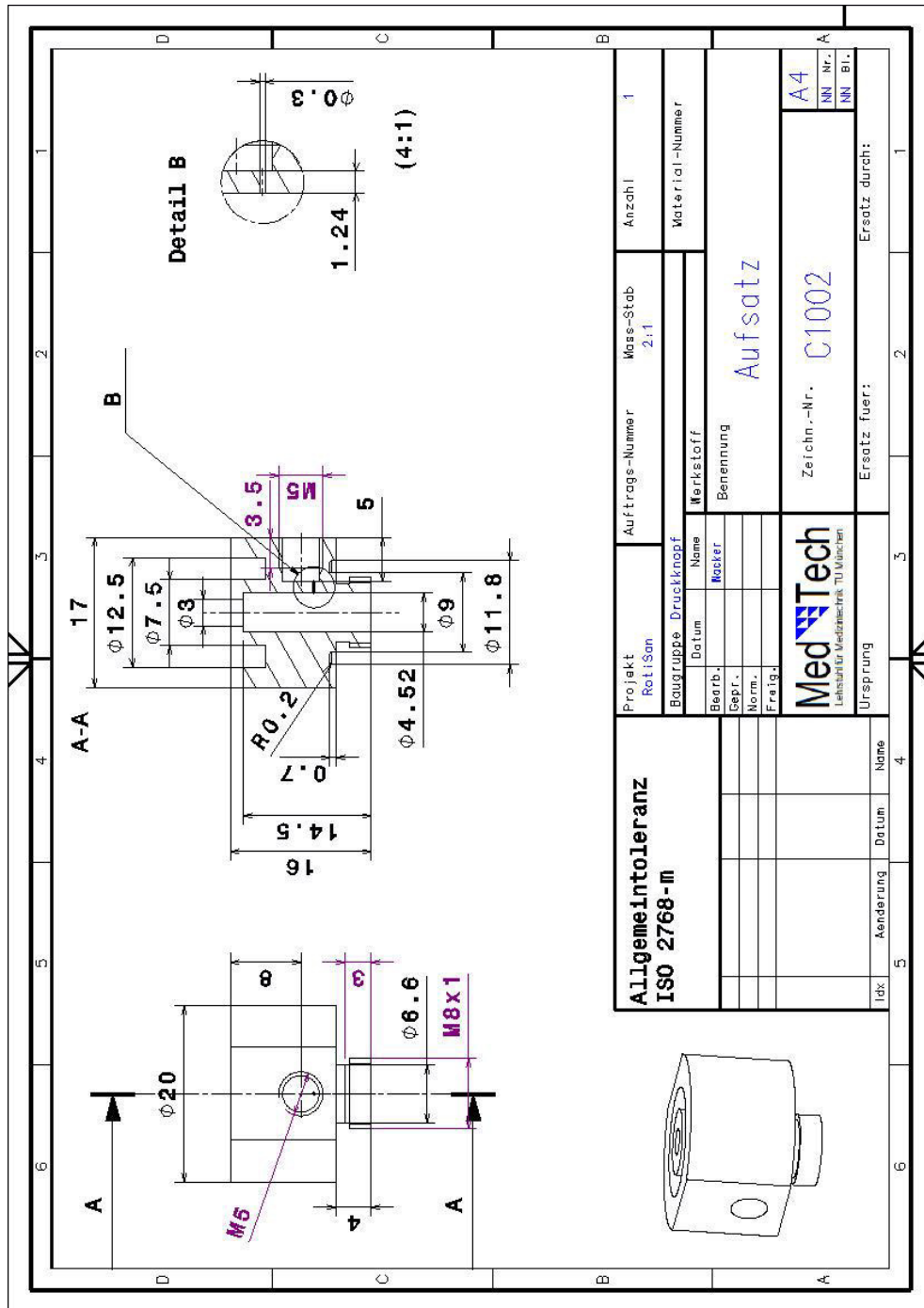
G Konstruktionszeichnungen

Bedienelement Applikator

6	5	4	3	2	1																																																												
D				C	B																																																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Pos.</th> <th>Qty.</th> <th>Component</th> <th>Description</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>C1001</td> <td>Druckplatte</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1</td> <td>DIN 2098, 2x10x18</td> <td>Druckfeder</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>1</td> <td>C1002</td> <td>Aufsatz</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1</td> <td>C1001</td> <td>Druckstift</td> </tr> </tbody> </table>						Pos.	Qty.	Component	Description	1	1	C1001	Druckplatte	2	1	DIN 2098, 2x10x18	Druckfeder	3	1	C1002	Aufsatz	4	1	C1001	Druckstift																																								
Pos.	Qty.	Component	Description																																																														
1	1	C1001	Druckplatte																																																														
2	1	DIN 2098, 2x10x18	Druckfeder																																																														
3	1	C1002	Aufsatz																																																														
4	1	C1001	Druckstift																																																														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Allgemeintoleranz ISO 2768-m</td> <td style="text-align: center;">Projekt RotiSan</td> <td style="text-align: center;">Auftrags-Nr.</td> <td style="text-align: center;">Mass-Stab 2:1</td> <td style="text-align: center;">Anzahl 1</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td style="text-align: center;">Baugruppe</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">Material-Nr.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Bearb.</td> <td style="text-align: center;">Datum</td> <td style="text-align: center;">Name</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">Werkstoff</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Gepr.</td> <td></td> <td style="text-align: center;">Rechter</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">Benennung</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Norm.</td> <td></td> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">Druckknopf</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Freig.</td> <td></td> <td></td> <td colspan="3" style="text-align: center;">Zeichn.-Nr. C1000</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">MedTech Lehrstuhl für Medizintechnik TU München</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Ursprung</td> <td style="text-align: center;">A4</td> <td style="text-align: center;">NN Nr. A</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Idx</td> <td style="text-align: center;">Änderung</td> <td style="text-align: center;">Datum</td> <td style="text-align: center;">Name</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Ersatz fuer:</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td colspan="3"></td> <td style="text-align: center;">C</td> <td style="text-align: center;">B</td> </tr> </table>						Allgemeintoleranz ISO 2768-m		Projekt RotiSan	Auftrags-Nr.	Mass-Stab 2:1	Anzahl 1			Baugruppe	Material-Nr.			Bearb.	Datum	Name	Werkstoff			Gepr.		Rechter	Benennung			Norm.			Druckknopf			Freig.			Zeichn.-Nr. C1000			MedTech Lehrstuhl für Medizintechnik TU München		Ursprung		A4	NN Nr. A	Idx	Änderung	Datum	Name	Ersatz fuer:		6	5	4	3	2	1	A				C	B
Allgemeintoleranz ISO 2768-m		Projekt RotiSan	Auftrags-Nr.	Mass-Stab 2:1	Anzahl 1																																																												
		Baugruppe	Material-Nr.																																																														
Bearb.	Datum	Name	Werkstoff																																																														
Gepr.		Rechter	Benennung																																																														
Norm.			Druckknopf																																																														
Freig.			Zeichn.-Nr. C1000																																																														
MedTech Lehrstuhl für Medizintechnik TU München		Ursprung		A4	NN Nr. A																																																												
Idx	Änderung	Datum	Name	Ersatz fuer:																																																													
6	5	4	3	2	1																																																												
A				C	B																																																												



Allgemeintoleranz ISO 2768-f		Projekt RotiSan	Auftrags-Nummer	Mass-Stab 2:1	Anzahl 1
		Baugruppe	Druckknopf	Material-Nummer	
		Datum	Name	Merkstoff: Messing	
		Bearb.		Benennung Druckplatte und Druckstift	
		Bepr.		Zeichn.-Nr. C1001	
		Norm.		A4	
		Fertig.		Nr.	
				Bl.	
		Ursprung	Ersatz fuer:		Ersatz durch:
Idk.	Aenderung	Datum	Name		
5			4		1



Applikator Gesamtaufbau

Pos.	Qty.	Component	Description
1	1	C1000	Druckknopf
2	1	C3001	Retrofit Adapter mit Ventil
3	1	C3002	Gaskartusche
4	1	C3003	Treibmittelleitung
5	1	C3004	Applikatreservoir
6	1	C3005	Applikatleitung
7	1	C3006	Düse
8	1	C3007	Dreiweghahn

Projekt	Verwendung		Masse-Staff	1:2	Anzahl	1		
	Auftrags-Nummer		Allgemeintoleranz ISO 2768-m		Material-Nummer			
Rolle	San	Datum	Werkstoff		Baugruppe			
			Bearb.	Wacker			Benennung	
			Gepr.				Applikator	
			Norm.					
Freig.		Zeichn.-Nr.		C3000	A4			
A	Änderung	Idk.	Ursprung		Ersatz fuer:	Ersatz durch:		
			MedTech Lehrstuhl für Medizintechnik TU München					

Silikon-Gussform

6	5	4	3	2	1																																																																		
						<p>(1:2)</p>																																																																	
				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Pos.</th> <th>Qty.</th> <th>Component</th> <th>Description</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>C2001</td> <td>Rückseite</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1</td> <td>C2002</td> <td>Membranaufnahme</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>1</td> <td>C2003</td> <td>Deckel</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>4</td> <td>DIN 10842, M4x16</td> <td>Schraube</td> </tr> </tbody> </table>		Pos.	Qty.	Component	Description	1	1	C2001	Rückseite	2	1	C2002	Membranaufnahme	3	1	C2003	Deckel	4	4	DIN 10842, M4x16	Schraube																																														
Pos.	Qty.	Component	Description																																																																				
1	1	C2001	Rückseite																																																																				
2	1	C2002	Membranaufnahme																																																																				
3	1	C2003	Deckel																																																																				
4	4	DIN 10842, M4x16	Schraube																																																																				
						<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Allgemeintoleranz ISO 2768-m</td> <td>Projekt RotiSan</td> <td>Auftrags-Nummer</td> <td>Mess-Stab 1:1</td> <td>Anzahl</td> <td colspan="2">Material-Nummer</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>Baugruppe</td> <td>Name</td> <td colspan="4">Edelstahl</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>Bearb.</td> <td>Nacker</td> <td colspan="4">Silikon-Gussform</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>Gepl.</td> <td></td> <td colspan="4">Zeichn.-Nr. C2000</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>Norm.</td> <td></td> <td colspan="4">A4</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td>Freige.</td> <td></td> <td colspan="4">NN Nr. / NN Bl.</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td colspan="2" style="text-align: center;">MedTech <small>Lehrstuhl für Medizintechnik, TU München</small></td> <td colspan="2">Ursprung</td> <td colspan="2">Ersatz fuer:</td> </tr> <tr> <td>Idx</td> <td>Kenderung</td> <td>Datum</td> <td>Name</td> <td colspan="4">Ersatz durch:</td> </tr> </table>		Allgemeintoleranz ISO 2768-m		Projekt RotiSan	Auftrags-Nummer	Mess-Stab 1:1	Anzahl	Material-Nummer				Baugruppe	Name	Edelstahl						Bearb.	Nacker	Silikon-Gussform						Gepl.		Zeichn.-Nr. C2000						Norm.		A4						Freige.		NN Nr. / NN Bl.						MedTech <small>Lehrstuhl für Medizintechnik, TU München</small>		Ursprung		Ersatz fuer:		Idx	Kenderung	Datum	Name	Ersatz durch:			
Allgemeintoleranz ISO 2768-m		Projekt RotiSan	Auftrags-Nummer	Mess-Stab 1:1	Anzahl	Material-Nummer																																																																	
		Baugruppe	Name	Edelstahl																																																																			
		Bearb.	Nacker	Silikon-Gussform																																																																			
		Gepl.		Zeichn.-Nr. C2000																																																																			
		Norm.		A4																																																																			
		Freige.		NN Nr. / NN Bl.																																																																			
		MedTech <small>Lehrstuhl für Medizintechnik, TU München</small>		Ursprung		Ersatz fuer:																																																																	
Idx	Kenderung	Datum	Name	Ersatz durch:																																																																			
6	5	4	3	2	1																																																																		
D	C	B	A																																																																				

6	5	4	3	2	1
D	C	B	A		
Allgemeintoleranz ISO 2768-m			Projekt RotiSan	Auftrags-Nummer 1	Anzahl 1
Idk. Änderung Datum Name			Baugruppe Silikon-Gussform	Mass-Staff 1:1	Material-Nummer
Datum Name			Markstoff Edelsstahl	Benennung Rückseite	
Bearb. Nachr.			Zeichn.-Nr. C2001		
Gepr. Norm.			Zeichn.-Nr. A4		
Freig.			Ersatz fuer: NN Nr.		
MedTech Lehrstuhl für Medizintechnik, TU München			Ersatz durch: NN Nr.		
Ursprung			Ersatz durch: NN Nr.		
6	5	4	3	2	1
D	C	B	A		

