Aus der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-H. Sievers

Hämokompatibilität verschiedener Oberflächen und deren Beschichtungen einer künstlichen Herzklappe

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Laura Thomassen
aus Kiel
Lübeck, 2017

1. Berichterstatterin / Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Hinrich Sievers
2. Berichterstatterin / Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Janine Pöss
Tag der mündlichen Prüfung:	21.08.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.08.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Epidemiologie....1

1.2 Anatomie des Herzens....1

1.3 Pathophysiologie....2

1.4 Herzklappen-Ersatz....3

1.4.1 Mechanische Herzklappen....3

1.4.2 Biologische Herzklappen....8

1.4.3 Fazit....10

1.5 Zelltypen....10

1.6 Thrombozytenaggregation....12

1.7 Funktionsweise des (Raster-)Elektronenmikroskops....13

1.8 Zielsetzung....13

2 Material und Methoden 15

2.1 Materialien....15

2.2 Testmedium....16

2.3 Probanden....17

2.4 Entwicklung der Methode....17

2.5 Versuchsdurchführung....21

2.6 Statistik....22

3 Ergebnisse 24

3.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung....24

3.2 Hauptversuche....29

3.2.1 On-X Aortic....29

3.2.2 Gold....30

3.2.3 LT1....31

3.2.4 LT1-CA30....32

3.2.5 Vestakeep 400R....33

3.2.6 MOTIS....35

3.3 Statistische Auswertung....36

3.3.1 Box-Plots....36

3.3.2 Friedmann-Test....38
3.3.3 Wilcoxon-Tests....39
3.4 Weitere Zelltypen: Leukozyten & Erythrozyten....39
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse....40

4 Diskussion **42**
4.1 Allgemein....42
4.2 Versuchsdauer....44
4.3 Versuchsdurchführung....45
4.4 Verwendetes Medium....46
4.5 Thrombozytenmorphologie....46
4.6 Auswertung....46
4.7 Materialaufbereitung/-beschaffenheit....48
4.8 Probandenauswahl....49
4.9 Ausblick....50

5 Zusammenfassung **53**

6 Literaturverzeichnis **55**

7 Abbildungsverzeichnis **61**

8 Tabellenverzeichnis **63**

9 Anlagen **64**
9.1 Votum der Ethikkommission....64
9.2 Probandeneinwilligungserklärung....67
9.3 Versuchsprotokoll....72
9.4 Versuchsauswertung aller Daten....73

10 Danksagungen **74**

11 Lebenslauf **75**

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Gesamtzahl der herzchirurgischen Eingriffe im Jahre 2016 belief sich gemäß Beckmann et al. (2017) auf ca. 128.000 Operationen. Vor allem im Bereich der Herzklappenoperationen gab es in den letzten Jahren einen stetigen Zuwachs. So lag die dortige Gesamtzahl der Eingriffe in 2014 bei ca. 31.300 und wuchs in 2016 auf ca. 33.400 Eingriffe pro Jahr. Den Hauptanteil der durchgeführten Operationen machten die reinen Aortenklappenersatz-Operationen mit ca. 11.200 Eingriffen aus. Die In-Hospital-Überlebensrate verblieb hierbei in den vergangenen Jahren bei konstanten 97%. Zusätzlich wurden im gleichen Jahr 1.400 Kombinations-Eingriffe durchgeführt, in denen die Aortenklappe ersetzt sowie die Mitralklappe neu modelliert beziehungsweise ebenfalls ersetzt wurde.

Im Jahr 2016 fanden zudem rund 6217 isolierte Mitralklappenoperationen statt, bei denen der Ersatz bei zwei Drittel der Patienten durch eine Modellierung der patienteneigenen Klappe und bei einem Drittel der Patienten durch das Implantieren einer Prothese vorgenommen wurde.

Insgesamt verzeichnet die Herzchirurgie im Bereich der Herzklappenprothetik einen kontinuierlichen Zuwachs. Im Jahr 1998 belief sich der Anteil an der Gesamtzahl der Herzoperationen auf 14,7%, wohingegen diese in 2016 einen Anteil von 33,8% verzeichnen konnten.

1.2 Anatomie des Herzens

Das Herz ist kegelförmig, als Hohlmuskel ausgestattet und pumpt pulsierend Blut durch alle Körperteile. Die Herzklappen bestimmen dabei die Richtung der Ströme aus Ein- und Auslassventilen gemäß des Prinzips einer Kolbenpumpe.

Das Herz lässt sich funktionell in die linke und die rechte Herzhälfte unterteilen. Beide Hälften bestehen jeweils aus einer Vorkammer (dem Atrium) und einer

Hauptkammer (dem Ventrikel). Von dem linken Ventrikel ausgehend wird sauerstoffreiches Blut über die Aorta in den Körperkreislauf befördert. Anschließend gelangt das sauerstoffarme Blut über die Hohlvene („Vena Cava communis“) und über das rechte Atrium in den rechten Ventrikel. Von hier aus wird das Blut über die Lungenarterien in den Lungenkreislauf gepumpt, gelangt über die Lungenvenen zurück in den linken Vorhof und von dort aus erneut in den linksseitigen Ventrikel. Das Herz arbeitet in einem rhythmischen Wechsel aus Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole).

Zwischen den einzelnen Atrien und Ventrikeln liegen die sogenannten Atrioventrikular-Klappen, auch Segelklappen genannt. Linksseitig befindet sich die zweizipflige Mitralklappe und rechtsseitig die dreizipflige Trikuspidalklappe. Diese bestehen aus feinen Bindegewebshäuten und ragen im geöffneten Zustand trichterförmig in die Ventrikel hinein. Über Sehnenfäden („Chordae tendinae“) sind die Klappen mit den Papillarmuskeln in der Herzspitze verbunden, sodass ein Durchschlagen während der Kontraktion des Herzmuskels verhindert wird.

Die Taschenklappen befinden sich zwischen der Aorta und dem linkem Ventrikel (Aortenklappe) sowie zwischen den Lungenarterien und dem rechtem Ventrikel (Pulmonalklappe). Diese Klappen bestehen aus drei halbmondförmigen Segeln (Schmidt et al. 2011).

1.3 Pathophysiologie

Generell existieren eine Vielzahl von möglichen Herzklappenfehlern. So gibt es angeborene Fehlbildungen wie zum Beispiel nach Meyer (2009) die bikuspide Aortenklappe oder die kongenitale Aortenklappenstenose. Ebenso können beispielsweise durch Infektionskrankheiten oder rheumatische Erkrankungen, insbesondere rheumatisches Fieber, hervorgerufene Entzündungen sowie altersbedingte Veränderungen wie zum Beispiel Kalzifizierungen nach Glasmacher et al. (2008) zu einer Klappeninsuffizienz in unterschiedlicher Ausprägung führen. Die Aortenklappenfehlfunktion ist gemäß des Vorstands der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2007) hierbei am häufigsten vertreten. Sekundär

kann es durch die vorhandenen Insuffizienzen, durch Veränderungen der Druckverhältnisse und Volumenbelastungen in den Ventrikeln zu deren Ausdehnung und längerfristig zu einer Schädigung der Herzmuskulatur kommen, sodass die Indikation zur Klappenersatz-Operation gegeben ist.

1.4 Herzklappen-Ersatz

1.4.1 Mechanische Herzklappen

In den frühen 50er Jahren entwickelten Hufnagel und Harvey die erste mechanische Herzklappe, die aus einem Käfig und einem kugelförmigen Ventil zusammengesetzt wurde. Der Käfig bestand aus Plexiglas, das ein silikonüberzogenes Nylonventil bedeckte. Die Klappe wurde nach Cale et al. (1993) erstmals als Aortenklappenersatz eingesetzt, aufgrund der noch fehlenden Möglichkeit zur extrakorporalen Zirkulation allerdings in die Aorta descendens.

Judson T. Chesterman implantierte nach Schmitz (1991) erstmalig eine mechanische Mitralklappe im Herzen selbst (Abb.1). Sie bestand aus dem Material Perspex (Polymethylmethacrylat), einem transparenten thermoplastischen Kunststoff. Dieser verformt sich erst ab 100°C, ist somit im menschlichen Körper formstabil und gilt bis heute als besonders kompatibel mit menschlichem Gewebe.

Nach Bloom et al. (1991) bestand diese Herzklappe bei der ersten Implantation aus einem äußeren Ring, der an zwei Stellen in den Ring der Mitralklappe vernäht und außerhalb des Herzens an einem Sicherungsknopf befestigt wurde. Zusätzlich gab es im Inneren des Rings ein Flügel- bzw. Kugelsegment.

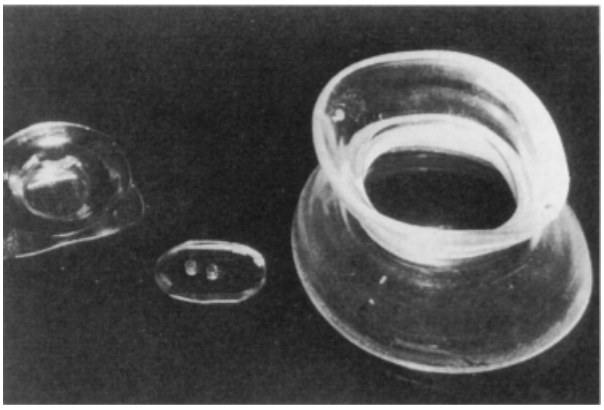

Abb. 1: Herzklappe nach Judson T. Chesterman

Quelle: Norman A., „The first mitral valve replacement“, Annals Thoracic Surgery, (1991)

Der Patient verstarb allerdings 14 Stunden nach der Operation, da die Form der einzelnen Plättchen noch nicht ausgereift und diese so aus ihrer ursprünglichen Position verrutscht waren. Eine funktionstüchtige Klappe war nicht mehr gegeben.

Das eigentliche Käfig-Kugel-Ventil wurde nach Matthews (1998) von Starr und Edwards entwickelt (Abb. 2). Zuerst benutzten diese das Material Teflon, das als besonders athrombogen gilt. Hieraus wurde ein Ring mit mittlerer Strebe entwickelt, in den zwei Silikonflügel eingehängt wurden. Beide Flügel waren allerdings im Tierversuchsmodell nach wenigen Tagen vollkommen mit Thromben überzogen, da sich diese direkt an den Nähten anlagern konnten und über die Flügel wuchsen.

Aus diesem Problem resultierte die Idee eines kugelförmigen Ventils. Hierbei sollte das kugelförmige Innensegment nicht fest mit dem äußeren Ring verbunden sein, da dieses so nahezu ununterbrochen rotieren kann und einen selbstreinigenden Effekt aufweist. Es wurde den Thromben damit keine Möglichkeit gegeben in Länge und Breite zu wachsen. Der umgebende Käfig bestand aus Plexiglas, die Kugel aus Silikon.

Später wurden weitere Modifizierungen wie zum Beispiel in Form eines stoffüberzogenen Käfigs entwickelt, der aus athrombogenen Materialien bestand.

So wurde unter anderem der erste rostfreie Stahlkäfig entwickelt und in Patienten implantiert (Matthews 1998).

Abb. 2: Starr/Edwards Kugel-Klappe mit Metallkäfig

Quelle: https://www.ohsu.edu/custom/library/digital-collections/items/show/12566 (abgerufen am 15.10.2017)

Bereits diese Patienten begannen postoperativ mit der lebenslangen Einnahme von antikoagulanten Arzneimitteln, um eine Blutgerinnselbildung zu vermeiden. In den Jahren von 1960 bis 1998 erhielten ca. 175.000 Menschen eine Herzklappe nach dem Starr-Edwards-Prinzip (Matthews 1998).

Da allerdings durch die große Kugel bedingte Abflussstörungen des linken Ventrikels und somit Funktionsbeeinträchtigungen, z.B. in Form von Insuffizienzen, entstehen konnten, wurde als weitere Neuerung das Kippscheibenventil entwickelt. Hierbei diente eine flache Scheibe innerhalb eines niedrigen Käfigs als Klappenersatz. Diese Methode wurde nach Viking et al. (1985) im Jahr 1969 von Bjork-Shiley entwickelt (Abb. 3).

Der Blutstrom wurde zentralisiert und die Querschnittsfläche der Öffnung deutlich erhöht. Die Kippscheibe bestand aus Kohlenstoff und der Ring aus „Haynes 25“, einer Legierung aus Kobalt, Chrom, Wolfram und Nickel.

Dennoch brachte auch die Björk-Shiley-Herzklappe einige Nachteile, z.B. in Form von Thrombenbildung und Bügelbrüchen mit sich (Schmitt 2009).

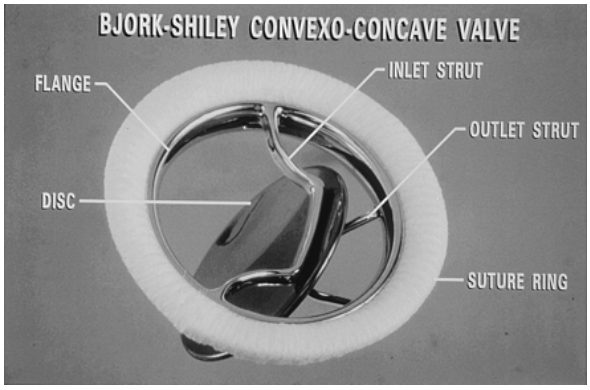

Abb. 3: Björk-Shiley-Klappe

Quelle: Walker et al., Patient Factors Associated With Strut Fracture in Björk-Shiley 60° Convexo-Concave Heart Valves“, American Heart Society Journals, (1995)

Als Weiterentwicklung gilt die „St. Jude Medical“-Doppelflügelprothese (Abb. 4), die nach Voigt (2011) im Jahr 1977 erstmals vorgestellt wurde und heutzutage primär verwendet wird.

Bei dieser Prothese öffnen sich die Türflügel nahezu parallel zum Blutstrom und ermöglichen so einen sehr geringen Strömungswiderstand. Zusätzlich wird ein zentraler Blutstrom gesichert, der eine maximale Entlastung des Herzmuskels bedingt. Die Schwachstellen dieser Konstruktion sind die scharnierartigen Verbindungen zwischen Flügeln und äußerem Ring, die eine bakterielle Besiedlung und die Entstehung von Thromben begünstigen (Hensler 2009).

Abb. 4: Doppelflügelprothese

Quelle: https://www.sjm.com/~/media/galaxy/hcp/featured-products/structural-heart/st-jude-medical-regent/regent-2.jpg (abgerufen am 10.12.2017)

Trotz aller Modellierungsversuche und Tests neuer Materialien blieben alle bisher eingesetzten mechanischen Herzklappen durch die hämodynamische Änderung und besondere Oberflächenstruktur thrombogen. Patienten mit transplantierter Herzklappe müssen somit eine lebenslange Antikoagulationstherapie mit Phenprocoumon (Marcumar) oder Warfarin durchführen, die der Bildung von Thromben entgegenwirkt und so das Risiko von Embolien senkt. Das Arzneimittel Phenoprocoumon verhindert zwar effektiv die Bildung von Thromben, begünstigt allerdings nach Schulte (1987), Niederera (2001) und Voigt (2011) die Blutungsneigung. So treten nach kleinsten Verletzungen schnell Hämatome auf; auch Zahnfleischblutungen, Blut im Urin und Leberentzündungen zählen zu den bekanntesten Nebenwirkungen. Insbesondere für Bluthochdruckpatienten besteht eine hohe Gefahr von Blutungen. Als gelegentliche Nebenwirkungen sind ebenfalls Blutungen im Bereich der Bauchspeicheldrüse, der Nebenniere, des Rückenmarks und des Gehirns sowie Netzhautblutungen, Blutungen im Herzbeutel und im Magendarmtrakt, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Juckreiz gelistet. Etwa ein Achtel aller Blutungen bei unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen ist nach Schmiedl et al. (2013) auf die Einnahme von Marcumar zurückzuführen. Der Kinderwunsch sollte abgeschlossen sein, da das Präparat nach Heilmann et al. (2001) eine teratogene Wirkung besitzt und in den fetalen Blutkreislauf übertritt.

1.4.2 Biologische Herzklappen

Generell unterscheidet man nach Saß (2007) vier verschiedene Gruppen von biologischen Herzklappen. Zum einen die Xenografts, bei denen es sich um denaturierte Aortenklappen aus Schweine- oder Rinderperikard handelt (Abb. 5), welche in (Metall-)Gerüste verstärkte Klappen (Stent-Bioprothesen) und gerüstfreie Klappen (Stentless-Bioprothesen) unterteilt werden können und zum anderen die Homografts, die aus humanen Aorten- oder Pulmonalklappen gewonnen werden. Als weitere Form besteht die Möglichkeit des Klappenersatzes durch autologes Gewebe. Hierbei wird Gewebe aus dem Perikard, der „Fascia lata“ oder der Pulmonalklappe im Rahmen der Ross-Operation zu einem Klappenersatz umgestaltet (Sievers et al. 2006).

Die erste von Binet et al. (1965) in Frankreich implantierte biologische Herzklappe war eine Aortenklappe eines Schweins, also ein Xenograft. Der limitierende Faktor in der Verwendung beruhte auf dem Prozess der Kalzifizierung des biologischen Materials. Die Kalkeinlagerungen führten zur Unbeweglichkeit und zunehmenden Porosität der Klappen. Es bestand zudem ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von Stenosen. Hierfür scheint ein ähnlicher Pathomechanismus wie bei der Artherossklerose verantwortlich zu sein (Colli et al. 2007). Im Mittel ist nach Funkat et al. (1997) eine erneute Operation mit Herzklappenersatz nach zehn bis zwölf Jahren notwendig. Aufgrund der Degeneration der Klappe finden sich nach Hoffmann et al. (2008) im Laufe der Zeit herabgesetzte Strömungseigenschaften, die ebenfalls eine Klappenreposition indizieren.

Homologe Herzklappen wurden erstmals nach Schmitt (2009) im Jahr 1956 von Murray eingesetzt. Ross und Somerville entwickelten dieses Verfahren zehn Jahre später weiter. Die entnommenen Klappen werden hierbei so kyrokonserviert, dass die Vitalität der Zellen durch ein schonendes, langsames Abkühlen erhalten bleibt. Die Haltbarkeit der homologen Klappen ist begrenzt aufgrund von Kalkeinlagerungen, Wassereinlagerungen durch den Kühlprozess, ischämisch bedingte Schäden auf zellulärer Ebene und der eventuell eintretenden Abstoßungsreaktion des Immunsystems des Empfängers.

Bereits 1962 entwickelte Senning (1970) aus einem Streifen der „Fascia lata“ eine Aortenklappe. Fünf Jahre später publizierten Ross und Spencer die autologe Pulmonalklappe als Ersatz der Aortenklappe (Sievers 2000). Da sich beide Klappen sowohl morphologisch als auch hämodynamisch ähneln, sind diese gleichermaßen für einen Ersatz geeignet. Zusätzlich besitzt nach Grübler (2006) die autologe Pulmonalklappe die einzigartige Eigenschaft ein Wachstumspotenzial vorzuweisen, das die Klappe besonders zur Transplantation bei Kindern qualifiziert. Die fehlende Pulmonalklappe in ihrer ursprünglichen Position wird durch einen Homograft ersetzt. Durch die Verwendung von körpereigenem Gewebe entfällt die Behandlung mit antikoagulativ wirksamen Arzneimitteln. Generell ist diese Methode allerdings ebenfalls durch die auftretende physiologische Kalzifizierung des Gewebes, der Bildung von Stenosen sowie der Kollagenfaserdegeneration limitiert. Des Weiteren muss beachtet werden, dass die durch einen Homograft ersetzte Pulmonalklappe ebenfalls nach einigen Jahren erneuert werden muss. So waren also bereits Mitte der 60er Jahre sowohl mechanische als auch biologische Herzklappen im Einsatz.

Abb. 5: Biologische Herzklappe aus Rinderperikard

Quelle: http://www.medicalexpo.de/prod/edwards-lifesciences/product-77962-473614.html#product-item_473624 (abgerufen am 11.12.2017)

1.4.3 Fazit

Der größte Unterschied zwischen den biologischen und den mechanischen Herzklappen ist der Einsatz von gerinnungshemmenden Medikamenten. Der Nachteil der biologischen Klappenersätze besteht allerdings in der geringeren Haltbarkeit im Vergleich zu den synthetisch hergestellten Prothesen.

Folglich wäre es von enormen Mehrwert für die Patienten eine Klappe so zu konstruieren, dass die Haltbarkeit auf lange Zeit gewährleistet wird und keine medikamentös bedingten Nebenwirkungen Einschränkungen in der Lebensqualität erwirken. Die Entwicklung eines mechanischen Klappenersatzes mit entsprechend modifizierter Beschichtung und Oberfläche, der die Verwendung von Antikoagulanzien wie Marcumar obsolet macht oder nur ein mit reduzierten Nebenwirkungen behaftetes Medikament wie zum Beispiel Aspirin als Begleittherapie benötigt, wäre erstrebenswert.

In der Klinik für Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie wird im Rahmen eines Forschungsprojektes mit Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Förderkennzeichen 13GW0055B) und in Kooperation mit den privaten Unternehmen der DOT GmbH (Rostock, Deutschland) und der H&H Gesellschaft für Engineering und Prototypenbau mbH (Leopoldshöhe, Deutschland) eine dreiflüglige mechanische Herzklappe entwickelt. Im Rahmen dieses Projektes werden verschiedene Aspekte wie die Geometrie der Klappen und der Flügel, die verwendeten Materialien, die Implantierbarkeit und die Thrombogenität untersucht.

1.5 Zelltypen

Das hinsichtlich der Thrombogenität zu untersuchende Material sind Zellen, welche auf den unterschiedlichen Materialien anhaften. Erythrozyten (Abb. 6) sind kernlose, flachkonkave Blutkörperchen mit einer Größe von ca. 6-8 µm, die primär dem Sauerstofftransport dienen (Schmidt et al. 2011).

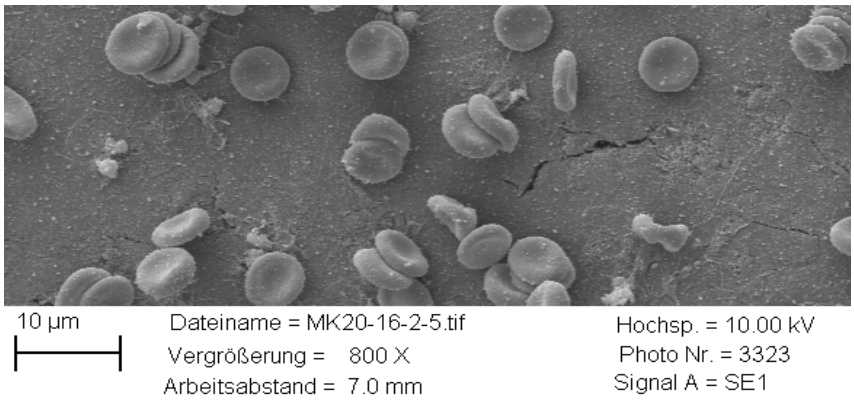

Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Erythrozyten

Leukozyten sind kernreiche, kugelförmige weiße Blutkörperchen mit einer Größe von ca. 7 µm bei Lymphozyten und ca. 20 µm bei Monozyten. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems (Abb. 7).

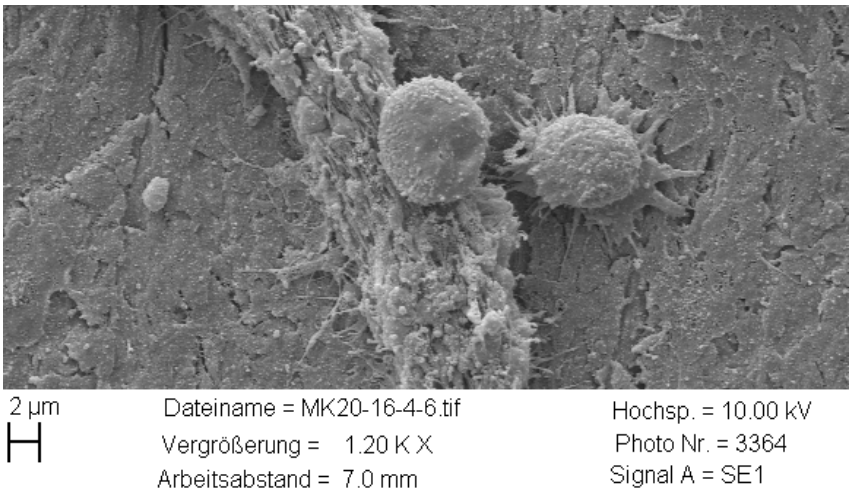

Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Leukozyten

Am interessantesten für die vorgelegte Studie sind die Thrombozyten (Abb. 8), die einen Durchmesser von 1,5 - 3 µm haben und maßgeblich für die Bildung von Thromben verantwortlich sind. In der DIN EN ISO 10993-4 (2017) wird unter anderem die Thrombozytenanzahl und -adhäsion als Prüfverfahren für implantierbare Medizinprodukte aufgeführt.

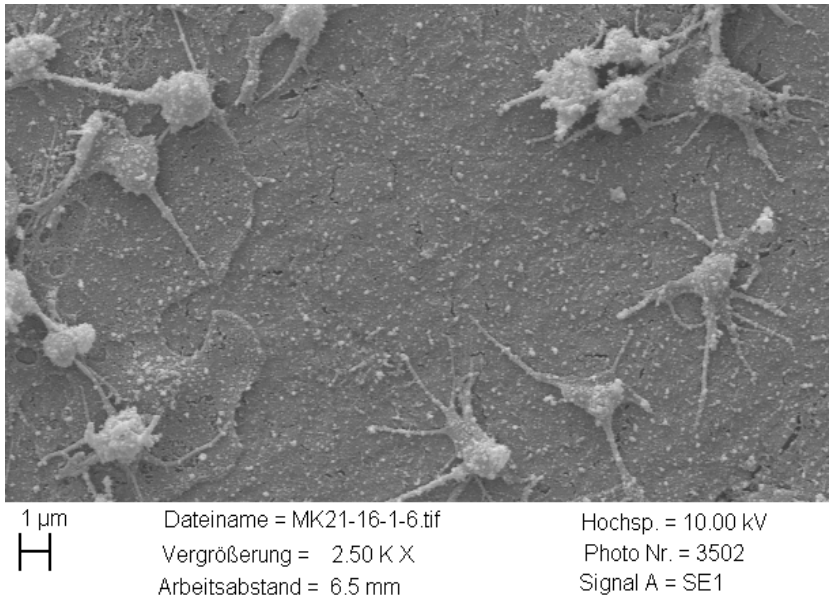

Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten und deren Ausbildung von Pseudopodien

1.6 Thrombozytenaggregation

Physiologisch kommt es nach Brown et al. (1975) und Tischer (2008) bei einer Membranverletzung eines Gefäßes zur Aktivierung der Thrombozyten. Das Gefäßendothel ist mit dem „von-Willebrand-Faktor“ ausgekleidet. Die Thrombozyten wiederum besitzen einen spezifischen Glykoproteinrezeptor mit dem sie sich an die Gefäßwand anheften. Dieser Vorgang ermöglicht weiterhin die Bindung der Thrombozyten an freigelegtes Kollagen. Aufgrund dieser Aktivierung der Blutplättchen ändern die Thrombozyten durch Umgestaltung ihres Cytoskeletts und der damit einhergehenden Ausbildung von Pseudopodien ihre Form, aus der eine deutliche Oberflächenvergrößerung resultiert. Dieser Vorgang wird ebenfalls bei Kontakt mit Fremdoberflächen beobachtet.

Durch die Ausschüttung aggregationsfördernder Substanzen wird letztendlich die intrazellulär ablaufende Arachidonsäurekaskade in Gang gesetzt, in der Arachidonsäure mittels konstitutiv exprimierter Cyclooxygenase (COX-1) über Zwischenstufen unter anderem zu dem potenten Aggregationsförderer Thromboxan-A2 umgesetzt wird. Die Thrombozyten selbst haben Rezeptoren für

diesen Botenstoff, sodass die Aggregation verstärkt wird. Durch diese Verstärkung kann nun Fibrinogen vermehrt an den freiliegenden Kollagenfasern binden, sodass sich die Thrombozyten quervernetzen können. Durch weitere molekularchemische Vorgänge und Faktorenaktivierung kommt es zur Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

Thrombin wiederum spaltet Fibrinogen zu Fibrin. Im entstandenen Netz aus Fibrin und Thrombozyten lagern sich auch weitere Blutbestandteile wie z.B. Erythrozyten an. Physiologischerweise würde nach Baumgartner et al. (1976), Morgenstern (1999) und Harbrecht (1999) während der Gefäßwandwiederherstellung Plasmin sezerniert, das den Thrombus durch Fibrinolyse des Fibrins auflöst.

1.7 Funktionsweise des (Raster-)Elektronenmikroskops

Ein Elektronenmikroskop bildet die Oberfläche eines Objekts mittels Elektronen ab. Die Auflösung ist hierbei deutlich höher gegenüber der eines Lichtmikroskops, da die Wellenlänge von Elektronen deutlich kürzer als die des Lichts ist. So können Strukturen bis zu einer minimalen Größe von etwa 0,1 nm dargestellt werden. Beim Rasterelektronenmikroskop scannt ein feiner Elektronenstrahl die Ober-fläche des Objekts rasterförmig ab. Fällt dieser Elektronenstrahl auf ein Objekt, wird der reflektierende Strahl verstärkt und mittels eines Detektors analysiert. Mit Hilfe elektrostatischer Linsen wird das Bild vergrößert und ermöglicht eine feinere Auflösung.

Das Elektronenmikroskop stellt aufgrund der geringen Größe der einzelnen Zellen die optimale Wahl zur weiteren Analyse dar.

1.8 Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie ist eine adäquate Oberflächenbeschaffenheit und -beschichtung einer künstlichen mechanischen Herzklappe zu bestimmen, die eine möglichst geringe akkumulative Wirkung erreichen und so eine bisher erforderliche gerinnungshemmende Dauermedikation vermeiden kann.

In der hier vorgelegten Studie sollen zwei unterschiedliche Polyetheretherketone, zwei Varianten davon mit Kohlefaserverstärkung und eine Variante mit Goldbesputterung, als Flügelmaterial für eine neu entwickelte Herzklappe getestet werden. Zusätzlich wird eine Versuchsreihe mit pyrolytischem Karbon als handelsübliches Vergleichsmaterial durchgeführt.

Nach entsprechender Aufbereitung wurden die Proben elektronenmikroskopisch untersucht und die Anzahl der anhaftenden Zellen ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

In dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Polyetheretherketone (PEEK) „Evonik i4“ (Material: Vestakeep 400R, Firma Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) und „Invibio Optima“ (Material: LT1, Firma Invibio Inc., Lancashire, England) getestet. Zwei Varianten davon mit Kohlefaserverstärkung (Materialien: MOTIS (Firma Evonik Industries AG, Essen, Deutschland) und LT1-CA30 (Firma Invibio Inc., Lancashire, England)). Pyrolytisches Karbon diente als handelsübliches Vergleichsmaterial (Handelsname: „On-X Aortic“, Firma Cyrolife, Freiburg, Germany). Zusätzlich wurde das Material „PEEK“ (LT-1) mit einer Schicht von 5 nm Gold besputtert und diente so als neues Material (Tabelle 1), das bisher im Bereich der Herzklappenentwicklung noch nicht zum Einsatz kam.

Invibio Optima wurde nach Green et al. (2014) als erstes PEEK-Implantat 1999 verwendet. Es gilt nach Kurtz et al. (2012) und Nedjat (2014) als sehr hitzestabil und weist eine gute Biokompatibilität auf (nach DIN EN ISO 10993-1/-4 getestet). Das Material Vestakeep 400R der Firma Evonik besitzt gute mechanische und tribologische Eigenschaften und ist von der Zusammensetzung vermutlich vergleichbar. Eine genaue Listung aller Inhaltsstoffe und deren Verarbeitung ist bei beiden Materialien Internum des Herstellers. Die Kohlefaserverstärkung des Materials erhöht die mechanische Festigkeit, begünstigt jedoch möglicherweise das Problem, dass die Kohlefasern beim Zuschneiden der Herzklappenflügel an die Oberfläche treten. Diese strukturelle Veränderung der Oberfläche könnte eine Auswirkung auf die Anbindung von Zellen haben.

Pyrolytisches Karbon wird nach Okazaki et al. (1996) seit den 60er Jahren in mechanischen Herzklappen verbaut und wurde als Vergleichsmaterial getestet. Die On-X-Aortic-Herzklappe gehört zu den Zweiflügelklappen. Das Grundmaterial stellt hierbei Graphit dar, das mit Carbon umhüllt ist. Seit den 90er Jahren wird laut Hersteller bei der Verarbeitung komplett auf Silikon verzichtet.

Aufgrund der langen Fertigungsdauer und nach Kalkulation des Projektetats wurden pro Material jeweils sechs Testobjekte hergestellt.

	Firma	Materialname
1.	Evonik	Vestakeep 400R
2.	Invibio	LT-1
3.	Invibio	LT-1 CA-30
4.	Evonik	MOTIS
5.	Invibio	LT-1 + 5nm Gold
6.	Cryolife	On-X Aortic

Tabelle 1: Übersicht der Materialien

2.2 Testmedium

Im Rahmen des Projektes wurde ein Ethikantrag bei der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (siehe Anhang, Aktenzeichen 16-131) für die Versuchsreihe dieser Studie gestellt und genehmigt. Es sollten 50 ml Blut von Patienten verwendet werden, die operativ in der Uniklinik Lübeck versorgt werden und an eine Herzlungenmaschine angeschlossen sind. Das benötigte Volumen an Blut befindet sich üblicherweise als Rest in den Schlauchsystemen der Maschine. Es besteht zwar heutzutage die Möglichkeit, dies dem Patienten zurückzuführen, jedoch ist die Menge so gering, dass die Entnahme für Versuchszwecke keinen Unterschied darstellen sollte. Das Blut wird ausschließlich entnommen, wenn der Patient eine absolut stabile Kreislaufsituation aufweist.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung der Methode stellte sich allerdings heraus, dass das Patientenblut wegen der individuell verschiedenen Medikamentengaben als ungeeignet bzw. nicht einheitlich genug für die Versuche einzustufen ist.

2.3 Probanden

Für die vorgelegte Studie wurden sechs klinisch gesunde Probanden ausgewählt, die keine blutverdünnenden Medikamente zu sich nahmen und vorab einen Aufklärungsbogen samt Einwilligungserklärung erhielten. Die Probanden befanden sich im Alter von 27 bis 55 Jahren und beide Geschlechter waren vertreten. Das Volumen von 50 ml wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen abgenommen und direkt in die Versuchsapparatur überführt.

Proband	Geschlecht	Geburtsjahr	Medikamenteneinnahme in den letzten 7 Tagen
1	männlich	1962	keine
2	männlich	1983	keine
3	weiblich	1986	keine
4	weiblich	1974	keine
5	weiblich	1965	keine
6	weiblich	1990	keine

Tabelle 2: Übersicht der Probanden

2.4 Entwicklung der Methode

Im ersten Schritt galt es die Darstell- und Auswertbarkeit von Zellen unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskops zu prüfen. Generell ist das Elektronenmikroskop nach Okazaki et al. (1995) und Minelli et al. (2011) insbesondere zur Darstellung von Strukturveränderungen von Zellen geeignet.

Glas gilt nach Reginald et al. (1971) als besonders thrombogenes Material, sodass handelsübliche Objektträger als erstes Versuchsmaterial dienten. Zusätzlich sollte vorab getestet werden in welcher Schichtdichte Zellen voneinander isoliert auf dem Bild eines Elektronenmikroskops betrachtet werden können oder ob es zu Überlagerungen kommt. So wurde auf einem Objektträger

ein Tropfen Blut einer Testperson aufgetragen, auf einem anderen wurde ein Blutausstrich angefertigt. Diese Proben wurden mit einer Phosphorpuffersalz-Lösung (PBS) und einer Ethanol-Austausch-Reihe gewaschen. So sollte die morphologische Struktur der Zellen erhalten bleiben. Die Proben wurden unter Luftausschluss in einem Inkubator gelagert. Vor der Rasterung im Elektronen-mikroskop mussten die Proben besputtert werden, da ansonsten eine mögliche positive Aufladung der Oberfläche einen nur schwachen Elektronenrückstrahl verursachen könnte und eine minderwertige Bildqualität zur Folge hätte. Hierfür wird Gold mit einer Schichtdicke von 5 nm aufgetragen. Die Aufnahmen für den ersten Vorversuch wurden an der Universität Rostock im Auftrag des Kooperationspartners der DOT GmbH angefertigt.

Für alle weiteren Versuche bestand die Versuchsapparatur aus einem Teflonbehältnis (Abb. 9) mit einem Durchmesser von 4,5 cm. In diesem Becher sollte das Probandenblut mit einem Volumen von 50 ml hineingegeben werden. Der Deckel des Bechers war mit sechs einzelnen, nach unten in das Lumen hineinragenden Stäbchen versehen, an denen jeweils das zu untersuchende Material eingespannt werden konnte. Die gesamte Apparatur befand sich auf einem Magnetrührer, der eine wärmende Platte mit konstanter Körpertemperatur von 37,0°C besaß und eine Rührgeschwindigkeit von 420 mm/s aufwies (Abb. 10). Dies sollte die im Körper vorhandene Strömung nahezu widerspiegeln.

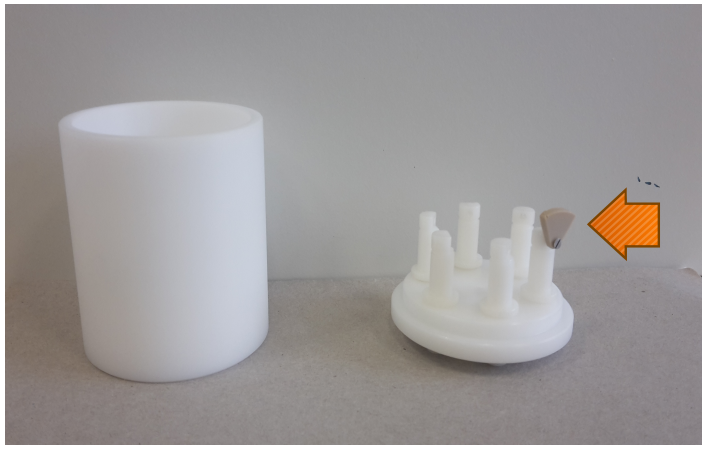

Abb. 9: Versuchsaufbau Teil 1 mit eingespannter Probe (Pfeil)

Abb. 10: Versuchsaufbau Teil 2, Teflontiegel inklusive Deckel mit eingehängten Proben auf Magnetrührgerät

Im zweiten Schritt sollte die Kontaktzeit des menschlichen Blutes auf den Testoberflächen eruiert werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Versuchsangaben. So ist beispielsweise in der ISO 10993-4 (eine deutsche Referenznorm für die Beurteilung von Medizinprodukten) vorgegeben, die Testobjekte zwischen 15 und 240 Minuten im Medium zu belassen. Weitere Arbeiten von Seyfert et al. (2002) beschreiben eine Verweildauer von 30 Minuten.
Im zweiten Vorversuch wurde dazu eine Testreihe mit den Parametern aus Tabelle 3 in heparinisiertem Blut untersucht.

Probennummer	Anzahl Min. in Medium Blut
1.	15
2.	30
3.	60
4.	90
5.	120
6.	180

Tabelle 3: Übersicht der Versuchszeiten im Vorversuch

Im dritten Schritt sollten bestimmte Materialien zur Positiv- bzw. Negativkontrolle dienen.

Für die Positivkontrolle wurde Polypropylen (PP) ausgewählt, das nach Keil (2003) als ein besonders thrombogenes Material gilt, zur Gruppe der Kunststoffe zählt und vor allem im Bereich der Folien- und Verpackungsindustrie Anwendung findet. In zahlreichen Studien wurde die starke Thrombozytenadhäsion des Materials bei direktem Blutkontakt beschrieben (Keil 2003, Dinsmore et al. 1999).

Als Negativkontrollmaterial diente Polytetrafluorethylen, das unter dem Handelsnamen Teflon bekannt ist. Es gilt nach Sharbati et al. (1991) als reaktionsträge und durch die geringe Oberflächenspannung bleiben nahezu keine Stoffe haften. Im medizinischen Bereich findet Teflon unter anderem Anwendung bei künstlichen Gefäßprothesen (Krönung 2007).

Es wurden sowohl die Nativproben als auch die Proben PP und Teflon nach einer Versuchsdauer von jeweils 10 und 15 Minuten elektronenmikroskopisch untersucht.

Im vierten Schritt wurde ein erster Versuch mit Patientenblut durchgeführt. Dazu wurden fünf der zu testenden Materialien (MOTIS, LT1, LT1-CA30, Vestakeep

400R und On-X Aortic) verwendet. Die Versuchsapparatur wurde entsprechend des Versuchsschemas installiert, das Blut von der Herz-Lungen-Maschine unmittelbar in die Versuchsapparatur überführt und zusätzlich Protamin als Heparinantagonist hinzugegeben, damit die physiologischen postoperativen Bedingungen möglichst in-vivo zu imitieren waren. Die Plättchen wurden nach einer Versuchsdauer von 15 Minuten entnommen und in einer Lösung fixiert.

In den abschließenden Versuchen wurde die identische Versuchsapparatur und der Ablauf mit Probandenblut von klinisch gesunden Menschen analog durchgeführt, mit Heparin versetzt und nicht antagonisiert. Nach Entnahme aus der Versuchsapparatur wurden die Proben standardisiert viermal hintereinander mit einer Phospharpuffersalzlösung (PBS) abgewaschen.

2.5 Versuchsdurchführung

Die Probenherstellung erfolgte bei einem externen Unternehmen (H&H Gesellschaft für Engineering und Prototypen mbH, Leopoldshöhe, Deutschland).

Alle für die Versuche verwendeten Proben wurden in gleicher Weise poliert. Verwendet wurde dabei eine Polierpaste („UNIPOL 0462“, Firma OSBORN International GmbH, Haan, Deutschland).

Vor Versuchsbeginn wurden die sechs zu untersuchenden Materialien noch aufbereitet. Hierzu erfolgte im ersten Schritt eine Reinigung mit Aceton. Dies wurde standardisiert über einen Zeitraum von 5 Minuten im Ultraschallbad vorgenommen. Auf diese Weise wurden mögliche bei der Produktion entstandene Fett- und Polierrückstände beseitigt. Anschließend erfolgte eine ebenso lange Reinigung der Proben in Ethanol im Ultraschallbad. Dieser Vorgang stellte einen weiteren Desinfektions- bzw. Reinigungsschritt dar. Im letzten Schritt wurden die Proben 5 Minuten lang mit destilliertem Wasser in das Ultraschallbad gegeben. Etwaige Rückstände der vorher benutzten Reinigungsmittel konnten so entfernt werden.

Die Plättchen wurden gemäß der Versuchsanordnung (Abb. 9, Abb. 10) in die Versuchsapparatur eingespannt und das Blut eingefüllt. Der Deckel des Tiegels wurde verschlossen, die Plättchen damit in das Blutmedium gebracht und nach einer Versuchszeit von 5 Minuten entnommen. Anschließend wurden die Proben standardisiert mit PBS gespült. Hierfür wurden diese viermal hintereinander in ein mit PBS-Lösung gefüllten Behälter getunkt. Danach wurden wiederum die Plättchen in mit Monti-Graziadei-Lösung befüllte Behälter überführt, die der Zellenfixation dient. Nach Durchführung einer Ethanol-Austausch-Reihe und der Besputterung der Oberflächen konnten die Proben rasterelektronenmikroskopisch am Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck untersucht werden.

Es wurden sechs Versuchsreihen durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen der einzelnen Materialien miteinander verglichen. Elektronenmikroskopisch wurden zehn jeweils zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (118 x 77 µm) pro Material aufgenommen und die Zellen ausgezählt. Der Randbereich der Probe wird hierbei nicht betrachtet. Die Untersucherin war bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht geblindet. Die mediale Fläche erfährt konstant einen Blutkontakt. Das Verfahren der Zellzählung zur Auswertung wurde bereits in früheren Publikationen von Kundu et al. (1998) und insbesondere Sperling et al. (2005) beschrieben, der quantitative Erhebungen zur Beurteilung von Thrombosebildung in extrakorporalen Kreisen durchführte. Analog wurde in der Arbeit von Ye et al. (2014), die Anzahl anheftender Thrombozyten aus 8 von 10 zufällig ausgewählten Feldern zur Bestimmung der Hämokompatibilität ermittelt.

2.6 Statistik

Es wurde vorab ein Beratungstermin im Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck zur Ermittlung der geeigneten statistischen Testverfahren wahrgenommen.
Im ersten Schritt wurde der Kolmogorov-Smirnow-Test zur Prüfung der Normalverteilung durchgeführt. Zur statistischen Auswertung werden sowohl Box-Plots (dienen der Darstellung von Verteilungen) als auch der Friedmann-Test

herangezogen. Der Friedmann-Test zählt zu den nicht-parametrischen Tests (keine Normalverteilung vorausgesetzt) und findet Anwendung bei zwei oder mehr nicht gepaarten abhängigen Stichproben. In den aufgeführten Versuchen werden jeweils sechs unterschiedliche Materialien pro Durchführung in einen Behälter mit Probandenblut gegeben, sodass dieser Test für die Auswertung geeignet erscheint.

Als Folgetest wurden alle Materialien jeweils mit Hilfe des Wilcoxon-Tests gegeneinander getestet, der ebenfalls zu den nicht-parametrischen Testverfahren gehört und abhängige Stichproben prüft.

Ein Signifikanzniveau von 5% wird für die Durchführung des statistischen Tests angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung

Im ersten Vorversuch des Blutes zur Darstellung der Zellen unter dem Elektronenmikroskop zeigten sich bezüglich der Bildqualität oder in der Überlagerung einzelner Zellen keine nennenswerten Unterschiede beim Vergleich der Ausstrichsweise (Abb.11, Abb. 12). Zusätzlich sollte überprüft werden, ob einzelne Zellen gut darstellbar und voneinander abgrenzbar waren.

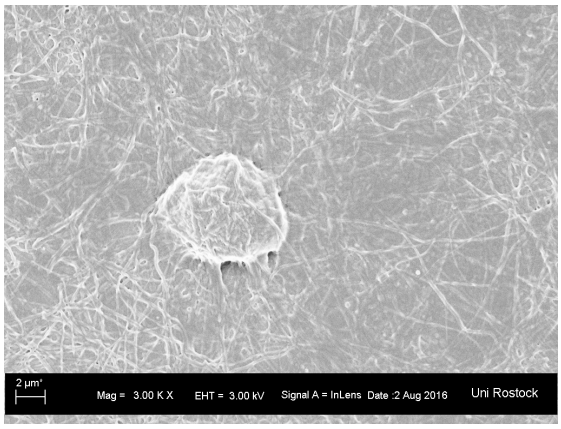

Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme: Blutstropfen auf Glas, Thrombozyt

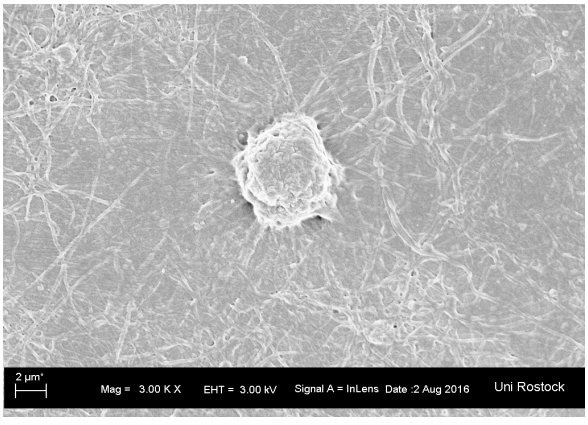

Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme: Blutausstrich auf Glas

Die zweite Versuchsreihe fand mit sechs unterschiedlichen Versuchszeiten statt.

Bei einer Versuchszeit von 15 Minuten fanden sich zahlreiche Fibrinfäden, jedoch konnte man einige Zellen wie zum Beispiel einzelne Leukozyten differenzieren.

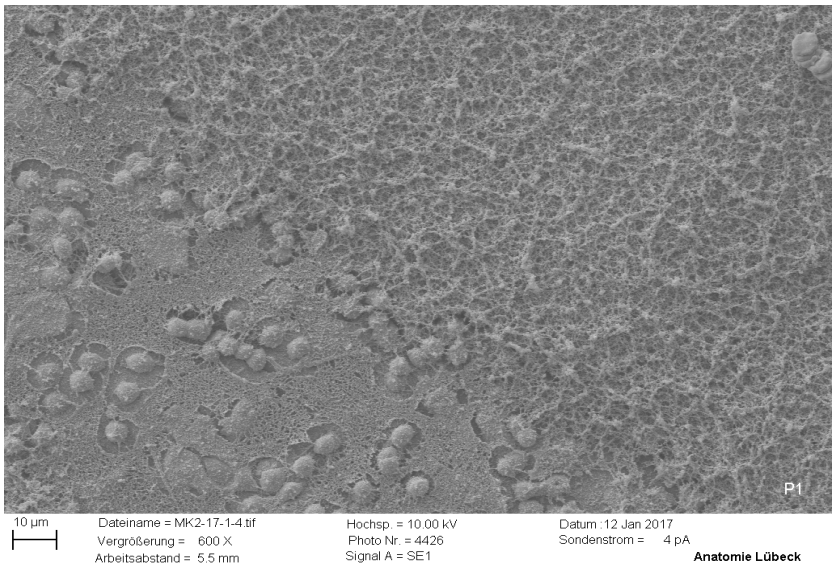

Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme bei einer Versuchszeit von 15 Minuten

Abgesehen von zahlreichen Erythrozyten fanden sich praktisch bei jeder anderen Versuchszeit unzählige Fibrinverbände, die sich überlagerten und eine genaue Auswertung der dort anheftenden Zellen negierten (Abb. 13, Abb. 14).

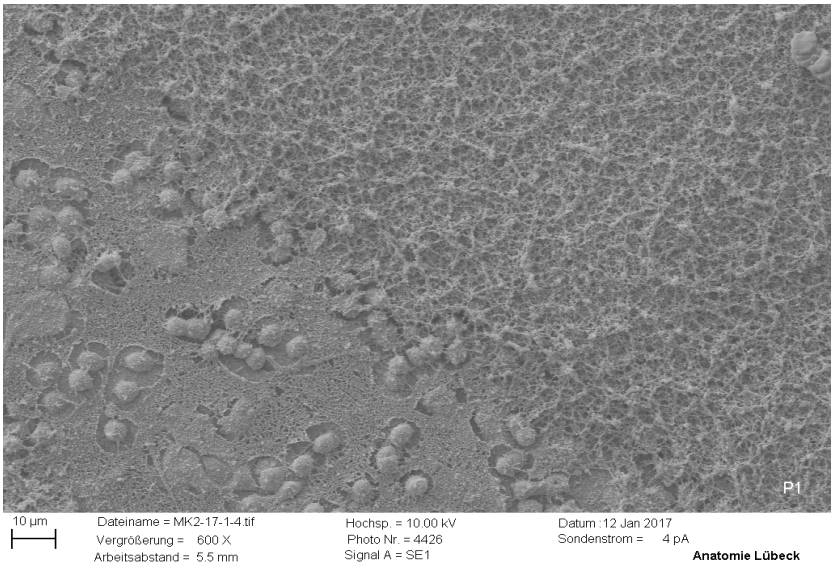

Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme bei einer Versuchszeit von 90 Minuten

Nach dem zweiten Vorversuch wurde somit eine maximale Versuchszeit von 15 Minuten angenommen.

Bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Positivkontrolle Polypropylen fanden sich bereits nach zehn Minuten der Versuchszeit zahlreiche Ablagerungen (Abb. 15). Einzelne Pseudopodien ausbildende Thrombozyten sind in einem Netz aus Zellen, aber auch viele Erythrozyten und Fibrinfäden zu erkennen.

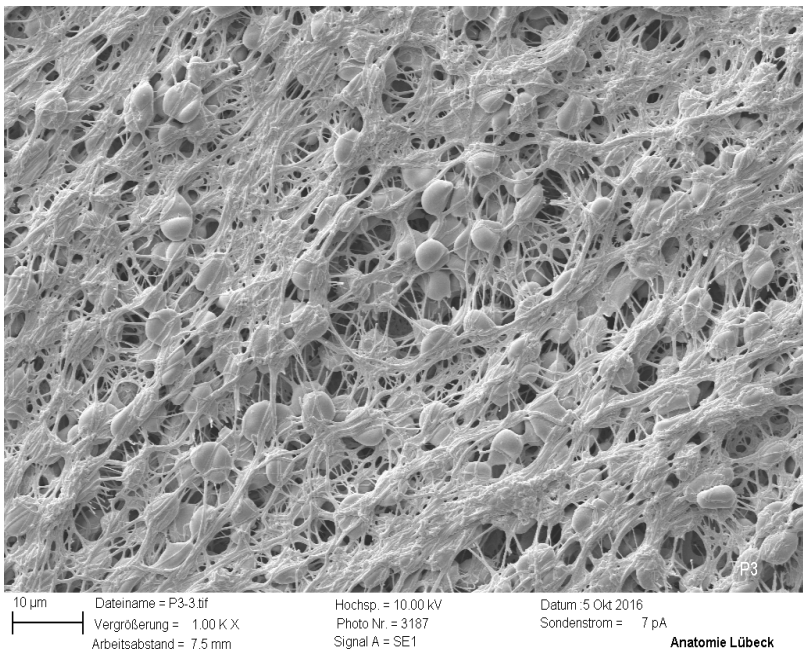

Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polypropylen nach 15 Minuten Versuchszeit

Das Material Teflon für die Negativkontrolle wies auch nach 15 Minuten in der Versuchsapparatur keine Anheftung von Zellen auf (Abb. 16).

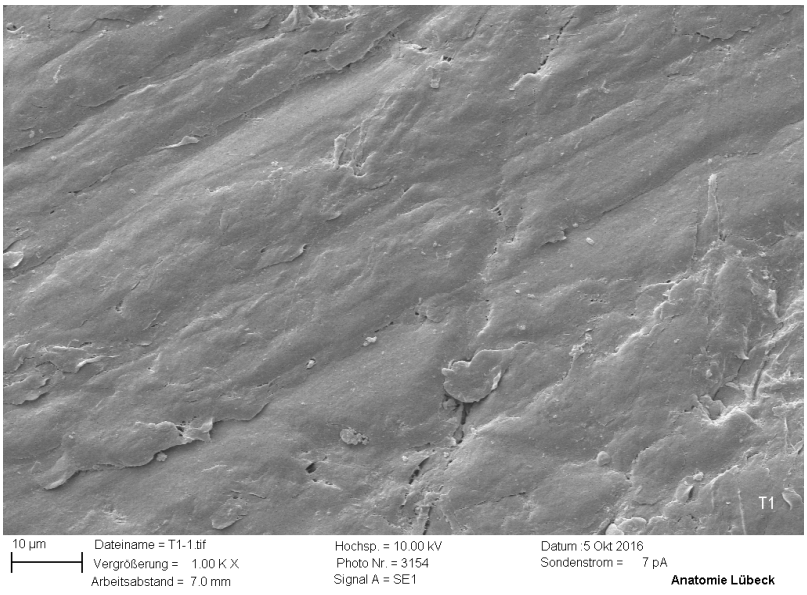

Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Teflon nach 15 Minuten Versuchszeit

Der dritte Vorversuch, bei dem bereits die zu untersuchenden Materialien der Studie verwendet, jedoch Heparin antagonisiert wurde, zeigte elektronenmikroskopisch eine massive Anlagerung und Überlagerung von Erythrozyten, die es nicht ermöglichten die einzelnen Thrombozyten differenziert zu betrachten oder die einzelnen Materialien miteinander zu vergleichen.

In drei nach gleichem Schema durchgeführten weiteren Versuchen zeigte sich ebenfalls ein durch die Erythrozytenüberlagerung bedingtes nicht auswertbares Bild (Abb. 17).

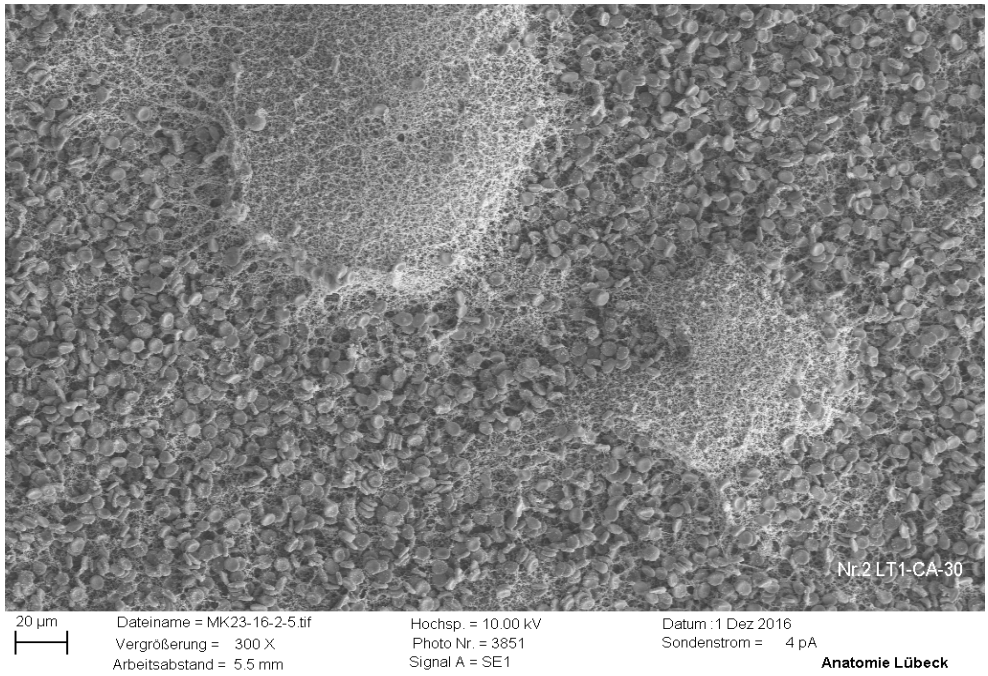

Abb. 17: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Überlagerung mit Erythrozyten

Der letzte Vorversuch wurde ohne Antagonisierung des Heparins durchgeführt. Bei einer Versuchsdauer von 15 Minuten zeigte sich jedoch eine starke Thrombenbildung (Abb. 18). Zudem konnten die in den Fibrinnetzen verfangenen Erythrozyten nicht herausgewaschen werden. Die massive Thrombenbildung ermöglichte ebenfalls keine Auswertung der Materialien, da einzelne Zellen und Strukturen nicht betrachtet werden konnten.

Die Versuchszeit musste also weniger als 15 Minuten betragen, um der Bildung von massiven Thromben vorzubeugen und so eine Auswertung der einzelnen Oberflächen überhaupt zu ermöglichen. Eine Versuchszeit von fünf Minuten wurde festgelegt.

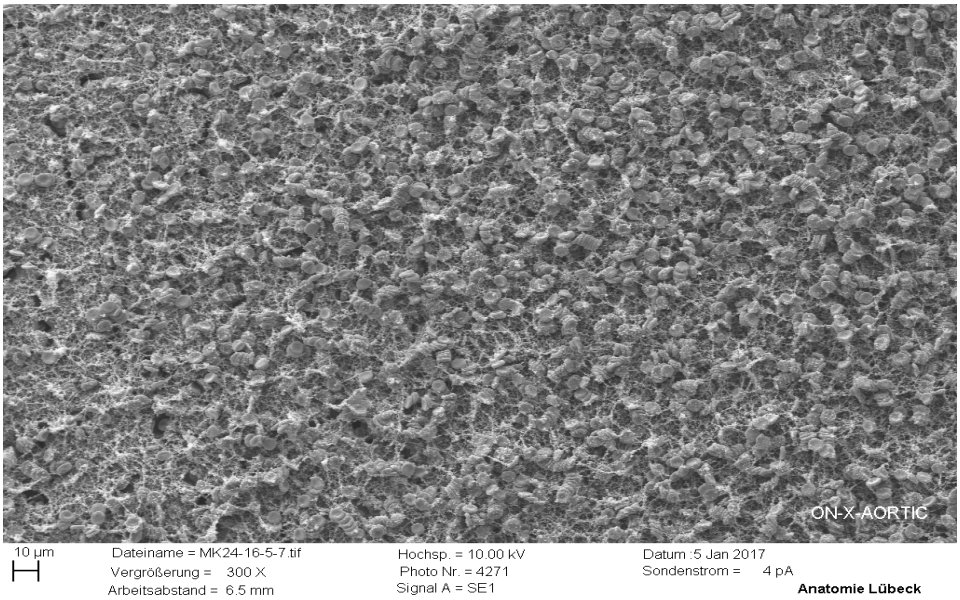

Abb. 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme mit heparinisiertem Blut bei einer Versuchsdauer von 15 Minuten

3.2 Hauptversuche

3.2.1 On-X Aortic

Das Referenzmaterial On-X Aortic wies eine mittlere Thrombozytenanzahl von 130 +/- 32 Zellen auf (Abb. 19). Die Zellverteilung auf der Oberfläche war homogen und hauptsächlich einschichtig anzusehen. Es fanden sich wenig aufeinanderliegende Zellen im Vergleich zu den anderen Materialien. Durch die geringe Gesamtzellanzahl fanden sich verhältnismäßig viele freie Oberflächenbereiche ohne jegliche Zellanheftung. Die auf dem Material anhaftenden Thrombozyten bildeten häufig Pseudopodien aus.

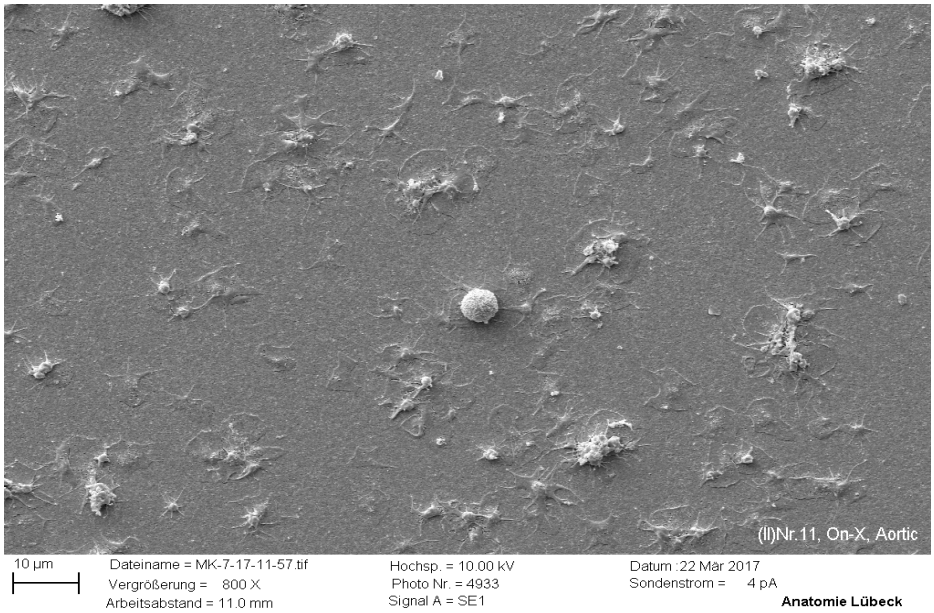

Abb. 19: Elektronenmikroskopische Aufnahme, On-X Aortic, 800er-Vergrößerung

3.2.2 Gold

Das Material Gold als Beschichtung wies im Mittel mit 200 +/- 75 Zellen pro ausgezähltem Gesichtsfeld die besten Ergebnisse neben dem Referenzmaterial auf (Abb. 20). Insgesamt zeigte sich, dass die Zellen häufig einschichtig und einzeln angeordnet waren. Vereinzelnd waren Risse in der Oberfläche erkennbar. Die Pseudopodienausbildung erschien insgesamt weniger ausgeprägt als es sich zum Beispiel auf dem Referenzmaterial On-X Aortic zeigte.

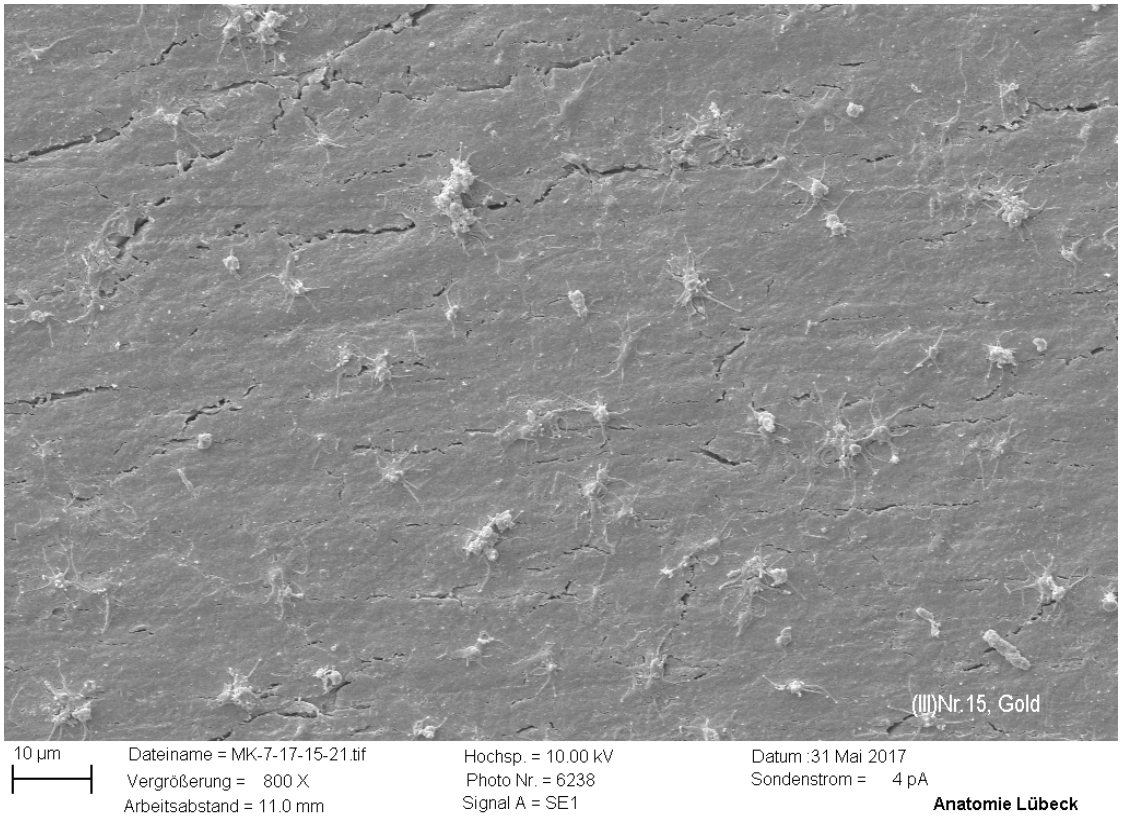

Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Gold, 800er-Vergrößerung

3.2.3 LT1

Das Material LT1 wies im Vergleich zu den beiden vorher beschriebenen Oberflächen bereits eine deutlich dichtere Besiedlung mit 320 +/- 82 Zellen auf (Abb. 21), die vorrangig gleichmäßig verteilt waren. Auch lagen die Zellen häufig mehrschichtig vor. Materialfehler fanden sich hier in Form von oberflächlich aussehenden Rillen. Die Ausbildung von Pseudopodien der Thrombozyten war häufig vorzufinden.

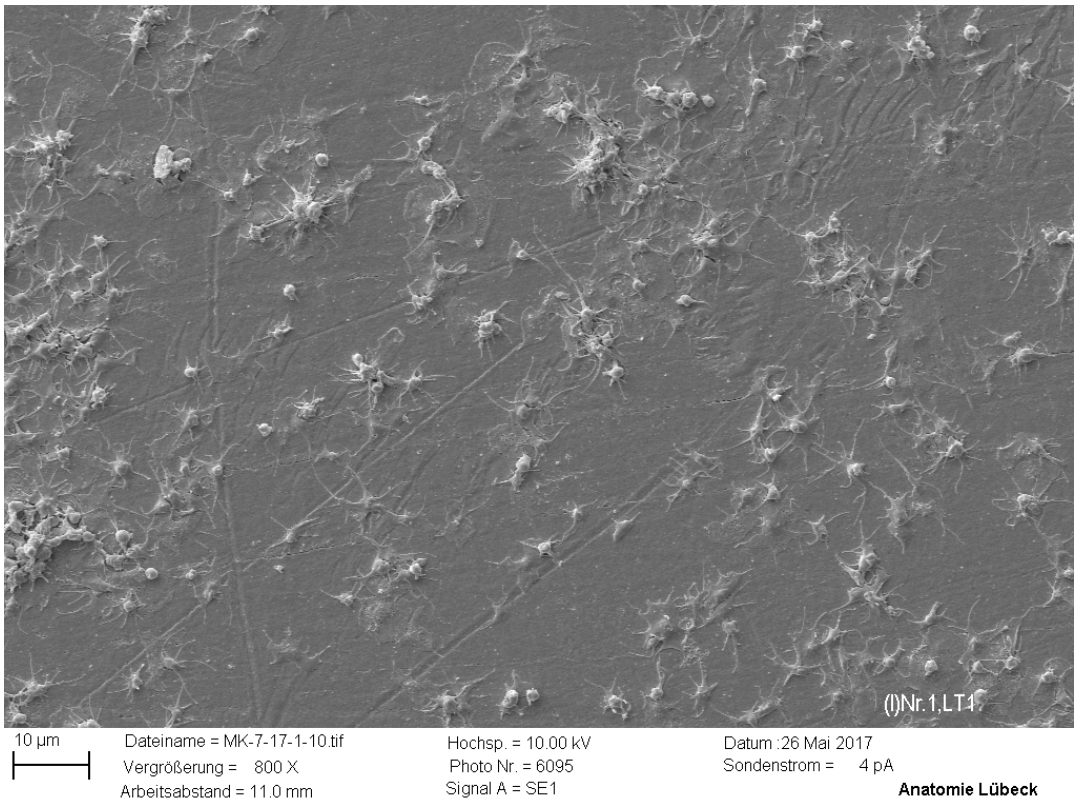

Abb. 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme, LT1, 800er-Vergrößerung

3.2.4 LT1-CA30

Das mit Kohlenstofffasern verstärkte Material LT1-CA30 wies im Vergleich zu dem anderen kohlenstoffverstärkten Material eine etwas niedrigere Zelldichte auf (Abb. 22, 310 +/- 153 Zellen). Allerdings waren hier auch mehrschichtige Aggregate zu finden. Zudem bildeten die Thrombozyten häufig Pseudopodien aus, die sich bis zu ihrer maximalen Größe zu entfalten schienen. Zusätzlich fanden sich in einigen Gesichtsfeldern ovale Ausstanzen und Risse des Materials. Die ovalen, im Bild nur angedeuteten Oberflächenfehler (siehe Pfeil) könnten Kohlenstofffasern im Anschnitt sein.

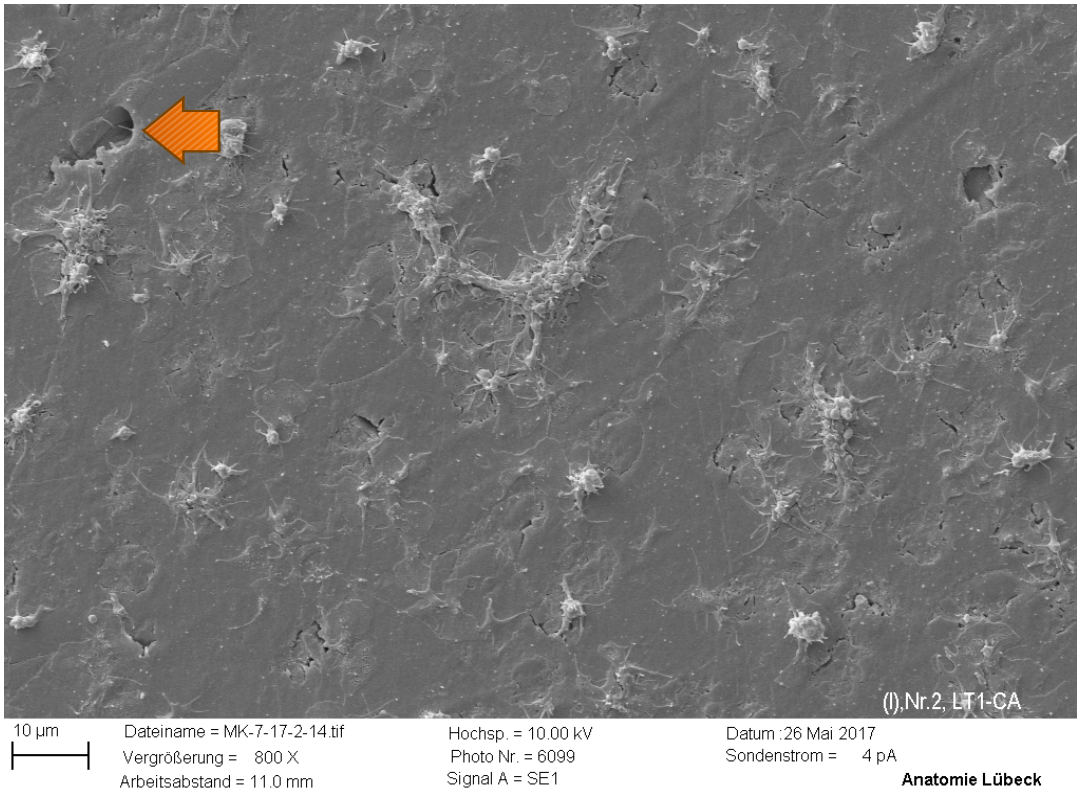

Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme, LT1-CA30, 800er-Vergrößerung

3.2.5 Vestakeep 400R

Das Material Vestakeep 400R wies mit 270 +/- 123 Zellen neben Gold die geringste Zelldichte auf. Es fanden sich auch hier viele Risse im Material, allerdings zeigte sich insgesamt eine recht homogene Verteilung der Zellen mit Pseudopodienausbildung. Diese ist mit der des Materials On-X Aortic zu vergleichen (Abb. 23). Eine Mehrschichtigkeit der Zellen war nur sehr vereinzelnd zu erkennen.

Auffällig bei diesem Material war hingegen die teilweise sehr ausgeprägte Vernetzung mit Fibrin (Abb. 24). Dies stellt ein weiteres Thrombogenitätsmerkmal dar.

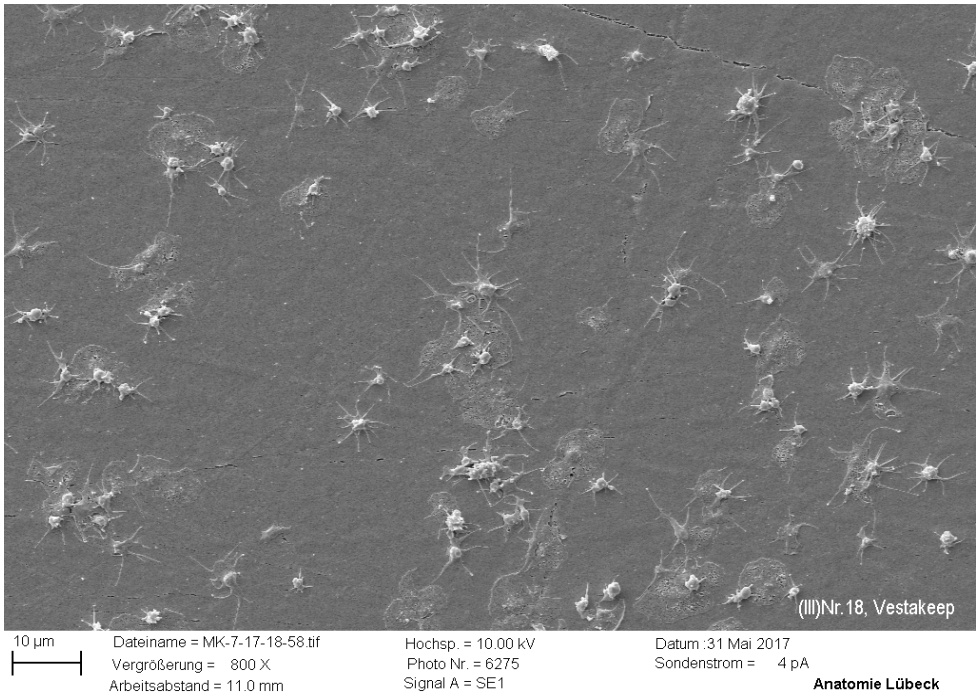

Abb. 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vestakeep 400R 1., 800er-Vergrößerung

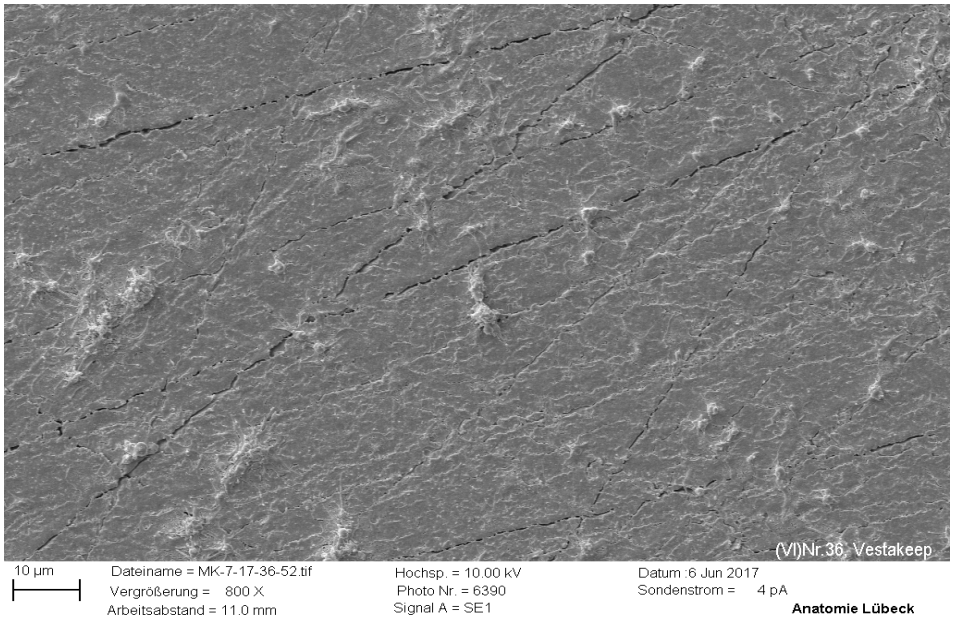

Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vestakeep400R, Benetzung mit Fibrinfäden, 800er-Vergrößerung

3.2.6 MOTIS

Die Oberfläche des Materials MOTIS schnitt im Vergleich der Zellzahlen mit 390 +/- 233 Zellen pro Gesichtsfeld am schlechtesten ab. Neben Rissen im Material fanden sich regelrechte Faseranschnitte an der Oberfläche (Abb. 25). Es kam zur Ausbildung von Pseudopodien, die mit dem des Materials LT1-CA30 vergleichbar waren. Auch lagen die Zellen häufig mehrschichtig vor.

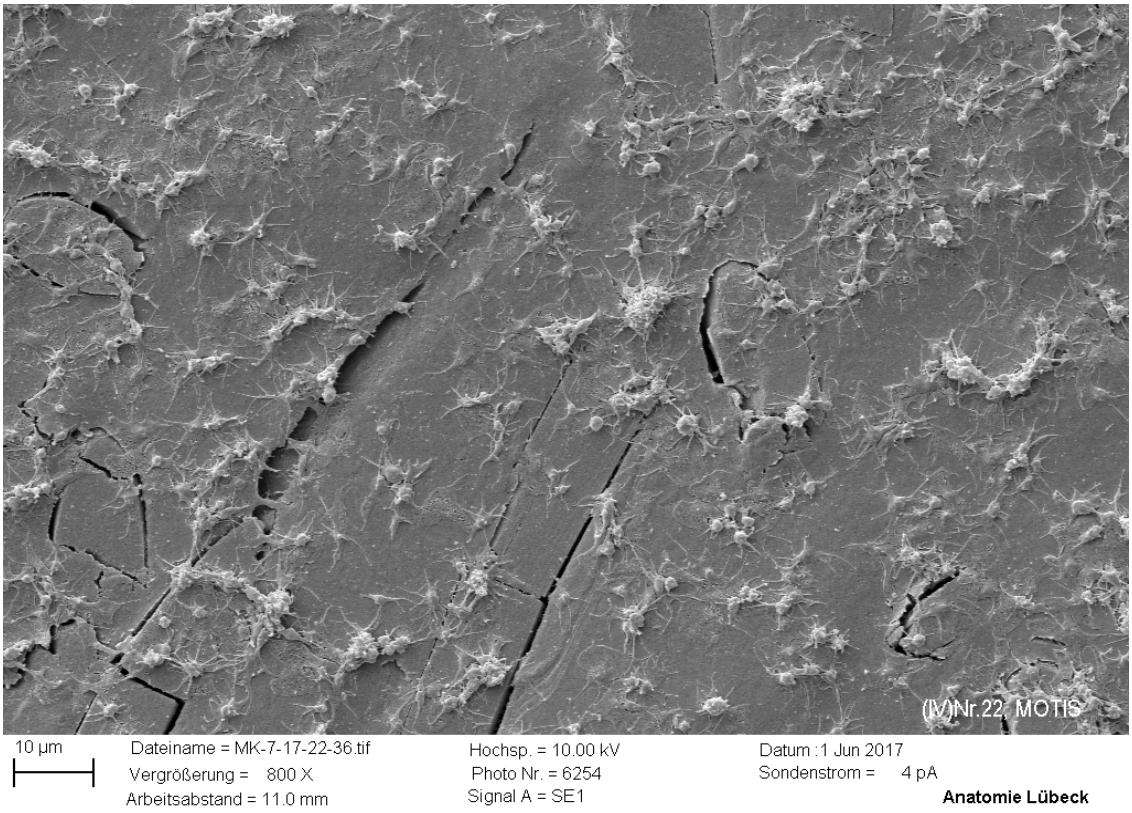

Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme, MOTIS, 800er-Vergrößerung

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Box-Plots

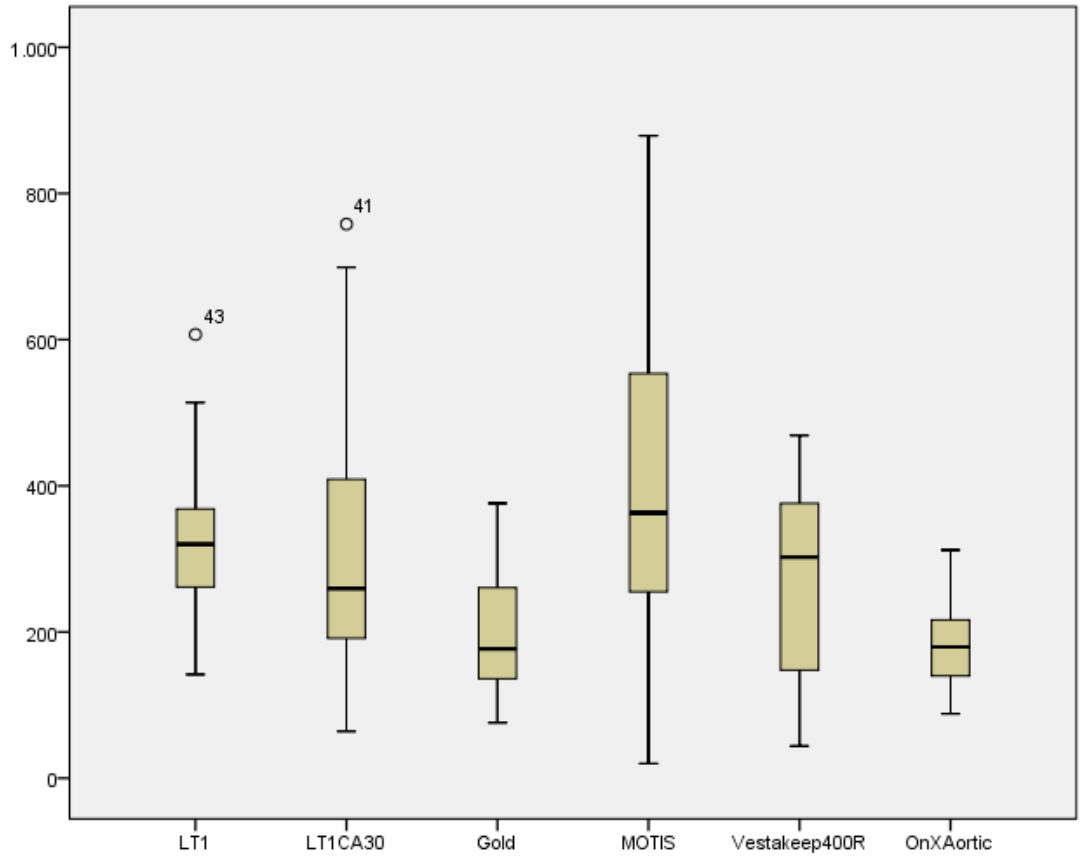

Abb. 26: Box-Plot

Auf der X-Achse sind die getesteten Materialien aufgeführt. Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der Thrombozyten. Die mit einem Kreis gekennzeichneten Werte beschreiben milde Ausreißer, die mit einem Stern gekennzeichneten Zellzahlen beschreiben extreme Ausreißer. Zur Auswertung wurden pro Material alle 60 ausgezählten Gesichtsfelder verwendet (Abb. 26).

Es ist deutlich erkennbar, dass das Material On-X Aortic eine geringe Streubreite hat. Der Median liegt bei 179 Zellen pro Gesichtsfeld. Die Verteilung ist insgesamt enger als bei den anderen Materialien und normalverteilt. Extreme Ausreißer sind

nicht vorhanden.

Das Material Gold weist einen ähnlich geringen Medianwert mit 177 Zellen pro Gesichtsfeld auf, wobei die Abweichung der Box nach oben hin etwas weiter ist, die Verteilung ist also rechtsverschoben. Ausreißer finden sich hier ebenfalls nicht.

Der zu LT1 gehörige Median von 320 Zellen pro Gesichtsfeld liegt deutlich über den bereits beschriebenen Medianwerten. Die Streubreite der Box ist bei diesem Material etwas größer als beim Vergleichsmaterial. Ein milder Ausreißer bis knapp über 600 Zellen pro Gesichtsfeld ist zu finden.

Der Median des Materials LT1-CA30 liegt bei 260 Zellen pro Gesichtsfeld. Die Streubreite bei 50% der Beobachtungen ist im Vergleich zu den Materialien On-X Aortic und Gold jedoch erheblich größer. Auffällig ist zusätzlich der milde Ausreißer auf knapp 800 Zellen. Die Verteilung ist insgesamt rechtsverschoben

Vestakeep 400R wird ein Median von 302 Zellen pro Gesichtsfeld zugeordnet. Die Streubreite ist verhältnismäßig groß und linksverschoben.

Im Vergleich zu dem Material MOTIS ist auffallend, dass der Medianwert hier zwar nicht extrem viel höher liegt (363 Zellen), die Streubreite allerdings erheblich größer ist.

Abschließend lässt sich auf Grundlage des Boxplots feststellen, dass das Referenzmaterial sehr gute Ergebnisse liefert. Das Material Gold weist durch seinen ebenfalls verhältnismäßig niedrigen Medianwert keine wesentlichen Abweichungen auf. Auffällig ist zudem das gute Ergebnis des Materials Vestakeep 400R beim Vergleich des arithmetischen Mittelwertes, das hingegen beim Ranking der unterschiedlichen Medianwerte hinter dem Referenzmaterial und Gold rangiert.

3.3.2 Friedmann-Test

Im Folgenden sind den Materialien einzelne Ränge zugeordnet (Tabelle 4 und Tabelle 5). Je niedriger der Rang, desto geringer ist die Anheftung von Thrombozyten, desto besser ist die Oberfläche hinsichtlich ihrer Hämokompatibilität einzustufen.

Ränge

	Mittlerer Rang
LT1	4,33
LT1CA30	3,78
Gold	2,68
MOTIS	4,32
Vestakeep400R	3,55
OnXAortic	2,34

Tabelle 4: Friedmann-Test Ergebnis

Statistik für Test[a]

N	60
Chi-Quadrat	59,140
df	5
Asymptotische Signifikanz	,000

a. Friedman-Test

Tabelle 5: Statistik für Friedmann-Test

Die Variable N beschreibt die Anzahl der Versuche. Chi-Quadrat ergibt sich als Teststatistik mit einem df-Wert („degrees of freedom“) von 5. Es wurde eine Signifikanz von 1,8297E-11 errechnet.

Das Material On-X Aortic erreicht ein deutlich besseres Rangergebnis als alle vergleichend untersuchten Materialien. Gold scheint ebenfalls ein relativ gutes Material hinsichtlich der Hämokompatibilität darzustellen. Kein Unterschied ist hingegen zwischen den Materialien Vestakeep400R und LT1-CA30 zu erkennen. MOTIS und LT1 liegen auf den letzten Rängen, wie auch die Ergebnisse des

arithmetischen Mittels und die Auswertung der Box-Plots bereits widerspiegelten.

3.3.3 Wilcoxon-Tests

Materialien	On-X Aortic	Gold	LT1	LT1-CA30	MOTIS	Vestakeep 400R
On-X Aortic	----------	0,350	**$1,5*10^{-9}$**	**$2,2*10^{-7}$**	**$9,0*10^{-8}$**	**$2,1*10^{-5}$**
Gold	0,350	----------	**$3,3*10^{-10}$**	**0,003**	**$8,5*10^{-8}$**	**0,001**
LT1	**$1,5*10^{-9}$**	**$3,3*10^{-10}$**	----------	0,556	**0,037**	**0,011**
LT1-CA30	**$2,2*10^{-7}$**	**0,003**	0,556	----------	0,135	0,301
MOTIS	**$9,0*10^{-8}$**	**$8,5*10^{-8}$**	**0,037**	0,135	----------	**$2,0*10^{-4}$**
Vestakeep 400R	**$2,1*10^{-5}$**	**0,001**	**0,011**	0,301	**$2,0*10^{-4}$**	----------

Tabelle 6: p-Werte nach Wilcoxon-Tests, signifikante Ergebnisse fettgedruckt

Der Tabelle 6 ist zu entnehmen, dass zwischen dem Referenzmaterial und allen anderen Materialien (außer Gold) signifikante Unterschiede zu erkennen sind. Das mit Gold besputterte LT1 weist ebenfalls deutliche Abweichungen zu den anderen Testmaterialien auf. Zwischen den einzelnen Materialien, abgesehen vom Referenzmaterial und Gold, gibt es kaum signifikante Ergebnisse. Lediglich der Vergleich von MOTIS und Vestakeep400R zeigt deutliche Abweichungen.

3.4 Weitere Zelltypen: Leukozyten & Erythrozyten

Auf allen Materialien finden sich nur wenige Erythrozyten. Diese Art der anheftenden Zellen sollte im vorangegangen Waschschritt mit PBS bereits entfernt worden sein.

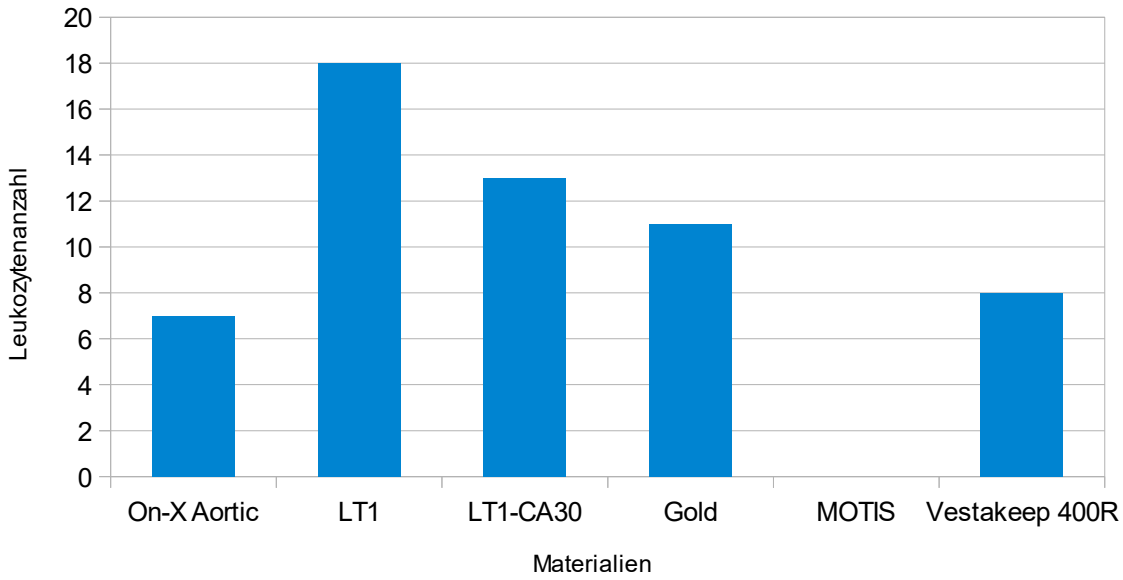

Abb. 27: Anzahl der Leukozyten

Die Anzahl der Leukozyten bezieht sich auf alle 60 Beobachtungen pro Material.

Der Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass dem Material MOTIS keine Leukozyten und hingegen dem Material LT1 im direkten Vergleich relativ viele Leukozyten anheften. Das Referenzmaterial On-X Aortic liegt hier an zweiter Stelle, dicht gefolgt vom Material Vestakeep 400R. Die verbliebenen Materialien Gold und LT1-CA30 zeigen eine in etwa gleiche Besiedlung mit Leukozyten.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Referenzmaterial On-X Aortic und das mit Gold besputterte Material LT1 erreichen bei der Ermittlung des arithmetischen Mittelwertes, der Berechnung des Medians und bei dem Friedmann-Test die besten Ergebnisse hinsichtlich der niedrigen Zellbesiedlung und somit der Blutverträglichkeitseigenschaften. Die Wilcoxon-Tests zeigen zudem, dass sich unter den getesteten Materialien kein

Material befindet, das eine bessere Hämokompatibilität aufweist. Die Anzahl der Leukozyten ist insgesamt als gering einzustufen.

Das Material LT1 ohne Beschichtung zeigt ebenso wie das Material MOTIS eine starke Besiedlung. Auffällig ist jedoch, dass sich an letzterem Material keinerlei Leukozyten anheften.

Das Material LT1-CA30 liefert durchschnittliche Ergebnisse, weist jedoch eine deutlich höhere Streubreite als die beiden Favoriten auf.

Bei dem Material Vestakeep 400R kann die im arithmetischen Mittel ausgewertete Zellzahl nicht in Zusammenhang mit einer guten Hämokompatibilität gebracht werden. Es zeigt sich eine Anlagerung unzähliger Fibrinfäden und die Streubreite ist enorm hoch.

4 Diskussion

4.1 Allgemein

Die Studie beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie Oberflächen von mechanischen künstlichen Herzklappen beschaffen bzw. inwieweit diese modifiziert sein müssen, um eine möglichst geringe Thrombogenität vorzuweisen. Hierzu wurden fünf verschiedene Materialien gegen ein Referenzmaterial, welches bereits erfolgreich implantiert wird, getestet.

Ein wesentliches Kriterium bei der Herstellung von Medizinprodukten mit Blutkontakt ist die Hämokompatibilität, die insbesondere von der Materialauswahl beeinflusst wird. Bei Kontakt mit Blut werden verschiedene Systeme wie die Koagulation, die Fibrinolyse, die Hämolyse und das Komplementsystem aktiviert. Wie bereits im Kapitel 3 beschrieben spielt die Thrombozytenaktivierung eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Thromben. Hierbei kann es zu einem vollständigen Funktionsverlust der Klappe durch Thrombenbildung kommen, der fatale Konsequenzen in Form von inadäquater Funktion der Klappe, Embolisierung des thrombogenen Materials, Endokarditis und Bakteriämie für den Patienten nach sich ziehen könnte. Zur Vermeidung müssen implantierte Patienten auch heute noch einer antikoagulanten Therapie unterzogen werden.

Bereits 1856 beschrieb nach Bagot et al. (2008) Virchow drei wesentliche Faktoren (die „Virchow-Trias“), die Thrombenbildung begünstigen. Zum einen die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, bei der es zu Verwirbelungen kommen kann. Des Weiteren die Viskosität des Blutes, bei der besonders Patienten mit einem generellen Volumenmangel eine höhere Neigung zur Blutgerinselbildung aufweisen, sowie der dritte Faktor der direkten Verletzungen an den Gefäßendothelien. Hinzu kommen Wechselwirkungen von Proteinen und den beteiligten Blutzellen mit künstlichen Materialien, wie sie bei mechanischen Herzklappen zum Einsatz kommen.

Im Versuch weist das Referenzmaterial On-X Aortic das beste Ergebnis bezüglich der getesteten Blutverträglichkeitseigenschaft auf. Das Grundgerüst des Implantats ist pyrolytisches Carbon, das in vielen mechanischen Herzklappen verwendet wird. Das Material Gold weist nahezu gleich viele Anlagerungen von Thrombozyten auf. Die verbliebenen Materialien variieren in ihren Ergebnissen, können jedoch durch die hohe Anzahl von anheftenden Zellen und Fibrinfäden gemein als thrombogen bezeichnet werden. Interessanterweise ist auch das Referenzmaterial nicht absolut frei von Thrombozyten. Sowohl im Versuch als auch nach erfolgreicher Implantation einer Herzklappe wird das Blut des behandelten Patienten antikoaguliert. Auch im vorgelegten Versuch wurde heparinisiertes Blut verwendet und trotz der verhältnismäßig kurzen Kontaktzeit konnten sich Thrombozyten anlagern.

Das Material PEEK, das in vier unterschiedlichen Ausführungen (Vestakeep400R, MOTIS, LT-1 und LT-1 CA30) getestet wurde, findet bereits in der Implantologie, vor allem im Bereich des Zahnersatz und der Knochenprothesen, eine breite Anwendung. PEEK gilt als besonders biokompatibel, da keine immunologischen Reaktionen oder Entzündungsreaktionen ausgelöst werden. In der hier vorgelegten Studie konnte allerdings hinsichtlich der Hämokompatibilität dieses Materials im Vergleich zu den bisher bei mechanischen Herzklappen verwendeten Materialien kein Vorteil aufgezeigt werden.

Das Material Gold beziehungsweise die mit Gold besputterte Oberfläche des LT-1 hingegen zeigt gute athrombogene Eigenschaften und ermöglicht einen direkten Vergleich zu der Oberfläche des Materials On-X Aortic. Bis auf seltene Ausreißer erreichen beide Materialien nahezu identische Ergebnisse. Gold ist ebenfalls besonders antiinflammatorisch.

Die Materialien MOTIS und Vestakeep 400R sind nach den Versuchen als thrombogen und somit für die Herstellung von mechanischen Herzklappen als ungeeignet zu deklarieren. Hier fällt vor allem bei der Oberfläche des MOTIS das Kohlenstofffasergrundgerüst auf, das gleich an mehreren Schnittflächen deutlich

an der Oberfläche zu sehen ist. Bei dem Material LT1-CA30 fallen ebenfalls Faseranschnitte auf, die Thrombogenität scheint jedoch hinsichtlich der Zellzahl geringer. Kohlenstofffasern sollen bei diesen Materialien primär die Festigkeit verbessern, könnten aber möglicherweise die Anlagerung von Thromben fördern.

Mit einer zusätzlichen Schicht wie z.B. Gold könnten die Kohlenstofffasern als stabiles Grundgerüst fungieren ohne direkten Kontakt mit dem Blut zu haben.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das Material LT1 für eine Herzklappen-Prothese alleine nicht ausreichend ist. Es lässt sich allerdings in Kombination mit einer geeigneten Beschichtung wie zum Beispiel mit den beschriebenen 5 nm Gold durchaus als Grundgerüst verwenden, da es ähnlich gute Ergebnisse wie das Referenzmaterial liefert. Es sollte daher eine Beschichtung des Materials weiter untersucht werden.

4.2 Versuchsdauer

Generell gibt es vom Deutschen Institut für Normungen eine Vorschrift zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (DIN EN ISO 10993), die auch die Prüfung der Hämokompatibilität umfasst. Ein entscheidender Faktor ist hierbei die Dauer des Blutkontaktes des Materials in der Versuchsapparatur. Die DIN schreibt hierbei eine Zeitspanne von 15 bis 240 Minuten vor, da nach vier Stunden die Halbwertszeit der Proteine erreicht wird.

Der Versuch wurde mit einer Versuchsdauer von 5 Minuten durchgeführt, da sämtliche Testläufe mit längerer Kontaktzeit keine auswertbaren Ergebnisse hervorbrachten. Es ist hierbei anzumerken, dass die gewählte Testdauer möglicherweise für eine Widerspiegelung der lebenslangen Kontaktzeit in-vivo als nicht ausreichend anzusehen ist. Es werden allerdings nach Born et al. (1980) die Thrombozytenaktivierungszeit mit 180 Millisekunden und die Ausbildung von Pseudopodien nach Misselwitz et al. (1987) mit 1-3 Minuten beschrieben, die eine relative Aussagekraft hinsichtlich der Hämokompatibilität auch bei dieser kurzen Versuchsdauer legitimieren würden. So lässt der Versuch zumindest eine

vergleichende Aussage hinsichtlich der Thrombogenität zu, da Materialien wie MOTIS und LT1 bereits nach der vergleichsweise kurzen Expositionsdauer mit Blut eine relativ starke Aktivierung und Anlagerung der Thrombozyten aufwiesen.

4.3 Versuchsdurchführung

Wie bereits im Kapitel 4.1 beschrieben, haben auch die Strömungseigenschaften des Blutes einen wichtigen Einfluss auf die Thrombenbildung. In der hier vorgelegten Studie hängen die Plättchen senkrecht zum Strömungsverlauf des Blutes. Die Fließgeschwindigkeit des Blutes wurde versucht annähernd den in-vivo Verhältnissen anzugleichen.

Im Versuch fließt das Blut nahezu parallel zum Blutfluss an den eingehängten Proben vorbei. Ähnlich ist es bei zweiflügeligen mechanischen Herzklappen. Die zwei biplanen Flügel der On-X Aortic Herzklappe haben nach Geyhan et al. (2008) bei maximaler Öffnung einen Öffnungswinkel von durchschnittlich 85 Grad. Die Gefahr von zusätzlichen Verwirbelungen des Blutes ist somit sehr gering und das Risiko einer Thrombozytenaggregation wird reduziert.

Der Versuchsaufbau spiegelt aber nicht exakt die Bedingungen in-vivo wider. Hier findet ein durch die sich ändernden Druckverhältnisse während einer Herzaktion ständiger Wechsel von geöffneter zu geschlossener Klappe statt.

So ist die in der Studie vorgestellte Durchführung des Versuchs nicht optimal und nicht genau auf in-vivo Verhältnisse übertragbar. Eine Versuchsapparatur, die die genauen Strömungseigenschaften widerspiegelt, erscheint geeigneter. Hier sei zum Beispiel die Arbeit von Chong-Hyon Kim et al. (2009) erwähnt, bei der ein pulsatiler Fluss innerhalb einer Flusskammer erreicht wird.

4.4 Verwendetes Medium

In dem Versuch wurde heparinisiertes Vollblut von klinisch gesunden Patienten verwendet, die keinerlei antikoagulante Medikamente in den letzten sieben Tagen eingenommen hatten. Andere Studien wie zum Beispiel von Xia Ye et al. (2013) und Jung et al. (2013) benutzen thrombozytenreiches Plasma, damit vermutlich ein deutlicherer Effekt durch die Thrombozyten zu erkennen ist und keine Überlagerung mit Erythrozyten stattfindet. Durch die mit PBS durchgeführte Waschung konnten ähnliche Effekte erzielt und so auch die Morphologie der Thrombozyten betrachtet werden.

Hierbei stellt sich allerdings die Frage nach der Übertragbarkeit zu in-vivo-Verhältnissen. Das Ziel der Studie ist ein Material beziehungsweise eine Oberfläche zu finden, die explizit keine antikoagulante Therapie erfordert. So müsste die Versuchsreihe mit den geeignet erscheinenden Materialien nochmals mit reinem Vollblut durchgeführt werden. Ein erster Schritt in diese Richtung könnte eine Studie mit Blut von Aspirin einnehmenden Patienten sein.

4.5 Thrombozytenmorphologie

In der vorgelegten Studie wird ausschließlich die Anzahl der Thrombozyten betrachtet und ein subjektiver Eindruck über die Ausbildung von Pseudopodien beschrieben. Die Arbeiten von Furquan Ahmed et al. (2014), Nurdin et al. (2003) und Uchida et al. (1999) beschreiben die unterschiedlichen Stadien der Morphologieänderung der Plättchen, die direkten Rückschluss auf den Aktivierungszustand zulassen. Dies könnte als eine Optimierung der durchgeführten Versuchsreihe angesehen werden, damit die Differenzierbarkeit des Materialeinflusses auf die Aktivierung und die Thrombenbildung untersucht werden könnte.

4.6 Auswertung

Generell werden verschiedene Methoden zur Ermittlung der Thrombozytenzahl beschrieben. Das hier verwendete Zählen bei elektronenmikroskopischer

Betrachtung birgt eine gewisse Fehleranfälligkeit. Mehrschichtig übereinander liegende Zellen konnten nicht exakt bestimmt und deren Anzahl nur geschätzt werden. Auch bei der Bildung von Thromben konnte die dort anheftende Thrombozytenanzahl nur grob beurteilt werden. Es konnten zudem nicht die exakt identischen Positionen auf jedem Material betrachtet werden. Eine genaue Einstellung von Koordinaten ist am Elektronenmikroskop nicht möglich, da die Plätten manuell aufgeklebt wurden und nicht in exakt gleicher Position lagen. Xia Ye et al. (2013) betrachtet ebenfalls Felder und zählt die Zellen aus. Hierbei verwendet er 8 aus 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern, sodass die verwendete Methode als geeignet erscheint. Andere Studien wie zum Beispiel von Gemmell et al. (1995) beschreiben die Messung der aktivierten Thrombozyten mittels eines Immunoassays im verbliebenen Blut nach Kontakt mit einer neuartigen Oberfläche. Auf diese Weise werden Rückschlüsse über die Thrombogenität des Materials gezogen. Auch die Benetzung mit Thrombozyten einer bestimmten determinierten Oberfläche wird in zahlreichen Studien wie beispielsweise von Skarja et al. (1997) und Ching-Hsiung Shen et al. (2012) als Vergleichswert unter den einzelnen Materialien genommen. Hierbei werden etwa die Plättchen pro mm^2 angegeben.

Unter Verwendung von Immunfluoreszenzen können nach Gemmell et al. (1994) und Jung et al. (2013) Thrombozyten ebenfalls elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Hierbei ermöglichen verschiedene Marker sogar die Unterscheidung zwischen anheftenden, in ihrer Morphologie unveränderten Thrombozyten und aktivierten Plättchen. Mit Hilfe einer speziellen Software kann die Intensität der einzelnen Fluoreszenzen ermittelt und analysiert werden. Dieses Verfahren beschrieb unter anderem Muthususbramaniam et al. (2011) zur Untersuchung der Hämokompatibilität von Silikon, das für die Analyse eines objektiven Werts der Thrombozytenzellzahl geeignet erscheint.

Bei der für die vorgelegte Studie durchgeführten Auswertung erscheint die Fehlerquote relativ hoch. Durch die alleinige elektronenmikroskopische Auszählung der Zellen ist es nicht möglich eine exakte Zahl der Thrombozyten zu

bestimmen. Zum einen wird dies durch die erwähnte Überlagerung von Zellen verursacht, zum anderen sind vereinzelnd die Zellgrenzen der aktivierten Thrombozyten nicht voneinander zu unterscheiden. Weitere Autoren wie zum Beispiel Ishihara et al. (1995) beschreiben ebenfalls die Auswertung mittels eines Rasterelektronenmikroskops. Im direkten Vergleich der Materialien pro Versuch ist diese Fehlerquote nicht von Relevanz, da es sich bei der Auswertung um ein Ranking der einzelnen Oberflächen handelt. Ein direkter Vergleich dieser Studie mit anderen Arbeiten hingegen erscheint schwierig.

Des Weiteren muss kritisch betrachtet werden, dass die Testmaterialien für die Untersucherin zur elektronenmikroskopischen Auswertung nicht verblindet wurden. Hier könnte ein subjektives Empfinden Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben.

4.7 Materialaufbereitung/-beschaffenheit

Es ist nach Zingg et al. (1982) davon auszugehen, dass nicht nur die Materialauswahl, sondern auch die Oberflächenrauigkeit einen wesentlichen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung hat. Die getesteten Materialien wurden mit der identischen Politur handpoliert, dies ermöglicht direkte Vergleiche. Die Zusammensetzung der Politur des Referenzmaterials ist ein Firmeninternum, somit können mögliche Einflüsse nur als Annahmen getroffen werden.

Wie in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Kapitel 3.2 zu sehen ist, weisen nahezu alle Materialien außer On-X Aortic Materialschäden auf. Die mit Kohlenstofffasern verstärkte Variante des LT-1 und MOTIS zeigen Faserverläufe des Kohlenstoffs. Diese Unebenheiten der Oberfläche dürften die Thrombogenität begünstigen. In den kleinen oberflächlichen Rillen auf der mit Gold besputterten LT-1-Oberfläche scheinen sich jedoch nicht besonders viele Zellen anzulagern.

Hier besteht also sowohl bei der Polierung als auch in der Herstellung der Materialien ein Optimierungsbedarf. Die Materialien müssten für eine homogene, glatte Oberfläche so bearbeitet werden, dass das Kohlenstoffgrundgerüst

weiterhin die Stabilität des gesamten Implantats gewährleistet aber nicht mehr an der Oberfläche sichtbar ist.

4.8 Probandenauswahl

In der vorgelegten Studie konnte beobachtet werden, dass zwei Probanden (Proband 2, Proband 4) durchweg höhere anheftende Zellzahlen aufwiesen als die vier anderen Probanden. Dies könnte zum Beispiel mit einem Volumenmangel des Blutes und der damit erhöhten Neigung zur Thrombenbildung erklärt werden. Zum Erreichen von konstanten Versuchsbedingungen und Blutparametern hätte vorweg z.B. eine Vorauswahl der Patienten zum Beispiel durch Ermittlung des Hämoglobin bzw. Hämatokrits stattfinden können. Ebenso könnte bei den zwei genannten Probanden eine noch nicht diagnostizierte Gerinnungsstörung vorliegen. Durch eine größere Anzahl von Probanden könnte ein solches Problem bei zukünftigen Versuchen in seiner Bedeutung relativiert werden. Zusätzlich könnten Probanden mit der Blutgruppe 0 von den Versuchen ausgeschlossen werden, da diese nach Seyfert et al. (2002) eine verringerte Anzahl eines Gerinnungsfaktors aufweisen können (FVIII), der bei einem Mangel zur Hämophilie A (Blutungsneigung) und bei Überschuss zur Thrombenbildung führen kann. Eine Erhebung über die Aufnahme von oralen Kontrazeptiva erfolgte nicht. Studien nach Martinez und Tsakiris (2015) belegen jedoch, dass diese prokoagulatorische Effekte aufweisen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die benutzte Methode dennoch als geeignet erscheint abhängige Proben wie vorliegend miteinander zu vergleichen und ein Ranking basierend auf den Ergebnissen zu erstellen.

Die vorgelegte Studie deckt mit dem Vergleich der Thrombozytenzahlen ein wesentliches Kriterium der Hämokompatibilität ab. Für eine umfassende Aussage über die Eigenschaften der Materialien müssen aufbauend auf den vorgelegten Ergebnissen allerdings weitere Tests zum Beispiel im Hinblick auf die Hämatologie, Koagulation und Aktivierung des Komplementsystems (unter anderem in der DIN EN ISO 10993-4 zur Testung von Medizinprodukten beschrieben) durchgeführt werden.

4.9 Ausblick

In dieser Studie konnte mit dem Gold ein Material beziehungsweise eine Oberfläche gefunden werden, das vergleichbare Thrombogenitätseigenschaften wie das On-X Aortic aufweist. Da allerdings keine Oberfläche bessere Ergebnisse als das Referenzmaterial lieferte, wurde für folgende Untersuchungen nach etwaigen Alternativen gesucht.

Bereits in früheren Studien wurde nach Donley et al. (1991), Yang et al. (1996), Winter et al. (2004), Wolfe et al. (1999), Ecker at al. (2002), Zimmermann (2009) und BhavanChand et al. (2012) bestätigt, dass Titan eine nennenswerte, gute Hämokompatibilität aufweist.

Daher werden in einem noch folgenden Versuch verschiedene Titan-beschichtungen getestet. Zum einen wird Titannitrid (TiN) verwendet, eine chemische Verbindung aus Stickstoff und Titan, die nach Glasmacher et al. (1999), Wolfe (1999) und Hensler (2009) als besonders stabil gilt und wenig Verschleißerscheinungen aufweist. Dieses Material findet unter anderem nach Schaldach et al. (2009) Anwendung in Form von Herzschrittmacherelektroden und als Beschichtung von chirurgischen Instrumenten.

Als weiteres Material soll Titanniobnitrid (TiNbN) getestet werden. Dies ist ein Zusammenschluss aus Titan, Stickstoff und Niobatomen, das momentan primär in der Herstellung von orthopädischen Implantaten verwendet wird, da es als besonders antiallergen gilt. Einige vorangegangene Studien nach Serro et al. (2009) konnten bereits im direkten Vergleich zeigen, dass Titaniobnitrid weniger affin Albumin bindet als Titannitrid.

Zudem wird eine PEEK-Variante mit einer DLC („diamond-like-carbon“)-Schicht getestet. Hierbei handelt es sich um eine amorphe Kohlenstoffschicht, die ebenfalls bereits in der Implantologie verwendet wird. Vor allem im orthopädischen Bereich findet nach Repenning et al. (2006) diese zum Beispiel bei Hüftimplantaten Anwendung, da sie als besonders antibakteriell und damit

biokompatibel gilt.

Des Weiteren wird ein mit Titan besputtertes PEEK-Material getestet. Hierbei liegt ein besonderes Augenmerk auf dem Besputterungsvorgang. Dieser wird mittels des HiPIMS („Hochleistungsimpulsmagnetrosputter“)-Verfahrens durchgeführt. Hierbei wird eine Dünnschicht dichterer Schichtmorphologie erzeugt.

Um etwaige Unterschiede durch Poliervorgänge aufzufinden werden von einigen Materialien sowohl eine handpolierte als auch unpolierte Variante getestet. Bei einer Politur sollten aber mögliche Wirkungen der Politurbestandteile beachtet werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung des Materials Silikon (Polyorganosiloxane) hinsichtlich seiner Hämokompatibilität. Während die Hersteller der On-X Aortic-Herzklappe betonen, dass die Biokompabilität vor allem durch die Reinheit des Carbonmaterials (also frei von Silikon) gewährleistet wird, untersuchten andere Studien gegenteilige Ansätze. Muthususbramaniam et al. (2011) untersuchte beispielsweise die Thrombogenitätsunterschiede zwischen Teflon und Stahl auf der einen Seite und Silikon auf der anderen Seite. In seinen Versuchen wurde eine Blutkontaktdauer von zwei Stunden mit hepatinisiertem Blut ausgewählt. Die Ergebnisse zeigen, dass Silikon im Vergleich zu den anderen getesteten Materialien deutlich besser abschneidet und eine weniger enge Benetzung mit Thrombozyten aufweist, die in der Studie durch Immunofluoreszenztechnologien sichtbar gemacht wurden.

Auf Grundlage dieser Untersuchungen soll das Material PEEK mit Silikon beschichtet werden. Zwischen den beiden Schichten wird eine Lage Zinkoxid aufgetragen, damit die Anheftung des Silikons verbessert wird.

Vorerst wurde nur ein Plättchen dieser Art hergestellt und mit heparinisiertem Blut wie in der hier vorgelegten Studie in Kontakt gebracht. Die durchschnittliche Thrombozytenzahl beträgt unter 100 Zellen pro ausgezähltem Gesichtsfeld. Auf

Grund dieses positiven Ergebnisses wird eine weitere Versuchsreihe mit silikonbeschichtetem PEEK angestrebt.

Zudem soll eine weitere Versuchsreihe zeigen, ob nennenswerte Unterschiede hinsichtlich der Thrombogenität zwischen handpolierten und gefrästen Oberflächen existieren. Hierfür werden Plättchen aus der Titanlegierung TiAlV (Titan Aluminium Vanadium) hergestellt, die bisher vor allem in der dentalen und orthopädischen Implantologie Anwendung findet. So besteht beispielsweise auch das Gehäuse der mechanischen Herzklappe aus diesem Material. Es werden zwei unterschiedliche Varianten ausgewählt, einerseits mit einer TiN-Beschichtung und zum anderen TiAlV als Reinmaterial und gegebenenfalls auch als Beschichtung. Da auch bei diesem Versuch nur einzelne Proben vorliegen, konnten diese im Rahmen der vorliegenden Studie nicht mehr zur Auswertung herangezogen werden. Dennoch zeigte sich in ersten Ergebnissen, dass die gefrästen Oberflächen anfälliger für die Ausbildung mehrschichtiger Zellanlagerungen waren und die handpolierten Plättchen insgesamt eher einschichtig anheftendes Material aufwiesen, das auf den Einfluss ungünstiger Strömungsverhältnisse an rauen Oberflächen hinweist.

5 Zusammenfassung

In dieser Studie sollte die Hämokompatibilität verschiedener neuer Materialien für eine künstliche Herzklappe im Vergleich mit einer sich bereits auf dem Markt befindlichen Herzklappe aus pyrolytischen Karbon (On-X Aortic) überprüft werden.

Die zugrundeliegende Motivation dieser Studie basiert auf den kontinuierlich steigenden Patientenzahlen mit implantierter Herzklappe, die sich aufgrund der bisher verwendeten Materialien dem Nachteil einer lebenslangen antikoagulanten Therapie ausgesetzt sehen. Diese ist auch heute noch zwingend notwendig, da für den Patienten lebensbedrohliche Thromben entstehen können. Aufgrund der Einnahme des zum Beispiel häufig verwendeten Arzneimittels Phenprocoumon müssen die Patienten viele Einschränkungen in ihrer Lebensqualität hinnehmen.

Im Rahmen der vorgelegten Studie wurden verschiedene Materialien gegeneinander getestet. Hierfür wurde Blut von gesunden Probanden als Testmedium genommen. In Vorversuchen wurden die korrekte Versuchsdauer, die Auswahl von geeigneten Blutspendern und die notwendige Versetzung des Blutes mit Heparin ermittelt.

Getestet wurden zwei von unterschiedlichen Unternehmen hergestellte Polyetheretherketone (PEEK) und zwei Abkömmlinge beider Materialien, die jeweils ein Kohlenstoffgerüst enthalten. Zusätzlich wurde PEEK mit einer 5nm dünnen Goldschicht besputtert. Das aus pyrolytischem Karbon bestehende Vergleichsmaterial On-X Aortic wurde als Referenz gesetzt.

Insgesamt fanden sechs Versuche statt. Die Oberflächen wurden elektronenmikroskopisch ausgewertet. Pro Plättchen wurden zehn Gesichtsfelder ausgewählt und die Thrombozytenzahl als Kriterium für die Hämokompatibilität ausgezählt. Eine statistische Auswertung aller Materialien zeigte, dass unter den getesteten Materialien nur eine mit Gold beschichtete PEEK-Version ähnliche antithrombogene Eigenschaften wie das On-X Aortic aufweisen konnte. Die

kohlenstoffverstärkten Oberflächen genauso wie die unbeschichteten PEEK wiesen im Durchschnitt eher mangelhafte Ergebnisse auf.

6 Literaturverzeichnis

Ahmed F., Choudhury N., Dutta N., Brito e Abreu S., Zannettino A., Duncan E.: Interaction of Platelets with Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) Electrospun Surfaces, Biomarcromolecules,15, 744-755, (2014)

Bagot C., Arya R., Virchow and his Triad: a Question of Attribution, British Journal of Haematology, 134, 180-190, (2008)

Baumgartner H., Muggli R., Tschopp T., Turitto V.: Platelet Adhesion, Release and Aggregation in Flowing Blood: Effects of Surface Properties and Platelet Function, Thrombosis and Haemostasis Stuttgart 35, 124-138 (1976)

Beckmann A., Funkat A., Lewandowski J., Frie M., Ernst M., Hekmat K., Schiller W., Grummert J., Harringer W., German Heart Surgery Report 2016: The Anual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery, Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 65., 505-518, (2017)

BhavanChand Y., Ranzani R., Annapoorani H., Evaluation of Hemocompatibility of Titanium after Various Surface Treatments: An in vitro Study, International Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry, 2, 136-142, (2012)

Björk V., Lindblom D., The Monostrut Björk-Shiley Heart Valve, Journal of the American College of Cardiology, 6, 1142-1148, (1985)

Bloom R., Goldmann B., Fremes S., Christakis G., Ali I., The first Mitral Valve Replacement, The Annals of Thoracic Surgery, 42, 525-526, (1991)

Bloomfield P., Wheatley D., Prescott R., Miller H., Twelve-Year Comparison of a Bjork–Shiley Mechanical Heart Valve with Porcine Bioprostheses, New England Journal of Medicine. 324, 573-579, (1991)

Born G., Richardson P., Activation Time of Blood Platelets, The Journal of Membrane Biology, 57, 87-90, (1980)

Brown C., Leverett L., Lewis C., Alfrey C., Hellums J.: Morphological, Biochemical, and Functional Changes in Human Platelets Subjected to Shear Stress, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 86, 462-471, (1975)

Cale A., Sang C., Campanella A., Cameron E., Hufnagel Revisited: A Descending Thoracic Aortic Valve to Treat Prosthetic Valve Insufficiency, The Annals of Thoracic Surgery, 5, 1218-1221, (1993)

Colli A., Gherli T., Mestres C., Degeneration of Native and Tissue Prosthetic Valve in Aortic Position: Do Statins Play an Effective Role in Prevention?, International Journal of Cardiology 116, 144–152, (2007)

Donley, T.G., Gillette, W.B. Titanium Endosseous Implant-Soft Tissue Interface: A Literature Review. J Periodontol., 62, 153-160 (1991)

Dinsmore R., Calton W., Prevention of Adhesions to Polypropylene Mesh in a Rabbit Model, The American Journal of Surgery 65, 383-387, (1999)

Ecker S., Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Biomaterialien: Neue präklinische hämostaseologische Untersuchungsmethoden zur Evaluierung der Biokompatibilität von dentalen Implantatwerkstoffen, Med. dent. Diss. Bonn (2002)

Engelhardt W., Breves G., Diener M., Gäbel G., Physiologie der Haustiere, Thieme Verlag, pp. 141-150 (2015)

Gemmell C., Ramirez S., Yeo E., Sefton M., Platelet Activation in Whole Blood by Artificial Surfaces: Identification of Platelet-Derived Microparticales and Activated Platelet Binding to Leukocytes as Material-Induced Activation Events, Journal of Laboratory and Clinical MEdicine.,125, 276-287, (1995)

Geyhan N., Bestimmung des Flussprofils von mechanischen Herzklappen in Aortenposition mittels Phasenkontrast-MRT in Vivo. Ein Vergleich von Kippscheibenprothesen (Omnicarbon®) versus Zweiflügelklappen (St.Jude Medical®, On-X®), Med. Diss.Bonn, (2008)

Glasmacher B., Deiwick M., Kalzifizierung biologischer Herzklappenprothesen, Medizintechnik Life Science Engineering, Springer Verlag, 1175-1190, (2008)

Glasmacher B., Nellen E., Reil H., Rau G., In Vitro Hemocompatibility Testing of New Materials for Mechanical Heart Valves, Materials Science and Engeneering Technology, 30., 806-808, (1999)

Green S., Compounts and Composite Materials, PEEK Biomaterials Handbook, Elsevier Verlag, 23-48, (2014)

Grübler B., Tissue Engineering: Wenn die Herzklappe mitwächst, Deutsches Ärzteblatt 103 (36), (2006)

Harbrecht U., Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie, Springer Verlag, 27-35, (1999)

Heilmann L., F. Rathz, Tempelhoff G., Harenberg J., Breddin H., Schwamm W., (im Namen der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung), Die Anwendung von niedermolekularen Heparinen in der Schwangerschaft, Georg Thieme Verlag, Geburtshilfe Frauenheilkunde, 355-363, (2001)

Hensler E., Evaluierung von Oberflächeneigenschaften und Funktion einer mechanischen trikuspiden Aortenklappe in vitro und in vivo, Med. Diss. Kiel, (2009)

Ishihara K., Hanyuda H., Nakabayashi N.: Synthesis of Phospholipid Polymers Having a Urethane Bond in the Side Chain as Coating Material on Segmented Polyurethane and Their Platelet Adhesion-Resistant Properties, Biomaterials 16, 873-879, (1995)

Jung F., Braune S., Lendlein A., Haemocompabibility Testing of Biomaterials Using Human Platelets, Clinical Hemorheology and Microcirculation 53, 97-115, (2013)

Keil J., Vergleichende Untersuchungen der Hämokompatibilität unterschiedlicher Polymere (Polypropylen, Cuprophan, PDLLA, PDLLA/HEMA) im Hinblick auf Thrombozytenadhäsion und -aktivierung, Med. Diss. Aachen, (2003)

Kim C., Steinseifer U., Schmitz-Rode T., Thrombogenic Evaluation of Two Mechanical Heart Valve Prostheses Using a New In-Vitro Test System, The Journal of Heart Valve Disease, Vol. 18, 207-213 (2009)

Krönung G., Arterieller Shuntzufluss durch eine Gefäßprothese - Der Einsatz von Gefäßprothesen in der Shuntchirurgie, Dialyse aktuell, 11(6), 40-43, (2007)

Kundu S., Klein M., Whittlesey G., Barmatoski S., Salley S.: Quantitative Scanning Electron Microscopy for the Evaluation of Thromboosis in Extracorporeal Circuits, Transaction – American Society for Artifical Internal Organs, 34, 568-571 (1988)

Kurtz S., An Overview of PEEK Biomaterials, PEEK Biomaterials Handbook, Elsevier Verlag, 1-8, (2012)

Martinez M., Tsakiris D., Thromboserisiko und kombinierte orale Kontrazeption, Journal für Gynäkologische Endokrinologie, 25 (2), 7-9 (2015)

Mason R., Read M., Brinkhou K., Effect of Fibrinogen Concentration on Platelet Adhesion to Glass, Journal of the Society for Experimental Biology and Medicine, 137 (2), 680-682, (1971)

Matthews A., The Development of the Starr-Edwards Heart Valve, Texas Heart Institute Journal, Vol. 25, pp. 282-293, (1998)

Meyer S., Mittelfristige Ergebnisstudie nach Aortenklappenersatz mit gerüstfreier boviner Perikardprothese im Hinblick auf Morbidität, Mortalität und Hämodynamik, Med. Diss. Berlin, (2009)

Minelli C., Yamamoto A., Kim M.: Optically Patterable Polymer Films as Model Interrfaces to Study Cellular Behaviour on Topographiccally Structured Materials, Journal of Biomaterials Science 22, 577-588, (2011)

Misselwitz F., Leytin V., Repin V., Effect of Metabolic Inhibitors on Platelet Attachment, Spreading and Aggregation on Collagen-coated Surfaces, Thrombosis Research, 46 (2), 233-240, (1987)

Morgenstern E., Morphologie der Thrombozyten, Springer Verlag, 3-14, (1999)

Muthusubramaniam I., Lower R., Fissell, Wilhelm, Li L., Marchant R., Desait T., Roy S.: Hemocompatibility of Silicon-Based Substrates for Biomedical Implant Applications, Annals of Biomedical Engineering, 39, 1296-1305, (2011)

Nedjat A., Das PEEK Implantat als Alternative zum Titan, ZWP Online, Implantologie, (2014)

Niederera A., Wuillemina W. , De Moerlooseb P., Orale Antikoagulation: Praktisches Vorgehen, Schweizer Mediziner Forum, Nr. 17, 452-430, (2001)

Nurdin N., Francois P., Mugnier Y., Krumeich J., Moret M., Aronsson B., Descounts P.: Haemocompatibility Evaluation of DLC- and SIC-coated Surfaces, European Cells and Materials, 5, 17-28, (2003)

Okazaki Y., Wika K., Matsuyoshi T., Fukamachi K., Kuntiomo R., Tweden K., Harasaki H.: Platelets Are Deposited Post-Operatively on the Leaf of a Mechanical Heart Valve in Sheep Whithout Post-Operative Anticoagulants or Antiplatelet Agents, Department of Biomedical Engineering, Cleveland Clinic Foundation, M750-4 (1996)

Pingel S., Retrospektive Analyse potentieller Beeinflussungsmodelle auf die Reoperationsrate nach mechanischem und biologischem Herzklappenersatz, Med. Diss. München, (2009)

Repenning D., Oberflächenbeschichtung - Beschichtungen auf Implantaten, Springer Verlag, Ossäre Integration, 53-61, (2006)

Saß K., Einfluss der Noduli Arantii auf den suffizienten Schluss der Aortenklappe, Med. Diss. der Universität zu Lübeck, (2007)

Sbarbati R., Gianessi D., Cenni M., Lazzerini G., Verni F., De Caterina R., Pyrolytic Carbon Coating Enhances Teflon and Dacron Fabric Compatibility with Endothelial Cell Growth, The International Journal of Artifical Organs, 491-498, (1991)

Schaldach M., Hubmann M., Hardt R., Weikl R. Titannitrid-Herzschrittmacher-Elektroden - Pacemaker Electrodes Made of Titanium Nitride, Biomedizinische Technik, Band 34, Heft 7-8, Jan. (1998)

Schmidt R., Lang F., Heckmann M., Physiologie des Menschen, Herzmechanik, Springer Verlag, 478-502, 540-564, (2011)

Schmitt B., Langzeitergebnisse nach Implantation von Björk-Shiley C/C Herzklappen, Med. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München, (2009)

Schmitz W., Linder F., Storch H., Zur Geschichte der Herzchirurgie in Berlin und Heidelberg, Springer Verlag, Heidelberger Jahrbücher, 79-87, (1989)

Schniedl S., Rottenkolber M., Szymanski J., Siegmund W., Hippius M., Farker K., Drewelow B., Hasford J., Thürmann P., Blutungskomplikationen und Leberschädigungen unter Phenprocoumon, Deutsches Ärzteblatt, 110, 244-258, (2013)

Schulte H., Horstkotte D., Krian A., Sons H., Bircks W., Komplikationen nach Herzklappenersatz mit mechanischen und biologischen Prothesen, Langenbecks Archiv für Chirurgie, 373, 607-611, (1987)

Schwitalla A., Spintig T., Kallage I., Wagner R., Mülle W., Polyetheretherketon (PEEK) – ein vielversprechender Werkstoff für die Zukunft, Umwelt Medizin Gesellschaft, 27, 255-261, (2014)

Senning A., Aortenklappenersatz durch Fascia lata, Springer-Verlag, I. Herzklappenersatz - II. Chirurgische Behandlung bei Durchblutungsstörungen des Herzens, 33-38, (1970)

Seyfert U., Biehl, V., Schenk, J.: In Vitro Haemocompatibility Testing of Biomaterials According to the ISO 10993-4, Biomolecular Engineering, 19, 91-96, (2002)

Shen C., Lin J.: Solvent and Concentration Effects on the Surface Characteristics and Platelet Compatibility of Zwitterionic Sulfobetaine-Terminated Self-Assembled Monolayers, Colloids and Surfaces B, Biointerfaces 101, 376-383, (2013)

Sievers H.-H., Ross-Operation bei Aorten-Vitien, Zeitschrift für Kadiologie, 89, 730-733, (2000)

Sievers H.-H., Hanke T., Stierle U., Bechtel M., Graf B., Robinson D., Ross D., A Critical Reappraisal of the Ross Operation, American Heart Association, 114, 505-511, (2006)

Skarja G., Konlough-Rathbone R., Perry D., Rubens F., Brash J.: A Cone-and-Plate Device for the Investigation of Platelet Biomaterial Interactions, Journal of Biomedical Materials Research, 34, 427-438, (1997)

Sperling C., Schweiss R., Streller U., Werner C.: In Vitro Hemocompatibility of Self-Assembled Monolayers Displaying Various Functional Groups, Biomaterials 26, 6547-6557, (2005)

Tischer R., Modifizierung von Membranoberflächen zur Verbesserung der Blutkompatibilität, Rer. nat. Diss. Dresden, (2008)

Uchida K., Yamato M., Ito E., Kwon O., Kikuchi A., Sakai K., Okano T.: Two Different Types of Nonthrombogenic Surfaces: PEG Suppresses Platelet Adhesion ATP-Independently but HEMA-St Block Copolymer Requires ATP Consumption of Platelet to Prevent Adhesion, Institute of Biomedical Engineering, Tokyo, (1999)

Voigt S., Patienten-Selbstmanagement der oralen Antikoagulation nach mechanischem Herzklappenersatz versus konventioneller Gerinnungsbestimmung durch den Hausarzt: Ein 10-Jahres-Rückblick, Med. Diss. München, (2011)

Winter S., Aubertin F., Gbureck U., Seyfert U., Thull R., Breme J. Untersuchung des Benetzungsverhaltens von oberflächen-modifizierten Ti-Werkstoffen im Hinblick auf verbesserte Hämokompatibilität, Biomaterialien 5 (2), 76-80, (2004)

Wolfe D., Singh, J.: Microstructural Evolution of Titanium Nitride (TiN) Coatings Produced by Reactive Ion Beam-Assisted, Electron Beam Physical Vapor Deposition (RIBA, EB-PVD), Journal of Material Science, 34, 2997-3006, (1999)

Yang Y., Franzen, S., Olin, C.: In Vivo Comparison of Hemocompatibility of Materials Used in Mechanical Heart Valves, Journal of Heart Valve Disease, 532-7 (1996)

Ye X., Wang Z., Zhang X., Zhou M., Cai L.: Hemocompatibility Research on the Micro-structure Surface of a Bionic Heart Valve, Bio-Medical Materials and Engineering 24, 2361-2369, (2014)

Zimmermann H., Heinlein M., Gildner N., Titanisierung von Implantatoberflächen, Medizintechnik, Springer-Verlag, 907-925, (2009)

Zingg W., Neumann A., Strong A., Hum O., Absolom D.: Effect of Surface Roughness on Platelet Adhesion under Static and under Flow Conditions, The Canadian Journal of Surgery, 25, 16-19 (1982)

DIN EN ISO 10993-4: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten, Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut (2012)

DIN EN ISO 10993-12: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten, Probenvorbereitung und Referenzmaterialien (2012)

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herzklappe nach Judson T. Chesterman

Abbildung 2: Starr/Edwards Kugel-Klappe mit Metallkäfig

Abbildung 3: Björk-Shiley-Klappe

Abbildung 4: Doppelflügelprothese

Abbildung 5: Biologische Herzklappe aus Rinderperikard

Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Erythrozyten

Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Leukozyten

Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten und derer Ausbildung von Pseudopodien

Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme: Blutstropfen auf Glas

Abbildung 10: Elektronenmikroskopiosche Aufnahme: Blutausstrich auf Glas

Abbildung 11: Versuchsaufbau Teil 1

Abbildung 12: Versuchsaufbau Teil 2

Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme bei einer Versuchszeit von 15 Minuten

Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme bei einer Versuchszeit von 90 Minuten

Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polypropylen nach 15 Minuten Versuchszeit

Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Aufnahme vonTeflon nach 15 Minuten Versuchszeit

Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Überlagerung mit Erythrozyten

Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme mit heparinisiertem Blut bei einer Versuchsdauer von 15 Minuten

Abbildung 19: Übersicht der mittleren Thrombozytenanzahl

Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahme, On-X Aortic, 800er-Vergrößerung

Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Gold, 800er-Vergrößerung

Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme, LT1, 800er-Vergrößerung

Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme, LT1-CA30, 800er-Vergrößerung

Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vestakeep 400R 1., 800er-Vergrößerung

Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vestakeep400R, Benetzung mit Fibrinfäden, 800er-Vergrößerung

Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme, MOTIS, 800er-Vergrößerung

Abbildung 27: Box-Plot

Abbildung 28: Anzahl der Leukozyten

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Materialien

Tabelle 2: Übersicht der Probanden

Tabelle 3: Übersicht der Versuchszeiten im Vorversuch

Tabelle 4: Friedmann-Test Ergebnis

Tabelle 5: Statistik für Friedmann-Test

Tabelle 6: Wilcoxon-Test

9 Anlagen

9.1 Votum der Ethikkommission

UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. H.-H. Sievers
Direktor der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie

im Hause

Ethik-Kommission
Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-131
Datum: 13. Juli 2016

Sitzung der Ethik-Kommission am 07. Juli 2016
Antragsteller: Herr Prof. Sievers
Titel: Hämokompabilität verschiedener Oberflächen und deren Beschichtungen einer künstlichen Herzklappe

Sehr geehrter Herr Prof. Sievers,
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission kann **noch kein Votum** erstellen. Zuvor sind weitere Informationen nachzureichen sowie Überarbeitungen der Antragsunterlagen vorzunehmen:
Die Kommission fragt sich, ob mit heparinisiertem Blut eine Prüfung der Hämokompabilität überhaupt möglich ist. Wie wird sichergestellt, dass die Entnahme von 50 ml nur bei hämodynamisch stabilen Patienten erfolgt? Ist das Blut von Patienten notwendig, könnte man nicht besser Gesunde als Spender heranziehen? Die Medikation der Patienten/Probanden, von denen das Blut stammt, sollte miterfasst werden, um mögliche Einflüsse auf das Ergebnis zu kontrollieren. Der Absatz in der Patienteninformation „Ziele der Studie" ist zu straffen, die ausführlichen Informationen zu „Marcumar" sind nicht relevant und verwirren. Es wird empfohlen, den ersten Absatz auf S. 2 der Synopsis zu verwenden. Ebenso sind die Ausführungen zu den geplanten Analysen aus der Synopsis in die Patienteninformation zu übernehmen. Die Patienteninformation sollte den Leser direkt ansprechen. Die Einwilligungserklärung ist um den Studientitel zu ergänzen. Die überarbeiteten Unterlagen sind in einfacher Kopie einzureichen und werden im verkürzten Verfahren abschließend votiert.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

☒ Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
☒ Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
☒ Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)
☒ Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)
☒ Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)
Frau Martini (Caritas)
☒ Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
☒ Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)
☒ Hr. Schneider (Landgericht Lübeck)
☒ Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
☒ Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)
Fr. Prof. Dr. Zühlke (Humangenetik)

Dr Schwedt

UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. H.-H. Sievers
Direktor der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie

im Hause

Ethik-Kommission
Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-131
Datum: 25. August 2016

Sitzung der Ethik-Kommission am 07. Juli 2016
Antragsteller: Herr Prof. Sievers
Titel: Hämokompabilität verschiedener Oberflächen und deren Beschichtungen einer künstlichen Herzklappe

Sehr geehrter Herr Prof. Sievers,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 28. Juli 2016, in dem Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum Studienvorhaben nachkommen und überarbeiteten Unterlagen vorlegen.

Die Kommission hat nunmehr keine Bedenken mehr. Sie gibt aber folgende Hinweise:

- Die Inkonsistenz zur Prävalenz von Klappen OPs zwischen dem Basisformular (52.000 bzw. 16.000 Klappen-OPs/Jahr in Europe bzw. Deutschland) und der Synopsis (75.000 bzw. 30.000/Jahr) ist aufzulösen.

- In der Patenteninformation sollte unter dem Punkt „Datenschutzrechtliche Information" im 2. Absatz der Schreibfehler korrigiert werden: „...mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand..." anstelle von „...mit reinem unverhältnismäßig großen Aufwand...".

- Die eingenommenen Medikamente sollten zusammen mit den Vorerkrankungen nicht auf dem Formular „Einwilligungserklärung", sondern auf einem Extra-Formular dokumentiert werden.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de).
Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Stellv. Vorsitzender

Fr. Herr

UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. H.-H. Sievers
Direktor der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie

im Hause

Ethik-Kommission
Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-131
Datum: 21. März 2017

Hämokompabilität verschiedener Oberflächen und deren Beschichtungen einer künstlichen Herzklappe
Hier: Änderung – Ihr Schreiben vom 15. März 2017

Sehr geehrter Herr Prof. Sievers,

die Änderung hinsichtlich der Durchführung einer Versuchsreihe mit10 gesunden Blutspendern habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

9.2 Probandeneinwilligungserklärung

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein
Campus Lübeck Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck

UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

Campus Lübeck
Abteilung: Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Ansprechpartner: Prof. Dr. med. H.-H. Sievers
Tel: 0451 / 500 - 2108
Fax: 0451 / 500 - 2051
E-Mail: Hans-Hinrich.Sievers@uksh.de
Internet: www.uksh.de\herzchirurgie-luebeck

Datum:

Probandeninformation

zur Teilnahme an der Studie:

Hämokompabilität verschiedener Oberflächen und deren Beschichtungen einer künstlichen Herzklappe

unter der Leitung von:

Herrn Prof. Dr. med. H.-H. Sievers, Direktor der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Sollten Sie weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wenden Sie sich bitte an den aufklärenden Arzt oder direkt an oben genannte Adresse.

Ziele der Studie:

Ziel der hier vorgelegten Studie ist es, eine künstliche Herzklappe oberflächlich so zu verändern (durch neue Materialien bzw. Beschichtungen, dass die Dauermedikation mit „Marcumar“ nicht mehr notwendig ist bzw. die Thrombogenität soweit herabgesetzt werden kann, dass leichtere handelsübliche Medikamente, wie z.B. „Aspirin“ mit dem Wirkstoff Acetylsalicylsäure genügen, die weitaus weniger Nebenwirkungen haben.

Um die Blutverträglichkeit einiger neuer Materialien zu testen, möchten wir Ihnen 50

ml Blut entnehmen. Es entsteht kein weiterer zeitlicher oder finanzieller Aufwand für Sie. Das menschliche Blutvolumen beträgt ca. 8 % des Körpergewichts; d.h. ein im Durchschnitt 70 kg schwerer Mensch besitzt ca. 5,6 Liter Blut (5600 ml). Wir benötigen somit weniger als 1% Ihres Blutes.

Zur weiteren Untersuchung wird das Blut im Labor in einen eigens dafür angefertigten Behälter gegeben. Im Deckel dieses Behälters sind kleine Plättchen mit den unterschiedlichen Beschichtungen und Oberflächenbeschaffenheiten befestigt. Das Blut wird hinzu gegeben und mittels eines Magnetrührers bewegt, so dass über die Material-Plättchen eine gewisse Strömung entsteht. In dieser Zeit können sich Blutbestandteile, Zellen und Proteine gegebenenfalls an den Plättchen anlagern. Insgesamt werden sechs verschiedene Materialien bzw. Materialkombinationen getestet.

Anschließend werden die unterschiedlichen Plättchen entnommen, in Lösung fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Auf diese Weise lässt sich herausfinden, ob sich dort Zellen angelagert haben. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Untersuchung findet am UK-SH Lübeck statt.

Wünschenswertes Ergebnis der Untersuchungen ist es, herauszufinden, wie das Material und die Oberfläche einer künstlichen Herzklappe beschaffen sein muss, so dass sich idealerweise keine oder möglichst wenig Zellen und Proteine daran anlagern und die verschiedenen Thrombogenitätsfaktoren im Normbereich liegen.

Nach Verwendung des Blutes für die Studie, wird die Probe direkt fachgerecht entsorgt.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie müssen also nicht teilnehmen.

Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen die Teilnahme an der Studie beenden, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile im Hinblick auf die Behandlung oder Ihr Verhältnis zu Ihrer behandelnden Ärztin bzw. Arzt entstehen. Wenn Sie die Studienteilnahme abbrechen, haben sie das Recht, die Löschung Ihrer bis dahin gesammelten Daten (bzw. die Vernichtung des Blutes) zu verlangen. Wenn Sie bei Rücktritt nicht auf eine Löschung bestehen, werden Ihre bisher erhobenen Daten

bzw. das gesamte Biomaterial unwiderruflich anonymisiert, d.h. eine Zuordnung zu Ihrer Person ist nicht mehr möglich.

Es wird keine Probandenversicherung abgeschlossen.

Datenschutzrechtliche Informationen

Personenbezogene Daten (nach BDSG §3 Abs. 1) sind Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse einer bestimmten oder bestimmbaren natürlichen Person.

Anonymisieren (nach BDGS §3 Abs. 6) ist das Verändern personenbezogener Daten derart, dass die Einzelangaben über persönliche und sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit reinem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmbaren natürlichen Person zugeordnet werden können.

Pseudonymisieren (nach BDSG §3 Abs. 6a) ist das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren.

Für die Datenverarbeitung verantwortlich ist der Studienleiter.

Die Datenerhebung erfolgt zum Zweck des oben genannten Studien-/Forschungsvorhabens.

Erhoben werden: Alter, Geschlecht, Datum, Vorerkrankungen/Gerinnungsstatus (falls bekannt)

Ihre Daten werden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zu Ihrem Namen, elektronisch gespeichert und ausgewertet.

Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes werden eingehalten.

Zugriff auf Ihre Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur

Verschwiegenheit verpflichtet. Die Daten sind vor fremden Zugriff geschützt.

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels/am Ende des Forschungsvorhaben, spätestens jedoch nach 3 Jahren anonymisiert, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Archivierungspflichten vorsehen.

Einwilligungserklärung

Name, Vorname: _____

Alter: _____

Geschlecht: O männlich O weiblich

Falls bekannt:
Vorerkrankungen/Gerinnungsstatus: _____

Ich wurde durch Herrn Prof. Dr. med. H.-H. Sievers, Telefon: 0451 500-2108 über die Studie „Hämokompabilität verschiedener Oberflächen und deren Beschichtungen einer künstlichen Herzklappe“ informiert.

Ich hatte Gelegenheit alle meine Fragen zu stellen. Diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet.

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich – mündlich und schriftlich - über das Ziel und den Verlauf der Studie, Chancen und Risiken der Behandlung, meine Rechte und Pflichten, den mir zustehenden Versicherungsschutz und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Ich erkläre hiermit meine Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde darauf hingewiesen, dass meine Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen.

Ich wurde über meine Datenschutzrechte informiert. Mit der Erhebung, Verarbeitung und Speicherung meiner Daten, sowie der Übermittlung im Rahmen der Studie bin ich einverstanden.

_____	_____	_____
Ort, Datum	Unterschrift Ärztin/Arzt	Unterschrift StudienteilnehmerIn

9.3 Versuchsprotokoll

Datum:

Proband:

Geschlecht: o männlich, o weiblich
Geburtsjahr: _____

Materialien:

On-X Aortic
LT-1
LT-1 CA30
MOTIS
GOLD
Vestakeep400R

Vorbehandlung:

Aceton: ____ min
Ethanol: ___ _min
Aqua dest.: ____ min

Auswaschen der Proben in PBS

Versuchsstart:_____

Versuchsende: _____

Fixierung der Proben in Monti-Graziadei-Lösung

9.4 Versuchsauswertung aller Daten

versuch	gesichtsfeld	lt1	lt1ca30	gold	motis	vestakeep400r	onxaortic
1	1	340	64	240	313	372	145
1	2	289	87	227	295	387	175
1	3	342	212	241	338	301	142
1	4	336	193	236	318	380	90
1	5	309	173	208	283	351	141
1	6	320	190	248	243	415	88
1	7	292	184	273	243	391	140
1	8	411	237	304	244	433	118
1	9	338	200	360	208	430	151
1	10	320	203	349	274	325	90
		329,7	**174,3**	**268,6**	**275,9**	**378,5**	**128**
2	1	465	297	321	830	290	140
2	2	358	291	277	879	238	174
2	3	514	271	295	807	246	169
2	4	448	240	301	837	314	185
2	5	408	267	296	683	304	121
2	6	500	205	308	671	275	193
2	7	463	228	367	639	353	190
2	8	502	204	308	652	276	209
2	9	489	215	343	626	226	135
2	10	413	221	376	613	190	167
		456	**243,9**	**319,2**	**723,7**	**271,2**	**168,3**
3	1	334	139	116	30	175	144
3	2	241	147	139	50	166	132
3	3	300	153	167	78	143	201
3	4	231	218	191	50	61	288
3	5	177	166	240	33	133	210
3	6	191	182	205	30	113	239
3	7	345	142	219	52	120	123
3	8	250	102	140	56	153	228
3	9	277	166	120	20	160	194
3	10	346	132	85	27	245	165
		269,2	**154,7**	**162,2**	**42,6**	**146,9**	**192,4**
4	1	248	758	156	650	438	182
4	2	288	117	233	663	469	177
4	3	607	689	181	594	381	220
4	4	273	664	163	623	290	191
4	5	356	699	171	469	341	118
4	6	357	574	81	513	381	312
4	7	390	632	91	478	407	294
4	8	346	684	196	459	439	210
4	9	329	238	164	435	412	255
4	10	332	252	104	468	378	256
		352,6	**530,7**	**154**	**535,2**	**393,6**	**221,5**
5	1	196	248	102	481	435	135
5	2	142	301	159	458	348	301
5	3	153	374	199	450	290	195
5	4	160	300	148	385	321	217
5	5	206	301	173	631	335	194
5	6	470	363	89	345	315	181
5	7	232	343	322	462	309	178
5	8	175	332	157	476	360	250
5	9	174	364	111	343	310	176
5	10	220	355	125	348	374	211
		212,8	**328,1**	**158,5**	**437,9**	**339,7**	**203,8**
6	1	379	454	171	381	138	239
6	2	406	390	147	374	143	156
6	3	290	573	186	394	115	216
6	4	314	428	141	305	125	259
6	5	327	372	140	335	103	134
6	6	273	454	124	352	109	128
6	7	305	470	114	246	60	235
6	8	285	498	133	301	62	117
6	9	311	435	126	296	79	236
6	10	306	501	76	264	44	136
		319,6	**457,5**	**135,8**	**324,8**	**97,8**	**185,6**
	Arith. Mittel	**323,32**	**314,87**	**199,72**	**390,02**	**271,28**	**183,27**

10 Danksagungen

Ich danke zuallererst meinem Doktorvater und Direktor des Instituts für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie Herrn Prof. Dr. Hans-Hinrich Sievers für die Bemühungen mir eine solche Arbeit in meiner Wunschheimat zu ermöglichen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die immer nette und hilfsbereite Zusammenarbeit sowie für die ansteckende Leidenschaft für sein Fachgebiet bedanken.

Ebenso geht mein Dank an den Leiter des Labors für Hydrodynamik aus dem Bereich der experimentellen Herzchirurgie Herrn Dipl.-Ing. Dr. Michael Scharfschwerdt, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und für jedes erdenkliche Problem eine Lösung parat hatte. Zusätzlich möchte ich mich bei Frau Kathrin Schubert für die kollegiale und sympathische Zusammenarbeit bedanken.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern der Herzambulanz für ihre Bereitschaft mir bei der Probenbeschaffung zu helfen.

Den Mitarbeitern des anatomischen Instituts und insbesondere Herrn Prof. Dr. Matthias Klinger danke ich für die Erstellung unzähliger Aufnahmen und für ihre immer hilfsbereite Art.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Statistik für Ihre kompetente Beratung.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere auch meinem Freund für die jahrelange Unterstützung und Hilfe bedanken, ohne die ich nicht da wäre wo ich jetzt bin und ohne die eine solche Arbeit nie hätte zustande kommen können.

Vielen Dank!

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	10.06.1990
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Ausbildung

August 2000 - Juni 2009 **Abitur**
Carl-Maria-von-Weber Gymnasium, Eutin

Okt. 2010 - Mai 2017 **Studium der Tiermedizin**
Tierärztliche Hochschule Hannover

Mai 2016 -
voraussichtlich März 2018 **Dissertation**
UKSH Lübeck, Institut für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie

Praxis

Praktika
Praktikum im biologischen Zentrum der Christian-Albrechts-Universität Kiel, März 2008
Ablammpraktikum, März 2011 im Schafsbetrieb Jochen Marten in Mölln
Ablammpraktikum, März 2012 im Schafsbetrieb Angus Woods in Irland
Großtierarzt - Praktikum, September 2012 bei DVM Ken Wood in Ebernezer, Kanada
Kleintierarzt - Praktikum, April 2013 in der Kleintierpraxis Spitz -Schulenburg in Eutin

	Kleintier-Praktikum, September 2013 in der Kleintierklinik Aspern in Wien, Österreich
Praktisches Jahr	Kleintierklinik-Praktikum, September 2014 in der Kleintierklinik Quickborn
	Kleintierpraxis-Praktikum, Oktober-November 2014 in der Kleintierpraxis Spitz-Schulenburg in Eutin
	Kleintierklinik-Praktikum, Dezember 2014 – Februar 2015 in der Kleintierklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover
	Schlachthofpraktikum, März 2015 im Schlachthof Bremen
	Veterinäramt- und Lebensmittelpraktikum, April 2015 im Kreis Plön
	Kleintierpraxis-Praktikum, Mai 2015 in der Kleintierpraxis Fr. Dr. Schröder in Hannover
	Groß- und Kleintierpraktikum, Juni 2015 in der Tierklinik in Nanton, Kanada
Seit Mai 2016	**Angestellte Assistenztierärztin**
	Kleintierklinik Dr. Wagner-Rietschel, Lübeck

Zusatzqualifikationen

FELASA Kategorie B

Lehrgang Teleinjektion