



Lehrstuhl für Medizintechnik
Technische Universität München

Hämokompatible Silikonelastomere: Analyse und Modifikation der Oberflächeneigenschaften eines implantierbaren Silikonkatheters

Dipl.-Ing. Cécile G. N. Boudot

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

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Tim C. Lüth

Prüfer der Dissertation: Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier

apl. Prof. Dr. med. Christian Pylatiuk

Die Dissertation wurde am 05.02.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 21.08.2018 angenommen.

Überblick

Die Hämkompatibilität eines Werkstoffes bezeichnet spezifische Wechselwirkungen zwischen seiner Oberfläche und Blut. Sie ist eine essenzielle Eigenschaft für die Entwicklung und Bewertung medizinischer Implantate, welche langfristig im Kontakt mit zirkulierendem Blut eingesetzt werden sollen, wie z. B. Katheter, Stents, künstliche Herzklappen. Jedoch ist die *in vitro* Prüfung der Hämkompatibilität von Werkstoffen kaum standardisiert und die Hämkompatibilität von medizinischen Kunststoffen oft nicht ausreichend charakterisiert. Aus diesem Grund wurde ein neues Prüfsystem, welches die Inkubation von Blut und Blutfraktionen mit Kunststoffproben unter reproduzierbaren, physiologischen Bedingungen ermöglicht, entwickelt und anschließend validiert.

Medizinische Silikonelastomere sind aufgrund ihrer Reinheit und ihrer thermischen, chemischen und biologischen Stabilität beliebte Werkstoffe im Medizinbereich. Mit dem neuen Prüfsystem wurden zunächst die Oberflächeneigenschaften hinsichtlich ihrer *in vitro* Hämkompatibilität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Oberflächeneigenschaften eine wesentliche Rolle spielen: Neben der Hydrophobie der Werkstoffoberfläche trägt auch die Rauheit zur Adhäsion von Blutbestandteilen bei. Wegen der stark hydrophoben Oberfläche erwiesen sich Silikonelastomere bei einer Vergleichsuntersuchung verschiedener Kunststoffe mit ähnlicher Rauheit als verhältnismäßig thrombogen.

Um die Hämkompatibilität der Silikonelastomere zu verbessern, sollte folglich die Oberfläche glatt und hydrophil gestaltet werden. Während eine Parametrisierung der Rauheit durch den Herstellungsprozess ermöglicht werden konnte, wurde die Hydrophilisierung durch Oberflächen- und Bulkmodifikationen erreicht und anschließend evaluiert. Als effizienteste Modifizierung erwies sich hierbei eine Additivierung mit Polyethylenglykol (PEG), welche deutlich verbesserte Hämkompatibilität, Langzeitstabilität, keine Zytotoxizität, gute Sterilisierbarkeit, Herstellbarkeit durch Extrusion und ausreichende Zugfestigkeit für die Anwendung als Katheter aufweist.

Abschließend wurde als Applikationsbeispiel ein implantierbares Portkathetersystem konstruiert und gefertigt. Zur Fertigung dieses Produkts kam das PEG-additivierte Silikonelastomer zum Einsatz, um die Hämkompatibilität des Katheters zu verbessern. Zusätzlich wurde ein mit Titandioxid beschichtetes Silikonelastomer aufgrund seiner verbesserten Zytokompatibilität als Werkstoff für den Port ausgewählt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie durch zielgerichtete Modifikationen Silikonelastomere hinsichtlich ihrer Biokompatibilität verbessert und für eine praxisnahe Anwendung optimiert werden konnten.

Abstract

The hemocompatibility of a biomaterial describes the desired interactions between its surface and blood. It is a primordial requirement for the development of medical products which are designed for long-term implantation that involve blood circulation, such as catheters, tubings for extracorporeal circulation, stents, heart valve prostheses and blood vessel prostheses.

In vitro assessment of the hemocompatibility of biomaterials is poorly standardized and generally the hemocompatibility of medical polymers is inadequately established. For this reason, a new test system was developed and validated, which enables the incubation of blood and blood fractions with polymers, under reproducible physiological conditions.

Medical grade silicone elastomers are particularly suitable for medical applications because of their thermal, chemical and biological stability. The new incubation system was used to investigate the hemocompatibility of silicone elastomer surfaces. It was shown that two surface properties play decisive roles; both hydrophobicity and roughness contribute to the attachment of blood components to the surface. A comparative analysis found that silicone elastomer is rather thrombogenic because of its strong hydrophobicity.

In order to improve its hemocompatibility, the surface of silicone elastomer should be designed to be smooth and hydrophilic. Roughness can be easily adjusted during processing. To enhance the hydrophilicity, several surface and bulk modifications were performed and validated. The best modification was obtained with a polyethylene-glycol (PEG) based additive, which presented the following properties: clearly improved hemocompatibility, long-term stability, non-cytotoxicity, sterilizability, processability by extrusion and sufficient mechanical properties for use as catheter.

Finally, a port/catheter-system was fabricated as an example of application. Several improved silicone elastomers were used in this product; the PEG-modified silicone elastomer was used for the catheter because of its good hemocompatibility, and a titanium dioxide coating was applied on the port made of silicone elastomer in order to improve its cytocompatibility. In conclusion, this practical application illustrated the use of goal-orientated modifications of silicone elastomers as a means to improve the biocompatibility of medical products.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation ist während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Medizintechnik mit der Unterstützung vieler Personen entstanden, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitgliedern der Prüfungskommission: Prof. Dr. Sonja Berensmeier und Prof. Dr. Christian Pylatiuk für die Begutachtung dieser Arbeit und Prof. Dr. Tim Lüth für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Erich Wintermantel. Als ehemaliger Lehrstuhlinhaber hat er mir dieses interdisziplinäre Promotionsprojekt anvertraut und mir ermöglicht, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen.

Für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Projektlaufzeit möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Christoph Briehn und Herrn Dr. Axel Bosh der Firma Wacker Chemie AG bedanken. Sie haben meine Arbeit mit zahlreichen Ratschlägen bereichert und dem Projekt eine industrielle Relevanz gegeben. Weiterer Dank gilt allen Projektbeteiligten, die zu dieser guten industriellen Kooperation über die Jahre beigetragen haben.

Mein Dank gilt besonders den studentischen und wissenschaftlichen Hilfskräften sowie auch den Studenten, die durch Bachelor-, Studien-, Master-, und Diplomarbeiten im Projekt mitgewirkt haben. Durch Eure Begeisterung, Hartnäckigkeit und Unterstützung bei der Durchführung von Versuchen habt Ihr die raschen Fortschritte im Projekt mit ermöglicht. Aus diesem Grund möchte ich mich bei Amelie, Ana, Andrea, Angelika, Anna, Ariane, Aurelie, Carmen, Cornelia, Dominik, Elena, Fabian, Franz, Gabriele, Jana, Julia, Karl, Katharina, Klaus, Laura, Laurin, Manuel, Marina, Martin, Matthias, Michaela, Paul, Sarah, Sebastian, Stefanie, Stephanie und Tilman herzlich bedanken.

Außerdem wäre die Durchführung der experimentellen Arbeiten ohne die zahlreichen Blutspenden nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund spreche ich hier allen Blutspendern meinen Dank aus.

Meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls gilt mein herzlicher Dank für die konstruktiven und fachlichen Diskussionen, insbesondere Frau Christin Rapp, Herrn Erhard Krampe und Frau Vera Seitz. Durch Eure Energie, Euren Teamgeist und Euer Engagement habt Ihr den Alltag zu einer sehr bereichernden Erfahrung gemacht.

Ich möchte ganz besonders Herr Marvin Kühn, M. Sc. und Frau Dr. Marina Kühn-Kauffeldt vom Institut für Plasmatechnik und Mathematik der Universität der Bundeswehr München für die spannende Zusammenarbeit, den intensiven Austausch von beschichteten Silikon-

proben und die bereichernden fachlichen Diskussionen bedanken. Für die Raman-Messung möchte ich Herr Sebastian Schwaminger, M. Sc. vom Fachgebiet für Selektive Trenntechnik und Frau Betiana Felice danken. Außerdem danke ich Herr Sepp Hintermair und Frau Susanne Schnell-Witteczek vom IMETUM für ihre Unterstützung für die Zellkultur und weitere analytischen Methoden. Mein Dank gilt auch Dr. Georg Mößmer vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum Rechts der Isar für die fachliche Beratung und den bereichernden Austausch zu Fragen der Hämostaseologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Marvin Kühn und Ulla Schneider für das fleißige und engagierte Korrigieren, sowie die Anregungen zur Gestaltung dieser Arbeit. Großer Dank auch an meine Freunde Angelika, Antonia, Christian, Christin, Corinne, Gwendolin, Marc, Markus, Max, Peter, Somashekar und Tino, die mich beim Korrekturlesen und der Rechtschreibprüfung großzügig unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich besonders bei Ilja Feldstein für die dauerhafte Unterstützung während den Jahren am Lehrstuhl, sowie die zahlreichen Ratschläge zu meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung bedanken.

Der größte Dank geht zuletzt an meine Familie und meine Freunde. Danke, dass Ihr mich während meines Studiums und meiner Promotion auf so vielfältige Weise immer unterstützt habt. Bei Euch konnte ich immer die nötige Ruhe finden und innerlich Kraft tanken.

Darmstadt, Januar 2018

Cécile Boudot

Studienarbeiten

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden am Lehrstuhl für Medizintechnik der TU München in den Jahren 2013 bis 2016 unter wesentlicher wissenschaftlicher, fachlicher und inhaltlicher Anleitung des Autors die im Folgenden aufgeführten studentischen Arbeiten, in welchen verschiedene Fragestellungen zu hämokompatiblen Silikonelastomeren, Analyse und Modifikation der Oberflächeneigenschaften eines implantierbaren Silikonkatheters untersucht wurden und deren Ergebnisse in Teilen in das vorliegende Dokument eingeflossen sind.

Boccoz, Ana (Masterarbeit) *Entwicklung, Konstruktion und Validierung eines dynamischen Prüfstands zur Bewertung der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren.*

Burkhardt, Sarah (Masterarbeit) *Modifizierung von Silikonem und deren Untersuchung hinsichtlich Langzeitstabilität, Benetzungsverhalten und Hämokompatibilität.*

Damnig, Michaela (Semesterarbeit) *Statistische Validierung eines dynamischen Hämokompatibilitätsprüfstandes und Evaluierung der Blutverträglichkeit von biomedizinischen Kunststoffen.*

Düregger, Katharina (Masterarbeit) *Untersuchung der Oberflächen induzierten Wechselwirkungen zwischen Silikon und Blut.*

Friedrich, Martin (Bachelorarbeit) *Proteinadsorption an modifizierten Silikonoberflächen.*

Hertle, Matthias (Semesterarbeit) *Plasmabehandlung und Funktionalisierung silikonelastomerer Oberflächen und deren Einfluss auf die Zytokompatibilität.*

Hertle, Matthias (Masterarbeit) *Chemische Modifizierungen von Silikonelastomer für den Einsatz als Implantatwerkstoff.*

Jodeit, Fabian (Semesterarbeit) *Hämokompatibilität mikrostrukturierter Kunststoffe.*

Kuhnla, Ariane (Semesterarbeit) *Untersuchung der Fluidodynamik an einem Prüfstand zur Hämokompatibilitätsprüfung und deren Einfluss auf die Thrombogenität von Materialien.*

Steger, Jana (Bachelorarbeit) *Konzeptentwicklung und Herstellung eines Portkatheters aus biokompatiblen Silikonelastomeren.*

Stückl, Marina (Masterarbeit) *Hydrophilie und Hämokompatibilität von beschichteten Silikonelastomeren.*

Wirths, Laura (Bachelorarbeit) *Vergleich von drei Analytikverfahren zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Werkstoffoberflächen und plasmatischer Blutgerinnung.*

Publikationsliste

Vollständige Liste der Publikationen aus Teilen der Dissertation, die vorveröffentlicht wurden:

Papers

Boudot, C., Briehn, C. (2017). Improvement of hemocompatibility of silicone elastomer using polyethylene-glycol based additive for application as catheter. *Processing and Fabrication Of Advanced Materials-XXV*, 87-95.

Boudot, C., Kühn, M., Kühn-Kauffeldt, M. & Schein, J. (2017). Vacuum arc plasma deposition of thin titanium dioxide films on silicone elastomer as a functional coating for medical applications. *Materials Science and Engineering: C.*, 74, 508–514.

Boudot, C., Burkhardt, S. & Haerst, M. (2016). Long-term stable modifications of silicone elastomer for improved hemocompatibility. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 2(1), 21-25.

Boudot, C., Boccoz, A., Düregger, K. & Kuhnla, A. (2016). A novel blood incubation system for the in-vitro assessment of interactions between platelets and biomaterial surfaces under dynamic flow conditions: The Hemocoater. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(10), 2430-2440.

Boudot, C., Recht, S., Eblenkamp, M., Haerst, M. & Wintermantel, E. (2015). Protein Adsorption and Adhesion of Blood Platelets on Silicone Rubber under Static and Dynamic Flow Conditions. In *6th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*, 541-544.

Talks

Boudot, C. (January 23th, 2017). Improvement of hemocompatibility of silicone elastomer using polyethylene-glycol based additive for application as catheter. *Processing and Fabrication Of Advanced Materials-XXV*, Auckland, New Zealand.

Boudot, C. (October 10th, 2014) Surface Functionalization of Silicone Rubber for Improved Cell Adhesion. *48th DGBMT Annual Conference*, Hannover, Germany.

Boudot, C. (September 11th, 2014). Protein Adsorption and Adhesion of Blood Platelets on Silicone Rubber under Static and Dynamic Flow Conditions. *6th European Conference of the IFMBE – MBEC 2014*, Dubrovnik, Croatia.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Medizinische und technische Grundlagen	4
2.1	Wechselwirkungen zwischen technischen Oberflächen und biologischen Systemen	4
2.1.1	Proteinadsorption	4
2.1.2	Blut-/Werkstoff-Wechselwirkungen	6
2.1.3	Zytokompatibilität und Gewebeintegration.....	10
2.2	<i>In vitro</i> Hämkompatibilitätsprüfung	11
2.2.1	Fehlende Standardisierung	11
2.2.2	Dynamische Inkubationssysteme	12
2.3	Silikonelastomere in der Medizintechnik	14
2.3.1	Grundlagen der Silikonchemie	14
2.3.2	Biologische Eigenschaften von medizinischen Silikonelastomeren	17
2.4	Modifizierungen von Silikon zur Verbesserung der biologischen Eigenschaften...	21
2.4.1	Herausforderung: Hydrophobe Relaxation der Silikonoberfläche	22
2.4.2	Hydrophilisierung von Silikon.....	23
2.4.3	Bioaktive Modifizierungen	27
3	Etablierung der Methodik zur Hämkompatibilitätsprüfung	30
3.1	Entwicklung eines neuen dynamischen Inkubationssystems	30
3.1.1	Anforderungen an das System	30
3.1.2	Konzept und Entwicklung.....	31
3.2	Hämodynamische Validierung	32
3.2.1	Charakterisierung der Strömung im Inkubationssystem.....	32
3.2.2	Ermittlung geeigneten Betriebspunkte.....	34
3.2.3	Erfüllung der Voraussetzungen des Hagen-Poiseuille-Gesetzes.....	36
3.3	Biologische Validierung.....	38
3.3.1	Beschreibung der Referenzproben	39
3.3.2	Auswahl der Analytik	41
3.3.3	Einfluss der Flussbedingungen auf die Hämkompatibilitätsprüfung	45
3.3.4	Bewertung der Hämkompatibilität der Referenzproben.....	48
3.4	Hämolytisches Potential des Inkubationssystems	51
4	Bewertung der Hämkompatibilität von Silikonelastomeren	55
4.1	Rolle der Oberflächeneigenschaften	55
4.2	Einfluss der Oberflächentopographie	56
4.2.1	Stand der Forschung und Strategie	57
4.2.2	Oberflächenstrukturierung	58

4.2.3	Hämokompatibilität	62
4.2.4	Diskussion: Relevanz der Einflussfaktoren	64
4.3	Einfluss der chemischen Zusammensetzung	66
4.3.1	Beschreibung der untersuchten Werkstoffe.....	66
4.3.2	Hämokompatibilität	68
4.3.3	Zytotoxizität.....	71
4.3.4	Diskussion: Hämokompatibilität von Silikonelastomeren.....	73
5	Verbesserung der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren	76
5.1	Hämokompatible Modifizierungen von Silikonelastomeren	76
5.1.1	Oberflächen- und Bulk-Modifizierungen	76
5.1.2	Hydrophilisierung und Langzeitstabilität	81
5.1.3	Hämokompatibilität	84
5.1.4	Zytotoxizität.....	87
5.1.5	Mechanische Eigenschaften	89
5.1.6	Fazit: Auswahl der besten Modifizierung.....	91
5.2	Optimierung des Werkstoffs	92
5.2.1	Anforderungen und Vorgehensweise	92
5.2.2	Hydrophilisierung	93
5.2.3	Hämokompatibilität	94
5.2.4	Zytotoxizität.....	95
5.2.5	Mechanische Eigenschaften	96
5.2.6	Mechanische Prüfung von Silikonschläuchen	97
5.3	Diskussion: Oberflächenchemie und Thrombogenität von Werkstoffen.....	100
5.3.1	Primäre Hämostase	100
5.3.2	Sekundäre Hämostase	101
5.3.3	Kompetitive Proteinadsorption und proteinabweisende Oberflächen.....	103
6	Entwicklung eines implantierbaren Langzeitkatheters	105
6.1	Konzept eines verbesserten Portkathetersystems	105
6.1.1	Funktionsprinzip und Stand der Technik.....	105
6.1.2	Klinische Komplikationen	106
6.1.3	Design- und werkstoffbasierte Lösungsansätze.....	108
6.2	Oberflächentitanisierung von Silikonelastomeren	110
6.2.1	Motivation und Stand der Forschung	110
6.2.2	Probenherstellung.....	111
6.2.3	Analyse der Titandioxidbeschichtung	113
6.2.4	Zytokompatibilität der Titandioxidbeschichtung.....	115
6.2.5	Diskussion: Zytokompatibilität von Titandioxid	118
6.3	Konstruktive Umsetzung.....	119

6.3.1	Modellierung, Dimensionierung und Werkstoffauswahl	119
6.3.2	Fertigung des Prototyps	122
7	Zusammenfassung	126
	Literaturverzeichnis	128
	Abkürzungen und Begriffserläuterungen	144
	Symbolverzeichnis	146
	Anhang	148
A	Review der Literatur: Dynamische Blutinkubationssysteme	148
B	Beschreibung der biologischen Versuchen	149
C	Prökerkörperherstellung und Vorbereitung	152
D	Liste der verwendeten Geräte, Werkstoffe und Chemikalien	154
E	Berechnungen zur Dimensionierung des Portkathetersystems	157
F	Konstruktionszeichnungen	159

1 Einleitung

Tausende unterschiedlicher Medizingeräte werden aus synthetischen Werkstoffen hergestellt und finden ihre Anwendung im Kontakt mit Blut, so wie beispielsweise extrakorporale Schläuche, Katheter, Gefäßprothesen, Stents, künstliche Herzklappen und Herzunterstützungssysteme. Jedes Jahr werden weltweit Millionen solcher kardiovaskulärer Implantate klinisch eingesetzt [229].

Kardiovaskuläre Implantate unterscheiden sich wesentlich von Implantaten in Knochen oder Weichgewebe und müssen spezifische Eigenschaften wie die Hämokompatibilität besitzen, die speziell auf den Blutkontakt ausgerichtet sind. Die Hämokompatibilität ist definiert als die Eigenschaft des Werkstoffs, im Blut seine Funktion zu erfüllen, ohne ungünstige Auswirkungen zu verursachen. In den meisten Fällen ist hierbei das Ziel der Non-Thrombogenität, d.h. durch den Kontakt mit dem Werkstoff wird keine Gerinnung des Bluts ausgelöst, zu gewährleisten [63, 252]. Die Bildung von Thromben in der Blutbahn kann für den Patient dramatische Auswirkungen zur Folge haben, wie z. B. Lungenembolien oder postthrombotisches Syndrom [17].

Trotz des weitverbreiteten, klinischen Einsatzes und einer großen medizintechnischen Industrie, die solche Systeme erforschen, entwickeln und produzieren, gibt es jedoch zahlreiche Beispiele, bei denen die Hämokompatibilität von vaskulären Implantaten in der Praxis nicht erreicht wird. So ist es bisher nicht gelungen, kleinelumige¹ Gefäßprothesen zu entwickeln, da es immer zu frühzeitigen Thrombosen kam [262, 229]. Außerdem treten bei Patienten mit Langzeitimplantaten häufig thrombogene Komplikationen auf [47, 136, 237, 68, 256, 228]. Aufgrund der zunehmenden Anzahl von klinischen Berichten, die *in vivo* Komplikationen bei solchen Implantaten beschreiben, stellt sich die Frage, ob die Werkstoff-Blut-Wechselwirkungen ausreichend untersucht sind und ob die verwendeten Werkstoffe effizienter optimiert werden können [34].

Die Schwierigkeit und Komplexität der *in vitro* Hämokompatibilitätsprüfung ist ein sehr bekanntes Problem, das seit Jahrzehnten in der Fachliteratur wiederholt behandelt wird [6, 228, 111, 229, 205]. Nach mehr als 60 Jahren intensiver Forschung konnte noch kein klarer Konsensus erzielt werden, um die gängigsten, medizinischen Werkstoffe als hämokompatibel oder non-hämokompatibel klassifizieren zu können [229, 251]. Verschiedene Gründe können dazu geführt haben: Die molekulardynamischen Vorgänge an der Blut-Werkstoff-Kontaktfläche sind vielfältig und sind heute trotz intensiver Forschung nur teilweise verstanden. Zusätzlich ist die Verwendung von Blut für *in vitro* Prüfungen besonders anspruchsvoll, da Blut ein lebendiges, auf externe Einflüsse extrem empfindlich reagierendes Fluid ist und nach der Entnahme aus dem Körper seine Eigenschaften schnell verliert [230]. Diese Bedingungen

¹Das Lumen bezeichnet den Innenraum des Gefäßes.

machen eine *in vitro* Prüfung sehr zeit- und kostenintensiv und benötigen außerdem eine umfangreiche Erfahrung innerhalb dieses Fachgebietes [34].

Silikonelastomere (im Folgenden auch als „Silikone“ bezeichnet) finden als Medizinprodukte im Kontakt mit Blut bereits eine verbreitete Anwendung, wie z. B. als Dialyse-Schläuche, Katheter, Ummantelung von Herzschrittmachern oder Beschichtungen von Kanülen [243]. Sie sind dank ihres hohen Reinheitsgrades, der exzellenten chemischen Stabilität und Sterilisierbarkeit sowie der Vielzahl an mechanischen Eigenschaften geeignete Werkstoffe [59, 84]. Aufgrund dieser guten Bulkeigenschaften wurden sie schließlich als Ausgangswerkstoff für diese Arbeit gewählt.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen mechanischen und chemischen Eigenschaften sind die Oberflächeneigenschaften und vor allem die Eigenschaft der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren nicht vollständig beschrieben. Silikonoberflächen weisen eine besonders starke Hydrophobie im Vergleich zu herkömmlichen Kunststoffen auf [211]. Diese Hydrophobie kann nach der Implantation zu einer unkontrollierten Proteinadsorption an der Oberfläche führen, welche zu unterschiedlichen Gerinnungsstörungen führen kann [258]. Die Literatur zur Hämokompatibilität von Silikonelastomeren ist jedoch widersprüchlich, da sie in unterschiedlichen Beiträgen entweder als hämokompatibel oder thrombogen bezeichnet werden [138, 44, 289, 205]. Das liegt zum Teil an der unzureichenden Vergleichbarkeit zwischen den Prüfmethode der verschiedenen Arbeitsgruppen und der fehlenden Standardisierung bei *in vitro* Hämokompatibilitätsprüfungen.

Aus dieser Situation kristallisieren sich zwei wesentliche Fragen heraus: Erstens, wie kann die Hämokompatibilität von Silikonelastomeren analytisch durch standardisierte *in vitro* Prüfmethode erfasst werden? Die Etablierung einer standardisierten Prüfmethode trägt wesentlich zu einer Klärung bei, ob Silikonelastomere abschließend als hämokompatibel betrachtet werden können und welche Oberflächeneigenschaften dabei eine Rolle spielen. Zweitens, falls sich Silikonelastomere schließlich als thrombogen erweisen sollten, stellt sich letztlich folgende Frage: Welche Werkstoffmodifizierungen könnten zur Verbesserung der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren zum Einsatz kommen? Diese müssen ihre Hämokompatibilität steigern, ohne dabei die vorteilhaften Bulkeigenschaften des Werkstoffs zu beeinträchtigen.

Für die Bearbeitung dieser Problematiken ist diese Arbeit in fünf Kapiteln aufgeteilt. Zuerst wird ein Überblick gegeben über die Wechselwirkungen zwischen Implantatoberflächen und biologischen Systemen, sowie die aktuellen Methoden zur *in vitro* Hämokompatibilitätsprüfung und die Eigenschaften bzw. chemischen Modifizierungen von Silikonelastomeren (Kapitel 2). Weil sich die fehlende Standardisierung der *in vitro* Hämokompatibilitätsprüfung als große Herausforderung herausgestellt hat, wird zunächst eine an der Prüfung von Elastomeren angepasste Analytik etabliert. Zu diesem Ziel wird ein dynamisches Inkubationssystem entwickelt und validiert (Kapitel 3). Dieses neue System ermöglicht folglich die genaue

Analyse der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren. Dabei werden folgende Aspekte in Betracht gezogen und ihre Relevanz bewertet: die chemische Zusammensetzung der Oberfläche, die Rauheit der Oberfläche, die Flussbedingungen an der Werkstoffoberfläche sowie die differenzierte Analyse der unterschiedlichen Gerinnungsprozesse (Kapitel 4). Wenn die relevanten Oberflächeneigenschaften identifiziert werden, können in der Folge Silikonelastomere chemisch optimiert werden, um eine verbesserte Hämokompatibilität zu erreichen. Diese Modifizierungen dürfen die vorher erwähnten guten Bulkigenschaften nicht beeinträchtigen und müssen die Anforderungen an den Einsatz im medizinischen Bereich erfüllen (Kapitel 5). Schließlich wird die technische Umsetzbarkeit der Modifizierungen anhand des Beispiels eines verbesserten Medizinprodukts – ein implantierbares Portkathetersystem – validiert. Neben der Hämokompatibilität ermöglicht dieses Anwendungsbeispiel die Einführung und Verbesserung einer weiteren Oberflächeneigenschaft von medizinischen Silikonelastomeren: die Zytokompatibilität (Kapitel 6).

2 Medizinische und technische Grundlagen

2.1 Wechselwirkungen zwischen technischen Oberflächen und biologischen Systemen

Biokompatibilität bezeichnet die Fähigkeit eines Werkstoffs, seine Funktion in einem bestimmten Implantationsort (Biofunktionalität) zu erfüllen, ohne unerwünschte Effekte zur Folge zu haben. Bei der näheren Betrachtung dieser Eigenschaft ergeben sich beliebig viele Variationen von Fallbeispielen, die sich durch die Kombination verschiedener Werkstoffe (z. B. Metalle, Polymere, Keramiken, Werkstoffe tierischen Ursprungs) und verschiedener biologischer Systeme (z. B. Knochen, Blut, Weichgewebe, Schleimhaut) ergeben können. Um die Biokompatibilität zu gewährleisten, müssen folglich die Oberflächeneigenschaften des implantierten Werkstoffs der biologischen Umgebung individuell angepasst werden.

In dieser Arbeit werden Polymere mit dem Schwerpunkt bei den Silikonelastomeren (im Folgenden auch als „Silikone“ bezeichnet) untersucht. Zwei biologische Systeme werden hier betrachtet: Blut und Weichgewebe. Ein in den Blutkreislauf eingebrachter Werkstoff wird als hämokompatibel bezeichnet, wenn er im Kontakt mit Blut keine Gerinnung auslöst. Diese Eigenschaft ist beispielsweise bei Stents, Katheter, Gefäßprothese, Herzklappe und Dialysehäufel von primärer Bedeutung. Mit der Hämokompatibilität einher geht die sogenannte Thrombogenität, welche die Thrombusbildung beschreibt. Die Kompatibilisierung von Werkstoffen innerhalb von Weichgeweben heißt Zytokompatibilität und ist oft ein wichtiger Parameter für die erfolgreiche Integration des Implantates im umliegenden Gewebe.

2.1.1 Proteinadsorption

Kommt ein Werkstoff mit einer biologischen Umgebung in Kontakt erfolgt innerhalb weniger Sekunden die spontane Adsorption einer dünnen Proteinschicht von ca. 1 - 10 nm auf der Werkstoffoberfläche [46]. Diese Proteinschicht startet spezifische Signaltransduktionswege, wie z. B. Thrombozytenadhäsion, Aktivierung der Koagulationskaskade oder Gewebeintegration [142]. Die biologischen Eigenschaften einer Implantatoberfläche sind direkt von der Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht abhängig. Die Untersuchung und das Verständnis der Adsorptionsmechanismen sind daher von wesentlicher Bedeutung für die Evaluierung der Biokompatibilität eines Implantates.

Die Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht hängt von zahlreichen Faktoren ab [226]:

- Die Konzentration und Art der Proteine in der umliegenden Flüssigkeit.
- Die Scherrate an der Werkstoffoberfläche.
- Temperatur.
- pH-Wert.

Zusätzlich spielen die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Werkstoffoberfläche eine zentrale Rolle. Jedes Protein wird vorzugsweise von Oberflächen angezogen, die spezifische Eigenschaften besitzen. Die Affinität zwischen Proteinen und Oberflächen wird u. a. durch Ladungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Polarität, Oberflächenspannung und Topographie bestimmt [226]. Die Benetzbarkeit der Oberfläche ist die Eigenschaft, die am meisten untersucht wurde. Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, gilt im Allgemeinen, dass hydrophobe Oberflächen eine höhere Affinität zu Proteinen besitzen [142]. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Benetzbarkeit von Kunststoffoberflächen und deren zentrale Rolle bei ihrer Hämokompatibilität (siehe Kapitel 5.3).

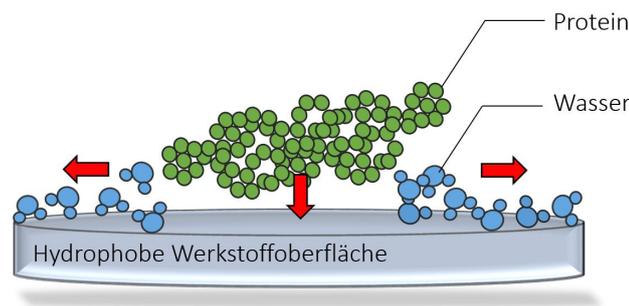


Abb. 2.1: **Prinzip der Proteinadsorption auf hydrophoben Oberflächen.** Die hydrophoben Bereiche von Proteinen können die beweglichen Wassermoleküle aus der Oberfläche von hydrophoben Werkstoffen verdrängen und sich über sog. hydrophobe Wechselwirkungen stabil verankern.

Ein weiterer Aspekt ist die zeitliche Veränderung der Zusammensetzung der Proteinschicht: Die Proteine mit der höchsten Mobilität in dem entsprechenden biologischen System werden zuerst auf der Oberfläche adsorbiert. Sie werden jedoch über die Zeit von den Proteinen mit der höchsten Affinität zur Oberfläche verdrängt¹[46]. Durch die Adsorption können außerdem Konformationsänderungen der Proteine auftreten, die zur Entfaltung funktioneller Bereiche führen kann. Orientierungsänderungen der adsorbierten Proteine sind auch möglich, wenn bestimmte Bereiche eine höhere Affinität mit der Oberfläche aufweisen [46, 226]. Diese zahlreichen möglichen Veränderungen in der Proteinschicht sind verantwortlich für die Komplexität und damit auch für die schwer vorhersehbaren biologischen Wechselwirkungen mit dem Implantat.

In dieser Arbeit stehen zwei Grenzflächen im Vordergrund: die Blut-/Werkstoff-Grenzfläche und die Gewebe/Werkstoff-Grenzfläche. Die physikalischen/biologischen/chemischen Prozesse an diesen Grenzflächen und die folgende biologische Antwort werden in den nächsten Absätzen genauer betrachtet.

¹sog. „Vroman-Effekt“.

2.1.2 Blut-/Werkstoff-Wechselwirkungen

Zusammensetzung von Blut und Fraktionierung

Blut ist eine komplexe Flüssigkeit, die im Körper zahlreiche Funktionen erfüllt. Aus diesem Grund wird es auch als „flüssiges Organ“ bezeichnet. Blut besteht zu ca. 45 % aus einem zellulären Anteil, der den Hämatokrit darstellt, und zu ca. 55 % aus einem flüssigen Anteil, dem Blutplasma.

Die hämoglobintragenden Erythrozyten sind bikonkave Zellen von ca. 7 μm Durchmesser und im Blut am häufigsten zu finden. Sie sind vor allem für den Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid zuständig. Thrombozyten sind ca. 2 μm kleine scheibenförmige Zellen, die die Gerinnungsprozesse unterstützen. Erythrozyten und Thrombozyten sind keine Zellen im klassischen Sinne, da sie keinen Zellkern besitzen und nicht teilungsfähig sind. Leukozyten sind ca.

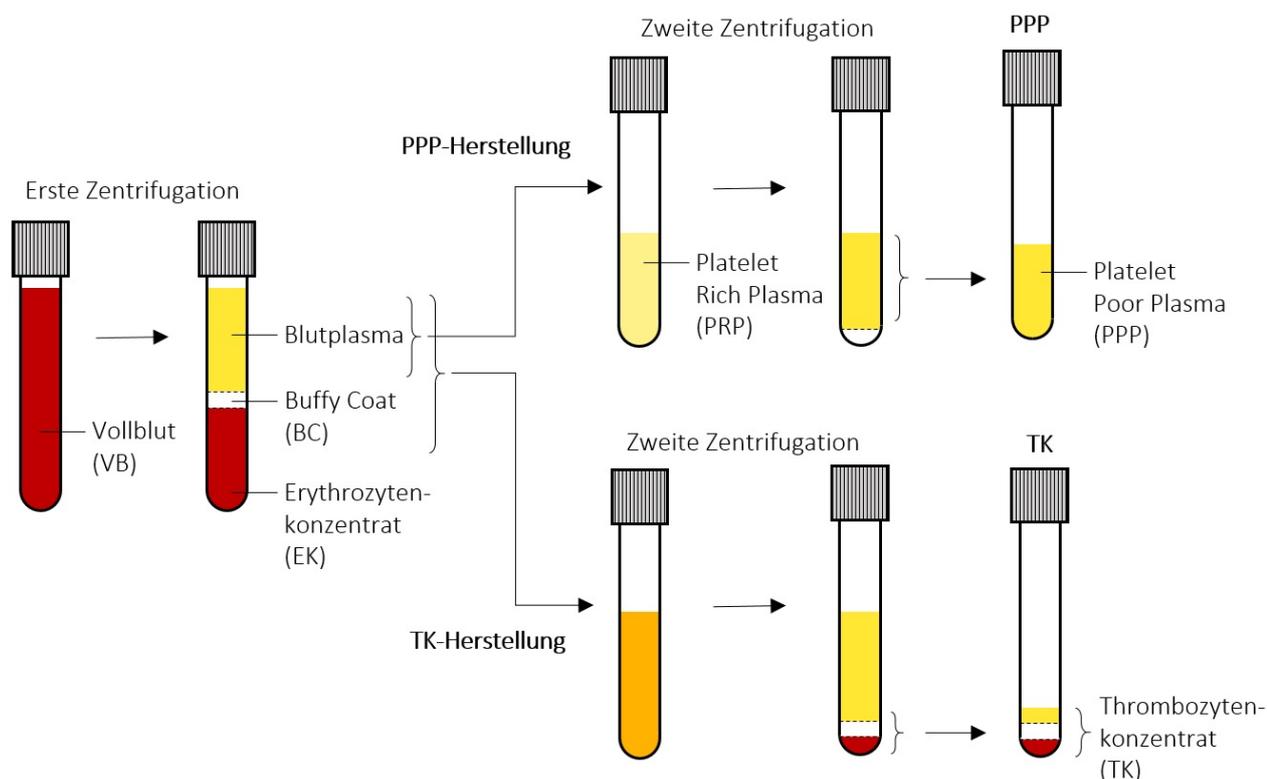


Abb. 2.2: Schematischer Ablauf der Herstellung von Thrombozytenkonzentrat (TK) und thrombozytenarmem Plasma (PPP). Vollblut (VB) wird durch einen ersten Zentrifugationsschritt in die drei Hauptphasen aufgetrennt: Unten lagert sich das Erythrozytenkonzentrat (EK) ab. In der Mitte liegt eine weiße dünne Schicht, die Thrombozyten und Leukozyten enthält, der Buffy Coat (BC). Über dem BC befindet sich das Blutplasma. Für die Herstellung vom PPP wird das thrombozytenreiche Blutplasma (PRP) wieder zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation trennen sich die restlichen Thrombozyten von dem überstehenden PPP. Für die Herstellung vom TK wird nach der ersten Zentrifugation das thrombozytenreiche Blutplasma zusammen mit dem BC einem zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen. Der Überstand wird entfernt und das TK bleibt letztendlich im Röhrchen übrig.

5 μm runde Zellen, die zur Immunabwehr gehören. Das Blutplasma besteht größtenteils aus Wasser und zusätzliche Bestandteile sind u. a. Elektrolyten, Proteinen, Stoffwechselprodukte, Hormonen, Glukose und Lipiden. Es erfüllt diverse Funktionen wie den Transport von Stoffen im Körper oder die Unterstützung der Blutgerinnung. Die für die Blutgerinnung verantwortlichen Plasmaproteine werden auch Gerinnungsfaktoren genannt. Blutplasma kann von den Gerinnungsfaktoren getrennt werden: In diesem Fall spricht man von Blutserum [252].

In vitro lassen sich die Hauptbestandteile des Bluts durch Zentrifugation abtrennen [40]. In dieser Arbeit wird vor allem thrombozytenarmes Blutplasma und Thrombozytenkonzentrat für unterschiedliche Untersuchungszwecke verwendet. Der schematische Ablauf der Gewinnung dieser Blutfraktionen ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die zellulären und Plasma-Anteile des Bluts spielen beide eine essenzielle Rolle für den Blutgerinnungsprozess. Zwei interagierende Vorgänge lassen sich dabei unterscheiden: die zelluläre (primäre) Hämostase und die plasmatische (sekundäre) Hämostase [176].

Primäre (zelluläre) Hämostase

Die Hauptfunktion der Thrombozyten ist das schnelle Verschließen von Verletzungen in der Gefäßwand. Sie reagieren also auf den Kontakt mit beschädigtem Endothel und aggregieren an der entsprechenden Stelle. Thrombozyten besitzen auf ihrer Oberfläche zahlreiche Rezeptoren, die sich an spezifische Proteine des subendothelialen Gewebes binden können [96]. Im Fall der Implantation eines Werkstoffs im Körper werden Proteine adsorbiert, die als Antagonist für die Rezeptoren der Thrombozyten wirken und ihre Aktivierung auslösen. Der Adhäsionsmechanismus ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

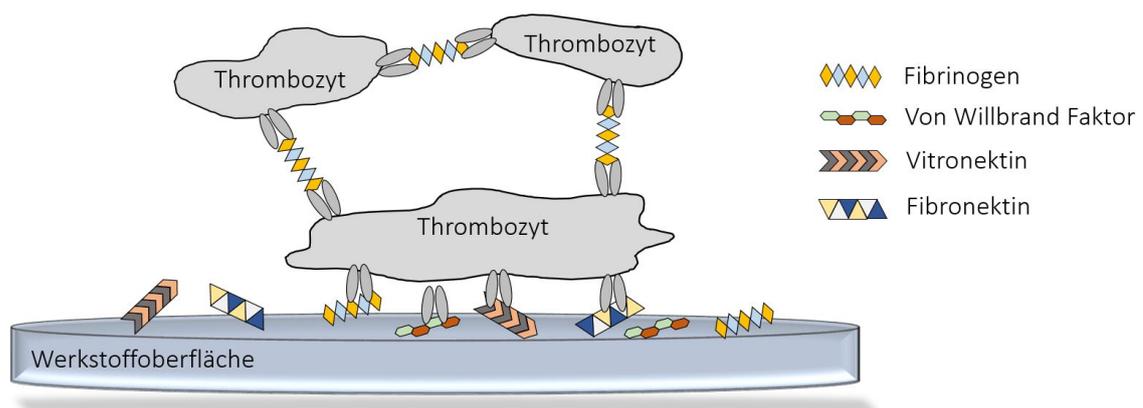


Abb. 2.3: **Prinzip der Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf Fremdoberflächen.** Verschiedene Proteine aus dem Blutplasma tragen zu der Thrombozytenaktivierung und -aggregation bei: Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin und von-Willebrand-Faktor (vWF) [315]. Sie werden auf der Oberfläche adsorbiert und dienen als Anker für die Thrombozyten. Die Bildung von Thrombozytenaggregaten erfolgt dann über Fibrinogenbrücken.

Es wurde gezeigt, dass Fibrinogen als wichtigster Vermittler der Thrombozytenadhäsion wirkt und, dass die anderen beteiligten Proteine (Fibronektin, Vitronektin und der von-Willebrand-

Faktor) nur eine unterstützende Rolle bei der Thrombozytenaktivierung spielen [286]. Neben der Menge des adsorbierten Fibrinogens auf der Oberfläche hängt jedoch das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion vor allem von der räumlichen Anordnung des Fibrinogens, die sog. Konformation, ab: Durch die Adsorption des Proteins findet eine Konformationsänderung statt, wodurch eine spezifische Bindungsstelle freigelegt wird [310]. In einer Studie untersuchten Sivaraman und Latour den Zusammenhang zwischen Fibrinogenadsorption und Thrombozytenadhäsion mit Hilfe von selbstorganisierenden Monoschichten (SAMs, engl. self-assembled monolayers) [258]. Sie konnten zeigen, dass Oberflächen, die aus CH_3 -Gruppen bestehen, eine vergleichsweise starke Konformationsänderung des Fibrinogens verursachen. Außerdem korrelieren diese Werte mit der Menge von adhärenen Thrombozyten [258].

Nach dem ersten Kontakt mit der Fremdoberfläche werden die Thrombozyten aktiviert und ihre Morphologie verändert sich. Die Adhäsion wird zuerst durch die Veränderung des Zytoskeletts und die Bildung von Pseudopodien verstärkt. Im fortgeschrittenen Adhäsionszustand breiten sich die Thrombozyten extrem aus und werden möglichst flach, um die Kontaktfläche zur Oberfläche zu maximieren: Dieser Zustand wird als „Fully Spread“ bezeichnet [245, 161]. Auf den rasterelektronmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 2.4 sind Thrombozyten mit verschiedenen Aktivierungszuständen zu sehen. Die Beobachtung der Morphologie der auf einer Fremdoberfläche adhärenen Thrombozyten ist eine verbreitete Methode, um den Grad der Thrombogenität des Werkstoffs zu untersuchen. Beim Adhäsionsvorgang, während dessen die Thrombozyten vollständig aktiviert sind, setzen sie zahlreiche Stoffe frei, welche die Koagulationskaskade verstärken und weitere Thrombozyten rekrutieren. Zusätzlich entstehen Wachstumsfaktoren, die eine schnelle Regeneration der Gefäßverletzung gewährleisten [161]. Nach der Adhäsion und Aktivierung folgt die Aggregation von mehreren Thrombozyten in Form eines stabilen Thrombozytenaggregates.

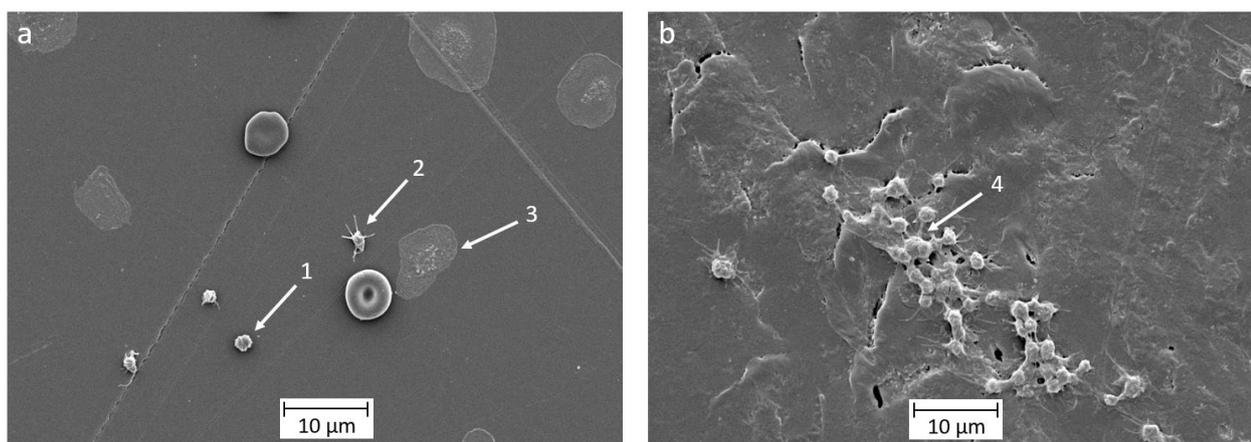


Abb. 2.4: **Aktivierungszustand von Thrombozyten auf Oberflächen.** Die Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerung $\times 2000$) zeigen Thrombozyten auf (a) plasma-behandeltem Polystyrol und (b) Polypropylen. 1: scheibenförmiges Thrombozyt, 2: aktiviertes Thrombozyt mit Pseudopodien, 3: Thrombozyt im „Fully Spread“ Zustand, 4: Thrombozytenaggregat.

Sekundäre (plasmatische) Hämostase

Neben der Thrombozytenadhäsion und -aggregation spielen Gerinnungsfaktoren eine wesentliche Rolle für die Entstehung eines Thrombus. Die Gerinnungskaskade bezeichnet die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, die wiederum ein Maschenwerk aus polymerisiertem Fibrin entstehen lassen. Es bildet sich ein gelartiger Fibrinklumpen, wie in Abbildung 2.5 exemplarisch zu sehen ist.



Abb. 2.5: **Fibrinklumpen aus PPP.** Das thrombozytenfreie Blutplasma (PPP) kann durch die Aktivierung der Koagulationskaskade gerinnen und die Entstehung eines polymerisierten Fibrinnetzwerkes zur Folge haben.

Die Aufgabe des Fibrinnetzwerkes ist die Stabilisierung des Thrombus, bestehend aus aggregierten Thrombozyten und darin enthaltenen Erythrozyten, wie in Abbildung 2.6 zu sehen. Der detaillierte Vorgang der Koagulationskaskade ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

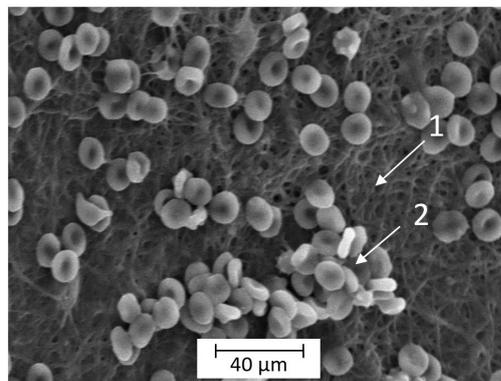


Abb. 2.6: **Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines festen Thrombus aus Vollblut.** Ein Thrombus besteht aus polymerisierten Fibrinfäden (1) und zahlreichen Blutzellen (2), die in dem stabilen Fibrinnetzwerk gefangen sind.

Der Mechanismus der Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII nach Kontakt mit einer Fremdoberfläche ist trotz intensiver Forschung noch nicht völlig verstanden und in der Fachliteratur umstritten [294]. Jedoch ist insbesondere die durch negativ geladene Oberflächen ausgelöste Kontaktaktivierung bereits nachgewiesen worden [231, 230, 96]. Es wird auch vermutet, dass die Adsorption auf der Fremdoberfläche eine Konformationsänderung des Gerinnungsfaktors XII verursacht, die im Aktivierungsmechanismus mitwirkt [263]. Zugleich verstärken

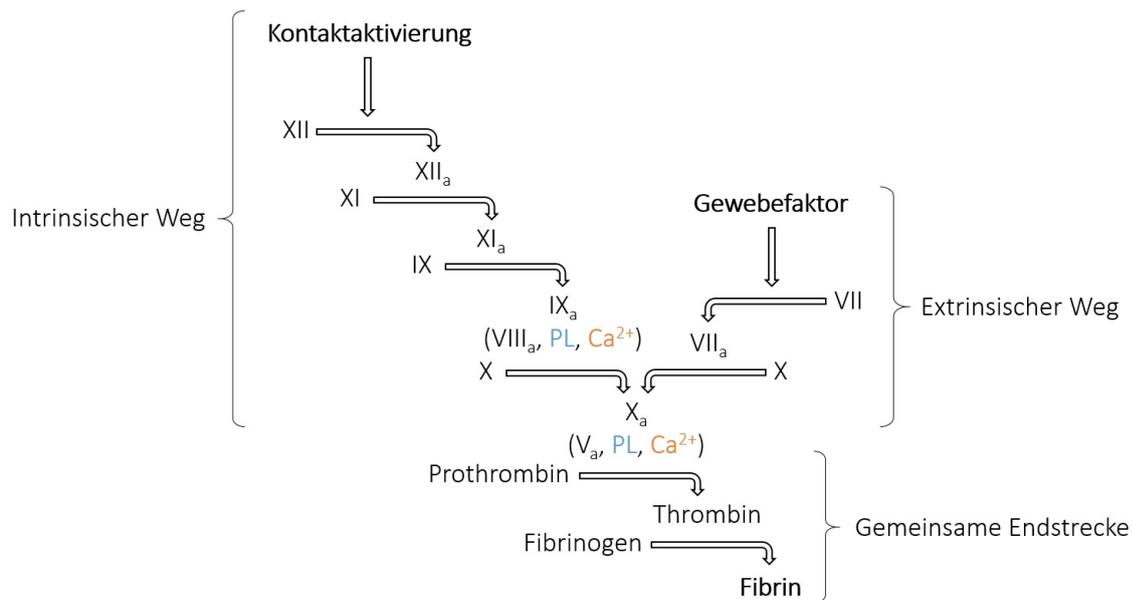


Abb. 2.7: **Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade.** Der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade bezeichnet den Vorgang, der durch die Freisetzung von Gewebefaktor aus dem sub-endothelialen Gewebe auftritt (z. B. durch eine Verletzung). Der Kontakt einer Fremdoberfläche (Kontaktaktivierung) löst wiederum den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade aus. In beiden Fällen werden die Gerinnungsfaktoren (hier nummeriert in römischen Zahlen) aktiviert und katalysieren die Aktivierung des nächsten Gerinnungsfaktors in der Kaskade. Beide Aktivierungswege führen zur Umwandlung von Prothrombin in Thrombin, das Schlüsselenzym der Koagulation. Thrombin polymerisiert das im Blut stark konzentrierte Fibrinogen in der Form eines stabilen Fibrinklumpens. Die Wechselwirkung zwischen der zellulären und plasmatischen Hämostase wird durch die Anwesenheit von Phospholipiden (PL) erkennbar. Phospholipiden befinden sich auf der Thrombozytenoberfläche und katalysieren die Fortsetzung der Gerinnungskaskade.

weitere Proteinen - Prekallikrein und HMWK (engl. high molecular weight kininogen) - die Kontaktaktivierung. Wenn diese Proteine ebenfalls auf der Oberfläche adsorbiert werden, interagieren sie mit dem Gerinnungsfaktor XII, wodurch Prekallikrein in Kallikrein gespalten wird und Gerinnungsfaktor XII wechselseitig aktiviert wird [231].

2.1.3 Zytokompatibilität und Gewebeintegration

Gewebezellen besitzen auf ihrer Oberfläche zahlreiche Membranrezeptoren (sog. Integrine), die sich an andere Zellen und Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) binden können. Die daran beteiligten Proteine sind bereits nachgewiesen. Darunter sind Kollagen, Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin und Laminin die bedeutendsten [106]. Sie beinhalten unter anderem spezifische Peptidsequenzen, die als Ankerpunkte für adhärente Gewebezellen erkannt werden und die Zelladhäsion ermöglichen. Am weitesten untersucht ist die sog. RGB-Sequenz¹ [106].

Diese automatisch, unter physiologischen Bedingungen ablaufenden Mechanismen sind im

¹RGB steht für die Sequenz der drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure

Fall der Implantation eines Werkstoffs gestört, da die Rezeptoren der Zellmembrane einer Fremdoberfläche gegenüber liegen. In dieser Situation folgt an der Kontaktfläche zwischen dem Werkstoff und dem Körper eine Kaskade von Entzündungsreaktionen, bekannt als Fremdkörperreaktion (oft engl. „foreign body reaction (FBR)“). Am Ende dieses Prozesses wird das Implantat vom Körper in einer Tasche isoliert, die sog. fibröse Kapsel¹ [284].

Die biologischen Prozesse, die nach der Implantation des Werkstoffs im Weichgewebe auftreten, sind noch nicht vollständig verstanden [279]. Verschiedene Arbeitsgruppen forschen allerdings an einer weiteren Hypothese, dass die Entzündungsreaktionen von der Zusammensetzung und dem Grad der Denaturierung der adsorbierten Proteinschicht gesteuert werden [60, 4, 142]. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben kann die ursprüngliche Struktur der Proteine durch Adsorption verformt werden. Nach der Konformationsänderung werden Bereiche der Proteine freigelegt, die normalerweise nicht zugänglich sind. Sie dienen als Rezeptoren für Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und Foreign Body Giant Cells (FBGC), die eine Fremdkörperreaktion auslösen [62, 60].

Als Konsequenz lassen sich die optimalen Oberflächeneigenschaften eines Implantats ableiten: um eine reduzierte Fremdkörperreaktion zu erzielen, müssen Proteine während des Adsorptionsvorgangs möglichst ihre Struktur behalten. Auf diese Weise sollen Bindegewebezellen mit dem Werkstoff interagieren und auf der Oberfläche adhäreren: Eine solche Oberfläche kann so als zytokompatibel bezeichnet werden.

2.2 *In vitro* Hämkompatibilitätsprüfung

Dieses Kapitel stellt einen kurzen Überblick über den Stand der Technik von *in vitro* Methoden und Geräten, die für die Untersuchung der Hämkompatibilität von Werkstoffen verwendet werden, dar. Der Schwerpunkt wird hierbei auf die aktuellen methodischen Herausforderungen gelegt.

2.2.1 Fehlende Standardisierung

Die mangelhafte Standardisierung der Hämkompatibilitätsprüfung ist eine bekannte Fragestellung, die ursprünglich 1993 von BD Ratner unter dem Begriff „blood catastrophe“ eingeführt und seitdem intensiv erforscht wurde [228, 229, 251]. Die wichtigsten Aspekte der bisherigen Forschungsergebnisse sind in der folgenden Auflistung dargestellt:

- **Werkstoffe:** Weder Kontroll- noch Referenzwerkstoffe konnten sich etablieren [34]. In der Praxis finden heutzutage die verschiedensten Werkstoffe Anwendung. Darunter sind am häufigsten Polyethylen (PE) und Polyvinylchlorid (PVC) als Negativkontrolle und Silikon

¹Auch „Einkapselung des Implantates“ genannt.

und Latex als Positivkontrolle zu finden [205].

- **Versuchsbedingungen:** Obwohl die Verwendung humanen Bluts etabliert ist, fehlt eine Einigung über die Antikoagulanzen, die für die *in vitro* Prüfung zugesetzt werden sollen [34]. Die maximale Versuchsdauer nach Blutabnahme wird überwiegend auf 4 Stunden festgelegt, um Alterungseffekte im Blut so gering wie möglich zu halten [71]. Manche Autoren empfehlen sogar eine Inkubationsdauer mit dem Werkstoff von maximal 2 Stunden [251].
- **Inkubationssysteme:** Es existieren sowohl statische als auch dynamische Inkubationssysteme [251]. Die internationale Norm DIN ISO 10993-4 sieht die Anwendung dynamischer Inkubationssysteme vor, schließt aber eine statische Prüfung nicht aus [71]. Statische Systeme werden in der Literatur häufig sowohl für die Untersuchung der zellulären Gerinnung [267, 287, 171, 114, 323] als auch für die Prüfung der plasmatischen Gerinnung [197, 241, 307, 236, 300] verwendet.

Aufgrund dieses Mangels an etablierten Standards und fehlender Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen und Institutionen war es bisher nicht möglich, absolute Bewertungskriterien zu definieren, die die verwendeten Werkstoffe in ihrer Hämokompatibilität klassifizieren [138, 205]. Dies stellt daher die größte Herausforderung der *in vitro* Hämokompatibilitätsprüfung dar. In dieser Arbeit werden differenzierte Prüfungen der primären und sekundären Hämostase als Standarduntersuchungen gewählt. Je nach Anwendungsgebiet wird der Blut-/Werkstoff-Kontakt unter statischen oder dynamischen Bedingungen durchgeführt. Die Bewertung der Hämokompatibilität von Werkstoffen erfolgt durch eine komparative Untersuchung mit ausgewählten Referenzproben.

2.2.2 Dynamische Inkubationssysteme

Die Art des Blut-/Werkstoff-Kontaktes ist von wesentlicher Bedeutung und muss unter kontrollierten Bedingungen erfolgen, da Scherkräfte die Gerinnungsvorgänge beeinflussen können [230, 205]. Zahlreiche dynamische Testsysteme wurden entwickelt, um den physiologischen Blutfluss an der Werkstoffoberfläche zu simulieren. Unter diesen Systemen konnte sich bisher kein Standard durchsetzen, obwohl „Chandler Loop“-Vorrichtungen häufiger in der Forschung und in Prüfinstituten Anwendung finden [196, 257, 193, 30]. Dieses System wurde erstmals 1958 von A.B. Chandler als Verfahren für die *in vitro* Erzeugung eines Thrombus beschrieben [49] und hinterher für die Hämokompatibilitätsprüfung von Werkstoffen angepasst. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 2.8 dargestellt.

Bei „Chandler Loop“-Vorrichtungen liegen die zu testenden Werkstoffe in der Form von Schläuchen vor, sodass Modifizierungen der Werkstoffoberfläche auf der Innenseite des Schlauches, wie z. B. Beschichtungen oder Strukturierung, begrenzt realisierbar sind. Ebenso ist die Anwendung von Werkstoffen, die nicht als Schlauch herstellbar sind, ausgeschlossen. Die

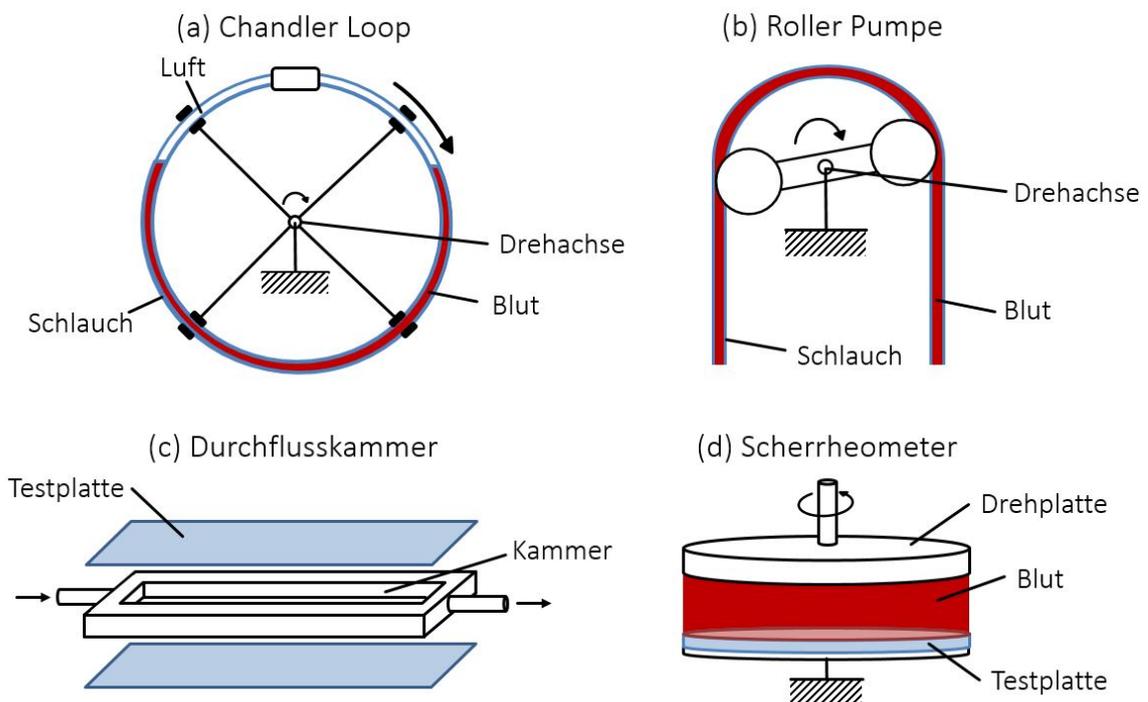


Abb. 2.8: Schematischer Überblick über die am häufigsten eingesetzten dynamischen Inkubationssysteme zur Prüfung der Hämokompatibilität von Werkstoffen. „Chandler Loops“ (a) bestehen aus Schläuchen, die mit Blut befüllt und rotiert werden, sodass eine kontinuierliche Relativgeschwindigkeit zwischen Blut und Werkstoffoberfläche entsteht. Für „Roller Pumpen“ (b) wird hingegen das Blut durch Schläuche mit einer Verdrängerpumpe angetrieben. Nach einem ähnlichen Prinzip wird im Fall der „Durchflussskammer“ (c) das Blut nicht mehr durch Schläuche, sondern zwischen parallele Testplatten gepumpt. Klassische „Scherrheometer“ (d) können ebenso mit Blut befüllt und für die Prüfung an Plattenoberflächen angewendet werden.

Schlauch-Geometrie erschwert insbesondere den Zugang zur Testoberfläche und die quantitative Analyse der Adhäsion von Blutbestandteilen nach dem Versuch. Infolgedessen werden in den meisten Studien unterschiedliche Blutparameter im zirkulierenden Blut analysiert oder die Testoberfläche mit Rasterelektronmikroskopie qualitativ untersucht [207, 193, 257, 200]. Eine weitere Einschränkung von Schlauch-Systemen liegt in der Herstellung der Schläuche mit einem reproduzierbaren spezifischen Innendurchmesser, wodurch das Verhältnis vom Blutvolumen zur Werkstoffoberfläche variieren kann. In einer Studie von Stefton *et al.* wird von Abweichungen von bis zu 5 % berichtet [248]. Neben den geometrisch bedingten Einschränkungen gibt es insbesondere bei „Chandler Loops“ eine periodische Abwechslung der Grenzfläche Luft/Blut an der Werkstoffoberfläche. Kleine Luftpinschlüsse könnten an der Blut-/Werkstoff-Kontaktfläche entstehen und die adsorbierten Proteine und adhärenierten Zellen ablösen [311, 93] oder die Gerinnung beeinflussen [140].

Zirkulationsschleifen, die an Roller-Pumpen angeschlossen sind, weisen ähnliche Begrenzungen auf [207, 144, 200]. Zusätzlich entstehen wegen der Pumpe mechanische Beschädigungen der Blutbestandteile, sodass die Sensitivität der Prüfung beeinflusst werden könn-

te [264, 74]. Um den genannten Nachteilen von Schlauchsystemen zu entkommen, wurden planare Durchflusskammer-Vorrichtungen entwickelt [271, 209]. Jedoch werden auch hier Roller-Pumpen an den Durchflusskammern angeschlossen, um den notwendigen Blutfluss zu gewährleisten. Neben potenziellen Blutschädigungen verursacht der Anschluss der Pumpe eine Vergrößerung der störenden Kontaktflächen durch Elemente, die nicht der Prüfung unterliegen, wie beispielsweise das Material der Pumpenschläuche oder der Pumpe selbst. Diese Einschränkung findet sich ebenfalls bei der Verwendung von Scherrheometern wieder, weil weniger als die Hälfte der Kontaktfläche aus dem Testwerkstoff besteht [240, 3, 151]. Schließlich ist der Hauptnachteil von Durchflusskammern und Scherrheometern die Schwierigkeit, mehrere Proben (wie z. B. Kontrollproben und Replikate der zu testenden Prüfwerkstoffe) unter identischen Versuchsbedingungen im gleichen Prüfsystem analysieren zu können, sodass die Versuchsbedingungen einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Prüfung haben. Eine komparative Liste der in der Literatur beschriebenen Inkubationssysteme und ausführliche Details über die experimentellen Einrichtungen befindet sich im Anhang A.

2.3 Silikonelastomere in der Medizintechnik

Bereits seit Jahrzehnten finden Silikonelastomere Anwendung in der Medizintechnik. Sie werden sowohl für extrakorporale Anwendungen, wie beispielsweise Wundauflagen, Atemmasken und Handprothesen, als auch als Implantat, wie beispielsweise Herzschrittmacherhüllen, Katheter, Implantate für plastische und rekonstruktive Chirurgie, eingesetzt [243]. Silikonelastomere gelten als biokompatibel [211]. Allerdings sind die molekularen Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe nicht eindeutig charakterisiert. In diesem Kapitel werden zunächst die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Werkstoffs vorgestellt und die biologischen Wechselwirkungen mit dem Körper, die aus deren Oberflächeneigenschaften entstehen, angesprochen. Anschließend wird ein Überblick über den Stand der Forschung in Bezug auf Modifizierungen von Silikonelastomeren, die eine Verbesserung der Biokompatibilität zum Ziel haben, gegeben.

2.3.1 Grundlagen der Silikonchemie

Polymerstruktur und Zusammensetzung

Unter den synthetischen Kunststoffen zeichnen sich Silikonelastomere durch ihre besondere chemische Struktur aus. Im Gegensatz zu den anderen Polymeren enthalten Silikone keine Kohlenstoffatome im Grundgerüst, sondern bestehen aus einer anorganischen Hauptkette aus alternierenden Silizium- und Sauerstoffatomen. Bei den meisten verfügbaren Silikonen und besonders bei den medizinischen Silikonen bestehen die organischen Seitengruppen aus Methylgruppen, wie in Abbildung 2.9 dargestellt ist. Diese Silikone werden Polydimethylsiloxane (PDMS) genannt [243]. In wenigen Anwendungsfällen können die Seitengruppen aus Wasser-

stoff, Methyl-, Vinyl-, Phenyl- oder Fluoralkylgruppen bestehen [211]. Silikonelastomere sind 3-dimensional vernetzte Polysiloxanketten mit einem Polymerisationsgrad¹ zwischen 100 und 10 000 [211].

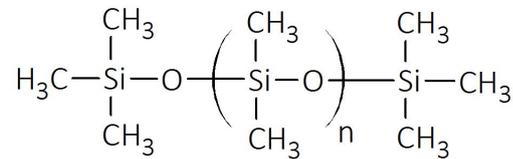


Abb. 2.9: **Strukturformel von Polydimethylsiloxane.** An das anorganische Si-O-Si Grundgerüst werden organischen Methylgruppe gebunden.

Die Vernetzung des reinen Polymers ergibt ein Elastomernetzwerk, dessen mechanische Eigenschaften ohne Füllstoffverstärkung ungenügend für technische Anwendungen sind [211]. Für den Einsatz in der Medizintechnik wird pyrogene Kieselsäure aufgrund ihrer hervorragenden Verstärkungswirkung und ihres hohen Reinheitsgrad bevorzugt [180, 35]. Pyrogene Kieselsäure besteht aus feinteiligen SiO₂ (Siliziumdioxid)-Partikeln, die sich in Form von größeren Aggregaten von ca. 70 bis 200 nm verbinden [58]. Diese Kieselsäure weist eine sehr große Oberfläche auf und die zahlreichen SiOH-Gruppen an der Oberfläche beschaffen der Kieselsäure eine hohe Oberflächenenergie und ein stark hydrophiles Verhalten. Sie binden an die Sauerstoffatome der Polymerketten über Wasserstoffbrücken und sind für die mechanische Stabilität der Silikonmasse verantwortlich [58]. Zusätzlich können weitere Zusatzstoffe wie Farbpigmente, Ruße für die elektrische Leitfähigkeit, Verarbeitungshilfsstoffe bei hohen Füllstoffanteilen der Silikonmasse oder Bariumsulfat-Pigmenten für den Röntgenkontrast in Silikonelastomeren eingesetzt werden [162, 180, 59].

Silikonelastomertypen und Vernetzungssysteme

Silikonelastomere werden als Ein- oder Zweikomponentensysteme in Form einer unvernetzten Polymermasse vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Die Mischung der Komponenten, Formgebung und anschließende Vulkanisation² des Silikons erfolgen ggf. beim Verarbeiter. Je nach Eigenschaften im unvernetzten Zustand und Verarbeitungsart untergliedern sich Silikonelastomere in drei Produktklassen [110]:

- Festsilikonelastomere (HTV) liegen im fest-pastösen Zustand vor und werden durch Formpressen, Extrusion oder Spritzguss verarbeitet. Sie besitzen einen Polymerisationsgrad von 5 000 bis 10 000 und einen hohen Anteil (bis zu 45 % der Masse) an Füllstoffen [211]. HTV-Silikone nehmen 76 % des Weltmarkts von Silikonelastomeren ein³.
- Flüssigsilikonelastomere (LSR) sind pumpbare Massen und werden spritzgegossen. Im Ver-

¹Anzahl von Monomereinheiten der Polymerkette.

²Vulkanisation bezeichnet ein Verfahren, mit Hilfe dessen zwischen den Makromolekülen kovalente Vernetzungen ausgebildet werden.

³Zahlen von 2010, aus [297].

gleich zu HTV-Silikonem besitzen sie einen niedrigen Polymerisationsgrad von 600 bis 1 800 und einen geringeren Füllstoffgehalt (ca. 30 % der Masse) [211]. Ihr Anteil innerhalb am Silikonmarkt beträgt 11 %³.

- Raumtemperaturvernetzende Silikonelastomere (RTV) sind weich-pastöse bis gießbare Massen. Ihre Verarbeitung erfolgt ohne Druck und Wärmezufuhr beispielsweise durch Gießen oder Tauchen. Aufgrund des niedrigen Anteils von Füllstoffen (ca. 22 % der Masse) besitzen RTV-Silikonem vergleichsweise schwächere Festigkeitskennwerte [211]. Ihr Marktanteil beträgt 13 %³.

Neben der Einteilung der Silikonem nach den Eigenschaften der Polymermasse vor der Vulkanisation werden außerdem die eingesetzten Vernetzungssysteme in der Praxis berücksichtigt. Obwohl zahlreiche Vernetzungssysteme existieren, haben vor allem drei Verfahren kommerzielle Bedeutung [280]:

- Die peroxid-induzierte radikalische Vernetzung erfolgt bei erhöhter Temperatur (über 370 K), sodass die unvernetzte Silikonmasse als Einkomponentensystem geliefert werden kann, ohne dass es zu vorzeitiger Vulkanisation kommt. Sie wird ausschließlich für die Vulkanisation von HTV-Silikonem eingesetzt [211]. Jedoch produziert diese Vulkanisationsart Vernetzer-spaltprodukte, die für den Einsatz in der Medizintechnik toxikologische Auswirkungen haben können und eine zusätzliche Temperung des Silikonem notwendig machen [214].
- Die Platin (Pt) katalysierte Additionsvernetzung läuft spontan bei Raumtemperatur ab und wird durch Wärmezufuhr beschleunigt. Aus diesem Grund wird in der Regel die unvernetzte Silikonmasse als zweikomponentiges System (getrennter Platin-Katalysator und Vernetzer) bereitgestellt und wird kurz vor der Formgebung zusammengemischt [211]. Diese Vernetzungsart findet in HTV-, LSR- und RTV-Silikonem Anwendung und wird in der Medizintechnik aufgrund der Abwesenheit von Spaltprodukten bevorzugt [162, 35]. Die sehr niedrige Konzentration des Pt-Katalysators (wenige ppm), die für die Vernetzung notwendig ist, ermöglicht einen Einsatz im medizinischen Bereich [280].
- Die Kondensationsvernetzung erfolgt durch Zufuhr von Feuchtigkeit und findet Anwendung als Ein- oder Zweikomponentensysteme in RTV-Silikonem [211]. Medizinische Silikonklebstoffe werden häufig durch Kondensationsvernetzung gehärtet [59].

Chemische und physikalische Eigenschaften

Silikonelastomere besitzen eine außergewöhnliche Kombination von organischen und anorganischen Eigenschaften. Sie bestehen ausschließlich aus Si-, O-, C- und H-Atomen und die Hauptkomponenten - Füllstoff und Polymer - weisen eine bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit auf [297]. Im Vergleich zu den klassischen organischen Polymeren zeichnet sich das Grundgerüst des Silikonem durch seine hohe zwischenatomare Bindungsenergie, lange zwische-

atomare Abstände und offene Winkelvalenz aus (siehe Tabelle 2.1) [180]. Außerdem sind die intermolekularen Wechselwirkungen aufgrund der apolaren, anhängigen Methylgruppen sehr schwach. Dies resultiert in einer hohen Flexibilität der Siloxankette und einer niedrigen Viskosität des Polymers trotz der hohen Molmasse [243]. Die Rotationsfreiheit der Polymerkette führt dazu, dass die seitlichen, apolaren Methylgruppen sich auf der Oberfläche des Vulkanisats ausrichten, was folglich der Oberfläche ihre starke Hydrophobie verleiht [37].

Tab. 2.1: **Molekulare Merkmale von Silikonen und klassischen Polymeren gegenübergestellt.** Das Grundgerüst des Polymers zeichnet sich durch einen breiten Si-O-Si Valenzwinkel (143°) und starke und lange Si-O-Bindungen aus. Die Bindungsenergie der Si-O-Bindung ist mit 444 kJ/mol höher als die C-C-Bindung mit 356 kJ/mol der klassischen organischen Polymere [210, 37].

Silikonelastomere (PDMS)		organische Polymere	
Bindungsenergie Si-O	444 kJ/mol	Bindungsenergie C-C	356 kJ/mol
Bindungslänge Si-O	$1,64 \text{ \AA}$	Bindungslänge C-C	$1,53 \text{ \AA}$
Bindungswinkel Si-O-Si	143°	Valenzwinkel C-C-C	112°

Die außergewöhnliche Stabilität der anorganischen Polymerkette spiegelt sich in der Aufrechterhaltung der elastischen Eigenschaften des Silikons über einen breiten Temperaturbereich (von $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $+200 \text{ }^\circ\text{C}$) [297], der chemischen Stabilität und der Beständigkeit gegenüber Alterung, Wetterexponierung und UV-Strahlung wider [162]. Im medizinischen Bereich ermöglicht diese Stabilität die Sterilisation des Werkstoffs mit Heißdampf, Gamma-, Röntgen-, Elektronstrahlung und Ethylenoxid [243]. Die Abschirmung der Polymerkette mit hydrophoben Methylgruppen verursacht die Abhässigkeit, die z. B. als Abformmaterial im Dentalbereich von Nutzen ist. Andere besondere Eigenschaften des Silikons sind die gute elektrische Isolation, die optische Transparenz und die sehr hohe Gasdurchlässigkeit [243]. Lediglich von den organischen Elastomeren werden Silikonen in ihren Festigkeitswerten übertroffen [211].

2.3.2 Biologische Eigenschaften von medizinischen Silikonelastomeren

Toxikologie und Biostabilität

Der große Vorteil von Silikonelastomeren gegenüber organischen Elastomeren ist vor allem die hohe Reinheit des Werkstoffs. Medizinische Silikone werden ohne Zusatz von Weichmachern, Alterungsschutzmitteln oder anderen diffundierenden Stoffen hergestellt und die Pt-katalysierte Additionsvernetzung erfolgt ohne Bildung von Spaltprodukten [59]. Bei ordnungsgemäßer Vernetzung und ausreichender Temperung zeigen Silikonelastomere keine toxische Wirkung [84].

Die Implantation von Silikonelastomeren führt zur Bildung einer Bindegewebskapsel, die am Implantat nicht adhärert [225, 166]. Die Toxizität des Silikons wurde insbesondere im Rah-

men von Implantaten für die Rekonstruktion der weiblichen Brust stark diskutiert [76]. Es wurde von toxischen und immunologischen Reaktionen berichtet, die allerdings auf die Verwendung von unreinen Silikontypen oder ein Leck in der Implantathülle und die Freisetzung des Inhalts zurückzuführen waren [104, 121, 225, 24].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Biokompatibilität ist die Schädigung des Werkstoffs durch den Einfluss des Körpers [220]. Medizinische Silikonelastomere gelten als chemisch inert und beständig gegenüber hydrolytischem, oxidativem und enzymatischem Abbau [31, 104]. Es existieren allerdings Berichte, dass die Siloxan-Bindung sich hydrolytisch in zwei Silanol-Gruppen abbauen könnte, insbesondere durch den Einfluss von Säuren und Alkalien [296, 84]. Diese Reaktion ist allerdings hoch reversibel, sodass Silikon sich „selbst heilen“ kann [19]. Es wurde gezeigt, dass die hydrolytische Abbaureaktion bei hochvernetzten Silikonelastomeren nur minimal und erst nach sehr langen Implantationszeiten (länger als 5 Jahren) relevant ist [295]. Eine Studie von Leininger *et al.* konnte zeigen, dass *in vivo* implantierte Silikone sich im Vergleich zu Polyethylen, Teflon und Nylon als besonders biostabil erweisen [166].

Proteinadsorption

Die Bedeutung der Benetzbarkeit in dem Vorgang der Proteinadsorption wurde im Kapitel 2.1.1 bereits angesprochen. Kunststoffe sind in der Regel hydrophob und weisen eine starke Proteinadsorption mit Konformationsänderung auf [279]. Aufgrund der Abschirmung der Polymerkette mit Methylgruppen ist Silikon ein besonders hydrophober Kunststoff (siehe Kapitel 2.3.1). Tabelle 2.2 stellt Oberflächenspannungen von Silikon und anderen synthetischen Kunststoffen dar und liefert eine Erklärung für die vergleichsweise schlechte Benetzbarkeit der Silikonoberfläche. Die Konsequenz ist die ausgeprägte und unkontrollierte Proteinadsorption auf Silikonoberflächen unmittelbar nach dem Kontakt mit einem biologischen System [16, 42, 5]. Diese Beobachtung wird durch eine Studie von Kidoaki und Matsuda erklärt: Die Messung der Adhäsionskraft von Plasmaproteinen auf unterschiedlichen Oberflächen hat gezeigt, dass die Adhäsionskraft auf CH_3 -funktionalisierten Oberflächen deutlich höher als

Tab. 2.2: **Oberflächenspannung verschiedener synthetischer Kunststoffe.** Silikon zeichnet sich durch seine besonders niedrige Oberflächenspannung aus. Die hier angegebenen Werte sind entnommen aus [223].

Kunststoff	Oberflächenspannung [mN/m]
Polytetrafluoroethylene (PTFE)	19
Silikone	24
Polypropylen (PP)	29-31
Polyethylen (PE)	31-35
Polycarbonat (PC)	34-37
Polymethylmethacrylate (PMMA)	33-44
Polyamid (PA)	47

auf funktionalisierten Oberflächen wie OH-, COOH- und NH₂ ist [150]. Weil die Silikonoberfläche hauptsächlich aus CH₃-Gruppen besteht, bestätigen diese Ergebnisse, dass Silikone eine starke Proteinadsorption verursachen.

Außerdem ist die Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht von großem Interesse, weil sie die drauffolgenden Interaktionen mit Zellen bedingt. Verschiedene Adsorptionsstudien konnten zeigen, dass Fibrinogen, Albumin und Immunglobulin G am häufigsten auf der Silikonoberfläche zu finden sind [330, 5]. Insbesondere die Präsenz von Fibrinogen auf der Oberfläche kann wesentliche Auswirkungen auf die Blutgerinnung zur Folge haben, wie im nächsten Kapitel genauer erklärt. In einer ausführlichen Studie haben Backovic *et al.* die Zusammensetzung der auf Silikon adsorbierten Proteinschicht mit Massenspektrometrie analysiert: 30 Proteine wurden identifiziert, wobei Proteine der EZM und Proteine der Immunabwehr die häufigsten sind [13, 14]. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Implantation von Silikon im Weichgewebe, weil sie die Zelladhäsion und die Fremdkörperreaktion beeinflussen. Die detaillierten Vorgänge werden im übernächsten Kapitel genauer beschrieben.

Hämokompatibilität

Trotz intensiver Forschungsarbeiten ist die Hämokompatibilität von Kunststoffen (u. a. Silikone) in der Fachliteratur umstritten [229, 26]. Zusätzlich existieren in der Fachliteratur nur wenige komparative Untersuchungen der Hämokompatibilität von herkömmlichen Werkstoffen. Es wird vielmehr auf die antithrombogene Wirkung diverser Werkstoffmodifizierungen, wie z. B. Oberflächenmodifikationen, eingegangen.

Silikon wird in verschiedenen Studien als Referenzwerkstoff verwendet. Manchmal wird Silikon als Negativkontrolle – also hämokompatibler Werkstoff – betrachtet, wie z. B. in der Arbeit von Mrowietz *et al.* [192]. In dieser Studie wurde die Hämokompatibilität von Stents mit verschiedenen Beschichtungen untersucht; Ein Silikonschlauch diente als Negativ- und eine Glasoberfläche als Positivkontrolle. Andere Studien wählen Silikon als thrombogene Positivkontrolle aus. In einer Studie von Jansen *et al.* wurden beispielsweise ePTFE und Herzbeutelgewebe als potenzieller Werkstoff für ein voll implantierbares künstliches Herz mit Silikon- bzw. Heparin-beschichtetem PVC als positive bzw. negative Kontrollproben verglichen [133].

Als weiteres Beispiel verwendeten Wendel *et al.* dynamische Inkubationssysteme, um die Hämokompatibilität von Verbindungsteilen aus Polycarbonat zu evaluieren. Als Vergleich untersuchten sie Silikon- und Heparin-beschichtete Teile auf Veränderungen der zellulären sowie der plasmatischen Gerinnung, wobei sie eine positive Auswirkung der Silikonbeschichtung auf die Hämokompatibilität feststellen konnten [303]. In einer Arbeit von Larena-Avellaneda *et al.* wurde Silikon ebenfalls als hämokompatible Beschichtung verwendet. Neben der reinen Silikonbeschichtung waren Kombinationen mit zusätzlichen Oberflächenmodifikationen

erfolgreich, wie z. B. Silikon-PVA- und Silikon-PC-Beschichtungen [164].

Jedoch sind in der Fachliteratur zahlreiche Studien zu finden, die Silikone als thrombogen beschreiben. Zum Beispiel haben van Oeveren *et al.* die plasmatische Gerinnung vom Blutplasma nach Kontakt mit gängigen Kunststoffen (Silikon, PE, PVC, PU, PTFE) untersucht und festgestellt, dass Silikon mit Abstand die stärkste Aktivierung der Koagulationskaskade verursachte [206]. In einer Studie von Goodman *et al.* wurde außerdem die Bildung von Thromben in einer Flusskammer aus verschiedenen Werkstoffen (Silikon, PE, PVC, PTFE) untersucht. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Silikon die stärkste Thrombusbildung auslöste [94]. Mithilfe einer „Chandler Loop“-Einrichtung evaluierte die Arbeitsgruppe von Glasmacher die Hämokompatibilität von Silikon-, Tygon- und PVC-Schläuchen. Sie stellten eine stärkere Abnahme der Thrombozytenzahl im zirkulierenden Blut bei Kontakt mit Silikon fest, was auf eine stärkere Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten zurückzuführen sein könnte [193, 90]. Im Gegenteil konnten Harmand und Briquet mit gravimetrischer Analyse unter statischen Testbedingungen keinen signifikanten Unterschied bei der Thrombusbildung auf Silikon und PVC feststellen [114]. Rodes *et al.* untersuchten die Oberflächenmodifizierung von Kunststoffen (Silikon, UHMWPE, PTFE und PU) mit Plasma, wobei ihre Ergebnisse auf eine erfolgreiche Hämokompatibilisierung durch die Plasmabehandlung hindeuten. Zusätzlich lässt sich ein Vergleich zwischen den unmodifizierten Kunststoffen ziehen: Silikon ist in dieser Untersuchung einer der thrombogensten Kunststoffe gewesen [233].

Die Schwierigkeit, konsistente Aussagen über die Hämokompatibilität von Silikon zu treffen, wird in der Zusammenfassung von Bélanger und Marois deutlich: In ihrer Publikation listen sie zahlreiche Studien auf, in denen die Hämokompatibilität der Kunststoffe Silikon und PE verglichen wird. Zusammengefasst ist keine Zuordnung der Hämokompatibilität dieser zwei Kunststoffe zu erkennen [26]. Außerdem beeinflussen die Prüfungsbedingungen zusätzlich die Ergebnisse der Hämokompatibilitätsprüfungen, wie in einer Studie von Cao *et al.* gezeigt: Sie stellten fest, dass die Zuordnung der Kunststoffe nach ihrer Thrombogenität abhängig von der Blutfraktion ist, welche für die Prüfung verwendet wird. Im Fall von Vollblut oder PRP erwies sich Silikon thrombogener als die anderen Kunststoffe. Bei der Verwendung von gewaschenen Thrombozyten ist dies jedoch nicht der Fall gewesen und Silikon wies eine mäßige Thrombogenität auf [44].

Die einander widersprechenden Ergebnisse aus der Literatur verhindern es, die Hämokompatibilität von Silikonen eindeutig zu beurteilen. Ein Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Bewertung der Hämokompatibilität von medizinischen Silikonen im Vergleich zu anderen Kunststoffen. Dafür ist die Etablierung einer präzisen Analytik und die Durchführung einer ausführlichen Untersuchung notwendig.

Zytokompatibilität und Gewebeintegration

Die Wechselwirkungen von Silikonen mit biologischen Geweben sind im Gegensatz zu deren Hämokompatibilität gut untersucht. Dies ist wahrscheinlich auf die weit verbreitete Anwendung des Werkstoffs als dauerhaftes Implantat im Weichgewebe, z. B. als Prothese für die Rekonstruktion der weiblichen Brust und Implantate für die Rhinoplastik, zurückzuführen. Solche Silikonimplantate werden vom Körper infolge einer Immunsystemreaktion abgekapselt [225]. Diese Fremdkörperreaktion (foreign body reaction, FBR) kann in manchen Fällen zur symptomatischen Kapselbildung führen. Die starke Hydrophobie der Silikonoberfläche und die ausgeprägte Proteinadsorption führen zu erheblichen Auswirkungen auf die Zelladhäsion (siehe Kapitel 2.1.3). So haben Backovic *et al.* eine Korrelation zwischen dem Auftreten von symptomatischen Kapselkontrakturen nach der Implantation von Silikon-Brustprothesen und der Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht auf der Implantatoberfläche nachgewiesen [14].

Die geringe Zytokompatibilität von Silikonen und der Zusammenhang mit dem Auftreten von Kapselbildung wurde bereits in der Fachliteratur diskutiert [182]. Es wurde außerdem in zahlreichen *in vitro* Studien bewiesen, dass Silikon sich nicht mit Gewebezellen besiedeln lässt [182, 148, 26]. In diesen Arbeiten ist sowohl die geringe Wachstumsrate der Zellen auf der Silikonoberfläche als auch die verformte Morphologie der wenigen adhären Zellen gezeigt worden. Verschiedene Untersuchungen demonstrierten zugleich die hohe Bedeutung der hydrophoben Oberfläche: Durch Hydrophilisierung des Silikons ist es möglich, seine *in vitro* Zytokompatibilität zu verbessern [275, 152]. Dadsetan *et al.* haben die Zytokompatibilität von segmentiertem Polyurethan und Silikon-additiviertem Polyurethan untersucht und eine signifikant niedrigere Ausbreitungsgeschwindigkeit adhären Zellen auf Silikonoberflächen im Vergleich zu segmentiertem Polyurethan festgestellt. Außerdem ist die Adhäsionskraft der Zellen auf Silikon niedriger als auf anderen Werkstoffen [62].

2.4 Modifizierungen von Silikon zur Verbesserung der biologischen Eigenschaften

Die inhärenten chemischen Eigenschaften von Silikonelastomeren (im Folgenden auch als „Silikone“ bezeichnet) machen sie sehr attraktiv für die Medizintechnik. Besonders die Eigenschaften des Bulks, wie z. B. die Sterilisierbarkeit, biologische Stabilität und Flexibilität, sind in diesem Zusammenhang bemerkenswert. Allerdings besitzt die außergewöhnliche Chemie des Werkstoffs auch Nachteile: Die schlechte Benetzbarkeit der Oberfläche ist für eine vergleichsweise große Proteinadsorption verantwortlich, die zu verschiedenen unerwünschten Reaktionen führen kann wie Thrombusbildung oder Fremdkörperreaktion (siehe Kapitel 2.3.2). Um die biologischen Eigenschaften zu verbessern, werden chemische Modi-

fizierungen des Werkstoffs intensiv erforscht. Solche Modifizierungen basieren oft auf der Hydrophilisierung der Oberfläche oder dem Anbinden von bioaktiven Substanzen. Sie sollen die Oberflächeneigenschaften von Silikon an die biologische Umgebung anpassen ohne die vorteilhaften Bulkeigenschaften zu beeinträchtigen.

2.4.1 Herausforderung: Hydrophobe Relaxation der Silikonoberfläche

Die hydrophobe Relaxation (oft engl. „hydrophobic recovery“) der Silikonoberfläche nach Modifizierung ist ein bekanntes Phänomen, welches in der Fachliteratur oft beschrieben wurde [211]. Diese Thematik ist besonders relevant – und intensiv erforscht – für die Entwicklung von Bioreaktoren und lab-on-a-chip Systemen.

Die hydrophobe Relaxation tritt besonders schnell im Fall der Oberflächenaktivierung des Silikons auf. Encinas *et al.* haben berichtet, dass die Hydrophilie von plasmaaktivierten Silikonoberflächen nur eine Stunde stabil bleibt und dass die Hydrophobie nach 24 Stunden vollständig zurückgeht [77]. Ebenso haben Khorasani *et al.* die Hydrophilisierung von Silikon mit O₂-Plasmaaktivierung untersucht und gezeigt, dass die hydrophobe Relaxation von Silikon nach 48 Stunden stattfindet [148]. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen von Bodas und Khan-Malek überein, die von einer schnellen Relaxation von O₂-behandelten Oberflächen innerhalb von wenigen Stunden berichteten. Im Vergleich zur reinen Oberflächenaktivierung ist die hydrophobe Relaxation durch das Anbinden einer weiteren Polymerschicht minimiert: Sie tritt weiterhin in wenigen Stunden auf, aber die Oberfläche stabilisiert sich in 2 bis 4 Wochen auf einen intermediären Zustand [272, 242, 27].

Die Ursache der hydrophoben Relaxation der Silikonoberfläche ist noch nicht vollständig verstanden. Die populärste und oftmals herangezogene Erklärung für die Instabilität der Oberfläche liegt in der Flexibilität der Siloxankette: Die durch Aktivierung/Beschichtung aufgetragenen polaren Funktionen orientieren sich in dem Bulk des Polymers. Gleichzeitig drehen sich die Siloxanketten um und apolare Seitengruppen (Methylgruppen) erscheinen auf der Silikonoberfläche, die dadurch ihren ursprünglichen hydrophoben Charakter zurückgewinnt [177, 27]. Andere Autoren berichten zusätzlich von der Diffusion von PDMS-Oligomeren auf der Oberfläche [290, 327]. Dieser Effekt kann im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da durch die Temperung der Silikonproben niedermolekulare Spezies aus dem Werkstoff entfernt werden [211].

2.4.2 Hydrophilisierung von Silikon

Die Verbesserung der Benetzbarkeit ist die meist verwendete Strategie, um die Proteinadsorption auf Silikon zu reduzieren. Zahlreiche Arbeiten über lab-on-a-chip Systeme¹ und die biomedizinische Technik haben sich umfassend mit diesem Thema beschäftigt [327, 1, 128]. In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über die gängigsten Methoden und ihre Ergebnisse gegeben.

Oberflächenmodifizierungen

Oberflächenaktivierung: Die Oberflächenaktivierung geschieht durch das Aufbringen reaktiver chemischer Spezies (i. d. R. sauerstoffhaltige Funktionen) auf die Oberfläche. Neben dem chemischen Aktivierungsbad oder der Flammenbehandlung ist die Plasmaaktivierung das meist verbreitetste Verfahren in der Medizintechnik [260]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit O₂-Plasmaaktivierung sehr hydrophile Silikonoberflächen (Kontaktwinkel mit Wasser < 5°) herstellen können [25, 127]. Rodes *et al.* haben PE, PU, PTFE und Silikon mit verschiedenen Plasmen (O₂, Ar, N₂ und NH₃) aktiviert. In allen Fällen sind die Oberflächen durch die Behandlung deutlich hydrophiler und die *in vitro* Hämokompatibilität deutlich verbessert [233]. Trotz hervorragender Kurzzeitwirkung ist die Modifizierung besonders anfällig für hydrophobe Relaxation [148, 307, 327, 219]. In der Medizintechnik hat sich das Verfahren² jedoch für die Hydrophilisierung von Kontaktlinsen aus modifizierten Silikon etabliert [270, 1].

Öberflächenaktivierung und Silanisierung: Die Plasmaaktivierung kann als Vorbehandlung für eine weitere Funktionalisierung der Oberfläche verwendet werden. Die Plasmaaktivierung bringt Silanolgruppen auf die Oberfläche, die mit reaktiven organofunktionellen Silanen reagieren können. Wenn die Silane eine hydrophile Funktion besitzen, kann die Oberfläche hydrophil gestaltet werden [327]. Der detaillierte Ablauf dieser Reaktion ist in Abbildung 2.10 dargestellt. Diese Methode wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit Erfolg verwendet, um Silikon mit dem hydrophilen Polymer Polyethylenglycol (PEG) zu funktionalisieren. In einer Studie haben Sharma *et al.* gezeigt, dass ein PEG-funktionalisiertes Silikon einen Kontaktwinkel mit Wasser von ca. 10° aufweist und dass innerhalb von 3 Stunden keine hydrophobe Relaxation auftritt. Im Gegenteil bildet sich die Hydrophobie der reinen plasmaaktivierten Oberfläche sogar komplett zurück [253]. Die Langzeitstabilität ähnlicher PEG-Beschichtungen wurde von Delamarche *et al.* für eine Dauer von 7 Tagen und von Zhang *et al.* für eine Dauer von 30 Tagen nachgewiesen [67, 324]. Nagahashi *et al.* verwendeten die Silanisierung, um eine MPC³-Beschichtung von Silikon zu realisieren, welche über eine Dauer

¹Publikationen aus diesem Bereich beschreiben oft chemisch wirksame Methoden zur Verbesserung der Benetzbarkeit von PDMS. Der Transfer zur Medizintechnik ist allerdings mit Vorsicht umzusetzen, weil die Toxizität der Modifizierungen im Rahmen von lab-on-a-chip Systemen oft nicht evaluiert wird.

²In der Regel handelt es sich um die Aktivierung mit O₂-Plasma.

³Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine.

von 84 Tage stabil blieb [198]. In einer Studie präsentierten Karakoy *et al.* eine Funktionalisierung mit aminofunktionellen Silanen, welche die Adhäsion von silikonbeschichteten Stents zum biologischen Gewebe verbessert [141]. In dieser Arbeit wird ebenso die Silianisierung der Silikonoberfläche als potenzielle Strategie zur Verbesserung der Hämokompatibilität verwendet (siehe Kapitel 5).

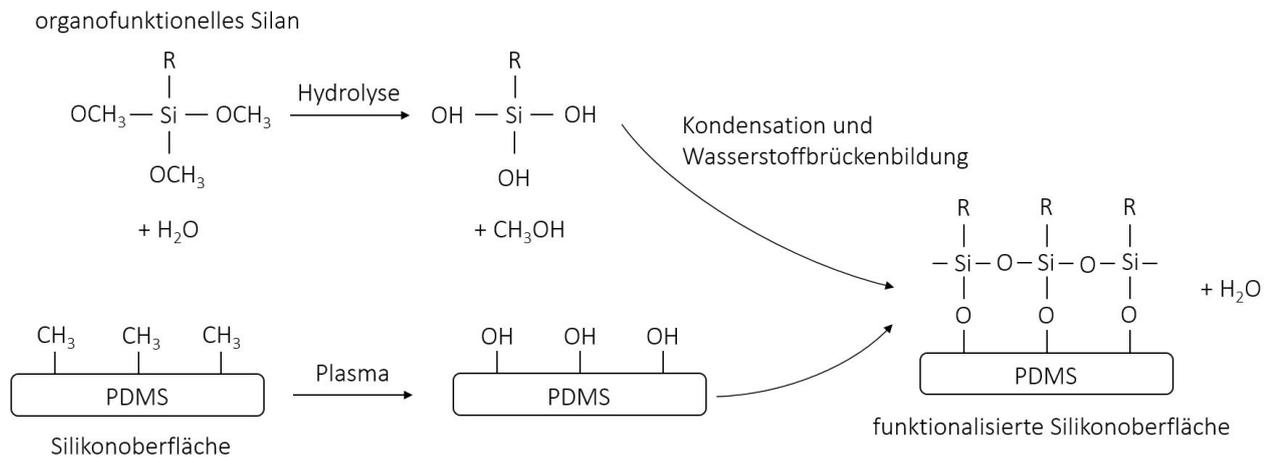


Abb. 2.10: **Prinzip der Silanisierung der Silikonoberfläche.** Zuerst wird das Silikon mit Plasma aktiviert, was reaktive Silanol-Gruppen auf die Oberfläche aufbringt. Dann werden die reaktiven Gruppen der Silane (hier beispielsweise OCH₃) hydrolysiert und nach Kondensation über Wasserstoffbrücken auf der Silikonoberfläche gebunden [10]. Nach Ablauf der Reaktion befinden sich die organischen Funktionen (hier R) der Silane auf der Oberfläche des Silikons.

Pfropfpolymerisation und Plasmapolymersation: Das Prinzip ist ähnlich wie im vorangehenden Beispiel, aber ohne Einsatz von Silanchemie. Radikale und reaktive Gruppen werden zuerst auf der Silikonoberfläche mit unterschiedlichen Verfahren aufgebracht (z. B. Gammabestrahlung, UV-Belichtung, Plasmaaktivierung, Laserbehandlung). Für die Polymerisation wird in einem zweiten Schritt die aktivierte Oberfläche in eine Lösung getaucht, die das Monomer enthält¹ [1, 327, 260]. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten Interesse an der Stabilität solcher Beschichtungen auf Silikon. Zum Beispiel haben Sugiura *et al.* mikrostrukturierte Silikonoberflächen mit PEG mit UV-Belichtung beschichtet. Die Stabilität der Hydrophilie (Kontaktwinkel mit Wasser < 60°) wurde über eine Dauer von zwei Monaten nachgewiesen [272]. Li *et al.* haben ähnliche Ergebnisse publiziert: Die Hydrophilie ihrer UV-belichteten, PEG-basierten Beschichtung blieb 30 Tage lang im PBS² stabil [168]. Die Arbeitsgruppe von De Smet hat sich mit der Beschichtung von Silikon mit den hydrophilen Monomeren AMPS und Sulfobetain beschäftigt. Sie haben zuerst die Silikonoberfläche mit Plasma oder Benzophenon aktiviert und anschließend die Beschichtung mit UV-Belichtung mit der aktivierten Oberfläche kovalent verbunden [66, 65]. Beide Aktivierungsverfahren haben zu einer stabilen hydrophilen Oberfläche geführt. Die Pfropfpolymerisation wurde außerdem angewendet,

¹Dieses Verfahren wird „grafting from“ Ansatz genannt. Die umgekehrte Strategie besteht in der Funktionalisierung eines Polymers und anschließender Bindung auf der Oberfläche. Sie wird als „grafting to“ bezeichnet.

²Phosphatgepufferte Salzlösung.

um die Hämokompatibilität von Schläuchen zu verbessern. In der Arbeit von Park *et al.* wurden die inneren Oberflächen von Silikon-, ePTFE- und PE-Schläuchen mittels Gammastrahlung mit PEO beschichtet [216]. *In vitro* Untersuchungen haben eine Reduktion von 70-90 % der Fibrinogenadsorption und Thrombozytenadhäsion bewiesen. Die Hämokompatibilität dieser Werkstoffe wurde in einem *ex vivo* Shunt-System in Hunden getestet und die gewünschte positive Wirkung der Beschichtung konnte gezeigt werden [216]. Diese Arbeit weist eine vielversprechende Anwendung von silikonbeschichteten Schläuchen in der Medizintechnik auf. Plasmapolymersation findet außerdem bereits Anwendung, um die Hydrophilie von Silikon/Hydrogel-Kontaktlinsen zu verbessern [270].

Weitere Methoden: Die chemische Gasphasenabscheidung (chemical vapour deposition, CVD) wurde in einigen Fällen verwendet, um Silikonoberflächen zu modifizieren. Mit dem Ziel, die Adhäsion von Silikon an anderen Substraten zu verbessern, haben Chen *et al.* Poly(p-xylylene) an der Silikonoberfläche erfolgreich gebunden [54]. Xu *et al.* haben ebenfalls CVD verwendet, um die Silikonoberfläche mit Aminogruppen zu funktionalisieren. Die Stabilität der Beschichtung wurde in einem mikrofluidischen Kanal für eine Dauer von 2 Wochen gezeigt [314]. Allerdings haben die Autoren keine toxikologischen Untersuchungen der CVD-Beschichtungen durchgeführt, sodass ein Transfer des Verfahrens in die Medizintechnik mit Vorsicht gemacht werden muss. Das Layer-by-layer (LBL)-Verfahren ist auch eine in der Fachliteratur beschriebene Prozedur. Sie besteht im mehrstufigen Auftragen von dünnen monomolekularen Schichten aus Polyelektrolyten. Allerdings ist das Verfahren sehr umständlich (viele Prozessschritte, keine Automatisierung) und die entstehenden Schichten sind wenig stabil [327]. Aus diesen Gründen ist das LBL-Verfahren auf Forschungsarbeiten limitiert.

Bulkmodifizierungen

Gegenüber Oberflächenmodifizierungen haben Bulkmodifizierungen den Vorteil, dass sie in der Regel zeitstabile Oberflächeneigenschaften erzeugen. Außerdem ist normalerweise kein zusätzlicher Arbeitsschritt für die Herstellung notwendig. Ihre praktische Umsetzung ist jedoch begrenzt, weil sie eine unerwünschte Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften des Silikons verursachen können. Aus diesem Grund sind sie in der Fachliteratur verhältnismäßig wenig beschrieben. Im folgenden Kapitel werden die meist angewendeten Bulkmodifizierungen kurz erläutert.

Interpenetrierende Netzwerke: Die einfachste Modifizierungsstrategie ist das Beimischen hydrophiler Elemente in die Silikonmasse vor der Vulkanisation. Ein interpenetrierendes Netzwerk ist als eine Mischung von zwei oder mehr Polymeren definiert, in der zumindest ein Polymer vernetzt ist [1]. In diesem Fall ist Silikon immer vulkanisiert und die zweite Phase besteht aus einem anderen Polymer, dessen Moleküle in der PDMS-Matrix gefangen sind. Hydrogele werden häufig zu Silikon hinzugefügt mit dem Ziel, ihre Biokompatibilität mit

den guten mechanischen Eigenschaften des Silikons zu kombinieren. Zum Beispiel hat die Arbeitsgruppe von P. Hron Partikel von Polyacrylamid (PAA) mit Silikon compoundingiert. Sie hat die resultierende Wasseraufnahme des Werkstoffs charakterisiert und durch *in vivo* Untersuchungen die gute Biokompatibilität nachgewiesen [128, 129]. Eine ähnliche Modifizierung wurde von Xiao *et al.* für die Herstellung von einem Silikonmikrochip beschrieben. Ein PLA-PEG Copolymer wurde in Dichloromethan gelöst und der unvernetzten Silikonmasse beigemischt. Der Kontaktwinkel mit Wasser wurde durch Zugabe von 2 % des Additivs stark reduziert (von 108° für reines Silikon auf 73° mit Zugabe 2 % des Additivs) [313]. Um Mikrokanäle herzustellen, haben beispielsweise Yao *et al.* ein PMDS-b-PEO Copolymer der unvernetzten Silikonmasse beigemischt. Mit 1,7 % des Additivs wies das modifizierte Silikon einen stabilen Kontaktwinkel mit Wasser von ca. 30° über eine Beobachtungszeit von 2 Monaten [316]. Allerdings muss für die Anwendung in der Medizintechnik beachtet werden, dass die unvernetzten Komponenten nicht aus dem Werkstoff entweichen und so toxische Reaktionen auslösen können. Interpenetrierende Netzwerke mit Hydrogelen haben sich für die Herstellung von Kontaktlinsen etabliert [218].

Copolymere: Um einer Vernetzung der hydrophilen Anteile mit dem PDMS zu ermöglichen, können Copolymere als Alternative zu Polymerblends verwendet werden. PDMS-PEO Copolymere sind in der Medizintechnik für ihre gute Hämokompatibilität bekannt (siehe Kapitel 5.1.1 für die vertiefte Beschreibung der Hämokompatibilität von PEO) [137]. Zu diesem Zweck werden zum Beispiel PEO-PDMS-Heparin Copolymere hergestellt [101]. Zahlreiche Untersuchungen von vielversprechenden PDMS-basierten Copolymeren sind für medizinische Anwendungen in der Fachliteratur beschrieben [1].

Hydrosilylation-basierte Modifizierungen: Dieser Ansatz besteht in der Mischung von funktionalisierten Polymeren in der Silikonmasse vor der Vulkanisation und der darauffolgenden kovalenten Bindung dieser Funktionen an PDMS-Moleküle während des Prozesses der Pt-katalysierten Additionsvernetzung (Hydrosilylierung). In Abbildung 2.11 ist das Reaktionsprinzip dargestellt. Wie bei der Vernetzung des Silikonnetzwerkes können auf die

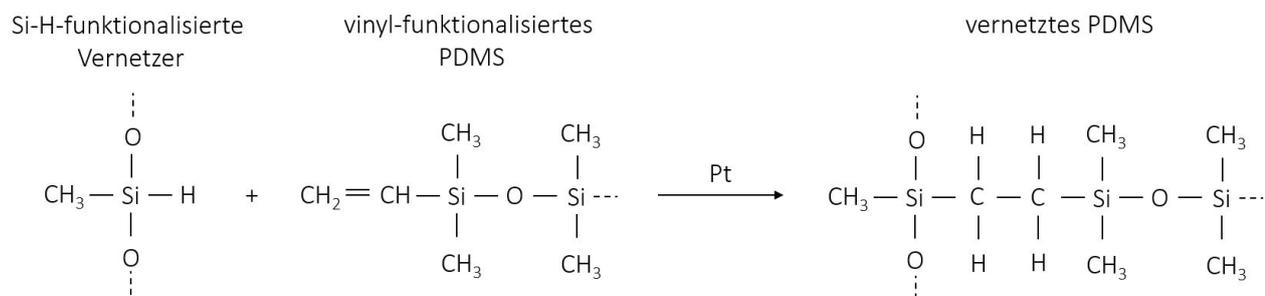


Abb. 2.11: **Prinzip der Pt-katalysierten Additionsvernetzung.** Die reaktiven Si-H-Gruppen des Vernetzers können mit Vinyl-Endgruppen der Silikonkette reagieren und somit ein dreidimensionales Netzwerk bilden [35].

gleiche Weise andere Polymere während der Vulkanisation an das Silikon chemisch gebunden werden. Um dies zu ermöglichen, müssen im Vorfeld diese Polymere mit vinyl-Gruppen funktionalisiert werden. Zhou *et al.* haben auf diese Weise vinyl-funktionalisiertes PEG im Silikonnetzwerk gebunden. Somit konnten sie die Benetzbarkeit der Oberfläche verbessern (Kontaktwinkel mit Wasser unter 80° bei der Zugabe von 1 % des PEG-Additivs) und die Proteinadsorption deutlich reduzieren [328]. Van Poll *et al.* haben ein ähnliches Verfahren verwendet, um ein breiteres Spektrum von vinyl-funktionalisierten Molekülen an Silikon zu binden. Sie konnten niedrige Kontaktwinkel erreichen (unter 80° für 3 % des PEG-basierten Moleküls) und die Stabilität der Modifizierungen über 5 Tage nachweisen [221]. Solche Modifizierungen werden ebenso in dieser Arbeit zur Verbesserung der Hämokompatibilität eingesetzt (siehe Kapitel 5).

Tenside: Einige Autoren haben die Benetzbarkeit des Silikons durch Zugabe von Tensiden in der Grundmasse vor der Vulkanisation verbessert. Diese Modifizierungen werden vor allem für die Entwicklung von lab-on-a-chip-Systemen untersucht. In einer Studie haben Seo *et al.* die Herstellung von sehr hydrophilen Silikonen (Kontaktwinkel mit Wasser von 40°) durch Beimischen von bis zu 3 % des Tensids Triton TX-100 in dem Bulk beschrieben [250]. Ähnliche Ergebnisse konnten Wu und Hjort durch die erfolgreiche Herstellung von hydrophilem Silikon mit der Beimischung von Tensid Pluronic F-127 erreichen [312]. Für eine Anwendung in der Medizintechnik sind solche Modifizierungen jedoch aufgrund des möglichen Entweichens des Tensids und zytotoxischer Wirkungen sehr fraglich.

2.4.3 Bioaktive Modifizierungen

Neben der Verbesserung der Benetzbarkeit des Silikons durch chemische Modifizierungen ist die Funktionalisierung mit bioaktiven Substanzen eine in der Forschung oft verwendete Strategie, um die biologischen Wechselwirkungen mit dem Körper zu beeinflussen. Weil dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht im Vordergrund steht, wird er in diesem Kapitel lediglich kurz beschrieben.

Hämokompatibilisierung

Die Bindung von aktiven Antikoagulanzen auf der Oberfläche ist ein beliebter Ansatz in der Forschung [229]. Das Polysaccharid Heparin findet in der Therapie von Thrombosen oft praktische Anwendung, weil es die Gerinnungskaskade hemmt. Der Wirkungsmechanismus erfolgt über die Bindung des Heparins an den zirkulierenden Proteaseinhibitor Antithrombin III (AT-III). Dadurch entsteht eine Konformationsänderung des AT-III und folglich eine Vervielfachung seiner Wirkung als Inhibitor von Thrombin [132].

Die Bindung des Heparins an der Oberfläche von Biomaterialien wird in der Forschung mit vielversprechenden *in vitro* Ergebnissen beschrieben: Reduzierung der Thrombozyten-

adhäsion, Verminderung des Verbrauchs von Blutzellen, Verlängerung der Koagulationszeit [326, 185]. Silikone werden auch mit Heparin modifiziert: Zum Beispiel hat die Arbeitsgruppe von Grainger *et al.* Heparin, PEO und Silikon als Triblockcopolymerer kombiniert und eine positive Auswirkung auf die *in vitro* Thrombozytenadhäsion feststellen können [100, 99]. Heparin wurde auch als Beschichtung aufgebracht. Thorslund *et al.* haben beispielsweise verschiedene Heparinbeschichtungen für Mikrokanäle aus Silikon vorgestellt und die verbesserte *in vitro* Hämokompatibilität des Werkstoffs gezeigt [282, 281].

Die Anwendung von Heparin weist allerdings einige Einschränkungen auf. Heparin kann das fibrinogene Thrombin nicht inhibieren. Außerdem bindet Heparin andere aktive körpereigene Moleküle wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und EZM Proteinen, was Nebenwirkungen verursachen kann [169]. Es wird auch in fachlichen Publikationen berichtet, dass heparinbeschichtete Stents starke Entzündungsreaktionen auslösen und eine Restenose beschleunigen [95].

Als Alternativ zum Heparin können außerdem andere Antikoagulanzen an der Biomaterialienoberfläche gebunden werden. Zum Beispiel hat die Arbeitsgruppe von Hashi *et al.* kleinlumige Gefäßprothesen (Durchmesser von 1 mm) erfolgreich mit Hirudin beschichtet. *In vivo* Langzeit Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Hämokompatibilität der Gefäßprothese durch die Hirudinbeschichtung deutlich verbessert wurde [116]. Gouzy *et al.* haben beispielsweise Benzamidin und PEG-Spacer verwendet, um die Hämokompatibilität von Polymeren zu verbessern. Sie konnten eine Reduzierung der Thrombozyten- und der Koagulationsaktivierung feststellen [97].

Zytokompatibilisierung

In der Forschung wird der biomimetische Ansatz oft verfolgt, um die Zelladhäsion auf künstliche Oberflächen zu fördern. Zahlreiche Arbeiten fokussieren sich auf die kovalente Bindung der sog. RGD-Peptidsequenz (oder die Bindung von Proteinen, die diese Sequenz enthalten) an die Werkstoffoberfläche. Nach Implantation können Gewebezellen diese besondere Peptidsequenz erkennen und folglich am Implantat adhären (siehe Kapitel 2.1.3).

Die Bindung von Peptiden an Silikon erfolgt oft als zweiter Bearbeitungsschritt nach der Funktionalisierung der Oberfläche (z. B. durch Silanisierung oder Plasmapolymerisation, siehe Kapitel 2.4.2). Die sog. EDC/NHS-Kopplung ermöglicht die kovalente Bindung von den auf die Werkstoffoberfläche aufgetragenen Carboxylgruppen mit den Aminogruppen der Peptidsequenz [1]. Außerdem ist die umgekehrte Strategie ebenfalls möglich: Die Gruppe von Sarvi *et al.* haben zunächst Aminogruppen auf Silikon durch Silanisierung aufgebracht und dann mit EDC/NHS-Kopplung die Carboxylgruppen von Carboxymethylcellulose (CMC) kovalent gebunden. Sie verwendeten schließlich die EDC/NHS-Kopplung ein zweites Mal, um Gelatine – ein Kollagenderivat – auf die CMC aufzubringen. Das mit Gelatine beschichte-

te Silikon konnte die Zelladhäsion und Zellwachstum in Mikrobioreaktoren deutlich verbessern [242]. Kollagen wurde in mehreren Arbeiten als Beschichtung von Silikon untersucht. Yue *et al.* haben beispielsweise Kollagen und Hyaluronsäure als Spacer für eine mögliche Applikation als Cochleaimplantate benutzt. Die Beschichtung konnte die Zelladhäsion und Zelldifferenzierung fördern [319]. Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch mit einer Kollagenbeschichtung, die nach EDC/NHS-Kopplung auf Silikon aufgebracht wurde, von Okada *et al.* berichtet. Nach einer 9-wöchigen Implantation in Kaninchen wurde die benötigte Kraft gemessen, um das Implantat aus dem umliegenden Gewebe herauszuziehen. Auf diese Weise konnten sie nachweisen, dass die Adhäsion von kollagenbeschichtetem Silikon an Gewebe ebenfalls *in vivo* verbessert wurde [208]. Neben Kollagen wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die verschiedene RGB-basierte Beschichtungen beschreiben [284].

3 Etablierung der Methodik zur Hämokompatibilitätsprüfung

Der Mangel an Standardisierung der Hämokompatibilitätsprüfung wurde im Kapitel 2.2 ausführlich behandelt. Als Folge ist es im Rahmen dieser Arbeit notwendig, ein optimiertes System zur dynamischen Prüfung von Silikonelastomeren zu entwickeln. In diesem Kapitel werden deshalb die Entwicklung und die Validierung des neuen Inkubationssystems dargestellt. Außerdem wird der Einfluss externer Faktoren auf die Ergebnisse der Hämokompatibilitätsprüfung, wie z. B. Flussbedingungen, betrachtet und diskutiert. Somit werden die experimentellen Methoden, die in der ganzen Arbeit für die Untersuchung der Hämokompatibilität angewendet werden, in diesem Kapitel vorgestellt und begründet.

3.1 Entwicklung eines neuen dynamischen Inkubationssystems

3.1.1 Anforderungen an das System

Wegen der inhärenten Beschränkungen existierender dynamischer Systeme (siehe Kapitel 2.2.2), hat sich der Bedarf an einem optimierten Prüfstand zur Prüfung von Silikonelastomeren (im Folgenden auch als „Silikone“ bezeichnet) konkretisiert. Die ausgearbeitete Anforderungsliste für das neue System beinhaltet folgende Punkte:

1. Der Blut-/Werkstoff-Kontakt soll bei 37 °C unter einstellbaren, dynamischen Flussbedingungen erfolgen, um möglichst viele Implantationsorte in der Blutbahn simulieren zu können [205].
2. Zur Limitierung von Blutschädigungen, soll das Blut durch das System pumpenlos angetrieben werden.
3. Aufgrund möglicher Lufteinschlüsse soll die Testoberfläche während der gesamten Versuchsdauer vollständig mit Blut benetzt bleiben.
4. Die Testoberfläche soll eben sein, um eine breite Werkstoffvariabilität zu ermöglichen. Außerdem soll es möglich sein, nach dem Blut-/Werkstoff-Kontakt die Testoberfläche schadlos aus dem System zu entnehmen.
5. Eine einfache Konstruktion mit reduzierter Anzahl an Verbindungselementen soll die Sensitivität des Tests verbessern, indem externe Effekte und Hintergrundaktivierungen vermindert werden [228].
6. Das Oberflächen-/Volumen-Verhältnis von Blut zu Werkstoff soll für alle Proben gleich sein.
7. Mehrere Proben sollen gleichzeitig unter den selben Versuchsbedingungen getestet werden können.

3.1.2 Konzept und Entwicklung

Abbildung 3.1 zeigt den entwickelten Prüfstand, wobei die Inkubationskammer aus einem rechteckigen Kanal besteht. Um das Fließverhalten von Blut in kleinlumigen¹ Gefäßen simulieren zu können, wurde die Höhe des Kanals klein dimensioniert. Je nach Anwendungsfall sind zwei Varianten des Prüfstands mit unterschiedlichen Dimensionen verfügbar: $218 \times 14 \times 1$ mm für die Inkubation niedrig viskoser Flüssigkeiten wie Zellsuspensionen, Blutplasma oder Proteinlösungen und $218 \times 14 \times 2$ mm für die Untersuchung von Vollblut.

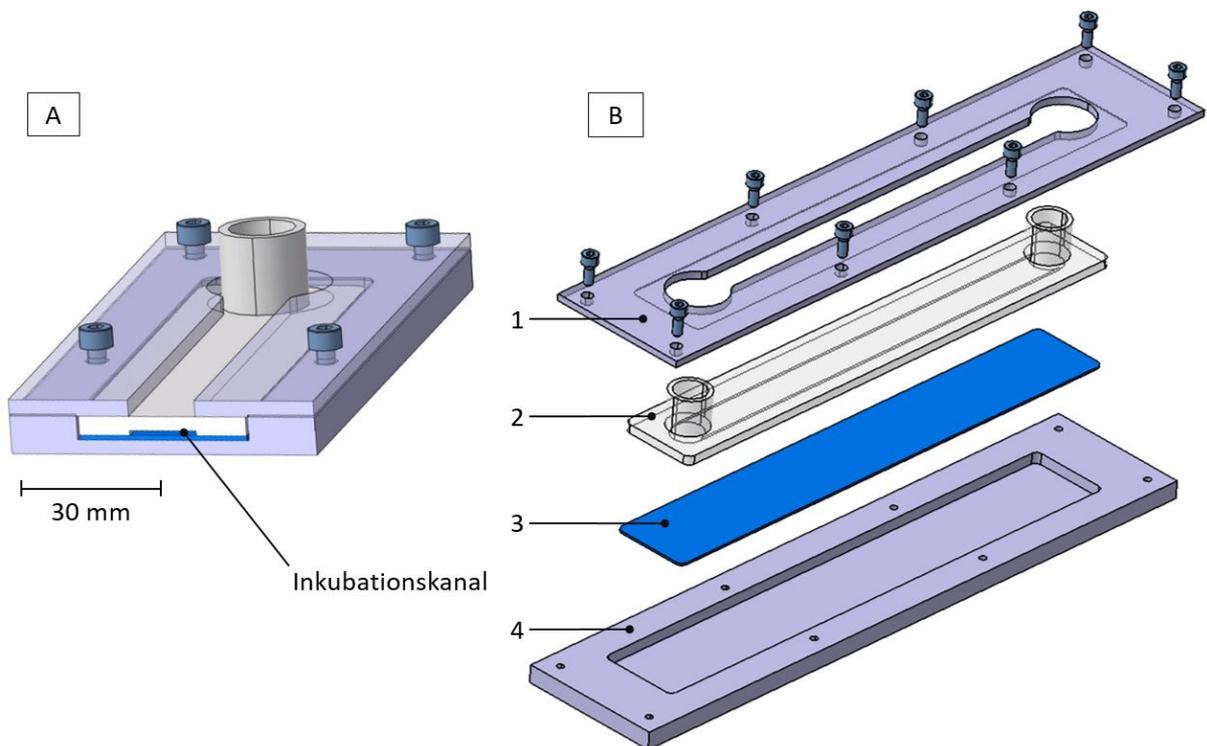


Abb. 3.1: **Aufbau des Prüfstands.** A: Schnittdarstellung der kanalförmigen Inkubationskammer. B: Explosionsdarstellung des Aufbaus. Der Boden des Kanals ist ein entnehmbare Streifen, der aus beliebigen Werkstoffen bestehen kann (3). Ein U-Profil aus Silikon dichtet die Inkubationskammer ab (2). Beide Teile werden zwischen zwei Aluminium-Platten (1 und 4) zusammengepresst, um eine ausreichende Abdichtung zu gewährleisten.

Dieses System ist für die Untersuchung von Silikon besonders geeignet: Der Teststreifen und das U-Profil können mit allen drei Silikon-Typen hergestellt werden, sodass das Blut ausschließlich mit dem zu testenden Werkstoff in Berührung kommt. Eine Gießform bzw. eine Pressform wurden für die Herstellung von U-Profilen aus RTV² bzw. LSR³ und HTV⁴ entwickelt. Detailansichten der Pressform sind im Anhang F abgebildet. Der Prüfstreifen ist entnehmbar, um eine weitere Untersuchung der Blut-/Werkstoff-Kontaktfläche nach Inkubation zu erleichtern.

¹Das Lumen bezeichnet den Innenraum des Gefäßes.

²Room Temperature Vulcanizing-Silikon.

³Flüssig-Silikon (Liquid Silicone Rubber).

⁴High Temperature Vulcanizing-Silikon.

Um die Verwendung einer Pumpe zu vermeiden, wird der Blutfluss im Kanal mithilfe eines wippenden Plattenschüttlers (Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) in Bewegung gesetzt, wie in Abbildung 3.2 zu sehen. Der Schüttler kann mit einer zusätzlichen Ladefläche mit maximal 8 Proben gleichzeitig beladen werden. Die Wippgeschwindigkeit ist kontinuierlich von 0 U/min¹ bis 50 U/min einstellbar, sodass Experimente unter variablen Flussbedingungen durchgeführt werden können. Während der gesamten Inkubationsdauer wird in einem Wärmeschrank die Temperatur konstant bei 37 °C gehalten.

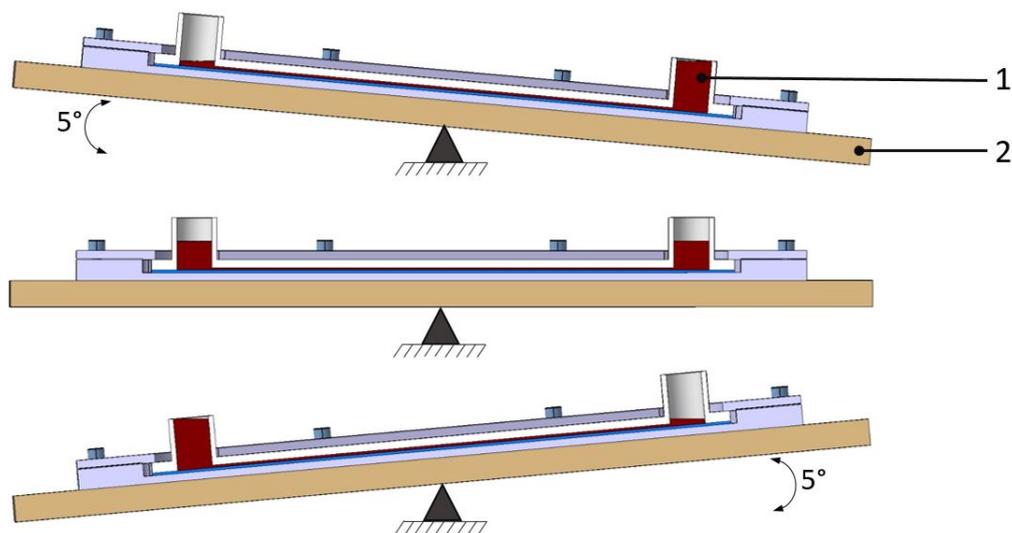


Abb. 3.2: **Funktionsprinzip des Prüfstands.** Der Kanal verbindet zwei Reservoirs, die mit der zu untersuchenden Flüssigkeit (1) befüllt werden. Wenn das Wippsystem (2) gekippt wird, bleibt nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren der Flüssigkeitsspiegel gleich. Ein periodischer Blutfluss entsteht entlang des Kanals ohne die Verwendung einer Pumpe.

3.2 Hämodynamische Validierung

Bei einer zweckmäßigen Hämokompatibilitätsprüfung sollten die Blut-/Werkstoff-Wechselwirkungen unter Flussbedingungen erfolgen, die den klinischen Ansatz des Endproduktes simulieren [34]. In diesem Kapitel werden die Strömungsparameter in dem Inkubationssystem ermittelt und geeignete Arbeitspunkte anhand physiologischer Werte etabliert.

3.2.1 Charakterisierung der Strömung im Inkubationssystem

Vollblut ist ein zweiphasiges nicht-newtonsches Fluid, dessen Viskosität von dem Hämatokrit², der Scherrate und der Temperatur abhängt [98]. Aufgrund der Bildung von Erythrozyten-Aggregaten (sog. „Geldrollenbildung“), ist die Viskosität des Vollbluts bei niedrigeren Scher-

¹Umdrehungen pro Minute, wobei eine Umdrehung des Antriebsmechanismus einem Wippvorgang der Ladefläche in der Hin- und Rückrichtung entspricht.

²Der Hämatokrit ist als Anteil der Erythrozyten am Volumen des Bluts definiert.

raten hoch. Bei Scherraten über 100 s^{-1} nimmt die Viskosität einen asymptotischen Wert von ca. $3,5 \text{ cP}^1$ an, wodurch das Blut als newtonsches Fluid betrachtet werden kann [213, 98, 85]. Weil das Blutplasma keine Erythrozyten enthält, verhält es sich wie ein newtonsches Fluid mit einer Viskosität von $1,2 \text{ cP}$ [238, 201]. Thrombozytensuspensionen bestehen vor allem aus Wasser und enthalten einen vernachlässigbaren Anteil von Erythrozyten. Thrombozyten beeinflussen das rheologische Verhalten der Suspension nicht und unter einem Hämatokrit von 10% ist die Viskosität der Suspension konstant [86, 201]. Aus diesen Gründen wird angenommen, dass Thrombozytensuspensionen ein newtonsches Verhalten aufweisen.

Vier verschiedene Testflüssigkeiten werden anhand ihrer physischen und rheologischen Eigenschaften mit Vollblut, Blutplasma und Thrombozytensuspension² verglichen. Die kinematische Viskosität η bzw. die Dichte ρ wird mit einem Kapillarviskosimeter (AVS 310, Schott-Geräte GmbH, Mainz, Deutschland) bzw. einem Dichtemessgerät (DMA 4100M, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck gemessen. Die dynamische Viskosität μ kann mit der Formel $\mu = \eta \times \rho$ berechnet werden. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.1 zu lesen.

Tab. 3.1: **Eigenschaften der verwendeten Flüssigkeiten.** Die Thrombozytensuspension hat eine Viskosität von $1,4 \text{ cP}$, die leicht über die Viskosität von Wasser und Ethanol liegt. Ihre Dichte nähert sich der Dichte von Wasser an. Das Vollblut und die zwei Glycerin-/Wasser-Lösungen weisen sehr ähnliche physische und rheologische Eigenschaften auf.

	Dynamische Viskosität μ [cP]	Dichte ρ [kg/m ³]
Wasser ^a	1,0	1000
99,9 % Ethanol ^a	1,18	788
30 %-Glycerin-/Wasser-Lösung ^a	3,03	1089
35 %-Glycerin-/Wasser-Lösung ^a	3,67	1104
Thrombozytensuspension ^a ($642 \cdot 10^3 \text{ PLT}/\mu\text{l}$)	1,41	1017
Vollblut ^b	3,5 [213]	1060 [98]
Blutplasma ^b	1,2 [238]	1028 [299]

^a experimentell gemessene Werte

^b Werte aus der Literatur

Nach Betrachtung der physiologischen und rheologischen Eigenschaften der Testflüssigkeiten (Tabelle 3.1) wird eine 35 %-Glycerin-/Wasser-Lösung für die Simulation von Vollblut bzw. Wasser für die Simulation von Blutplasma und Thrombozytensuspensionen ausgewählt. 8 ml der Glycerin-Lösung bzw. 4,5 ml Wasser wird in dem 2 mm-Kanal bzw. 1 mm-Kanal pipettiert und auf dem Plattformschüttler in Bewegung gesetzt. Nach der Verteilung der Flüssigkeit im Inkubationskanal werden in einem Reservoir zusätzliche gefärbte $200 \mu\text{l}$ der

¹für einen Hämatokrit von 45% .

²hergestellt nach dem Protokoll im Anhang B.1.

gleichen Lösung pipettiert. Der entstehende Farbunterschied ermöglicht die Visualisierung des Geschwindigkeitsprofils der Strömung über die Zeit. Abbildung 3.3 zeigt die Entwicklung des Strömungsprofils im Inkubationskanal. Die Geschwindigkeit der Mittellinie des Profils $v_0(t)$ wird für Wippgeschwindigkeiten zwischen 2 U/min und 50 U/min aufgenommen. Der Graph in der Abbildung 3.4 fasst die gemessenen Werte zusammen.

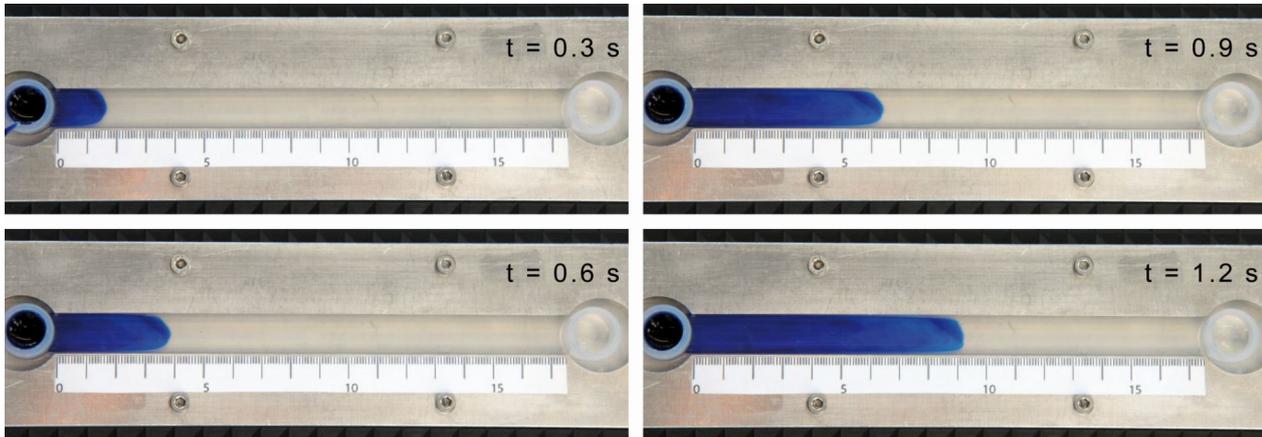


Abb. 3.3: **Geschwindigkeitsprofil der Strömung durch das Inkubationssystem.** Die Aufnahmen zeigen beispielhaft Wasser in dem 1 mm-Kanal bei einer Wippgeschwindigkeit von 15 U/min zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten.

3.2.2 Ermittlung geeigneten Betriebspunkte

Für die weitere analytische Ermittlung der Flussbedingungen wird das Hagen-Poiseuille-Gesetz angewendet. Dieses Gesetz beschreibt die laminare, stationäre Strömung einer homogenen newtonschen Flüssigkeit durch einen langen, starren Kanal [38]. Die Validität der Voraussetzungen des Hagen-Poiseuille-Gesetzes wird im Kapitel 3.2.3 diskutiert.

Das Geschwindigkeitsprofil einer Poiseuille-Strömung ist parabolisch. Im Fall einer Strömung durch einen Kanal rechteckigen Querschnitts mit der Breite b und der Höhe h ($h < b$) lässt sich aus der Geschwindigkeit der Mittellinie des Profils v_0 und einer Konstante K die mittlere Geschwindigkeit \bar{v} über den Querschnitt des Kanals berechnen:

$$\bar{v}(t) = \frac{3}{2} \cdot K \cdot v_0(t) \quad (3.1)$$

Bei dem klassischen Fall der Spaltströmung¹ mit parabelförmigem Geschwindigkeitsprofil ist $K = 1$ [285]. Die Konstante K entspricht der Volumenstromreduzierung durch einen rechteckigen Querschnitt aufgrund der Entstehung eines Geschwindigkeitsprofils über die Breite des Kanals (wie in Abbildung 3.3 zu sehen). K ist abhängig vom Seitenverhältnis h/b

¹Ein Spalt wird als der Abstand zwischen zwei unendlich breiten parallelen Ebenen definiert.

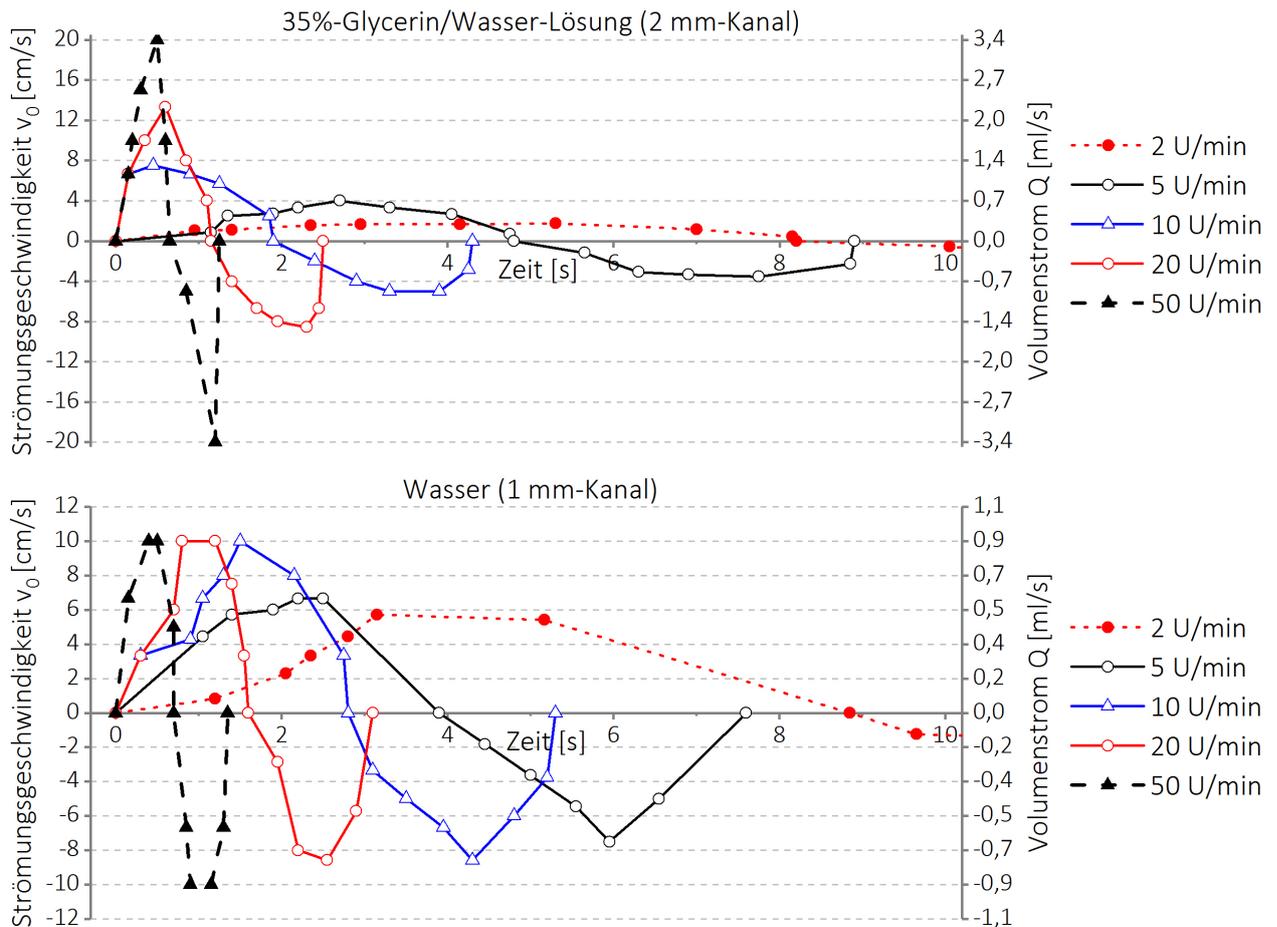


Abb. 3.4: **Geschwindigkeit der Mittellinie des Profils $v_0(t)$ und des Volumenstroms $Q(t)$ für beide Testflüssigkeiten bei einem Wipp-Zyklus (hier exemplarisch dargestellt bei 5 verschiedenen Wippfrequenzen).** Die Geschwindigkeit im Kanal weist einen periodischen Verlauf auf, wobei die Werte der Geschwindigkeit über die erste Periode aufgezeichnet werden. Mit einer Erhöhung der Wippfrequenz nimmt die erreichte Geschwindigkeit $v_{0,max}$ bis zu einem maximalen Wert von 20 cm/s für die Glycerin-Lösung bzw. 10 cm/s für das Wasser zu. Dieser maximale Wert wird erreicht, wenn die Trägheit der Flüssigkeit die Entstehung eines schnelleren Fließens bei höheren Frequenzen limitiert.

und lässt sich analytisch durch eine Fourierreihe beschreiben (modifiziert nach [38]):

$$K = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^5} \cdot \frac{192}{\pi^5} \cdot \frac{h}{b} \cdot \tanh\left((2n-1) \cdot \frac{\pi}{2} \cdot \frac{b}{h}\right) \quad (3.2)$$

Aus der vorgegebenen Kanalgeometrie ergibt sich: $K_{h=1mm} = 0,95$ und $K_{h=2mm} = 0,91$.

Der Volumenstrom im Kanal $Q(t)$ ist proportional zur mittleren Geschwindigkeit $\bar{v}(t)$. Die Scherrate an der Kanalwand $\gamma(t)$ kann folgendermaßen berechnet werden, wobei b der Breite und h der Höhe des Kanals entspricht [183, 271]:

$$Q(t) = h \cdot b \cdot \bar{v}(t) \quad (3.3)$$

$$\gamma(t) = 6 \frac{Q(t)}{bh^2} \quad (3.4)$$

Um die geeigneten Betriebspunkte des Systems zu ermitteln, wird die im Kanal maximal erreichte Scherrate über einen Wipp-Zyklus γ_{max} mit den Scherraten, die *in vivo* in verschiedenen Blutgefäßen gemessen werden, verglichen. Abbildung 3.5 stellt die experimentell gemessenen Werte mit physiologischen Daten aus der Literatur im Vergleich dar. Die Scherrate wird als Vergleichsgröße zwischen der *in vivo* und der *in vitro* Situation herangezogen, da nach der in der Fachliteratur dominierenden Meinung eine Skalierung der Geometrie bei konstanten Scherraten zu gleicher Thrombozytenadhäsion führt [259, 20].

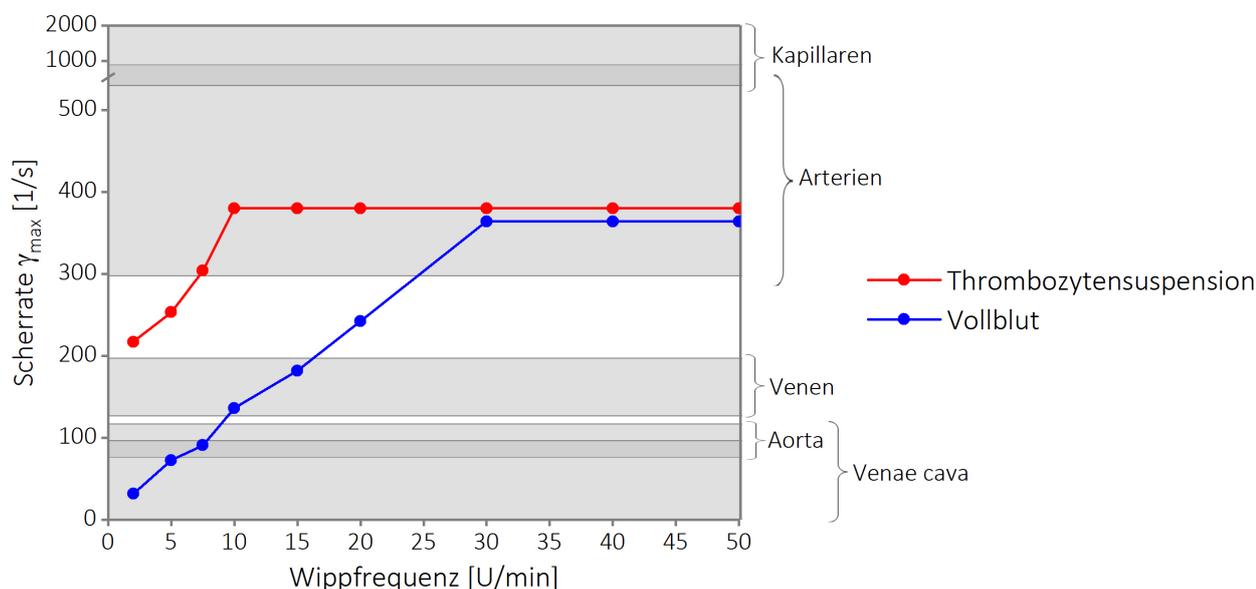


Abb. 3.5: **Scherraten für Vollblut und Thrombozytensuspension bei Wippgeschwindigkeiten von 2 U/min bis 50 U/min.** Die grauen Bereiche entsprechen *in vivo* Werten der Scherraten von Vollblut in verschiedenen Blutgefäßen (nach [274, 213, 158, 305, 232]). Die Scherraten im Kanal erreichen einen maximalen Wert von 364 s^{-1} für das Vollblut und 380 s^{-1} für die Thrombozytensuspension, was die Strömungsbedingungen in Arterien widerspiegelt. Bei niedrigeren Wippfrequenzen sind venöse Strömungsbedingungen einstellbar.

3.2.3 Erfüllung der Voraussetzungen des Hagen-Poiseuille-Gesetzes

Die Voraussetzungen, unter denen das Hagen-Poiseuille-Gesetz gilt, werden in Bezug auf das entwickelte System im Detail überprüft:

Kanalgeometrie: Die Geometrie des Kanals erfüllt die Voraussetzungen des Hagen-Poiseuille-Gesetzes: Der rechteckige Querschnitt ist über die gesamte Länge des Kanals unverändert und der Werkstoff ist steif genug, um keine Verformung des Querschnitts während des Wippzyklus zuzulassen. Außerdem ist die Länge des Kanals im Vergleich zu dem untersuchenden Bereich sehr lang ($l \ll b, h$), sodass sich das parabolische Geschwindigkeitsprofil vollständig entwickeln kann.

Flüssigkeit: Beim Hagen-Poiseuille-Gesetz ist die Flüssigkeit homogen und ihre Viskosität ist gleich für alle Scherraten. In großen Gefäßen und in Kanälen, deren Durchmesser im Vergleich zu den Abmaßen der Erythrozyten ($7\ \mu\text{m}$) groß sind, kann Blut als homogene Flüssigkeit betrachtet werden [201]. Das newtonsche Verhalten von Blut für Scherraten größer als $100\ \text{s}^{-1}$ wurde im Kapitel 3.2.1 behandelt. Während einem Wipp-Zyklus entstehen periodisch Scherraten unter $100\ \text{s}^{-1}$, für welche das Hagen-Poiseuille-Gesetz keine exakte Lösung liefern kann. Jedoch bleiben die maximalen Scherraten aus dem Graph 3.5 bestehen, da sie außerhalb dieser Zeitspannen ermittelt wurden. Lediglich für Wippfrequenzen kleiner als $10\ \text{U}/\text{min}$ sind die Scherraten zu niedrig, um das Blut als newtonsche Flüssigkeit zu betrachten: Die ermittelten Scherraten sind in diesem Bereich zu hoch angesetzt.

Strömungsbedingungen: Das Hagen-Poiseuille-Gesetz gilt für laminare, stationäre Strömungen. Der Übergang von laminarer Strömung zu turbulenter Strömung lässt sich mit der Reynolds-Zahl (Re) beschreiben. Unterhalb eines kritischen Werts von ca. $Re_{krit} = 2300$ bzw. $Re_{krit} = 2000$ ist die Rohrströmung bzw. die Spaltströmung laminar [304]. In den meisten Blutgefäßen ist das der Fall (mit Ausnahme der Aorta und der A. Pulmoralis, wenn die Blutgeschwindigkeit am höchstens ist, oder in der Nähe von Gefäßstenosen) [41]. Bei einem rechteckigen Querschnitt wird die Reynolds-Zahl mithilfe des hydraulischen Durchmessers D_H , wie in der Formel 3.5 zu sehen, ermittelt. Der hydraulische Durchmesser ist eine Ersatzgröße, die sich wie folgend aus der Kanalbreite b und der Kanalhöhe h berechnen lässt:

$$Re = \frac{\rho \bar{v}_{max}}{\mu} \cdot D_H = \frac{\rho \bar{v}_{max}}{\mu} \cdot \frac{2bh}{b+h} \quad (3.5)$$

Die jeweils erreichten Reynolds-Zahlen für Vollblut und Thrombozytensuspension bei Wippfrequenzen von $2\ \text{U}/\text{min}$ bis $50\ \text{U}/\text{min}$ sind im Graph 3.6(a) dargestellt und bestätigen, dass die Strömung im Kanal für alle Konfigurationen laminar bleibt.

Das klassische Hagen-Poiseuille-Gesetz ist nur für stationäre Strömungen anwendbar. Wenn eine Strömung periodisch ist, wirkt die Trägheit der Flüssigkeit der Etablierung eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils entgegen. Dieses Phänomen ist bei niedrigen Frequenzen vernachlässigbar (sog. „quasi-stationäre“ Strömung¹) [201]. Der Übergang zwischen quasi-stationärer und instationärer Strömung wird mit der Womersley-Zahl Wo beschrieben. Diese ist von der Frequenz der Strömung ω , der Dichte ρ und der dynamischen Viskosität μ der Flüssigkeit abhängig und wurde nach [173] berechnet:

$$Wo = \frac{h}{2} \sqrt{\frac{\omega \rho}{\mu}} \quad (3.6)$$

¹Häufige Terminologie-Fehler: „quasi-stationär“ bedeutet nicht, dass die Strömungsgeschwindigkeit annähernd konstant ist, sondern, dass der Volumenstrom nur vom unmittelbaren Druckunterschied bestimmt ist. Die Auswirkungen der Trägheit des Fluids auf die Strömung werden vernachlässigt.

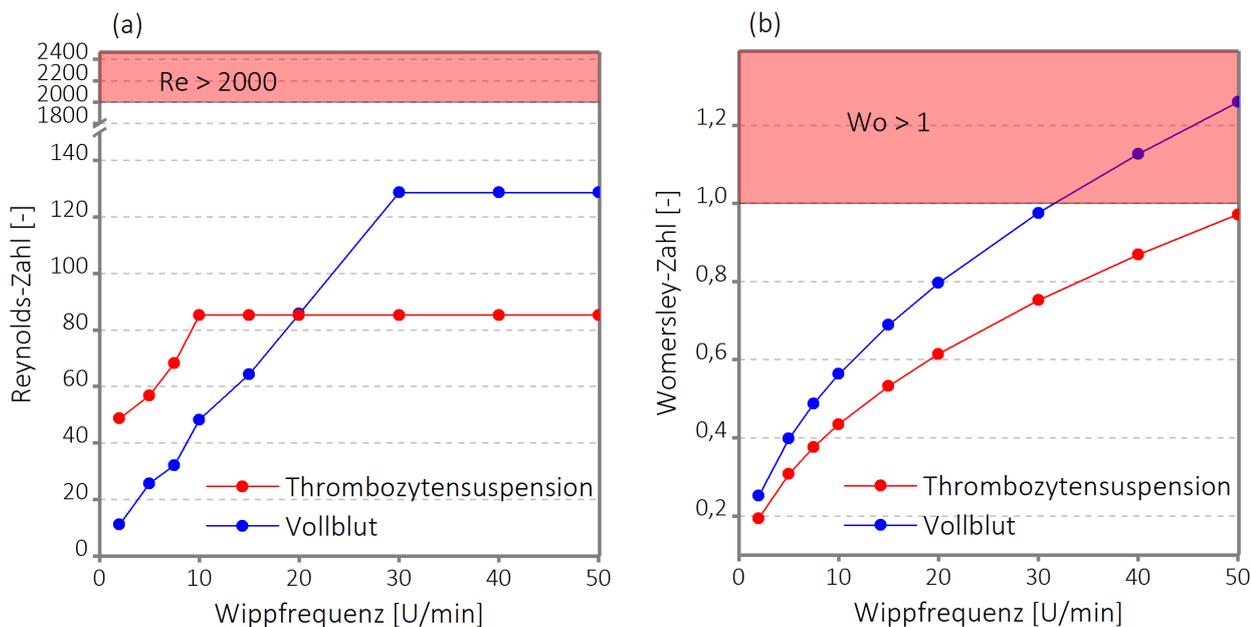


Abb. 3.6: **Reynolds-Zahl Re und Womersley-Zahl Wo für Wippfrequenzen von 2 U/min bis 50 U/min.** Beide Zahlen nehmen mit der Wippfrequenz zu. Die Reynolds-Zahl bleibt bei allen Wippfrequenzen unterhalb des kritischen Wertes von $Re_{krit} = 2000$. Hingegen übersteigt die Womersley-Zahl bei Vollblut und Wippfrequenzen $\omega > 30$ U/min den Wert 1 und stellt dort instationäre Strömungsbedingungen dar.

Der Verlauf der Womersley-Zahl über der Wippfrequenz des Systems wird im Graph 3.6(b) dargestellt. In der Fachliteratur wird ein Wert von $Wo = 1$ als maximaler Grenzwert für die quasi-stationäre Strömung angegeben [45, 98, 173]. So wie in vielen Blutgefäßen ist die Strömung von Vollblut im Kanal für hohe Wippfrequenzen (> 30 U/min) instationär [201]. Die Strömung der Thrombozytensuspension kann allerdings für alle Wippgeschwindigkeiten als quasi-stationär betrachtet werden ($Wo < 1$ für Wippfrequenzen bis zu 50 U/min).

Zusammenfassung: Die vorherige Analyse ermöglicht die Bestimmung der Wippfrequenzen, für welche die Voraussetzungen des Hagen-Poiseuille-Gesetzes gelten. Die Betriebspunkte des Inkubationssystems sind vorzugsweise in diesen Intervallen anzusetzen, da die Strömungsbedingungen hier eindeutig definiert werden können. Für die Thrombozytensuspension wurde gezeigt, dass das Gesetz für alle Wippfrequenzen gilt. Für Vollblut sind die Voraussetzungen des Gesetzes für Wippfrequenzen zwischen 10 U/min und 30 U/min erfüllt.

3.3 Biologische Validierung

Anhand des neuen Systems soll die Hämokompatibilität von Werkstoffen zuverlässig bewertet werden. Da für diese Arbeit die Bewertung von Kunststoffen von hoher Relevanz ist, muss die Analytik hierzu von ausreichender Sensitivität sein, um signifikante Unterschiede in der Hämokompatibilität von Proben ähnlicher Werkstoffklassen aufzuzeigen.

3.3.1 Beschreibung der Referenzproben

Werkstoffe und Probenherstellung

Für die Validierung der Analytik werden ein Silikon und drei Thermoplasten verwendet. Alle Kunststoffe weisen eine medizinische Zulassung vor und werden als Implantationswerkstoffe eingesetzt. Die Probenherstellung erfolgt beim Silikon durch Pressen und bei den Thermoplasten durch Extrusion gemäß der Beschreibung in Anhang C.1.

Als Vertreter der Silikonklasse wird ein HTV (Silpuran[®] UR 9030/60, Wacker Chemie AG, Deutschland) verwendet. Dieses für eine Langzeitimplantation vorgesehene Silikon hat die Biokompatibilitätstests nach ISO 10993 und USP Class VI bestanden [298].

Polymethylen (POM) ist, wie Silikon, ein halborganisches Polymer, da seine Grundkette alternierende Sauerstoff- und Kohlenstoffatome enthält [179]. Aufgrund seiner Dimensionsstabilität und seiner guten mechanischen Eigenschaften wird POM für die Herstellung von Präzisionsteilen eingesetzt [139]. POM findet zahlreiche Anwendungen in der Medizintechnik, im Besonderen für den Blutkontakt beispielsweise als Herzklappen-Okkluder oder Blutröhrchen [11, 104]. Für diese Untersuchung wird ein medizinisch optimiertes POM (Ticona Hostaform[®] MT24U01, Celanese Corporation, USA) verwendet [48].

Polypropylen (PP) und Polyethylen (PE) gehören zur Polyolefine-Klasse und sind beide Standardkunststoffe. PE wird als Implantatwerkstoff z. B. in Hüft- und Knieprothesen und als Bänderersatz eingesetzt. Im Kontakt mit Blut findet PE in Form von Schläuchen (Katheter) Anwendung [243, 104]. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein LD-PE (DowlexTM 2107GC, Dow Chemical Corp., USA) untersucht, welcher lebensmittelunbedenklich ist und die kurzzeitige Anwendung im Körper (< 72 Stunden) zulässt [75].

PP gilt trotz seiner geringeren Dichte gegenüber PE allgemein hin als fester und steifer [139]. Aufgrund seiner Klarheit und Beständigkeit gegenüber UV- und Gammabestrahlungen ist PP ein beliebter Kunststoff in der Medizintechnik und findet zahlreiche Anwendungen, u. a. mit Blutkontakt in Herzklappen und als Komponente für Dialysesysteme und Blutoxygenatoren [243, 104]. In dieser Arbeit wird ein medizinisches PP (Sabic[®] PCGH10, Sabic, Saudi-Arabien), welches USP Class VI zertifiziert ist, verwendet [239].

Charakterisierung der Probenoberfläche

Da es für jedes Polymer je nach Hersteller größere Abweichungen in der Rezeptur sowie in der Vor- und Nachbehandlung des Produktes gibt, ist die chemische Bezeichnung des Polymers nicht ausreichend, um die Werkstoffcharakterisierung zu ermöglichen, und erfordert deshalb eine initiale Untersuchung der Oberflächeneigenschaften [228, 230].

Tab. 3.2: **Oberflächeneigenschaften der Referenzproben.** Die Kontaktwinkelmessung erfolgt mit 2 μl Tropfen unmittelbar nach dem Kontakt mit der Probenoberfläche. Für die Rauheitsmessung werden die gängigen Kenngrößen Ra und Rz aus 24 einzelnen Profillinien gemittelt. Der Mittenrauwert Ra gibt die mittlere, arithmetische Abweichung eines Profils von der Mittellinie an und die Rautiefe Rz stellt die mittlere Summe der größten Profilspitze und des tiefsten Profiltals dar.

		Benetzbarkeit		Rauheit	
		Kontaktwinkel mit Wasser [°] (n=10)		Ra [μm] (n=24)	Rz [μm] (n=24)
POM	<i>Hostaform[®] MT24U01</i>	81,0 \pm 6,2		0,02 \pm 0,01	0,15 \pm 0,05
PP	<i>Sabic[®] PCGH10</i>	95,5 \pm 1,6		0,02 \pm 0,00	0,20 \pm 0,08
PE	<i>DowlexTM 2107GC</i>	106,7 \pm 2,2		0,34 \pm 0,12	3,31 \pm 1,44
Silikon	<i>Silpuran[®] UR 9030/60</i>	127 \pm 1,3		0,33 \pm 0,05	2,87 \pm 1,36

Daher wird nach der Reinigung der Proben (Reinigungsprotokoll in Anhang C.3.) zunächst der Kontaktwinkel mit Wasser gemessen, um hierdurch die Benetzbarkeit gegenüber wässrigen Flüssigkeiten zu evaluieren. Anschließend werden Topografie und Rauheit der Oberfläche mit berührungsloser Konfokalmikroskopie (μsurf , Nanofocus AG, Oberhausen, Deutschland) ermittelt, welche durch die Verschiebung der Fokussierungsebene eine dreidimensionale Rekonstruktion der Probenoberfläche in nanometergenauer Auflösung ermöglichen [199, 195]. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.2 dokumentiert und einzelne Profillinien der Werk-

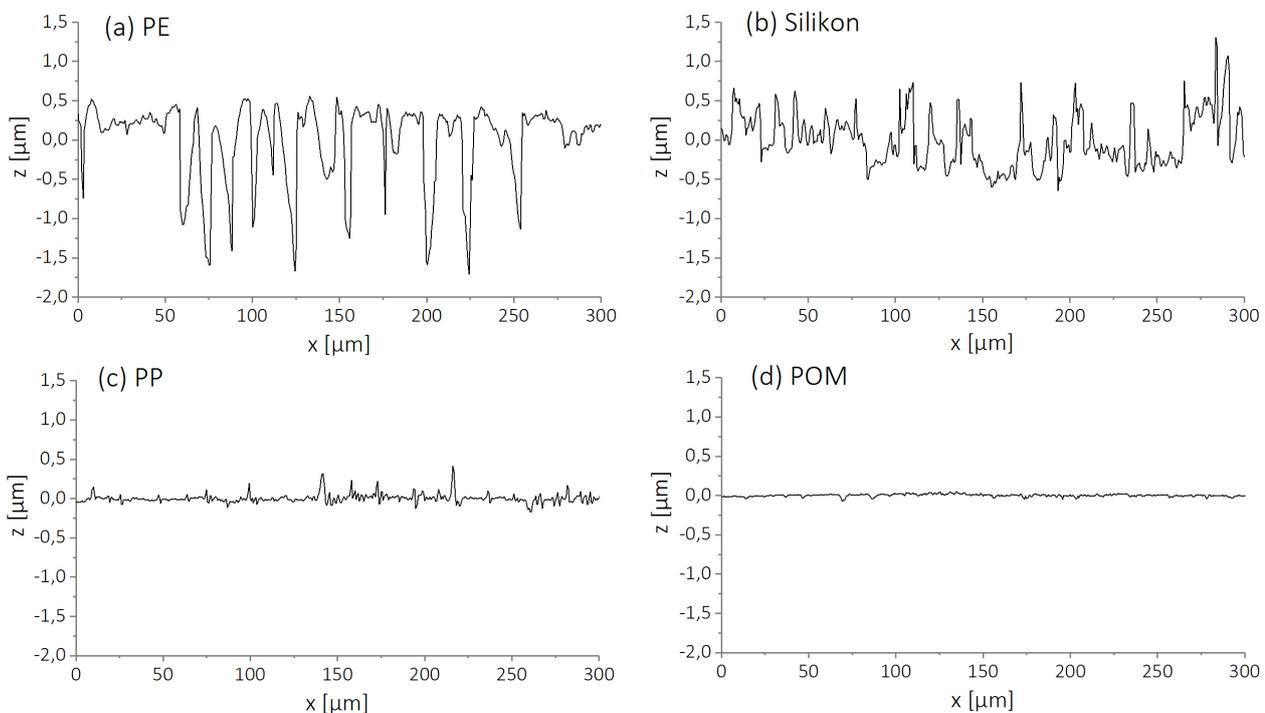


Abb. 3.7: **Exemplarische Darstellung des Oberflächenprofils der Referenzproben.** Die Topografie der Proben unterscheidet sich wesentlich: Silikon und PE sind deutlich rauer als PP und POM, die als sehr glatt eingestuft werden können.

stoffoberflächen werden exemplarisch in Bild 3.7 dargestellt.

Die Benetzbarkeit der Referenzproben mit Wasser erstreckt sich von hydrophil für POM bis zu stark hydrophob für Silikon. Die Werte ergeben sich aus einer Kombination der Oberflächenspannung des Kunststoffes und der Rauheit der Oberfläche (eine Erhöhung der Oberflächenrauheit verursacht eine Reduzierung der Benetzbarkeit [125, 255]). Im Vergleich zu anderen Kunststoffen hat POM eine relativ hohe Oberflächenenergie (40 mN/m [306]), welche die Hydrophilie der Probe erzeugt. PP bzw. PE haben vergleichbar niedrigere Oberflächenenergien (29-31 mN/m bzw. 31-35 mN/m [223]), wobei bei PE die erhöhte Oberflächenrauigkeit die Hydrophobie noch weiter verstärkt. Silikon weist eine im Vergleich sehr niedrige Oberflächenenergie (24 mN/m [223]) auf, welche kombiniert mit der erhöhten Rauheit die sehr starke Hydrophobie der Probe erklärt.

3.3.2 Auswahl der Analytik

Primäre Hämostase

Um den Einfluss des Werkstoffs auf die primäre Hämostase zu ermitteln, sind verschiedene Strategien möglich. Ein verbreiteter Einsatz ist die Messung der Anzahl von Thrombozyten im zirkulierenden Blut vor und nach dem Kontakt mit dem Werkstoff, wobei eine Reduzierung der Anzahl von Thrombozyten auf die Adhäsion, Aktivierung oder Aggregation hindeutet [190, 207, 90, 117]. Jedoch sind die Reproduzierbarkeit und die Sensitivität der Ergebnisse oft limitiert, weil die Messung sehr anfällig für externe Einflussfaktoren ist (z. B. Spendervariabilität). Im zirkulierenden Blut sind außerdem Aktivierungsprodukte aus dem Plasma nachweisbar, die aus der Degranulation der Thrombozyten entstehen [71]. Eine weitere Methode ist die Analyse der an der Werkstoffoberfläche adhärenen Blutbestandteile. Im Gegensatz zur Analyse zirkulierenden Bluts bietet diese Methode den Vorteil, eine direkte Untersuchung der Wirkungen des Werkstoffs zu ermöglichen. Die Relevanz dieser Untersuchung wurde bereits in der Fachliteratur diskutiert [205].

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Thrombozytenadhäsion gelegt, weil sie als Auslöser der zellulären Gerinnung gilt [163]. Eine qualitative Evaluierung der Thrombozytenadhäsion auf Werkstoffoberflächen erfolgt mit Rasterelektronenmikroskopie. Die Quantifizierung der Anzahl von adhärenen Thrombozyten wird mit dem ACP-Test durchgeführt. Im Folgenden wird das Funktionsprinzip des ACP-Tests beschrieben, das detaillierte Protokoll zur Blutvorbereitung und Durchführung des ACP-Tests ist im Anhang B.1. dokumentiert.

Thrombozytenkonzentrat (TK) wird aus frischem humanen Vollblut durch einen zweistufigen Zentrifugationsprozess gewonnen (siehe Abb. 2.2 im Kapitel 2.1.2). Eine Antikoagulation ist bei *in vitro* Untersuchungen zwangsläufig notwendig [34]. Für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion wird oft Zitrat als gerinnungshemmender Wirkstoff verwendet, weil es *in*

vitro keine spontane Thrombozytenaktivierung verursacht [115, 138, 251]. In den folgenden Untersuchungen wird das Blut während der Blutabnahme mit Zitrat (ACD-A) versetzt. Durch die Bindung der für die Gerinnung notwendigen Kalziumionen (Chelat-Komplex) wird die Koagulationskaskade gehemmt, sodass das Blut während der TK-Vorbereitung und der gesamten Versuchsdauer nicht gerinnen kann.

Weil die Blutspender sehr unterschiedliche Thrombozytenzahlen haben (150 bis $400 \times 10^3/\mu\text{l}$), ermöglicht die Herstellung von TK die Einstellung einer festen Zellkonzentration ($500 \times 10^3/\mu\text{l}$) und mindert dadurch die starken spenderabhängigen Variationen bei Wiederholungsversuchen. Die Zellkonzentration im TK wird mithilfe eines Hämatologieanalysators (KX-21N, Sysmex Europe GmbH, Deutschland) bestimmt. TK wird in dem Kanal des Inkubationssystems pipettiert und bei 37°C im Kontakt mit der Probe gehalten, damit die Thrombozyten an der Werkstoffoberfläche adhären können. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Die Versuchsparameter sind die Inkubationsdauer und Wippfrequenz. Nach der Inkubation wird das TK entfernt und eine Waschlösung (PBS, 37°C) in einem Reservoir pipettiert. Die Waschlösung fließt einmal durch den Kanal und wird anschließend vom zweiten Reservoir abpipettiert, sodass die überschüssigen Blutreste entfernt werden. Durch diese Waschprozedur ist gewährleistet, dass alle Proben gleichermaßen gewaschen werden: Das Fließen der Waschlösung ist von der Kanalgeometrie und nicht von den manuellen Pipettierungsvorgängen abhängig. Anschließend wird die Probe aus dem System entnommen und mindestens drei Ausschnitten (Durchmesser 12 mm) werden an unterschiedlichen Stellen entfernt und weiteruntersucht.



Abb. 3.8: **Inkubation von Thrombozytenkonzentrat.** Der Plattformschüttler trägt gleichzeitig 4 Referenzproben und wird in ein Wärmeschrank gestellt, um die Umgebungstemperatur bei 37°C konstant zu halten.

Die Quantifizierung der an der Probenoberfläche adhärenen Thrombozyten erfolgt durch die von Bellavite *et al.* entwickelte Prozedur: der ACP-Test [23]. Dieses Verfahren wird gegenüber dem klassischen LDH-Test bevorzugt angewendet, weil seine bessere Wirksamkeit in der Fachliteratur nachgewiesen worden ist [288]. Die adhärenen Zellen werden durch

eine Lyselösung, die das Detergens Triton X-100 enthält, zerstört. Die Lyse der Zellmembrane verursacht die Freigabe der zellgebundenen Enzyme saure Phosphatase (engl. Acid Phosphatase: ACP), ohne dabei ihre Aktivität zu beeinflussen. Die Zugabe des Substrates p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) führt in Reaktion mit dem Enzym ACP zur Bildung des Reaktionsproduktes p-Nitrophenol, dessen gelbe Farbe photometrisch bei der Wellenlänge 405 nm gemessen wird [23]. Gleichzeitig wird eine Verdünnungsreihe des TKs mit ACP-Test gemessen, was die Herstellung einer Standardgerade ermöglicht. Die Anzahl von adhärenenten Thrombozyten an der Probenoberfläche wird mithilfe dieser Kalibrierkurve berechnet.

Abbildung 3.9 zeigt die Ergebnisse eines Vorversuches mit unterschiedlichen Inkubationszeiten. Es wird gezeigt, dass die Thrombozytenadhäsion bei 60 min am höchsten ist, sodass eine Inkubationsdauer von 60 min als Standard für die Untersuchung ausgewählt wird.

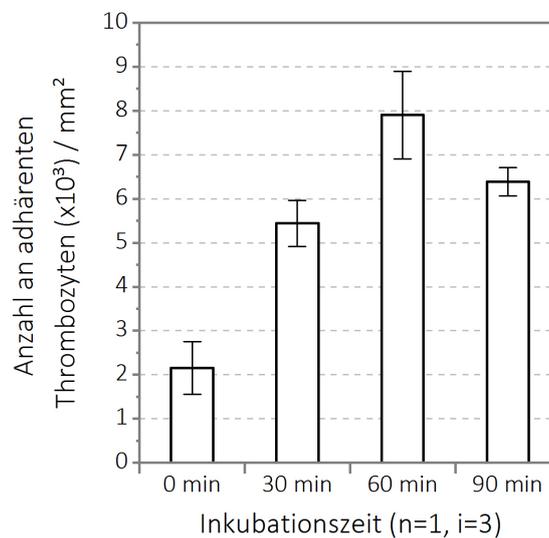


Abb. 3.9: **Thrombozytenadhäsion auf Silikon für unterschiedliche Inkubationszeiten.** Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Thrombozytenadhäsion zu und erreicht einen Maximalwert für 60 min. Nach 60 min nimmt die Thrombozytenadhäsion wieder ab, möglicherweise wegen Alterungseffekten des Bluts. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die Wippfrequenz des Schüttlers beträgt 15 U/min.

Sekundäre Hämostase

Neben der Wechselwirkung mit zellulären Blutbestandteilen spielt die Aktivierung der Gerinnungskaskade eine wesentliche Rolle in der Bildung und Stabilisierung von Blutgerinnsel. Die sekundäre Hämostase wird hauptsächlich durch klassische hämatologische Prüfungen untersucht. Diese bestehen aus der Messung von verschiedenen Koagulationszeiten des Blutplasmas nach Kontakt mit der Werkstoffoberfläche, wie beispielsweise die am häufigsten verwendete PTT-Messung (aus engl. partial thromboplastin time). Der Nachweis von Reaktionsprodukten über ELISA ist ebenso ein verbreiteter Untersuchungsansatz [71].

In dieser Arbeit wird die plasmatische Hämostase durch die Thrombinbildung im Blutplasma

evaluiert (Thrombin Generation Assay, TGA). Thrombin ist ein zentraler Gerinnungsfaktor, weil es sich exponentiell bildet und als Verstärker der Gerinnung gilt [176]. Die Thrombinmenge ist also ein sehr sensibles Anzeichen für die Aktivierung der Koagulationskaskade. Die gute Sensitivität und Reproduzierbarkeit dieser Methode gegenüber klassischen Verfahren wurde in der Fachliteratur mehrmals dokumentiert [206, 88, 123]. Das Prinzip des Tests wird im Folgenden erläutert und das detaillierte Protokoll ist im Anhang B.2. dokumentiert.

Die Untersuchung wird nach der von van Oeveren *et al.* beschriebenen Prozedur durchgeführt [206]. Zunächst wird aus Zitratblut PPP gewonnen (siehe Abb. 2.2 im Kapitel 2.1.2). Durch Zugabe von Thrombin im Überschuss wird ein Fibringerinnsel gebildet, das vom restlichen Plasma entfernt wird. Auf diese Weise entsteht fibrinogenfreies PPP (ff-PPP), welches während der Untersuchung nicht gerinnen kann. Das ff-PPP wird mit dem Werkstoff im Inkubationssystem für 15 min bei 37 °C in Kontakt gebracht, damit die Kontaktphase der Koagulation aktiviert wird. Weil das ff-PPP Zitrat als Antikoagulanzen enthält, ist die Entstehung von Thrombin blockiert. Nach der Inkubation wird das ff-PPP mit Kalziumionen und Phospholipiden versetzt, sodass die Gerinnung fortgesetzt wird und Thrombin generiert werden kann. Falls der Werkstoff eine thrombogene Wirkung aufweist, wird die Kontaktphase stark aktiviert und das Thrombin bildet sich nach Rekalzifizierung besonders schnell und in großem Ausmaß. Folglich werden in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen. Die Quantifizierung der Thrombinentstehung erfolgt mit einem chromogenen Substrat (S2238), das durch die Wirkung von Thrombin das gelbe Chromophor p-nitroanilin freisetzt. Dieses ist photometrisch bei 405 nm messbar. Außerdem wird eine Kalibrierungskurve erstellt, um die Bestimmung der Thrombinkonzentration zu ermöglichen.

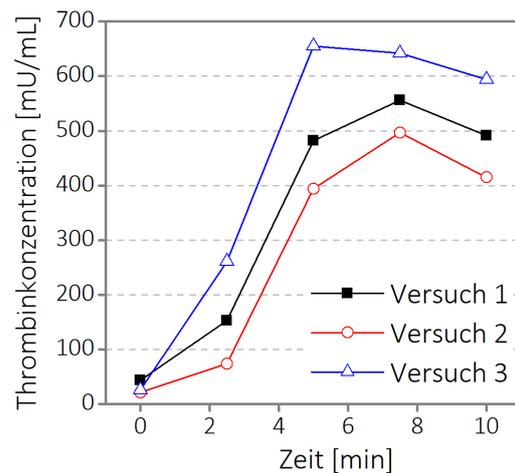


Abb. 3.10: **Thrombinbildung über die Zeit.** Der zeitliche Verlauf der Thrombinbildung nach Kontakt mit der Positivkontrolle (PA) wird für drei unabhängige Wiederholungsversuche dargestellt. Das Thrombin bildet sich exponentiell innerhalb weniger Minuten und wird dann schnell wieder abgebaut. Reduzierte Thrombinkonzentrationen und verlängerte Thrombinzeiten deuten auf hämokompatible Eigenschaften des Werkstoffs.

Die Abbildung 3.10 zeigt die charakteristische Kurve der Thrombinbildung über die Zeit nach Kontaktaktivierung mit der Positivkontrolle (Polyamid (PA), siehe Kapitel 3.3.4). Der zeitliche Verlauf ist konform zu den Literaturwerten, die Reproduzierbarkeit wird mit drei unabhängigen Versuchen überprüft [224]. Für den quantitativen Vergleich mehrerer Proben wird in einem nächsten Schritt die Fläche unter der Thrombinkurve (Thrombinaktivität, engl. endogenous thrombin potential, siehe Anhang B.2.) berechnet [124].

3.3.3 Einfluss der Flussbedingungen auf die Hämokompatibilitätsprüfung

Der Einfluss der Flussbedingungen auf die Hämokompatibilität wird mit Referenzproben aus Silikon untersucht. ACP- bzw. TGA-Versuche werden mit Thrombozytensuspension (TK) bzw. thrombozytenarmes Plasma (PPP) durchgeführt, wobei für jeden Versuch jeweils eine Probe unter dynamischen Flussbedingungen inkubiert wird (15 U/min^1) und eine Probe statisch im Inkubationssystem liegt (0 U/min). Dies ermöglicht die direkte Ermittlung des Einflusses der Flussbedingungen, weil alle anderen externen Versuchsparameter unverändert bleiben (Spenderblut, Werkstoff, Geometrie, Temperatur, Inkubationszeit, usw.).

Abbildung 3.11 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen. Auf dem Graph (a) wird die Thrombinaktivität von Proben, die entweder statisch oder dynamisch inkubiert worden sind, dargestellt. Dieser komparative Versuch verdeutlicht den Einfluss der Scherrate auf die plasmatische Gerinnung. Der Graph (b) zeigt die Ergebnisse einer ähnlichen Untersuchung, die die Thrombozytenadhäsion für verschiedene Flussbedingungen erfasst. Dieser Versuch gibt Hinweise auf den Einfluss der Scherrate auf die zelluläre Gerinnung.

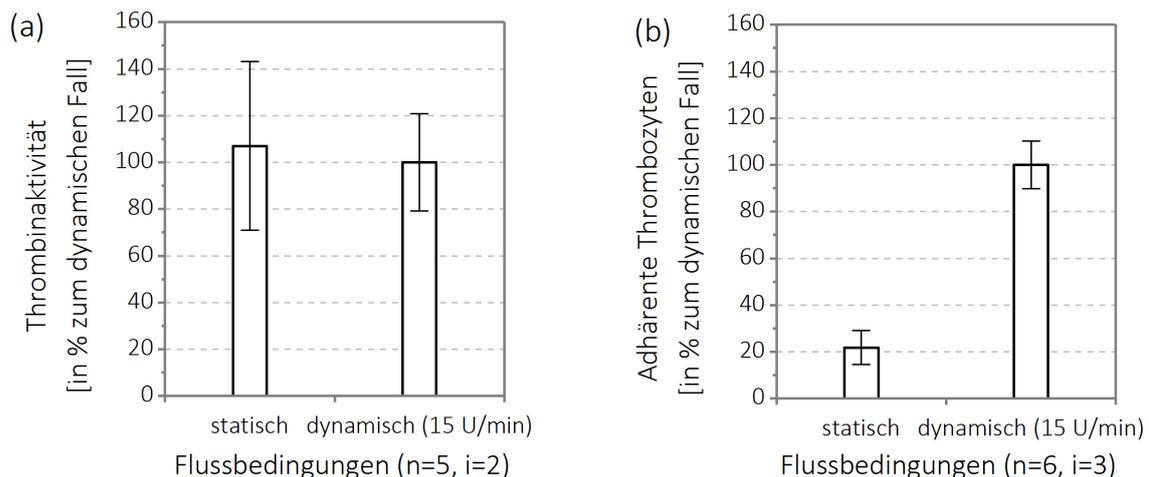


Abb. 3.11: **Einfluss der Flussbedingungen auf die Hämokompatibilität.** (a) Plasmatische Gerinnung: Es wurde kein Unterschied zwischen der Thrombinaktivität unter statischen und dynamischen Flussbedingungen beobachtet. (b) Zelluläre Gerinnung: Unter dynamischen Flussbedingungen ist die Thrombozytenadhäsion auf das Silikon um den Faktor 5 deutlich höher als unter statischen Flussbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

¹Dies entspricht der arteriellen Flussbedingungen, siehe Abbildung 3.5 in Kapitel 3.2.2.

In dieser Untersuchung haben die Flussbedingungen die Thrombinaktivität nicht beeinflusst. Diese Beobachtung stimmt mit anderen theoretischen und experimentellen Literaturbeiträgen überein. Rollason und Sefton haben in *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Thrombinbildung in einer durchströmten Küvette unabhängig zur Durchflussrate ist [235]. Nur unter statischen Bedingungen kann eine beschleunigte Thrombinbildung gemessen werden. Eine theoretische Erklärung wurde von Basmadjian *et al.* [18] vorgeschlagen: Aufgrund der engen Abhängigkeit von der Stofftransportrate der Umwandlung von Gerinnungsfaktor XI zu XI_a, werden im stehenden Fluid große Mengen von Thrombin gebildet. Im Gegenteil, bei der Erhöhung des Durchflusses und trotz eventueller verstärkter Aktivierung der Kontaktphase werden weniger Gerinnungsfaktoren XI_a und Thrombin gebildet. Diese Hypothese würde erklären, warum in dieser Untersuchung keine Erhöhung der Thrombinaktivität unter dynamischen Flussbedingungen beobachtet wird. Diese Überlegung stimmt außerdem mit den Arbeiten von Ismagilov *et al.* überein: Sie haben gezeigt, dass die Initiierung der Koagulation nur unter einem Schwellenwert der Scherrate und Probenoberfläche möglich ist [143, 254]. Sie vertreten die Meinung, dass aktivierte Gerinnungsfaktoren sich ausschließlich unter sehr niedrigen Scherraten in der Nähe der Probenoberfläche ansammeln können und die Bildung eines Klumpens ermöglichen.

Da dynamische Flussbedingungen keinen oder negativen Einfluss auf die Initiierung der Koagulation haben, werden nun in dieser Arbeit die Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung unter statischen Flussbedingungen durchgeführt. Aus diesem Grund ist das dynamische Inkubationssystem nicht mehr notwendig. Zudem, um Zeit und Kosten zu sparen, werden scheibenförmige Proben (Durchmesser 12 mm) in einer Mikrotiterplatte untersucht.

Im Gegensatz zur plasmatischen Gerinnung ist die zelluläre Gerinnung mit erhöhten Flussbedingungen stark aktiviert. Im Bild 3.11 (b) ist die Thrombozytenadhäsion auf dem Referenzsilikon zu sehen, wobei die Werte unter dynamischen Flussbedingungen das 5-fache der Werte unter statischen Bedingungen erreichen. Der signifikante Einfluss dieses Phänomens auf die Ergebnisse der Hämokompatibilitätsprüfung wird in einem nächsten Versuch verdeutlicht. Die 4 Referenzwerkstoffe (beschrieben im Kapitel 3.3.1) werden gleichzeitig und mit den gleichen TK entweder unter statischen Flussbedingungen (0 U/min) oder dynamischen Flussbedingungen (15 U/min) inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

Unter statischen Flussbedingungen sind kaum Unterschiede zwischen den Mengen an adhärenen Thrombozyten messbar. Dennoch erreicht die Thrombozytenadhäsion unter Einfluss der Scherrate Werte, die bis um das 10-fache höher sind. Außerdem erscheinen die Unterschiede zwischen den getesteten Materialien deutlich ausgeprägter, sodass vergleichende Aussagen zu deren Hämokompatibilität bedeutsam werden. Aufgrund dieser Erkenntnis ist die Inkubation unter dynamischen Bedingungen zwingend notwendig und die Wippfrequenz des Schüttlers wird auf 15 U/min als Standard für die folgenden Untersuchungen mit TK festgelegt.

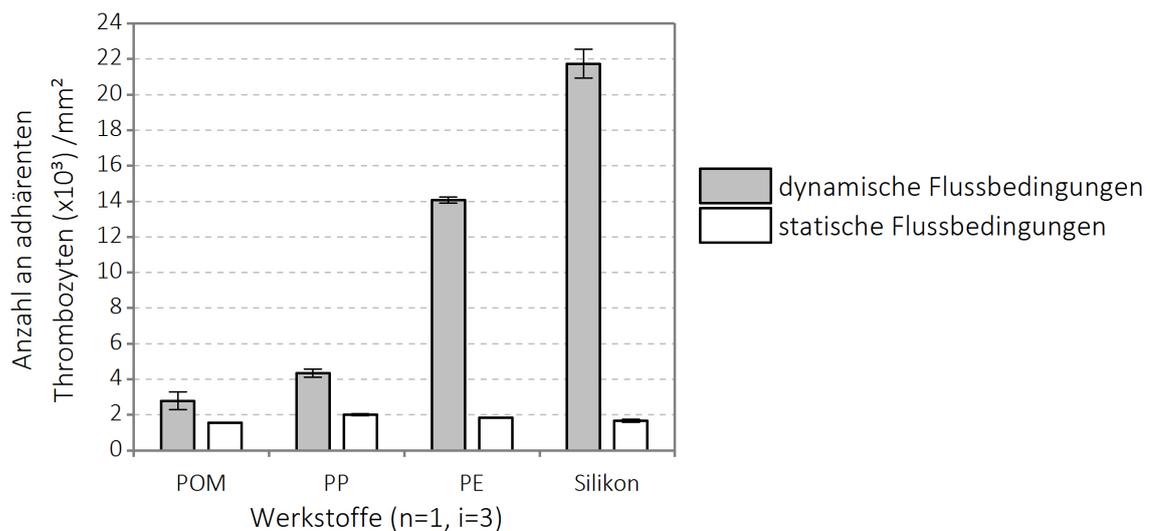


Abb. 3.12: **Thrombozytenadhäsion auf den Referenzwerkstoffen unter statischen und dynamischen Flussbedingungen.** Unter statischen Flussbedingungen (Wippfrequenz 0 U/min) ist die Anzahl an adhärenenten Thrombozyten ca. 2000 Zellen/mm² für alle Werkstoffe. Allerdings, wenn dynamische Flussbedingungen herrschen (Wippfrequenz 15 U/min), nimmt die Thrombozytenadhäsion deutlich zu und erreicht Werte bis zu 21700 Zellen/mm² für die Silikonprobe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die Inkubationszeit beträgt 60 min.

Dieser Versuch bestätigt zusätzlich, dass die gezählten Thrombozyten ausschließlich durch die Scherraten an der Werkstoffoberfläche adhärert sind, und nicht in Blutresten enthalten sind, die durch eine unvollständige Waschprozedur im Kanal zurückhängen bleiben könnten.

Die flussinduzierte Thrombozytenadhäsion ist in der klinischen Hämostaseologie ein bekanntes Phänomen. Die Thrombozytenadhäsion ist abhängig von der Stofftransportrate im Blutgefäß und ihre Initiierung ist mit erhöhtem Blutfluss deutlich verstärkt [204, 259]. Die Relevanz dieser Erscheinung für die Hämokompatibilitätsprüfung wurde in der Fachliteratur bereits thematisiert, denn implantierte Biomaterialien weisen massive thrombotische Probleme unter hohen dynamischen Scherkräften auf [268]. Diese Erkenntnis bestätigt zusätzlich die hohe Relevanz der Prüfung der Thrombozytenadhäsion unter dynamischen Flussbedingungen und beweist die Notwendigkeit der Nutzung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Inkubationssystems. Allerdings werden in der Praxis oft statische *in vitro* Untersuchungen der Thrombozytenfunktion durchgeführt [114, 267, 287, 323, 44, 263, 171, 301, 317, 258, 310, 286].

Interessanterweise werden die zwei Gerinnungsprozesse bei unterschiedlichen Flussbedingungen aktiviert. Im stehenden Fluid oder bei langsamem Fluss wird die plasmatische Gerinnung stark aktiviert, während die zelluläre Gerinnung hohe Scherraten bevorzugt. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen den zwei Gerinnungsprozessen ist die Bildung eines Thrombus bei allen Flussbedingungen möglich [247]. Klinische *in vivo* Beobachtungen scheinen diese Erkenntnis zu bestätigen: Unter arteriellen Flussbedingungen werden oft sog. weiße Thrombi gebildet, welche vorzugsweise aggregierte Thrombozyten enthalten, z. B. nach der Ruptur

einer arteriosklerotischen Ablagerung [113, 244, 174]. Im Gegensatz dazu entstehen venöse Thrombi durch die Aktivierung des Koagulationssystems. Sie enthalten viele Erythrozyten, die in einem Fibrinklumpen gefangen sind (sog. rote Thrombi) [113, 174, 217]. Aus diesen Gründen wird in dieser Arbeit die Hämokompatibilität unter differenzierten Flussbedingungen untersucht: statisch für die plasmatische Gerinnung und dynamisch für die zelluläre Gerinnung.

3.3.4 Bewertung der Hämokompatibilität der Referenzproben

Versuchsdesign und Statistik

Eine bekannte experimentelle Herausforderung bei der Hämokompatibilitätsprüfung ist die erhebliche Variabilität der Bluteigenschaften der Spender [190]. Die Hämostase weist bei gesunden Spendern derart extreme physiologische Unterschiede auf, dass ein direkter Werkstoffvergleich nur unter der Verwendung des gleichen Spenderbluts möglich ist [207]. Da die Blutmenge einer Spende limitiert ist, wird oft die Anzahl von Proben jedes Werkstoffs pro Versuch begrenzt. Um dieses Problem zu lösen, müssen zahlreiche Wiederholungsversuche durchgeführt werden [228]. Zum Beispiel empfehlen Seyfert *et al.* eine Anzahl von 2 bis 6 Wiederholungsversuche, um die Signifikanz der Ergebnisse bewerten zu können [251].

In dieser Arbeit wird ein ähnlicher Ansatz gefolgt: Um eine aussagekräftige Bewertung der getesteten Werkstoffe sicherzustellen, wird die Spendervariabilität in die Untersuchung einbezogen. Dafür werden die werkstoffvergleichenden Versuche mindestens 6 bis 8 Mal mit unterschiedlichen Blutspendern wiederholt. Im Vergleich zu Untersuchungen mit dem gleichen Spenderblut vergrößert zwar diese Vorgehensweise die Messunsicherheit der Ergebnisse aber, falls signifikante Unterschiede in der Hämokompatibilität der Werkstoffe gemessen werden können, ist sichergestellt, dass die Ergebnisse für ein breites Spektrum von Spendern gültig sind. Versuche mit weniger Wiederholungen gelten als orientierende Versuche und werden nicht mit einer statistischen Analyse bewertet.

Für jeden einzelnen ACP-Versuch werden zunächst die Werte der Triplikat-Proben gemittelt, sodass jedem Werkstoff ein Wert zugeordnet wird. Dieser Schritt ist für die TGA-Versuche nicht notwendig. Um die Wiederholungsversuche miteinander vergleichen zu können, werden die Messwerte auf den Wert der Referenzprobe normiert (in der Regel reines Silikon). Es ergeben sich also zwischen 6 und 8 Werte für jeden Werkstoff. Weil diese Werte keine Normalverteilung aufweisen, wird der statistische Vergleich zwischen den getesteten Werkstoffen mit einer nicht-parametrischen Varianzanalyse durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test ist das nicht-parametrische Pendant der klassischen einfachen ANOVA [61]. Er wird mit der Software IBM SPSS Statistics durchgeführt, der Vergleich zwischen Werkstoffpaaren wird durch eine follow-up Analyse ausgeführt, wie beschrieben in [82]. Folgende Signifikanzwerte werden betrachtet: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***); $p \leq 0,001$ (****). Im Fol-

genden werden die Anzahl von Messungen pro Versuch bzw. die Anzahl von unabhängigen Wiederholungsversuchen mit den Buchstaben i bzw. n bezeichnet.

Primäre Hämostase

Die gemittelten Ergebnisse der sechs unabhängigen Thrombozytenadhäsionstests sind im Bild 3.13 dargestellt. Silikon weist eine verstärkte Thrombozytenadhäsion im Vergleich zu den anderen drei Referenzwerkstoffen, wobei die Unterschiede zu POM und PP signifikant sind ($p < 0,005$).

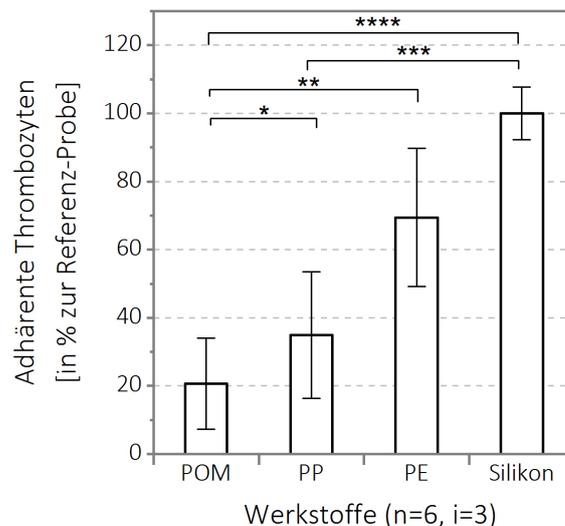


Abb. 3.13: **Thrombozytenadhäsion auf POM, PP, PE und Silikon (ACP-Test) nach Inkubation mit Thrombozytensuspension (TK) bei 15 U/min.** Die maximale Thrombozytenadhäsion befindet sich auf den Silikonproben. Am geringsten ist sie auf POM (21 % der Wert von Silikon) und PP (35 %). PE weist eine mittlere Thrombozytenadhäsion auf (69 %). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***); $p \leq 0,001$ (****).

Diese Befunde werden mit Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestätigt. Die REM-Aufnahmen sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Zahlreiche Thrombozytenaggregate befinden sich auf der Silikonoberfläche und weisen eine fortgeschrittene Aktivierungsform mit langen Pseudopodien auf. Auf der Oberfläche von PE und PP adhären einzelne Thrombozyten, die auch Pseudopodien besitzen. Auf POM hingegen sind wenige und isolierte Thrombozyten zu finden, die wenig aktiviert sind.

Diese zwei komplementären Untersuchungen beschreiben die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Referenzwerkstoffen. Thrombozyten adhären vorzugsweise auf hydrophoben Oberflächen wie PE und Silikon (siehe Oberflächeneigenschaften im Kapitel 3.3.1). Die weniger hydrophoben PP- und POM- Proben weisen hingegen eine niedrigere Thrombozytenadhäsion auf. Außerdem korreliert die Thrombozytenadhäsion mit den Rauheitswerten der Proben: Silikon und PE sind rauer als PP und POM und interagieren stärker mit Thrombozyten. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen Studien überein, die gezeigt haben, dass

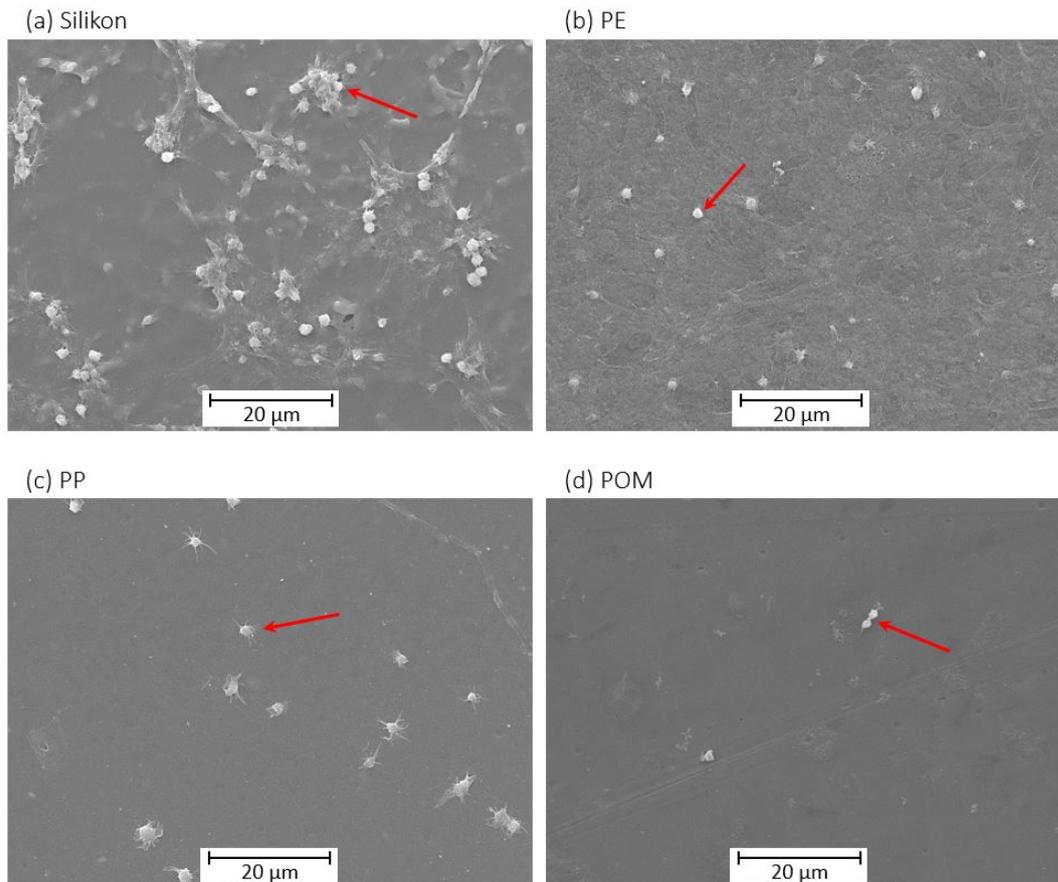


Abb. 3.14: REM-Aufnahmen der Oberfläche der Referenzproben nach Inkubation mit TK bei 15 U/min. Die adhärennten Thrombozyten sind mit roten Pfeilen markiert und sind an ihrer typischen Form mit ausgebreiteten Pseudopodien erkennbar (sekundäre Elektronen, Beschleunigungsspannung 5 kV, Vergrößerung 1500-fach).

hydrophobe und raue Oberflächen höhere Thrombozytenadhäsion verursachen, als hydrophile und glatte Oberflächen [234, 215, 165, 318, 302, 287, 33, 265, 233]. Spijker *et al.* konnten nachweisen, dass adhärennte Thrombozyten sich unter dynamischen Flussbedingungen von einer hydrophilen Oberfläche ablösen können, aber auf hydrophoben Oberflächen fest adhärennt bleiben [266]. Dies bestätigt, dass das Inkubationssystem für die Untersuchung der Thrombozyten/Werkstoff-Wechselwirkungen geeignet ist.

Sekundäre Hämostase

Trotz wiederholten Optimierungsschleifen der experimentellen Methodik lieferte die Untersuchung der Thrombinbildung mit den vier Referenzwerkstoffen in ersten Orientierungsversuchen keine differenzierte Ergebnisse. Hinweise aus der Fachliteratur deuten auf eine mögliche Erklärung hin: Laut Rollason und Sefton ist die Thrombinbildung unabhängig von der Oberflächenchemie, wenn die Oberfläche eine mittlere Thrombogenität aufweist (z. B. für Polymere) [235]. Basmadjian *et al.* behaupten, dass bei langsamem Fluss und stehendes Fluid die Umwandlungsrate des Gerinnungsfaktors XI in XI_a für alle Oberflächen sehr hoch sind [18].

Dies könnte dazu führen, dass der Einfluss der Oberfläche auf die Thrombinbildung nicht differenziert detektiert werden kann.

Aus diesem Grund wurde nach einem anderen Referenzwerkstoff gesucht, dessen Thrombogenität höher ist, um differenzierte Ergebnisse erzielen zu können. Dieser Werkstoff sollte dann als Positivkontrolle für die Untersuchung der Thrombinbildung gelten. Als geeignetes Polymer erwies sich Polyamid (PA) Ultramid Typ B27E (BASF, Deutschland). Die Ergebnisse der Untersuchung mit den zusätzlichen Polyamid-Proben sind in Abbildung 3.15 zu sehen. PA weist tatsächlich eine deutlich stärkere Aktivierung der Koagulationskaskade als die anderen Referenzwerkstoffe auf. Die Unterschiede sind hoch signifikant ($p < 0,001$). Für POM, PP, PE und Silikon ist keine ausgeprägte Aktivierung der Koagulationskaskade nachweisbar. Das starke Aktivierungspotenzial vom PA liegt möglicherweise an seiner höheren Polarität. Der Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf die Aktivierungsphase wird im Kapitel 5.3 genauer diskutiert.

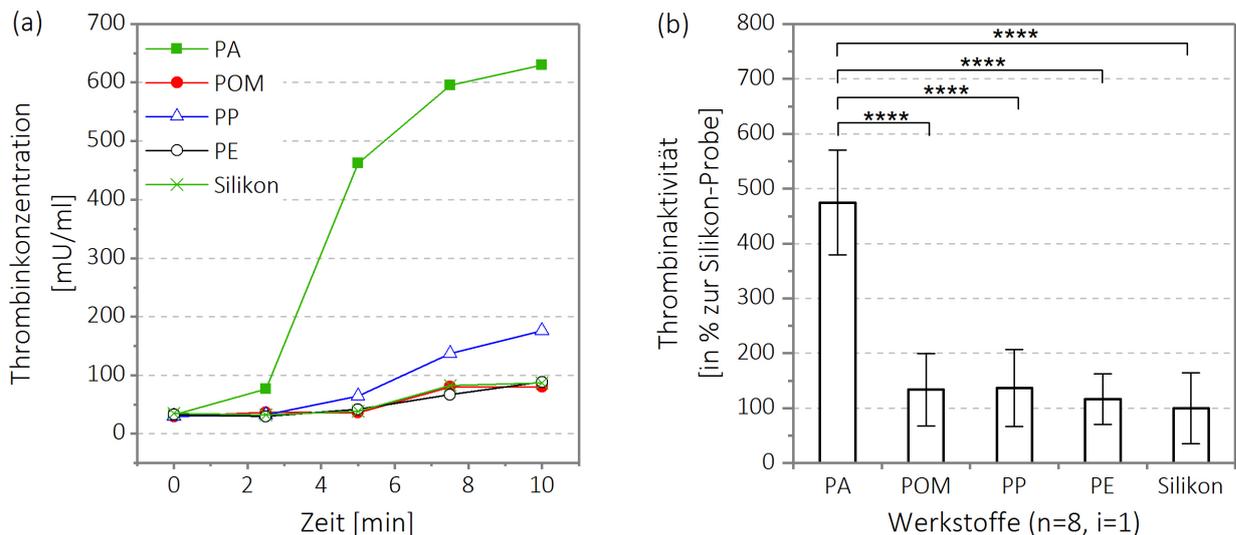


Abb. 3.15: **Thrombinbildung auf PA, POM, PP, PE und Silikon (TGA-Test) nach Inkubation mit fibrinogenfreiem Plasma unter statischen Bedingungen.** (a) Thrombinbildung über die Zeit für einen exemplarischen Versuch. (b) Thrombinaktivität gemittelt über die 8 Wiederholungsversuche. POM, PP, PE und Silikon weisen sehr ähnliche Werte auf, die auf eine niedrige Aktivierung der Koagulationskaskade hindeuten. Nur beim Kontakt mit PA ist eine wesentlich stärkere Thrombinbildung zu beobachten (ca. 5-faches des Silikons). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***) ; $p \leq 0,001$ (****).

3.4 Hämolytisches Potential des Inkubationssystems

Testsysteme zur Hämokompatibilitätsprüfung sollen keine traumatische Zirkulation des Bluts erzeugen und eine Beschädigung der Blutbestandteile minimieren [205]. In diesem Kapitel wird die Beschädigung der Erythrozyten durch die Bestimmung des freien Hämoglobins im Blutplasma nach Inkubation von Vollblut im System gemessen [71].

Für diese Untersuchung wird Silikon vom Typ Silpuran[®] UR 9030/60 verwendet. Frisch abgenommen und mit Antikoagulanzen versetztes Vollblut wird in den verschiedenen Inkubationskammern pipettiert. Gleichzeitig werden drei Proben bei 30 U/min inkubiert, drei bei 10 U/min und eine letzte Vorrichtung statisch (0 U/min). In dieser Zeit können die Blutzellen aufgrund der entstehenden Scherraten beschädigt werden und, im Fall der Erythrozyten, freies Hämoglobin freisetzen. Bei 30 U/min sind die Scherraten maximiert und entsprechen Flussbedingungen im arteriellen Bereich. Bei 10 U/min erreichen die Scherrkräfte mittlere Werte, die den venösen Bereich widerspiegeln (siehe Abb. 3.5 in Absatz 3.2.2). Blutproben werden nach 30, 60 and 90 Minuten entnommen, und zwei Mal bei 1000 g zentrifugiert, um das Blutplasma anschließend zu isolieren.

Für den Hämoglobinnachweis werden die Absorptionspeaks des Hämoglobin bei 415, 541 und 577 nm ausgenutzt. Hierdurch kann mit UV-Spektroskopie freies Hämoglobin nachgewiesen werden. Zahlreiche Quantifizierungsmethoden basieren auf der Messung dieser Peaks und werden in der Fachliteratur beschrieben [178]. In dieser Arbeit wird die Methode von Harboe aufgrund der geringen Konzentration vom Hämoglobin im Blutplasma vorgezogen [112]. Diese Methode analysiert die Absorption vom höchsten Hämoglobin-Peak im Blutplasma bei 415 nm. Der Hämolyse-Index (HI) wird als Verhältnis der Konzentration von freiem Hämoglobin in Blutplasma (PHb) zur Hämoglobinkonzentration im Vollblut (THb) unter Berücksichtigung des Hämatokrit (HCT) definiert [193, 151]:

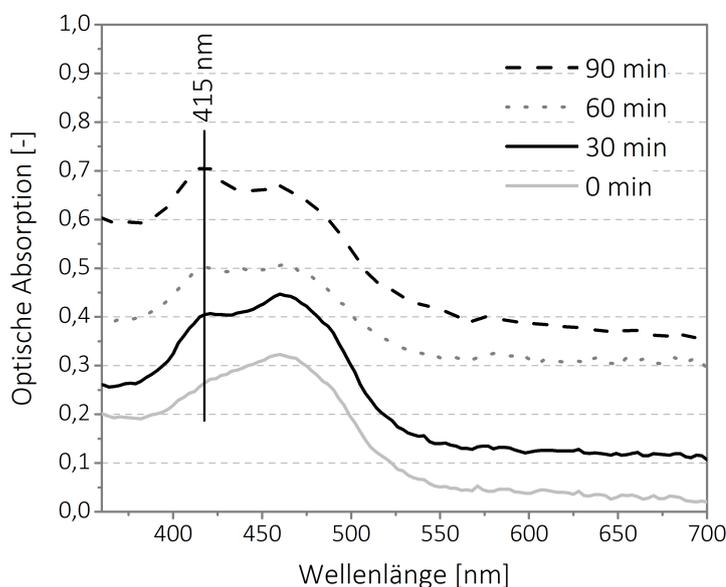


Abb. 3.16: **UV-Spektren von Blutplasma nach Inkubation des Vollbluts bei 30 U/min.** Die Inkubationszeiten betragen 0, 30, 60 und 90 min. Bei 405 nm und Inkubationszeiten von 30 bis 90 min ist ein Peak nachweisbar, welcher auf das freie Hämoglobin zurückzuführen ist. Mit der Inkubationsdauer nimmt die Höhe des Peaks zu. Andere Hämoglobin-Peaks bei 541 nm und 577 nm sind allerdings nicht sichtbar.

$$HI [\%] = \frac{(1 - \frac{HTC}{100}) \times PHb}{THb} \times 100 \quad (3.7)$$

Abbildung 3.16 zeigt die UV-Spektren von Blutplasma nach Inkubation des Vollbluts im Testsystems bei 30 U/min. Bei zunehmenden Inkubationszeiten nimmt die optische Absorption bei 415 nm ebenfalls zu, was zu einer Erhöhung der Hämoglobinkonzentration im Blutplasma zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine leichte Hämolyse während der Inkubation im System stattfindet.

Die quantitative Bestimmung ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Unter statischen Bedingungen sind die Hämoglobinwerte nach 90 min im Vergleich zu den Werten ohne Inkubation leicht erhöht. Diese Erhöhung lässt sich auf die Schädigung des Bluts durch das Pipettieren und die zeitliche Zersetzung des Bluts zurückführen. Unter dynamischen Bedingungen sind die Hämoglobinwerte höher als unter statische Bedingungen, aber noch im niedrigen Bereich für das freie Hämoglobin im Blutplasma von gesunden Menschen (0 mg/dl zu 10 mg/dl [71]). Bei hoher Scherrate (364 s^{-1} bei 30 U/min, arterielle Flussbedingungen) sind außerdem die Hämoglobinwerte bis zu 40 % höher als bei mittlerer Scherrate (137 s^{-1} , venöse Flussbedingungen). Dies bestätigt die Vermutung, dass erhöhte Scherrate im Inkubationssystem die Hämolyse verursacht. Eine Zeitabhängigkeit ist außerdem bemerkbar, wobei längere Inkubationszeiten eine Erhöhung der Hämolyse verursachen. Der höchste Hämoglobinwert

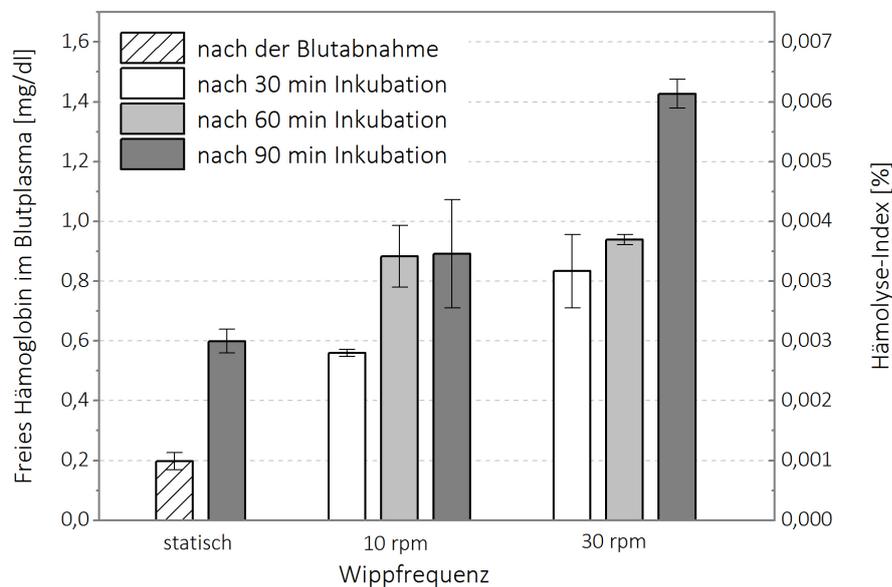


Abb. 3.17: **Freies Hämoglobin und Hämolyse-Index nach Inkubation von Vollblut unter verschiedenen Flussbedingungen und nach verschiedenen Inkubationszeiten.** Gleich nach der Blutabnahme ist die Hämoglobinkonzentration 0,2 mg/dl. Nach 90 min unter statischen Bedingungen liegt sie bei 0,6 mg/dl. Unter dynamischen Bedingungen erreicht sie Werte zwischen 0,5 mg/dl und 1,5 mg/dl, je nach Inkubationsdauer und Flussbedingungen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n=3$).

beträgt 1,5 mg/dl und wird nach 90 Minuten Inkubationszeit bei 30 U/min gemessen. Der Hämolyse-Index berechnet mit der Formel 3.7 bleibt mit dem Wert 0,006 %¹ sehr klein.

Die Hämolyse in Testsystemen ist eine unerwünschte Erscheinung, die für zahlreiche Geometrien beschrieben wurde [264, 151, 207]. Ding *et al.* berichten von Hämoglobinwerten von ca. 200 mg/dl nach einer 4-stündigen Inkubation von Vollblut in zwei unterschiedlichen Modellen von Roller Pumpen [74]. Diese hohen Werte sind auf die mechanische Zerstörung der Blutzellen durch die Verwendung einer Pumpe zurückzuführen. In einer Arbeit von van Oeveren *et al.* werden die durch drei verschiedene Schlauchsysteme (Chandler Loop, Hemobile und Roller Pumpe) verursachten Hämolysewerte nach einer einstündigen Inkubation bei 25 ml/min verglichen: Chandler Loop und Hemobile erzeugen beide mittlere Hämolyse (PHb = 21 mg/dl), die Roller Pumpe hingegen stärkere Hämolyse (PHb = 85 mg/dl) [207]. Diese Werte sind im Vergleich mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten hoch: Diese erreichen 0,88 mg/dl nach einer Stunde bei 10 U/min (entspricht 49 ml/min) und 0,93 mg/dl nach einer Stunde bei 30 U/min (entspricht 128 ml/min).

Der Unterschied zwischen diesen Studien und den in dieser Arbeit gemessenen Werten kann zum Teil mit der Verwendung von Blut unterschiedlicher Spender erklärt werden. Außerdem erzeugen Systeme wie Chandler Loop und Roller Pumpen einen kontinuierlichen Blutfluss, sodass die Blutzellen ständig maximalen Scherkräften ausgesetzt sind. Möglicherweise verursacht dies eine zusätzliche Ermüdung der Zellmembrane und begünstigt die Hämolyse. In dem neuen System sind die Scherkräfte, die sich auf die Zellmembrane ausüben, periodisch. Die maximalen Kräfte werden nur für wenige Sekunden erreicht, die gemittelten Kräfte sind über die Zeit deutlich niedriger als z. B. im Chandler Loop. Das könnte erklären, warum die in dieser Arbeit gemessene Hämolyse besonders niedrig ist. Die schonende und periodische Inkubation von Blut in diesem System stellt also einen großen Vorteil gegenüber den klassischen Vorrichtungen wie Chandler Loop und Roller Pumpe dar, da die *in vivo* Bedingungen vergleichsweise besser nachgebildet werden.

¹mit HCT = 40,4 % und THb = 14,2 g/dl

4 Bewertung der Hämkompatibilität von Silikonelastomeren

Im Kapitel 3 wurden das Inkubationssystem und die experimentelle Vorgehensweise für die Durchführung der Hämkompatibilitätsprüfung vorgestellt. Diese Methoden werden nun in diesem Kapitel für die detaillierte Analyse der Hämkompatibilität von Silikonelastomeren angewendet. Der Einfluss der wichtigsten Oberflächeneigenschaften - Topografie und Chemie – wird zuerst separat analysiert. In einem zweiten Schritt wird die Hämkompatibilität von Silikonelastomeren im Vergleich zu anderen flexiblen Kunststoffen und Elastomeren bewertet.

4.1 Rolle der Oberflächeneigenschaften

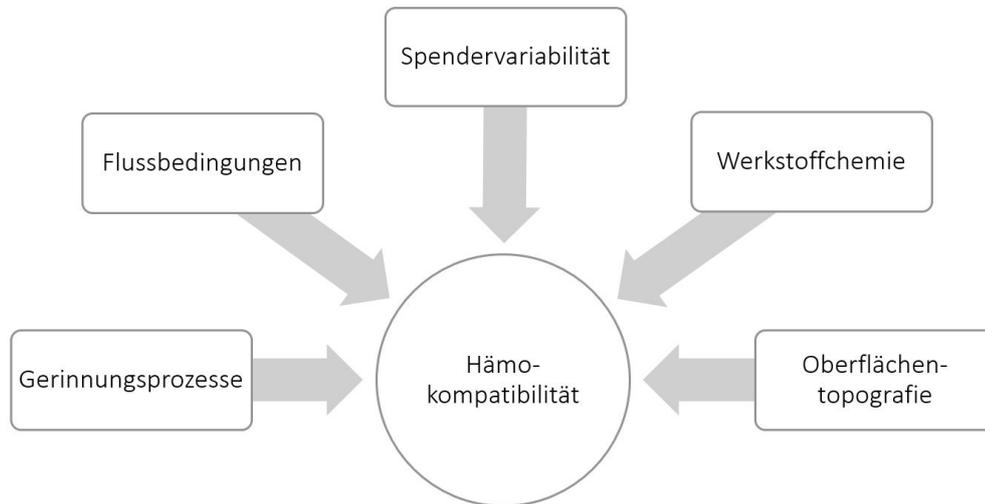


Abb. 4.1: **Schematische Darstellung der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Hämkompatibilität.** Die Hämkompatibilität wird durch drei prüfungsinhärente Einflussfaktoren beeinflusst: Die untersuchten Gerinnungsprozesse, die herrschenden Flussbedingungen und die spenderabhängige Variabilität der Bluteigenschaften. Die Werkstoffeigenschaften, die auf die Hämkompatibilität eine Wirkung ausüben, sind die Oberflächenchemie und Oberflächentopografie.

Abbildung 4.1 stellt die zahlreichen Faktoren dar, die auf die Ergebnisse der Hämkompatibilitätsprüfung einen wesentlichen Einfluss haben können. Die Kombination dieser zahlreichen Faktoren hat die Komplexität der Hämkompatibilitätsprüfung und damit die Schwierigkeit zur Folge, absolute Aussagen zur Hämkompatibilität eines Werkstoffs¹ zu treffen.

Weil die Gerinnung das Zusammenspiel von verschiedenen Gerinnungsvorgängen ist, kann ein Werkstoff unter Betracht eines Gerinnungsvorgangs gute Hämkompatibilität aufweisen, aber gegenüber dem anderen Vorgang eher thrombogene Eigenschaften besitzen. Diese Problematik wurde bereits in der Literatur demonstriert und es wurde folglich empfohlen, separate

¹Unter „Werkstoff“ wird oft hier nur die „chemische Zusammensetzung der Werkstoffoberfläche“ unabhängig von der „Oberflächentopografie“ verstanden.

Prüfungen für die zwei Gerinnungen durchzuführen [263, 233]. In dieser Arbeit werden differenzierte Prüfungen der primären (zellulären) und sekundären (plasmatischen) Hämostase durchgeführt. Ausschließlich Werkstoffe, die gegenüber beiden Prozessen gute Ergebnisse aufweisen, werden als hämokompatibel bezeichnet.

Der Einfluss der Flussbedingungen auf die Hämokompatibilität wurde bereits im Rahmen der Etablierung der Prüfungsmethodik diskutiert (siehe Kapitel 3.3.3). Insbesondere können die Flussbedingungen für eine optimale Untersuchung der zwei Gerinnungsvorgänge nicht gleich eingestellt werden. Desweiteren ist die extreme Variabilität der Bluteigenschaften der Spender wahrscheinlich eine der größten Herausforderungen für die Forschung. Um solide Aussagen zur Hämokompatibilität treffen zu können, müssen zahlreiche – und zeitintensive – Wiederholungsversuche durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.3.4).

Nach methodischer Klärung dieser prüfungsinhärenten Faktoren bleiben als einzige Einflussgröße die werkstoffbezogenen Eigenschaften: Struktur und Chemie der Oberfläche. Beide Faktoren spielen entscheidende Rollen bei den Wechselwirkungen mit Blutkomponenten [155]. In der Fachliteratur werden jedoch die Oberflächeneigenschaften der getesteten Werkstoffe selten dokumentiert, sodass die Vergleichbarkeit zwischen Studien, die ähnliche Werkstoffe untersuchen, deutlich erschwert ist. Dieses Problem wurde auch von Ratner und Horbett thematisiert [230].

Mit dem Ziel, die Hämokompatibilität des Werkstoffs Silikonelastomer (im Folgenden auch als „Silikon“ bezeichnet) zu bewerten, sollen also in zwei unabhängigen Untersuchungen diese Faktoren separat analysiert werden. Außerdem soll geklärt werden, mit welchem Ausmaß die Topografie der Silikonprobe die Blutverträglichkeit beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wird zunächst die Hämokompatibilität von Silikon und POM mit verschiedenen Oberflächenstrukturierungen untersucht (Kapitel 4.2). Anschließend werden, um die Hämokompatibilität des Silikons mit anderen flexiblen Werkstoffen¹ (PVC-P, TPE-U und TPE-S) vergleichen zu können, Proben mit vergleichbaren glatten Oberflächenstrukturen untersucht (Kapitel 4.2).

4.2 Einfluss der Oberflächentopographie

Viele Implantate aus Kunststoffen weisen Oberflächenrauigkeiten im Nano- und Mikrometerbereich auf. Die Topografie kann sich aufgrund der Kombination der verwendeten Werkstoffe mit den eingesetzten Herstellungsverfahren ergeben. In manchen Fällen wird sogar eine Strukturierung absichtlich aufgebracht, wie zum Beispiel für die Förderung der Endothelialisierung von Gefäßimplantaten [321]. Aus diesem Grund ist eine Untersuchung des Einflusses der Oberflächentopografie auf die Hämokompatibilität von Werkstoffen, und insbesondere

¹Diese Werkstoffe können als potenzielle Konkurrenten zu Silikon für medizinische Anwendungen betrachtet werden.

von Silikon, von hoher Relevanz. In diesem Kapitel soll ebenfalls die Fragestellung, ob die Oberflächenchemie oder die Oberflächenrauheit eine stärkere Auswirkung auf die Hämokompatibilität von Silikon hat, behandelt werden.

4.2.1 Stand der Forschung und Strategie

Der wesentliche Einfluss der Oberflächentopografie auf die Blutverträglichkeit ist im Allgemeinen anerkannt. Allerdings gibt es keine Einigkeit, ob eine höhere Rauheit der Oberfläche die Hämokompatibilität verbessert oder verschlechtert. Weiterhin ist ungeklärt, mit welcher Strukturgröße eine Wirkung nachweisbar wird. Zum Beispiel berichteten Weiss *et al.* über eine Korrelation zwischen Oberflächenrauheit und Thrombogenität [302]. Diese Beobachtung wurde außerdem von Minelli *et al.* belegt: Sie haben gezeigt, dass die Vergrößerung der Oberflächenstrukturen die Adsorption des von-Willebrand-Faktors fördert und daher die Thrombozytenadhäsion erhöht [187]. Im Gegensatz dazu haben Bailly *et al.* verschiedene Katheter für angiografische Untersuchungen verwendet und festgestellt, dass die glattesten Katheter am häufigsten Okklusionen aufweisen [15]. Zhao *et al.* untersuchten TiO₂/Ta₂O₅-Beschichtungen auf NiTi-Legierung und konnten zeigen, dass die Fibrinogenadsorption auf rauen Oberflächen zwar erhöht wird, die Thrombozytenadhäsion aber im Gegensatz dazu reduziert wird [325].

Verschiedene Untersuchungen der Hämokompatibilität strukturierter Werkstoffe wurden bereits publiziert. Zwei Fälle sind je nach Größenordnung der untersuchten Strukturen zu unterscheiden: Strukturen kleiner als Thrombozyten ($< 2 \mu\text{m}$) und Strukturen größer als Thrombozyten ($> 2 \mu\text{m}$). Kleine Strukturen werden oft mit dem Ziel einer Verbesserung der Hämokompatibilität eingesetzt: In diesem Fall erhalten Thrombozyten zu wenig Platz zwischen den Strukturen, um sich komplett auszubreiten und sich dauerhaft auf der Oberfläche festhalten zu können [155, 55, 78]. Trotz Erhöhung der spezifischen Oberfläche wird auch eine Reduktion der Fibrinogenadsorption beobachtet [186, 154]. Für sehr kleine Strukturen ($< 100 \text{ nm}$) behaupten außerdem manche Autoren, dass die Thrombozytenmembran die Räume zwischen Strukturen nicht erreichen kann. Daher ist die Anzahl der Bindungsstellen zwischen der Zelle und der Oberfläche geringer [130]. Für größere Strukturen ($> 2 \mu\text{m}$) ist die Situation umstritten, da verschiedene Autoren über eine Verbesserung der Hämokompatibilität von Oberflächen, die Strukturen von $2 \mu\text{m}$ bis zu $50 \mu\text{m}$ aufweisen, berichten, während andere Autoren einer Verschlechterung der Hämokompatibilität für ähnliche Strukturgrößen (ca. $10 \mu\text{m}$) aufgezeigt haben [50, 317, 167].

Im Rahmen dieser Arbeit ist es aus zeitlichen und materiellen Gründen nicht möglich, den Einfluss der Oberflächentopografie auf die Blutverträglichkeit sowohl für Nano- als auch Mikrostrukturen zu untersuchen. Es wird angenommen, dass in der Größenordnung der Thrombozyten relevante biologische Prozesse stattfinden können. Aus diesem Grund werden Mi-

krorillen von $1\ \mu\text{m}$ bis $11\ \mu\text{m}$ untersucht. Die Rillengeometrie wird so ausgewählt, dass das Oberflächen-/Volumen-Verhältnis des Bluts zur Oberfläche möglichst gleich gehalten wird. Dafür soll der Querschnitt der Rillen möglichst quadratisch sein (aber ohne scharfe Kanten) und die Abmessungen von Tiefe, Breite und Abstand zwischen den Rillen gleich gehalten werden. Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch Strukturen der Größe a und $2a$. Sechs verschiedene Rillengrößen werden untersucht: $1\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m}$, $7\ \mu\text{m}$, $9\ \mu\text{m}$ und $11\ \mu\text{m}$. Mit $1\ \mu\text{m}$ sind die Rillen kleiner als ein nicht-aktivierter Thrombozyt. Die anderen Rillen ($3\ \mu\text{m}$ bis $11\ \mu\text{m}$) sind von der Größenordnung ausgebreiteter aktivierter Thrombozyten.

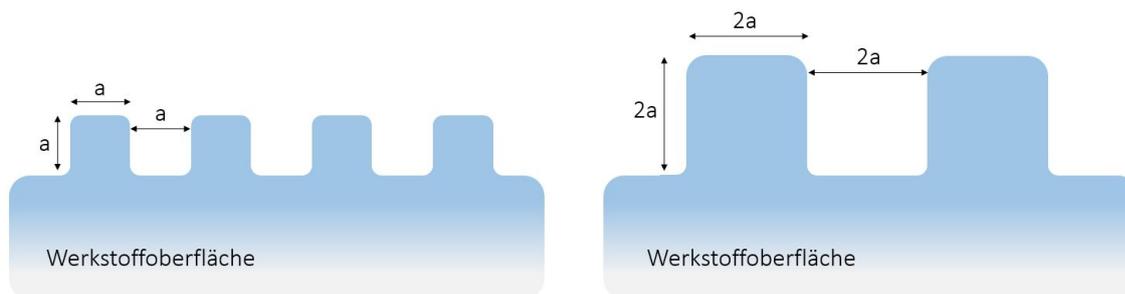


Abb. 4.2: **Schematische Darstellung des Profils der strukturierten Proben.** Exemplarisch werden Profile mit Rillenbreiten, Rillenhöhe und Abständen der Größe a und $2a$ dargestellt.

4.2.2 Oberflächenstrukturierung

Probenherstellung

Für die Analyse der Einflüsse von Oberflächenchemie und Oberflächenstruktur werden Silikon und POM verwendet¹. POM wird als zusätzlicher Referenzwerkstoff hinzugenommen, da es sich in der vorherigen Untersuchung durch seine gegensätzlichen Oberflächeneigenschaften ausgezeichnet hat: Im Gegensatz zum Silikon ist POM hydrophil und hämokompatibel (siehe Ergebnisse der Oberflächenanalyse und Hämokompatibilitätsprüfung im Kapitel 3.3). Außerdem ist POM für seine gute Dimensionsstabilität bekannt und für die Abbildung kleiner Strukturen gut geeignet.

Verschiedene Oberflächenstrukturen werden zuerst in einer Edelstahlplatte eingraviert und in einem zweiten Schritt in dem Polymer (Silikon und POM) durch Formpressen abgebildet. Für beiden Polymere werden dieselben Edelstahlplatten verwendet. Als Referenzoberfläche (gleiche Topografie wie in der vorherigen Untersuchung) wird eine geschliffene Edelstahlplatte eingesetzt. Zusätzlich wird eine spiegelglatt polierte Edelstahlplatte für die Herstellung von Proben geringerer Rauheit benutzt. Die Analyse der Oberfläche der spiegelglatten Probe mit Konfokalmikroskopie (μsurf , Nanofocus AG, Oberhausen, Deutschland) liefert folgende Rauheitswerte: $R_a = 0,004\ \mu\text{m}$ und $R_z = 0,029\ \mu\text{m}$. Diese sind deutlich geringer als die Werte für die Referenzprobe ($R_a = 0,33\ \mu\text{m}$ und $R_z = 2,87\ \mu\text{m}$, siehe Kapitel 3.3.1). Für die Herstel-

¹Die benutzten Werkstoffe sind die gleichen wie im vorherigen Kapitel.

lung von Proben mit zusätzlichen Strukturen werden auf einer geschliffenen Edelstahlplatte Mikrorillen aufgebracht. Die Strukturierung der Stahlplatte wird durch Laserablation bei der Firma KLUG Laserdienstleistungen und Beratung in Hannover durchgeführt. Sechs verschiedene Rillengeometrien werden hergestellt. Die Herstellung der Proben aus Silikon und POM erfolgt durch Formpressen mit der Heißpresse P300P, Dr. Collin GmbH, Ebersberg, Deutschland. Die detaillierten Pressparameter für Silikon und POM sind im Anhang C.1. und C.2. dokumentiert.

Oberflächenanalyse

Die Oberfläche der strukturierten Probekörper wurde mit Rasterelektronenmikroskopie (JSM-6390, JEOL GmbH, Freising, Germany) untersucht. Vor der Analyse wurden die Proben mit einer 7 nm dicken Goldschicht beschichtet (SCD 005, Bal-Tec AG, Balzers Liechtenstein). Die Beschichtungsparameter sind: Abstand zum Goldtarget 5 cm, Sputterstrom von 40 mA und Sputterdauer von 40 s. Abbildung 4.3 zeigt die Oberflächentopografie von Silikon- und POM-Proben. Dieser Versuch bestätigt die gute Abdruckbarkeit der Strukturen in beiden Polymeren. Außerdem wird so sichergestellt, dass die Strukturierung der beiden Werkstoffe genau gleich ist, damit die Ergebnisse der Hämokompatibilitätsprüfung verglichen werden können.

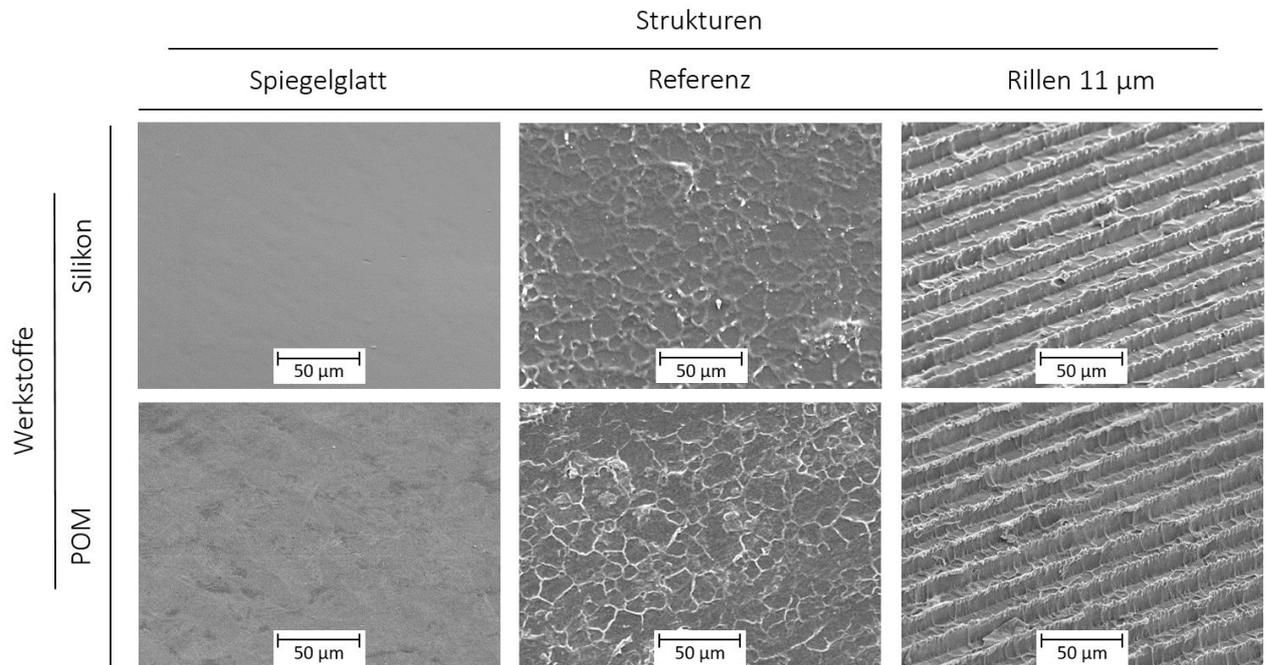


Abb. 4.3: **Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von Silikon- und POM-Proben.** Die Bilder wurden im SE-Modus (sekundäre Elektronen) mit einer Beschleunigungsspannung von 7 bis 10 kV bei 500-facher Vergrößerung aufgenommen. Exemplarisch werden hier drei verschiedene Oberflächenstrukturen dargestellt: Es handelt sich um die Abdrücke der polierten Oberfläche (spiegelglatt), der Referenzplatte (Referenz) und der Platte mit Rillen von 11 μm in Silikon und in POM.

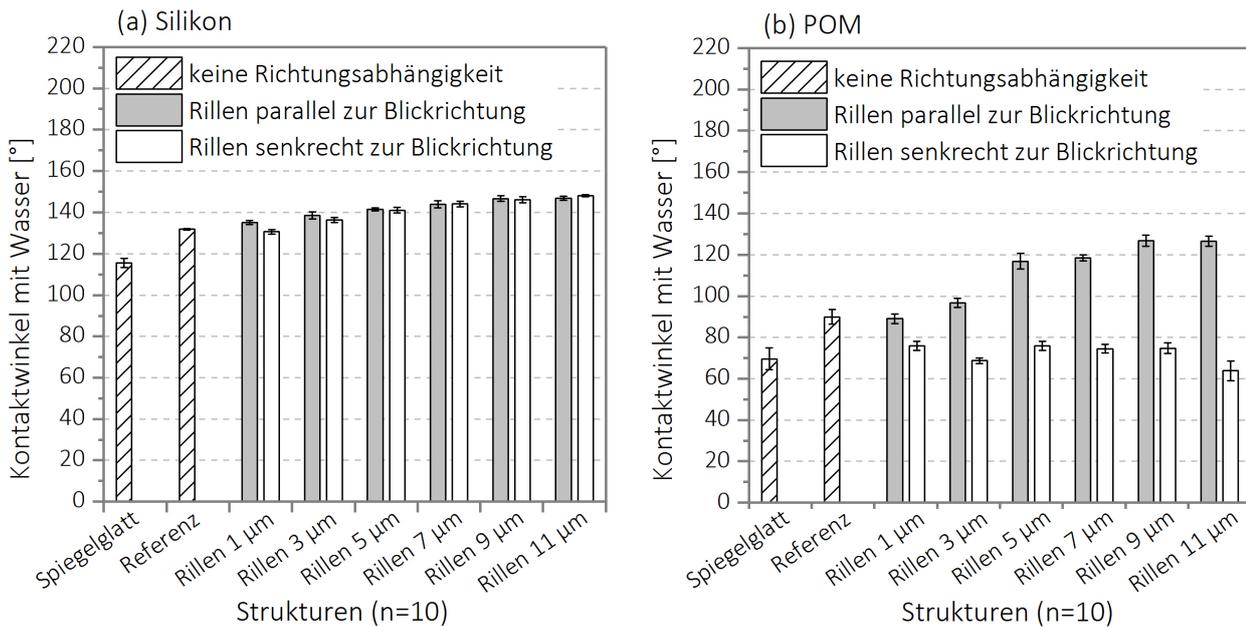


Abb. 4.4: **Kontaktwinkelmessung der strukturierten Oberflächen.** Die Messung wurde mit $6\ \mu\text{m}$ Tropfen und Dispensergeschwindigkeit von $0,5\ \mu\text{l/s}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. (a) Silikon: Für alle Strukturgrößen ist Silikon hydrophob. Der Kontaktwinkel nimmt mit der Größe der Struktur zu und erreicht den Wert 148° für die Struktur mit Rillen von $11\ \mu\text{m}$. Außerdem hat eine Änderung der Orientierung der Rillen kaum Einfluss auf die gemessenen Werte. (b) POM: POM ist deutlich hydrophiler als Silikon mit einem Kontaktwinkel von 70° (spiegelglatte Oberfläche). Der Einfluss der Orientierung der Rillen ist in diesem Fall deutlich. Wenn die Rillen in der Blickrichtung orientiert sind, nimmt der Kontaktwinkel mit der Größe der Strukturen stark zu (bis zu 127° für die Rillen der Größe $11\ \mu\text{m}$). Senkrecht zur Blickrichtung scheint die Strukturierung allerdings keine Wirkung auf die Werte des Kontaktwinkels zu haben.

Die Untersuchung der Benetzbarkeit der Oberfläche wurde mit Kontaktwinkelmessung mit destilliertem Wasser durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Wie bereits in der vorherigen Untersuchung beobachtet, ist Silikon deutlich hydrophober als POM. Im Allgemeinen nimmt der Kontaktwinkel mit der Größe der Strukturen zu. Der Einfluss der Orientierung¹ der Rillen ist bei Silikon wenig merkbar, aber bei POM sehr ausgeprägt. Diese Beobachtung ist für die Untersuchung der Hämokompatibilität von großer Bedeutung, weil die Rillen in der Flussrichtung des Bluts orientiert werden. Mit dieser Orientierung (Rillen parallel zur Blickrichtung) nimmt der Kontaktwinkel mit der Größe der Rillen stark zu. Dies liegt wahrscheinlich an der Benetzbarkeit des Werkstoffs: Entlang der Rillen kann sich das Wasser gut ausbreiten, sodass die Messung mit Rillen senkrecht zur Blickrichtung nicht beeinflusst wird. Allerdings kann der Wassertropfen die Rillen schwer überspringen und verformt sich, sodass der Kontaktwinkel mit den Rillen parallel zur Blickrichtung größer aussieht.

¹Während der Messung können die Rillen in der gleichen Achse wie der Beobachter und die Lichtquelle (Rillen parallel zur Blickrichtung) oder senkrecht zu dieser Achse (Rillen senkrecht zur Blickrichtung) orientiert werden.

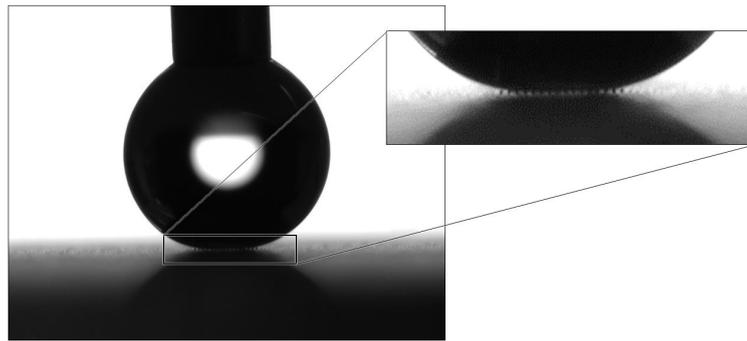


Abb. 4.5: **Aufnahme des Tropfens während der Kontaktwinkelmessung.** Das Bild wurde mit strukturiertem Silikon (Rillengröße $11\ \mu\text{m}$) aufgenommen. Die Rillen sind parallel zur Blickrichtung orientiert. Die Vergrößerung des Tropfens zeigt, dass der Kontakt mit der Oberfläche nicht vollständig ist, weil Luftschlüsse in den Rillen vorhanden sind.

Die besonders starke Hydrophobie des strukturierten Silikons liegt an der Teilbenetzung der Oberfläche aufgrund der Entstehung von Luftschlüssen an der Kontaktfläche [125]. Zum Beispiel zeigt Abbildung 4.5 die Kontaktwinkelaufnahme, wenn die Rillen in der Blickrichtung orientiert werden. Dieser Zustand wurde ab Rillengröße von $5\ \mu\text{m}$ beobachtet.

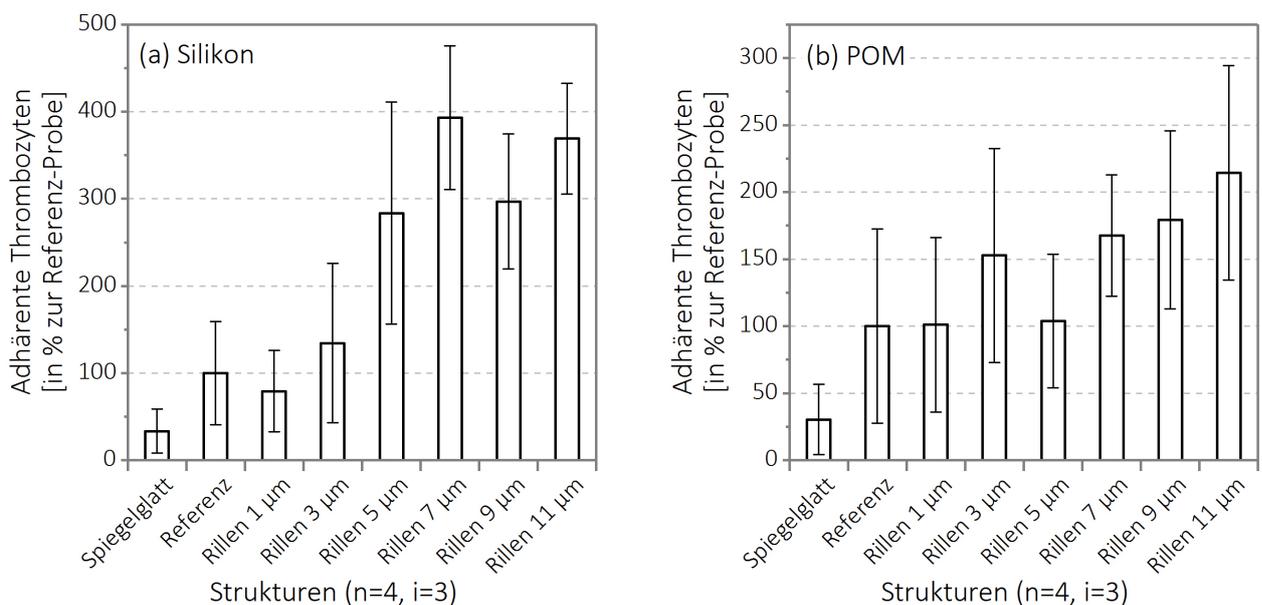


Abb. 4.6: **Thrombozytenadhäsion auf strukturierte Oberflächen (ACP-Test).** Die einstündige Inkubation von TK mit den Proben erfolgt unter dynamischen Flussbedingungen ($15\ \text{U}/\text{min}$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. (a) Silikon: Die Thrombozytenadhäsion auf der spiegelglatten Oberfläche ist ungefähr 3-fach niedriger als auf der Referenz und 10-fach niedriger als auf der strukturierten Oberfläche mit Rillen von $11\ \mu\text{m}$. (b) POM: Thrombozyten sind auf der spiegelglatten Oberfläche am wenigsten zu finden. Auf der Referenz ist die Anzahl von Thrombozyten um den Faktor 4 erhöht und auf der strukturierten Oberfläche mit Rillen von $11\ \mu\text{m}$ liegt die Zunahme der Thrombozytenzahl nahezu um den Faktor 10.

4.2.3 Hämokompatibilität

Die Thrombozytenadhäsion wird für strukturierte Silikon- und POM-Proben untersucht. Für jeden Werkstoff werden vier Wiederholungsversuche durchgeführt und die Ergebnisse, wie in 3.3 beschrieben, gemittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Für beide Werkstoffe ist der Einfluss der Strukturierung auf die Thrombozytenadhäsion deutlich, wobei die spiegelglatte Oberfläche die besten Ergebnisse liefert und die Strukturen sich als thrombogen erweisen. Hieraus kann so abgeleitet werden, dass die Strukturierung einen negativen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion hat.

Zudem wird die Thrombozytenadhäsion auf strukturierten Silikonoberflächen durch die rasterelektronenmikroskopische (REM) Analyse visualisiert (Abbildung 4.7). Die Vorbereitung der Proben ist im Anhang B.8. dokumentiert und die Inkubation der Zellen mit den Proben erfolgt mit den gleichen Parametern wie für den vorherigen ACP-Test. Diese Untersuchung bestätigt die Ergebnisse des ACP-Tests: Mit zunehmender Strukturgröße liegen Thrombozy-

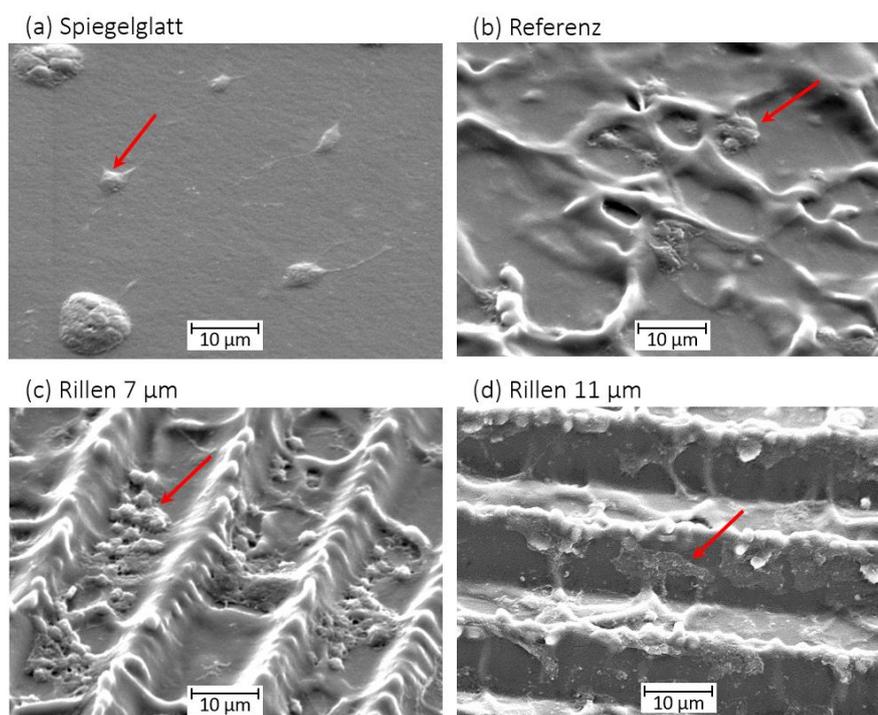


Abb. 4.7: **Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von strukturierten Silikonoberflächen nach Inkubation mit Thrombozyten.** Die Bilder wurden im SE-Modus (sekundäre Elektronen) mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV bei 2500-facher Vergrößerung aufgenommen. Thrombozyten sind mit roten Pfeilen markiert. Auf der spiegelglatten Oberfläche sind vereinzelte Thrombozyten und kleine Aggregate zu finden. Auf der Referenzoberfläche lagern sich Thrombozyten vorzugsweise neben Unebenheiten an. In diesen beiden Fällen sind die Zellen wenig ausgebreitet (leichter Aktivierungszustand). Auf strukturierten Oberflächen (insbesondere für Rillen ab 7 µm) sind Thrombozyten vermehrt und aggregiert in der Tiefe der Rillen zu finden. Für die Rillen der Größe 11 µm liegen Thrombozyten sogar im fortgeschrittenen Aktivierungszustand vor und breiten sich auf den Wänden der Rillen stark aus („fully spread“ Zustand).

ten vermehrt und mit stärkerem Aktivierungsgrad auf der Oberfläche vor. Außerdem ist es auffallend, dass die Thrombozyten vorzugsweise in den Tiefen der Strukturen adhären.

Um die Fragestellung zu behandeln, ob die Oberflächenchemie oder die Oberflächenrauheit die stärkste Auswirkung auf die Hämokompatibilität hat, werden ausgewählte Strukturen aus Silikon und POM in gemeinsamen Versuchen untersucht. Aufgrund von Begrenzungen in der Handhabung während der Versuchsdurchführung, wird die Anzahl der untersuchten Strukturen reduziert. Die Referenz und die spiegelglatte Oberfläche werden weiter untersucht. Außerdem werden Proben mit Rillengröße von 5 μm und 7 μm als Vergleichsreferenz für thrombogene Topografie mitgeführt. Diese Strukturen werden ausgewählt, weil ihre Größe knapp über dem Thrombozytendurchmesser liegt. Die Ergebnisse dieser komparativen Versuche werden gemittelt und sind in Abbildung 4.8 zu sehen. Auf Silikon ist die Thrombozytenadhäsion deutlich abhängig von der Strukturgröße und um eine Größenordnung höher als auf POM. Der große Unterschied zwischen der Thrombozytenadhäsion auf den zwei Werkstoffen zeigt, dass in diesem Fall der Einfluss der chemischen Zusammensetzung ausgeprägter als der Einfluss der Topografie ist. Jedoch ist die negative Auswirkung der Strukturierung des Silikons nicht zu vernachlässigen, weil sie eine Erhöhung der Thrombozytenadhäsion um ein Vielfaches verursacht.

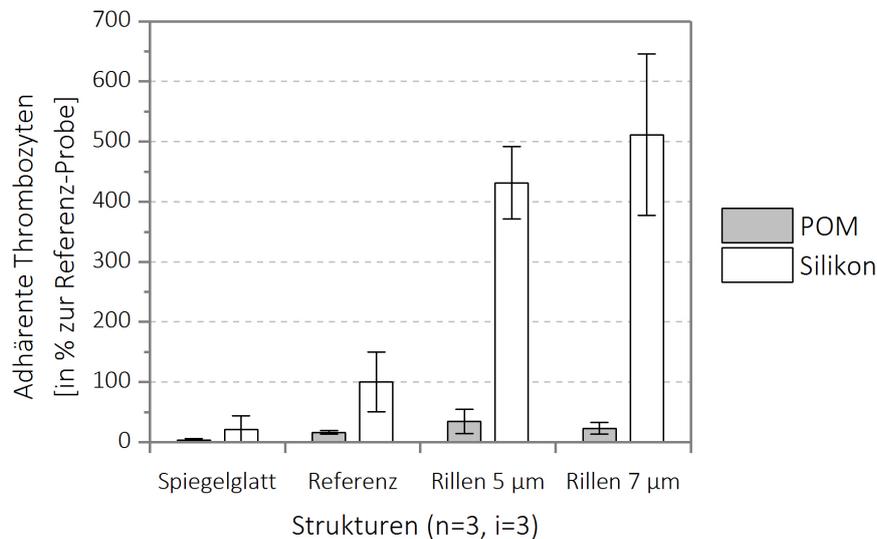


Abb. 4.8: **Komparative Untersuchung der Thrombozytenadhäsion von strukturierten Silikon- und POM-Proben (ACP-Test)**. Die einstündige Inkubation von TK mit den Proben erfolgt unter dynamischen Flussbedingungen (15 U/min). Die Zunahme der Anzahl von adhärenen Thrombozyten mit der Strukturgröße ist bei Silikon deutlich: Die Thrombozytenadhäsion auf den strukturierten Proben mit Rillen von 7 μm ist 5-fach höher als auf der Referenz. Auf POM hingegen ist die Thrombozytenadhäsion viel geringer: Für Rillen von 7 μm ist die Thrombozytenadhäsion auf POM um den Faktor 20 niedriger als auf Silikon. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Die Thrombozytenadhäsion ist nur ein Aspekt der Hämokompatibilität. Um die sekundäre Hämostase zu untersuchen, wird die Messung der Thrombinbildung nach Kontakt mit den

strukturierten Silikonoberflächen durchgeführt. Die Ergebnisse von 8 Wiederholungsversuchen werden gemittelt und in Abbildung 4.9 gezeigt. Trotz Vergrößerung der Oberfläche durch die Struktur wird die sekundäre Hämostase von der Oberflächentopografie des Silikons nicht in einem Ausmaß beeinflusst, dass eine Auswirkung in dieser Untersuchung gemessen werden kann. Das heißt, dass Werkstoffe, die die Gerinnungskaskade nicht aktivieren, durch eine Erhöhung der Rauheit nicht wesentlich thrombogener werden. Die gleiche Schlussfolgerung wie für die primäre Hämostase kann hier ebenfalls gezogen werden: Die Oberflächentopografie hat einen geringeren Einfluss auf die Hämokompatibilität als die Oberflächenchemie. Hinsichtlich des Werkstoffs Silikon ist ein negativer Einfluss der Strukturierung lediglich auf die primäre Hämostase (Thrombozytenadhäsion) nachweisbar.

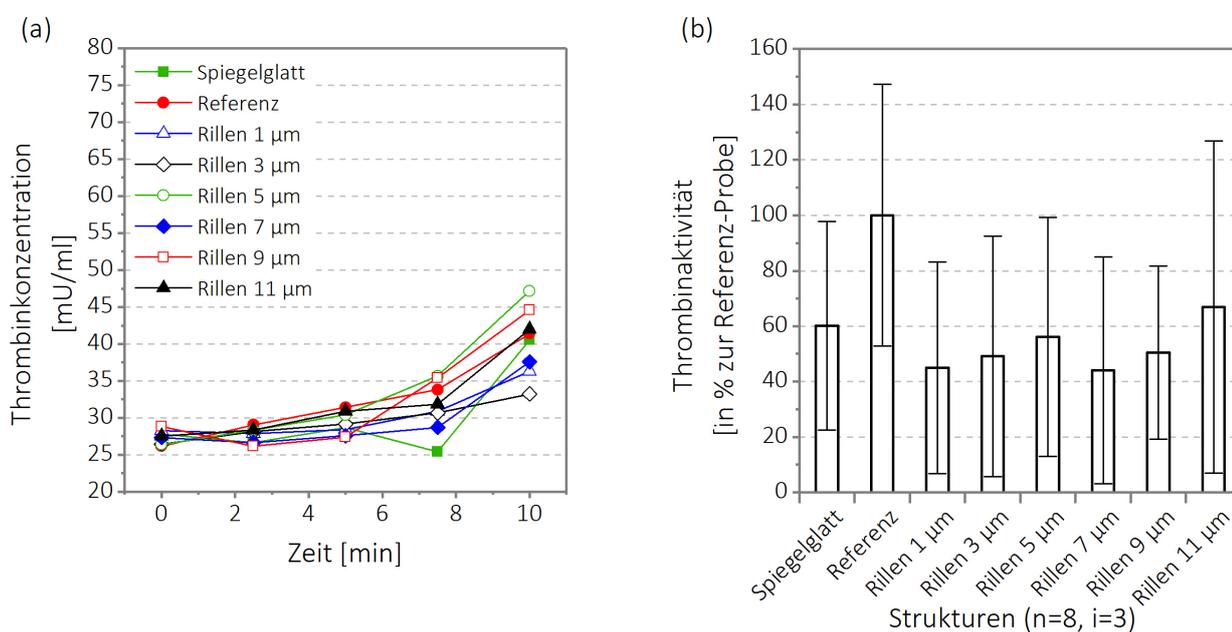


Abb. 4.9: **Thrombinbildung auf strukturierten Silikonoberflächen (TGA-Test).** (a) Thrombinbildung während eines exemplarischen Versuchs. (b) Thrombinaktivität gemittelt über 8 Wiederholungsversuche. Die Menge des gebildeten Thrombins nach Inkubation von Plasma auf den strukturierten Oberflächen ist für alle Werkstoffe sehr niedrig und zeigt keine erkennbare Tendenz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

4.2.4 Diskussion: Relevanz der Einflussfaktoren

Die Analyse der Hämokompatibilität von mikrostrukturierten Oberflächen hat gezeigt, dass ausschließlich die Thrombozytenadhäsion von der Oberflächenstruktur beeinflusst wird. Eine weitere Erkenntnis ist, dass der Einfluss der Strukturierung sehr stark vom verwendeten Werkstoff abhängig ist. Für Silikon (hydrophob) hat die Thrombozytenadhäsion stark mit der Größe der Strukturen zugenommen. Für POM (hydrophil) war die Thrombozytenadhäsion zwar auch abhängig von der Struktur, trat aber in deutlich geringerem Ausmaß auf.

Die Verstärkung der Hydrophobie von Silikon aufgrund der Mikrostruktur wurde bereits in einer Studie von Ye *et al.* berichtet. Die Größenordnung ihrer Strukturen (Breite von 3 µm

Breite und Abstand von 8 μm) ist vergleichbar mit den Rillen, die in dieser Arbeit untersucht werden. Sie haben einen Kontaktwinkel mit Wasser von 164° (vgl. 148° in dieser Arbeit) gemessen, was einem super-hydrophoben Werkstoff entspricht. Sie konnten außerdem eine ähnliche Teilbenetzung der Oberfläche beobachten. Interessanterweise lieferte die Untersuchung der Thrombozytenadhäsion jedoch andere Ergebnisse als in dieser Arbeit: Sie konnten eine deutliche Reduzierung der Thrombozytenadhäsion auf strukturierten Oberflächen feststellen [317]. Dieser Unterschied deutet auf die signifikante Rolle der Prüfungsbedingungen hin, da Ye und Kollegen ausschließlich statische Untersuchungen durchgeführt haben. In dieser Arbeit hingegen wird die Analyse der Thrombozytenadhäsion unter dynamischen Flussbedingungen durchgeführt. Eine mögliche Interpretation ist, dass Thrombozyten unter statischen Bedingungen von der super-hydrophoben Oberfläche abgestoßen werden, da nur eine Teilbenetzung vorliegt. Aufgrund des Blutflusses ist möglicherweise die Benetzung der Oberfläche mit der Prüfflüssigkeit verbessert, sodass Thrombozyten Zugang zur gesamten Oberfläche bekommen. In dieser Untersuchung sind die Thrombozyten in den Tiefen der Rillen angesammelt, was beweist, dass die tiefen Bereiche der Struktur mit Blut benetzt sind.

Der negative Einfluss der Rauheit auf die Thrombozytenadhäsion unter dynamischen Flussbedingungen wurde bereits in der Fachliteratur beschrieben [302]. Eine Erklärung wird von Minelli *et al.* vorgeschlagen. Diese hatten die Adsorption von verschiedenen Proteinen auf strukturierten Werkstoffoberflächen unter dynamischen Flussbedingungen untersucht und gezeigt, dass die Adsorption von vWF (von-Willebrandt-Faktor) um das 5-Fache wegen der Strukturierung erhöht wird. Im Vergleich wird die Adsorption von Fibrinogen nur verdoppelt [187]. Der vWF ist ein starker Aktivator der Thrombozytenadhäsion [246]. Eine vermehrte Adsorption könnte den negativen Einfluss der Strukturierung erklären. Außerdem ist in der Hämostaseologie gut bekannt, dass die Wirkung des vWF stark vom Blutfluss abhängig ist. Die aktive Stelle des vWF, welche sich an den Thrombozyten bindet, kann sich nur unter der Wirkung von Scherkräften entfalten [246]. Diese Erkenntnis verstärkt die Hypothese, dass die Untersuchung der Thrombozytenadhäsion unbedingt unter dynamischen Flussbedingungen erfolgen muss.

Neben vWF spielt Fibrinogen ebenfalls eine wesentliche Rolle für die Thrombozytenadhäsion. Chen und Kollegen haben die Lokalisierung des adsorbierten Fibrinogens auf mikrostrukturierten Silikonoberflächen unter dynamischen Flussbedingungen beschrieben [51]. Die Größenordnung ihrer Strukturen ist mit ca. 12 μm vergleichbar mit den in dieser Arbeit untersuchten Rillen. Sie haben interessanterweise eine Zunahme von 46 % der Fibrinogenadsorption festgestellt, obwohl die Vergrößerung der Oberfläche aufgrund der Strukturierung nur 8 % beträgt. Außerdem war Fibrinogen nicht homogen auf der Oberfläche vorhanden, sondern sammelte sich in viel höherer Konzentration in den tieferen Bereichen der Strukturen an. Die Lokalisierung der adhärenierten Thrombozyten auf der Oberfläche entsprach ebenfalls der Verteilung des adsorbierten Fibrinogens [51]. Diese Beobachtungen beweisen, dass die primäre Häm-

stase vorzugsweise in den tieferen Bereichen stattfindet, wie es auch in dieser Arbeit mit Rasterelektronenmikroskopie beobachtet wird. Die hier verwendeten Strukturen verursachen ungefähr eine Verdopplung der Oberfläche des Silikons. Die Thrombozytenadhäsion ist um den Faktor 4 bis 5 erhöht, was deutlich zeigt, dass die Struktur – und nicht nur die Oberflächenvergrößerung – eine thrombogene Wirkung hat.

4.3 Einfluss der chemischen Zusammensetzung

4.3.1 Beschreibung der untersuchten Werkstoffe

Die Analyse der Topografie der Silikonoberfläche hat gezeigt, dass eine erhöhte Rauheit eine thrombogene Wirkung hat. Um den Einfluss der reinen Oberflächenchemie bzgl. Thrombogenität untersuchen zu können, werden nun glatte Proben verwendet. Hierdurch wird eine Beeinflussung durch die Oberflächenrauigkeit minimiert. Die verwendeten Proben wurden hierbei durch Extrusionsverfahren hergestellt. Um eine für die industrielle Applikation relevante Analyse der Hämokompatibilität durchführen zu können, werden die Silikonproben zusätzlich mit anderen flexiblen Werkstoffen verglichen, die als potenzielle Alternativen im Betracht kommen.

Werkstoffe

Für die Versuche wird eine 2 mm dicke Silikonfolie aus HTV Silpuran[®] UR 9030/60 verwendet, welche bei der Firma Wacker Chemie AG hergestellt wird. Die Temperung und Reinigung erfolgte am Lehrstuhl für Medizintechnik¹. Als Vergleichsprodukte werden folgende Kunststoffe verwendet:

- PVC-P: Plastifiziertes Polyvinylchlorid für medizinische Anwendung (Solmed Medipak CP 3222 cler) wurde von der Firma Renolit zur Verfügung gestellt. Es liegt als 350 µm dicke Extrusionsfolie vor, welches für die Herstellung von Infusionsbeuteln weiterverarbeitet werden kann. PVC-P findet außerdem verbreitete Anwendung als Werkstoff für Blutbeutel und medizinische Schläuche [119].
- TPE-U: In dieser Arbeit wird ein thermoplastisches Polyurethan der Firma Bayer (Platilon[®] U 4210 AU) in Form einer extrudierten Folie (Dicke 500 µm) als Vergleichswerkstoff herangezogen. Der Hersteller gibt eine Zertifizierung nach USP Cl. VI und ISO 10993 an. Typische Anwendungen für dieses TPE-U sind Pflaster, Gelkissen und extrakorporale Brustprothesen [22]. Polyurethane gelten als hämokompatibel und gut verträglich und besitzen zusätzliche vorteilhafte Eigenschaften wie eine hohe Elastizität und eine ausgeprägte Ermüdungsbeständigkeit [322, 120].

¹Die detaillierte Vorgehensweise ist im Anhang C dokumentiert.

- TPE-S: Als letzter Vergleichswerkstoff wird ein Compound auf Basis vollhydrierter Styrol-Blockcopolymerer der Firma Kraiburg TPE verwendet (Thermolast[®] M MC/tl). Auch dieser Werkstoff liegt als Extrusionsfolie (Dicke 500 µm) vor und wurde nach USP Cl. VI und ISO 10993 getestet [159]. Eine Anwendung findet TPE-S unter anderem innerhalb medizinischer Schläuche und Dichtungen.

Charakterisierung der Probenoberfläche

Die Oberfläche der extrudierten Werkstoffe wird anhand des Kontaktwinkels mit Wasser und der Rauheit bewertet. Die Ermittlung der Profillinien und Rauheitsmessung erfolgt mit Konfokalmikroskopie (µsurf, Nanofocus AG, Oberhausen, Deutschland), wie bereits im Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Silikon ist der hydrophobste der vier untersuchten Werkstoffe. Ausschließlich PVC-P weist hydrophiles Verhalten auf (Kontaktwinkel < 90°). TPE-U und TPE-S haben dazwischenliegende Werte.

Tab. 4.1: **Oberflächeneigenschaften der untersuchten Werkstoffen.** Die Kontaktwinkelmessung erfolgt mit 2 µl Tropfen und Dispensergeschwindigkeit von 0,5 µl/s. Für die Rauheitsmessung werden die gängigen Kenngrößen Ra und Rz aus 24 einzelnen Profillinien gemittelt. Der Mitterauwert Ra gibt die mittlere, arithmetische Abweichung eines Profils von der Mittellinie an und die Rautiefe Rz stellt die mittlere Summe der größten Profilspitze und des tiefsten Profiltals dar.

	Benetzbarkeit		Rauheit	
	Kontaktwinkel mit Wasser [°] (n=10)		Ra [µm] (n=24)	Rz [µm] (n=24)
Silikon <i>Silpuran[®] UR 9030/60</i>	113,1±2,8		0,058±0,069	0,350±0,506
PVC-P <i>Solmed Medipak CP 3222 cler</i>	84,4±6,5		0,051±0,022	0,339±0,191
TPE-U <i>Platilon[®] U 4210 AU</i>	99,6±4,9		0,098±0,049	0,673±0,498
TPE-S <i>Thermolast[®] M MC/tl</i>	109,8±1,3		0,631±0,361	4,551±4,888

Drei der extrudierten Werkstoffe (Silikon, PVC-P und TPE-U) weisen sehr kleine Ra-Werte (< 0,1 µm) und Rz-Werte (< 0,7 µm) auf, die auf eine glatte Oberfläche hindeuten. TPE-S hat im Gegensatz hierzu eine rauere Oberfläche mit Rauheitswerten in kleinen µm-Bereich. Diese Struktur ergibt sich aus dem Herstellungsverfahren. In Abbildung 4.10 sind exemplarische Profillinien der vier Oberflächen dargestellt. Diese zeigen sehr deutlich die wesentlich höhere Rauigkeit des TPE-S.

Anhand dieser Untersuchungsergebnisse, werden für die weiterführenden Untersuchungen der chemischen Oberflächeneigenschaften Silikon, PVC und TPE-U herangezogen. Aufgrund der wesentlich höheren Rauigkeit der verfügbaren Probe kann die Hämokompatibilität vom reinen Werkstoff TPE-S nicht verglichen werden.

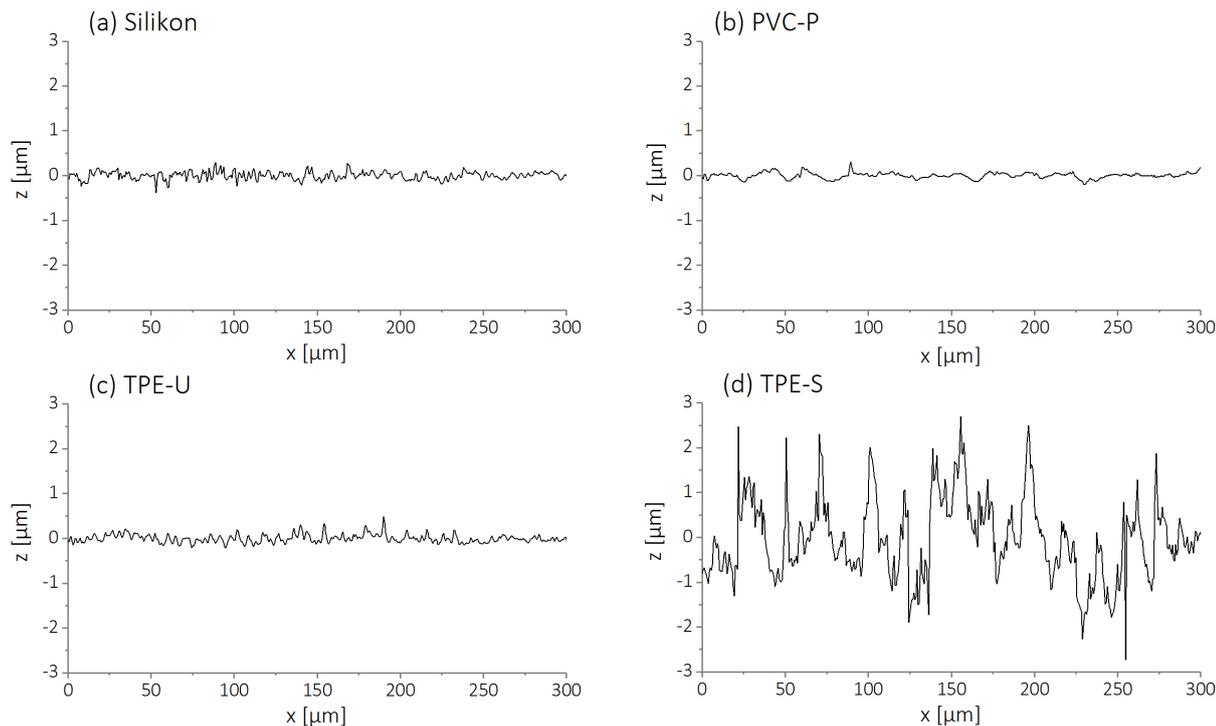


Abb. 4.10: Exemplarische Darstellung des Oberflächenprofils der getesteten Werkstoffe. Die Topografie von Silikon, PVC-P und TPE-U kann als sehr glatt betrachtet werden ($< \mu\text{m}$). TPE-S weist im Gegensatz hierzu eine rauere Oberfläche auf.

4.3.2 Hämokompatibilität

Die Hämokompatibilität der vier Proben wird zunächst anhand der Thrombozytenadhäsion und Thrombinbildung, wie im Kapitel 3.3 beschrieben, bewertet. Die TPE-S Probe wird

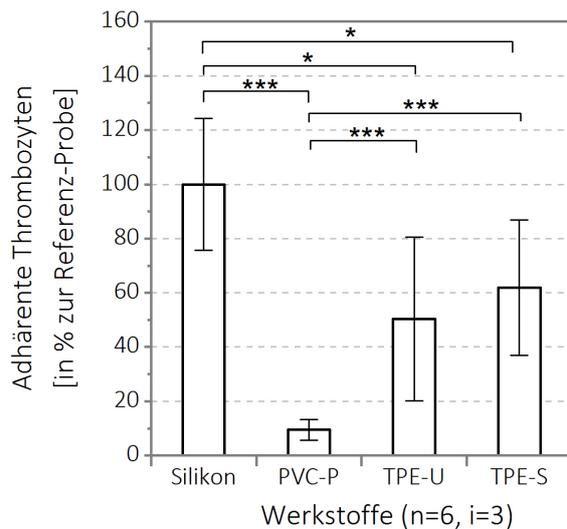


Abb. 4.11: Thrombozytenadhäsion auf Silikon, PVC-P, TPE-U und TPE-S (ACP-Test). Die einstündige Inkubation von TK mit den Proben erfolgt unter dynamischen Flussbedingungen (15 U/min). Die maximale Thrombozytenadhäsion befindet sich auf den Silikonproben. Am geringsten ist sie auf PVC-P (9 % der Wert von Silikon). TPE-U und TPE-S weisen beide eine mittlere Thrombozytenadhäsion auf (50 % bzw. 62 % der Wert von Silikon). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***) ; $p \leq 0,001$ (****).

trotz höherer Rauheit in der Untersuchung aufgenommen: Eine Aussage zu Werkstoff ist zwar nicht möglich, aber die Betrachtung der Hämokompatibilität der Probe als Kombination von Oberflächenchemie und -topografie ist als Orientierung unproblematisch – und relevant für die Bewertung eines Medizinproduktes. Es wird dabei das gleiche Versuchsdesign bzw. die gleiche statistische Auswertung wie im Kapitel 3.3 verwendet.

Die Thrombozytenadhäsion wird mit ACP-Test nach der Vorgehensweise untersucht, die im Kapitel 3.3 beschrieben ist. Die Ergebnisse von 6 unabhängigen Wiederholungsversuchen werden gemittelt und sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Anzahl von adhärenenten Thrombozyten auf Silikon ist signifikant höher als auf TPE-U und TPE-S und sogar hoch signifikant ($p < 0,005$) im Vergleich zu PVC-P. Diese Ergebnisse bestätigen die Tendenz, die bereits im Kapitel 3.3.4 vermutet wurde: Im Vergleich zu den meisten Kunststoffen weist Silikon eine ausgeprägte Thrombozytenadhäsion auf. Auch die TPE-S Probe zeigt eine hohe Thrombozytenadhäsion, welche durch die im vorherigen Kapitel ermittelte Rauigkeit erklärt werden kann. PVC-P hingegen ist besonders resistent gegenüber der Thrombozytenadhäsion. Bemerkenswert ist außerdem, dass dieser Werkstoff auch deutlich hydrophiler als die anderen ist. Aus diesen Ergebnissen ist eine Korrelation zwischen der Anzahl von adhärenenten Thrombozyten und der Hydrophilie der Oberfläche erkennbar (siehe Kontaktwinkelmessung in Tabelle 4.1).

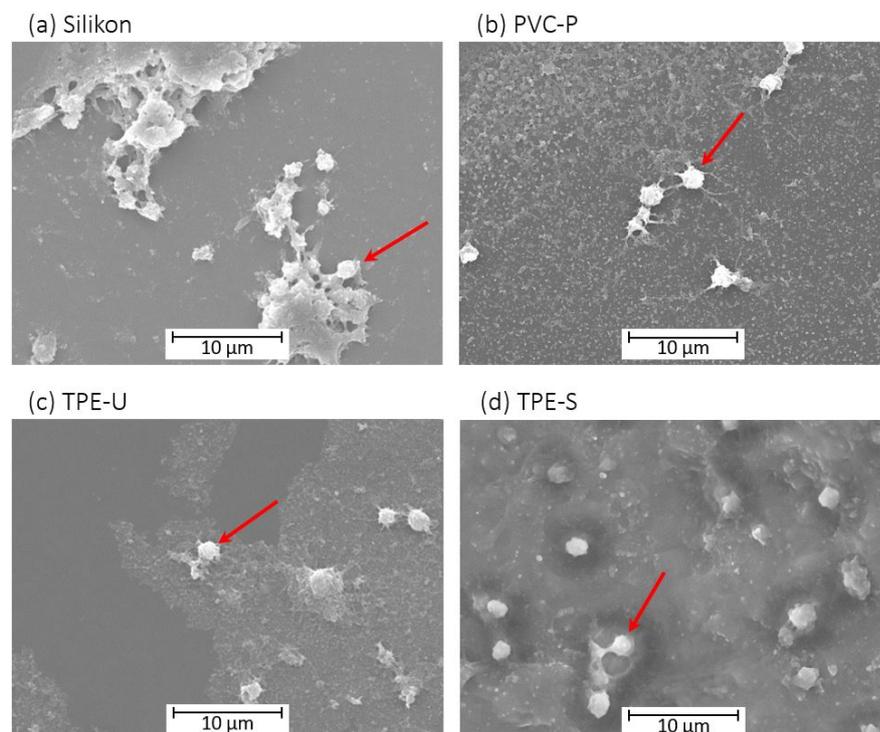


Abb. 4.12: **Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der extrudierten Oberflächen nach Inkubation mit Thrombozyten.** Die Bilder wurden im SE-Modus (sekundäre Elektronen) mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV bei 2500-facher Vergrößerung aufgenommen. Adhärenente Thrombozyten sind mit roten Pfeilen markiert.

Eine Analyse der Probenoberfläche mit Rasterelektronenmikroskopie nach Inkubation mit Thrombozyten wird als Validierung der Ergebnisse des ACP-Tests durchgeführt. Die Bilder sind in Abbildung 4.12 zu sehen. Im Gegensatz zur letzten Untersuchung sind die Unterschiede zwischen den Proben weniger ausgeprägt. Das liegt wahrscheinlich an der Reduzierung des Einflusses der Oberflächentopografie durch Extrusion der Proben – ausgenommen die raue TPE-S Probe. Auf Silikon sind vergleichsweise größere Thrombozytenaggregate zu beobachten. Auf PVC-P, TPE-U und TPE-S adhären hingegen die Zellen vereinzelt auf der Oberfläche. Allerdings ist die Dichte der adhären Zellen auf den Proben nicht homogen, sodass keine sichere Schlussfolgerung über Thrombogenität der Werkstoffe getroffen werden kann. Dies zeigt den Vorteil des enzymatisch basierten ACP-Tests, weil dieses Verfahren die Thrombozytenadhäsion auf der gesamten Probenoberfläche ermitteln kann. Hierdurch werden Inhomogenitäten der Thrombozytenverteilung auf der Probe ausgeglichen, wodurch belastbare Ergebnisse gewonnen werden können.

Neben der Thrombozytenadhäsion wird auch der zweite Aspekt der Hämokompatibilität geprüft. Die Thrombinbildung wird durch 8 Wiederholungsversuche evaluiert und die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 zusammengefasst. In diesem Fall fällt ausschließlich TPE-S aufgrund seiner erhöhten Thrombinaktivität auf. Wie bei den vorherigen Untersuchungen ist bei glattem Silikon keine signifikante Aktivierung der sekundären Hämostase bemerkbar.

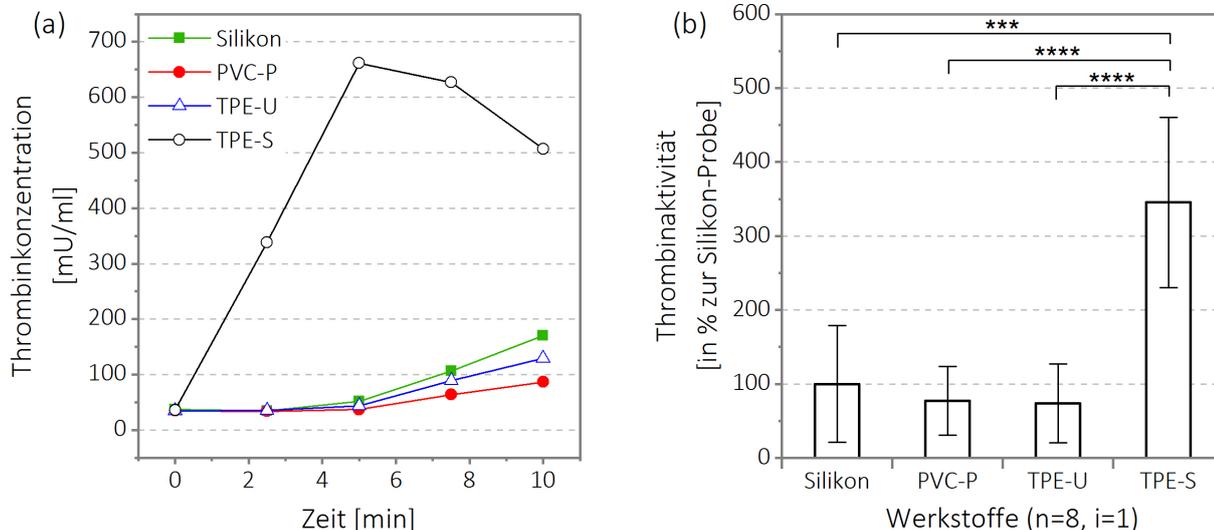


Abb. 4.13: **Thrombinbildung auf Silikon, PVC-P, TPE-U und TPE-S (TGA-Test).** (a) Thrombinbildung während eines exemplarischen Versuchs. (b) Thrombinaktivität gemittelt über 8 Wiederholungsversuche. TPE-S weist eine erhebliche Erhöhung der Thrombinbildung nach Inkubation von Plasma im Vergleich mit den anderen Werkstoffen auf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***) ; $p \leq 0,001$ (****).

4.3.3 Zytotoxizität

Die Hämokompatibilität ist die primäre Eigenschaft eines Werkstoffs, der im Kontakt mit Blut Anwendung findet. Weiterhin müssen Werkstoffe hinsichtlich ihrer Giftigkeit im Körper (Zytotoxizität) beurteilt werden, da eine Überprüfung auf Hämokompatibilität keine Aussage über potentiell beinhaltete giftige Substanzen liefert. In diesem Absatz wird die Zytotoxizität der vier Vergleichswerkstoffe (Silikon, PVC-P, TPE-U und TPE-S) analysiert, um ihre Eignung als Implantationsprodukt zu beurteilen.

Die Unbedenklichkeit der Werkstoffe wird durch *in vitro* Zytotoxizitätsuntersuchungen gemäß der Norm DIN ISO 10993-5 evaluiert. Die untersuchten Werkstoffe werden zuerst unter kontrollierten Bedingungen mit einem Zellkulturmedium inkubiert, um potenziell lösliche Substanzen zu extrahieren. Zwei unterschiedlich lange Extraktionen werden hier betrachtet: eine 3 und eine 7 Tage dauernde Extraktion (siehe Anhang B.4.). Eine 3-tägige Extraktion ist ausreichend, um den Mindestanforderungen der Norm zu entsprechen. Die zusätzliche Inkubationsdauer von 7 Tagen dient als aussagekräftigere Prüfung und ist für die Suche nach toxischen Substanzen relevant. In einem zweiten Schritt werden biologische Zellen (in diesem Fall humane Fibroblasten der Linie Hs 27, CRL-1643TM, ATCC[®], UK) mit den hergestellten Extrakten inkubiert. Falls die Extrakte sich als toxisch erweisen, wird die Vitalität der Fibroblastenkultur eingeschränkt. Die Auswirkungen sind eine Veränderung der Morphologie der Zellen, eine Reduktion der Zellproliferation und eine Erhöhung der Sterberate der Zellen. In dieser Arbeit wird als Standarduntersuchung die Messung der Intensität des Stoffwechsels der Zellen durchgeführt (CCK8-assay, Dojindo EU GmbH, Germany). Laut ISO 10993-5 muss die Vitalität der Zellen unter einen Wert von 70 % der Blankprobe¹ liegen, um die Zytotoxizität des Werkstoffs nachzuweisen. Eine positive Kontrollprobe² wird ebenfalls mitgeführt, um die experimentelle Durchführung des Versuches zu validieren. Zu diesem Zweck wird Kupfer mit der gleichen Extraktionsprozedur verwendet. Die detaillierten Beschreibungen der Kultivierungsbedingungen, Herstellung der Extrakte und Auswertung der Ergebnisse sind im Anhang B.4. und B.6. dokumentiert.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung der vier Werkstoffe sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Ungiftigkeit der Werkstoffe ist für Silikon, TPE-U und TPE-S nachgewiesen, da selbst die 7-tägigen Extrakte keine Wirkung auf die Zellvitalität der Kulturen haben. Im Gegensatz hierzu verursacht der Extrakt aus PCV-P eine drastische Reduktion der Zellvitalität, was für eine sehr starke Zytotoxizität des Werkstoffs spricht. Die mikroskopische Analyse der Morphologie der Zellen nach Inkubation mit den Werkstoffextrakten ist in der Abbildung 4.15 dargestellt und bestätigt diese Ergebnisse. Für manche Werkstoffe (z. B. Silikon) befindet sich

¹Zur Herstellung einer Blankprobe wird das Zellkulturmedium (ohne Werkstoffprobe) nach der gleichen Prozedur wie für die anderen Extraktionen behandelt.

²Die positive Kontrollprobe besteht aus einem Werkstoffextrakt, das stark toxisch ist und die Zellen abtötet.

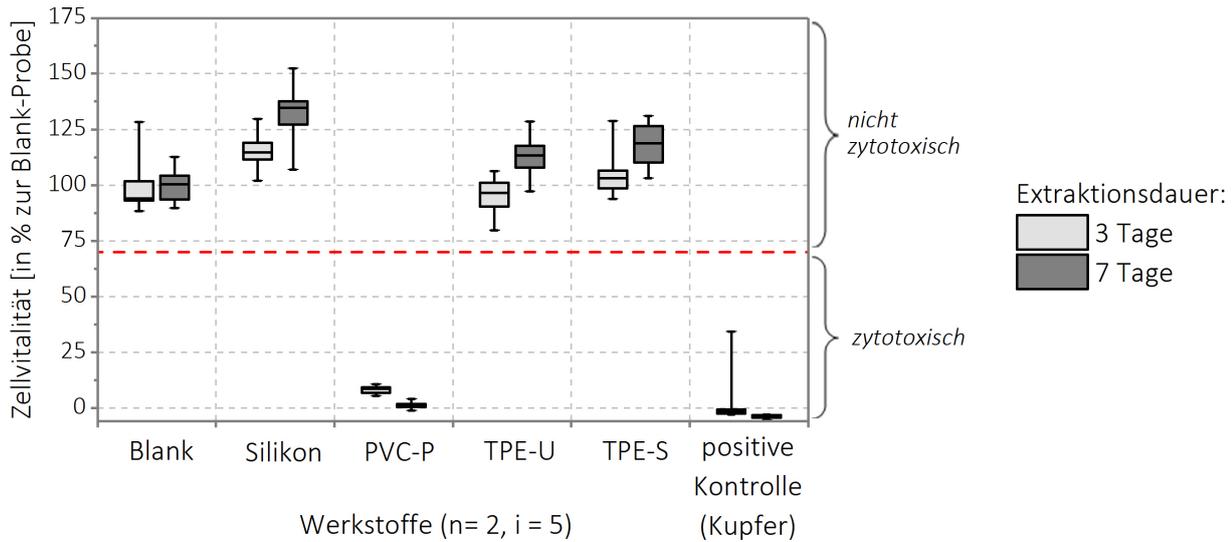


Abb. 4.14: **Zytotoxizität von Silikon, PVC-P, TPE-U und TPE-S (CCK8-Test)**. Mit der Ausnahme von PVC-P (sehr niedrige Zellvitalität < 10 %) weisen die untersuchten Werkstoffe keine zytotoxische Wirkung nach 3 Tagen oder nach 7 Tagen auf. Für jeden Extrakt werden der Median, das erste Quartil, das dritte Quartil, der Minimalwert und der Maximalwert der Zellvitalität dargestellt.

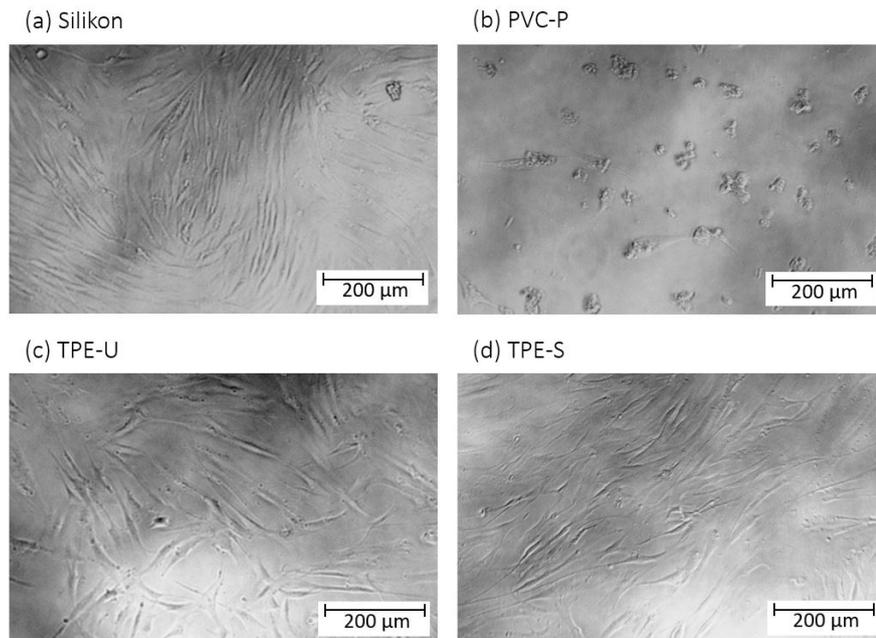


Abb. 4.15: **Mikroskopische Aufnahme der Zellen nach 3-tägiger Inkubation mit den Werkstoffextrakten**. Nach Kontakt mit Extrakten von Silikon, TPE-U und TPE-S weisen die Fibroblasten eine gesunde, ausgestreckte Morphologie auf. Nach Kontakt mit dem PVC-P-Extrakt sind die Zellen abgerundet und nicht auf dem Boden des Zellkulturgefäßes adhären, was auf eine toxische Wirkung zurückzuführen ist.

der Wert der Proliferationsrate über dem Wert der Blankprobe, was sich aus der Berechnung der Mittelwert aus den 10 experimentellen Messungen ergibt. Die Abweichungen zwischen den Mittelwerten befinden sich allerdings innerhalb der experimentellen Streuung und haben daher keine klare Bedeutung.

Trotz seiner sehr guten Hämokompatibilität (siehe im vorherigen Kapitel) ist die Anwendung von PVC-P als Medizinprodukt aufgrund seiner starken Zytotoxizität fraglich. Allerdings muss an dieser Stelle herausgestellt werden, dass die Untersuchung sich nur auf ein exemplarisches PVC-P bezieht. Die chemische Zusammensetzung ist je nach Hersteller unterschiedlich (Weichmacher, Füllstoffe, Farbstoffe usw.), wodurch eine Verallgemeinerung auf die gesamte Werkstoffklasse streng genommen nicht zulässig ist. Zusätzlich können andere Faktoren eine Rolle für die finalen Werkstoffeigenschaften spielen (Herstellung, Transport, Lagerung, etc). Weiterhin muss PVC-P viele Weichmacher enthalten, um eine ausreichende Flexibilität des Werkstoffs zu gewährleisten. Die Migration von Weichmachermolekülen zur Werkstoffoberfläche während der Extraktion ist wahrscheinlich der Grund für die in diesem Fall beobachtete Zytotoxizität. In der Fachliteratur wurden ähnlichen Untersuchungen an PCV-P für Blutbeutel berichtet. Zum Beispiel wurde die Migration des Weichmachers DEHP¹ während der Lagerung von P-PVC im Wasser von Al Salloum *et al.* nachgewiesen [2]. Außerdem steht dieses Molekül wegen seiner Toxizität längst im Verdacht, schwere Nebeneffekte verursachen zu können [283]. Eine ähnliche Wirkung wurde von Fischer *et al.* durch Zytotoxizitätsprüfung an BioMEMs² demonstriert, wobei PVC als positive – also toxische – Kontrolle verwendet wurde [83]. Allerdings ist die genaue Zusammensetzung des hier verwendeten PVC-P nicht bekannt, sodass die beobachtete Zytotoxizität nicht auf ein bestimmtes Molekül zurückgeführt werden kann.

4.3.4 Diskussion: Hämokompatibilität von Silikonelastomeren

Die Hämokompatibilitätsprüfung der vier vorgestellten Werkstoffe hat gezeigt, dass Silikon eine vergleichsweise ausgeprägte Thrombozytenadhäsion auslöst (primäre Hämostase), aber die Gerinnungskaskade nicht aktiviert (sekundäre Hämostase). In dieser Untersuchung haben auch die meisten anderen Kunststoffe (PVC-P und TPE-U) keine Aktivierung der Gerinnungskaskade verursacht. Zusammengefasst weist also Silikon ein eher thrombogenes Verhalten auf.

Trotz umstrittener Fachliteratur bezüglich der Hämokompatibilität von Silikon (siehe Kapitel 2.3.2) ist es in diesem Fall jedoch interessant, die Ergebnisse von Studien, die die gleichen Werkstoffe untersucht haben, zu analysieren. Die Arbeitsgruppe von Glasmacher hat u. a. Silikon- und PVC-P-Schläuche mit einem „Chandler Loop“ untersucht. In ihrer Untersuchung haben sie nachgewiesen, dass Silikon eine stärkere Reduktion der Thrombozytenzahl im zirkulierenden Vollblut als PVC-P verursacht, was für eine thrombogene Wirkung des Silikons spricht [193, 90]. Sie vergleichen außerdem ihre Ergebnisse mit einer ähnlichen Studie von Mulvihill und Cazenave, die u. a. Silikon-, TPE-U- und PVC-P-Schläuche untersucht haben. Hier hat Silikon ebenfalls mehr Thrombozytenadhäsion erzeugt als die anderen zwei Kunst-

¹Diethylhexylphthalat, einer der meistverwendeten Weichmacher für medizinische Kunststoffe.

²Bio-Mikro-Elektro-Mechanische-Systeme.

stoffe [194]. Mit Hilfe eines dynamischen Modells zeigten auch Goodman *et al.* eine Zunahme der Thrombusgröße auf Silikon im Vergleich zu PVC-P [94]. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Studien, die unter dynamischen Flussbedingungen durchgeführt worden sind, stimmen also mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein und belegen die starke Aktivierung der primären Hämostase durch die Silikonoberfläche.

Cao *et al.* haben die Thrombozytenadhäsion auf u. a. Silikon, TPE-U und PVC-P (DEHP-frei) unter statischen Flussbedingungen untersucht und gezeigt, dass Silikon mehr Thrombozytenadhäsion als TPE-U und PVC-P aufweist, wenn entweder Vollblut oder PRP für die Untersuchung verwendet wird. Im Fall einer Untersuchung mit gewachsenen Thrombozyten erweist sich Silikon als weniger thrombogen als die anderen zwei Kunststoffe [44]. Dieser Effekt deutet wahrscheinlich auf die wichtige Rolle der Gerinnungsfaktoren im Blutplasma und der Flussbedingungen hin. In zwei weiteren Studien können allerdings keine Unterschiede zwischen Silikon und PVC-P einerseits sowie Silikon und TPE-U andererseits festgestellt werden [114, 233].

Wenige Arbeiten berichten über Untersuchungen der sekundären Hämostase. Van Oeveren *et al.* haben die Aktivierung der Gerinnungskaskade nach Kontakt von Blutplasma mit Silikon, PVC und TPE-U beschrieben. Sie haben gezeigt, dass Silikon die Gerinnung besonders stark im Vergleich zu den anderen Kunststoffen aktiviert, was den Ergebnissen dieser Arbeit widerspricht [206]. Der Unterschied könnte ebenfalls in den abweichenden Zusammensetzungen der Proben liegen.

Neben dieser Reihe von *in vitro* Untersuchungen wurden dieselben Werkstoffe ebenfalls in *in vivo* Studien bewertet. Ein guter Überblick ist im Buch von H. Plank zusammengefasst [269]. Die Autoren analysieren die Ergebnisse von zwei klinischen Studien, die Silikon- und Polyurethankatheter nach Implantation im Menschen vergleichen. In einer Studie von Lidner ist das Thromboserisiko bei einem Silikonkatheter deutlich höher (Inzidenz von 35 %) als bei einem Polyurethankatheter (Inzidenz von 5,5 %). In der zweiten Studie von Otteni sind nur leichte Unterschiede bemerkbar (Inzidenz von 20 % für Silikon und 17 % für Polyurethan).

Wenn ausschließlich ausgewählte Werkstoffe betrachtet werden, stimmen die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Hämokompatibilitätsprüfung mit einem Großteil der Berichte aus der Literatur überein. Vor allem im Bezug auf die Thrombozytenfunktion kristallisiert sich die Aussage, dass Silikon eine stärkere Thrombozytenadhäsion als PVC-P und TPE-U verursacht. Die Ergebnisse der Prüfung der sekundären Hämostase sind hingegen teilweise widersprüchlich zu Literaturangaben. Allerdings ist die Anzahl von verfügbaren Daten in der Literatur zu gering, um eine klare Tendenz erkennen zu können. Außerdem können die verwendeten Kunststoffe in ihrer Zusammensetzung variieren und somit die Abweichungen zwischen den Studien begründen. Ein anderer Grund kann in der verwendeten Analytik in dieser Arbeit und in der Literatur liegen, da diese unterschiedlich gute Nachweiseigenschaften

besitzen.

Eine komparative Analyse der Ergebnisse der Thrombozytenadhäsionsprüfung (siehe Abbildung 4.11) und der Messung der Benetzbarkeit der verwendeten Kunststoffe (siehe Tabelle 4.1) zeigt eine bemerkenswerte Korrelation zwischen der Hydrophobie der Oberfläche und dem Grad der Thrombozytenadhäsion. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits im Kapitel 3.3 bei der Validierung des Prüfstandes gemacht. Allerdings war in dieser ersten Versuchsreihe der Einfluss der Oberflächenrauheit der Proben nicht komplett ausgeschlossen. Diese neue Untersuchung mit extrudierten Proben scheint also eine negative Wirkung der Hydrophobie der Oberfläche auf die Hämokompatibilität und insbesondere die Thrombozytenadhäsion zu bestätigen. Weil Silikon ein stark hydrophober Kunststoff ist, ist seine Thrombogenität vergleichsweise hoch.

Neben der Oberflächenstrukturierung trägt die Oberflächenchemie des Werkstoffs wesentlich zu seiner Hämokompatibilität bei. Allerdings ist es mit den vorliegenden Daten nur schwer möglich, klare Aussagen zum Einfluss der Oberflächenzusammensetzung auf die Blutkomponenten zu treffen. Der Grund dafür ist, dass die genaue Zusammensetzung der Werkstoffe von den Herstellern nicht bekannt gegeben wird. Eine vertiefte Analyse wird aber im nächsten Kapitel geführt, nachdem die Silikonoberfläche unter kontrollierten Bedingungen chemisch modifiziert worden ist. Weil der Einfluss der Modifizierungen auf die Hämokompatibilität bewertet werden kann, wird es nun möglich, Schlussfolgerungen über die Auswirkungen der eingebrachten chemischen Gruppen auf die Gerinnung zu ziehen. Eine zusammenfassende Diskussion über die Wechselwirkungen zwischen der Oberflächenchemie und den zwei Gerinnungsprozessen erfolgt detailliert im Kapitel 5.3.

5 Verbesserung der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren

Die Analyse der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren im Kapitel 4 hat gezeigt, dass ihre Oberflächeneigenschaften für den Blutkontakt nicht optimal sind. In diesem Kapitel soll gezeigt werden, wie durch gezielte Modifikationen des Werkstoffs die Hämokompatibilität verbessert werden kann und gleichzeitig die Eigenschaften des Bulkmaterials (Bulkigenschaften) beibehalten werden.

5.1 Hämokompatible Modifizierungen von Silikonelastomeren

5.1.1 Oberflächen- und Bulk-Modifizierungen

Polyethylenglykol-basierte Modifizierungen

Polyethylenglykol (PEG) ist ein wasserlösliches Polymer, das in der Medizintechnik für seine Passivierungseigenschaften und seine gute Biokompatibilität bekannt ist [291]. Seine Strukturformel ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Die Anwendung von PEG für die Hydrophilisierung von Silikonelastomeren (im Folgenden auch als „Silikone“ bezeichnet) wurde bereits kurz im Kapitel 2.4.2 vorgestellt. Neben der Hydrophilisierung wurden die Passivierungseigenschaften von PEG z. B. von Sigura *et al.* für lab-on-a-chip Anwendungen demonstriert: Nachdem Polyethylenglykoldiakrylat (PEGDA) als Mikrostrukturierung aus Silikon aufgebracht wird, kann durch mikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden, dass die beschichteten Bereiche sowohl geringere Proteinadsorption als auch Zelladhäsion aufweisen [272]. Andere Autoren berichten von einer 90-prozentigen Reduktion bei der Adsorption von Fibrinogen und Albumin auf PEG-beschichtetem Silikon, was die starke proteinabweisende Wirkung von PEG deutlich belegt [53].

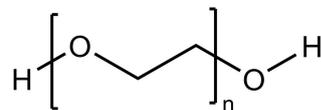


Abb. 5.1: **Strukturformel von Polyethylenglykol (PEG)**. Lineare PEGs bestehen aus einer Kette mit der Grundeinheit $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$.

Neben der Passivierung der Oberfläche kann PEG zur Verbesserung der Hämokompatibilität von medizinischen Kunststoffen beitragen. Zum Beispiel haben Cao *et al.* eine ausführliche Studie zur Hämokompatibilität von Tetraglymen¹ durchgeführt. In einem *in vitro* Versuch mit beschichteten Polyethylenschläuchen zeigen sie, dass Fibrinogen- und vWF-Adsorption,

¹Tetraethylenglycoldimethylether ist ein lineares Molekül, das mit den gleichen Monomeren wie PEG aufgebaut ist.

Thrombinbildung und Thrombozytenadhäsion drastisch reduziert werden. Ein *ex vivo* Versuch mit arteriellem Shunt im Schaf-Modell bestätigt diese Ergebnisse und kann die Hämokompatibilität der Beschichtung belegen [44]. Außerdem werden ähnliche Beobachtungen für Beschichtungen auf anderen Substraten (Glass, PU) gemacht [43, 135]. Auf die Hämokompatibilität von PEG-modifizierten Silikonelastomeren wird auch in der Fachliteratur eingegangen. Park *et al.* berichten von einer 35-prozentigen Reduktion der Thrombozytenadhäsion auf PEG-beschichteten Silikonschläuchen in einem *ex vivo* Versuch (arteriovenöser Shunt im Hund-Modell) [216]. In *in vitro* Studien sind die Ergebnisse noch deutlicher. Zum Beispiel verursacht die Beschichtung von Silikon mit Polyethylenglykolmethakrylat (PEGMA) einen Abfall von 80 % der Thrombozytenadhäsion und eine Verlängerung von 90 % der Plasmarekalkifizierungszeit¹ [168].

Aufgrund der zahlreichen und vielversprechenden Berichte aus der Fachliteratur werden in dieser Arbeit Silikonmodifizierungen basierend auf PEG vorgenommen. Trotz guter Beschreibung der Wirkung des Moleküls, gibt es noch einige Herausforderungen für eine industrielle Anwendung im Medizinbereich. PEG ist oxidativ abbaubar, insbesondere unter thermischer Belastung [9]. Die Degradation könnte möglicherweise bei der Temperung und/oder Sterilisation des Werkstoffs auftreten. Außerdem ist die Langzeitstabilität der Oberflächeneigenschaften erforderlich, um während der Lagerung des Produktes und seiner drauffolgenden Implantation im Körper die biologische Wirkung behalten zu können. Ein Nachteil der PEG-basierten Modifizierungen ist aber ihre Anfälligkeit für eine sog. hydrophobe Relaxation der Silikonoberfläche (siehe Hintergrund im Kapitel 2.4.1) [219, 272]. Aus diesen Gründen besteht noch großes Interesse an der Entwicklung von PEG-modifizierten Silikonoberflächen, die folgende Eigenschaften besitzen: einfach verarbeitbar (keine oder wenige zusätzliche Prozessschritte), beständig gegenüber Temperung und Sterilisationsverfahren, kostengünstig, nicht toxisch und hämokompatibel.

Auswahl der Positivkontrolle für die Hämokompatibilitätsprüfung

Die Modifizierungen mit PEG haben das Ziel, die Hämokompatibilität des Silikons zu verbessern. Für die Hämokompatibilitätsprüfung ist es außerdem empfehlenswert, eine Positivkontrolle – also eine thrombogene Werkstoffprobe – als Referenz mitzuführen, um eine einfache Interpretation zu ermöglichen. Es ist zusätzlich von wissenschaftlichem Interesse zu untersuchen, inwieweit sich die chemische Zusammensetzung der Oberfläche auf die Hämokompatibilität auswirkt. Daher werden für diese Arbeit zwei Beschichtungen auf Silikon als Kontrolle verwendet.

Die Prüfung der Thrombozytenadhäsion erfordert eine Positivkontrolle, die die Zelladhäsion

¹Die Plasmarekalkifizierungszeit ist ein experimentell ermittelter Wert, der die Aktivierung der Koagulationskaskade im Blutplasma beschreibt. Die Aktivierung des Blutplasmas – z. B. durch den Kontakt mit einer thrombogenen Oberfläche –, kann sich durch eine verkürzte Plasmarekalkifizierungszeit charakterisieren.

fördert. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Beschichtungen mit Aminogruppen die Zelladhäsion signifikant erhöhen [8, 79]. In anderen Arbeiten wird APTES (Aminopropyltriethoxysilan) als Beschichtungsmolekül für die Verbesserung der Zelladhäsion bewusst ausgewählt [273, 141]. Aus diesen Gründen wird für die nachfolgende Untersuchungen eine APTES basierte Beschichtung als Referenz verwendet.

Vogel *et al.* haben ähnliche Untersuchungen durchgeführt, um das Aktivierungspotenzial auf die Gerinnungskaskade verschiedener chemischer Gruppen zu evaluieren. Sie haben gezeigt, dass COOH-funktionalisierte Oberflächen sich als die thrombogensten erweisen [292]. Außerdem stimmt dieses Ergebnis mit der Aussage überein, dass negativ geladene Oberflächen die Gerinnung auslösen [205]. Als Positivkontrolle für die Thrombinbildungsversuche wird ebenfalls in dieser Arbeit mit Säurefunktionen beschichtet.

Durchführung der Modifizierungen

Weil die Langzeitstabilität und Verträglichkeit des modifizierten Werkstoffs von primärer Bedeutung ist, werden in dieser Arbeit ausschließlich Modifizierungen durchgeführt, die auf der kovalenten Bindung von PEG an dem Silikon basieren. Auf diese Weise dürfen nach der Modifizierung keine ungebundenen Moleküle aus dem Werkstoff austreten. Das einfache Mischen von PEG in der Silikonmasse [316] oder die Adsorption des PEGs auf die Werkstoffoberfläche [301] werden hier also nicht betrachtet.

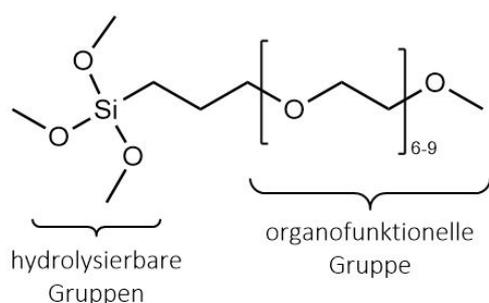
Im vorherigen Kapitel wurde die Relevanz der Oberflächentopografie diskutiert (siehe 4.2) und es wurde gezeigt, dass alle Oberflächen glatt sein sollten, um eine aussagekräftige Analyse der Hämokompatibilität der modifizierten Silikone gewährleisten zu können. Aus diesem Grund werden nun alle Silikonproben zwischen zwei PTFE-Folien gepresst, um die Rauheit der metallischen Gegenplatte abzudecken.

Oberflächensilanisierung

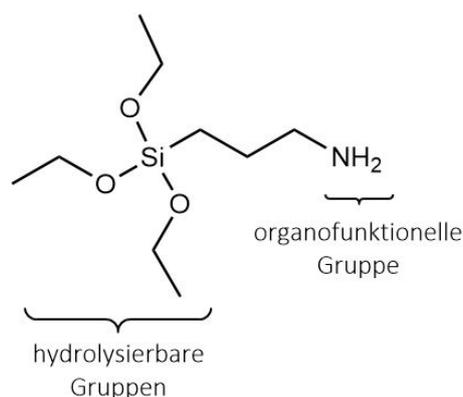
Mit einer Silanisierung lässt sich die Silikonoberfläche mit PEG-, Amino- und Carboxyl-Gruppen funktionalisieren. Das Prinzip wurde im vorherigen Kapitel 2.4.2 beschrieben. Für diese Arbeit werden drei organofunktionelle Silane eingesetzt (siehe Strukturformel in Abbildung 2.10):

- PEG-funktionalisiertes Silan: 2-[methoxy (polyethylenoxy)_{6–9} propyl] trimethylsiloxan, ChemPur, Karlsruhe, Deutschland, als hämokompatible Beschichtung (Abbildung 2.10 (a)) im Folgenden als „Referenz + PEG-Beschichtung“ bezeichnet.
- Amino-funktionalisiertes Silan (APTES): Genosil[®] GF93, Wacker Chemie AG, Burghausen, Deutschland, als Positivkontrolle für Zelladhäsionsversuche (Abbildung 2.10 (b)) im Folgenden als „Referenz + GF93“ bezeichnet.

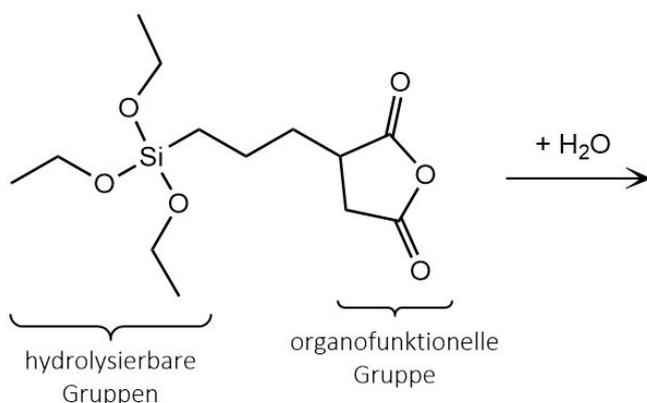
- Säure-funktionalisiertes Silan: Genosil[®] GF20, Wacker Chemie AG, Burghausen, Deutschland (Abbildung 2.10 (c)). Nach Reaktion mit Wasser kann sich die Bernsteinsäure-Funktion aufspalten und zwei Carboxyl-Gruppen freilegen (Abbildung 2.10 (d)). Diese Beschichtung gilt als Positivkontrolle für die Thrombinbildungsversuche und wird im Folgenden als „Referenz + GF20“ bezeichnet.

(a) 2-[methoxy(polyethylenoxy)₆₋₉ propyl]trimethoxysilan

(b) (3-aminopropyl)triethoxysilan



(c) 3-(Triethoxysilyl)propylbernsteinsäureanhydrid



(d) 2-[3-(Triethoxysilyl)propyl]bernsteinsäure

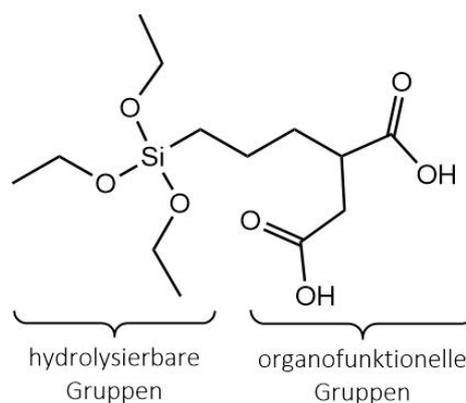


Abb. 5.2: **Strukturformel der verwendeten organofunktionellen Silane.** Die Silane bestehen aus einem Siliziumatom, das an drei hydrolysierbare Gruppen und an eine organofunktionelle Gruppe gebunden ist. Die hydrolysierbaren Gruppen können sich an die aktivierte Silikonoberfläche kovalent anbinden; die organofunktionelle Endgruppe befindet sich dann an der Oberfläche.

Die Silanisierungsreaktion wurde im Kapitel 2.4.2 beschrieben. Das HTV Silpuran[®] UR 9030/60 wird als Substrat verwendet, da es sich für die Extrusion eignet und für die Herstellung eines Katheters eingesetzt werden kann. Die Aktivierung der Silikonoberfläche erfolgt mit OpenAir[®]-Plasma (Anlage PT-60, Plasmatreat GmbH, Steinhagen, Deutschland), wobei die optimalen Aktivierungsparameter im Rahmen einer Studienarbeit festgelegt worden sind [126]. Die detaillierten experimentellen Protokolle zur Oberflächenaktivierung und -funktionalisierung sind im Anhang C.5. dokumentiert. Nach der Erstellung werden die Proben aus modifizierten Silikon standardmäßig gereinigt und mit Heißdampf sterilisiert (siehe Anhang C.3. und C.4.).

Additivierung

Die Modifizierung von Silikon mit PEG kann auch durch Additivierung umgesetzt werden. In dieser Arbeit wird eine Hydrosilylation-basierte Modifizierung vorgenommen (siehe Prinzip im Kapitel 2.4.2). Zu diesem Zweck wird ein vernetzbares Polyethylen-Glycol-Siloxan-Copolymer (PTS-A M1, Wacker Chemie AG, Burghausen, Deutschland) mit der unvernetzten Silikonmasse gemischt. Das Additiv wird in dieser Arbeit als „PEG-Additiv“ bezeichnet. Das Copolymer enthält eine funktionelle Gruppe, die eine Bindung an das Silikonnetzwerk während der Vulkanisation ermöglicht [36].

Obwohl die genaue Zusammensetzung des Additivs nicht offen gelegt wurde, kann man einen möglichen Vernetzungsablauf vermuten. Die Pt-katalysierte Additionsvernetzung basiert auf der Reaktion zwischen der Vinyl-Gruppe des PDMS und der Si-H-Gruppe des Vernetzers. Verschiedene Publikationen beschreiben bereits Additivierungsstrategien, wobei vinyl-funktionalisierte Moleküle über diese Reaktion kovalent an das Silikonnetzwerk gebunden werden [327, 221]. Ein ähnliches Prinzip könnte in diesem Fall möglich sein, wenn das Polyethylen-Glycol-Siloxan-Copolymer mit einer Vinylfunktion ausgestattet wird. Diese hypothetische Vernetzungsreaktion ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Eine andere Möglichkeit würde in der umgekehrten Reaktion bestehen: die Vernetzung eines Si-H-funktionalisierten Additivs mit dem vinyl-funktionalisierten PDMS.

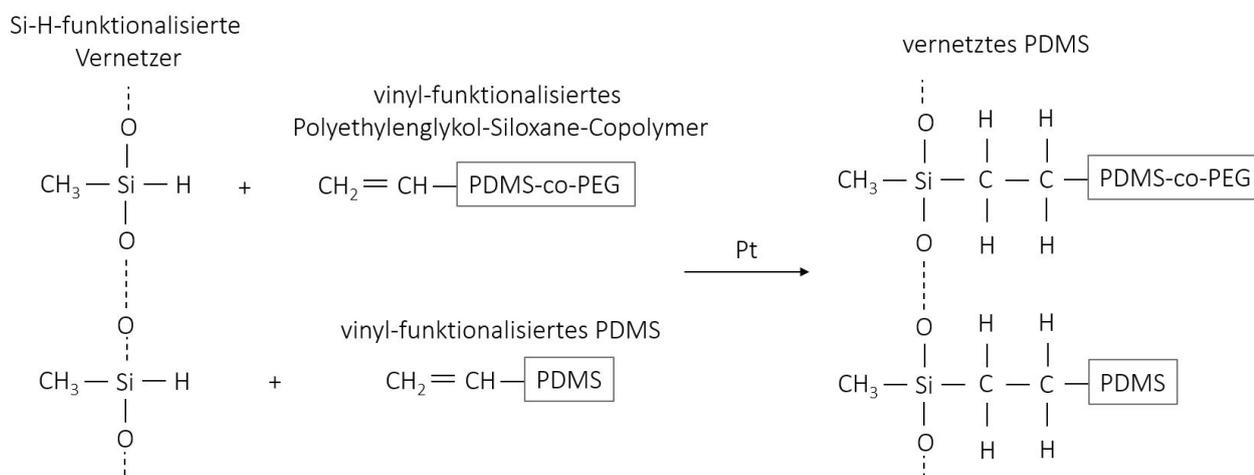


Abb. 5.3: **Mögliche Verbindungsreaktion zwischen dem PEG-Additiv und dem Silikonnetzwerk.** Falls das Polyethylenglykol-Siloxan-Copolymer (PDMS-co-PEG) mit einer Vinylgruppe funktionalisiert wird, könnte es sich theoretisch über die Pt-katalysierte Additionsvernetzung an das vinyl-funktionalisierte PDMS kovalent binden.

In dieser Arbeit werden zwei Varianten dieser Modifizierung untersucht:

- Vulkanisierte Silikonplatten wurden von der Firma Wacker Chemie AG zur Verfügung gestellt. Diese bestehen aus HTV Silpuran[®] UR 9030/60 und enthalten 8 % des PEG-Additivs und 1,5 % des Vernetzers Silpuran[®] Curing Agent X. Diese Proben werden im Folgenden als „Referenz + PEG-Additiv“ bezeichnet.

- Ein kommerziell erhältliches RTV-2 (Elastosil[®] RT 629, Wacker Chemie AG, Burghausen, Deutschland), welches das PEG-Additiv enthält, wird als Vergleich evaluiert. Die Untersuchung dieses Silikon könnte die Wirkung des PEG-Additivs für verschiedene Silikontypen bestätigen. Diese Proben werden im Folgenden als „PEG-additivierte RTV-2“ bezeichnet. Die Verarbeitung dieses Silikons ist im Anhang C.2. beschrieben.

Nach der Herstellung werden die Proben aus modifiziertem Silikon standardmäßig gereinigt und mit Heißdampf sterilisiert (siehe Protokolle im Anhang C.3. und C.4.).

5.1.2 Hydrophilisierung und Langzeitstabilität

Bei der Klassifizierung von Medizinprodukten sieht die Norm DIN ISO 10993-1 einen Körperkontakt von mindestens 30 Tagen vor für den Fall einer Langzeitanwendung, was der höchsten Stufe der Klassifizierung entspricht (Dauerkontakt) [70]. In dieser Arbeit wird die Stabilität der Modifizierungen über eine Beobachtungsdauer von 2 Monaten untersucht. Proben werden an der Luft bzw. in destilliertem Wasser gelagert, um die Lagerungsbedingungen bzw. die Implantation der Werkstoffe zu simulieren. Die Messung der Kontaktwinkel mit Wasser liefert Informationen über die Benetzbarkeit der Oberfläche. Die Werte des Kontaktwinkels vor und nach der Einlagerung der Proben sind in Abbildung 5.4 dargestellt.

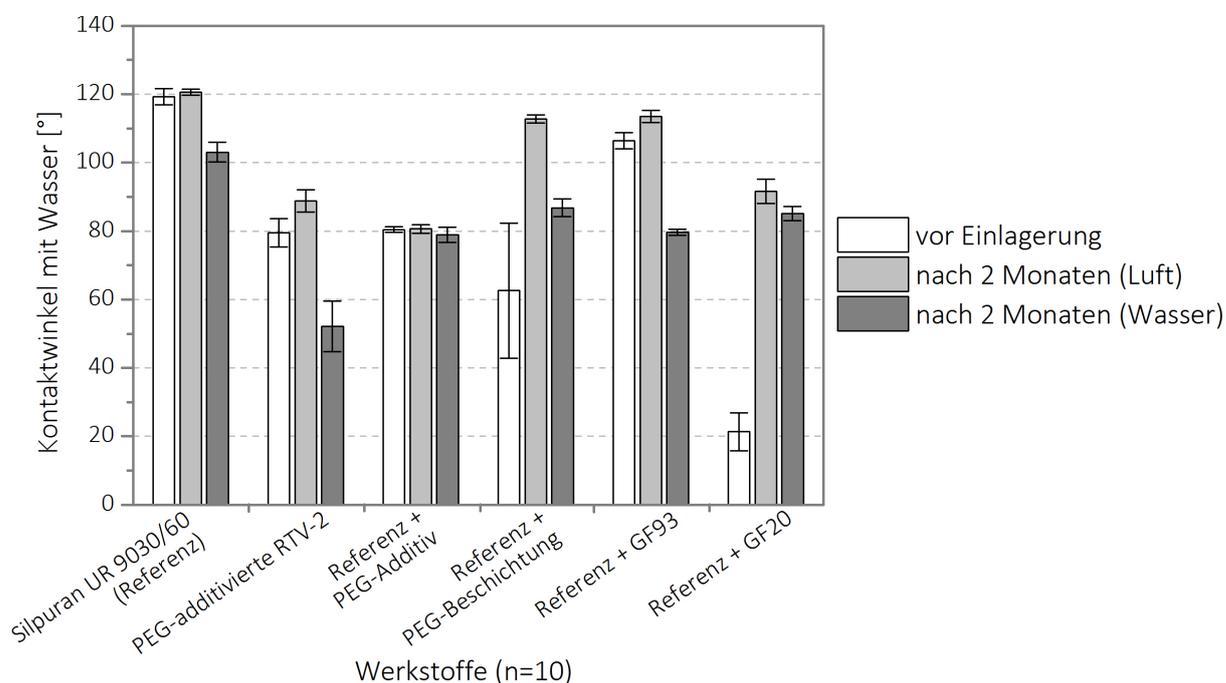


Abb. 5.4: **Kontaktwinkel mit Wasser der modifizierten Silikone.** Die Kontaktwinkelmessung erfolgt unmittelbar nach Stabilisierung der 2 μ l Tropfen auf die Oberfläche (Dispensergeschwindigkeit von 0,5 μ l/s). Die Messung erfolgt nach Herstellung der Probe und wird nach 2-monatiger Lagerung im Wasser und Luft wiederholt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($i = 10$).

Vor Einlagerung weist unmodifiziertes Silikon einen Kontaktwinkel (KW) von 119° auf, was einer starken Hydrophobie entspricht. Dieser Wert ändert sich nicht nach der Lagerung an der

Luft (120°), wird aber geringer nach der Einlagerung in Wasser (103°). Dies ist möglicherweise auf eine Hydratation der Oberfläche zurückzuführen, wie bereits im Fall von PEG gezeigt wurde [56]. Alle Modifizierungen haben eine unmittelbare Verbesserung der Benetzbarkeit verursacht, wobei die mit PEG modifizierten Proben hydrophile Oberflächen aufweisen (KW zwischen 60° und 80°). Beide Kontrollproben unterschieden sich zu den PEG-Modifizierungen, da die Beschichtung mit GF93 nur eine minimale Reduktion des Kontaktwinkels (106°) bringt und die Beschichtung mit GF 20 eine stark hydrophile Oberfläche erzeugt (KW von 21°).

Die zwei additivierten Silikone besitzen außerdem eine zeitstabile Oberfläche: Die Werte des Kontaktwinkels sind nach Lagerung an der Luft unverändert und werden sogar kleiner nach Einlagerung in Wasser, was auf eine Hydratation des Werkstoffs zurückzuführen ist. Die Hydratation erfolgt durch die Aufnahme von Wassermolekülen in einer oberflächlichen Schicht und durch ihre Bindung an dem Polymer über Wasserstoffbrücken, wie beschrieben in [56]. Die Stabilität der drei beschichteten Werkstoffe ist allerdings nicht so deutlich: Die Werte des Kontaktwinkels nach Lagerung an der Luft sind höher als unmittelbar nach der

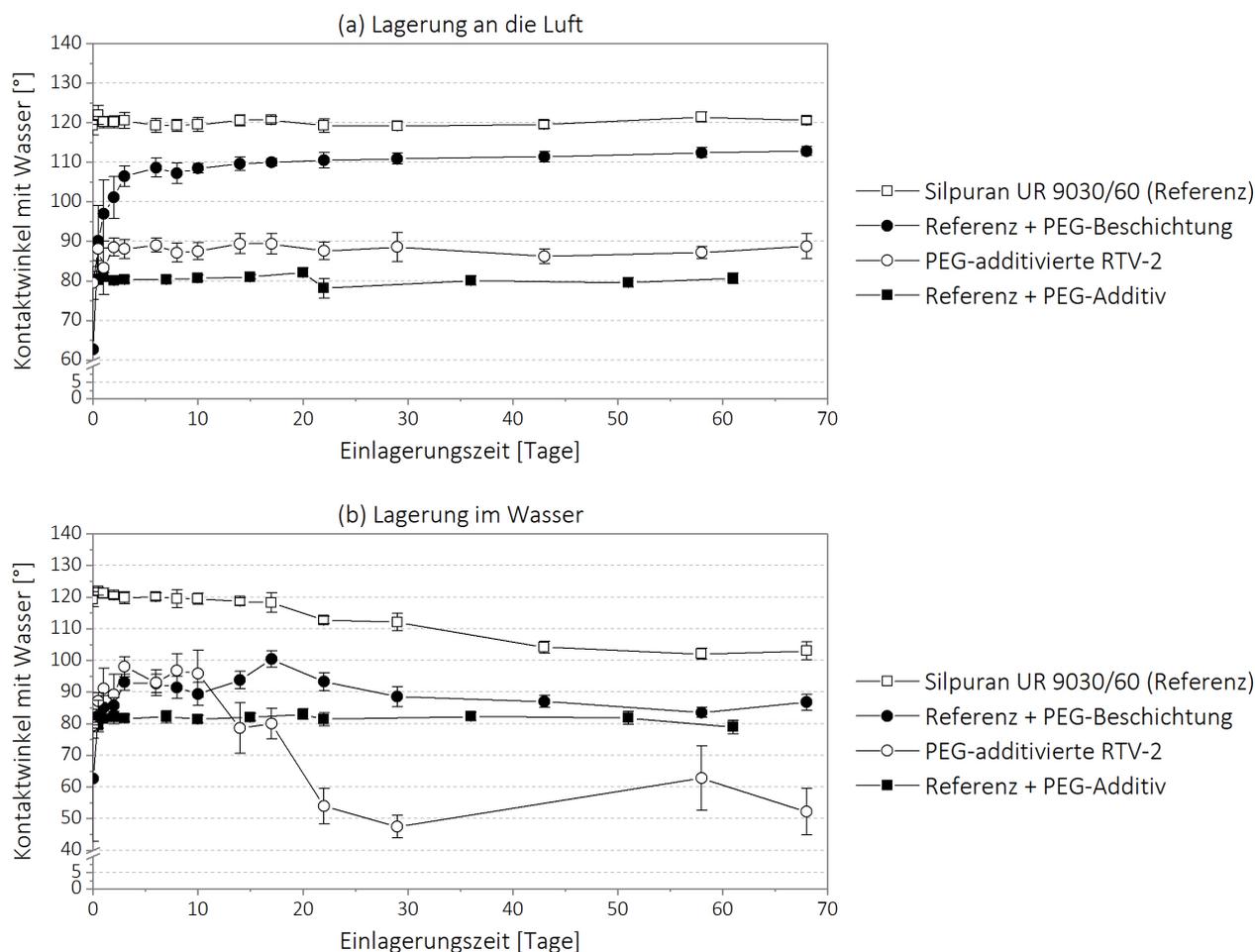


Abb. 5.5: **Kontaktwinkel der PEG-modifizierten Silikone während der Einlagerung.** Die Kontaktwinkelmessung erfolgt unmittelbar nach Stabilisierung der $2\ \mu\text{l}$ Tropfen auf der Oberfläche (Dispensergeschwindigkeit von $0,5\ \mu\text{l/s}$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Beschichtung, was auf eine Veränderung der Oberfläche hindeutet. Nach Lagerung in Wasser ist dieser hydrophoben Effekt allerdings weniger stark ausgeprägt, da die Hydratation der Oberfläche eine gegenläufige Wirkung hat. Trotzdem ist die hydrophile Wirkung während des Beobachtungszeitraums teilweise vorhanden. Dies zeigt sich daran, dass die Kontaktwinkel nach der Lagerung kleiner sind als vor der Lagerung.

Abbildung 5.5 zeigt den Verlauf des Kontaktwinkels der PEG-modifizierten Proben als Funktion der Zeit. Während des Einlagerungszeitraums wurde zu regelmäßigen Zeitpunkten gemessen. Vor jeder Messung wurden die Proben zwei Stunden bei Raumtemperatur in einem vakuumierten Exsikkator getrocknet. Für die additivierten Proben sind die Kontaktwinkel während der Lagerung an der Luft (Graph (a)) sehr stabil. Die hydrophobe Relaxation tritt bei der PEG-Beschichtung innerhalb von wenigen Tagen auf und die Kontaktwinkel liegen stabil bei Werten, die etwa 10° unterhalb der Werte des unmodifizierten Silikons sind. Im Fall der Lagerung in Wasser (Graph (b)) ist der Verlauf der Werte sehr ähnlich während der ersten 10 Tage. Anschließend tritt aufgrund der Hydratation der Oberfläche eine kontinuierliche Abnahme auf und der Kontaktwinkel stabilisiert sich nach ca. 30 bis 50 Tagen. Die hydrophile Wirkung der Modifizierungen mit PEG kann also nach 2-monatiger Lagerung sichergestellt werden.

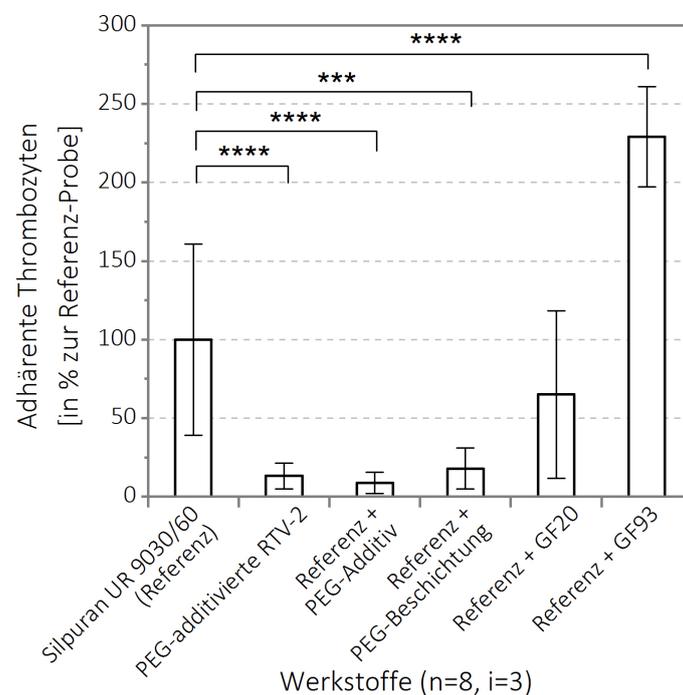


Abb. 5.6: **Thrombozytenadhäsion auf modifizierten Silikonem (ACP-Test)**. Die einstündige Inkubation von TK mit den Proben erfolgt unter dynamischen Flussbedingungen (15 U/min). Die maximale Thrombozytenadhäsion befindet sich auf der Positivkontrolle (Referenz + GF93). Die drei PEG-basierten Modifizierungen verursachen eine starke Reduktion der Anzahl von adhärenenten Thrombozyten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***); $p \leq 0,001$ (****).

5.1.3 Hämokompatibilität

Die Hämokompatibilitätsprüfung der modifizierten Silikone wird nach den im Kapitel 3 beschriebenen Methoden durchgeführt. Die detaillierten Beschreibungen der Versuche sind im Anhang C dokumentiert.

Primäre Hämostase

Die Thrombozytenadhäsion wird unter dynamischen Flussbedingungen mit dem neu entwickelten Inkubationssystem untersucht. Es wurden 8 Wiederholungsversuche durchgeführt und die Ergebnisse in Abbildung 5.6 dargestellt. Die Wirkung der Modifizierungen mit PEG lässt sich deutlich beobachten: Die adhärenenten Thrombozyten sind im Vergleich zu unmodifizierten Silikonproben um mehr als 80 % reduziert. Diese Ergebnisse stimmen außerdem mit der Verbesserung der Benetzbarkeit der Oberfläche (siehe Abbildung 5.4) überein. Die Reduktion der Thrombozytenadhäsion wird außerdem mit Rasterelektronenmikroskopie belegt. Abbildung 5.7 zeigt die Oberfläche der mit PEG modifizierten Silikone nach der einständigen

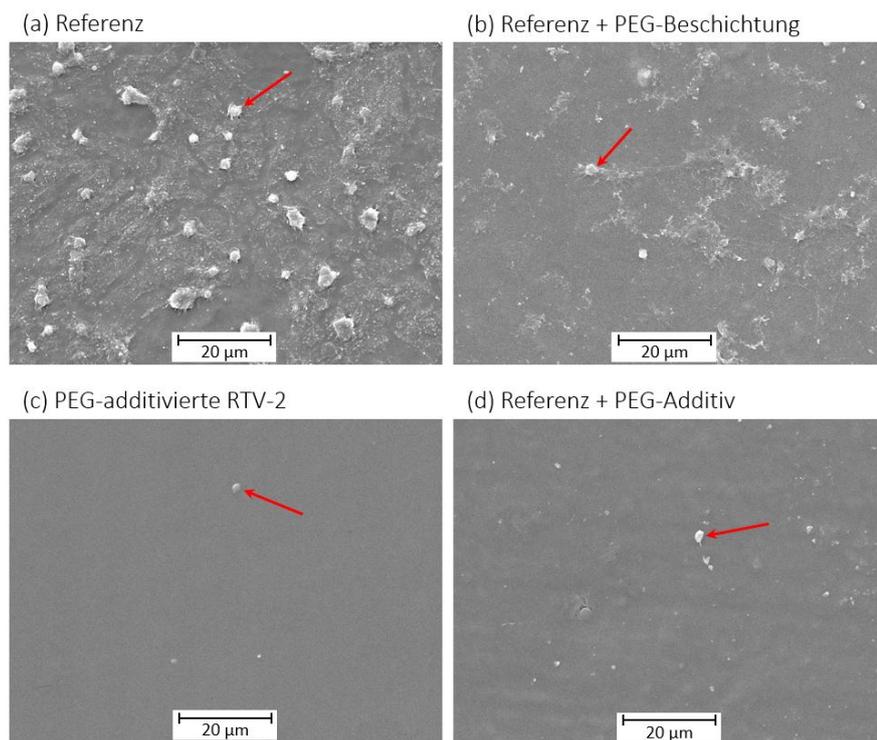


Abb. 5.7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche der mit PEG modifizierten Silikonem nach Inkubation mit Thrombozyten. Die Bilder wurden im SE-Modus (sekundäre Elektronen) mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV bei 1500-facher Vergrößerung aufgenommen. Adhärenente Thrombozyten sind mit roten Pfeilen angezeigt. Die zwei PEG-additivierten Silikone weisen sehr glatte Oberfläche mit vereinzelt adhärenenten Thrombozyten auf. Das PEG-beschichtete Silikon hat hingegen mehr Rückstände auf seiner Oberfläche und die unmodifizierte Silikonprobe ist mit adhärenenten Thrombozyten überzogen, die in einem ausgeprägten Aktivierungszustand vorliegen (zahlreiche Pseudopodien und Aggregate).

gen Inkubation mit Thrombozyten unter dynamischen Flussbedingungen. Im Vergleich zur Referenz (unmodifiziertes Silikon) weisen die Oberflächen der modifizierten Proben deutlich weniger adhärenente Rückstände und Thrombozyten auf. Außerdem sind die vereinzelt Thrombozyten vergleichsweise wenig aktiviert. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse des ACP-Tests und belegen die Aussage, dass die Passivierungseigenschaften des Silikons durch die Zugabe von PEG zunehmen.

Fibrinogenadsorption

Wie im Kapitel 2.1.2 erwähnt, steht die Fibrinogenadsorption in engem Zusammenhang mit der Thrombozytenadhäsion auf Werkstoffoberflächen. Um die passivierende Wirkung des PEGs zu validieren und die Abnahme der Thrombozytenadhäsion zu erklären, wird ein zusätzlicher Versuch durchgeführt. Dabei wird die gleiche Einrichtung wie für die Thrombozytenadhäsionsprüfung verwendet, jedoch anstelle der Thrombozytensuspension eine Fibrinogenlösung in Kontakt mit den Werkstoffproben gebracht und dynamisch inkubiert. Die Quantifizierung des adsorbierten Fibrinogens erfolgt mit BCA-Test. Die detaillierten Protokolle zur Inkubation und Auswertung des Versuchs sind in Anhang B.9. dokumentiert und Abbildung 5.8 zeigt die Ergebnisse.

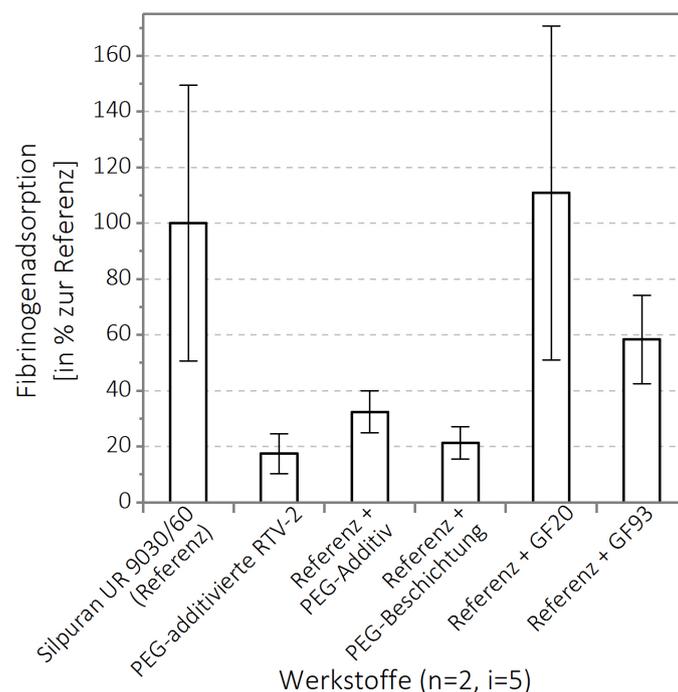


Abb. 5.8: **Fibrinogenadsorption auf modifizierten Silikon (BCA-Test).** Im Vergleich zum unmodifizierten Silikon weisen die drei PEG-basierten Modifizierungen eine deutlich geringere Fibrinogenadsorption auf ihrer Oberfläche auf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

So wie im Fall der Thrombozytenadhäsion ist auch die Fibrinogenadsorption auf den PEG-modifizierten Silikon deutlich reduziert im Vergleich zum reinen Silikon: Die Menge des adsorbierten Fibrinogens ist je nach Werkstoff zwischen 65 % und 80 % geringer. Im Fall

des PEGs scheinen also Fibrinogenadsorption und Thrombozytenadhäsion zu korrelieren. Eine mögliche Interpretation ist daher, dass das PEG das Fibrinogen tatsächlich abstößt. Als Folge davon existieren weniger Ankerpunkte auf der Oberfläche, welche die Adhäsion von Thrombozyten ermöglichen. Diese Erklärung passt auch mit den Ergebnissen der mit GF20 (Carboxylgruppen) funktionalisierten Proben zusammen, weil keine signifikante Änderung der Fibrinogenadsorption und der Thrombozytenadhäsion zu beobachten ist. Allerdings treten vermutlich auch komplexere Vorgänge auf, da diese Erklärung für die Interpretation der Ergebnisse der mit GF93 (Aminogruppen) funktionalisierten Proben nicht ausreicht: Diese weisen eine Abnahme der Fibrinogenadsorption, aber eine starke Thrombozytenadhäsion auf (siehe 5.6). Diese Beobachtung könnte sich durch unterschiedliche Adsorptionsmuster erklären lassen, wie z. B. Denaturierung oder Orientierungsänderung des Fibrinogens durch Adsorption auf die Oberfläche.

Sekundäre Hämostase

Im Gegensatz zur primären Hämostase hat die vorherige Untersuchung gezeigt, dass reines Silikon keine Aktivierung der Gerinnungskaskade auslöst (siehe Kapitel 4.3.2). Aus diesem Grund ist es notwendig zu überprüfen, ob die vorgesehenen Modifizierungen keine negativen Auswirkungen auf die sekundäre Hämostase haben. Die Untersuchungsergebnisse der

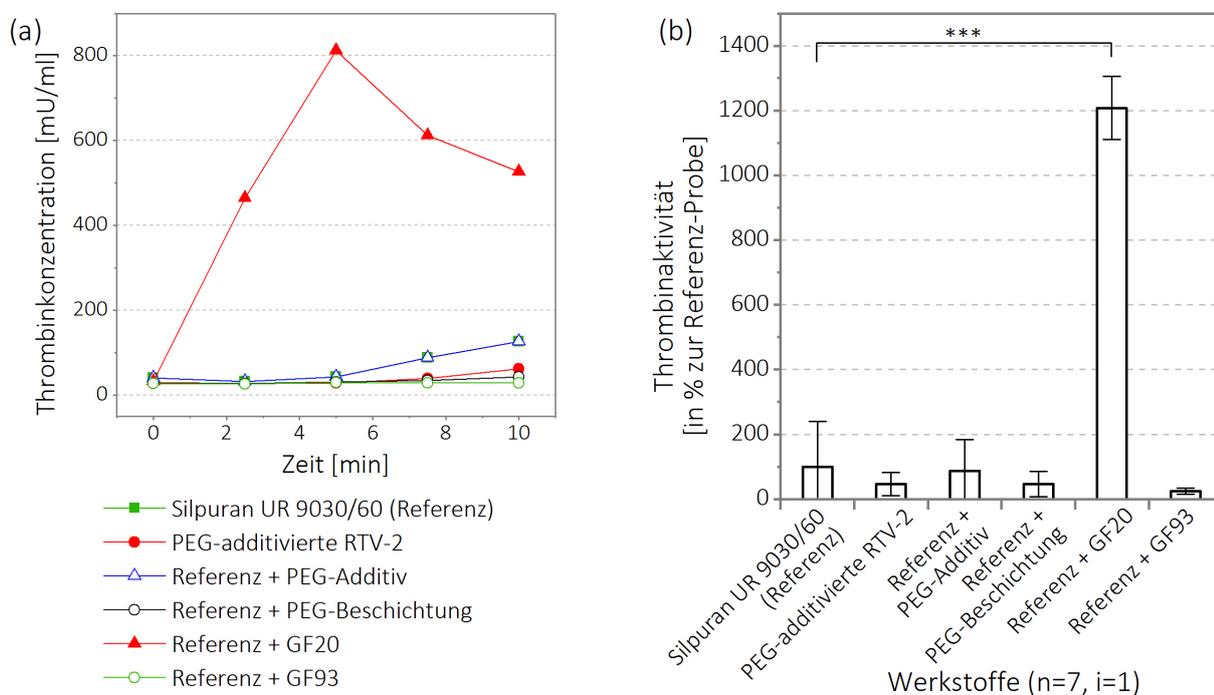


Abb. 5.9: **Thrombinbildung auf modifizierten Silikonem (TGA-Test).** (a) Thrombinbildung während eines exemplarischen Versuchs. (b) Thrombinaktivität gemittelt über 7 Wiederholungsversuche. Die GF20-funktionalisierten Proben weisen eine erhebliche Erhöhung der Thrombinbildung nach Inkubation von Plasma im Vergleich mit den anderen Werkstoffen auf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,005$ (***) ; $p \leq 0,001$ (****).

Thrombinbildung im Blutplasma nach Kontakt mit den modifizierten Proben sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Eine starke Thrombinbildung ist ausschließlich auf der Positivkontrolle (carboxylfunktionalisierte Oberfläche) zu beobachten. Dies führt zu der Schlussforderung, dass die PEG-Modifizierungen keine zusätzliche Aktivierung der Gerinnungskaskade verursachen.

Zusammenfassung

Alle PEG-basierten Modifizierungen (eine Beschichtung und zwei Additivierungen) haben die Hämokompatibilität von Silikon deutlich verbessert: Sowohl die Thrombozytenadhäsion als auch die Fibrinogenadsorption wurden reduziert, ohne die Gerinnungskaskade zu aktivieren.

5.1.4 Zytotoxizität

Die Hämokompatibilitätsprüfung reicht nicht aus, um die Biokompatibilität der Werkstoffe vollständig zu validieren. Die potenzielle Giftigkeit wird daher mit einer Zytotoxizitätsuntersuchung evaluiert. Das Vorgehen ist dabei analog zu Kapitel 4.3.3. Zwei unterschiedlich lange Extraktionszeiten werden verwendet: Eine 3-tägige Inkubation entspricht den Voraussetzungen der Norm DIN ISO 10993-5 und eine 7-tägige Inkubation stellt aufgrund der längeren

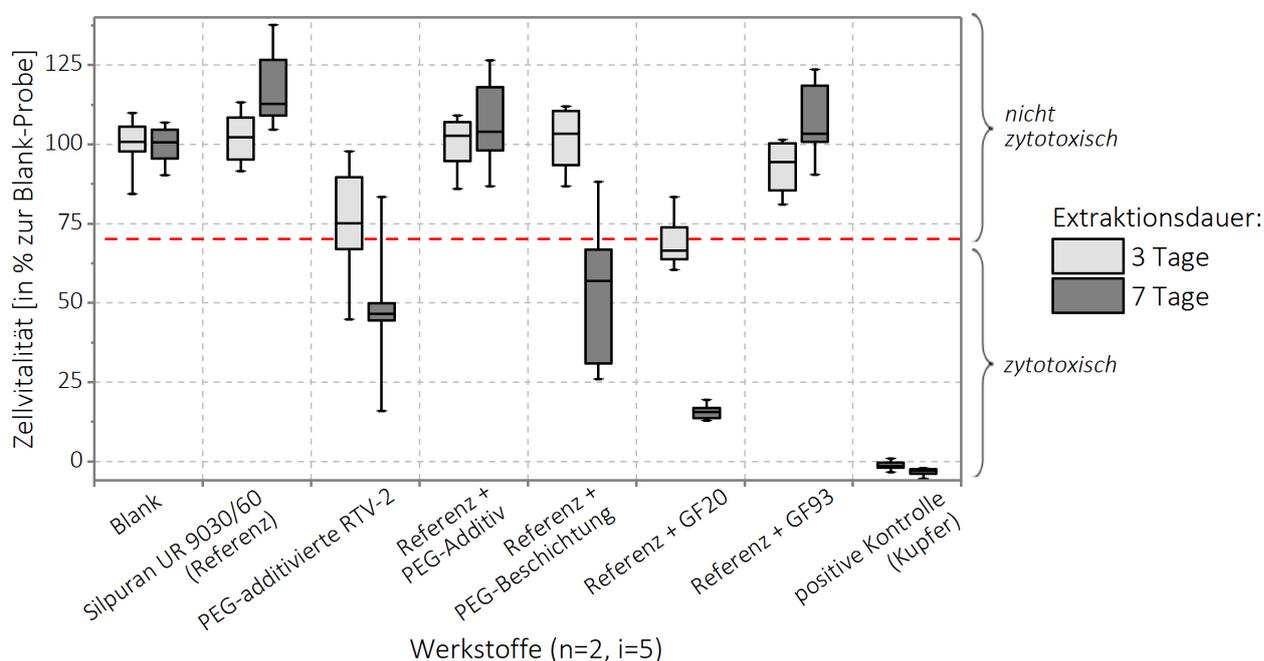


Abb. 5.10: **Zytotoxizität der modifizierten Silikone (CCK8-Test)**. Mit der Ausnahme des mit GF20 beschichteten Silikons (sehr niedrige Zellvitalität < 20 %) weisen die untersuchten Werkstoffe keine zytotoxische Wirkung nach 3-tägiger Extraktion auf. Für eine Extraktionsdauer von 7 Tagen weisen allerdings die PEG-additivierten RTV-Proben und die PEG-beschichteten Proben eine messbare Zytotoxizität. Die Referenz, die PEG-additivierte Referenz und die GF93-beschichtete Referenz sind nach 7-tägiger Extraktion nicht zytotoxisch. Für jeden Extrakt sind Median, erstes Quartil, drittes Quartil, minimaler Wert und maximaler Wert der Zellvitalität dargestellt.

Dauer eine kritischere Prüfung dar. Abbildung 5.10 zeigt, dass einige Modifizierungen tatsächlich eine leicht bis stark zytotoxische Wirkung haben. Die Zellvitalität ist für eine Extraktionsdauer von 7 Tagen niedriger als für 3 Tage (PEG-additivierte RTV-2, PEG-Beschichtung, GF20-Beschichtung). Dies bestätigt die zusätzliche Extraktion von toxischen Stoffen in einer längeren Zeitspanne. Die Werkstoffe, die trotz 7-tägiger Extraktion keine Reduktion der Zellvitalität verursachen, können mit höherer Sicherheit als nicht zytotoxisch eingestuft werden (Referenz, Referenz + PEG-Additiv, Referenz + GF93). Jedoch reicht eine Zellvitalität von 70 % der Blankprobe bei einer kurzen Extraktionsdauer, um nach Norm als nicht zytotoxisch zu gelten (alle Proben).

Diese Befunde werden außerdem durch optische Betrachtung der Zellen nach Inkubation mit den Extrakten bestätigt, da neben der Abnahme der Zellvitalität auch eine Verringerung der Zelldichte zu beobachten ist. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 5.11 zu sehen. Die Zytotoxizität der mit GF20-beschichteten Proben kann durch das Ablösen der Schicht erklärt werden: Es wurde vorher gezeigt, dass sich nach wenigen Tagen wieder eine hydrophobe Oberfläche einstellt, wodurch auch das Ablösen der Schicht erklärt werden kann. Außerdem wurde eine Verschiebung des pH-Werts des Extrakts festgestellt, was zu der Schlussfolgerung führt, dass die Säuregruppen der Schicht im Umgebungsmedium gelöst wurden und so die Zellen zerstört haben. Eine ähnliche Interpretation kann auch für die PEG-beschichteten Proben gemacht werden, da sich auch hier wieder hydrophobe Probenoberflächen gebildet haben - wenn auch in geringerem Ausmaß. In dem Fall der additivierten

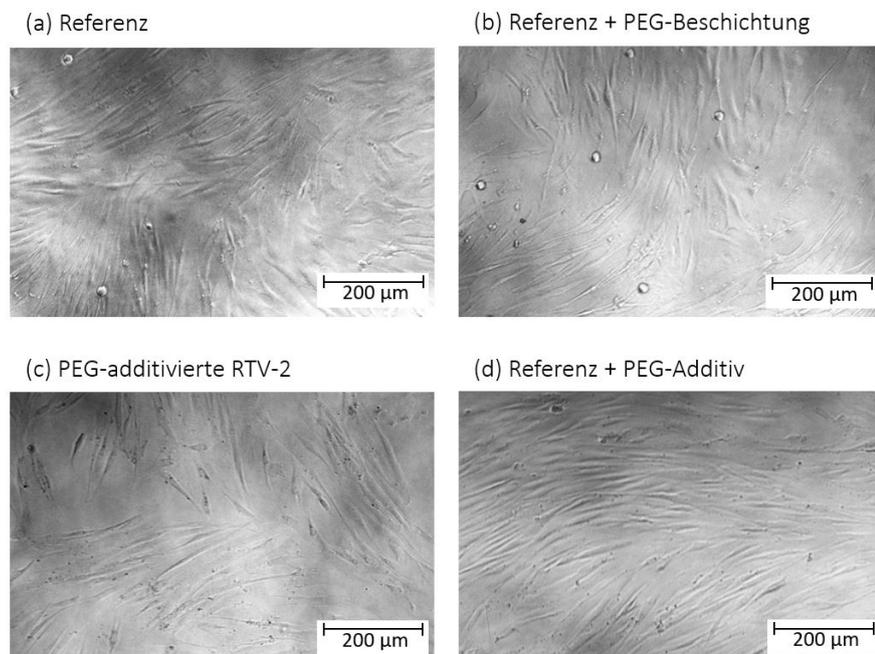


Abb. 5.11: **Mikroskopische Aufnahme der Zellen nach 3-tägiger Inkubation mit den Werkstoffextrakten.** Nach Kontakt mit Extrakten weisen die Fibroblasten eine gesunde, ausgestreckte Morphologie auf. Jedoch ist die Zelldichte für das PEG-beschichtete Silikon und das PEG-additivierte RTV-2 niedriger als für die Referenz und die PEG-additivierte Referenz.

RTV-2-Probe ist die leichte Zytotoxizität wahrscheinlich durch die Zusammensetzung des Werkstoffs verursacht, der vom Hersteller nicht als medizinisch eingestuft ist. Das PEG-Additiv selber ist jedoch nicht zytotoxisch, weil keine Abnahme der Zellvitalität für das PEG-additivierte HTV festzustellen ist.

5.1.5 Mechanische Eigenschaften

Die Auswirkungen der Modifizierungen auf die mechanischen Eigenschaften des Silikons werden in diesem Absatz analysiert. Außerdem werden die Proben nach 2-monatiger Lagerung in SBF (Simulated Body Fluid) ein zweites Mal evaluiert, um Informationen über die Alterung der Modifizierungen zu gewinnen. Das SBF wurde nach dem von Kokubo und Takadama beschriebenen Rezept hergestellt [156]. Die Lösung hat die gleiche Ionenkonzentration wie das menschliche Blut und wird benutzt, um die Implantation der Werkstoffe im Körper zu simulieren. Die Lagerungstemperatur beträgt außerdem 37 °C. Die Härte wird nach DIN ISO 7619-1 mit dem Handprüfgerät PCE-HT 200 gemessen. Die Zugfestigkeit ergibt sich aus der Zugprüfung nach DIN 53504:2009 mit der Maschine Zwick Roell Z2.5. Die Prüfgeschwindigkeit beträgt 400 mm/min und die Einspannlänge liegt bei 40 mm. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 5.12 und 5.13 gezeigt.

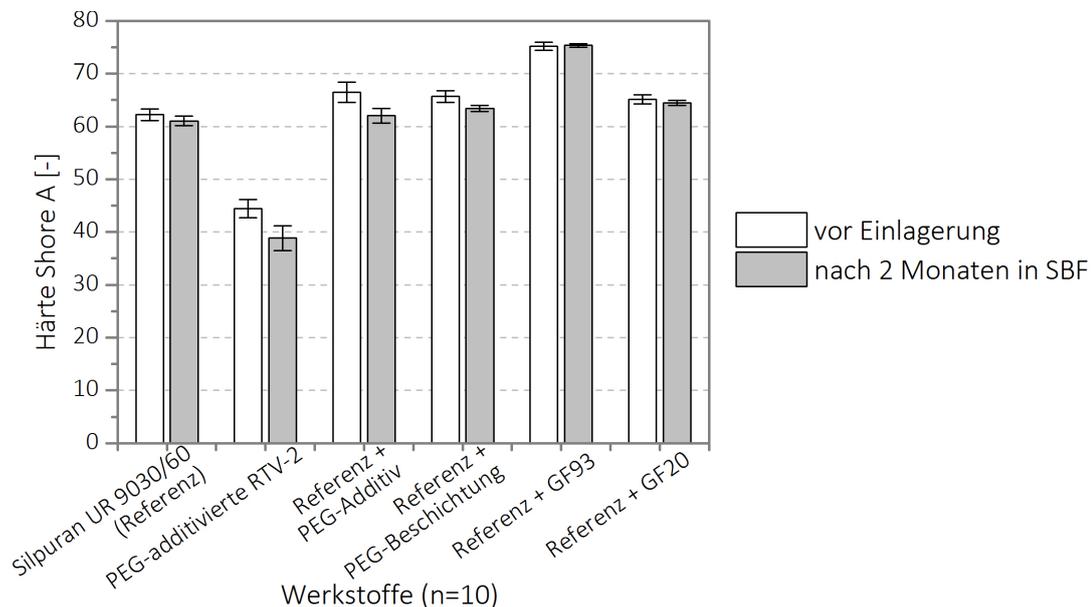


Abb. 5.12: **Härte der modifizierten Silikone vor und nach 2-monatiger Einlagerung in SBF.** Die unmodifizierte Referenz hat eine Härte von 62 Shore A. Die Modifizierungen mit organofunktionellen Silanen verursachen eine leichte (65 Shore A für GF 20 und 66 Shore A die PEG-Beschichtung) bis mäßige (75 Shore A für GF93) Zunahme der Härte des Silikons. Dieser Effekt ist nach Lagerung stabil. Die mit PEG modifizierten Proben weisen eine leichte Aufweichung nach der Lagerung auf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Als Erstes kann die Stabilität der mechanischen Eigenschaften der modifizierten Silikone nach 2-monatiger Einlagerung validiert werden (ausgenommen die GF20-Beschichtung). So-

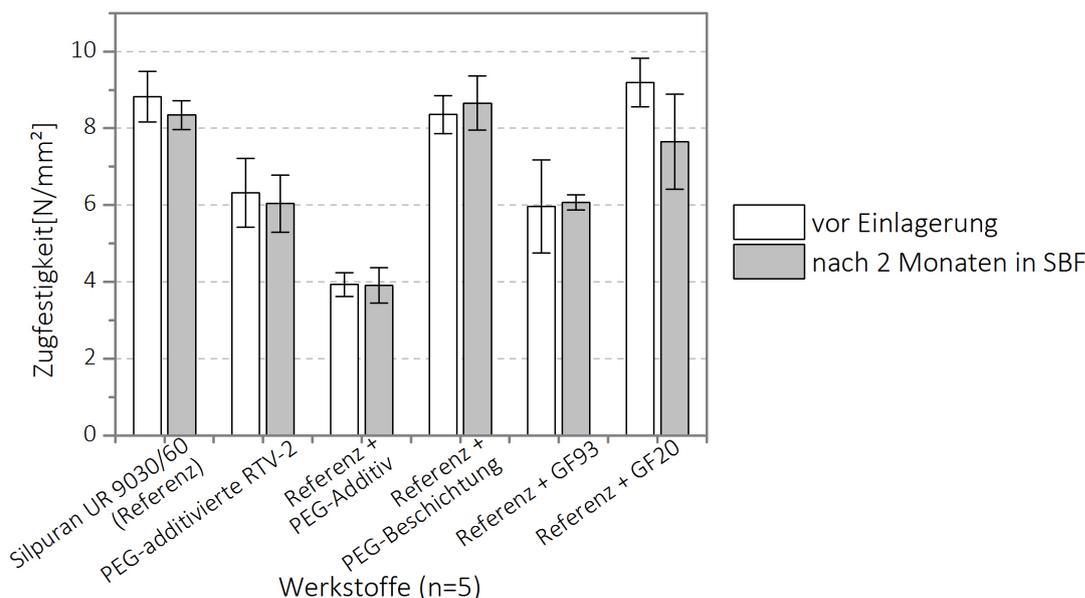


Abb. 5.13: **Zugfestigkeit der modifizierten Silikone vor und nach 2-monatiger Einlagerung in SBF.** Die Referenz weist eine Zugfestigkeit von $8,8 \text{ N/mm}^2$ auf. Zwei Modifizierungen (PEG-Beschichtung und GF20-Beschichtung) haben diese Werte nicht signifikant beeinflusst. Die Additivierung mit PEG und die Beschichtung mit GF93 hingegen verursachen starke Abnahmen der Zugfestigkeit (4 N/mm^2 für die PEG-additivierte Referenz und 6 N/mm^2 für das GF93-beschichtete Silikon). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

wohl die Härte der Proben als auch ihre Zugfestigkeit weisen keine signifikanten Änderungen auf. Tendenziell nehmen die Werte für die PEG-basierten Modifizierungen leicht ab, was vermutlich auf die Aufnahme geringerer Mengen von Wasser zurückzuführen ist. Eine Wasseraufnahme auf der Oberfläche wurde bereits durch die Kontaktwinkelmessung beobachtet (siehe Kapitel 5.1.2). Alterungseffekte gibt es ausschließlich für die mit GF20 beschichteten Proben, da die Zugfestigkeit nach der Einlagerung um 17 % niedriger geworden ist. Diese Beobachtung bestätigt die vorherigen Kontaktwinkelmessung, welche die Unbeständigkeit der Beschichtung bereits bewiesen hat.

Ein weiteres Resultat dieser Untersuchung ist, dass einige Modifizierungen starke Auswirkungen auf das mechanische Verhalten des Silikons haben. Die Zugfestigkeit der GF93-beschichteten Proben ist um 32 % geringer als die des unmodifizierten Silikons. Seine Härte ist auch verändert und höher als die der Referenz. Dies deutet auf eine Änderung des Substratwerkstoffs während des Beschichtungsprozesses hin. Für die Beschichtung wird die Probe im Kontakt mit einer Lösung gebracht, die Silan und Benzin als Lösungsmittel enthält. Möglicherweise quellen die Proben in Benzin auf, sodass Silanmoleküle in das Netzwerk eindringen, wodurch die Eigenschaften des Elastomers verändert werden.

Trotz eines geringen Anteils im Werkstoff (8 %), verursacht das PEG-Additiv die stärkste Abnahme der Zugfestigkeit von allen Modifizierungen. Dies könnte auf eine Verminderung der Vernetzungsdichte im Elastomernetzwerk zurückzuführen sein. Dies würde zudem mit

dem vorgeschlagenen Vernetzungsmechanismus des Additivs mit dem PDMS (siehe 5.3) passen: Die funktionellen Bereiche des Vernetzers würden mit den Vinylfunktionen des Additivs und nicht mit dem PDMS reagieren und somit eine geringere Anzahl an Verbindungen im Elastomernetzwerk hervorrufen. Diese Ergebnisse stimmen mit einer in der Fachliteratur publizierten Studie überein. In dieser Studie wurde Silikon durch zwei verschiedene Methoden modifiziert, um die Hydrophilie zu steigern: Oberflächensilanisierung mit Ethylenoxid und Zugabe von Ethylenoxid-funktionalisiertem Tensid im Bulk. Die Autoren haben gezeigt, dass beide Modifizierungen eine Verbesserung der Benetzbarkeit bewirken. Außerdem weisen die oberflächenfunktionalisierten Proben bessere mechanische Eigenschaften und geringere Wasseraufnahme als die bulkmodifizierten Proben auf [12].

5.1.6 Fazit: Auswahl der besten Modifizierung

Drei Modifizierungen von Silikon, die auf die Zugabe von Polyethylenglykol als Beschichtung oder Additiv basieren, wurden vorgestellt und evaluiert. Für die weitere Entwicklung eines Katheters wird ausschließlich die am besten geeignete Modifikation ausgewählt und weiter untersucht. Die Aspekte, welche bei der Auswahl des optimalen Werkstoffs eine Rolle spielen, wurden bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert und werden hier kurz wiederholt:

- Hydrophilisierung,
- Langzeitstabilität,
- Hämokompatibilität,
- Zytotoxizität,
- Mechanische Festigkeit,
- Verarbeitung. Hierbei handelt es sich um die Komplexität der Verarbeitung (kein zusätzlicher Prozessschritt) und die Möglichkeit, mit dem Werkstoff einen Katheter industriell herzustellen (vorzugsweise durch Extrusion).

Tab. 5.1: **Bewertung der Modifizierungen.** Die drei Modifizierungen werden anhand von sechs Kriterien bewertet. +++ sehr gut, ++ gut, + ausreichend, – mangelhaft.

	Referenz + PEG-Beschichtung	PEG-additivierte RTV-2	Referenz + PEG-Additiv
	<i>Silpuran® UR 9030 + PEG-Silan</i>	<i>Elastosil® RT 629</i>	<i>Silpuran® UR 9030/60 + 8 % PTS-A M1</i>
Hydrophilisierung	++	+++	+++
Langzeitstabilität	+	+++	+++
Hämokompatibilität	+++	+++	+++
Zytotoxizität	++	+	+++
Mechanische Festigkeit	+++	+	–
Verarbeitung	+	–	+++

Für eine übersichtliche Bewertung der Vor- und Nachteile der drei Modifizierungen werden sie in Tabelle 5.1 bewertet und zusammengefasst. Für jedes Kriterium erfolgt die Bewertung durch die Betrachtung der experimentellen Ergebnisse. Alle drei Modifizierungen weisen sehr gute Hämokompatibilität auf. Die PEG-Beschichtung hat keinen Einfluss auf die vorteilhaften mechanischen Eigenschaften des Silikons. Sie bringt jedoch viele Nachteile: mäßige Stabilität, leichte Zytotoxizität, komplizierte industrielle Verarbeitung (zusätzliche Prozessschritte). Das PEG-Additiv hingegen ist einfach im Silikon zu verarbeiten, weil der Werkstoff als Compound vorliegt und wie unmodifiziertes HTV verwendet wird. Das Compound mit HTV (Referenz + PEG-Additiv) wird vorgezogen, weil es sich durch klassische Extrusion verarbeiten lässt und sich am Besten für die Herstellung eines Katheters eignet. Der Werkstoff erwies sich außerdem als zeitstabil und nicht zytotoxisch. Der einzige Nachteil dieser Modifizierung ist die starke Abnahme der mechanischen Eigenschaften.

Aus diesen Gründen wird das PEG-Additiv mit Silpuran[®] UR 9030/60 (Referenz + PEG-Additiv) als bester Kompromiss für die Herstellung des Katheters ausgewählt. Weil die mechanischen Eigenschaften aufgrund des Additivs stark beeinträchtigt sind, wird im nächsten Kapitel versucht, durch Optimierung des Additivanteils und der Temperungsdauer ein besseres mechanisches Verhalten zu erzielen.

5.2 Optimierung des Werkstoffs

5.2.1 Anforderungen und Vorgehensweise

Im vorherigen Kapitel wurde ein PEG-basiertes Additiv als vielversprechender Ansatz vorgestellt, um die Benetzbarkeit und Hämokompatibilität von Silikon zu verbessern. Allerdings waren die mechanischen Eigenschaften des Werkstoffs aufgrund des Additivs stark beeinträchtigt. Die bisherigen Untersuchungen wurden mit Silikonproben durchgeführt, die einen Massenanteil von 8 % des Additivs enthielten.

In diesem Kapitel wird die Zusammensetzung des Werkstoffs angepasst, um einen Kompromiss zwischen Hämokompatibilität und Mechanik zu finden. Zu diesem Zweck wurden drei bereits vulkanisierte, additivierte Silikone (Silpuran[®] UR 9030/60) von der Firma Wacker Chemie AG zur Verfügung gestellt, die einen Additivanteil von 0 %, 4 % und 8 % besitzen. Weil PEG anfällig für oxidative und thermische Zerstörung ist, wird außerdem versucht, die Temperungsdauer zu optimieren [9]. Allerdings soll dabei die Verträglichkeit (im Sinne der Nicht-Toxizität) des Silikons nicht beeinflusst werden. Für diese Untersuchung werden die drei verschiedenen Silikone entweder 2 Stunden oder 4 Stunden bei 200 °C getempert.

Neben der Temperung ist die Sterilisation des Werkstoffs ein notwendiger Prozessschritt für die Anwendung im medizinischen Bereich. Entsprechend der Sterilisationsmethode kann

dies zur Zerstörung des Additivs oder zur Freisetzung von gesundheitsgefährdenden Stoffen führen. Eine Untersuchung unterschiedlicher Sterilisationsverfahren und deren Einfluss auf die Werkstoffeigenschaften muss daher untersucht werden. Drei Sterilisationsverfahren werden in dieser Arbeit betrachtet: Heißdampf (121 °C, 2 bar, 20 min), Gammabestrahlung 25 kGy und Ethylenoxid (45 °C, 680 mg EO/l, Belüftungszeit von 80 Stunden).

Tabelle 5.2 fasst die untersuchten Herstellungs- und Behandlungsparameter zusammen. Die in den vorherigen Untersuchungen bezeichnete „Referenz“ entspricht der Parameterkombination „0 % Additiv, 4 Stunden Temperung, Heißdampfsterilisation“.

Tab. 5.2: **Herstellung- und Behandlungsparameter der untersuchten Proben.** Der Einfluss des Additivanteils, der Temperungsdauer und der Sterilisationsverfahren auf die Werkstoffeigenschaften wird untersucht.

Additivanteil	Temperungsdauer	Sterilisationsverfahren
0 %	2 Stunden	Heißdampf
4 %	4 Stunden	Gammabestrahlung
8 %		Ethylenoxid

5.2.2 Hydrophilisierung

Zuerst wird die Hydrophilisierung der additivierten Silikone mit Kontaktwinkelmessung evaluiert. Der Nachweis zur Langzeitstabilität wurde hierbei bereits in Kapitel 5.1.2 erbracht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

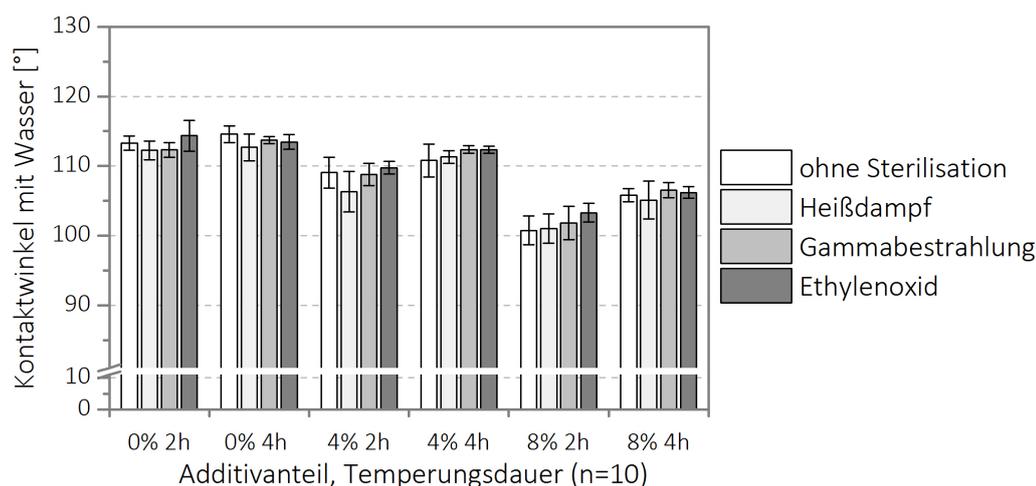


Abb. 5.14: **Kontaktwinkel mit Wasser der mit PEG additivierten Silikone.** Die Kontaktwinkelmessung erfolgt unmittelbar nach Stabilisierung der 2 µl Tropfen auf der Oberfläche (Dispensergeschwindigkeit von 0,5 µl/s). Nicht modifiziertes Silikon weist einen Kontaktwinkel von 114° auf. Die Zugabe des Additivs bewirkt eine Reduktion des Kontaktwinkels bis zu 101° (für einen Additivanteil von 8 % und eine Temperungsdauer von 2 Stunden). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

Eine Verbesserung der Benetzbarkeit wird mit zunehmendem Additivanteil beobachtet. Außerdem hat die Temperungsdauer einen Einfluss auf den Kontaktwinkel der additivierten Silikone, weil die kurz getemperten Proben (2 Stunden Temperung) eine bessere Benetzbarkeit als die lang getemperten Proben (4 Stunden Temperung) aufweisen. Dieser Effekt lässt sich durch die thermische Zerstörung des PEGs während der Temperung bei hoher Temperatur (200 °C) erklären. Im Gegensatz dazu hat die Sterilisation keinen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung des Kontaktwinkels. Eine Zerstörung des Werkstoffs ist bei den drei betrachteten Sterilisationsverfahren nicht zu beobachten.

5.2.3 Hämokompatibilität

Die Hämokompatibilität von Silikon wurde im Kapitel 4 detailliert untersucht, wobei gezeigt wurde, dass Silikon eine ausgeprägte Thrombozytenadhäsion, aber keine Aktivierung der Gerinnungskaskade verursacht. Im Kapitel 5.1.3 wurde nachgewiesen, dass das PEG-Additiv die Thrombozytenadhäsion reduziert, ohne dabei die Gerinnungskaskade zu aktivieren. Aus diesem Grund ist es nun notwendig zu überprüfen, inwiefern eine Verminderung des Additivanteils die Thrombozytenadhäsion beeinflusst. Thrombozytenadhäsionsversuche werden unter dynamischen Flussbedingungen mit dem neuen Inkubationssystem durchgeführt (siehe experimentelle Protokolle im Anhang B.1.). Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Abbildung 5.15 dargestellt.

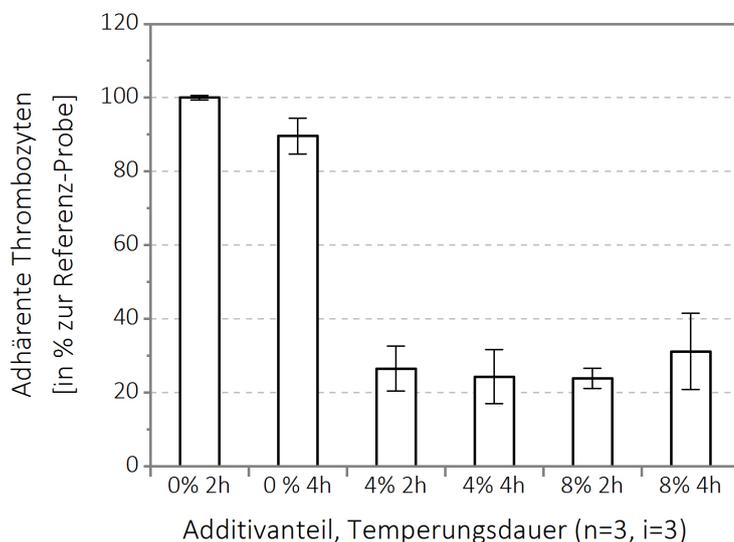


Abb. 5.15: **Thrombozytenadhäsion auf der Oberfläche der mit PEG additivierten Silikone (ACP-Test).** Die einstündige Inkubation von TK mit den Proben erfolgt unter dynamischen Flussbedingungen (15 U/min). Alle additivierten Silikone weisen eine ähnliche Reduktion der Thrombozytenadhäsion auf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Die Zugabe des Additivs verursacht eine 75-prozentige Reduktion der adhärenen Thrombozyten auf der Oberfläche. Allerdings weisen die Proben mit 4 % und 8 % des Additivs keinen Unterschied in diesen Versuchen auf. Dieses deutet daraufhin, dass die Zugabe von 4 % des

PEG-Additivs ausreichend ist, um dem Silikon eine hämokompatible Wirkung zu verleihen.

Jedoch zeigte die vorherige Kontaktwinkelmessung, dass eine Zugabe von 8 % des Additivs zu einer ausgeprägten Abnahme des Kontaktwinkels führt. Dies könnte auf eine stärkere Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit des Silikons hindeuten. Die Thrombozytenadhäsion bleibt aber in diesem Fall unverändert, was auf ein Erreichen eines Schwellwertes schließen lässt. Dieser Schwellwert könnte das Produkt aus physiologischen oder experimentellen Faktoren sein, welche sich zum Beispiel an der „Hintergrundaktivierung“ des Bluts widerspiegeln können. Als mögliche Ursache für diese „Hintergrundaktivierung“ kann der unvermeidbare Kontakt mit der Fremdoberfläche (Pipetten, Blutröhrchen, Prüfsystem) während der Blutabnahme, Fraktionierung und Inkubation angenommen werden.

5.2.4 Zytotoxizität

Für den Einsatz als Implantat sollten die Modifizierungen und die darauffolgende Sterilisation des Werkstoffs keine toxischen Substanzen bilden oder einbringen. Aus diesem Grund wird eine ausführliche Untersuchung der *in vitro* Zytotoxizität durchgeführt (siehe experimentelle Protokolle im Anhang B.4.). Die vorherigen Untersuchungen mit verschiedenen Extraktionszeiten (siehe 5.1.4) haben gezeigt, dass eine 7-tägige Extraktion eine kritische Prüfung der Werkstoffe darstellt. Diese Extraktionszeit wird für diese Versuche übernommen, um zuverlässige Aussagen zur Verträglichkeit der Werkstoffe treffen zu können. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 5.16 zusammengefasst.

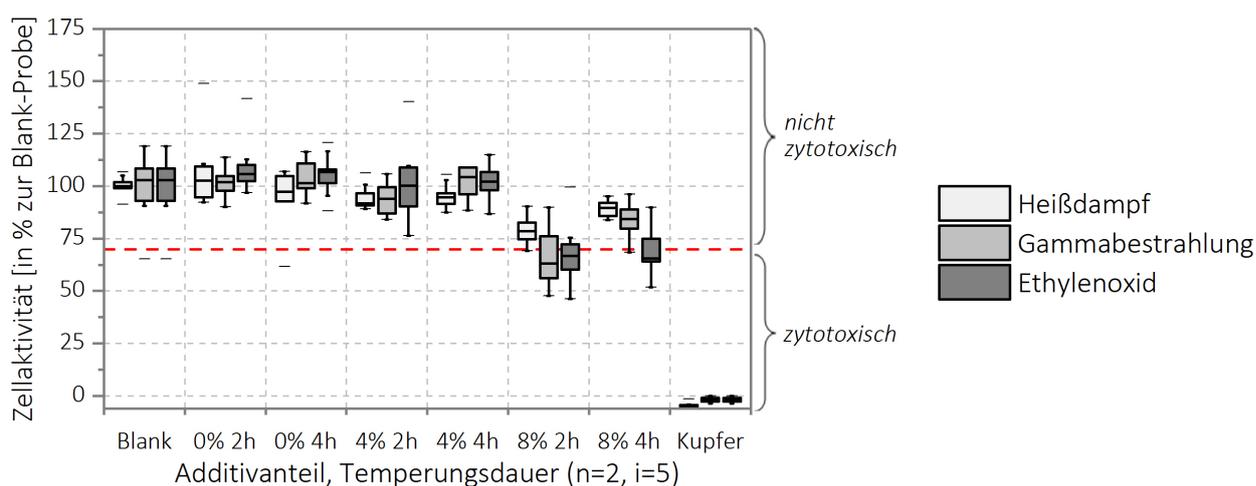


Abb. 5.16: **Zytotoxizität der mit PEG additvierten Silikone (CCK8-Test)**. Die Extraktionsdauer beträgt 7 Tage. Die Zugabe von 8 % des PEG-Additivs in dem Werkstoff verursacht eine leichte Zytotoxizität (Zellvitalität kleiner als 70 % des Wertes der Blankprobe). Dieser Effekt ist insbesondere nach Sterilisation mit Ethylenoxid auffallend. Für 0 % und 4 % des PEG-Additivs ist keine zytotoxische Wirkung nachweisbar. Für jeden Extrakt sind Median, erstes Quartil, drittes Quartil, minimaler Wert und maximaler Wert der Zellvitalität dargestellt.

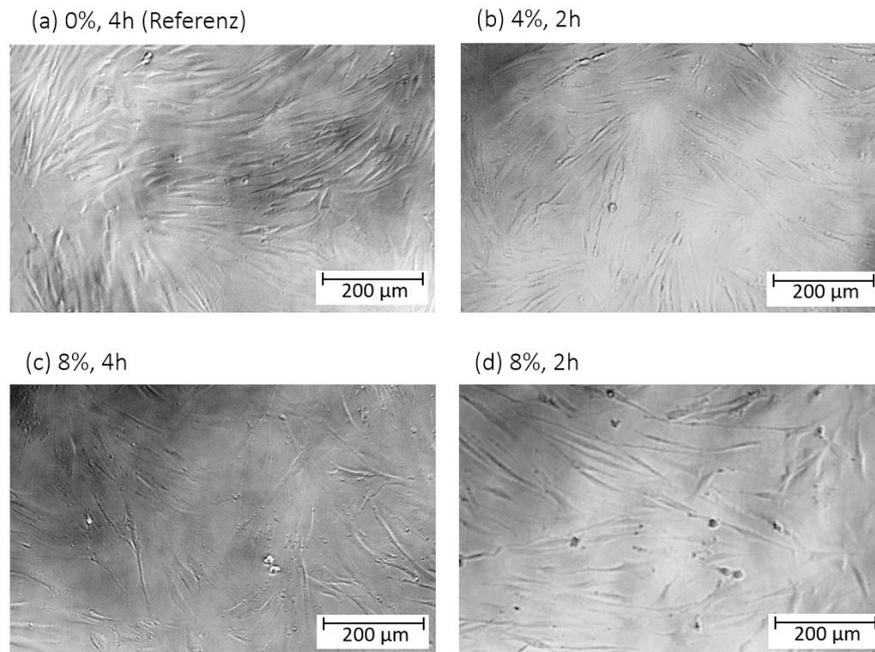


Abb. 5.17: **Mikroskopische Aufnahme der Zellen nach 7-tägiger Inkubation mit den Werkstoffextrakten.** Die Proben werden mit Heißdampf sterilisiert. Nach Kontakt mit Extrakten aus Silikon mit 0 % und 4 % des Additivs weisen die Fibroblasten eine gesunde, ausgestreckte Morphologie auf. Die Zellen, die mit dem Extrakt aus Silikon mit 8 % des Additivs und 2-stündige Temperung inkubiert wurden, weisen allerdings eine geringere Zelldichte auf. Einige Fibroblasten sind außerdem abgerundet, was auf eine toxische Wirkung zurückzuführen ist.

Sowohl unmodifiziertes Silikon als auch Silikon, das 4 % des PEG-Additivs enthält, weisen keinerlei zytotoxische Auswirkung auf. Das gilt auch für alle drei Sterilisationsverfahren. Allerdings sind die mit 8 % PEG additvierten Proben leicht zytotoxisch, falls sie mit Ethylenoxid (EO) sterilisiert werden. Das lässt sich möglicherweise durch die Anwesenheit von toxischen EO-Rückständen im Werkstoff erklären. Der positive Effekt der Temperung ist besonders auffallend für die Proben, die mit Heißdampf und Gammabestrahlung sterilisiert worden sind. Die Zellvitalität ist bei einer 4-stündigen Temperung höher als bei einer 2-stündigen Temperung. Eine mögliche Interpretation ist, dass ein Teil des Additivs nicht mit dem Silikon vernetzt wird, falls große Mengen ($\geq 8\%$) eingemischt werden. Diese möglicherweise toxischen und unvernetzten Additivbestandteile werden dann während der Temperung aus dem Werkstoff austreten. Eine mikroskopische Untersuchung der Morphologie der Zellen nach Kontakt mit den Werkstoffextrakten belegt diese Beobachtungen. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

5.2.5 Mechanische Eigenschaften

Die gleichen Werkstoffe werden in einer standardisierten Zugprüfung untersucht (Testparameter wie beschrieben im Kapitel 5.1.5). Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Abbildung 5.18 dargestellt.

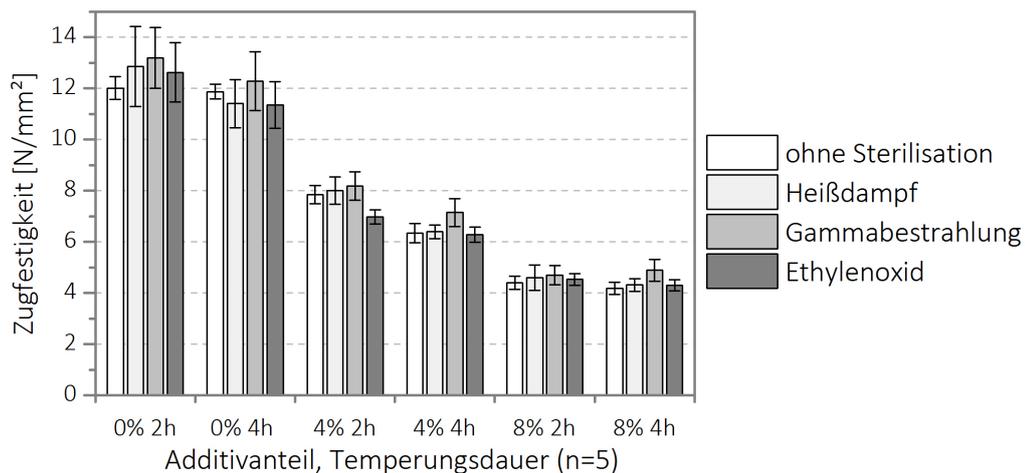


Abb. 5.18: **Zugfestigkeit der mit PEG additivierten Silikone.** Unmodifiziertes Silikon weist eine Zugfestigkeit von 12 N/mm^2 auf. Die Zugabe des Additivs verursacht die Reduktion der Zugfestigkeit des Silikons auf einen Wert von $4,5 \text{ N/mm}^2$ (8 % Additiv und 4 Stunden Temperung). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Wie bereits im Kapitel 5.1.5 beobachtet, hat die Zugabe des PEG-Additivs einen erheblichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Silikons. Die gemessenen Werte stimmen mit der vorherigen Untersuchung überein, wobei Proben mit 8 % des PEG-Additivs eine Zugfestigkeit von ca. 4 N/mm^2 aufwiesen. Ein Additivanteil von 4 % zeigt hingegen eine geringere Verschlechterung der Zugfestigkeit, wie in Abbildung 5.18 zu sehen. Dieser Effekt ist konsistent mit der vorher erwähnten Hypothese, dass das Additiv eine Verminderung der Vernetzungsdichte im Silikonnetzwerk verursacht.

Temperaturdauer und Sterilisation haben einen geringeren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften als die Zugabe des Additivs. Eine längere Temperung (4 Stunden) verursacht eine stärkere Abnahme der Zugfestigkeit als eine kurze Temperung (2 Stunden). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Kontaktwinkelmessung überein und verstärkt die Interpretation, dass ein Teils des PEG durch die Temperung bei $200 \text{ }^\circ\text{C}$ thermisch zerstört wird (siehe Kapitel 5.2.2). Das Sterilisationsverfahren scheint die Zugfestigkeit nicht signifikant zu beeinflussen. Nur bei der Gammabestrahlung ist ein geringer Anstieg der Zugfestigkeit zu beobachten. Dieser Effekt ist allgemein bekannt und ist auf eine zusätzliche Nachvernetzung des Silikonnetzwerkes zurückzuführen [212, 35].

5.2.6 Mechanische Prüfung von Silikonschläuchen

Basierend auf den vorherigen Ergebnissen wird die Variante mit der Zugabe von 4 % des PEG-Additivs und einer Temperaturdauer von 2 Stunden als bester Kompromiss zwischen mechanischen und biologischen/medizinischen Eigenschaften gewählt: Neben der deutlichen Verbesserung der Hämokompatibilität und dem vergleichsweise geringeren Verlust der mechanischen Eigenschaften wurde geprüft, dass dieser Werkstoff nicht zytotoxisch ist. Die Ver-

schlechterung der Zugfestigkeit spricht allerdings nicht für ein Ausschlusskriterium, weil die mechanischen Eigenschaften des Werkstoffs möglicherweise ausreichen, damit das Produkt (Katheter) die notwendigen Anforderungen erfüllt. Aus diesem Grund wird mit diesem Werkstoff ein Schlauch hergestellt und auf produktbezogene Anforderungen hin überprüft.

Für diese Untersuchung werden drei verschiedene Silikone im Betracht gezogen. Das PEG-additivierte Silikon (Silpuran[®] UR 9030/60 mit einem Additivanteil von 4 %) wird als Schlauch extrudiert und anschließend zwei Stunden getempert. Als Referenz wird ein Schlauch ohne Additiv (Silpuran[®] UR 9030/60, 4 Stunden getempert) hergestellt. Hierbei ist eine Einarbeitung von Kontrastmittel unablässig, um eine notwendige Röntgenopazität zu gewährleisten. Während der Implantation des Katheters kann somit die Lage im Blutgefäß überprüft werden. Um die praktische Anwendung zu reflektieren, wird ein Schlauch mit 4 % des PEG-Additives und zusätzlichen 15 % des Kontrastmittels Bariumsulfat (Silpuran[®] AUX 8250 RO, Wacker Chemie AG, Burghausen) hergestellt. Dieser Schlauch wird 2 Stunden getempert. Die Schläuche werden von der Firma Wacker Chemie AG in Burghausen zur Verfügung gestellt. Um die Dimensionen kleinlumiger Katheter zu entsprechen, werden die Schläuche mit einem Innendurchmesser D_i von 1 mm und einem Außendurchmesser D_a von 2 mm extrudiert. Die extrudierten Schläuche sind in Abbildung 5.19 zu sehen. Die Verarbeitungsfähigkeit – ohne zusätzlichen Prozessschritt – der additivierten Silikone ist außerdem damit bewiesen.

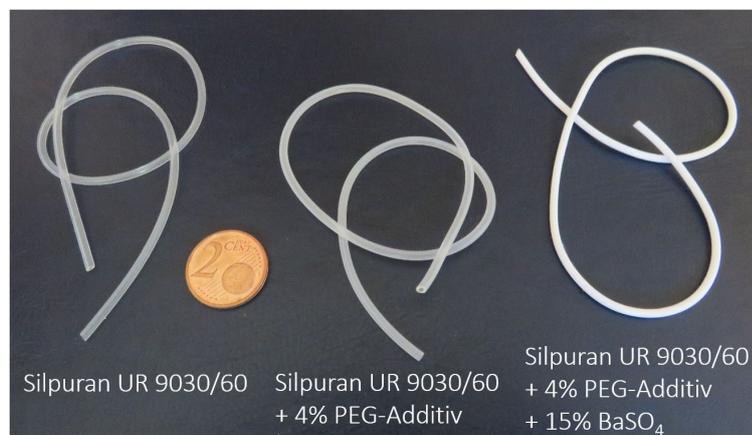


Abb. 5.19: **Extrudierte Silikonschläuche.** Die drei Schläuche besitzen gleiche geometrische Abmessungen und unterscheiden sich nur durch die verwendeten Additive.

Um die mechanischen Eigenschaften der Schläuche zu bewerten, werden die Zugfestigkeit und der Berstdruck der Schläuche ermittelt. Die Zugprüfung wird mit der gleichen Vorrichtung, wie im Kapitel 5.1.5 beschrieben, durchgeführt. Die Einspannlänge für die Zugprüfung beträgt 20 mm. Die Berstdruckmessung von Schlauchabschnitten von 200 mm Länge wird mit einem hydraulischen Drucktester der Firma BW-TECH mit destilliertem Wasser als Prüfmedium durchgeführt. Die Ergebnisse dieser zwei Prüfungen sind in Abbildung 5.20 dargestellt. Laut Norm ISO 1055-1 soll die Bruchkraft von Kathetern mit einem Außendurchmesser von 2

mm einen Wert von 15 N erreichen [69]. Dieser Wert wird für die Validierung der Schläuche übernommen. Weil ein Portkathetersystem als finale Anwendung angestrebt ist, wird die Mindestanforderung für den Berstdruck im Fall von Portkathetersystemen übernommen. Der minimale Wert der Berstdruck wird für diese Untersuchung als 5 bar festgestellt (siehe [108]). Die erforderlichen Werte der Bruchkraft und des Berstdrucks werden in Abbildung 5.20 durch die rote Linie abgebildet.

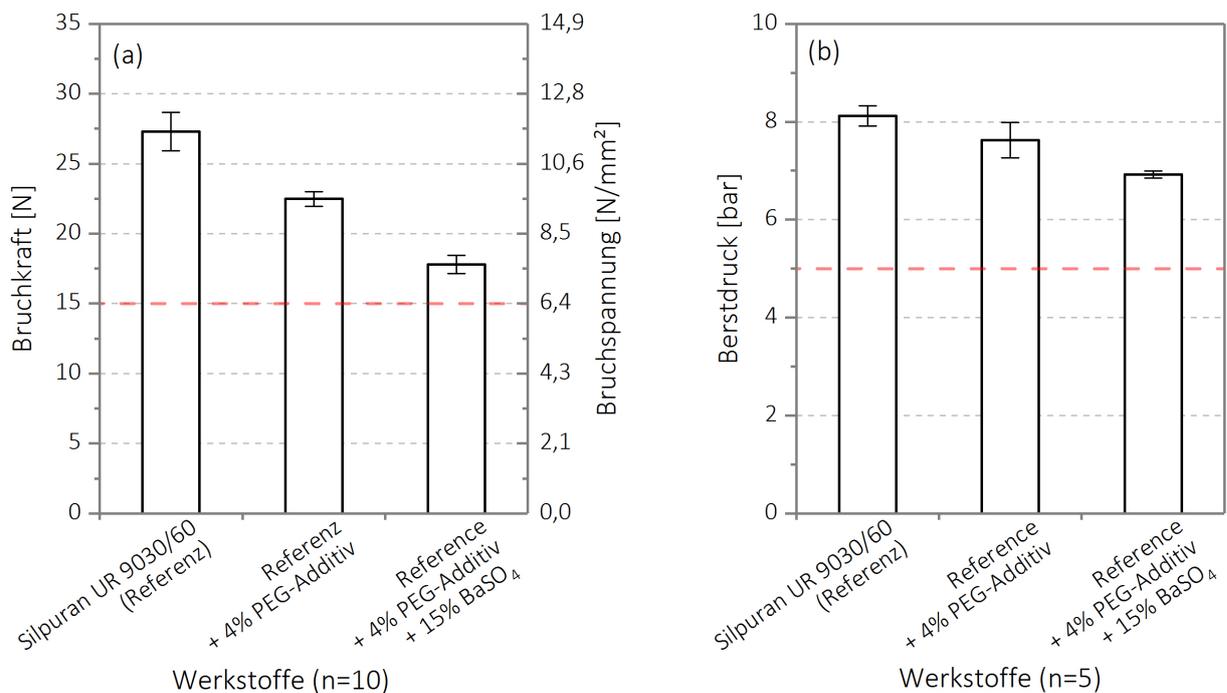


Abb. 5.20: **Bruchkraft (a) und Berstdruck (b) der extrudierten Schläuche.** Die roten Linien stellen die erforderlichen Mindestwerte der Bruchkraft (15 N) und des Berstdrucks (5 bar) dar. Das unmodifizierte Silikon bietet hierbei eine Zugfestigkeit von 27 N und einen Berstdruck von 8,1 bar und erreicht somit die besten mechanischen Kennwerte. Die Zugabe des PEG-Additivs reduziert die Werte auf 22 N bzw. 7,6 bar. Eine Zugabe von 15 % Bariumsulfat reduziert die mechanischen Kennwerte auf ein Minimum in dieser Testreihe (18 N bzw. 6,9 bar), jedoch werden die definierten Mindestwerte der Zugfestigkeit und des Berstdrucks eingehalten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Wie schon bei der vorherigen Untersuchung hat die Zugabe des PEG-Additivs die Zugfestigkeit des Werkstoffs vermindert. Eine zusätzliche Zugabe von Bariumsulfat hat eine weitere Abnahme der mechanischen Eigenschaften zur Folge. Die gemessenen Werte der Bruchkraft und des Berstdrucks bleiben dennoch über den definierten Mindestwerten. Eine Zugabe des Additivs und des Kontrastmittels kann somit als eine akzeptable Lösung für die Anwendung als Portkathetersystem angesehen werden.

5.3 Diskussion: Oberflächenchemie und Thrombogenität von Werkstoffen

Neben der Untersuchung eines neuen hämokompatiblen Silikons ermöglicht die ausführliche Hämokompatibilitätsprüfung eine Bewertung der Thrombogenität der chemischen Gruppen, die durch die verschiedenen Beschichtungen auf der Oberfläche aufgebracht worden sind. Differenzierte Oberflächeneigenschaften, die die verschiedenen Gerinnungsprozesse auslösen, können so identifiziert werden. Zusätzlich werden in diesem Kapitel mögliche Mechanismen der Thrombusbildung vorgeschlagen und diskutiert.

5.3.1 Primäre Hämostase

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten eine starke Thrombozytenadhäsion (primäre Hämostase) des unmodifizierten Silikons im Vergleich zu anderen Werkstoffen. Die Oberfläche von Silikon weist hauptsächlich Methylgruppen auf, die dem Werkstoff seine starke Hydrophobie verleihen (siehe Kapitel 2.3.1). Wie im Kapitel 2.1 erläutert, spielt die Benetzbarkeit von Oberflächen eine wesentliche Rolle im Prozess der Proteinadsorption. Sehr wahrscheinlich ist im Fall von Silikon die starke Hydrophobie eine der Ursachen seiner Thrombogenität.

Diese Vermutung wird durch eine Studie von J.H. Lee und H.B. Lee belegt [165]. Ein Benetzbarkeitsgradient wurde auf einer Polyethylenoberfläche erzeugt und die Thrombozytenadhäsion wurde anhand dieses Gradienten quantifiziert. Die Autoren zeigten, dass die Thrombozytenadhäsion und die Thrombozytenaktivierung in Anwesenheit von Plasmaproteinen am stärksten auf hydrophoben Oberflächen sind. Eine ähnliche Untersuchung der Thrombozytenadhäsion auf einem Benetzbarkeitsgradienten wurde von Spijker *et al.* unter dynamischen Flussbedingungen durchgeführt [266]. Sie haben ähnliche Beobachtungen gemacht und erklären, dass unter dynamischen Flussbedingungen möglicherweise Thrombozyten von hydrophilen Oberflächen abgelöst werden. Diese Interpretation stimmt mit einigen Ergebnissen dieser Arbeit überein: Die Hämokompatibilitätsprüfungen von Kunststoffen (siehe 3.3.4 und 4.3.2) wurden auch unter dynamischen Flussbedingungen durchgeführt und haben eine Korrelation zwischen der Hydrophobie der Oberfläche und dem Ausmaß der Thrombozytenadhäsion gezeigt. Im Fall der Untersuchung der modifizierten Silikone wiederholte sich allerdings diese Korrelation nicht (siehe 5.1.3). Eine Benetzbarkeit ist somit nicht der einzige Einflussfaktor für die Thrombozytenadhäsion.

Die Untersuchung von selbstorganisierenden Monoschichten (SAMs) stellt eine gute Möglichkeit dar, die Hämokompatibilität verschiedener Oberflächenfunktionen zu analysieren. Rodrigues *et al.* haben z. B. SAMs mit verschiedenen Anteilen von OH-Gruppen auf Gold untersucht und gezeigt, dass die zunehmende Konzentration in OH-Gruppen – und somit zunehmende Hydrophilie – eine stärkere Proteinadsorption, Thrombozytenadhäsion und Thrombo-

zytenaktivierung verursacht [234]. Mithilfe von CH₃- und COOH-SAMs bestätigen Sperling *et al.* den negativen Einfluss von Methylgruppen auf die Thrombozytenadhäsion [263, 265]. Weil Silikonoberflächen hauptsächlich aus Methylgruppen bestehen, stimmt diese Beobachtung mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Die Fachliteratur geht ebenfalls davon aus, dass die Thrombozytenadhäsion auf die Adsorption von Plasmaproteinen zurückzuführen ist [279]. Die Rolle von Fibrinogen wurde in diesem Rahmen besonders intensiv behandelt. Mithilfe von SAMs auf Gold zeigten Tegoulia *et al.*, dass Fibrinogen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen besonders gut auf CH₃-funktionalisierten Oberflächen adsorbiert wird. Als Folge weisen diese Oberflächen ausgeprägte Thrombozytenadhäsion und schlechte Blutverträglichkeit auf [276]. Außerdem wird auf Silikon eine starke Proteinadsorption – vor allem von Fibrinogen, ImmunoglobulinG und Albumin – beobachtet [330]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Fibrinogenadsorption auf modifizierten Silikon zeigte hiermit übereinstimmende Ergebnisse (siehe 5.1.3) und bestätigt diese Interpretation.

Eine weitere interessante Beobachtung während dieser Arbeit ist die starke Thrombozytenadhäsion auf aminofunktionalisiertem Silikon. Aminogruppen – und insbesondere APTES – werden in der Forschung für ihre zelladhäsiven Eigenschaften sehr verbreitet eingesetzt [141, 79, 273]. Das liegt an der positiven Ladung der NH₂-Gruppen, die eine günstige Proteinadsorption auf der Oberfläche verursacht [279]. Arima und Iwata haben in einer Studie mit SAMs gezeigt, dass die zelladhäsiven Proteine Fibronectin und Vitronectin eine hohe Affinität zu NH₂-funktionalisierten Oberflächen aufweisen und mit der Zeit andere adsorbierte Proteine ersetzen (siehe Vroman-Effekt im Kapitel 2.1.1) [8]. Diese zwei Proteine sind auch für die Adhäsion von Thrombozyten auf Fremdoberflächen verantwortlich, wie erklärt im Kapitel 2.1.2. Dass in dieser Arbeit starke Thrombozytenadhäsion auf APTES-funktionalisierten Oberflächen beobachtet wurde, stimmt mit der Interpretation von Arima und Iwata überein.

5.3.2 Sekundäre Hämostase

In dieser Arbeit haben die meisten Kunststoffe keine starke Aktivierung der Gerinnungskaskade verursacht. Ausschließlich Polyamid 6 (siehe 3.3.4), TPE-S (siehe 4.3.2) und säurefunktionalisiertes Silikon (siehe 5.1.3) haben eine verstärkte Thrombinbildung ausgelöst. Um das Ausmaß der Reaktion evaluieren zu können, wird eine zusätzliche vergleichende Untersuchung dieser drei Werkstoffe durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.21 dargestellt. Wie in den vorherigen Versuchen lösen die drei Werkstoffe die Gerinnung aus, wobei die mit GF20 funktionalisierten Proben eine vergleichsweise deutlich stärkere Thrombinbildung als Polyamid (PA) und TPE-S verursachten. Da PA und TPE-S kommerziell erhältliche Produkte sind, werden ihre genauen Zusammensetzungen von den Herstellern nicht bekannt gegeben. Eine Diskussion über die Thrombogenität ihrer chemischen Bestandteile wäre so nicht aussagekräftig. Aus diesen zwei Gründen wird in diesem Kapitel die Diskussion auf die Aktivierung der sekundären Hämostase im Fall von säurefunktionalisierten Oberflächen fokussiert.

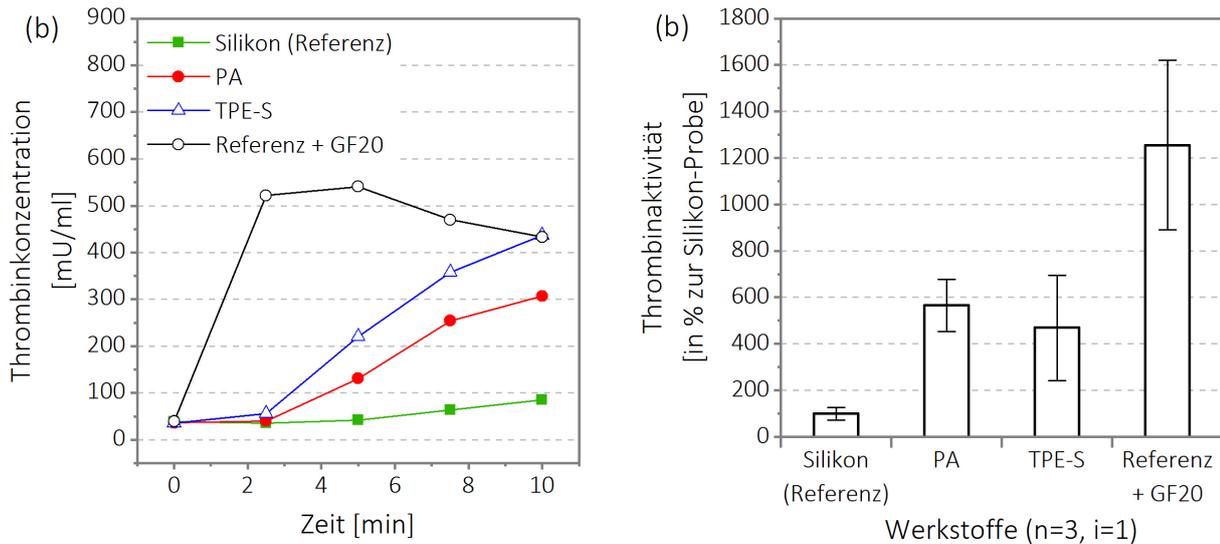


Abb. 5.21: **Thrombinbildung auf Silikon, PA, TPE-S und GF20-funktionalisiertem Silikon (TGA-Test).** (a) Thrombinbildung während eines exemplarischen Versuchs. (b) Thrombinaktivität gemittelt über 3 Wiederholungsversuche. Die GF20-funktionalisierten Proben weisen eine erhebliche Erhöhung der Thrombinbildung nach Inkubation von Plasma im Vergleich mit den anderen Werkstoffen auf. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Dieses Ergebnis stimmt mit mehreren Beiträgen aus der Fachliteratur überein, die von thrombogenen COOH-funktionalisierten Oberflächen berichten. In einer anderen Studie von Sperling *et al.* werden SAMs mit verschiedenen Anteilen von CH₃- und COOH-Gruppen untersucht. Die stärkste Aktivierung der Gerinnung lässt sich in diesem Fall auf der 100 %-COOH Oberfläche beobachten [263]. Außerdem hat eine Studie mit plasmabehandelten Silikonoberflächen konkordante Ergebnisse geliefert: Nach der Behandlung mit Sauerstoffplasma nimmt der Anteil von C-O-Bindungen auf der Oberfläche zu und zur gleichen Zeit verkürzt sich die Gerinnungszeit (PTT) [307].

COOH-funktionalisierte Oberflächen besitzen eine negative Ladung und somit eine hohe Oberflächenenergie [279, 265]. Mehrere Autoren haben vorgeschlagen, dass die Hydrophilie bzw. die Oberflächenenergie eine wesentliche Rolle für die Aktivierung der Gerinnung spielen könnten [91, 80]. Vogler *et al.* bestätigen in einer Untersuchung mit SAMs, dass neben der Hydrophilie auch die chemische Spezifität der Oberfläche einen wichtigen Aspekt darstellt: COOH-Beschichtungen weisen eine 10- bis 100-fach höhere Aktivierung der Gerinnung auf als die anderen 11 untersuchten Oberflächen – inkl. CH₃-funktionalisierte Oberfläche – [292]. Die Interpretation der Autoren ist, dass eine sehr stabile Wasserschicht auf der hydrophilen Oberfläche gebildet wird. Prokoagulatorische Proteine sind zusätzlich an diese Wasserschicht stark gebunden¹ und können somit die Gerinnung auslösen [293]. Diese Interpretation würde außerdem erklären, warum in dieser Arbeit eine vergleichsweise starke Fibrinogenadsorption auf COOH-funktionalisierten Silikonproben vorhanden ist (siehe 5.1.3). Die Aussage, dass die

¹Die Autoren sprechen von „assozierten Proteinen“.

Hydrophilie der Oberfläche nicht die einzige Voraussetzung für die Aktivierung der Gerinnung darstellt, wurde außerdem von der Arbeitsgruppe von Sperling *et al.* gezeigt. Sie haben die Aktivierung der Kontaktphase durch Messung des Bradykinins nach Inkubation von verschiedenen SAMs mit Vollblut evaluiert. Als Ergebnis weisen OH- und COOH-Oberflächen vergleichbare Benetzbarkeit auf aber die Gerinnungsaktivierung ist deutlich ausgeprägter auf COOH-Gruppen als auf OH-Gruppen [265].

Die Gerinnungskaskade wird durch die Aktivierung des Gerinnungsfaktors FXII¹ ausgelöst (siehe Abbildung 2.7 im Kapitel 2.1.2). Jedoch sind die zu Grunde liegenden Mechanismen zur Aktivierung der Kontaktphase in der Fachliteratur umstritten. Eine etablierte Hypothese ist, dass FXII auf negativgeladenen Oberflächen adsorbiert wird. Durch Adsorption tritt eine Konformationsänderung auf, die die Autoaktivierung des FXII verursacht [263]. Allerdings widersprechen andere Studien diese Hypothese: Zum Beispiel haben Zhuo *et al.* FXII im Kontakt mit hydrophilen und hydrophoben Oberflächen gebracht und gezeigt, dass FXII gleiche Aktivierungszustände aufweist, wenn es in einer Pufferlösung gelöst ist, aber unterschiedlich reagiert in Anwesenheit von Plasmaproteinen [329]. Dieses Experiment beweist, dass eine kompetitive Proteinadsorption wahrscheinlich für die Aktivierung des FXII auf hydrophilen Oberflächen verantwortlich ist [294]. Diese verschiedenen Interpretationen können beide erklären, warum in dieser Arbeit keine Aktivierung des hydrophoben Silikons stattgefunden hat.

5.3.3 Kompetitive Proteinadsorption und proteinabweisende Oberflächen

Beide Gerinnungsprozesse werden durch die Proteinadsorption auf der Werkstoffoberfläche ausgelöst, wobei die Chemie der Oberfläche die Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht beeinflusst, und somit das Ausmaß der Gerinnung bedingt. Eine globale Hypothese, die auf eine kompetitive Proteinadsorption auf der Silikonoberfläche basiert, kann alle Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassen. Verschiedene Berichte aus der Literatur liefern außerdem Hinweise, die diese Hypothese belegen können. Ziats *et al.* haben die Proteinadsorption auf verschiedene Biomaterialien untersucht und gezeigt, dass zahlreiche Proteine (u. a. Fibrinogen) vorzugsweise auf Silikon adsorbiert werden [330]. Im Vergleich zu andere Werkstoffen ist aber der Gerinnungsfaktor FXII von Silikon besonders gering adsorbiert [330]. Andere Autoren berichten von dem Auftreten des Vroman-Effekts auf negativgeladenen Oberflächen, welches das Fibrinogen durch andere Proteine (z. B. das prokoagulatorische HMWK) ersetzt [320, 32]. Die globale Hypothese lässt sich also folgenderweise zusammenfassen: Silikonoberflächen sind aufgrund der zahlreichen Methylgruppen hydrophob und begünstigen die Adsorption von Fibrinogen. Weil das adsorbierte Fibrinogen als Anker für die Thrombozyten wirkt, hat das die starke Adhäsion von Thrombozyten auf der Silikonoberfläche (primären Hämostase) zur Folge. Falls Oberflächen hydrophil – und insbesondere negativ geladen –

¹auch Hageman-Faktor genannt.

sind, spielt die kompetitive Proteinadsorption eine Rolle. Das Fibrinogen wird durch andere Proteine ersetzt, die die Autoaktivierung des Gerinnungsfaktors FXII verursachen und somit die Gerinnungskaskade auslösen (sekundäre Hämostase).

Die Hypothese der kompetitiven Proteinadsorption würde erklären, warum die Entwicklung von blutverträglichen Werkstoffen trotz intensiver Forschung immer noch große Probleme darstellt: Hydrophobe Oberflächen begünstigen die primäre Hämostase und hydrophile Oberflächen lösen wiederum die sekundäre Hämostase aus. Eine mögliche Lösung wäre die Entwicklung von proteinabweisenden Oberflächen. Das würde auch die in dieser Arbeit erfolgreiche Anwendung von Polyethylenglykol (PEG) als Modifizierung von Silikon erklären, welches die Fibrinogenadsorption und Thrombozytenadhäsion reduziert hat, ohne dabei die Gerinnungskaskade zu aktivieren. PEG ist für seine proteinresistanten Eigenschaften bekannt [135, 52].

6 Entwicklung eines implantierbaren Langzeitkatheters

Im vorherigen Kapitel wurde ein Polyethylenglykol-basiertes Additiv vorgestellt, welches die Hämokompatibilität des Silikonelastomers in *in vitro* Versuchen verbessert. Um die Eignung des Werkstoffs für die Herstellung von Medizinprodukten zu demonstrieren, wird in diesem Kapitel der Prototyp eines innovativen Portkathetersystems konstruiert. Dieses Beispiel zeigt, wie modifizierte Silikonelastomere (im Folgenden auch als „Silikone“ bezeichnet) in der Praxis als potenzieller Lösungsansatz für die Verbesserung von implantierbaren Medizinprodukten verwendet werden können.

6.1 Konzept eines verbesserten Portkathetersystems

6.1.1 Funktionsprinzip und Stand der Technik

Portkathetersysteme (PKS) sind implantierbare Systeme, die einen häufigen Zugang zum venösen oder arteriellen Kreislauf ermöglichen. Sie unterscheiden sich wesentlich von klassischen Venenkathetern, weil sie keine dauerhafte Öffnung durch die Haut erfordern, wodurch das Risiko für Infektionen vermindert und die Mobilität der Patienten verbessert wird [102].

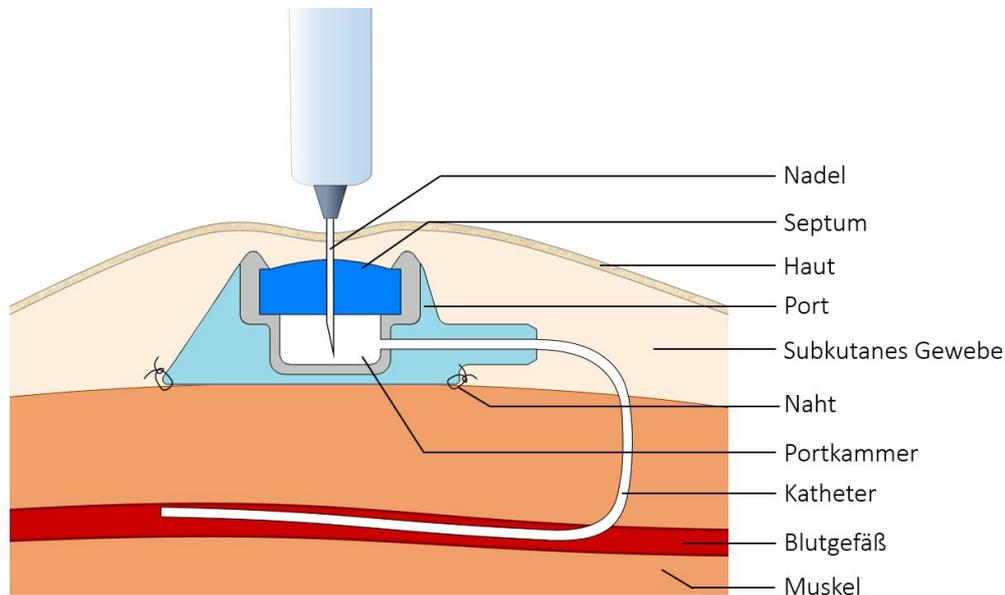


Abb. 6.1: **Aufbau und Funktionsprinzip eines Portkathetersystems (PKS).** Ein PKS besteht aus zwei Teilen. Ein Port ist subkutan in einer Gewebetasche implantiert und an dem darunter liegenden Gewebe mit Nähten fixiert. Der Port besteht aus einer Injektionskammer, die mit einem komprimierten Septum geschlossen ist. Das Septum ist aus Silikonelastomer hergestellt und kann mit einer Nadel punktiert werden, um Medikamente in die Kammer zu injizieren. Der zweite Teil besteht aus einem Katheter, welcher mit dem Port verbunden ist. Die andere Extremität des Katheters liegt in einem Blutgefäß, sodass die injizierten Medikamente an der optimalen Stelle im Körper, oft vor dem rechten Vorhof, verabreicht werden können.

Oft werden sie für die Langzeitbehandlung von Patienten, wie z. B. für Chemotherapie oder parentale Ernährung, eingesetzt. Das Funktionsprinzip des PKS ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Das System kann auch für die Entnahme von Blutproben verwendet werden [278, 188].

Es existieren verschiedene Typen von Portkathetersystemen. In manchen Fällen ist der Port (Injektionskammer und Gehäuse) einteilig und besteht vollständig aus Titan. Diese Variante ist konstruktiv sehr stabil und ermöglicht die Injektion von Flüssigkeiten mit hohem Druck, z. B. für die Injektion von Kontrastmitteln bei Computertomografieuntersuchungen [107]. Außerdem ist Titan in der Medizintechnik für seine Zytokompatibilität bekannt, welche gute Wechselwirkungen zwischen der Implantatoberfläche und dem umliegenden Gewebe garantiert. Das Einwachsen des Ports im Gewebe ist eine wichtige Voraussetzung, um das Infektionsrisiko zu minimieren [108]. Allerdings hat Titan mehrere Nachteile: Das massive Metallgerüst kann Artefakte bei MRT-Kontrollen verursachen und beeinträchtigt aufgrund seines hohen Gewichtes den Tragekomfort für Patienten. Aufgrund dieser Nachteile wurden einige Systeme mit Portgehäusen aus Kunststoff entwickelt, wie z. B. Polysulfon, Polyamid und in seltenen Fällen Silikon. Diese Systeme haben in der Regel eine Injektionskammer aus Titan, um den hohen Injektionsdruck auszuhalten, und werden mit einem Kunststoffgehäuse überdeckt.

6.1.2 Klinische Komplikationen

Zahlreiche Studien haben die auftretenden Komplikationen nach der Implantation von PKS erfasst. In Tabelle 6.1 sind die Ergebnisse von 10 Studien exemplarisch dargestellt und deren Komplikationen nach ihren klinischen Ursachen kategorisiert. Kurzzeitkomplikationen, wie beispielsweise Hämo- und Pneumothorax, allergische Reaktionen, Gefäßverletzungen und Blutungen, sind in der Regel direkte Konsequenzen des chirurgischen Eingriffs [39]. Diese treten im Vergleich zu Langzeitkomplikationen deutlich seltener auf [107]. In dieser Analyse werden verschiedene Langzeitkomplikationen dargestellt, die einen Überblick über die Verträglichkeit des PKS für den Körper liefern.

Das Auftreten von Langzeitkomplikationen, 4 Wochen nach der Implantation [107], ist für alle 10 dargestellten Studien mit einer Häufigkeit von 6,9 % bis zu 53,5 % sehr hoch [227, 172]. Die Rate der Explantationen ist aufgrund von Komplikationen ist ebenso hoch (bis zu 21,4 % siehe [21]). Zwei Ursachen von Langzeitkomplikationen zeichnen sich durch ihre hohe Häufigkeit aus: Thrombose bzw. Okklusionen und Infektionen. Okklusionen des Katheters können verschiedene Ursachen haben. Eine davon ist die Bildung eines Blutgerinnsels im Katheter oder an der Katheterspitze, welches die Injektion von Medikamenten und die Abnahme von Blutproben erschwert. Weitere Ursachen sind beispielsweise Abriebeffekte und Kratzpartikel, die im Katheter stecken bleiben, oder die Kristallisierung von Medikamenten mit anschließender Bildung von festen Ablagerungen in der Portkammer bzw. im Katheter [107].

Tab. 6.1: **Häufigkeit von Komplikationen nach der Implantation von Portkathetersystemen.** Die Angaben in Prozent bilden das Verhältnis aus der Anzahl von aufgetretenen Komplikationen zur Anzahl implantierter Portkathetersystemen (n).

Studie	Werkstoff Katheter	Perioperative Komplikationen	Langzeitkomplikationen					
			Total	Thrombose und Okklusion	Infektionen	Fixationsprobleme und Fehllage	Produktdefekte und Extravasation	Explantationen wegen Komplikationen
Poorter <i>et al.</i> [222] n = 169	Silikon	11,9 %	15,4 %	6,5 %	2,4 %	1,8 %	3,0 %	14,8 %
Kock <i>et al.</i> [153] n = 1500	Silikon	0,8 %	12,8 %	3,9 %	4,8 %	2,4 %	0,3 %	11,9 %
Goltz <i>et al.</i> [92] n = 763	Silikon Polyurethan	1,4 %	15,1 %	8,8 %	5,4 %	0,8 %	0,1 %	5,5 %
Teichgräber <i>et al.</i> [277] n = 2622	unv. A.	1,3 %	12,7 %	4,3 %	5,7 %	1,3 %	0,8 %	7,4 %
Rathmann <i>et al.</i> [227] n = 174	k. A.	k. A.	6,9 %	4,0 %	1,1 %	1,7 %	k. A.	1,2 %
Lokich <i>et al.</i> [172] n = 92	k. A.	k. A.	53,5 %	22,8 %	8,7 %	7,6 %	6,5 %	unv. A.
Bautista <i>et al.</i> [21] n = 355	Silikon	k. A.	21,4 %	3,4 %	14,4 %	0,3 %	2,5 %	21,4 %
McNulty <i>et al.</i> [184] n = 178	k. A.	k. A.	19,1 %	0,6 %	14,6 %	k. A.	1,1 %	19,1 %
Heibl <i>et al.</i> [122] n = 143	Silikon	7,7 %	17,5 %	2,1 %	9,1 %	k. A.	2,1 %	4,2 %
Jablon <i>et al.</i> [131] n = 358	Silikon	1,2 %	12,5 %	4,9 %	2,0 %	2,9 %	1,2 %	unv. A.

k. A. keine Angabe

unv. A. unvollständige Angabe

Weil diese zwei Ursachen klinisch zur Verstopfung des Systems führen, sind sie oft in der Praxis nicht differenzierbar. Aus diesem Grund werden sie in Tabelle 6.1 zu einer Kategorie zusammengefasst. Neben Okklusionen sind Infektionen die zweithäufigste Ursache für Langzeitkomplikationen. Sie können an verschiedenen Stellen auftreten, entlang des Katheters, in der Portkammer oder in der subkutanen Tasche, worin der Port eingebettet ist. Weitere Komplikationen sind Fehllagen des PKS, wie z. B. Fixierungsprobleme des Ports in der subkutanen Tasche, Migration des Katheters, oder Konnektor- und Materialfehler, die z. B. zur Extravasation von Medikamenten führen können [107, 108]. Wie in Tabelle 6.1 zu sehen ist, treten Fehllageprobleme und mechanischen Probleme viel seltener als Thrombose und Infektionen auf.

Die Dunkelziffer für Thromboseentstehung wird als hoch eingeschätzt, da vermutlich die Thrombosierung des Katheters nicht in allen Fällen erkannt wird [107]. Im Fall einer Okklusion schreibt die klinische Prozedur eine Spülung des Katheters mit einer Heparin-NaCl-Lösung vor. Ist diese Maßnahme erfolgreich, so wird die Okklusion oft nicht als Komplikation doku-

mentiert. Diese methodologischen Unterschiede in der Überwachung der Patienten erklären zum Teil, warum die in Tabelle 6.1 dargestellten Studien große Unterschiede in den Häufigkeiten der Komplikationen aufweisen. Zum Beispiel wurden in den Studien [92, 277, 227, 21, 184] nur Patienten untersucht, die an einer vorher aufgetretenen Fehlfunktion des PKS litten. In den Studien [222, 172] hingegen wurden alle Patienten regelmäßig zur Routinekontrolle aufgefordert, was wahrscheinlich zu einer Früherkennung von Komplikationen führte.

6.1.3 Design- und werkstoffbasierte Lösungsansätze

Das häufige Auftreten von Langzeitkomplikationen nach der Implantation von Portkathetersystemen verdeutlicht, dass die Verträglichkeit der aktuellen Systeme zu verbessern ist. Insbesondere Thrombosierungen und Infektionen, welche die häufigsten Komplikationen darstellen, lassen sich durch den Einsatz von verbesserten Werkstoffen, wie z. B. antithrombotischen oder antimikrobiellen Werkstoffen, reduzieren. In diesem Absatz wird ein Konzept eines innovativen Portkathetersystems vorgestellt, welches u. a. auf modifizierten Silikonen basiert, und einen möglichen Lösungsansatz zur Reduktion der Spätkomplikationsrate darstellt. Neben der zielorientierten Anwendung modifizierter Silikone (Katheter und Portgehäuse, siehe unten) werden zudem einige konstruktive Aspekte verbessert. Im Folgenden werden die jeweiligen Teile des neuen Systems vorgestellt.

Katheter

Um das Risiko einer Thrombose zu senken, ist es wünschenswert, möglichst hämokompatible Werkstoffe zu verwenden [189]. Außerdem muss der Katheter röntgendicht sein, um während der Implantation des PKS die richtige Platzierung im Blutgefäß sicherzustellen. Als hämokompatibler Werkstoff wird Silikon verwendet, welches 4 % PEG-Additiv und 15 % Bariumsulfat enthält (siehe Kapitel 5.2). Es hat sich gezeigt, dass dieser Werkstoff sehr gute Hämokompatibilität und ausreichende mechanische Eigenschaften aufweist, und sich dieser somit gut als Werkstoff für einen Langzeitkatheter eignet. Außerdem ermöglicht die hämokompatible Additivierung die Vorbeugung von Thrombosen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Katheterschlauchs, was im Fall einer hämokompatiblen Beschichtung technisch schwer zu realisieren ist (siehe 5.1.6).

Auf indirekte Weise könnte auch die Verbesserung der Hämokompatibilität des Katheters einen positiven Einfluss auf die Reduktion des Infektionsrisikos haben. Auf die Wechselwirkungen zwischen Thrombosen und Infektionen wurden bereits in der Fachliteratur eingegangen. Es wurde gezeigt, dass Thrombosen die Ausbreitung von Infektionen auf der Werkstoffoberfläche begünstigen [160]. Auf diese Weise ist es möglich, mit einer hämokompatiblen Werkstoffmodifizierung die beiden häufigsten Komplikationen zu bekämpfen.

Portgehäuse

Um das Gewicht des gesamten Systems so gering wie möglich zu halten und Artefakte in MRT-Untersuchungen zu vermeiden, wird auf einen vollständig metallischen Port verzichtet. Ports mit Kunststoffgehäuse aus Polysulfon oder Polyamid existieren bereits auf dem Markt. In diesem Fall wird allerdings, im Gegensatz zu den thermoplastischen Polymeren, Silikon aus zwei Gründen bevorzugt.

Zunächst ähnelt das Silikonelastomer aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften dem Verhalten von biologischem Gewebe. Somit wird die sog. Strukturkompatibilität des Silikongehäuses im Vergleich zu harten Thermoplasten vorteilhaft gestaltet [309]. Silikon hat außerdem einen zusätzlichen Vorteil: Durch die Formgebung im flüssig/pastösen Zustand und die anschließende Vulkanisation der Silikonmasse ist es möglich, die Injektionskammer und den Konnektor vollständig in Silikon einzubetten. Auf diese Weise sind Spalten zwischen den verschiedenen Komponenten, die sich bei den herkömmlichen Systemen konstruktiv nicht vermeiden lassen, komplett beseitigt. Diese tiefen Spalten sind schwer zu sterilisieren und fördern dadurch bakterielle Infektionen.

Weil Infektionen nicht nur entlang des Katheters, sondern auch in der subkutanen Tasche häufig vorkommen, ist eine weitere Lösung zur Reduktion von Infektionen erwünscht [107]. Die Anwendung antimikrobieller Substanzen ist im Falle von implantierbaren Produkten allerdings bedenklich, da sie das umliegende Gewebe beschädigen können. Portinfektionen werden auch durch die Platzierung des Ports in einer serösen Gewebetasche begünstigt, weil sie einen optimalen Hohlraum für die bakterielle Kolonisierung bietet. Eine weitere Strategie ist es also, die seröse Spalte zwischen dem Implantat und dem Gewebe zu reduzieren, indem der implantierte Werkstoff im Gewebe einwächst [1, 108]. Zum Beispiel haben Okada *et al.* in einem *in vivo* Versuch anhand eines Kaninchen-Modell gezeigt, dass eine Kollagenbeschichtung das Einwachsen des Silikons ermöglicht und gleichzeitig die Infektionen reduziert [208]. In dieser Arbeit wird die Oberflächenkompatibilität des Silikongehäuses durch eine Beschichtung mit Titandioxid verbessert [308]. Weil die Titanisierung vom Silikonelastomer einige Herausforderungen darstellt, wird die Beschreibung der Vorgehensweise und die biologische Validierung, Verbesserung der Zytokompatibilität, in einem separaten Unterkapitel detailliert beschrieben (siehe 6.2).

Injektionskammer

In dieser Arbeit wird Titan oder eine Titanlegierung als Werkstoff für die Injektionskammer bevorzugt. Eine metallische Kammer ist notwendig, um einen hohen Injektionsdruck bei der Injektion von Kontrastmitteln zu ermöglichen [107]. Außerdem müssen die Ränder der Injektionskammer durch die Hautschichten gut abtastbar sein, damit die Punktion durch das Septum und die Injektion von Medikamenten im Port sichergestellt wird [189]. Zuletzt

ermöglicht Titan eine einfache CT-Darstellung des Ports, ohne dabei starke Artefakte in MRT-Untersuchungen zu verursachen.

Konnektor

Der Konnektor bezeichnet den Mechanismus, der die Verbindung zwischen der Injektionskammer und dem Katheter ermöglicht. In dieser Arbeit wird auf einen klassischen Konnektor verzichtet: Kammer und Katheter werden direkt in dem Silikongehäuse eingebettet. Diese Designanpassung gewährleistet, dass kein Spalt zwischen beweglichen Elementen entsteht, welche potenzielle Ausgangspunkte für die bakterielle Kolonisierung darstellen. Außerdem wird dadurch die Verbindung stabiler sein als bei den klassischen Konnektoren, was das Risiko einer Extravasation reduziert [108].

6.2 Oberflächentitanisierung von Silikonelastomeren

Im vorherigen Kapitel wurde die Titanisierung der Silikonoberfläche als mögliche Strategie zur Verbesserung der Zytokompatibilität des Portgehäuses erwähnt. Aufgrund der Flexibilität des Werkstoffs und der Apolarität der Oberfläche sind Silikone generell schwer stabil zu beschichten. Dieser Kapitel umfasst die Untersuchung der aufgetragenen Beschichtung und die Validierung des Einsatzes dieser Beschichtung für implantierbare Medizinprodukte.

6.2.1 Motivation und Stand der Forschung

Trotz der verbreiteten Anwendung von Silikonelastomeren in implantierbaren Produkten ist die resultierende ausgeprägte Fremdkörperreaktion (FBR) bekannt. Auf den Zusammenhang zwischen der FBR und der begrenzten Zytokompatibilität von Silikon wurde bereits im ersten Kapitel über die biologischen Eigenschaften von Silikon detailliert eingegangen (siehe 2.3.2). Im Zusammenhang damit werden Modifizierungen von Silikon zur Verbesserung der Zytokompatibilität in der Forschung intensiv untersucht. Zahlreiche Strategien werden verfolgt, wie z. B. physikalische Modifizierungen [148, 275], Bulkmodifizierungen mit hydrophilen Copolymeren und Blends [249], diverse Oberflächenmodifikationen und Pfropfpolymerisation [242, 208, 272]. Wie bereits im Kapitel 2.4 detailliert erklärt, liegt allerdings die Schwierigkeit in der hydrophoben Relaxation der Silikonoberfläche, welche dazu führt, dass Beschichtungen auf dem Substrat schlecht adhären können. Es muss also überprüft werden, dass sich Beschichtungen, bei einer eventuellen Verformung des flexiblen Substrates oder nach dauerhaftem Kontakt mit biologischen Flüssigkeiten, nicht ablösen [261]. Außerdem müssen diese Modifizierungen verschiedene Anforderungen für medizinische Werkstoffe, wie z. B. Sterilisierbarkeit und Langzeitstabilität, erfüllen und dürfen nicht toxisch sein.

Titan ist hingegen sehr bekannt für seine hervorragende Biokompatibilität und findet eta-

blierte Anwendung z. B. für die Herstellung von dentalen und orthopädischen Implantaten. Der Grund dafür ist die spontane Bildung einer Oxidschicht (Titandioxid TiO_2), welche durch Hydroxylierung in wässriger Umgebung der Oberfläche stabile Hydrophilie verleiht [64, 308]. Es wird angenommen, dass die OH-Gruppen auf der Oberfläche eine vorteilhafte Proteinadsorption verursachen [202] und dadurch die gute Zytokompatibilität des Titandioxids ermöglichen [331, 170]. Die Arbeitsgruppe von Keselowsky *et al.* hat in verschiedenen Publikationen die Zelladhäsion von SAMs untersucht. Sie haben gezeigt, dass OH-funktionalisierte Oberflächen die höchsten Werte für Zelladhäsion und Integrinbindung aufweisen. Außerdem könnten sie beweisen, dass das Bindungsprotein Fibronectin (FN) signifikante Konformationsänderungen während der Adsorption erfährt, wobei im Falle des OH-SAMs die Bindungssequenz RGB häufiger an der Oberfläche vorkommt. Im Gegensatz dazu ist die CH_3 -Oberfläche diejenige, die die schlechteste Zelladhäsion aufweist [145, 146]. Die verbesserte Adhäsion von Zellen auf OH-Oberflächen wird auch in anderen Publikationen dokumentiert [152, 7]. Diese Ergebnisse können erklären, warum eine OH-haltige Titandioxid-Beschichtung eine höhere Zytokompatibilität als die CH_3 -haltige Silikonoberfläche besitzt. Die Verbesserung des *in vivo* Einwachsens von Titandioxid-beschichteten Werkstoffen wurde zudem für harte Kunststoffe nachgewiesen, wie z. B. PTFE und Polyethylen [331, 57].

Zahlreiche Publikationen beschreiben TiO_2 -Beschichtungen, aber nur wenige Autoren verwenden Silikon als Substrat. Dies liegt wahrscheinlich an der schlechten Adhäsion von Beschichtungen auf der stark apolaren Silikonoberfläche. Girshevitz *et al.* und Gao *et al.* beschreiben zum Beispiel die Abscheidung von TiO_2 aus einer Lösung [89, 87]. Eine Applikation ist beispielsweise das Ausnutzen der photokatalytischen Wirkung des Titandioxids, um eine antibakterielle Schicht auf Silikon zu bilden. Kommireddy *et al.* beschreiben eine hydrophile und zytokompatible Beschichtung auf Silikon, die TiO_2 -Nanopartikeln enthält und mit der layer-by-layer Methode produziert wurde [157]. Reaktiver Sputterprozess wurde von Niu *et al.* verwendet, um Silikon mit einer dünnen TiO_2 -Schicht zu beschichten, die proteinabweisende Eigenschaften aufweist [202, 203]. Eine der seltenen quantitativen Untersuchungen der Zelladhäsion auf beschichtetem Silikon befindet sich in einer Studie von Zimmerman *et al.* [331]. Die CVD-Methode wurde verwendet, um verschiedene Kunststoffe – darunter Silikon – zu beschichten. Die Ergebnisse zeigen eine Verbesserung des *in vitro* Zellwachstums von 90 % im Vergleich zum unmodifizierten Silikon.

6.2.2 Probenherstellung

Für diese Untersuchung wird zunächst die Titandioxidbeschichtung auf flache Silikonproben aufgebracht (Silpuran[®] UR 9030/60, Wacker Chemie AG, Deutschland). Um den Einfluss der Oberflächenrauheit so gering wie möglich zu halten, werden die Proben zwischen zwei spiegelglatte Stahlplatten gepresst. Die Beschichtung erfolgt dann am Institut für Plasmatechnik und Mathematik der Universität der Bundeswehr München. Die verwendete Beschichtungs-

technik ist die Vakuumlichtbogendeposition¹.

Diese Methode ermöglicht die Bildung von dünnen, stabilen und reproduzierbaren Schichten. Besonders interessant ist in diesem Fall die Möglichkeit, eine gute Adhäsion der Schicht auf dem Substrat zu erreichen. Bei der Vakuumlichtbogendeposition wird hier mittels eines Hochstimpulses ein Plasma aus dem Kathodenmaterial (Titan) erzeugt. Infolge verschiedener physikalischer Effekte werden die so entstandenen Ionen von der Kathode weg beschleunigt und erreichen Geschwindigkeiten im 10^4 m/s Bereich [147]. Diese Ionen treffen mit hoher Geschwindigkeit auf die Silikonoberfläche und dringen zusätzlich in den Werkstoff ein, was auf makroskopischer Ebene eine gute Anbindung an das Substrat ermöglicht. Durch die Verwendung von O_2 als Umgebungsgas wird Titandioxid erzeugt, welches entweder auf dem Substrat oder schon innerhalb der Flugphase der Ionen entsteht [147].

Die genaue Beschreibung der Beschichtungsvorrichtung, die Angabe der Beschichtungsparameter, sowie die detaillierte Erklärung des physikalischen Hintergrunds sind im Rahmen einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht worden [29]. Die mikroskopische Untersuchung der Beschichtung hat gezeigt, dass die Schicht eine gute Adhäsion auf dem Silikonsubstrat aufweist und eine Dicke von ca. 150 nm hat. Außerdem wurde Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) verwendet, um die chemische Zusammensetzung zu analysieren und nachzuweisen, dass die Beschichtung tatsächlich aus Titandioxid besteht. In Abbildung 6.2 ist ein Bild einer halbbeschichteten Silikonprobe zu sehen. Trotz einer sehr dünnen Abscheidung lässt sich die TiO_2 -Beschichtung gut aufgrund ihrer weißlichen Farbe erkennen.

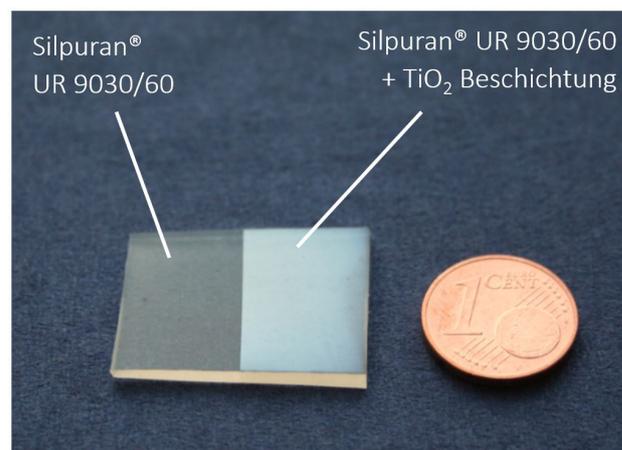


Abb. 6.2: **Titandioxidbeschichtung auf Silikonsubstrat.** Die linke Seite der Probe wurde während des Beschichtungsprozesses abgedeckt und ist somit unbehandelt geblieben. Auf der rechten Seite ist die weiße Verfärbung aufgrund der TiO_2 -Beschichtung gut erkennbar.

¹Die exakte Bezeichnung lautet „triggerless pulsed vacuum cathodic arc plasma deposition (PVCAPD)“

6.2.3 Analyse der Titandioxidbeschichtung

Hydrophilisierung und Langzeitstabilität

Laut der Norm DIN ISO 10993-1 beträgt die Mindestimplantationsdauer für Langzeitimplantate 30 Tage [70]. Um die Eignung der TiO_2 -Beschichtung als Implantationswerkstoff zu untersuchen, wird die Stabilität von beschichteten Silikonproben für 68 Tagen in einem Einlagerungsversuch in Wasser evaluiert. Die Lagerungstemperatur beträgt 37°C . Außerdem werden andere Proben währenddessen an der Luft gelagert, um den Einfluss von Lagerungsbedingungen auf das Produkt nach der Herstellung zu simulieren. Der Kontaktwinkel mit Wasser wird während der Einlagerungszeit regelmäßig gemessen (Gerät OCA 20, Software SCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland). Um die Messbedingungen reproduzierbar zu halten, werden die Proben vor der Messung 2 Stunden vakuumgetrocknet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 6.3 dargestellt.

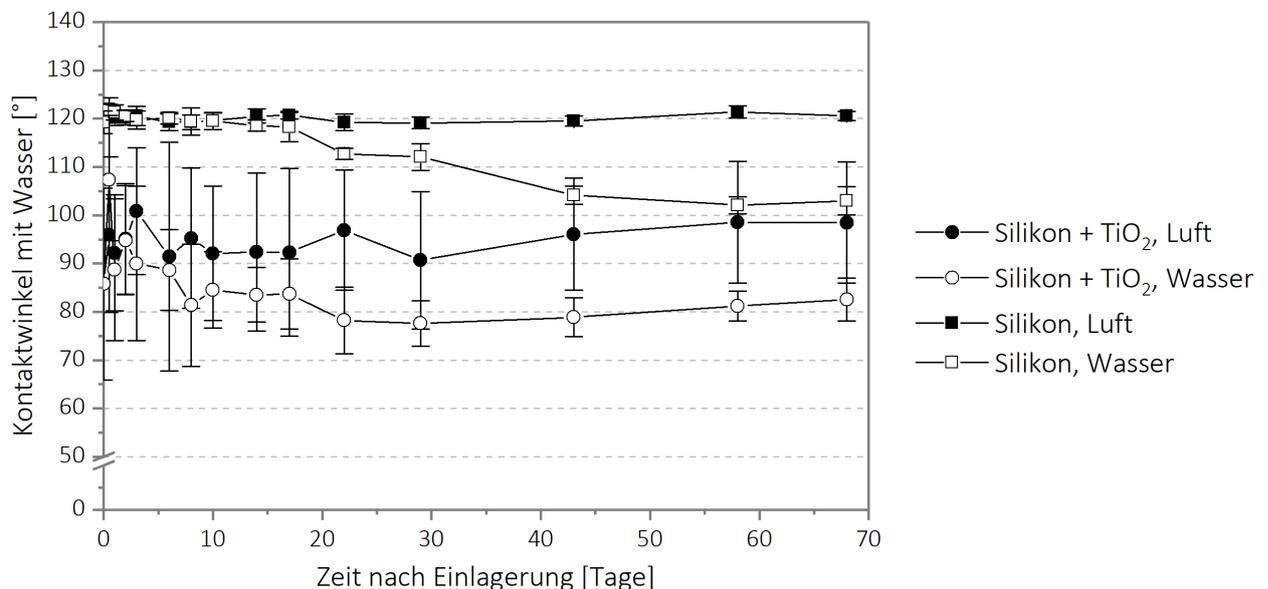


Abb. 6.3: **Kontaktwinkel von unbehandeltem und TiO_2 -beschichtetem Silikon während der Einlagerung in Wasser und an der Luft.** Die Kontaktwinkelmessung erfolgt unmittelbar nach Stabilisierung der $2\ \mu\text{l}$ Tropfen auf der Oberfläche (Dispensergeschwindigkeit von $2\ \mu\text{l/s}$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 10$).

Die TiO_2 -Beschichtung hat eine unmittelbare Verbesserung der Benetzbarkeit von Silikon bewirkt. Vor der Einlagerung weist unbehandeltes Silikon einen Kontaktwinkel mit Wasser von 120° auf, während beschichtetes Silikon einen deutlich niedrigeren Kontaktwinkel von 95° hat. Außerdem bleiben die Oberflächeneigenschaften während der 68-tägigen Einlagerung stabil. Im Fall der Lagerung an der Luft stabilisiert sich der Kontaktwinkel auf einen Wert von 98° . Das zeigt, dass weder eine Degradierung der Beschichtung noch eine hydrophobe Relaxation der Silikonoberfläche vorkommt. Nach 68 Tagen im Wasser ist der Kontaktwinkel der beschichteten Proben ca. 15° geringer als bei der Lagerung an der Luft. Dies liegt

wahrscheinlich an der Oberflächenadsorption von Wassermolekülen. Der Kontaktwinkel der TiO_2 -beschichteten Proben verringert sich langsam während der ersten Tage der Einlagerung in Wasser. Dies zeigt, dass Wasser eine hohe Affinität zur Titandioxidbeschichtung besitzt. Im Gegensatz dazu tritt die Wasseradsorption erst ca. 3 Wochen nach dem Anfang der Einlagerung im Fall der unbeschichteten Proben auf.

Zytotoxizitätsuntersuchung

Trotz der Stabilität des Kontaktwinkels in wässriger Umgebung muss die toxikologische Unbedenklichkeit der Beschichtung untersucht werden, um die Abwesenheit von toxischen löslichen Substanzen oder Kontaminationen sicherzustellen, die während der Probenherstellung oder des Beschichtungsprozesses erzeugt werden könnten. Dafür werden *in vitro* Zytotoxizitätsuntersuchungen gemäß der Norm DIN ISO 10993-5 durchgeführt [72]. Das Vorgehen entspricht der Untersuchung der modifizierten Silikone im Kapitel 5: Zwei unterschiedlich lange Extraktionszeiten werden verwendet. 3 Tage reichen, um die Vorschrift der Norm DIN ISO 10993-5 zu erfüllen, Prüfungen mit einer Dauer von 7 Tagen werden als kritischer angesehen (siehe 4.3.3). Die Protokolle zur Zellkultivierung und Auswertung der Ergebnisse sind im Anhang B.4. und B.6. dokumentiert. Abbildung 6.4 zeigt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche.

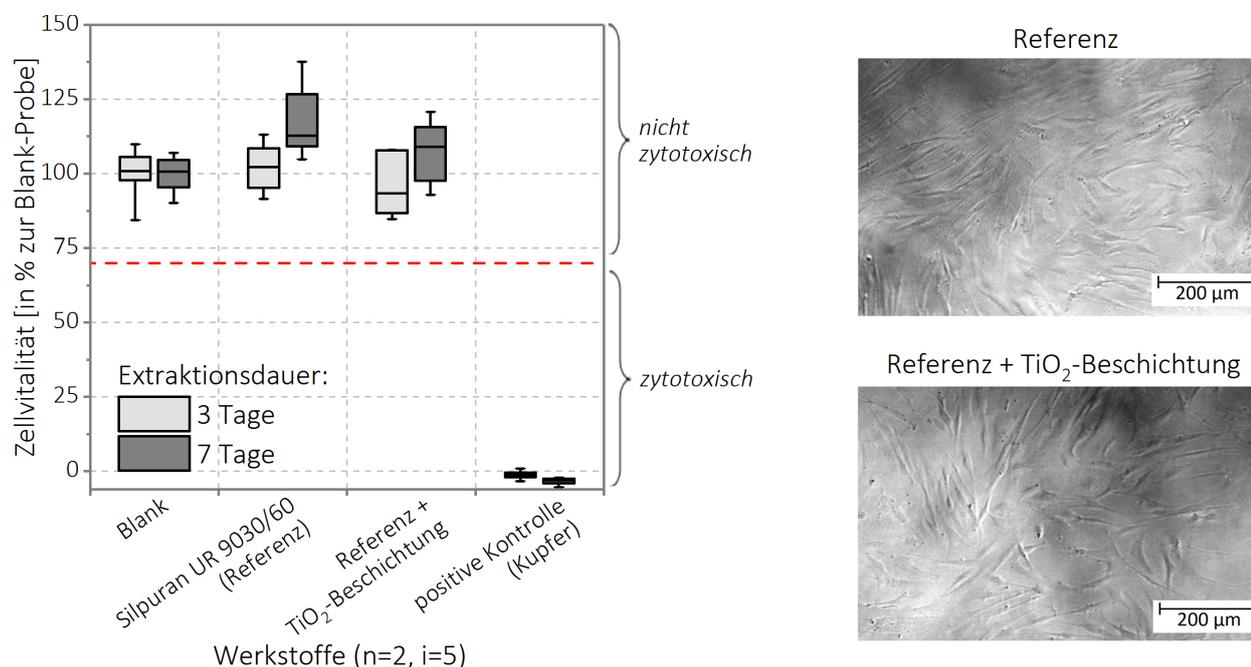


Abb. 6.4: **Zytotoxizität von unbehandeltem Silikon und TiO_2 -beschichtetem Silikon.** Links: Zellvitalität nach Inkubation mit den Werkstoffextrakten (CCK8-Test). Beide untersuchten Werkstoffe weisen keine zytotoxische Wirkung nach 3 Tagen oder nach 7 Tagen auf. Für jeden Extrakt wird der Median, das erste Quartil, das dritte Quartil, der Minimalwert und der Maximalwert der Zellvitalität gebildet. Rechts: Mikroskopische Aufnahme der Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit den Werkstoffextrakten. Nach Kontakt mit den untersuchten Werkstoffextrakten weisen die Fibroblasten eine gesunde, ausgestreckte Morphologie auf.

Beide untersuchten Werkstoffextrakte sowohl nach der 3- als auch 7-tägigen Inkubation, führen zu keiner Verringerung der Zellvitalität. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die TiO_2 -Beschichtung toxikologisch unbedenklich ist, und eignen sich demzufolge gut als Beschichtung für das Portgehäuse.

6.2.4 Zytokompatibilität der Titandioxidbeschichtung

Besiedlungsversuche

Um die Zytokompatibilität der TiO_2 -Beschichtung zu untersuchen, werden biologische Zellen in direkten Kontakt mit den Werkstoffen gebracht. Eine Verbesserung der Zytokompatibilität resultiert in einer Verbesserung der Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Oberfläche. Mit diesem Ziel werden also *in vitro* Besiedlungsversuche mit Fibroblasten durchgeführt. Fibroblasten sind Bindegewebezellen, die sich daher gut für die Untersuchung von Werkstoffen eignen, die in Weichgewebe implantiert werden [191]. Ähnliche Besiedelungsversuche mit Fibroblasten wurden in verschiedenen Studien durchgeführt, um die Zytokompatibilität von Silikonelastomeren zu bewerten [148, 182].

Runde unbehandelte und beschichtete Silikonproben mit einem Durchmesser von 12 mm werden in einer flachen Probe gestanzt und dicht auf den Boden von Silikonnapfchen gedrückt. Fibroblasten werden dann auf die Proben verteilt, und für 72 Stunden inkubiert. Während der Inkubationszeit können die Zellen auf der Oberfläche adhären und sich verbreiten. Auf

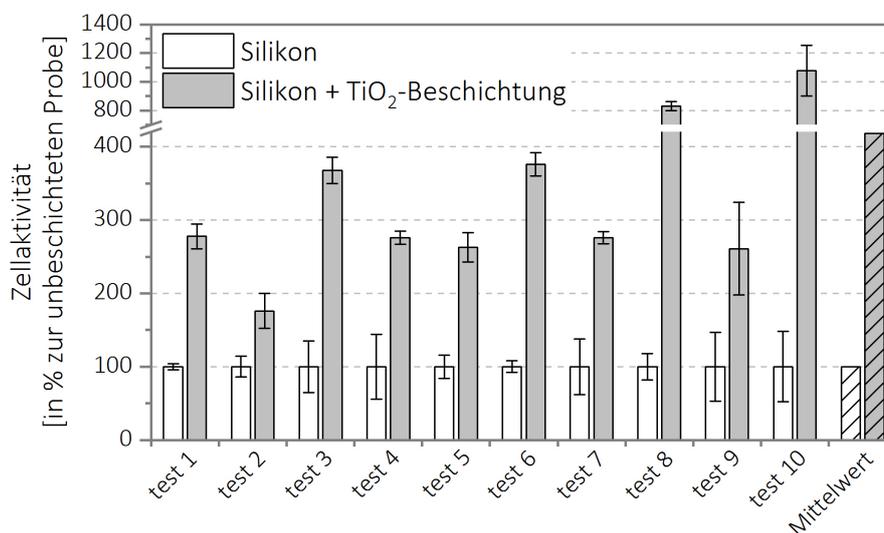


Abb. 6.5: **Besiedlungsversuche mit Fibroblasten auf unbehandelten Silikonproben und TiO_2 -beschichteten Silikonproben (CCK8-Test).** Bei allen 10 Versuchen ist die Zellaktivität auf TiO_2 -beschichteten Proben signifikant höher im Vergleich zu unbehandeltem Silikon. Der Mittelwert über 10 Versuche der Zellaktivität auf den beschichteten Probenkörpern ist in grau dargestellt und beträgt 480 % bezogen zur Referenz (unbehandeltes Silikon). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 10$, $i = 3$).

Werkstoffen, die eine zytokompatible Oberfläche aufweisen, sollten sich nach der Inkubation vergleichsweise viele Zellen befinden. Für die Auswertung wird die Zellvitalität der Kultur mit dem CCK8-Test erfasst. Die Protokolle zur Inkubation und Auswertung sind im Anhang B.5. und B.6. dokumentiert. Zehn unabhängige Versuche werden durchgeführt, um die Variabilität der Kultivierungsbedingungen in den Ergebnissen miteinbeziehen zu können, und somit eine solide Aussage über die biologische Wirkung treffen zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.5 dargestellt.

Diese Versuche zeigen deutlich, dass durch die Beschichtung die Zelladhäsion und das Zellwachstum auf Silikon signifikant verbessert werden. Die gemittelte Erhöhung der Zellaktivität beträgt 480 %. Die Werte der beschichteten Proben sind je nach Versuch zwischen 176 % und 1080 % höher auf der Beschichtung als die auf Silikon. In 7 von 10 Versuchen beträgt sogar dieser Wert zwischen 260 % und 380 %. Die hohe Variabilität der Versuchsergebnisse lässt sich durch verschiedene Faktoren erklären: die Sensitivität der Zellkultur gegenüber externen Einwirkungen (zum Beispiel ist die Zellaktivität in der Regel höher im Fall der Inkubation über das Wochenende im Vergleich zur Inkubation während der Arbeitswoche), die unterschiedliche Vitalität der Kultur je nach Passage und die leichte Variationen der Oberflächeneigenschaften der Beschichtung.

Die Verbesserung der Zytokompatibilität wird außerdem im Rahmen eines Zusatzversuchs mittels Fluoreszenzmikroskopie exemplarisch visualisiert. Dafür werden Silikonproben nur zur Hälfte beschichtet, siehe Abbildung 6.2. Die Grenzlinie zwischen dem beschichteten Bereich und dem Rest der Probe ist ausreichend scharf, um den Übergangsbereich in einem mikroskopischen Bild darstellen zu können. Fibroblasten werden unter den gleichen Kultivierungsbedingungen wie für die Besiedlungsversuche mit den halb-beschichteten Proben inku-

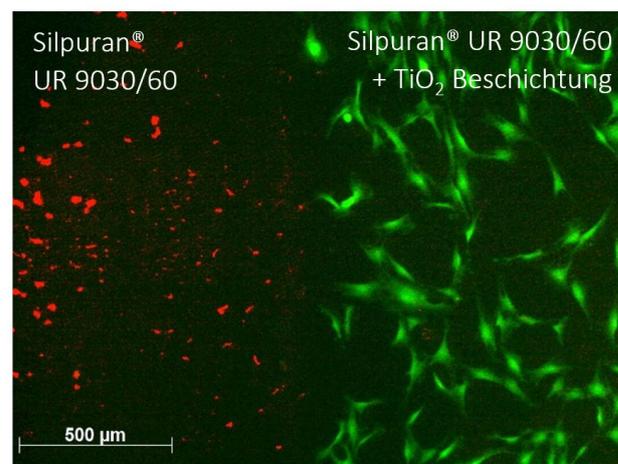


Abb. 6.6: Mikroskopische Aufnahme der Live/Dead-Färbung von Fibroblasten nach 72-stündiger Inkubation auf halb-beschichteter Probe. Auf der unbehandelten Seite (links) sind rote abgestorbene Zellen zu sehen. Die beschichtete Seite (rechts) weist im Gegensatz dazu eine hohe Anzahl von grünen adhärenente Zellen auf.

biert. Nach 72 Stunden wird eine Live/Dead-Färbung (LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit, ThermoFisher Scientific Inc., USA) durchgeführt und die Zellen werden direkt mikroskopiert. Die Protokolle zu den Kultivierungsbedingungen, zur Zellfärbung und mikroskopischen Analyse sind im Anhang B.7. dokumentiert. Abbildung 6.6 zeigt die Überlappung von zwei Aufnahmen: das Zytoplasma der lebendigen Zellen ist grün gefärbt, der Zellkern der toten Zellen ist in rot abgebildet. Dieser Versuch bestätigt, dass die Beschichtung einen positiven Effekt auf die Zellaktivität bewirkt.

Einfluss des Sterilisationsverfahrens

Der Einfluss des Sterilisationsverfahrens, wie bei der Validierung der PEG-Additivierung in Kapitel 5.2, wird im Rahmen dieser Untersuchung auf die Zellkultur überprüft. In den vorherigen Untersuchungen wurden die Proben standardgemäß mittels Heißdampf (121 °C, 2 bar, 20 min) sterilisiert. An dieser Stelle werden zwei weitere Sterilisationsverfahren betrachtet: Gammabestrahlung (Strahlungsdosis von 25 kGy) und Ethylenoxid (45 °C, 680 mg EO/l, Belüftungszeit von 80 Stunden). Die Ergebnisse des zusätzlichen Besiedlungsversuchs mit Proben, die durch die drei Methoden sterilisiert worden sind, sind in Abbildung 6.7 dargestellt.

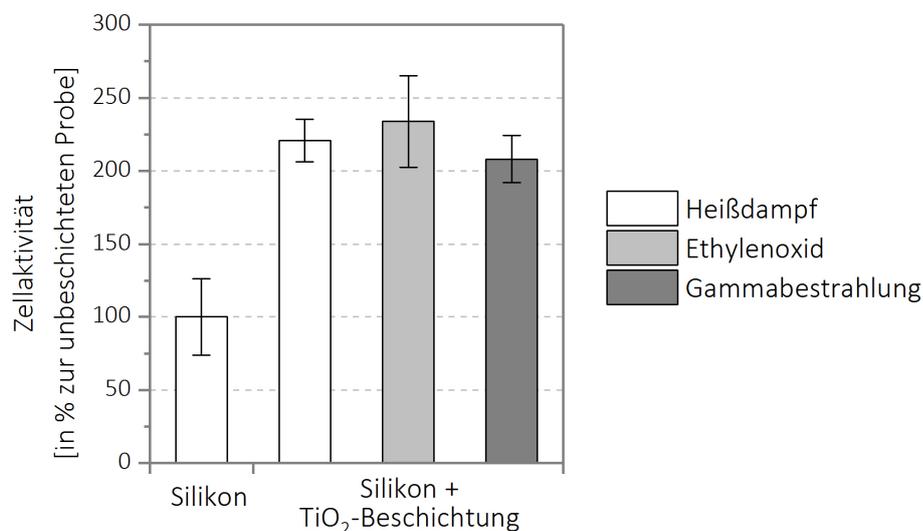


Abb. 6.7: **Besiedlungsversuche mit Fibroblasten auf unbehandeltem Silikon und TiO₂-beschichtetem Silikon nach verschiedenen Sterilisationsverfahren (CCK8-Test).** Die beschichteten Silikonproben weisen alle eine erhöhte Zellaktivität im Vergleich zum unbeschichteten Silikon auf. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der beschichteten Proben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($i = 3$).

Der positive Effekt der TiO₂-Beschichtung auf die Zellvitalität spiegelt sich in diesem Versuch wider. Außerdem hat die Sterilisation keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Es bestätigt sich, dass die Beschichtung keiner Degradierung ausgesetzt ist. Außerdem zeigt dieser Versuch, dass keine toxischen Substanzen während der Sterilisation der Beschichtung produziert werden.

6.2.5 Diskussion: Zytokompatibilität von Titandioxid

Die Ergebnisse der Besiedlungsversuche stimmen mit der Literatur überein, die von einer generellen Verbesserung der Zytokompatibilität von Silikon mit Titandioxid-Beschichtung berichtet. Im Rahmen einer Studie berichten Zimmermann *et al.* von einer Verbesserung der Zellaktivität von ca. 90 % [331]. In dieser Arbeit ist die Zellaktivität um das Vierfache erhöht, wodurch der positive Effekt der Beschichtung deutlich bestätigt wird.

Es existieren drei verschiedene Kristallstrukturen von Titandioxid: Anatas, Rutil und Brookit. Einige Arbeiten weisen auf den Einfluss der Struktur und ihrer biologischen Wirkung hin. *In vitro* Studien zeigten, dass TiO₂-Beschichtungen eine bessere Bioaktivität besitzen, wenn sie aus Anatas bestehen [170, 118]. Um die Kristallstruktur der in dieser Arbeit verwendeten Beschichtung zu analysieren, wird eine Analyse mit Raman-Spektroskopie (Senterra spectrometer, Bruker Optics, Deutschland) durchgeführt. Für diese Untersuchung wird eine Folie aus Kupfer mit den gleichen Prozessparametern mit TiO₂ beschichtet. Statt Silikon wurde Kupfer als Substrat verwendet, um eine Überlappung mit dem TiO₂-Spektrum zu verhindern. Das Raman-Spektrum ist in Abbildung 6.8 dargestellt. Es zeigt viele Ähnlichkeiten mit Anatas-Spektren, die in der Literatur erfasst sind [175, 109, 81]. Die Anwesenheit von TiO₂ in Anatas-Form könnte demzufolge teilweise zu der deutlichen Erhöhung der Zellaktivität in den Besiedlungsversuchen beigetragen haben.

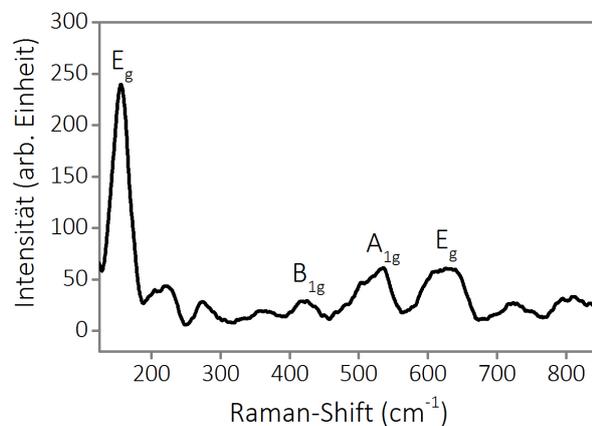


Abb. 6.8: **Raman-Spektrum der Titandioxidbeschichtung.** Das Spektrum wurde mit einem 785 nm-Laser aufgenommen. Ein hoher Peak an der Wellenlänge 153 cm^{-1} ist deutlich identifizierbar und könnte dem E_g Modus des Anatas zugeordnet werden. Andere kleinere Peaks bei 423 cm^{-1} , 538 cm^{-1} und 628 cm^{-1} könnten den B_{1g} , A_{1g} und E_g Modi des Anatas entsprechen. Die anderen Peaks können nicht zu den anderen Kristallstrukturen zugeordnet werden.

Die Rauheit der Oberfläche spielt auch für die Zytokompatibilität von Werkstoffen eine wichtige Rolle [149]. Die unbeschichteten Silikonproben, die für diese Untersuchung hergestellt worden sind, waren sehr glatt. Eine Analyse der Oberfläche mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) zeigt, dass die TiO₂-Beschichtung eine leichte Erhöhung der Rauheit verursacht (siehe detaillierte Analyse in [29]). Das Ausmaß der Hydrophilisierung der Oberfläche ist allerdings

von der Form und Größe der Strukturierung abhängig, was möglicherweise einen weiteren Einfluss hat. Die Erhöhung der Zelladhäsion ergibt sich demzufolge aus einer Kombination zweier Faktoren: Oberflächenchemie und Oberflächenstruktur.

6.3 Konstruktive Umsetzung

6.3.1 Modellierung, Dimensionierung und Werkstoffauswahl

Abbildung 6.9 stellt die Umsetzung des Systems in einem CAD-Modell dar. In diesem Modell sind die konstruktiven Merkmale umgesetzt, die vorher in dem Kapitel 6.1.3 vorgestellt worden sind. Die Besonderheit hier gegenüber kommerziell erhältlichen PKS ist die Ummantelung des Systems in einem Silikongehäuse, was mobile Komponenten und Spalten zwischen den Teilen komplett beseitigt. Außerdem werden Ösen in dem Gehäuse vorgesehen, um das System mit Nähten an dem Gewebe fixieren zu können und somit zu verhindern, dass der Port sich in der subkutanen Tasche bewegt. Zusätzlich ist die Bodenfläche sehr breit gestaltet,

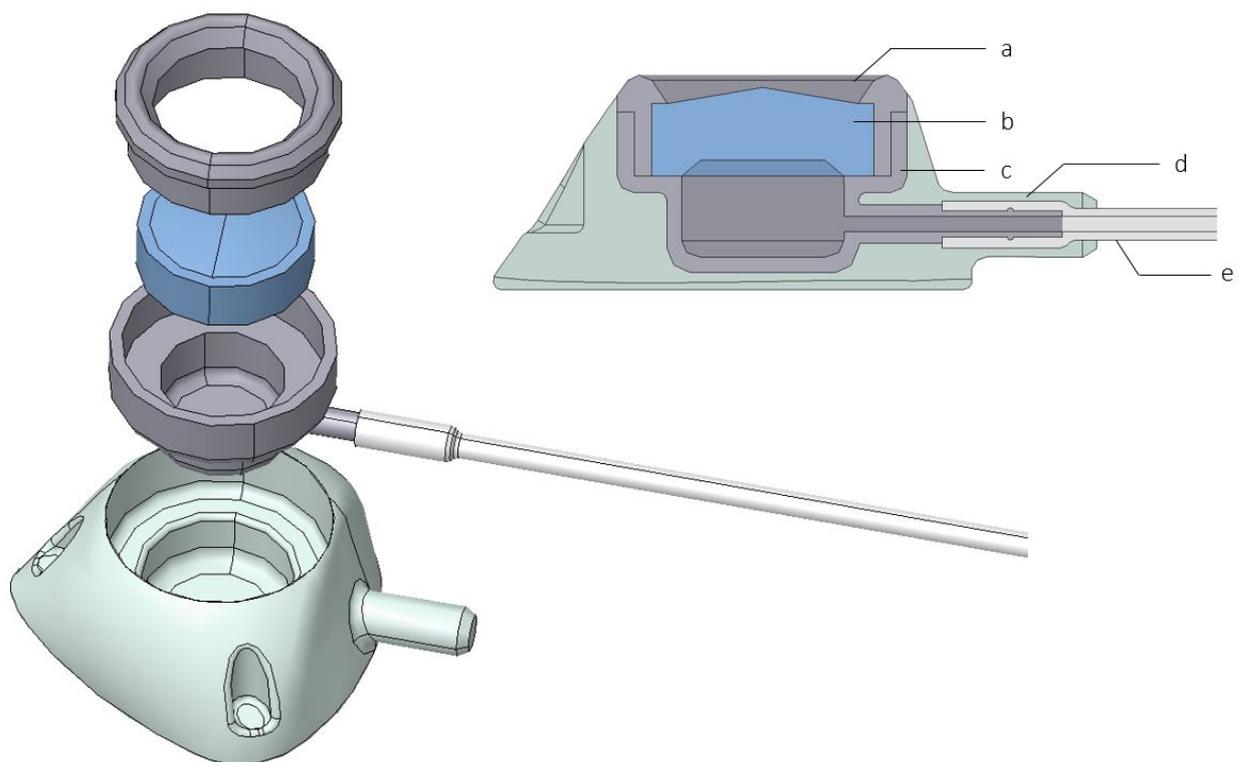


Abb. 6.9: **CAD-Modellierung des Portkathetersystems.** Links: Explosionsansicht des Systems. Rechts: Schnitt entlang der Symmetrieachse des zusammengebauten PKS. Das System besteht aus dem Zusammenbau von 5 Teilen. Ein Kranz (a) presst das Silikonseptum (b) in die Injektionskammer (c). Eine Übermaßpassung des Kontakts zwischen dem Kranz und der Kammer gewährleistet das Einspannen des Septums im System. Der Katheter (e) ist über ein kleines Rohr geschoben, welches eine direkte Verbindung zur Injektionskammer ermöglicht. Das Ganze ist mit einem Silikongehäuse (d) ummantelt.

ohne dabei das Gesamtgewicht erhöht zu haben, um die Stabilität zu verbessern [189].

Eine Übermaßpassung des Kranzes ermöglicht die Befestigung des Septums im zusammengebauten System. Aus diesem Grund ist die Portkammer das Teil, welches der höchsten mechanischen Beanspruchung ausgesetzt ist. Die Dimensionierung der Übermaßpassung und die Festigkeitsberechnung spielen demnach eine wichtige Rolle für die Werkstoffauswahl des Kranzes und der Portkammer. Im Folgenden werden die Vorgehensweise und Ergebnisse der Dimensionierung dargestellt. Die detaillierten Berechnungen und verwendeten Werte sind im Anhang E dokumentiert.

Die Formeln zur Berechnung der Übermaßpassung wurden dem Buch von H. Haberbauer und F. Bodenstein entnommen [105]. Zwei Flächenpressungen zwischen Kranz und Kammer werden berechnet: Die minimale Flächenpressung p_{min} stellt den erforderlichen Druck dar, damit sich der Kranz während der Benutzung des Systems nicht aus der Verbindung lösen kann. Die maximale Flächenpressung p_{max} stellt hingegen den höchsten Druck dar, welchem die Werkstoffe ohne plastische Verformung oder Bruch ausgesetzt werden können.

Die minimale Flächenpressung p_{min} setzt sich aus einem Sicherheitsfaktor S_R , der Summe der axialen Kräfte F_a , dem Anwendungsfaktor K_a , dem Haftbeiwert für die Werkstoffpaarung f , dem Fügedurchmesser D_F und der Nabenbreite B zusammen:

$$p_{min} = S_R \cdot F_a \times \frac{K_a}{f \cdot \pi \cdot D_F \cdot B} \quad (6.1)$$

Die maximale Flächenpressung p_{max} setzt sich aus einem Sicherheitsfaktor S_B , der Streckgrenze des Werkstoffs R_e und einem geometrischen Wert Q zusammen:

$$p_{max} = \frac{1 - Q^2}{\sqrt{3}} \cdot \frac{R_e}{S_B} \quad (6.2)$$

Zur Berechnung der minimalen Flächenpressung p_{min} müssen die axialen Kräfte F_a , die auf den Kranz ausgeübt werden, geschätzt werden. Diese bestehen aus zwei Komponenten, dem Injektionsdruck, welcher während der Injektion von Flüssigkeiten auf die untere Fläche des Septums einwirkt, und der Verformung des Septums aufgrund der Einspannung im System. Während der Behandlung oder zur Injektion von Kontrastmitteln kann der Injektionsdruck in Portkathetersystemen Werte von 5 bis 10 bar erreichen [134]. Wird ein Druck von 10 bar betrachtet, entspricht dieser einer Kraft von 79 N (siehe Anhang E).

Die Abschätzung des Drucks, der auf das Septum ausgeübt wird, hängt von seiner Verformung ab. Durch Pressen in das System verringert sich die Dicke des Septums von einer Dicke von 5,5 mm zu einer Dicke von 4,5 mm. Für die Herstellung des Septums wird ein Silikon der Härte 60 Shore A ausgewählt (Silpuran[®] UR 9030/60, Wacker Chemie AG, Deutschland).

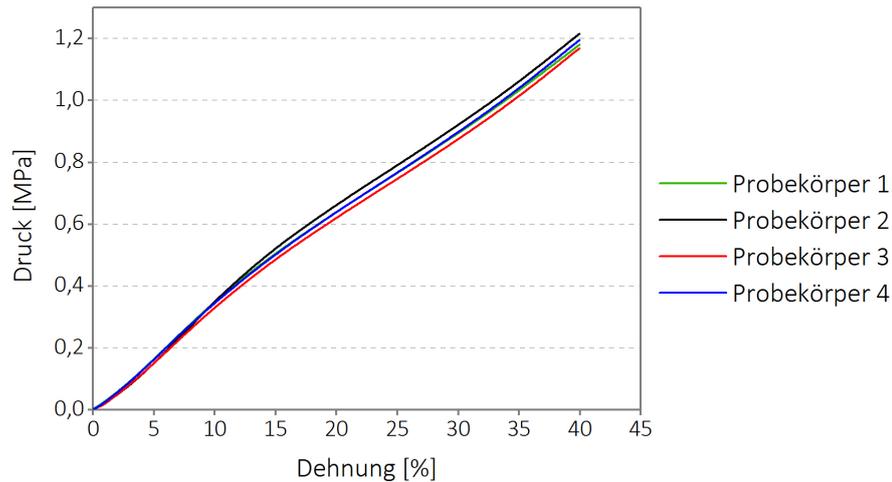


Abb. 6.10: **Druck-Dehnungs-Kurven des Silikons, welches für die Herstellung des Septums verwendet wird.** Die Prüfung wurde mit vier zylindrischen Silikonproben mit einem Durchmesser von 30 mm, einer Höhe von 15 mm und einer Prüfgeschwindigkeit von 10 mm/min durchgeführt.

Ein Druckversuch wird mit einer Standard-Zugprüfmaschine (Zwick Roell Z2.5, Deutschland) durchgeführt, und der Druckmodulus des Silikons wird folglich auf 3 MPa abgeschätzt (siehe die Druck-Dehnung-Kurven in Abbildung 6.10). Für die Prüfung gilt die Norm DIN ISO 7743 als Orientierung [73]. Anschließend wird die Kraft, die sich durch das Pressen des Septums im System ergibt, auf 45 N abgeschätzt. Die gesamte Axialkraft, die sich aus diesen zwei Komponenten ergibt, wird also auf 123 N geschätzt, was eine minimale Flächenpressung p_{min} von $2,45 \text{ N/mm}^2$ entspricht (siehe Anhang E).

Tab. 6.2: **Mechanische Werkstoffkenngrößen von Titan und Ti6Al4V.**

	Titan Grad 4	Titanlegierung Ti6Al4V
E-Modul E [GPa]	120	113,8
Poissonzahl ν [-]	0,34	0,342
Streckgrenze R_e [MPa]	600	880

Für die weitere Berechnung des Minimalwerts des Übermaßes U_{min} müssen verschiedene Werkstoffkenngrößen betrachtet werden, um die elastische Verformung der Werkstoffe während des Fügens zu betrachten. Für das Portkathetersystem kommen zwei Werkstoffe in Frage: Titan (Grad 4) und Titanlegierung, wobei die Titanlegierung als Alternative gilt, für den Fall, dass das mechanische Verhalten des Titans nicht ausreichen sollte. Als potenzielle Titanlegierung wird Ti6Al4V in Betracht gezogen. Tabelle 6.2 fasst die Werkstoffkenngrößen¹ zusammen, die für die Berechnung verwendet werden. Außerdem wird ein Sicherheitsfaktor

¹Entnommen aus: http://www.dentaurum.de/files/198-209_Titan_ZT2015_DE_LoRes.pdf (abgerufen am 03.02.2017) und <http://asm.matweb.com/search/SpecificMaterial.asp?bassnum=MTP641> (abgerufen am 03.02.2017)

von 2 berechnet (siehe Anhang E).

Diese mechanischen Kenngrößen werden auch für die Berechnung der maximalen Flächenpressung p_{max} und des Maximalwertes des Übermaßes U_{max} eingesetzt. Es muss sichergestellt, dass das Fügen des Kranzes mit der Injektionskammer keine plastische Verformung der Teile verursacht. p_{max} und U_{max} sind also abhängig von den mechanischen Werkstoffeigenschaften (hier die Streckgrenze R_e). Für die Berechnung von p_{max} wird ein Sicherheitsfaktor von 3 verwendet (siehe detaillierte Berechnung im Anhang E).

Die Ergebnisse der Berechnungen der minimalen und maximalen Werte des Übermaßes U_{min} und U_{max} für die Materialpaarungen Titan/Titan und Ti6Al4V/Ti6Al4V sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst. Es lässt sich erkennen, dass theoretisch beide Werkstoffpaarungen eingesetzt werden können. Allerdings ist der Unterschied zwischen U_{min} und U_{max} im Falle von Titan vergleichsweise klein ($34 \mu\text{m}$), was für die Fertigung der Teile anspruchsvoll wäre. Aus diesem Grund und um eine höhere Sicherheit zu generieren, wird die Titanlegierung für die Fertigung des Kranzes und der Portkammer benutzt. In diesem Fall beträgt der Unterschied zwischen U_{min} und U_{max} $62 \mu\text{m}$. Anhand dieser Ergebnisse wird schließlich ein Übermaß von $0,04 \text{ mm}$ bezogen auf den Fügedurchmesser gewählt.

Tab. 6.3: **Ergebnisse der Berechnung des Übermaßes.** Die berechneten Werte von U_{min} unterscheiden sich kaum zwischen beiden Materialpaarungen. Allerdings ist der Wert von U_{max} für die Titanlegierung Ti6Al4V deutlich höher als für Titan.

	Materialpaarung	
	Titan/Titan	Ti6Al4V/Ti6Al4V
mininales Übermaß U_{min} [mm]	0,0309	0,0311
maximales Übermaß U_{max} [mm]	0,0647	0,0931

6.3.2 Fertigung des Prototyps

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wird für die Herstellung der zwei metallischen Teile eine Titanlegierung (Ti6Al4V) ausgewählt. Der Kranz und die Injektionskammer werden im Technikum des Lehrstuhls für Medizintechnik zerspanend gefertigt und das Übermaß wird umgesetzt (siehe technische Zeichnungen in Anhang F.2.). Mit der Injektionskammer wird ein kleines Rohr – Kammerauslass – verbunden, welches einen Sicherungsring besitzt, um das Lösen des Katheterschlauchs zu verhindern. Das Zusammenfügen der zwei Teile und des Silikonseptums wird auch am Technikum des Lehrstuhls durchgeführt. Für die Herstellung des Silikonseptums wird das Material Silpuran[®] UR 9030/60 benutzt. Eine zweiteilige Pressform wird aus Aluminium gefertigt, um dem Silikon seine finale Form zu geben. Die Pressparameter des Silikons sind die gleichen wie in den vorherigen Untersuchungen und sind im Anhang C.2. detailliert aufgeführt. Die technischen Zeichnungen der Pressform sind im Anhang F.3. dokumentiert. Der Katheter wird mit verbessertem Silikon, welches im Kapitel 5 vorgestellt

wurde, hergestellt, und anschließend auf dem Kammerauslass über den Sicherungsring geschoben (siehe Abbildung 6.9). Der hergestellte Silikonschlauch wurde von der Firma Wacker Chemie AG in Burghausen, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

In einem zweiten Schritt werden die zusammgebauten Teile Kranz, Kammer, Septum und Katheter mit der Silikonummantelung überzogen. Für eine industrielle Produktion des PKS ist vermutlich eine Ummantelung mittels Spritzgussprozess die bevorzugte Methode. Dafür würde ein LSR-Silikon zum Einsatz kommen (siehe Kapitel 2.3.1). Allerdings ist die Herstellung eines Spritzgusswerkzeuges für die Herstellung eines Prototyps zu aufwendig. Aus diesem Grund wird das Portgehäuse des PKS aus einem medizinischen RTV-2 (Silupran[®] UR 3440, Wacker Chemie AG, Deutschland) gegossen. Eine dreiteilige Gussform wird als Gegenform des Portgehäuses im CAD modelliert und schließlich in Aluminium gefertigt (siehe technische Zeichnungen im Anhang F.4.). Abbildung 6.11 stellt den Zusammenbau der Gussform dar. Die detaillierten Protokolle zur Silikonvorbereitung und Vulkanisation sind im Anhang C.2. dokumentiert.

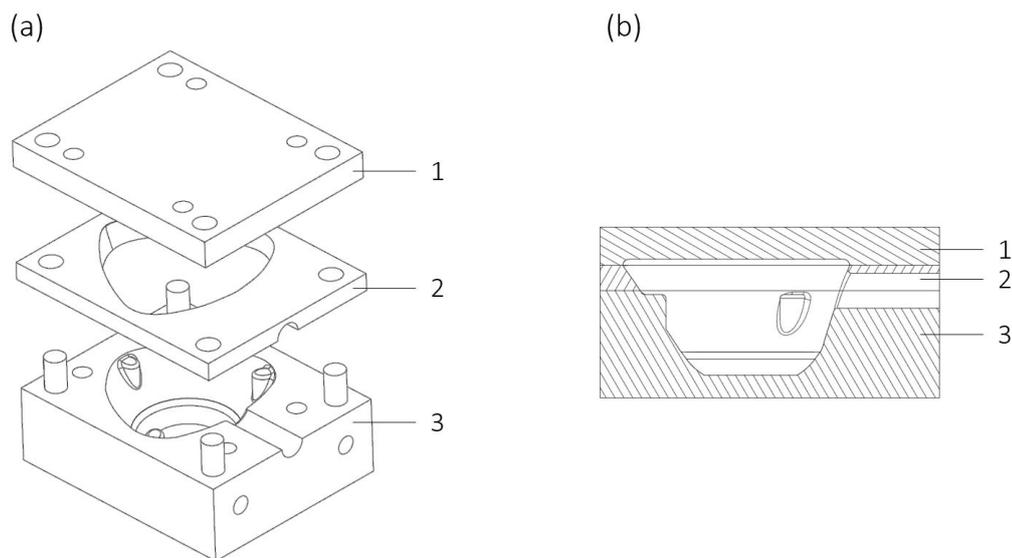


Abb. 6.11: **Gussform für die Herstellung des Portgehäuses.** (a) Explosionsansicht. (b) Zusammenbau. Die Gussform besteht aus drei Teilen. Für die Herstellung des Portgehäuses werden zunächst die zusammengefügte Injektionskammer, das Septum und der Kranz seitenverkehrt in den Boden der Gussform (3) gelegt. Der Katheter wird in einer Öffnung mit einem zusätzlichen Zentrierelement festgehalten. Der mittlere Teil der Gussform (2) schließt die Katheteröffnung. Schließlich wird die Gussform mit Silikon gefüllt und der obere Teil der Gussform (1) wird leicht gepresst und vertreibt den Überschuss an Silikon aus der Gussform.

Durch die Ummantelung der Kammer und des Katheters im Portgehäuse ist eine Abtrennung des Gehäuses mechanisch unmöglich. Allerdings ist die gute Haftung des Silikons auf der Titankammer notwendig, um die Abwesenheit von Spalten im System sicherzustellen. Um die Haftung zu steigern, werden zwei Oberflächenbehandlungen des Titans durchgeführt: Vor dem Zusammenfügen mit dem Kranz wurde die Injektionskammer sandgestrahlt. Das

Verfahren maximiert die Oberfläche, die dann in Kontakt mit Silikon kommt. Zweitens wird direkt vor dem Gießen eine Standardbehandlung durch das Pyrosil[®]-Verfahren durchgeführt. Diese Behandlung bildet eine dünne Silikatschicht auf dem Titan, erhöht seine Reaktivität und verbessert die Anbindung an der Silikonmasse [181]. Die hervorragende Haftung zwischen den zwei Werkstoffen konnte schließlich anhand des fertigen Produktes festgestellt werden.

Anschließend wird die Titandioxidbeschichtung auf dem Silikongehäuse aufgebracht. Die Beschichtung des PKS erfolgt am Institut für Plasmatechnik und Mathematik der Universität der Bundeswehr München mit den gleichen Parametern wie für die Untersuchungen im Kapitel 6.2. Abbildung 6.12 zeigt einen funktionsfähigen Prototyp des Portkathetersystems. Die Beschichtung auf dem Portgehäuse ist an den farbigen Spiegelungen gut zu erkennen.



Abb. 6.12: **Prototyp des verbesserten Portkathetersystems.** (a) Injektionskammer aus Titanlegierung. (b) Silikonsetpum. (c) Silikongehäuse mit zytokompatibler Titandioxidbeschichtung. (d) Ummantelte Verbindung zwischen der Kammer und dem Katheter. (e) Katheter aus hämokompatiblen und röntgendichtem Silikon.

Bei der Entwicklung von Portkathetersystemen wird dringend empfohlen, das gesamte Gewicht des Systems so gering wie möglich zu halten. Dadurch soll der Tragekomfort für den Patienten verbessert werden, und das Risiko von unerwünschten Bewegungen des Systems in der Gewebetasche reduziert werden. Das Gewicht des in dieser Arbeit entwickelten Systems beträgt schließlich 9,7 g. Ein Vergleich mit zwei alternativen kommerziell erhältlichen PKS in Tabelle 6.4 zeigt, dass dieses Gewicht absolut zufriedenstellend ist.

Tab. 6.4: **Gewicht verschiedener Portkathetersysteme.** Das System mit einem einteiligen Titanport hat mit 17,2 g das höchste Gewicht. Die Verwendung eines Kunststoffgehäuses reduziert das Gewicht erheblich. Das Modell mit Polysulfon bzw. des in dieser Arbeit entwickelten Systems weisen ein ähnliches Gewicht auf (9.98 g bzw. 9,7 g).

Modell	Werkstoffe	Gewicht
neues Silikonssystem	Titan und Silikon (2-teilig)	9,7 g
Port-a-cath [®] , Smiths Medical	Titan und Polysulfon (2-teilig)	9,98 g
Vital-Port [®] , Cook Medical	Titan (1-teilig)	17,2 g

Zusammenfassend bietet dieses neue System verschiedene Verbesserungen, die die hohe Komplikationsrate von klassischen Portkathetersystemen reduzieren könnten. Insbesondere wurde Silikon verwendet, um seine Eignung als implantierbares Medizinprodukt zu demonstrieren. Durch die Modifizierungen des Silikons ist es möglich, zwei Aspekte der Biokompatibilität von Portkathetersystemen zu verbessern: Ein hämokompatibler Katheterschlauch aus PEG-additiviertem Silikon wird gegen potenzielle Thrombusbildungen eingesetzt, und ein TiO₂-beschichteter Silikonport verbindet das leichte Gewicht des Silikons mit der Zytokompatibilität des Titans und kann somit die Infektionsrisiken senken.

7 Zusammenfassung

Die Biokompatibilität ist eine essenzielle Eigenschaft, die bei der Entwicklung von medizinischen Werkstoffen und Produkten im Vordergrund steht. Eine besondere Herausforderung ist die Entwicklung von hämokompatiblen Implantaten, welche langfristig in die Blutbahn eingesetzt werden, wie Katheter, Dialyseschläuche und Gefäßprothesen. Medizinisches Silikonelastomer eignet sich gut als Werkstoff für Implantate dank seiner chemischen Stabilität und Reinheit und wird bereits verbreitet in Medizinprodukte eingesetzt. Allerdings ist seine Hämokompatibilität aufgrund der fehlenden Standardisierung von geeigneten Prüfmethoden noch nicht etabliert.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein dynamisches *in vitro* Prüfsystem entwickelt, welches die Inkubation von Blut und Blutfraktionen mit Kunststoffproben unter reproduzierbaren, physiologischen Bedingungen ermöglicht, und somit die *in vivo* Situation nachbildet. Eine Besonderheit des Systems ist die Abwesenheit einer Pumpe, die eine Beschädigung der Blutzellen während der Inkubation verursacht hätte. Außerdem können in diesem System flache Werkstoffproben untersucht werden, was die Analyse von Oberflächeneigenschaften oder Werkstoffmodifizierungen deutlich vereinfacht.

Für die Hämokompatibilitätsprüfung wurden zwei Gerinnungsprozesse untersucht: die primäre Hämostase, die die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten auf Werkstoffoberflächen beschreibt, und die sekundäre Hämostase, die die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren und die Bildung von Fibrin im Blutplasma darstellt. Mithilfe des neuen Inkubationssystems konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenadhäsion stark von den Flussbedingungen abhängig ist: Unter venösen Flussbedingungen sind bis zu 10-fach mehr adhärenente Thrombozyten auf verschiedenen Werkstoffoberflächen gezählt worden als unter statischen Flussbedingungen. Für die Untersuchung der primären Hämostase ist also eine dynamische Prüfung zu empfehlen. Im Gegensatz dazu haben die Flussbedingungen keine Auswirkung auf die Ergebnisse der sekundären Hämostase gezeigt. Als Konsequenz wurde eine differenzierte Prüfungsanalytik für die weitere Untersuchung der Hämokompatibilität von Silikonelastomeren etabliert.

Zwei Eigenschaften von Werkstoffoberflächen können ihre Hämokompatibilität beeinflussen: ihre chemische Zusammensetzung und ihre Rauheit. Silikonelastomere zeichnen sich durch eine besonders niedrige Oberflächenspannung auf. Es wird vermutet, dass die Hydrophobie der Silikonoberfläche eine unkontrollierte Proteinadsorption und eine starke Adhäsion von Blutzellen verursacht. Nachdem Mikrostrukturen verschiedener Größen im Silikonelastomer zusätzlich aufgebracht wurden, hat sich sowohl die Hydrophobie der Oberfläche als auch die Thrombozytenadhäsion deutlich erhöht. Dieser thrombogene Effekt der Mikrostruktur konnte ebenso im Fall eines hydrophileren Werkstoffs (POM) verifiziert werden. Allerdings

blieben die erreichten Werte der Thrombozytenadhäsion auf den strukturierten POM-Proben deutlich niedriger als auf Silikonelastomer. Dies zeigt, dass die Rauheit der Werkstoffe zwar eine Rolle spielt, aber im Vergleich zum Einfluss der Oberflächenchemie minimal ist. Um die Rauheit zu minimieren, wurden in einem nächsten Schritt extrudierte Silikonproben mit anderen extrudierten medizinischen Elastomeren (TPE-U, TPE-S und PVC-P) hinsichtlich ihrer Hämokompatibilität verglichen. Silikonelastomer erwies sich aufgrund der ausgeprägten Thrombozytenadhäsion vergleichsweise thrombogen. Die sekundäre Hämostase hingegen wird im Kontakt mit Silikonelastomer nicht sonderlich aktiviert.

Nach dieser vollständigen Beurteilung der Hämokompatibilität von Silikonelastomer wurden chemische Modifizierungen angegangen, um die Oberfläche protein- und thrombozytenabweisend zu gestalten. Für diesen Zweck kam Polyethylenglykol (PEG) als Beschichtung und als Additiv zum Einsatz. Die Modifizierungen wurden anhand folgender Kriterien bewertet:

- Verbesserte *in vitro* Hämokompatibilität und Reduktion der Fibrinogenadsorption
- Chemische Stabilität über einen Zeitraum von mindestens 60 Tagen
- Keine toxische Wirkung
- Sterilisierbarkeit
- Keine Einschränkung der mechanischen Eigenschaften
- Einfache Verarbeitung

Als erfolgreichste Modifizierung hat sich das PEG-basierte Additiv erwiesen. Der Additivgehalt wurde mit 4 % als optimaler Kompromiss zwischen der Verbesserung der Hämokompatibilität (Reduktion der Thrombozytenadhäsion von 75 % im Vergleich zum unbehandelten Silikonelastomer) und der leichten Abnahme der mechanischen Eigenschaften optimiert. Schließlich wurden Schläuche aus dem additivierten Silikonelastomer extrudiert und geprüft. Zug- und Berstprüfungen konnten nachweisen, dass die Schläuche die Anforderungen für die Anwendung als Katheter erfüllen.

Als Letztes wurde ein vollständig implantierbares Portkathetersystem gefertigt. Neben der praktischen Umsetzung des hämokompatiblen Silikonelastomers in einem Medizinprodukt rückte dieses Anwendungsbeispiel die Frage der Zytokompatibilität von Silikonelastomeren in den Vordergrund: Ein Teil dieses Produkts, welches aus Silikonelastomer besteht, wird in eine subkutane Gewebetasche implantiert. Wie im Falle der Hämokompatibilität wird hier eine funktionelle Silikonoberfläche benötigt, die verbesserte Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe aufweist. Die Verbesserung der Zytokompatibilität dieses Silikonteils wurde mit einer Titandioxidbeschichtung realisiert. Zusätzliche Untersuchungen der Beschichtung haben gezeigt, dass die *in vitro* Zytokompatibilität des Silikonelastomers durch diese Beschichtung deutlich verbessert wird (4-fache Steigerung des Zellwachstums im Vergleich zum unbehandelten Silikonelastomer). Schließlich demonstriert das Anwendungsbeispiel, wie durch gezielte Modifizierungen von Silikonelastomeren die Biokompatibilität von implantierbaren Medizinprodukten gesteigert werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] Abbasi, F., Mirzadeh, H., Katbab, A.A.: Modification of polysiloxane polymers for biomedical applications: a review. *Polymer International*, 2001, 50 (12), 1279–1287
- [2] Al Salloum, H., Saunier, J., Tfayli, A., et al.: Studying DEHP migration in plasticized PVC used for blood bags by coupling Raman confocal microscopy to UV spectroscopy. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 61, 56–62
- [3] Alkhamis, T., Beissinger, R., Chediak, J.: Effect of hirudin on platelet deposition to an artificial surface during low-stress shear flow of whole blood. *Biomaterials*, 1993, 14 (11), 865–870
- [4] Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T.: Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 2008, 20 (2), 86–100
- [5] 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*, 1996, 7 (2), 159–169
- [6] Andrade, J., Coleman, D., Didisheim, P., et al.: Blood-materials interactions - 20 years of frustration. *ASAIO Journal*, 1981, 27 (1), 659–662
- [7] Arima, Y., Iwata, H.: Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 2007, 28 (20), 3074–3082
- [8] Arima, Y., Iwata, H.: Preferential adsorption of cell adhesive proteins from complex media on self-assembled monolayers and its effect on subsequent cell adhesion. *Acta biomaterialia*, 2015, 26 (1), 72–81
- [9] Arima, Y., Toda, M., Iwata, H.: Complement activation on surfaces modified with ethylene glycol units. *Biomaterials*, 2008, 29 (5), 551–560
- [10] Arkles, B.: *Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silane Surface Modification*. Gelest Inc., Technische Dokumentation, 2006
- [11] ASM Materials for Medical Devices Database Committee: Polyoxymethylene Copolymer. In: *Materials and Coatings For Medical Devices: Cardiovascular*, ASM International, 2009, 265–268
- [12] Aziz, T., Waters, M., Jagger, R.: Surface modification of an experimental silicone rubber maxillofacial material to improve wettability. *Journal of dentistry*, 2003, 31 (3), 213–216
- [13] Backovic, A., Huang, H.L., Del Frari, B., et al.: Identification and dynamics of proteins adhering to the surface of medical silicones in vivo and in vitro. *Journal of proteome research*, 2007, 6 (1), 376–381
- [14] Backovic, A., Wolfram, D., Del-Frari, B., et al.: Simultaneous analysis of multiple serum proteins adhering to the surface of medical grade polydimethylsiloxane elastomers. *Journal of immunological methods*, 2007, 328 (1), 118–127
- [15] Bailly, A., Lautier, A., Laurent, A., et al.: Thrombosis of angiographic catheters in humans: experimental study. *The International journal of artificial organs*, 1999, 22 (10), 690–700
- [16] Bartzoka, V., McDermott, M.R., Brook, M.A.: Protein-Silicone Interactions. *Advanced Materials*, 1999, 11 (3), 257–259
- [17] Baskin, J.L., Pui, C.H., Reiss, U., et al.: Management of occlusion and thrombosis associated with long-term indwelling central venous catheters. *The Lancet*, 2009, 374 (9684), 159–169
- [18] Basmadjian, D., Sefton, M., Baldwin, S.: Coagulation on biomaterials in flowing blood: some theoretical considerations. *Biomaterials*, 1997, 18 (23), 1511–1522
- [19] Batich, C., DePalma, D., Marotta, J., et al.: Silicone degradation reactions. In: M. Potter, N.R. Rose (Hg.), *Immunology of Silicones*, Springer Berlin Heidelberg, 1996, 13–23
- [20] Baumgartner, H., Sakariassen, K.: Factors controlling thrombus formation on arterial lesions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1985, 454 (1), 162–177

- [21] Bautista, F., Gómez-Chacón, J., Costa, E., et al.: Retained intravascular fragments after removal of indwelling central venous catheters: a single institution experience. *Journal of pediatric surgery*, 2010, 45 (7), 1491–1495
- [22] Bayer MaterialScience AG, Epurex Films GmbH & Co. KG: Technische Daten PLATILON® U. Bomlitz, Deutschland, 2016
- [23] Bellavite, P., Andrioli, G., Guzzo, P., et al.: A Colorimetric Method for the Measurement of Platelet Adhesion in Microtiter Plates. *Analytical Biochemistry*, 1994, 216 (2), 444–450
- [24] Berry, M.G., Davies, D.M.: Breast augmentation: Part I—A review of the silicone prosthesis. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2010, 63 (11), 1761–1768
- [25] Bhattacharya, S., Datta, A., Berg, J.M., et al.: Studies on surface wettability of poly (dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. *Journal of microelectromechanical systems*, 2005, 14 (3), 590–597
- [26] Bélanger, M.C., Marois, Y.: Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review. *Journal of biomedical materials research*, 2001, 58 (5), 467–477
- [27] Bodas, D., Khan-Malek, C.: Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 123 (1), 368–373
- [28] Boudot, C., Bocoz, A., Düregger, K., et al.: A novel blood incubation system for the in-vitro assessment of interactions between platelets and biomaterial surfaces under dynamic flow conditions: The Hemocoater. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104 (10), 2430–2440
- [29] Boudot, C., Kühn, M., Kühn-Kauffeldt, M., et al.: Vacuum arc plasma deposition of thin titanium dioxide films on silicone elastomer as a functional coating for medical applications. *Materials Science and Engineering C*, 2017, 74, 508–514
- [30] Boudot, C., Recht, S., Eblenkamp, M., et al.: Protein Adsorption and Adhesion of Blood Platelets on Silicone Rubber under Static and Dynamic Flow Conditions. *IFMBE Proceedings*, 2015, 45, 541–544
- [31] Braley, S.: The silicones as subdermal engineering materials. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1968, 146, 148–157
- [32] Brash, J., Scott, C., ten Hove, P., et al.: Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: role of the contact and fibrinolytic systems. *Blood*, 1988, 71 (4), 932–939
- [33] Braune, S., Lange, M., Richau, K., et al.: Interaction of thrombocytes with poly (ether imide): The influence of processing. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2010, 46 (2-3), 239–250
- [34] Braune, S., Grunze, M., Straub, A., et al.: Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials? *Biointerphases*, 2013, 8 (33), 33
- [35] Briehn, C.: Silicone rubber - The elastomer of choice for medical applications. In: *Fachtagung Kunststoffe Medical*, Ulm, 2011,
- [36] Briehn, C.: Persönliche Mitteilung im Rahmen einer gemeinsamen wissenschaftlichen Publikation, 2016
- [37] Briquet, F. and Colas, A., Thomas, X.: Silikone in der Medizin. *Techn. Ber.*, Dow Corning Corp., 1996
- [38] Bruus, H.: *Theoretical microfluidics*. Oxford Univ. Press, 2009
- [39] Buerger, T., Meyer, F., Ridwelski, K., et al.: Komplikationen zentralvenöser Ports: Erfahrungen nach über 1200 Implantationen. *Zeitschrift für Herz-, Thorax-und Gefäßchirurgie*, 1998, 12 (1), 48–53
- [40] Burkhart, J., Leimbach, R., Nagl, D., et al.: Blutpräparate und therapeutische Anwendung (Hämotherapie). In: E. Wintermantel, S. Ha (Hg.), *Medizintechnik*, 5. Auflage, Springer-Verlag, 2009, 473–512
- [41] Busse, R.: Kreislauf. In: R. Schmidt, F. Lang (Hg.), *Physiologie des Menschen*, 30. Auflage, Springer Verlag, 2007, 618–680

- [42] Butler, J.E., Lü, E.P., Navarro, P., et al.: The adsorption of proteins on a polydimethylsiloxane elastomer (PEP) and their antigenic behavior. In: *Immunology of Silicones*, Springer Berlin Heidelberg, 1996, 5–84
- [43] Cao, L., Chang, M., Lee, C.Y., et al.: Plasma-deposited tetraglyme surfaces greatly reduce total blood protein adsorption, contact activation, platelet adhesion, platelet procoagulant activity, and in vitro thrombus deposition. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, 81 (4), 827–837
- [44] Cao, L., Sukavaneshvar, S., Ratner, B.D., et al.: Glow discharge plasma treatment of polyethylene tubing with tetraglyme results in ultralow fibrinogen adsorption and greatly reduced platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 79 (4), 788–803
- [45] Caro, C., Pedley, T., Schroter, R., et al.: *The mechanics of the circulation*. Oxford University Press, 1978
- [46] Castner, D.G., Ratner, B.D.: *Biomedical surface science: Foundations to frontiers*. *Surface Science*, 2002, 500 (1), 28–60
- [47] Cáceres-Lóriga, F.M., Pérez-López, H., Santos-Gracia, J., et al.: Prosthetic heart valve thrombosis: pathogenesis, diagnosis and management. *International journal of cardiology*, 2006, 110 (1), 1–6
- [48] Celanese Corp.: *Data Sheet Hostaform® MT24U01*. Irving, USA, 2016
- [49] Chandler, A.B.: In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. *Laboratory Investigation*, 1958, 7 (2), 110–114
- [50] Chen, H., Chen, H., Huang, Z., et al.: Design and hemocompatibility of the micro–nano multiscale patterns of TiO₂ nanowires/carbon composite films. *Materials Letters*, 2014, 124, 275–278
- [51] Chen, H., Song, W., Zhou, F., et al.: The effect of surface microtopography of poly (dimethylsiloxane) on protein adsorption, platelet and cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71 (2), 275–281
- [52] Chen, H., Yuan, L., Song, W., et al.: Biocompatible polymer materials: role of protein–surface interactions. *Progress in Polymer Science*, 2008, 33 (11), 1059–1087
- [53] Chen, H., Zhang, Z., Chen, Y., et al.: Protein repellent silicone surfaces by covalent immobilization of poly (ethylene oxide). *Biomaterials*, 2005, 26 (15), 2391–2399
- [54] Chen, H., McClelland, A., Chen, Z., et al.: Solventless adhesive bonding using reactive polymer coatings. *Analytical chemistry*, 2008, 80 (11), 4119–4124
- [55] Chen, L., Han, D., Jiang, L.: On improving blood compatibility: from bioinspired to synthetic design and fabrication of biointerfacial topography at micro/nano scales. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 2011, 85 (1), 2–7
- [56] Chen, S., Li, L., Zhao, C., et al.: Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer*, 2010, 51 (23), 5283–5293
- [57] Cikirikcioglu, M., Sedelnikov, N., Da Cruz, S., et al.: Titanium coating improves neo-endothelialisation of ePTFE grafts. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 2006, 54 (1), 61
- [58] Cohen Addad, J.: *NMR Approach to Siloxane Properties: Melts, Gels, Silica, Mixtures*. In: S. Clarson, J. Semlyen (Hg.), *Siloxane Polymers*, Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993, 511–566
- [59] Colas, A., Curtis, J.: *Silicones*. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 617–634
- [60] Collier, T.O., Anderson, J.M.: Protein and surface effects on monocyte and macrophage adhesion, maturation, and survival. *Journal of biomedical materials research*, 2002, 60 (3), 487–496
- [61] Corder, G., Foreman, D.: *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. Joh, 2009
- [62] Dadsetan, M., Jones, J.A., Hiltner, A., et al.: Surface chemistry mediates adhesive structure, cytoskeletal organization, and fusion of macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, 71 (3), 439–448

- [63] De Mel, A., Rafei, Y., Cousins, B.G., et al.: Modifying biomaterial surfaces to optimise interactions with blood. In: R. Williams (Hg.), *Surface modification of biomaterials*, Woodhead Publishing, 2011, 255–283
- [64] De Nardo, L., Raffaini, G., Ganazzoli, F., et al.: Techniques for analyzing biomaterial surface structure, morphology and topography. In: R. Williams (Hg.), *Metal Surface Oxidation and Surface Interaction*, Woodhead Publishing, 2011, 102–142
- [65] De Smet, N., Rymarczyk-Machal, M., Schacht, E.: Modification of polydimethylsiloxane surfaces using benzophenone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2009, 20 (14), 2039–2053
- [66] De Smet, N., Rymarczyk-Machal, M., Schacht, E.: Plasma-induced surface modification of polydimethylsiloxane aimed at reducing salt and protein deposition. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2011, 22 (18), 2457–2473
- [67] Delamarche, E., Donzel, C., Kamounah, F.S., et al.: Microcontact printing using poly (dimethylsiloxane) stamps hydrophilized by poly (ethylene oxide) silanes. *Langmuir*, 2003, 19 (21), 8749–8758
- [68] Desai, M., Seifalian, A.M., Hamilton, G.: Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2011, 40 (2), 394–398
- [69] DIN EN ISO 10555-1: Intravaskuläre Katheter – Sterile Katheter zur einmaligen Verwendung – Teil 1: Allgemeine Anforderungen. Deutsches Institut für Normung e.V., 2011
- [70] DIN EN ISO 10993-1: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 1: Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems. Deutsches Institut für Normung e.V., 2009
- [71] DIN EN ISO 10993-4: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 4: Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut. Deutsches Institut für Normung e.V., 2009
- [72] DIN EN ISO 10993-5: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität. Deutsches Institut für Normung e.V., 2009
- [73] DIN ISO 7743: Elastomere oder thermoplastische Elastomere – Bestimmung des Druckverformungsverhaltens. Deutsches Institut für Normung e.V., 2004
- [74] Ding, M., Xu, S., Zhang, J., et al.: Trauma to erythrocytes induced by long term in vitro pumping using a roller pump. *Cell Biology International*, 2007, 31 (8), 763–767
- [75] Dow Chemical Company: Data Sheet Dowlex™ 2107GC. Midland, USA, 2016
- [76] El-Zaim, H. S., Hegggers, J.: Silicones for pharmaceutical and biomedical applications. In: S. Dumitriu (Hg.), *Polymeric materials*, Marcek Dekker, Inc., 2002, 79–89
- [77] Encinas, N., Dillingham, R.G., Oakley, B.R., et al.: Atmospheric pressure plasma hydrophilic modification of a silicone surface. *The Journal of Adhesion*, 2012, 88, 321–336
- [78] Fan, H., Chen, P., Qi, R., et al.: Greatly improved blood compatibility by microscopic multiscale design of surface architectures. *Small*, 2009, 5 (19), 2144–2148
- [79] Faucheux, N., Schweiss, R., Lützow, K., et al.: Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*, 2004, 25 (14), 2721–2730
- [80] Faxälv, L., Tengvall, P., Lindahl, T.L.: Imaging of blood plasma coagulation and its propagation at surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 85 (4), 1129–1134
- [81] Felske, A., Plieth, W.J.: Raman spectroscopy of titanium dioxide layers. *Electrochimica Acta*, 1989, 34 (1), 75–77
- [82] Field, A.: *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. Sage, 2013
- [83] Fischer, R., Steinert, S., Fröber, U., et al.: Cell cultures in microsystems: biocompatibility aspects. 2010, *Biotechnology and bioengineering*, 108 (3), 687–693
- [84] Franck, A.: *Kunststoff-Kompandium*, 5. Auflage. Vogel Verlag, 2000
- [85] Fredrickson, B., McIntire, L.: Rheology of thrombosis. In: R. Colman, J. Hirsh, V. Marder, A. Clowes, J. George (Hg.), *Hemostasis and thrombosis*, 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 625–638

- [86] Fung, Y.: Biomechanics, 2nd edition. Springer, 1993
- [87] Gao, Y., Liu, H.: Preparation and catalytic property study of a novel kind of suspended photocatalyst of TiO₂-activated carbon immobilized on silicone rubber film. *Materials Chemistry and Physics*, 2005, 92 (2), 604–608
- [88] Gatt, A., van Veen, J.J., Woolley, A.M., et al.: Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro. *Thromb Haemost*, 2008, 100 (2), 350–355
- [89] Girshevitz, O., Nitzan, Y., Sukenik, C.N.: Solution-deposited amorphous titanium dioxide on silicone rubber: a conformal, crack-free antibacterial coating. *Chemistry of Materials*, 2008, 20 (4), 1390–1396
- [90] Glasmacher, B., Krolitzki, B., Müller, M., et al.: Blutverträglichkeit von Kunststoffen. In: *Kunststoffe un der Medizintechnik*, VDI Verlag, 2012, 273–289
- [91] Golas, A., Parhi, P., Dimachkie, Z.O., et al.: Surface-energy dependent contact activation of blood factor XII. *Biomaterials*, 2010, 31 (6), 1068–1079
- [92] Goltz, J.P., Scholl, A., Ritter, C.O., et al.: Peripherally placed totally implantable venous-access port systems of the forearm: clinical experience in 763 consecutive patients. *Cardiovascular and interventional radiology*, 2010, 33 (6), 1159–1167
- [93] Gomez-Suarez, C., Busscher, H., van der Mei, H.: Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid Interfaces. *Applied and environmental microbiology*, 2001, 67 (6), 2531–2537
- [94] Goodman, P.D., Barlow, E.T., Crapo, P.M., et al.: Computational model of device-induced thrombosis and thromboembolism. *Annals of biomedical engineering*, 2005, 33 (6), 780–797
- [95] Goodwin, S., Yoon, H., Chen, G., et al.: Intense inflammatory reaction to heparin polymer coated intravascular Palmaz stents in porcine arteries compared to uncoated Palmaz stents. *Cardiovascular and interventional radiology*, 2003, 26 (2), 158–167
- [96] Gorbet, M.B., Sefton, M.V.: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 2004, 25 (26), 5681–5703
- [97] Gouzy, M.F., Sperling, C., Salchert, K., et al.: In vitro blood compatibility of polymeric biomaterials through covalent immobilization of an amidine derivative. *Biomaterials*, 2004, 25 (17), 3493–3501
- [98] Goyal, M.: *Biofluid dynamics of human body systems*. Apple Academic Press, 2013
- [99] Grainger, D.W., Knutson, K., Kim, S.W., et al.: Poly (dimethylsiloxane)-poly (ethylene oxide)-heparin block copolymers II: Surface characterization and in vitro assessments. *Journal of biomedical materials research*, 1990, 24 (2), 403–431
- [100] Grainger, D.W., Okano, T., Kim, S.W., et al.: Poly (dimethylsiloxane)-poly (ethylene oxide)-heparin block copolymers III: Surface and bulk compositional differences. *Journal of biomedical materials research*, 1990, 24 (5), 547–571
- [101] Grainger, D., Kim, S., Feijen, J.: Poly (dimethylsiloxane)-poly (ethyleneoxide)-heparin block copolymers. I. Synthesis and characterization. *Journal of biomedical materials research*, 1988, 22 (3), 231–249
- [102] Groeger, J.S., Lucas, A.B., Thaler, H.T., et al.: Infectious morbidity associated with long-term use of venous access devices in patients with cancer. *Annals of Internal Medicine*, 1993, 19 (12), 1168–1174
- [103] Groth, T., Vassiliepp, C., Wolf, H., et al.: Development of a new dynamic method for quantitative evaluation of in vitro hemocompatibility of biomedical materials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1992, 3 (4), 285–300
- [104] Ha, S., Wintermantel, E., Maier, G.: *Biokompatible Polymere*. In: *Medizintechnik - Life Science Engineering*, 5. Auflage, Springer Verlag, 2009, 219–268
- [105] Haberbauer, H., Bodenstein, F.: Verbindungselemente- Reibschlussverbindung- Pressverbindung. In: Haberbauer, H., Bodenstein, F. (Hg.), *Maschinenelemente- Gestaltung, Berechnung, Anwendung*, Springer Berlin Heidelberg, 2011, 127–138
- [106] Hacking, S., Khademhosseini, A.: Cells and surfaces in-vitro. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 617–634

- [107] Haeder, L., Jähne, J.: Indikation, Technik und Komplikationen der Portimplantation. *Der Chirurg*, 2013, 84 (7), 572–579
- [108] Haindl, H.: Technische Komplikationen. In: H. Haindl, H. Müller, E. Schmoll (Hg.), *Portkathetersysteme: praxisnahe Information zu Indikationen, Implantationstechnik, Handhabung*, Springer, 2013, 169–177
- [109] Hanaor, D.A., Sorrell, C.C.: Review of the anatase to rutile phase transformation. *Journal of Materials science*, 2011, 46 (4), 855–874
- [110] Hanke, D.: Silikon- ein Werkstoff mit Zukunft - Verarbeitung und Technologie. In: *Kunststoffe in der Medizintechnik*, Bad Neuenahr, 2002, 149–153
- [111] Hanson, S., Ratner, B.: Evaluation of blood-materials interactions. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd edition, Academic Press, San Diego, 2004, 367–378
- [112] Harboe, M.: A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 1959, 11 (1), 66–70
- [113] Harker, L., Slichter, S.: Arterial and venous thromboembolism: kinetic characterization and evaluation of therapy. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*, 1974, 31 (2), 188–203
- [114] Harmand, M., Briquet, F.: In vitro comparative evaluation under static conditions of the hemocompatibility of four types of tubing for cardiopulmonary bypass. *Biomaterials*, 1999, 20, 1561–1571
- [115] Harrison, P., Mackie, I., Mumford, A., et al.: Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *British journal of haematology*, 11, 155 (1), 30–44
- [116] Hashi, C., Derugin, N., Janairo, R., et al.: Antithrombogenic Modification of Small-Diameter Microfibrous Vascular Grafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2010, 30 (8), 1621–1627
- [117] Haycox, C.L., Ratner, B.D.: In vitro platelet interactions in whole human blood exposed to biomaterial surfaces: insights on blood compatibility. *Journal of biomedical materials research*, 1993, 27 (9), 1181–1193
- [118] He, J., Zhou, W., Zhou, X., et al.: The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. *Journal of materials science: materials in medicine*, 2008, 19 (11), 3465–3472
- [119] Heath, D.E., Cooper, S.: *Polymers: Basic Principles*. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 64–79
- [120] Heath, D.E., Cooper, S.: *Polyurethanes*. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 79–82
- [121] Hegggers, J., Kossovsky, N., Parsons, R., et al.: Biocompatibility of silicone implants. *Annals of plastic surgery*, 1983, 11 (1), 38–45
- [122] Heibl, C., Trommet, V., Burgstaller, S., et al.: Complications associated with the use of Port-a-Caths in patients with malignant or haematological disease: a single-centre prospective analysis. *European journal of cancer care*, 2010, 19 (5), 676–681
- [123] Hemker, H.C., Al Dieri, R., De Smedt, E., et al.: Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*, 2006, 96 (5), 553–61
- [124] Hemker, H., Beguin: Endogenous thrombin potential. In: J. Jespersen, R. Bertina, F. Haverkate (Hg.), *Laboratory techniques in thrombosis—a manual*, Springer Netherlands, 1999, 63–78
- [125] Herminghaus, S.: Roughness-induced non-wetting. *EPL (Europhysics Letters)*, 2000, 52 (2), 165–170
- [126] Hertle, M.: *Plasmabehandlung und Funktionalisierung silikonelastomerer Oberflächen und deren Einfluss auf die Zytokompatibilität*, Unveröffentlichte Semesterarbeit (Betreuer: Boudot, C.), Lehrstuhl für Medizintechnik, Technische Universität München, Garching, 2014
- [127] Hong, S.M., Kim, S.H., Kim, J.H., et al.: Hydrophilic surface modification of PDMS using atmospheric RF plasma. *Journal of physics: conference series*, 2006, 34 (1), 656

- [128] Hron, P.: Hydrophilisation of silicone rubber for medical applications. *Polymer international*, 2003, 52 (9), 1531–1539
- [129] Hron, P., Slechtova, J., Smetana, K., et al.: Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials: IX. Composites containing powdery polyacrylamide hydrogel. *Biomaterials*, 1997, 18 (15), 1069–1073
- [130] Hulander, M., Lundgren, A., Faxälv, L., et al.: Gradients in surface nanotopography used to study platelet adhesion and activation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 110 (1), 261–269
- [131] Jablon, L.K., Ugolini, K.R., Nahmias, N.C.: Cephalic vein cut-down verses percutaneous access: a retrospective study of complications of implantable venous access devices. *The American journal of surgery*, 2006, 192 (1), 63–67
- [132] Jackson, C.: Antithrombin, Heparinkofaktor II und Protein-C-Inhibitor. In: B. Pötzsch, K. Madlener (Hg.), *Hämostaseologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 259–266
- [133] Jansen, P., van Oeveren, W., Capel, A., et al.: In vitro haemocompatibility of a novel bioprosthetic total artificial heart. *Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2012, 41 (6), e166–e172
- [134] Janssen, R., Haindl, H.: Technische Forderungen an Portkathetersysteme. In: H. Haindl, H. Müller, E. Schmoll (Hg.), *Portkathetersysteme: praxisnahe Information zu Indikationen, Implantationstechnik, Handhabung*, Springer, 2013, 169–177
- [135] Johnston, E.E., Bryers, J.D., Ratner, B.D.: Plasma deposition and surface characterization of oligoglyme, dioxane, and crown ether nonfouling films. *Langmuir*, 2005, 21 (3), 870–881
- [136] Joner, M., Finn, A., Farb, A., et al.: Pathology of drug-eluting stents in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 48 (1), 193–202
- [137] Jukarainen, H.J., Clarson, S.J., Seppälä, J.V., et al.: Block and graft copolymers of poly (ethylene glycol) and poly (dimethylsiloxane) for blood contacting biomedical materials applications. *Silicon*, 2012, 4 (4), 231–238
- [138] Jung, F., Braune, S., Lendlein, A.: Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013, 53 (1-2), 97–115
- [139] Kaiser, W.: *Kunststoffchemie für Ingenieure*, 3. Auflage. Hanser Verlag, 2011
- [140] Kalman, P., McCullough, D., Ward, C.: Evacuation of microscopic air bubbles from Dacron reduces complement activation and platelet aggregation. *Journal of vascular surgery*, 1990, 11 (4), 591–598
- [141] Karakoy, M., Gultepe, E., Pandey, S., et al.: Silane surface modification for improved bioadhesion of esophageal stents. *Applied surface science*, 2014, 311, 684–689
- [142] Kasemo, B.: Biological surface science. *Surface Science*, 2002, 500 (1), 656–677
- [143] Kastrup, C., Shen, F., Runyon, M., et al.: Characterization of the threshold response of initiation of blood clotting to stimulus patch size. *Biophysical journal*, 2007, 93 (8), 2969–2977
- [144] Kealey, C., Whelan, S., Chun, Y., et al.: In Vitro Hemocompatibility of Thin Film Nitinol In Stenotic Flow Conditions. *Biomaterials*, 2010, 31 (34), 8864–8871
- [145] Keselowsky, B.G., Collard, D.M., García, A.J.: Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 66 (2), 247–259
- [146] Keselowsky, B.G., Collard, D.M., Garcia, A.J.: Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*, 2004, 25 (28), 5947–5954
- [147] Kühn, M.: Persönliche Mitteilung, 09.08.2017, 2017
- [148] Khorasani, M.T., MoemenBellah, S., Mirzadeh, H., et al.: Effect of surface charge and hydrophobicity of polyurethanes and silicone rubbers on L929 cells response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, 51 (2), 112–119
- [149] Kidambi, S., Udpa, N., Schroeder, S.A., et al.: Cell adhesion on polyelectrolyte multilayer coated polydimethylsiloxane surfaces with varying topographies. *Tissue engineering*, 2007, 13 (8), 2105–2117

- [150] Kidoaki, S., Matsuda, T.: Adhesion forces of the blood plasma proteins on self-assembled monolayer surfaces of alkanethiolates with different functional groups measured by an atomic force microscope. *Langmuir*, 1999, 15 (22), 7639–7646
- [151] Klaus, S., Paul, R., Mottaghy, K., et al.: Investigation of flow and material induced hemolysis with a Couette type high shear system. *Materials Science & Engineering Technology*, 2001, 32 (12), 922–925
- [152] Kobayashi, T., Yokota, T., Kato, R., et al.: Surface modification of silicone medical materials by plasma-based ion implantation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2007, 257 (1), 128–131
- [153] Kock, H.J., Pietsch, M., Krause, U., et al.: Implantable vascular access systems: experience in 1500 patients with totally implanted central venous port systems. *World journal of surgery*, 1998, 22 (1), 12–16
- [154] Koh, L.B., Rodriguez, I., Venkatraman, S.S.: A novel nanostructured poly (lactic-co-glycolic-acid)-multi-walled carbon nanotube composite for blood-contacting applications: Thrombogenicity studies. *Acta biomaterialia*, 2009, 5 (9), 3411–3422
- [155] Koh, L., Rodriguez, I., Venkatraman, S.: The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomaterials*, 2010, 31 (7), 1533–1545
- [156] Kokubo, T., Takadama, H.: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006, 27 (15), 2907–2915
- [157] Kommireddy, D., Patel, A., Shutava, T., et al.: Layer-by-layer assembly of TiO₂ nanoparticles for stable hydrophilic biocompatible coatings. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2005, 5 (7), 1081–1087
- [158] Koutsiaris, A., Tachmitzi, S., Batis, N.: Wall shear stress quantification in the human conjunctival pre-capillary arterioles in vivo. *Microvascular Research*, 2013, 85, 34–39
- [159] Kraiburg TPE: Data Sheet Thermolast® M MC/tl. Waldkraiburg, Deutschland, 2014
- [160] Lamba, N.M.K., Baumgartner, J.N., Cooper, S.L.: The influence of thrombus components in mediating bacterial adhesion to biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2000, 11 (11), 1227–1237
- [161] Lamba, N.M.K., Cooper, S.L.: Interaction of blood with artificial surfaces. In: R. Colman, J. Hirsh, V. Marder, A. Clowes, J. George (Hg.), *Hemostasis and Thrombosis - Basic Principles and Clinical Practice*. 4th edition, Lippincott William and William, 2001, 661–672
- [162] Lambrecht, J., Wolf, H., Gerlach, E.: Chemische Eigenschaften von Silikonelastomeren. In: ETG Fachbericht 93, Silikonelastomere: Werkstoffe für Kabelgarnituren, Isolatoren, Überspannungsableiter, VDE-Verlag, 2003, 17–28
- [163] Langer, H., Gawaz, M.: Thrombozytenadhäsion und-aggregation. In: B. Pötzsch, K. Madlener (Hg.), *Hämostaseologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 61–65
- [164] Larena-Avellaneda, A., Debus, E.S., Siegel, R., et al.: Die Silikon-beschichtete Polyester-Prothese. *Gefäßchirurgie*, 2004, 9 (2), 105–110
- [165] Lee, J.H., Lee, H.B.: Platelet adhesion onto wettability gradient surfaces in the absence and presence of plasma proteins. *Journal of biomedical materials research*, 1998, 41 (2), 304–311
- [166] Leininger, R., Mirkovitch, V., Peters, A., et al.: Change in properties of plastics during implantation. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs*, 1964, 10 (1), 320–322
- [167] Li, J., Yang, P., Zhang, K., et al.: Preparation of SiO₂/TiO₂ and TiO₂/TiO₂ micropattern and their effects on platelet adhesion and endothelial cell regulation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2013, 307, 575–579
- [168] Li, M., Neoh, K.G., Xu, L.Q., et al.: Surface modification of silicone for biomedical applications requiring long-term antibacterial, antifouling, and hemocompatible properties. *Langmuir*, 2012, 28 (47), 16408–16422
- [169] Li, S., Henry, J.J.: Nonthrombogenic approaches to cardiovascular bioengineering. *Annual review of biomedical engineering*, 2011, 13, 451–475

- [170] Lin, C., Yen, S.: Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. *Materials Science and Engineering: C*, 2006, 26 (1), 54–64
- [171] Lin, J.C., Chuang, W.H.: Synthesis, surface characterization, and platelet reactivity evaluation for the self-assembled monolayer of alkanethiol with sulfonic acid functionality. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 51 (3), 413–423
- [172] Lokich, J.J., Bothe, A., Benotti, P., et al.: Complications and management of implanted venous access catheters. *Journal of Clinical Oncology*, 1985, 3 (5), 710–717
- [173] Loudon, C., Tordesillas, A.: The use of the dimensionless Wormersley number to characterize the unsteady nature of internal flow. *J theor Biol*, 1998, 191, 63–78
- [174] Lowe, G.: Rheological influences on thrombosis. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 1999, 12 (3), 435–449
- [175] Ma, W., Lu, Z., Zhang, M.: Investigation of structural transformations in nanophase titanium dioxide by Raman spectroscopy. *Applied Physics A*, 1998, 66 (6), 621–627
- [176] Madlener, K., Pötzsch, B.: Hämostasesystem. In: B. Pötzsch, K. Madlener (Hg.), *Hämostaseologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 7–12
- [177] Makamba, H., Kim, J.H., Lim, K., et al.: Surface modification of poly (dimethylsiloxane) microchannels. *Electrophoresis*, 2003, 24 (21), 3607–3619
- [178] Malinauskas, R.A.: Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artificial organs*, 1997, 21 (12), 1255–1267
- [179] Mark, J.: Conformations and Spatial Configurations of Inorganic Polymers. *Macromolecules*, 1978, 11 (4), 627–633
- [180] Mark, J., Allcock, H., West, R.: Polysiloxanes and related polymers. In: *Inorganic polymers*, Oxford University Press, 2005, 154–199
- [181] Matinlinna, J.P., Vallittu, P.K.: Silane based concepts on bonding resin composite to metals. *J Contemp Dent Pract*, 2007, 82 (2), 1–8
- [182] McCauley, R.L., Riley, W.B., Juliano, R.A., et al.: In vitro alterations in human fibroblast behavior secondary to silicone polymers. *Journal of Surgical Research*, 1990, 49 (1), 103–109
- [183] McIntire, L., Eskin, S., Yee, A.: Mechanical forces on cells. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 2nd edition, Els, 2004, 282–291
- [184] McNulty, N.J., Perrich, K.D., Silas, A.M., et al.: Implantable subcutaneous venous access devices: is port fixation necessary? A review of 534 cases. *Cardiovascular and interventional radiology*, 2010, 55 (4), 751–755
- [185] Michanetzis, G., Katsala, N., Missirlis, Y.: Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques. *Biomaterials*, 2003, 24 (4), 677–688
- [186] Milner, K.R., Snyder, A.J., Siedlecki, C.A.: Sub-micron texturing for reducing platelet adhesion to polyurethane biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 76 (3), 561–570
- [187] Minelli, C., Kikuta, A., Yamamoto, A.: Blood interaction with nano-topography. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2006, ICONN'06, 263–266
- [188] Müller, H.: Indikationen. In: H. Haindl, H. Müller, E. Schmoll (Hg.), *Portkathetersysteme: praxisnahe Information zu Indikationen, Implantationstechnik, Handhabung*, Springer, 2013, 9–14
- [189] Müller, H., Haindl, H.: Zu erwartende Entwicklungen von Indikation und Technik. In: H. Haindl, H. Müller, E. Schmoll (Hg.), *Portkathetersysteme: praxisnahe Information zu Indikationen, Implantationstechnik, Handhabung*, Springer, 2013, 9–14
- [190] Münch, K., Wolf, M., Gruffaz, P., et al.: Use of simple and complex in vitro models for multiparameter characterization of human blood-material/device interactions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2000, 11 (11), 1147–1163

- [191] Morais, J.M., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J.: Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS journal*, 2010, 12 (2), 188–196
- [192] Mrowietz, C., Franke, R.P., Seyfert, U.T., et al.: Haemocompatibility of polymer-coated stainless steel stents as compared to uncoated stents. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2005, 32 (2), 89–103
- [193] Mueller, M., Krolitzki, B., Glasmacher, B.: Dynamic in vitro hemocompatibility testing – improving the signal to noise ratio. *Biomedical Engineering*, 2012, 57 (SI-1), 549–552
- [194] Mulvihill, J.N., Cazenave, J.P.: Perfusion Technique for in vitro Evaluation of Platelet Interaction with Biomaterials in Catheter Form. In: W. Lemm (Hg.), *The reference materials of the European Communities: results of hemocompatibility tests.*, Springer Science and Business Media, 1992, 165–172
- [195] Murthy, N.: Techniques for analyzing biomaterial surface structure, morphology and topography. In: R. Williams (Hg.), *Surface modification of biomaterials*, Woodhead Publishing, 2011, 232–255
- [196] Mutch, N., Moore, N., Mattsson, C., et al.: The use of the Chandler loop to examine the interaction potential of NXY-059 on the thrombolytic properties of rtPA on human thrombi in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153, 124–131
- [197] Muthusubramaniam, L., Lowe, R., Fissel, W., et al.: Hemocompatibility of Silicon-Based Substrates for Biomedical Implant Applications. *Annals of Biomedical Engineering*, 2011, 39 (4), 1296–1305
- [198] Nagahashi, K., Teramura, Y., Takai, M.: Stable surface coating of silicone elastomer with phosphorylcholine and organosilane copolymer with cross-linking for repelling proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 134, 384–391
- [199] Nanofocus AG: Berührungsloses 3D-Oberflächen-Messsystem - μ surf explorer, 2007
- [200] Nguyen, K., Su, S., Sheng, A., et al.: In vitro hemocompatibility studies of drug-loaded poly-(l-lactic acid) fibers. *Biomaterials*, 2003, 24 (28), 5191–5201
- [201] Nichols, W., O'Rourke, M.: *McDonald's blood flow in arteries*, 5th edition. Oxford University Press, 2005
- [202] Niu, Z., Gao, F., Jia, X., et al.: Synthesis studies of sputtering TiO₂ films on poly (dimethylsiloxane) for surface modification. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, 272 (3), 170–175
- [203] Niu, Z., Jia, X., Zhang, W., et al.: Reactive sputtering TiO₂ films for surface coating of poly (dimethylsiloxane). *Applied surface science*, 2006, 252 (6), 2259–2264
- [204] O'Brien, J.: Shear-induced platelet aggregation. *The Lancet*, 1990, 335 (8691), 711–713
- [205] van Oeveren, W.: Obstacles in Haemocompatibility Testing. *Scientifica*, 2013, 2013 (1), 14
- [206] van Oeveren, W., Haan, J., Lagerman, P., et al.: Comparison of Coagulation Activity Tests In Vitro for Selected Biomaterials. *Artificial Organs*, 2002, 26 (6), 506–511
- [207] van Oeveren, W., Tielliu, I., de Hart, J.: Comparison of Modified Chandler, Roller Pump, and Ball Valve Circulation Models for In Vitro Testing in High Blood Flow Conditions: Application in Thrombogenicity Testing of Different Materials for Vascular Applications. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 2012, 7
- [208] Okada, T., Ikada, Y.: Surface modification of silicone for percutaneous implantation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1996, 7 (2), 171–180
- [209] Otto, M., Klein, C., Köhler, H., et al.: Dynamic blood cell contact with biomaterials: validation of a flow chamber system according to international standards. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 1997, 8 (3), 119–129
- [210] Owen, M.: *Surface chemistry and Applications*. In: *Siloxane polymers*, Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993, 305–372
- [211] Pachaly, B., Achenbach, F., Herzig, C., et al.: Silicone. In: R. Dittmeyer, W. Kein, G. Kreysa, A. Oberholz (Hg.), *Chemische Technik*, 5. Auflage, Band 5: *Organische Zwischenverbindungen, Polymere*, Wiley-VCH, 2005, 1095–1213

- [212] Palsule, A., Clarson, S., Widenhouse, C.: Gamma irradiation of silicones. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2008, 18 (2), 207–221
- [213] Papaioannou, T., Stefanadis, C.: Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic Journal of Cardiology*, 2005, 45, 5–15
- [214] Park, H., Berzin, I., De Luis, J., et al.: Evaluation of silicone tubing toxicity using tobacco BY2 culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 2005, 41 (4), 555–560
- [215] Park, J.Y., Gemmell, C.H., Davies, J.E.: Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*, 2001, 22 (19), 2671–2682
- [216] Park, K., Shim, H.S., Dewanjee, M.K., et al.: In vitro and in vivo studies of PEO-grafted blood-contacting cardiovascular prostheses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2000, 11 (11), 1121–1134
- [217] Peel, R. K. and Turney, J.H.: Fibrin sheath on a tunnelled haemodialysis catheter. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003, 18 (5), 1026
- [218] Peppas, N.A., Hoffman, A.S.: Hydrogels. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 617–634
- [219] Pinto, S., Alves, P., Matos, C.M., et al.: Poly (dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma to improve its characteristics towards biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 81 (1), 20–26
- [220] Planck, H.: Generelle Aspekte und spezielle Anforderungen bei der Verwendung von Kunststoffen für medizinische Produkte. In: H. Planck (Hg.), *Kunststoffe und Elastomere in der Medizin*, Verlag W. Kohlhammer, 1993, 23–37
- [221] van Poll, M.L., Khodabakhsh, S., Brewer, P.J., et al.: Surface modification of PDMS via self-organization of vinyl-terminated small molecules. *Soft Matter*, 2009, 5 (11), 2286–2293
- [222] Poorter, R.L., Lauw, F.N., Bemelman, W.A., et al.: Complications of an implantable venous access device (Port-a-Cath) during intermittent continuous infusion of chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 1996, 32 (13), 2262–2266
- [223] Pröbster, M.: *Elastisch Kleben: aus der Praxis für die Praxis*. Springer Verlag, 2013
- [224] Pötzsch, B., Madlener, K.: Thrombingenerierung und endogens Thrombinbildungs-potenzial. In: *Hämostaseologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 873–876
- [225] Quinn, K.: Silicones as biomaterials. *British Polymer Journal*, 1988, 20, 25–32
- [226] Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S.: Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in colloid and interface science*, 2011, 162 (1), 87–106
- [227] Rathmann, N., Hausmann, D., Kostrzewa, M., et al.: Komplikationen venöser Portsysteme. *Der Radiologe*, 2011, 51 (5), 397–404
- [228] Ratner, B.D.: The blood compatibility catastrophe. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993, 27 (3), 283–287
- [229] Ratner, B.D.: The catastrophe revisited: Blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials*, 2007, 28 (34), 5144–5147
- [230] Ratner, B.D., Horbett, T.A.: Evaluation of blood-material interaction. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 617–634
- [231] René, T.: Kontaktfaktoren. In: B. Pötzsch, K. Madlener (Hg.), *Hämostaseologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 203–212
- [232] Renemann, R., Arts, T., Hoeks, A.: Wall shear stress - an important determinant of endothelial cell function and structure - in the arterial system in vivo. *Journal of vascular research*, 2006, 43, 251–269
- [233] Rhodes, N.P., Wilson, D.J., Williams, R.L.: The effect of gas plasma modification on platelet and contact phase activation processes. *Biomaterials*, 2007, 28 (31), 4561–4570

- [234] Rodrigues, S.N., Gonçalves, I.C., Martins, M.C.L., et al.: Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 2006, 27 (31), 5357–5367
- [235] Rollason, G., Sefton, M.: Measurement of the rate of thrombin production in human plasma in contact with different materials. *Journal of biomedical materials research*, 1992, 26 (5), 675–693
- [236] Romani, A.A., Ippolito, L., Riccardi, F., et al.: In Vitro Blood Compatibility of Novel Hydrophilic Chitosan Films for Vessel Regeneration and Repair. In: R. Pignatello (Hg.), *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, InTech, 2013, 157–175
- [237] Rossi, M., Zavalloni, D., Gasparini, G., et al.: Very late multivessel thrombosis of bare metal stents with concomitant patent drug-eluting stents after withdrawal of aspirin. *International journal of cardiology*, 2008, 113 (1), e7–e9
- [238] Rubenstein, D., Yin, W., Frame, M.: *Biofluid mechanics*. Elsevier, 2012
- [239] Sabic: *Data Sheet Sabic® PCGH10*. Riyadh, Saudi Arabia, 2016
- [240] Sanak, M., Jakiela, B., Wegrzyn, W.: Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests. *Bulletin of the polish academy of sciences: Technical sciences*, 2010, 58 (2), 317–322
- [241] Sanchez, J., Lundquist, P., Elgue, G., et al.: Measuring the degree of plasma contact activation induced by artificial materials. *Thrombosis Research*, 2002, 105, 407–412
- [242] Sarvi, F., Yue, Z., Hourigan, K., et al.: Surface-functionalization of PDMS for potential micro-bioreactor and embryonic stem cell culture applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1 (7), 987–996
- [243] Sastri, V.: *Plastics in medical devices: properties, requirements and applications*. Elsevier, 2013
- [244] Savage, B., Ruggeri, Z.M.: Platelet thrombus formation in flowing blood. In: A. Michelson (Hg.), *Platelets*, 2nd edition, Elsevier, 2007, 359–376
- [245] Schettini, N., Jaroszeski, M.J., West, L., et al.: Hemocompatibility Assessment of 3C-SiC for Cardiovascular Applications. In: S.E. Sadow (Hg.), *Silicon carbide biotechnology: a biocompatible semiconductor for advanced biomedical devices and applications*, Springer, 2012, 153–208
- [246] Schneppenheim, R., Budde, U.: Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS13. In: B. Pötzsch, K. Madlener (Hg.), *Hämostaseologie*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 227–235
- [247] Sefton, M.V., Gemell, C.H., Gorbet, M.B.: What really is blood compatibility? *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2000, 11 (11), 1165–1182
- [248] Sefton, M., Sawyer, A., Gorbet, M., et al.: Does surface chemistry affect thrombogenicity of surface modified polymers? *Journal of biomedical materials research*, 2001, 55 (4), 447–459
- [249] Seldon, H., Dahm, M., Clark, G., et al.: Silastic with polyacrylic acid filler: swelling properties, biocompatibility and potential use in cochlear implants. *Biomaterials*, 1994, 15 (14), 1161–1169
- [250] Seo, J., Lee, L.P.: Effects on wettability by surfactant accumulation/depletion in bulk polydimethylsiloxane (PDMS). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, 119 (1), 192–198
- [251] Seyfert, U.T., Biehl, V., Schenk, J.: In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular Engineering*, 2002, 19 (2-6), 91–96
- [252] Shah-Derler, B., Wintermantel, E., Ha, S.: Blut. In: E. Wintermantel, S. Ha (Hg.), *Medizintechnik*, 5. Auflage, Springer-Verlag, 2009, 155–162
- [253] Sharma, V., Dhayal, M., Shivaprasad, S.M., et al.: Surface characterization of plasma-treated and PEG-grafted PDMS for micro fluidic applications. *Vacuum*, 2007, 81 (9), 1094–1100
- [254] Shen, F., Kastrup, C., Liu, Y., et al.: Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2008, 28 (11), 2035–2041
- [255] Shirtcliffe, N., McHale, G., Newton, M., et al.: Dual-scale roughness produces unusually water repellent surfaces. *Adv Mater*, 2004, 16 (21), 1929–1932

- [256] Sims, D., Takayama, H., Uriel, N., et al.: Ventricular Assist Device–Associated Thrombus. *Circulation*, 2011, 124 (7), e197–e198
- [257] Sinn, S., Scheuermann, T., Deichelbohrer, S., et al.: A novel in vitro model for preclinical testing of the hemocompatibility of intravascular stents according to ISO 10993-4. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011, 22 (6), 1521–1528
- [258] Sivaraman, B., Latour, R.A.: The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials*, 2010, 31 (5), 832–839
- [259] Sixma, J., Groot, P.: Regulation of platelet adhesion to the vessel wall. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1994, 714 (1), 190–199
- [260] Solouk, A., Cousins, B.G., Mirzadeh, H., et al.: Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: a review. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2011, 58 (5), 311–327
- [261] Song, J., Lee, S., Cha, G., et al.: Surface modification of silicone rubber by ion beam assisted deposition (IBAD) for improved biocompatibility. *Journal of applied polymer science*, 2005, 96 (4), 1095–1101
- [262] Song, Y., Feijen, J., Grijpma, D., et al.: Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2011, 44 (1-4), 357–374
- [263] Sperling, C., Fischer, M., Maitz, M.F., et al.: Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials*, 2009, 30 (27), 4447–4456
- [264] Sperling, C., Houska, M., Brynda, E., et al.: In vitro hemocompatibility of albumin–heparin multilayer coatings on polyethersulfone prepared by the layer-by-layer technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 76A (4), 681–689
- [265] Sperling, C., Schweiss, R.B., Streller, U., et al.: In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups. *Biomaterials*, 2005, 26 (33), 6547–6557
- [266] Spijker, H.T., Bos, R., Busscher, H.J., et al.: Adhesion of blood platelets under flow to wettability gradient polyethylene surfaces made in a shielded gas plasma. *Journal of adhesion science and technology*, 2002, 16 (13), 1703–1713
- [267] Spijker, H., Bos, R., Busscher, H., et al.: Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Biomaterials*, 2002, 23, 757–766
- [268] Spijker, H., Graaff, R., Boonstra, P., et al.: On the influence of flow conditions and wettability on blood material interactions. *Biomaterials*, 2003, 24 (26), 4717–4727
- [269] Stöber, H., Brethauer, U.: Schlauchsysteme/Katheter - Gefäßkatheter. In: H. Planck (Hg.), *Kunststoffe und Elastomere in der Medizin*, Kohlhammer, 1993, 291–298
- [270] Steinert, R., Jain, R.: Ophthalmologic applications: introduction. In: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons (Hg.), *Biomaterials Science*, 3rd edition, Elsevier, 2013, 617–634
- [271] Streller, U., Sperling, C., Hübner, J., et al.: Design and Evaluation of Novel Blood Incubation Systems for In Vitro Hemocompatibility Assessment of Planar Solid Surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2003, 66B (1), 379–390
- [272] Sugiura, S., Edahiro, J.I., Sumaru, K., et al.: Surface modification of polydimethylsiloxane with photo-grafted poly (ethylene glycol) for micropatterned protein adsorption and cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 63 (2), 301–305
- [273] Sweetman, M.J., Shearer, C.J., Shapter, J.G., et al.: Dual silane surface functionalization for the selective attachment of human neuronal cells to porous silicon. *Langmuir*, 2011, 27 (15), 9497–9503
- [274] Tablot, L., Berger, S.: Fluid-mechanical aspects of the circulation. *American scientist*, 1974, 62 (4), 671–682
- [275] Tan, H.M., Fukuda, H., Akagi, T., et al.: Surface modification of poly (dimethylsiloxane) for controlling biological cells' adhesion using a scanning radical microjet. *Thin Solid Films*, 2007, 515 (12), 5172–5178

- [276] Tegoulia, V., Rao, W., Kalambur, A., et al.: Surface properties, fibrinogen adsorption, and cellular interactions of a novel phosphorylcholine-containing self-assembled monolayer on gold. *Langmuir*, 2001, 17 (14), 4396–4404
- [277] Teichgräber, U.K., Kausche, S., Nagel, S.N., et al.: Outcome analysis in 3,160 implantations of radiologically guided placements of totally implantable central venous port systems. *European radiology*, 2011, 21 (6), 1224–1232
- [278] Teichgräber, U., Pfitzmann, R., Hofmann, H.: Portsysteme als integraler Bestandteil von Chemotherapien. *Dtsch Arztebl Int*, 2011, 108 (9), 147–153
- [279] Thevenot, P., Hu, W., Tang, L.: Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current topics in medicinal chemistry*, 2008, 8 (4), 270–280
- [280] Thomas, D.: Cross-linking of polydimethylsiloxanes. In: S. Clarson, J. Semlyen (Hg.), *Siloxane polymers*, Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993, 567–615
- [281] Thorslund, S., Sanchez, J., Larsson, R., et al.: Bioactive heparin immobilized onto microfluidic channels in poly (dimethylsiloxane) results in hydrophilic surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 46 (4), 240–247
- [282] Thorslund, S., Sanchez, J., Larsson, R., et al.: Functionality and stability of heparin immobilized onto poly (dimethylsiloxane). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 45 (2), 76–81
- [283] Tickner, J., Schettler, T., Guidotti, T., et al.: Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *American journal of industrial medicine*, 2001, 39 (1), 100–111
- [284] Tirrell, M., Kokkoli, E., Biesalski, M.: The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science*, 2002, 500 (1), 61–83
- [285] Truckenbrodt, E.: *Fluidmechanik: Band 1: Grundlagen und elementare Strömungsvorgänge dichtebeständiger Fluide*, 4. Auflage. Springer, 1996
- [286] Tsai, W.B., Grunkemeier, J.M., McFarland, C.D., et al.: Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *Journal of biomedical materials research*, 2002, 60 (3), 348–359
- [287] Tsyganov, I., Maitz, M., Wieser, E., et al.: Correlation between blood compatibility and physical surface properties of titanium-based coatings. *Surface & Coatings Technology*, 2005, 200, 1041–1044
- [288] Vanícková, M., Suttner, J., Dyr, J.: The adhesion of blood platelets on fibrinogen surface: comparison of two biochemical microplate assays. *Platelets*, 2006, 17 (7), 470–476
- [289] van Oeveren, W., Haan, J., Lagerman, P., et al.: Comparison of Coagulation Activity Tests In Vitro for Selected Biomaterials. *Artificial Organs*, 2002, 26 (6), 506–511
- [290] Vickers, J.A., Caulum, M.M., Henry, C.S.: Generation of hydrophilic poly (dimethylsiloxane) for high-performance microchip electrophoresis. *Analytical chemistry*, 2006, 78 (21), 7446–7452
- [291] Vladkova, T.G.: Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. *International Journal of polymer science*, 2010, 2010, 22
- [292] Vogler, E.A., Graper, J.C., Harper, G.R., et al.: Contact activation of the plasma coagulation cascade. I. Procoagulant surface chemistry and energy. *Journal of biomedical materials research*, 1995, 29 (8), 1005–1016
- [293] Vogler, E.A., Graper, J.C., Sugg, H.W., et al.: Contact activation of the plasma coagulation cascade. II. Protein adsorption to procoagulant surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 1995, 29 (8), 1017–1028
- [294] Vogler, E.A., Siedlecki, C.A.: Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, 2009, 30 (10), 1857–1869
- [295] Vondracek, P., Dolezel, B.: Biostability of medical elastomer: a review. *Biomaterials*, 1984, 5 (4), 209–214

- [296] Vondracek, P., Gent, A.: Slow decomposition of silicone rubber. *Journal of applied polymer science*, 1982, 27 (11), 4517–4522
- [297] Wachtler, U.: Siliconelastomere - Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen. In: *Fachtagung Silikonelastomere*, Würzburg, 2013,
- [298] Wacker Chemie AG: *Medical Design & Manufacturing 2012: WACKER Presents Special Silicones for Long-Term Medical Implants*. Pressemitteilung, 2012
- [299] Waite, G.: Blood components. In: R. Rhoades, D. Bell (Hg.), *Medical Physiology*, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2009, 169
- [300] Wang, A., Cao, T., Tang, H., et al.: In vitro haemocompatibility and stability of two types of heparin-immobilized silicon surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 43 (3), 245–255
- [301] Wang, J., Pan, C.J., Huang, N., et al.: Surface characterization and blood compatibility of poly (ethylene terephthalate) modified by plasma surface grafting. *Surface and Coatings Technology*, 2005, 196 (1), 307–311
- [302] Weiss, R., Spittler, A., Schmitz, G., et al.: Thrombocyte adhesion and release of extracellular microvesicles correlate with surface morphology of adsorbent polymers for lipid apheresis. *Biomacromolecules*, 2014, 15 (7), 2648–2655
- [303] Wendel, H.P., Hauser, N., Briquet, F., et al.: Hemocompatibility of medical connectors with biopassive or bioactive surface coatings. *Journal of biomaterials applications*, 2002, 17 (1), 5–17
- [304] White, F.: *Fluid mechanics*. McGraw Hill, 2010
- [305] Whitmore, R.: The flow behaviour of blood in the circulation. *Nature*, 1967, 215, 123–126
- [306] Wilke, G.: Coatings for plastic parts. In: H. Streitberger, K. Dössel (Hg.), *Automotive Paints and Coatings*, 2nd edition, Wiley Verlag, 2008, 305–350
- [307] Williams, R., Wilson, D., N.P., R.: Stability of plasma-treated silicone rubber and its influence on the interfacial aspects of blood compatibility. *Biomaterials*, 2004, 25, 4659–4673
- [308] Wintermantel, E.: Editorial - Life Science Engineering: Die Interdisziplinarität der Medizintechnik. Werte und Bewertungen aus 25 Berufsjahren – und die Empfehlung, in der Medizintechnik tätig zu werden. In: E. Wintermantel, S. Ha (Hg.), *Medizintechnik*, 5. Auflage, Sprinter-Verlag, 2009, 3–60
- [309] Wintermantel, E., Shah-Derler, B., Bruinink, A., et al.: Biokompatibilität. In: E. Wintermantel, S. Ha (Hg.), *Medizintechnik*, 5. Auflage, Sprinter-Verlag, 2009, 67–104
- [310] Wu, Y., Simonovsky, F.I., Ratner, B.D., et al.: The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: a comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, 74 (4), 722–738
- [311] Wu, Z., Chen, H., Dong, Y., et al.: Cleaning using nanobubbles: Defouling by electrochemical generation of bubbles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, 328 (1), 10–14
- [312] Wu, Z., Hjort, K.: Surface modification of PDMS by gradient-induced migration of embedded Pluronic. *Lab on a Chip*, 2009, 9 (11), 1500–1503
- [313] Xiao, Y., Yu, X.D., Xu, J.J., et al.: Bulk modification of PDMS microchips by an amphiphilic copolymer. *Electrophoresis*, 2007, 28 (18), 3302–3307
- [314] Xu, J., Gleason, K.: Conformal, amine-functionalized thin films by initiated chemical vapor deposition (iCVD) for hydrolytically stable microfluidic devices. *Chemistry of Materials*, 2010, 22 (5), 1732–1738
- [315] Xu, L.C., Bauer, J.W., Siedlecki, C.A.: Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 124 (1), 49–68
- [316] Yao, M., Fang, J.: Hydrophilic PEO-PDMS for microfluidic applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2012, 22 (2),
- [317] Ye, X., Shao, Y.L., Zhou, M., et al.: Research on micro-structure and hemo-compatibility of the artificial heart valve surface. *Applied Surface Science*, 2009, 255 (13), 6686–6690

- [318] Yeh, Y.S., Iriyama, Y., Matsuzawa, Y., et al.: Blood compatibility of surfaces modified by plasma polymerization. *Journal of biomedical materials research*, 1988, 22 (9), 795–818
- [319] Yue, Z., Liu, X., Molino, P.J., et al.: Bio-functionalisation of polydimethylsiloxane with hyaluronic acid and hyaluronic acid–collagen conjugate for neural interfacing. *Biomaterials*, 2011, 32 (21), 4714–4724
- [320] Yung, L.Y.L., Lim, F., Khan, M.M.H., et al.: High-molecular-weight kininogen preabsorbed to glass surface markedly reduces neutrophil adhesion. *Biomaterials*, 2000, 21, 405–414
- [321] Zapanta, C.M., Griffith, J.W., Hess, G.D., et al.: Microtextured materials for circulatory support devices: preliminary studies. *Asaio Journal*, 2006, 52 (1), 17–23
- [322] Zdrahala, R.J., Zdrahala, I.J.: Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities and vibrant future. *Journal of biomaterials applications*, 1999, 14, 67–90
- [323] Zhang, M., Ferrari, M.: Hemocompatible Polyethylene Glycol Films on Silicon. *Biomedical Microdevices*, 1998, 1 (1), 81–89
- [324] Zhang, Z., Feng, X., Xu, F., et al.: “Click” chemistry-based surface modification of poly (dimethylsiloxane) for protein separation in a microfluidic chip. *Electrophoresis*, 2010, 31 (18), 3129–3136
- [325] Zhao, T., Li, Y., Gao, Y., et al.: Hemocompatibility investigation of the NiTi alloy implanted with tantalum. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011, 22 (10), 2311–2318
- [326] Zhao, X., Courtney, J.: Surface modification of biomaterials by heparinisation to improve blood compatibility. In: R. Williams (Hg.), *surface modification of biomaterials*, Woodhead publishing Ld, 2011, 56–77
- [327] Zhou, J., Khodakov, D.A., Ellis, A.V., et al.: Surface modification for PDMS-based microfluidic devices. *Electrophoresis*, 2012, 33 (1), 89–104
- [328] Zhou, J., Yan, H., Ren, K., et al.: Convenient Method for Modifying Poly(dimethylsiloxane) with Poly(ethylene glycol) in Microfluidics. *Analytical chemistry*, 2009, 81 (16), 6627–6632
- [329] Zhuo, R., Siedlecki, C.A., Vogler, E.A.: Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials*, 2006, 27 (24), 4325–4332
- [330] Ziats, N.P., Pankowsky, D.A., Tierney, B.P., et al.: Adsorption of Hageman factor (factor XII) and other human plasma proteins to biomedical polymers. *J Lab Clin Med*, 1990, 116 (5), 687–696
- [331] Zimmermann, H., Heinlein, M., Guldner, N.: Titanisierung von Implantatoberflächen. In: E. Wintermantel, S. Ha (Hg.), *Medizintechnik*, 5. Auflage, Springer-Verlag, 2009, 907–925
- [332] Zwicker, U.: Verschleißverhalten. In: K. W. (Hg.), *Titan und Titanlegierungen*, Springer Berlin Heidelberg, 1974, 437–438

Abkürzungen und Begriffserläuterungen

APMS	acrylamidomethylpropyl sulfonic acid
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
BC	Buffy Coat
CMC	Carboxymethylcellulose
CVD	Chemische Gasphasenabscheidung (engl. chemical vapor deposition)
EK	Erythrozytenkonzentrat
EO	Ethylenoxid
ePTFE	engl. expanded polytetrafluoroethylene
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBGC	engl. Foreign Body Giant Cells
FBR	Fremdkörperreaktion (engl. Foreign Body Reaction)
ff-PPP	fibrinogenfreies thrombozytenarmes Plasma
FN	Fibronectin
HEMA	(Hydroxyethyl)methacrylate
HI	Hämolyse-Index
HMWK	engl. High Molecular Weight Kininogen
HTV	Festsilikonelastomer (engl. High Temperature Vulcanizing Silicone Rubber)
KW	Kontaktwinkel
LBL	engl. layer-by-layer
LD-PE	engl. low-density polyethylene
LSR	Flüssigsilikonelastomer (engl. Liquid Silicone Rubber)
MPC	methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
PA	Polyamid
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG, PEO	Polyethylenglycol, Polyethylenoxid
PL	Phospholipiden
PLA	Poly lactide
PLT	Thrombozyten (engl. Platelets)
POM	Polyoxymethylen
PE	Polyethylen
PKS	Portkathetersystem
PP	Polypropylen
PPP	Thrombozytenarmes Plasma (engl. Platelet Poor Plasma)
PRP	thrombozytenreiches Plasma (engl. Platelet Rich Plasma)

PTFE	Polytetrafluoroethylen
(a/na)PTT	(aktivierte/nicht aktivierte) partielle Thromboplastinzeit
PU	Polyurethan
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
PVCAPD	engl. triggerless pulsed vacuum cathodic arc plasma deposition
PVC-P	weiches Polyvinylchlorid
PVD	Physikalische Gasphasenabscheidung (engl. physical vapor deposition)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RTV	Raumtemperaturvernetzendes Silikonelastomer
SAMs	Selbstorganisierende Monoschichten (engl. Self-Assembled Monolayers)
SBF	engl. Simulated Body Fluid
TK	Thrombozytenkonzentrat
TPE-S	Thermoplastisches Elastomer aus Styrol-Basis
TPE-U	Thermoplastisches Polyurethan
UHMWPE	engl. ultrahigh molecular weight polyethylene
U/min	Umdrehungen pro Minute
VB	Vollblut
vVF	von-Willebrand-Faktor

Symbolverzeichnis

η	$[m^2/s]$	kinematische Viskosität
μ	$[cP]$	dynamische Viskosität
ρ	$[kg/m^3]$	Dichte
v_0	$[cm/s]$	Strömungsgeschwindigkeit an der Mittellinie des Kanals
\bar{v}	$[cm/s]$	mittlere Strömungsgeschwindigkeit über den Kanalquerschnitt
b	$[mm]$	Breite des Kanals
h	$[mm]$	Höhe des Kanals
l	$[mm]$	Länge des Kanals
ω	$[rad/s]$	Strömungsfrequenz
Q	$[mL/s]$	Durchfluss
γ	$[s^{-1}]$	Scherrate
D_H	$[cm]$	hydrolischer Durchmesser
Re	$[-]$	Reynolds-Zahl
Wo	$[-]$	Womersley-Zahl
K_1, K_2	$[-]$	Korrekturfaktoren zur Berechnung der Strömungsparameter im Kanal
a	$[\mu m]$	Rillengröße
R_a	$[\mu m]$	arithmetische Mittenrauwert
R_z	$[\mu m]$	gemittelte Rautiefe
D_i	$[mm]$	Innendurchmesser des Schlauchs
D_a	$[mm]$	Außendurchmesser des Schlauchs
D_F	$[mm]$	Fügedurchmesser
B	$[mm]$	Nabenbreite
R_K	$[mm]$	Innere Radius der Injektionskammer
R_S	$[mm]$	Außere Radius des Septums
H_1	$[mm]$	Dicke des Septums vor dem Fügen
H_2	$[mm]$	Dicke des Septums nach dem Fügen
$D_{W,i}$	$[mm]$	Innere Durchmesser der Welle (Kranz)
$D_{N,a}$	$[mm]$	Äußere Durchmesser der Nabe (Kammer)
S_R	$[-]$	Sicherheitsfaktor gegen Rutschen
S_B	$[-]$	Sicherheitsfaktor gegen plastische Verformungen
K_a	$[-]$	Anwendungsfaktor
f	$[-]$	Haftbeiwert
F_a	$[N]$	Summe der Axialkräfte
p_{min}	$[N/mm^2]$	minimale Flächenpressung
p_{max}	$[N/mm^2]$	maximale Flächenpressung
Z_{min}	$[mm]$	minimale Haftmaß
Z_{max}	$[mm]$	maximale Haftmaß

U_{min}	[mm]	Minimalwert des Übermaßes
U_{max}	[mm]	Maximalwert des Übermaßes
E	[GPa]	E-Modul
ν	[-]	Poissonzahl
R_m	[MPa]	Zugfestigkeitsgrenze
R_e	[MPa]	Streckgrenze

Anhang

A Review der Literatur: Dynamische Blutinkubationssysteme

Prüfstand (Author)	Autonome Zirkulation	Anzahl von Proben ^e	Proben-geometrie	L_c (mm)	Blutvolumen (ml)	Pumpe	A_{test}/A_{total} ^c
Mueller [193]	Ja	30	Schlauch	4 od. 2,4	3 od.1,5	Nein	1
Sinn [257]	Ja	1	Schlauch	4,3	9	Nein	1
Van Oeveren [207]	Ja	3	Schlauch	3	4	Nein	1
Kealey [144]	Ja	1	Schlauch	3,125	4,6	Ja	1
Nguyen [200]	Ja	4	Schlauch	3,18	n.a.	Ja	1
Van Oeveren [207]	Ja	3	Schlauch	3	4,5	Ja	1
Otto [209]	Ja	1	Platte	0,1	12	Ja	0,09 - 0,25*
Streller [271]	Ja	8	Schlauch	0,25 bis 0,5	6	Ja	0,39*
Alkhamis [3]	Ja	1	Platte	0,4*	0,13	Nein	<0,5*
Sanak [240]	Ja	1	Platte	n.a.	1,38	Nein	<0,5*
Van Oeveren [207]	Ja	3	Schlauch	3	4,5	Nein	1
Spiralförmige Kanal	Nein	1	Kanal	0,02	5	Ja	0,94*
Groth [103]							
Hemocoater	Ja	8	Kanal	1 od. 2	4,5 od. 8	Nein	0,96 - 0,41
Boudot [28]							

^a gleichzeitig getestete Proben mit einem einzigen Gerät.

^b charakteristische Länge, definiert als Durchmesser bzw. kleinste Seite für einen kreisförmigen bzw. rechteckigen Querschnitt.

^c Verhältnis der nützlichen Blut-/Werkstoff-Kontaktfläche zur gesamten Blut-/Gerät-Kontaktfläche

* berechnet aus den publizierten Angaben.

n.a. nicht angegeben.

B Beschreibung der biologischen Versuche

B.1. ACP-Test

- Werkstoffproben und Kanäle sorgfältig reinigen (siehe Anhang C.2.), sterilisieren (Standard: Heißdampf 121 °C, 2 bar, 20 min), in die Spannvorrichtungen legen und auf 37 °C vorwärmen.
- Blut abnehmen (Antikoagulanzen Citrat ACD-A).
- TK herstellen: Zentrifugieren 6 min bei 1750 g, PRP und buffy coat entnehmen, nochmal zentrifugieren 9 min bei 2250 g und Überstand entfernen. Thrombozytenzahl auf ca. 500×10^3 mit PBS einstellen.
- 4,5 ml des TK in jeden Prüfstand pipettieren, 1 h bei 37 °C inkubieren (Standardversuche: Schüttlergeschwindigkeit 15 U/min).
- Blut vom Prüfstand entfernen. Mit 5 ml PBS einmal den Kanal spülen. Proben entnehmen und drei Probekörper ($\varnothing = 12$ mm)/Probe abtrennen. Probekörper in eine Mikrotiterplatte (48 wells, Nunc®) legen.
- Zugabe von 300 µl Citrat-Puffer (Sodium Citrate Dihydrate 0,1 M; p-Nitrophenyl-Phosphat Phosphatase Substrat (pNPP) 5 mM ; Triton-X 1 %; pH 5,4). Inkubation 1 h bei 37 °C (statisch).
- Reaktionstopp durch Zugabe von 210 µl NaOH 2 M.
- 170 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführen und die optische Absorption mittels ELISA-reader bei 405 nm messen (Referenzwellenlänge 620 nm).
- Auswertung: optische Dichte des Blanks von der optischen Dichte der Proben subtrahieren. Normieren auf den Wert der Referenzprobe (Referenzprobe = 100 %)

B.2. TGA-Test

- Probekörper sorgfältig reinigen (Anhang C.2.), sterilisieren (Standard: Heißdampf 121 °C, 2 bar, 20 min) und in eine 24-Well-Mikrotiterplatte legen.
- Blut abnehmen (Antikoagulanzen Citrat ACD-A).
- Fibrinogenfreies PPP (ff-PPP) herstellen: Zentrifugieren 6 min bei 1750 g, Überstand entnehmen, nochmal zentrifugieren 9 min bei 2250 g und Überstand entfernen. Thrombin ($c = 100$ NIH/ml) im Verhältnis 1:100 zugeben, 10 min inkubieren lassen und schließlich den gebildeten Fibrinklumpen entfernen. Prozedur wiederholen: Zugabe vom Thrombin und Entfernen des Fibrinklumpens.
- Frische Phospholipid-CaCl₂-Lösung ansetzen: lyophilisierte Phospholipide mit 5 ml CaCl₂ (50 mM) rekonstituieren. Pro Probekörper: 5 Gefäße mit 490 µl Tris-Puffer (25 mM) vorbereiten und auf Eis legen.
- 200 µl ff-PPP auf jeden Probekörper pipettieren. 15 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- Reaktionstart: 100 µl Phospholipid-CaCl₂-Lösung auf jeden Probekörper pipettieren.
- Reaktionstop: bei 0 min; 2,5 min; 5 min; 7,5 min; 10 min, 10 µl entnehmen und in Tris-Puffer überführen.
- 150 µl je Eppi in eine 24-Well-Mikrotiterplatte überführen. 50 µl des Substrats S₂₂₃₈ ($c = 3$ mM) zugeben. 20 Minuten bei 37 °C inkubieren lassen.
- Optische Absorption mit ELISA-reader bei 405 nm messen (Referenzwellenlänge 540 nm).

- Auswertung: Thrombinkonzentration mit einer Kalibrationskurve berechnen. Die Thrombinaktivität entspricht der Fläche unter der Kurve der Thrombinkonzentration über die Zeit. Sie wird auf die Referenzprobe normiert (Referenzprobe = 100 %).

B.3. Zellkultur und Passagieren

Die Zellen sind Fibroblasten der Zelllinie Hs27 (CRL-1643TM, ATCC[®], UK) und die Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist: DMEM, 5 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % Amphotericin B. Das folgende Protokoll bezieht sich auf das Passagieren aus einem Gefäß des Typs T25.

- Zellkulturmedium entfernen und Zellen mit 5 ml PBS waschen.
- 2 ml Trypsin zugeben und 3 min im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂) inkubieren.
- 3 ml Zellkulturmedium zugeben.
- Zellenlösung in ein Zentrifugenröhrchen überführen und zentrifugieren (310 g, 5 min), Überstand entfernen und Zellen in 1 ml Medium resuspendieren.
- Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmen.
- Zellen in ein neues Kulturgefäß aussäen und bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutschrank inkubieren:
 - **Weitere Kultivierung:** Kulturgefäß Typ T25, 3 000 Zellen/cm², 5 ml Medium.
 - **Zytotoxizitätsversuch:** 96-Wells-Mikrotiterplatte, 5 000 Zellen/cm², 200 µl Medium.
 - **Besiedlungsversuch:** Silikonnäpfen Ø= 12 mm, 15 000 Zellen/cm², 250 µl Medium.

B.4. Zytotoxizitätsversuch

- Proben sorgfältig reinigen (Anhang C.2.), schneiden (Probenoberfläche: 7,5 cm²; Standard: 1,5 × 5 cm) und sterilisieren (Standard: Heißdampf 121 °C, 2 bar, 20 min).
- Extrakte herstellen: Proben (inkl. Kupfer als Positivkontrolle und Blank als Negativkontrolle) mit 5 ml Zellkulturmedium (DMEM, 5 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % Amphotericin B) im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂) inkubieren. Das Oberflächen-/Volumen-Verhältnis beträgt 1,5 cm²/ml.
 - **kurze Extraktion:** Inkubationszeit 3 Tage.
 - **lange Extraktion:** Inkubationszeit 7 Tage.
- Zellen passagieren und in einer 96-Wells-Mikrotiterplatte mit einer Dichte von 5 000 Zellen/cm² aussäen (Mediumvolumen 200 µl). Inkubation: 3 Tage im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂).
- Zellen Giften: Medium entfernen und mit 200 µl der Werkstoffextrakte giften. Inkubation: 2 Tage im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂).
- Auswertung mit CCK-8-Test.

B.5. Besiedlungsversuch

- Probekörper reinigen (Anhang C.2.), schneiden (Ø= 12 mm), sterilisieren (Standard: Heißdampf 121 °C, 2 bar, 20 min) und in Silikonnäpfchen legen.
- Zellen passagieren und auf die Proben mit einer Dichte von 15 000 Zellen/cm² aussäen (Mediumvolumen 250 µl). Inkubation: 3 Tage im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂).
- Auswertung mit CCK-8-Test oder Live/Dead-Färbung.

B.6. CCK-8-Test

- CCK-8-Lösung im Verhältnis 1:11 mit Zellkulturmedium (DMEM, 5 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % Amphotericin B) verdünnen.
- Altes Zellkulturmedium abpipettieren und durch CCK-8-Lösung ersetzen.
 - **Zytotoxizitätsversuch:** 100 μ l der CCK-8-Lösung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte.
 - **Besiedlungsversuch:** 250 μ l der CCK-8-Lösung in die Silikonnapfchen und anschließendes Umpipettieren von 100 μ l in eine 96-Well-Mikrotiterplatte für die Messung.
- Eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂) inkubieren.
- Messung bei 450 nm im ELISA-reader (Korrekturwellenlänge 620 nm).
- Auswertung: Optische Dichte des Blanks von der optischen Dichte der Proben subtrahieren. Normieren auf den Wert der Referenzprobe (Referenzprobe = 100 %)

B.7. Live/Dead-Färbung

- Live/Dead-Lösung herstellen: 2 μ M Calcein-AM und 8 μ M Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) im Zellkulturmedium (DMEM, 5 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % Amphotericin B).
- 15 min im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂) inkubieren lassen.
- Probekörper aus den Silikonnapfchen entfernen und auf eine Glasscheibe für die Mikroskopie legen.
- Fluoreszenz-Mikroskopie: Erregung/Emission von 475/530 nm für Calcein-AM und Erregung/Emission von 545/605 nm für EthD-1. Überlappen der Aufnahmen mit der Software ImageJ.

B.8. Vorbereitung von biologischen Proben für REM Aufnahme

- Proben mit PBS waschen.
- Fixierung mindestens 12 Stunden bei 4 °C in 3 % Glutaraldehyd.
- Entwässern in einer Ethanolreihe (50 %, 15 min; 70 %, 15 min; 80 %, 15 min; 99 %, 30 min bei Raumtemperatur). Anschließend mindestens 12 Stunden bei 4 °C in 99 % Ethanol aufbewahren.
- Proben trocknen und mit einer ca. 7 nm Goldschicht besputtern (Abstand zum Goldtarget 5 cm, Sputterstrom von 40 mA und Sputterdauer von 40 s).

B.9. Proteinadsorptionsversuch und BCA-Test

- Werkstoffproben und Kanäle sorgfältig reinigen (siehe Anhang C.2.), in die Spannvorrichtungen legen und auf 37 °C vorwärmen.
- BCA-Lösung herstellen: BCA-Lösung mit Kupfersulfatlösung im Verhältnis 50:1 mischen.
- 4,5 ml der Fibrinogenlösung (3 mg/ml) in jeden Prüfstand pipettieren, 1 h bei 37 °C inkubieren (Standardversuche: Schüttlergeschwindigkeit 15 U/min).
- Fibrinogenlösung vom Prüfstand entfernen. Mit 5 ml PBS durch den Kanal spülen. Probekörper (\varnothing = 12 mm) entnehmen und in eine Mikrotiterplatte (48 wells, Nunc®) legen.
- Zugabe von 250 μ l der BCA-Lösung auf die Probekörper. Inkubieren 30 min bei 37 °C.
- Überführen von 225 μ l der Lösung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte.
- Messung bei 570 nm im ELISA-reader.

C Prokerkörperherstellung und Vorbereitung

C.1. Verarbeitung von Thermoplasten

Tab. 7.3: **Extrusion von Thermoplasten.** Extrudierte (Einschneckenextruder, Teach Line E20T, Dr. Collin GmbH, Ebersberg, Deutschland) Probekörper aus Thermoplasten wurden für die Validierung des neuen Inkubationssystems verwendet.

Werkstoffe	Extrusionsparameter		
	Schneckentemperatur	Werkzeugtemperatur	Schneckendrehzahl
	[°C]	[°C]	[U/min]
POM <i>Hostaform[®] MT24U01</i>	190-220	225-230	81
PP <i>Sabic[®] PCGH10</i>	200-230	240	81
PE <i>DowlexTM 2107GC</i>	190-220	225-230	81

Tab. 7.4: **Formpressen von POM.** Gepresste (Heißpresse P300P, Dr. Collin GmbH, Ebersberg, Deutschland) strukturierte Probekörper wurden aus POM für die Untersuchung des Einflusses der Oberflächentopographie auf die Häkompatibilität hergestellt.

Werkstoff	Pressphase	Pressparameter		
		Temperatur [°C]	Druck [bar]	Zeit [s]
POM <i>Hostaform[®] MT24U01</i>	1	200	10	120
	2	200	150	80
	3	170	200	80
	4	120	240	80
	5	60	250	200

C.2. Verarbeitung von Silikon

Verarbeitung von HTV

In dieser Arbeit wird ausschließlich HTV des Typs Silpuran[®] UR 9030/60 verwendet.

- Silikonmasse (Silpuran[®] UR 9030/60) mit dem Vernetzer (Silpuran[®] Curing Agent M) zum Verhältnis 100:1 auf dem Walzwerk gründlich kneten. Pressform füllen.
- Vulkanisieren in der Heißpresse (200 °C, 15 min, 50 bar).
- Tempern bei 200 °C für 4 h

Verarbeitung von RTV-2

RTV-2 wird für die Silikonäpfchen (Silpuran[®] 2438), die Untersuchung des PEG-Additivs (Elastosil[®] RT 629) und das Gehäuse des Portkathetersystems (Silpuran[®] UR 3440) verwendet.

- Die zwei Komponenten A und B werden separat gewogen und gründlich gemischt.
 - Silpuran[®] 2438: Verhältnis 1:1.
 - Silpuran[®] UR 3440: Verhältnis 1:1.
 - Elastosil[®] RT 629: Verhältnis 10:1.
- Entlüften im Exsikkator.

- Gießen und Vulkanisieren im Ofen bei 120 °C für 30 min.
- Tempern bei 200 °C für 4 h (außer für Elastosil® RT 629).

C.3. Probenreinigung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden nach dem folgenden Protokoll gereinigt:

- Reinigung mit reinst 70 %-2-Propanol für 10 min im Ultraschallbad.
- Reinigung mit gefiltertem destilliertem Wasser für 10 min im Ultraschallbad.
- Vakuumtrocknung für Minimum 12 Stunden in einem evakuierten Exsikkator.

C.4. Sterilisation

Heißdampf: Wenn das Sterilisationsverfahren nicht angegeben ist, sind die Proben standardmäßig mit Heißdampf sterilisiert worden. Die Sterilisationsparameter sind: 121 °C, 2 bar, 20 min (Gerät SteriTop 23L, celitron medical technologies, Budapest, Ungarn).

Gammabestrahlung: Die Sterilisation erfolgt bei der Firma Steripac GmbH, Calw, Deutschland. Die Bestahlungsdosis beträgt 25 kGy.

Ethylenoxid: Die Sterilisation erfolgt bei der Firma Steripac GmbH, Calw, Deutschland. Die Prozessparameter sind: 45 °C, 680 mg EO/l und Belüftungszeit von 80 Stunden.

C.5. Funktionalisierung mit organofunktionellen Silanen

Im Kapitel 5 wird die Funktionalisierung der Silikonoberfläche mit drei verschiedenen Silanen beschrieben. Die genaue experimentelle Vorgehensweise wird hier detailliert beschrieben:

- Proben reinigen und mit dem Openair®-Plasma-Gerät aktivieren. Die Einstellungsparameter des Plasmageräts sind in Tabelle 7.5 zusammengefasst.
- Aktivierte Probekörper in die Silanlösungen für 5 min bei Raumtemperatur tauchen. Die Zusammensetzung der Silanlösungen ist:
 - **GF93:** Verdünnung in Wundbenzin 1:10 (vol).
 - **GF20:** Verdünnung in Wundbenzin 1:50 (vol).
 - **PEG-Silan:** Verdünnung in Essigsäure und Ethanol 1:2:50 (vol).
- Eine Stunde bei 110 °C ausreagieren lassen.
- 20 min im entionisierten Wasser im Ultraschallbad reinigen.
- Vakuumtrocknung für min 12 Stunden in einem evakuierten Exsikkator.

Tab. 7.5: **Prozessparameter der Plasmabehandlung.**

Spannung	280V
Frequenz	21 Hz
Plasma cycle time	60 %
Abstand zur Düse	20 mm
Geschwindigkeit	10 m/min
Anzahl der Aktivierungszyklen	15

D Liste der verwendeten Geräte, Werkstoffe und Chemikalien

D.1. Geräte

Tischwalzwerk	W 100 T, Dr. Collin GmbH, Ebersberg, Deutschland
Heißpresse	P 300 P, Dr. Collin GmbH, Ebersberg, Deutschland
Temperofen	FD 53, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Einschneckenextruder	Teach Line E20T, Dr. Collin GmbH, Ebersberg, Deutschland
Kontaktwinkelmessgerät	OCA 20 DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland
Konfokalmikroskop	µsurf, Nanofocus AG, Oberhausen, Deutschland
Plattformschüttler	Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Universal 320, Andreas Hettich GmbH + Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Blutanalysegerät	KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
ELISA-reader	Multiscan FC 357, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kapillarviskosimeter	AVS 310, Schott-Geräte GmbH, Mainz, Deutschland
Dichtemessgerät	DMA 4100M, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
UV/VIS Spektrophotometer	Nanodrop TM 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6390, JEOL GmbH, Freising, Deutschland
Besputteranlage	SCD 005, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein
Open-Air [®] -Plasmaanlage	PT-60, Plasmatreat GmbH, Steinhagen, Deutschland
Zugprüfmaschine	Zwick Roell Z2.5, Deutschland
Härtemessgerät	Handprüfgerät PCE-HT 200, PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 40CFL, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank	APT line TM CB 150, Binder GmbH, Tuttlingen
Raman-Spektrometer	Senterra spectrometer, Bruker Optics, Ettlingen, Deutschland
Pyrosil [®] -Beflammungsgerät	FB25, Sura Instruments GmbH, Jena, Deutschland
Autoklav	SteriTop 23L, celitron medical technologies, Budapest, Ungarn
Sterilwerkbank	Safe 2020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	portable pH-Meter, Checker [®] , HANNA instruments, Woonsocket, USA

D.2. Werkstoffe

Silikon (HTV, Referenz)	Silpuran [®] UR 9030/60, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
-------------------------	--

Silikonvernetzer	Silpuran [®] Curing Agent M, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
Silikon (RTV-2)	Silupran [®] UR 3440, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
Silikon (RTV-2)	Silpuran [®] 2430, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
PEG-additivierte RTV-2	Elastosil [®] RT 629, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
Polyethylen (PE)	Dowlex TM 2107GC, The Dow Chemical Company, Midland, Michigan, USA
Polypropylen (PP)	PCGH10, Sabic [®] , Riad, Saudi-Arabien
Polyoxymethylen (POM)	Ticona Hostaform [®] MT24U01, Celanese Corporation, Irving, Texas, USA
Polyamid 6 (PA)	B27E, Ultramid [®] , BASF, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland
Weiches Polyvinylchlorid (PVC-P)	Solmed Medipak CP 3222 cler, Renolit, Worms, Deutschland
Thermoplastisches Elastomer auf Styrol-Basis (TPE-S)	Thermolast [®] M MC/tl, Kraiburg, Deutschland
Thermoplastisches Polyurethan (TPE-U)	Platilon [®] U 4210 AU, Bayer MaterialScience AG, Leverkusen, Deutschland

D.3. Chemische und biologische Substanzen

GF93	Genosil [®] GF93, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
GF20	Genosil [®] GF20, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
PEG-Silan	methoxy(polyethylenoxy)6-9propyl]trimethylsiloxane, chemPUR Feinchemikalien und Forschungsbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PEG-Additiv	PTS-A M1, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
Bariumsulfat	Silpuran [®] AUX 8250 RO, Wacker Chemie AG, München, Deutschland
p-Nitrophenyl-Phosphat Phosphatase Substrat (pNPP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Phospholipiden	Bell and Alton Platelet Substitute, Diagnostic Reagents Ltd., Thame, England
Phospholipiden	C.K. Prest [®] , Diagnostica Stago S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich
Calcium chloride dihydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Sodium Citrate Tribasic Dihydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tris	Molecular biology grade, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Substrat S ₂₂₃₈	Chromogenix S ₂₂₃₈ TM , Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland
Glutardialdehyd 25 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Live/Dead-Lösungen	LIVE/DEAD [®] Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, ThermoFisher Scientific Inc., USA)
DMEM	Dulbecco's MEM Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	Dulbecco Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FBS	fetales Kälberserum Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CCK-8-Lösung	Cell Counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville (MD), USA
Fibrinogen	Fibrinogen Bovine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Thrombin	Thrombin Bovine 1 KU, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BCA-Lösungen	BCA-Assay Kit, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Citrat ACD-A	Vacurette [®] buis, ACD-A, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
70 %-2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 %	CLN GmbH, Freising, Deutschland

E Berechnungen zur Dimensionierung des Portkathetersystems

Für die Berechnung der Übermaßpassung werden die Formel aus [105] entnommen.

Geometrische Maße:

Fügedurchmesser $D_F = 16$ mm

Nabenbreite $B = 4$ mm

Innerer Radius der Injektionskammer $R_K = 5$ mm

Äußerer Radius des Septums $R_S = 7$ mm

Dicke des Septums vor dem Fügen $H_1 = 5,5$ mm

Dicke des Septums nach dem Fügen $H_2 = 4,5$ mm

Innerer Durchmesser der Welle (Kranz) $D_{W,i} = 14$ mm

Äußerer Durchmesser der Nabe (Kammer) $D_{N,a} = 18$ mm

Werkstoffkenngrößen¹:

	Titan Grad 4	Titanlegierung Ti6Al4V
E-Modul E [GPa]	120	113,8
Poissonzahl ν [-]	0,34	0,342
Streckgrenze R_e [MPa]	600	880

Berechnung des Mindestübermaßes:

Minimale Flächenpressung p_{min} :

$$p_{min} = S_R \cdot F_a \times \frac{K_a}{f \cdot \pi \cdot D_F \cdot B} = 2,45 \text{ MPa} \quad (\text{E1})$$

mit $S_R = 2$ ein Sicherheitsfaktor gegen Rutschen, K_a der Anwendungsfaktor und f der Haftbeiwert für die Werkstoffpaarung,

wobei $K_a = 1$, da keine dynamische Kräfte auf das System wirken,

und $f = 0,5$ („worst case“ Abschätzung aus [332]).

F_a ist die Summe der Axialkräfte und setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: der Injektionsdruck $F_{Injektion}$ und die Verformung des Septums F_{Septum} :

$$\begin{aligned} F_a &= F_{Injektion} + F_{Septum} \\ &= 10 [\text{bar}] \cdot \pi \cdot R_K^2 + 3 [\text{MPa}] \cdot \frac{H_1 - H_2}{H_1} \cdot (\pi \cdot R_S^2 - \pi \cdot R_K^2) \\ &= 79 \text{ N} + 45 \text{ N} = 123 \text{ N} \end{aligned} \quad (\text{E2})$$

¹Entnommen aus: http://www.dentaurum.de/files/198-209_Titan_ZT2015_DE_LoRes.pdf (abgerufen am 03.02.2017) und <http://asm.matweb.com/search/SpecificMaterial.asp?bassnum=MTP641> (abgerufen am 03.02.2017)

Mindesthaftmaß Z_{min} :

$$Z_{min} = p_{min} \times D_F \times \left(\frac{1}{E_W} \cdot \frac{1 + Q_W^2}{1 - Q_W^2} - \nu_W + \frac{1}{E_N} \cdot \frac{1 + Q_N^2}{1 - Q_N^2} - \nu_N \right) \quad (E3)$$

$$Z_{min}(Titan) = 0,00525 \text{ mm} \quad Z_{min}(Ti6Al4V) = 0,00554 \text{ mm}$$

wobei $Q_W = \frac{D_{W,i}}{D_F}$ und $Q_N = \frac{D_F}{D_{N,a}}$.

E_W bzw. E_N sind die E-Module der Welle bzw. Nabe.

ν_W bzw. ν_N sind die Poissonzahlen der Welle bzw. Nabe.

Mindestübermaß U_{min} :

$$U_{min} = Z_{min} + 0,8 \cdot (R_{z,W} + R_{z,N}) \quad (E4)$$

$$U_{min}(Titan) = 0,0309 \text{ mm} \quad U_{min}(Ti6Al4V) = 0,0311 \text{ mm}$$

mit $R_{z,W}$ bzw. $R_{z,N}$ die Rauhtiefe der Welle bzw. Nabe. Bei der Fertigung durch Fräsen befindet sich dieser Wert zwischen 8 und 16 μm . Als „worst case“ wird hier der Wert $R_{z,W} = R_{z,N} = 16 \mu\text{m}$ angenommen.

Berechnung des maximalen Übermaßes:

Maximale Flächenpressung p_{max} :

$$p_{max,W} = \frac{1 - Q_W^2}{\sqrt{3}} \cdot \frac{R_{e,W}}{S_B}$$

$$p_{max,W}(Titan) = 27,1 \text{ MPa} \quad p_{max,W}(Ti6Al4V) = 39,7 \text{ MPa} \quad (E5)$$

$$p_{max,N} = \frac{1 - Q_N^2}{\sqrt{3}} \cdot \frac{R_{e,N}}{S_B}$$

$$p_{max,N}(Titan) = 24,2 \text{ MPa} \quad p_{max,N}(Ti6Al4V) = 35,5 \text{ MPa}$$

Hier $S_B = 3$ ist der Sicherheitsfaktor gegen plastische Verformungen. $R_{e,W}$ bzw. $R_{e,N}$ sind die Streckgrenzen der Welle bzw. Nabe. Die Werte von p_{max} zeigen, dass die Nabe (der Kranz) die kritische Stelle ist. Für die weitere Berechnung wird also die Welle (die Kammer) nicht mehr betrachtet.

Maximales Haftmaß Z_{max} :

$$Z_{max} = p_{max} \times D_F \times \left(\frac{1}{E_W} \cdot \frac{1 + Q_W^2}{1 - Q_W^2} - \nu_W + \frac{1}{E_N} \cdot \frac{1 + Q_N^2}{1 - Q_N^2} - \nu_N \right) \quad (E6)$$

$$Z_{max}(Titan) = 0,00519 \text{ mm} \quad Z_{max}(Ti6Al4V) = 0,00803 \text{ mm}$$

wobei $Q_W = \frac{D_{W,i}}{D_F}$ und $Q_N = \frac{D_F}{D_{N,a}}$.

E_W bzw. E_N sind die E-Module der Welle bzw. Nabe.

ν_W bzw. ν_N sind die Poissonzahlen der Welle bzw. Nabe.

Maximales Übermaß U_{max} :

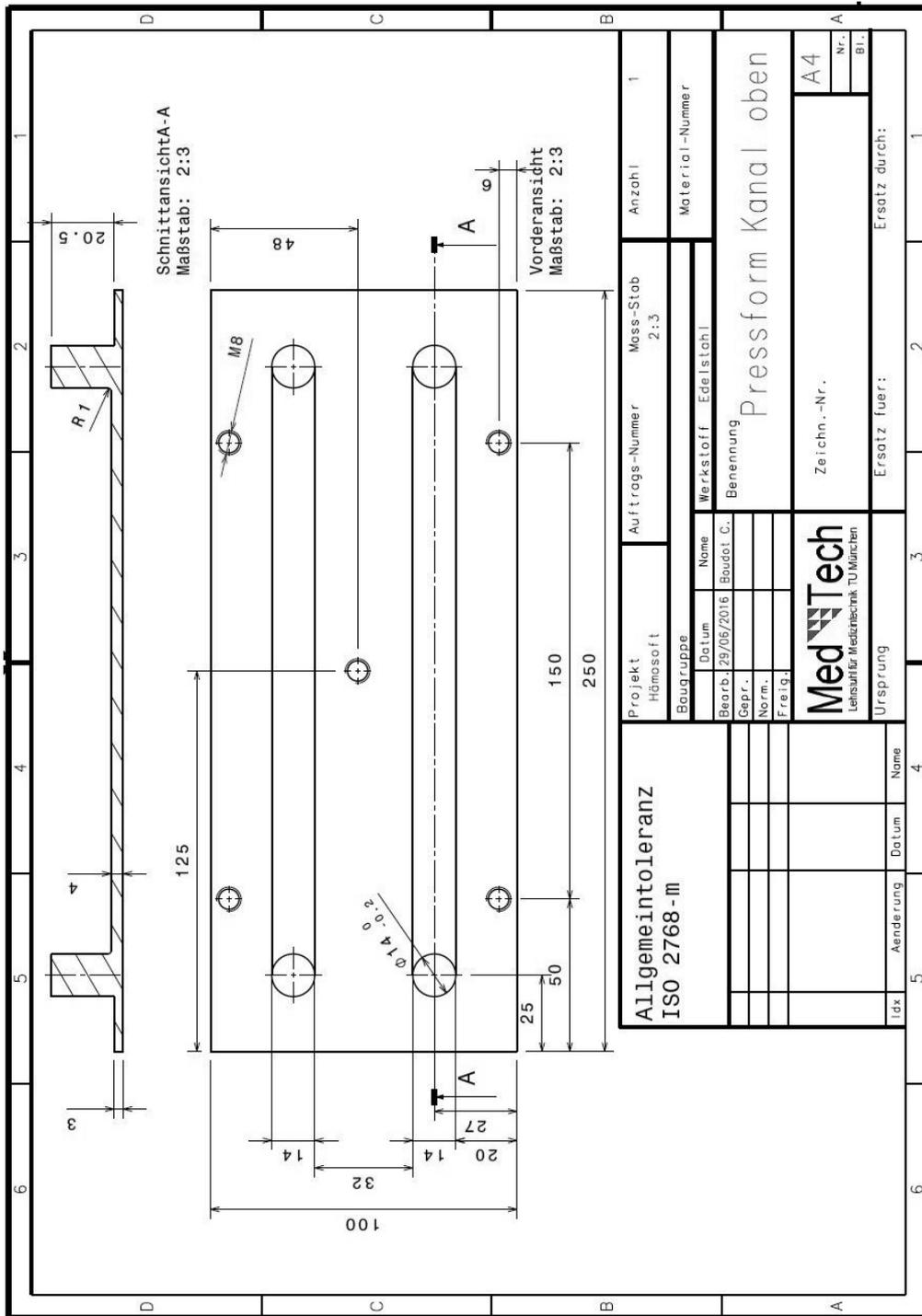
$$U_{max} = Z_{max} + 0,8 \cdot (R_{z,W} + R_{z,N}) \quad (E7)$$

$$U_{max}(Titan) = 0,0647 \text{ mm} \quad U_{max}(Ti6Al4V) = 0,0931 \text{ mm}$$

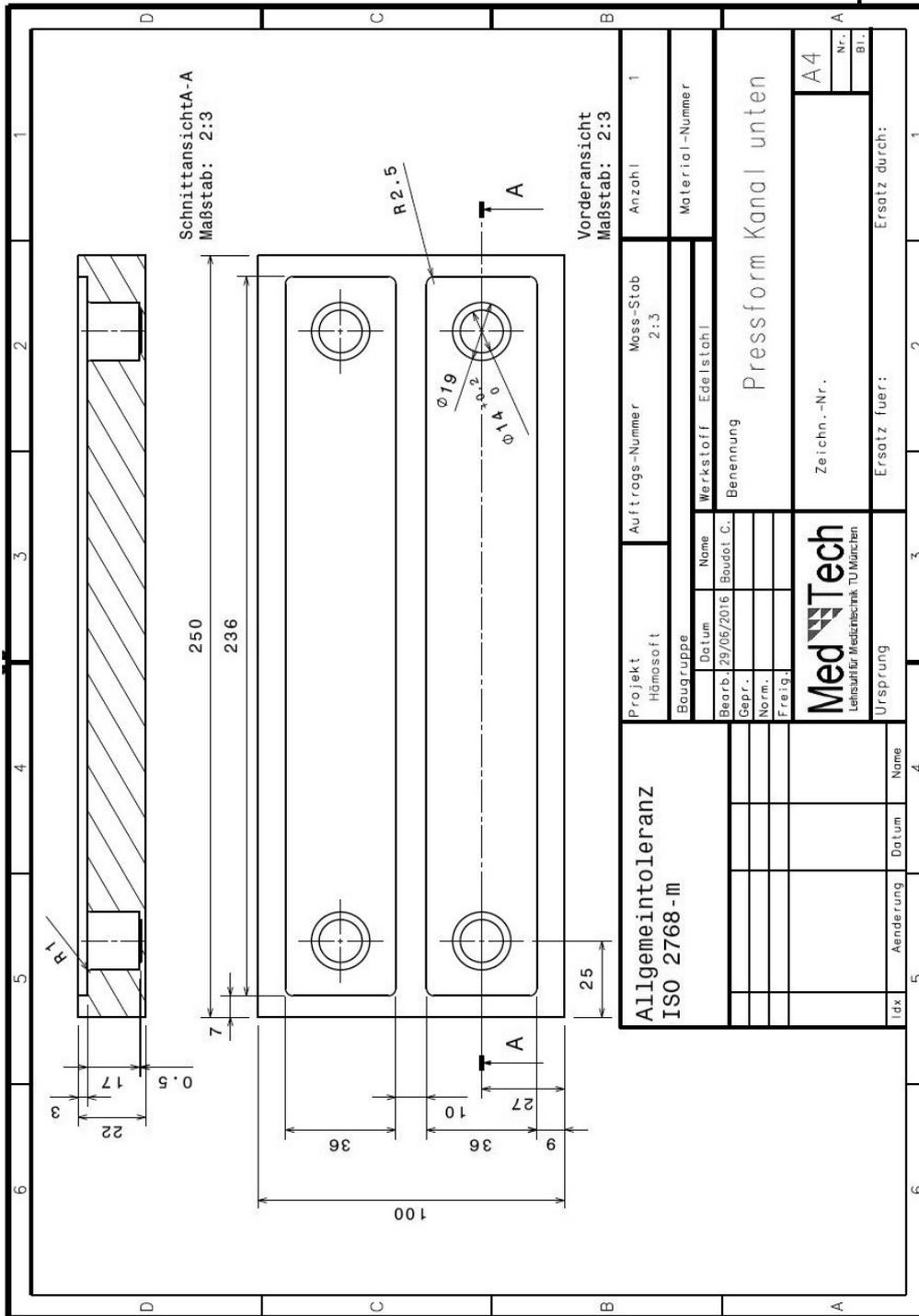
F Konstruktionszeichnungen

F.1. Pressform zur Herstellung von Silikonkanäle (Inkubationssystem)

Obere Hälfte der Pressform

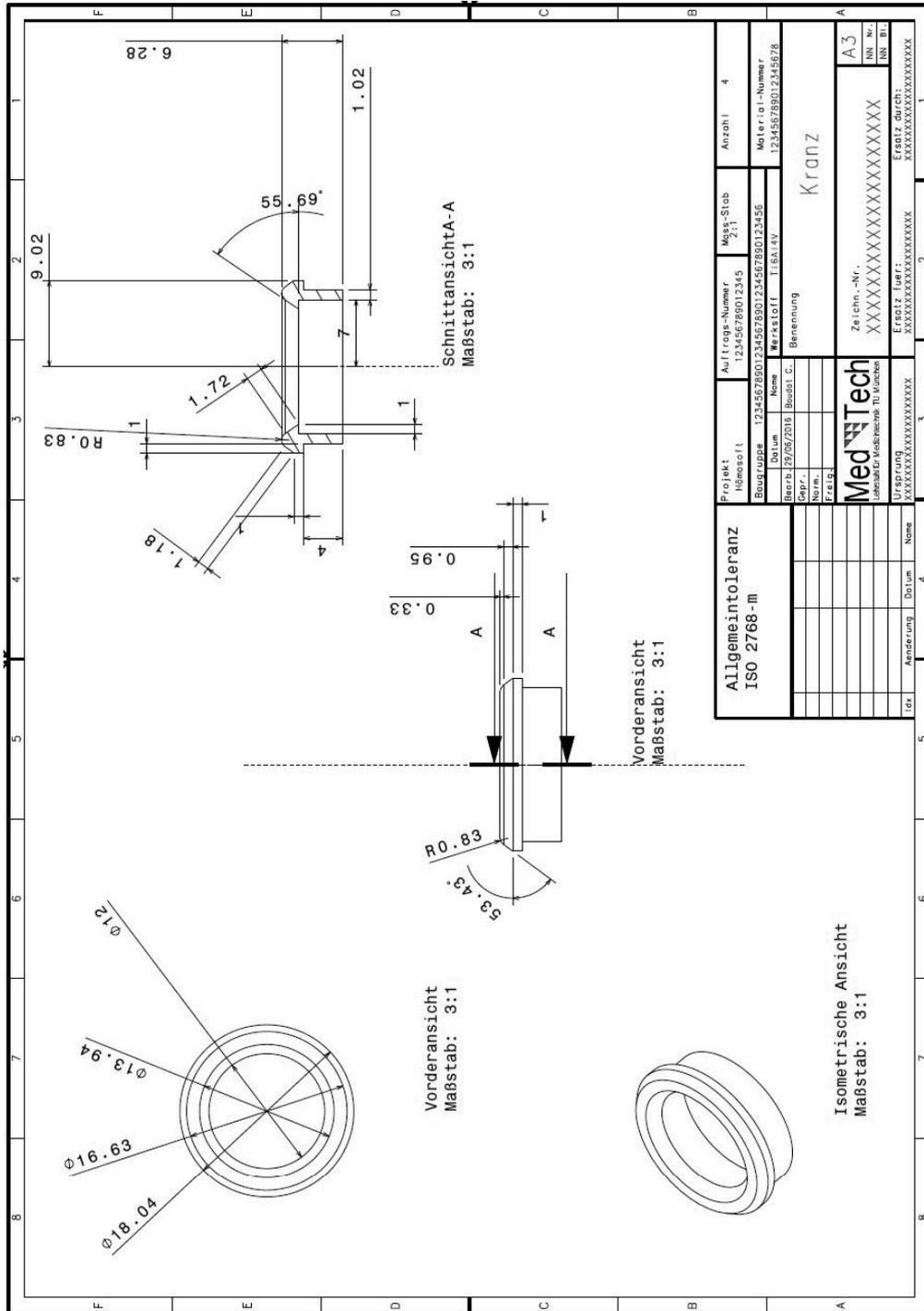


Untere Hälfte der Pressform

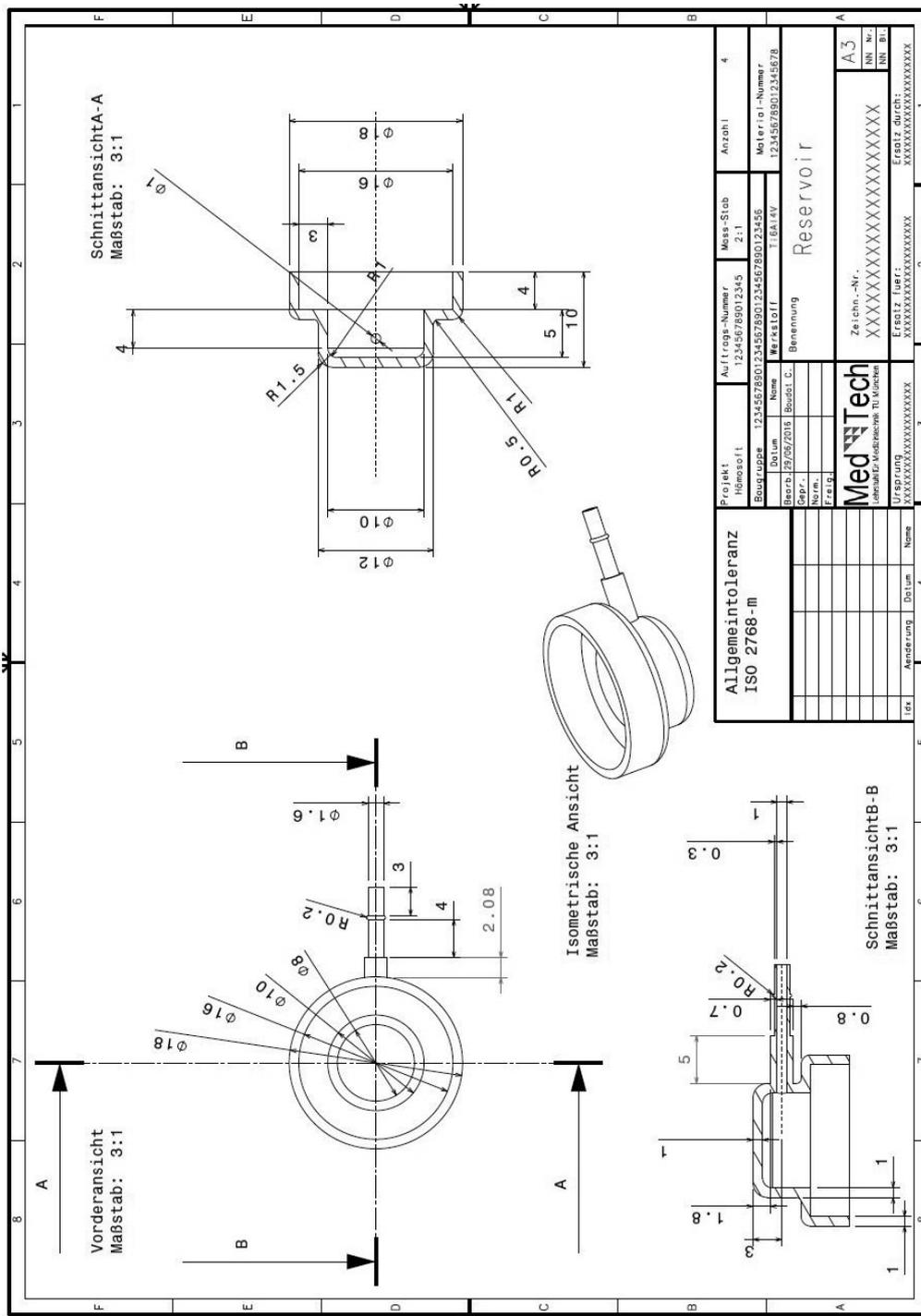


F.2. Metallische Teile des Portkathetersystems

PKS-Kranz

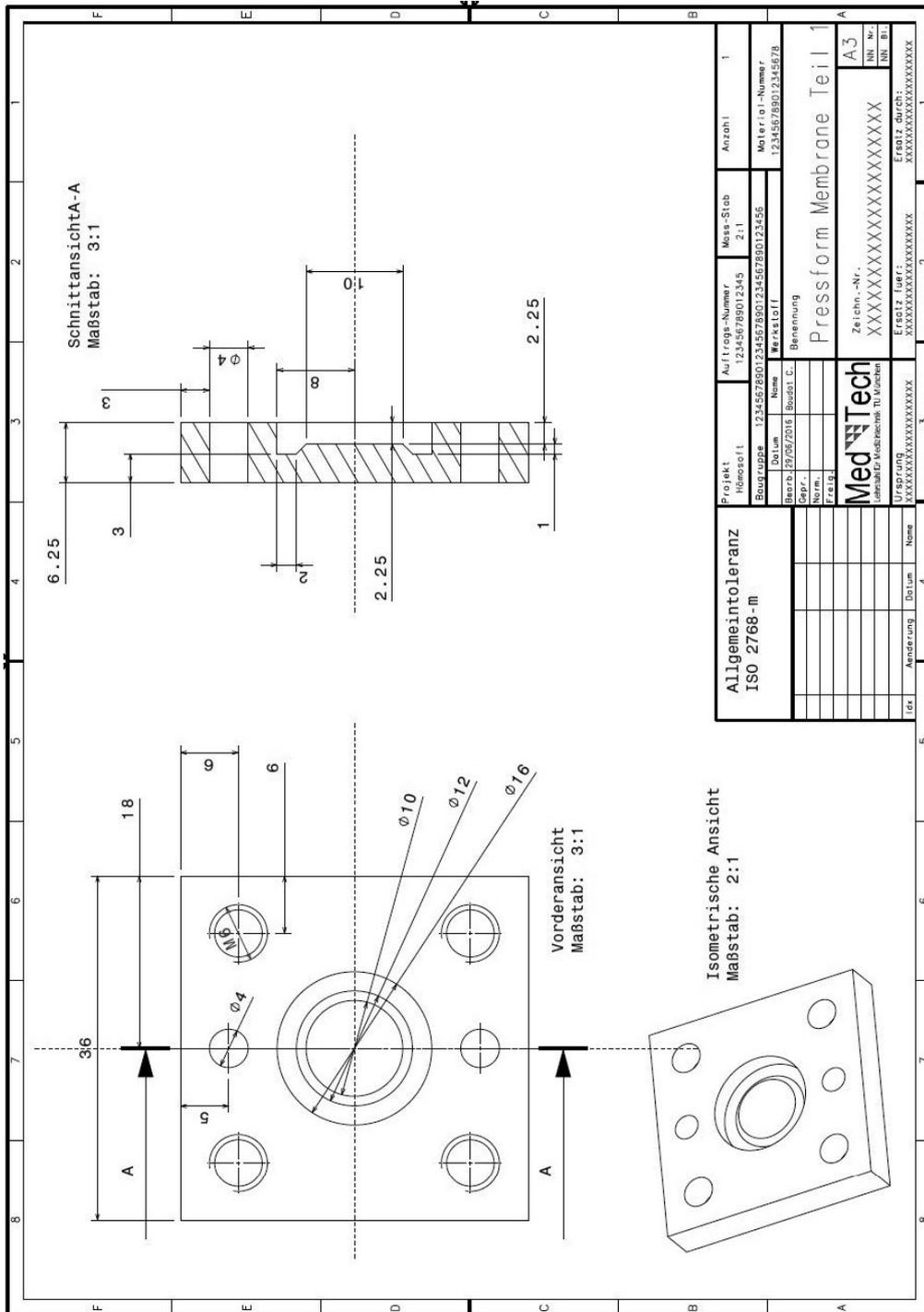


PKS-Kammer

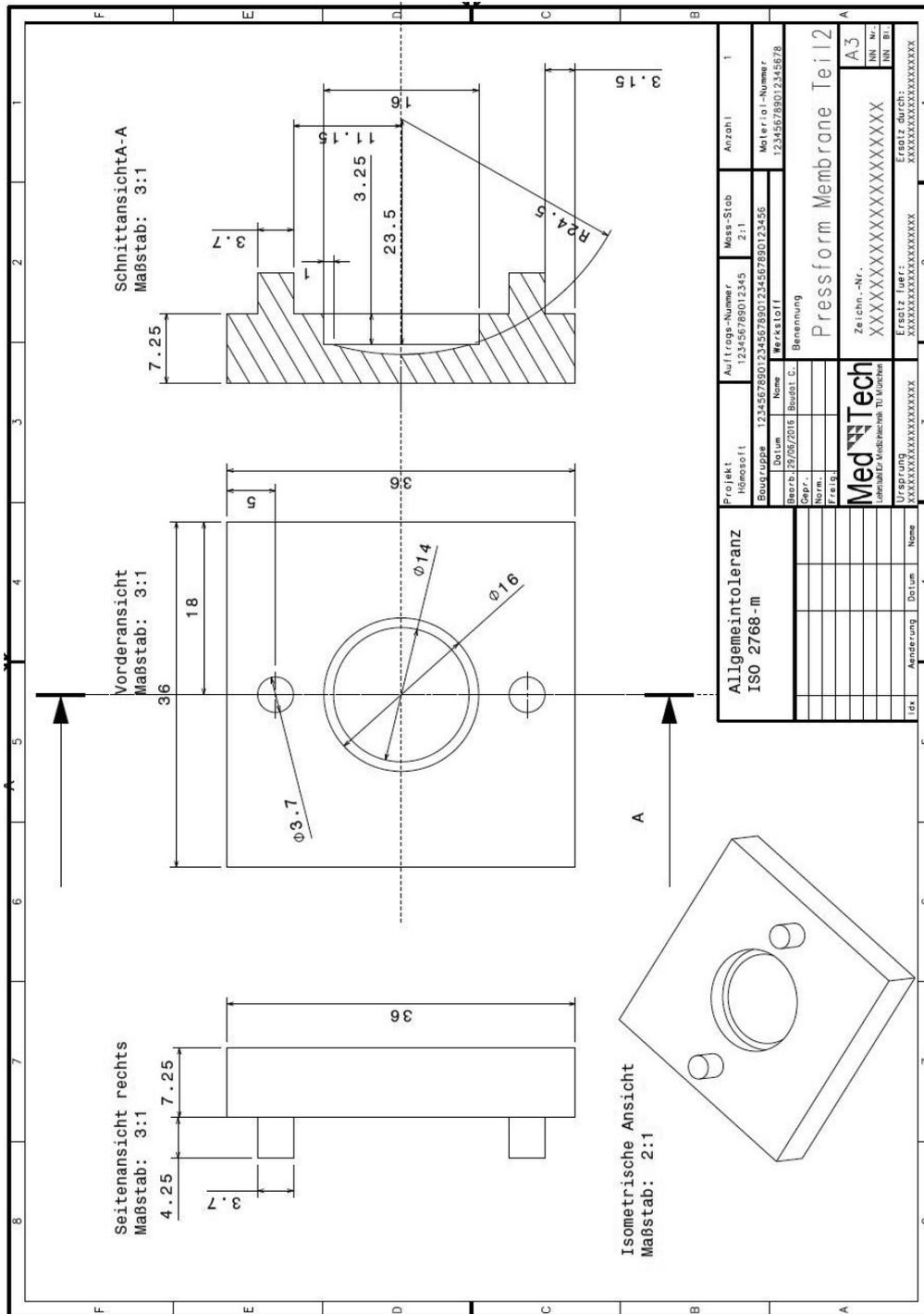


F.3. Pressform zur Herstellung des Silikonseptums

Obere Hälfte der Pressform

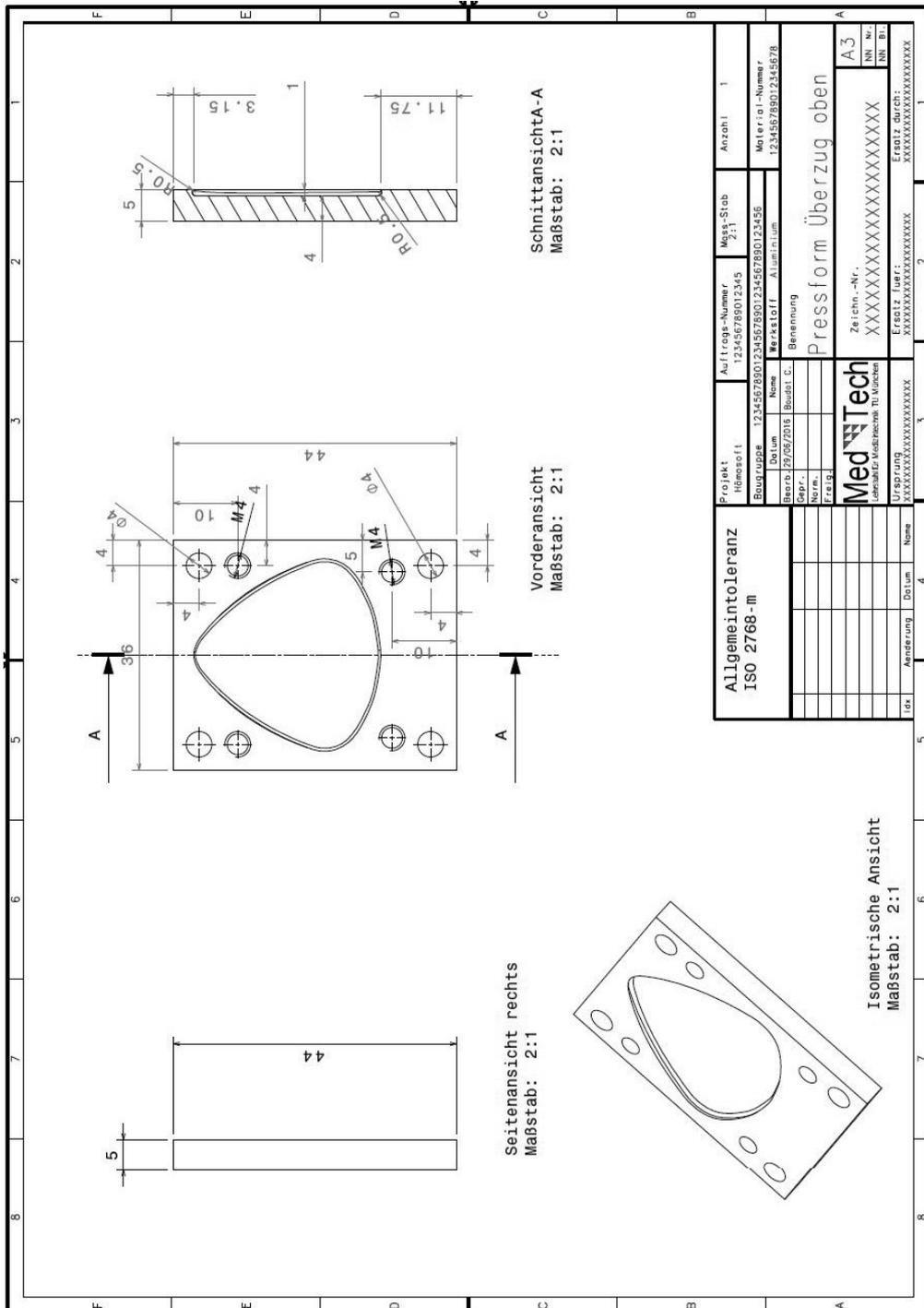


Untere Hälfte der Pressform



F.4. Gussform zur Herstellung des Portgehäuses

Oberes Teil des Gussforms



Unteres Teil des Gussforms

