

Aus der
Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Klinisches Forschungslabor der Thorax-,
Herz- und Gefäßchirurgie

**Endothelialisierung von künstlichen Lungen durch
Homing-Faktor imitierende Oberflächenbeschichtungen
für Langzeit-Anwendungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Halbrügge, Franziska

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Avci-Adali

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Köppen

Tag der Disputation: 23.04.2025

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis.....	13
1. Einleitung.....	14
1.1. Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO)	14
1.1.1. Aufbau und Funktion der ECMO	14
1.1.2. Indikationen für eine ECMO-Therapie.....	18
1.1.3. Probleme und Komplikationen des ECLS im klinischen Alltag.....	20
1.2. Der Oxygenator	23
1.2.1. Aufbau und Funktion des Oxygenators und der Oxygenator-Membran	23
1.2.2. Probleme und Komplikationen im Bereich der Oxygenator-Membran.....	25
1.3. Hämokompatibilität der Oxygenator-Membran	28
1.3.1. Ansätze zur Verbesserung der Hämokompatibilität	29
1.3.2. Das Endothel und die Hämostase.....	29
1.3.3. Das vaskulär-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin)	33
1.3.4. Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs).....	35
1.4. Bedeutung der Endothelialisierung von Oxygenator-Membranen.....	36
2. Zielsetzung	38
3. Material und Methoden	40
3.1. Materialien	40
3.1.1. Geräte.....	40
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	40
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	42
3.1.4. Lösungen und Puffer	43
3.1.5. Zellen.....	43
3.1.6. Zellkulturmedien	44
3.1.7. Lösungen für den Nachweis des NHS-Alkins auf den HFM.....	45
3.1.8. Antikörper	45
3.1.9. Kits für Antikörperlabeling und Antikörperkonjugation zu den HFM	46
3.1.10. Software	46
3.2. Methoden	47
3.2.1. Funktionalisierung von HFM.....	47

3.2.1.1.	Sauerstoff-Plasma Behandlung.....	47
3.2.1.2.	Silanisierung mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).....	48
3.2.1.3.	Nachweis der Aminogruppen mittels Methylorange	49
3.2.1.4.	Konjugation von N-hydroxysuccinimid-Alkin-Ester (NHS-Alkin Ester) zur Oberfläche der HFM	49
3.2.1.5.	Nachweis der Alkin-Gruppen auf der Oberfläche der HFMs	50
3.2.1.6.	Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers (CD144)	54
3.2.2.	Biofunktionalisierung von HFM.....	56
3.2.2.1.	Bindung des VE-Cadherin-Antikörpers zur funktionalisierten Oberfläche	56
3.2.2.2.	Nachweis des VE-Cadherin Antikörpers auf den HFMs.....	57
3.2.3.	Auftauen von humanen venösen Nabelschnurzellen (HUVEC).....	58
3.2.4.	Kultivierung, Passagieren und Ablösung der HUVEC	59
3.2.5.	Endothelialisierung der biofunktionalisierten HFMs mit HUVECs	59
3.2.6.	Anfärben der angehafteten HUVECs auf den HFMs mit Calcein-AM.....	61
4.	Ergebnisse.....	62
4.1.	Silanisierung der HFM.....	62
4.2.	Nachweis Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling auf den HFMs	69
4.2.1.	Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Konjugation an HFM nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung	70
4.2.1.1.	Einmaliges Waschen der HFMs mit 100% EtOH nach Cy3-Azid-Inkubation 70	
4.2.1.2.	Zweimaliges Waschen der HFM mit 100% EtOH nach Cy3-Azid- Inkubation	73
4.2.2.	Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Konjugation an HFM nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung	78
4.2.2.1.	Einmaliges Waschen der HFM mit 100% EtOH nach Cy3-Azid-Inkubation 78	
4.2.2.2.	Zweimaliges Waschen der HFM mit 100% EtOH nach Cy3-Azid- Inkubation	82
4.2.2.3.	Dreimaliges Waschen der HFMs mit 100% EtOH und Inkubation mit 100% EtOH über Nacht nach Cy3-Azid-Inkubation	85
5.	Diskussion	93
5.1.	Funktionalisierung von PP- und PMP-Hohlfasermembranen.....	95
5.2.	Biofunktionalisierung der funktionalisierten PP- und PMP Hohlfasermembranen	100
5.3.	Endothelialisierung von PP- und PMP-Hohlfasermembranen.....	102

5.4. Fazit und Ausblick.....	108
6. Zusammenfassung.....	110
7. Erklärung zum Eigenanteil	112
Danksagung.....	113
Literaturverzeichnis	114

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Activated clotting time
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
apTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
CBP	Cardiopulmonary Bypass
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CuAAC	Kupfer(I)-aktivierte Azid/Alkin Cycloaddition
Cy3	Cyanin-3
DES	Drug eluting stent
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECLS	Extracorporeal life support system
EC-Medium	Endothelzell-Medium
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
EtOH	Ethanol
F _i O ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
hCB-EC	human cord blood-derived endothelial cells
HFM	Hohlfasermembranen
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
HZV	Herzzeitvolumen
IgG	Immunglobulin G
NHS-Alkin Ester	N-hydroxysuccinimid-Alkin Ester
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PF4	Plättchenfaktor 4
PMP	Polymethylpenten

PP	Polypropylen
RFU	Fluoreszenzintensität
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolyl-methyl)amine
VA-ECMO	Veno-arterielle Extrakorporale Membranoxygenierung
V-AV-ECMO	Veno-arteriell-venöse Extrakorporale Membranoxygenierung
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
vWF	von-Willebrand-Faktor
V-VA-ECMO	Veno-venös-arterielle Extrakorporale Membranoxygenierung
VV-ECMO	Veno-venöse Extrakorporale Membranoxygenierung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Funktionsweise und der Komponenten einer ECMO.	15
Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Kanülierungsarten der ECMO.	16
Abbildung 3: Darstellung einer Zentrifugalpumpe im Querschnitt.....	17
Abbildung 4: Aufbau der (mikroporösen, nicht-mikroporösen) Hohlfasermembran im Oxygenator in der a) Parallel-Platten- (z.B. während der ECMO-Therapie auf der Intensivstation) und in der b) Zylinder-Version (z.B. beim kardiopulmonalen Bypass).	24
Abbildung 5: Darstellung der Entstehungsorte von Thromben im Oxygenator.	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sekundären Hämostase.	33
Abbildung 7: VE-Cadherin als transmembranes Glykoprotein.	35
Abbildung 8: Plasma Generator.....	47
Abbildung 9: Funktionalisierung von PP-/PMP-HFM durch die Behandlung mit Sauerstoff-Plasma und Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).	48
Abbildung 10: Konjugation der Alkin-Gruppen zur Oberfläche der vorbehandelten HFMs.50	
Abbildung 11: Labeling der zur Oberfläche der HFMs konjugierten Alkin-Gruppen mit Cy3-Azid.	53
Abbildung 12: Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers (CD144).	55
Abbildung 13: Bindung des VE-Cadherin Antikörpers zur funktionalisierten Oberfläche.....	57
Abbildung 14: Endothelialisierung der HFMs mit HUVECs.	60
Abbildung 15: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PP-HFMs nach Behandlung mit O ₂ -Plasma und Inkubation mit 5% APTES- Lösung.	63
Abbildung 16: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PMP-HFM nach Behandlung mit O ₂ -Plasma und Inkubation mit 5% APTES- Lösung.	64

Abbildung 17: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf HFM nach Behandlung mit O ₂ -Plasma und Inkubation mit 5% APTES-Lösung – PP- und PMP-HFM im Vergleich.	65
Abbildung 18: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PP-HFM nach Behandlung mit O ₂ -Plasma und Inkubation mit 8% APTES-Lösung.	66
Abbildung 19: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PMP-HFM nach Behandlung mit O ₂ -Plasma und Inkubation mit 8% APTES-Lösung.	67
Abbildung 20: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf HFM nach Behandlung mit O ₂ -Plasma und Inkubation mit 8% APTES-Lösung – PP- und PMP-HFM im Vergleich.	69
Abbildung 21: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH.	71
Abbildung 22: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH.	72
Abbildung 23: Nachweis der Alkin-Gruppen durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich.	73
Abbildung 24: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH.	75
Abbildung 25: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH.	76
Abbildung 26: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich.	77

Abbildung 27: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH.....	79
Abbildung 28: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH.....	80
Abbildung 29: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich.	81
Abbildung 30: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH.	83
Abbildung 31: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH..	84
Abbildung 32: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich.....	85
Abbildung 33: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels dreimaliger Spülung mit EtOH und Inkubation der HFMs in 100% EtOH über Nacht.....	87
Abbildung 34: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels dreimaliger Spülung mit EtOH und Inkubation der HFMs in 100% EtOH über Nacht.....	88
Abbildung 35: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels dreimaliger Spülung mit 100% EtOH und Inkubation der HFMs mit 100% EtOH über Nacht – PP- und PMP-HFM im Vergleich.....	89

Abbildung 36: Fotografische Aufnahme der unterschiedlich vorbehandelten HFM in der Well Platte für den Nachweis der Alkin-Gruppen auf den HFMs nach Labeling mit Cy3-Azid.	90
Abbildung 37: Anfärbung der HUVEC auf HFM mit Calcein-AM.....	92
Abbildung 38: Zunahme der implantierten ECMOs von 2010 bis 2016.	94
Abbildung 39: Darstellung der 30-Tages Überlebenswahrscheinlichkeit nach Implantation einer ECMO..	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Art und Häufigkeit von Komplikationen während einer ECMO-Therapie.	23
Tabelle 2: Verwendete Geräte	40
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	42
Tabelle 5: Lösungen und Puffer	43
Tabelle 6: Zellen	43
Tabelle 7: Zellkulturmedien.....	44
Tabelle 8: Stocklösungen für den Nachweis des NHS-Alkin Esters auf den HFM	45
Tabelle 9: Antikörper	45
Tabelle 10: Kits für Antikörperlabeling und Antikörperkonjugation zu den HFM	46
Tabelle 11: Software	46

1. Einleitung

1.1. Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO)

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) ist ein Kurzzeit-Unterstützungssystem des Körperkreislaufs, welches zu den "*extracorporeal-life-support Systemen*" (engl.: ECLS) gezählt wird. Es kann sowohl zur pulmonalen, zur kardialen, als auch zur kombiniert kardiopulmonalen Unterstützung am Patienten eingesetzt werden. Die Nutzung im klinischen Alltag erfolgt unter anderem entweder zum Regenerationszeitgewinn im Rahmen einer akuten Dekompensation oder zur Unterstützung während oder nach einem herzchirurgischen Eingriff.

Etabliert und angewendet wurde die ECMO zuerst im Rahmen eines kardiopulmonalen Bypasses (*engl.: cardiopulmonary bypass, CPB*) 1955 während einer herzchirurgischen Operation. Das als Herz-Lungen-Maschine bezeichnete ECLS war von John Gibbon Jr. erfunden worden und unter der Leitung von John W. Kirklin in der Mayo Clinic (Minnesota) das erste Mal während einer Operation am offenen Herzen zum Einsatz gekommen (Hessel, 2014). Die Entwicklung des Membranoxygenators als Teil einer ECMO wurde zum ersten Mal Anfang der 1950er Jahre vorangetrieben. Über die Zeit wurden viele Arten von Oxygenatoren entwickelt. Hier wurden Filmoxygenatoren, Blasenxygenatoren, Membranoxygenatoren, biologische Oxygenatoren (tierische Lungen) und sogar die Lungen anderer Patienten in der Funktion als Oxygenator genutzt (Hessel, 2014). Letztendlich setzte sich in den 1960er Jahren hier der heute noch immer genutzte Membranoxygenator durch. Die Entwicklung und Nutzung einer ECMO über einen längeren Zeitraum abseits einer Operation am offenen Herzen, wurde das erste Mal zwischen 1971 und 1975 von Bartlett et al. durchgeführt (Bartlett et al., 2024).

1.1.1. Aufbau und Funktion der ECMO

Grundsätzlich kann der Einsatz einer ECMO die Oxygenierung und Decarboxylierung des Patientenblutes als pulmonale Funktion, die kardiale Pumpfunktion oder beide Funktionen gleichzeitig unterstützen oder auch ganz ersetzen. Grundkonzept einer jeden ECMO-Anlage ist die Ausleitung des

Patientenblutes aus dem Körper, Oxygenierung und Flussbeschleunigung des Blutes in der ECMO und im Anschluss das Zurückführen des oxygenierten Blutes in den Kreislauf des Patienten (Abbildung 1).

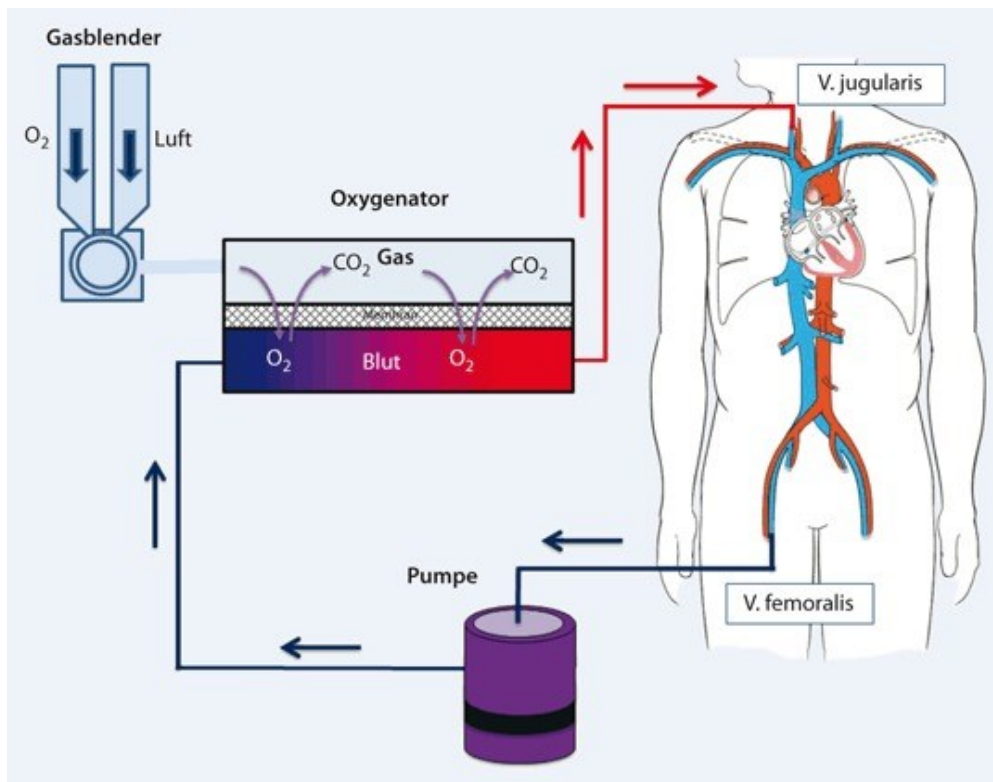


Abbildung 1: Darstellung der Funktionsweise und der Komponenten einer ECMO. Hier dargestellt ist eine VV-ECMO mit Kanülierung der V. femoralis und der V. jugularis. Das Blut wird über die Kanülierung der V. femoralis aus dem Patienten herausgeleitet, passiert die Zentrifugalpumpe, wird im Oxygenator oxygeniert und decarboxyliert und wird dann über die Kanülierung der V. jugularis in den Patienten zurückgeleitet (Pilarczyk et al., 2013).

Das Blut wird hierbei über die Kanülierung großer Gefäße des Patienten aus dem Körper heraus- und anschließend wieder zurückgeleitet. Die Kanülierungsart wird je nach benötigter Unterstützung als veno-arterielle ECMO (VA-ECMO; kardiopulmonal), veno-venöse ECMO (VV-ECMO; pulmonal) oder veno-venös-arterielle/veno-arteriell-venöse ECMO (V-VA-V-AV-ECMO; kardiopulmonal) bezeichnet. Die Kanülierungsstellen am Körper des Patienten können entweder zentral (Aorta, V. cava superior und inferior, rechter Vorhof) oder peripher (A./V. femoralis, A. axillaris, V. jugularis) gewählt werden. Kanüliert wird entweder direkt

zentral, also offen chirurgisch, oder peripher perkutan in Seldinger-Technik. Entscheidend bei der Wahl der Kanülierungsstellen ist die Funktion, welche die ECMO in Bezug auf den Kreislauf des Patienten übernehmen soll. Die aktuell am meisten verwendeten Funktionsmodi der ECMO sind die VV-ECMO und die VA-ECMO (Abbildung 2). Die Größe der das Blut aus dem Körper herausleitenden Kanüle beträgt zwischen 21–23 French (Fr.) und die Größe der das Blut in den Körper zurückleitenden Kanüle beträgt zwischen 17–21 Fr. (Pilarczyk et al., 2013).

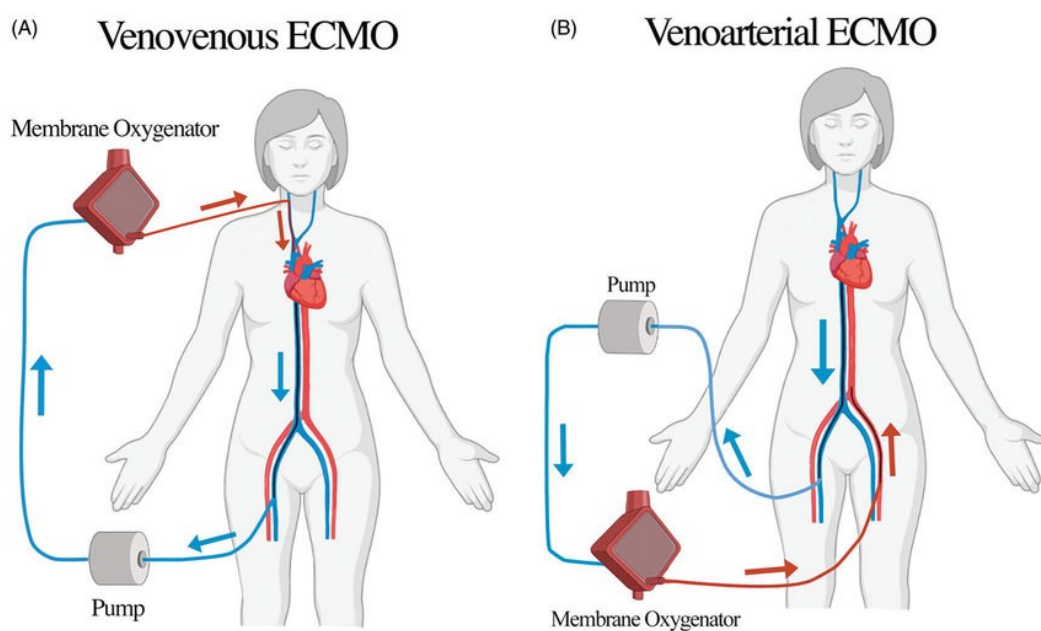


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Kanülierungsarten der ECMO. Kanüliert wurde als A) VV-ECMO zur ECMO hin über die V. femoralis und zum Patienten zurück über die V. cava superior in den rechten Vorhof; B) als VA-ECMO über die V. femoralis zur ECMO und über die A. femoralis zum Patienten zurück (Upchurch et al., 2021).

Über die herausleitende Kanüle wird das Blut der mithilfe eines Sogs einer sich im ECMO-System befindenden Zentrifugalpumpe zugeführt, in dessen Zentrum das axial eintretende Blut durch einen Impeller beschleunigt wird und die Pumpe dann zentrifugal wieder verlässt (Abbildung 3) (Pilarczyk et al., 2013). Im Vergleich zu den während des CBP genutzten Rollerumpen, sind die Zentrifugalpumpen weniger zellschädigend. Das Blut wird laminar durch die ECMO transportiert und wird dem Patienten mit laminarem Fluss zurückgegeben.

Die Blutflussrate in einer ECMO sollte mehr als 50% des Herzzeitvolumens (HZV) (50–60 ml/kgKG/min) des Patienten betragen, um eine effektive Oxygenierung des Blutes zu erreichen. Das entspricht bei einem gesunden erwachsenen Menschen etwa 4,5–5L/min (Pilarczyk et al., 2013). Nach Passieren der Zentrifugalpumpe, wird das Blut dem Oxygenator zugeleitet. Hier erfolgen Oxygenierung und Decarboxylierung des Blutes. Wie in 1.1 erwähnt, werden heute sowohl für die Kurzzeit-Unterstützung des Kreislaufs als auch zum kardiopulmonalen Bypass während einer Operation am offenen Herzen überwiegend Hohlfasermembranoxygenatoren verwendet. Der Sauerstoffbedarf eines Menschen in Ruhe beträgt etwa 250–300 ml/min (Larsen, 2012). Dieser wird je nach Bedarf vom Oxygenator kompensiert. Befindet sich der Körper in einem katabolen Zustand (z.B. Sepsis, Tachykardie), kann der Bedarf steigen. Er kann dann an der ECMO durch Steigerung der Flussrate (L/min) oder durch Steigerung der Oxygenierung des Blutes (F_{iO_2}) erhöht werden. Ein weiterer Parameter an der ECMO ist die CO_2 -Elimination (Decarboxylierung). Diese wird hauptsächlich über den Gasfluss (1-10 L O_2 /min) im Gasblender in der ECMO gesteuert (Lotz and Muellenbach, 2018). Nach Passieren des Oxygenators wird das Blut dem Patienten über die zurückleitende Kanüle zurückgegeben.

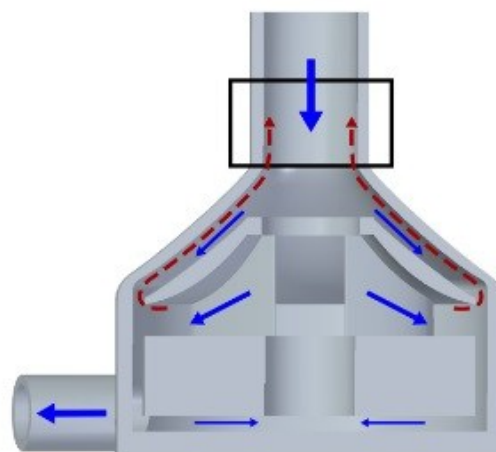


Abbildung 3: Darstellung einer Zentrifugalpumpe im Querschnitt. Die blauen Pfeile geben den Fluss des Blutes über den Einlass (im schwarzen Kasten) und Verteilung des Blutes mittels Impeller zum Auslass an. Die roten gestrichelten Pfeile geben die Verwirbelungen des Blutes Richtung Einlass an (Rorro et al., 2024).

1.1.2. Indikationen für eine ECMO-Therapie

Die Implantation einer ECMO stellt immer eine Maßnahme zur Überbrückung eines potenziell tödlichen Zustandes des Patienten für einen bestimmten Zeitraum dar. Die Zielsetzung bei der Implantation der ECMO lässt sich hierbei in vier Gruppen einteilen. Die erste Gruppe ist die sogenannte „Bridge to recovery“. Hierbei wird durch die Implantation der ECMO eine potenziell lebensgefährlich reduzierte kardiale oder pulmonale Funktion des Patienten unterstützt, wodurch die Zeit bis zur ausreichenden Erholung des Patienten überbrückt wird. Die zweite Gruppe ist die „Bridge to decision“. Hier gibt die Implantation der ECMO dem behandelnden Team in einer potenziell für den Patienten lebensbedrohlichen Situation die Zeit, Diagnostik zu betreiben und anhand der erhobenen Befunde eine Entscheidung bezüglich der weiteren Therapie zu treffen. Die dritte Gruppe ist die „Bridge to bridge“. Die Implantation der ECMO erfolgt hier im Rahmen eines kardiogenen Schocks bei exazerbierter Grunderkrankung oder in einer postoperativen Phase nach einer Herzoperation. Sie überbrückt die Zeit bis zur Implantation eines Langzeit-Herzunterstützungssystems (LVAD, RVAD, BiVAD), welches wiederum die Zeit bis zur Herztransplantation überbrücken soll. Die vierte und letzte Gruppe stellt die „Bridge to transplant“ dar. Diese Gruppe schließt alle Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz oder akuter kardialer Dekompensation mit Kontraindikation zur Implantation eines Langzeit-Herzunterstützungssystems ein. Hier überbrückt die ECMO-Implantation die Zeit bis zur Herztransplantation (Pilarczyk et al., 2013). Der Einsatz der ECMO ist immer dann indiziert, wenn eine kardiale oder pulmonale Unterstützung des Patienten benötigt wird. Die Wahl der Kanülierung am Patienten ist abhängig vom Bedarf der Unterstützung.

Eine VV-ECMO kommt immer dann zu Einsatz, wenn die pulmonale Funktion des Patienten lebensbedrohlich erschöpft ist. Dies besteht zum Beispiel im Rahmen eines schweren ARDS (acute respiratory distress syndrome). Hierbei besteht aufgrund des hypoxämischen und/oder hyperkapnischen Lungenversagens die Indikation zur ECMO-Anlage. Referenzwerte wären hier ein Horowitz-Index ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2$, Oxygenierungsindex zur Beurteilung der Lungenfunktion) < 80 mmHg trotz PEEP (positiver endexpiratorischer Druck) > 15 cmH₂O an der

Beatmungsmaschine (Pilarczyk et al., 2013). Andere Indikationen für die Implantation einer VV-ECMO wären mit der Beatmungsmaschine nicht mehr haltbare Beatmungsdrücke zur Sicherstellung der ausreichenden Oxygenierung mit $P_{\max} > 35$ cmH₂O oder eine massive metabolisch oder pulmonal nicht mehr ausgleichbare Oxygenierungsstörung mit dem Resultat eines pH-Wertes $< 7,15$ (respiratorische Azidose) (David et al., 2016). Zu diesen Werten führende Krankheiten sind neben dem ARDS z.B. schwere interstitielle oder alveoläre Lungenerkrankungen oder ein massives Lungenödem.

Der Einsatz einer VA-ECMO ist bei Bedarf einer kardialen Unterstützung des Patienten indiziert. Auslöser hierfür ist zumeist ein kardiogener Schock im Rahmen einer terminalen kardialen Erkrankung (Herzinsuffizienz, Kardiomyopathien), eines hämorrhagischen Geschehens oder die Notwendigkeit der Unterstützung der Pumpfunktion des Patienten nach einer Operation am Herzen zur Gewinnung einer Regenerationsphase. Zusätzlich sollten zum Zeitpunkt der Indikationsstellung alle Möglichkeiten des Einsatzes der Kurzzeitunterstützungssysteme ausgeschöpft sein. Laborchemischer Referenzwert für die Indikation wäre eine niedrige zentralvenöse Sauerstoffsättigung (S_{cvO_2}) und steigende Laktatwerte in der Blutgasanalyse trotz Einsatz von Inotropika und Vasopressoren. Ein beginnendes Multiorganversagen als klinischer Parameter kann darüber hinaus als Hinweis dienen. Außerdem kann eine Lungenarterienembolie mit folgendem isolierten Rechtsherzversagen und kardiogenem Schock eine Indikation zur VA-ECMO-Anlage darstellen.

Die Indikation zur Implantation einer V-AV-ECMO steht bei einer Kombination der o.g. Faktoren. Diese können separat voneinander oder in Zusammenhang miteinander auftreten. Dies wäre zum Beispiel ein low-output Syndrom des linken Ventrikels im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie und gleichzeitige Entwicklung eines massiven Lungenödems aufgrund des Rückwärtsversagens mit Oxygenierungsstörung. Auch möglich wäre hier eine Kombination aus einer pulmonalen Erkrankung und ein sich daraus entwickelndes ARDS mit gleichzeitig reduzierter Pumpfunktion im Rahmen einer kardialen Erkrankung.

1.1.3. Probleme und Komplikationen des ECLS im klinischen Alltag

Im Rahmen der ECMO-Therapie entstehen regelmäßig einige Komplikationen unterschiedlichen Ursprungs. Die meisten Komplikationen entstehen im Rahmen der Antikoagulation, auf Zellebene im Blut, am Oxygenator, im Rahmen der Hämodilution während des CBP und in Bezug auf die Nierenfunktion (Tabelle 1). Häufige Komplikation der ECMO-Therapie sind Thromben, Embolien und Schlaganfälle. Jede Therapie mit einer ECMO erfordert eine Vollantikoagulation des Patienten. Ursächlich hierfür ist die Gerinnungsneigung des Blutes bei Kontakt mit künstlichen Oberflächen. Sobald das Blut die Blutstrombahn verlässt und mit der künstlichen Oberfläche der ECMO in Berührung kommt, wird eine Gerinnungskaskade in Gang gesetzt, welche zur Blutgerinnung führt. Durch die Gerinnung entstehen Thromben, welche dann als Emboli verschleppt werden können. Durch die Verschleppung der Emboli in das Kreislaufsystem des Patienten, kann es zu Schlaganfällen, peripheren Embolien oder Lungenarterienembolien kommen. Die Gabe von Antikoagulanzen hat die außer Kraft Setzung der Gerinnungskaskade zur Folge, wodurch die Bildung von Thromben und Embolien verhindert wird. Das Antikoagulanz Heparin bindet an Antithrombin III und katalysiert damit die Inaktivierung von Thrombin und Gerinnungsfaktor Xa (Linkins et al., 2002). Während des Einsatzes der ECMO wird in den meisten Fällen hochmolekulares, unfraktioniertes Heparin verwendet, welches dem Patienten dauerhaft intravenös verabreicht wird (Murphy et al., 2015). Gesteuert wird diese Antikoagulation über die Bestimmung der aktivierten Gerinnungszeit (ACT, activated clotting time, Normwert: 70-120 sec). Die Messung der aktivierten partiellen Prothombinzeit (apTT) ist hier nicht hilfreich, da sich deren Werte bei ausreichender Antikoagulation in einen nicht mehr messbaren Bereich verschieben (Larsen, 2012). Bei ungenügender Antikoagulation stellen Thrombosen und Embolien infolgedessen eine der Komplikationen der ECMO-Therapie dar.

Eine weitere Komplikation im Rahmen der Vollantikoagulation mit Heparin stellt die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) dar. Eine HIT ist definiert durch eine Thrombozytopenie im Blut des Patienten mit gleichzeitig erhöhter Thromboseneigung und lässt sich in Typ 1 und 2 einteilen (nicht-immunologische

Form und immunologische Form). Grundsätzlich entsteht eine HIT durch die direkte Aktivierung der Thrombozyten. Eine HIT I definiert sich durch eine Thrombozytenaktivierung durch das Medikament selbst. Bei einer HIT II werden die Thrombozyten von Antikörpern aktiviert, welche gegen einen aus Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4) bestehenden Heparin-Protein-Komplex gerichtet sind. Das hier an Heparin bindende Protein, ist ein Protein aus der Gruppe der Chemokine, welches normalerweise durch Bindung von Immunzellen an der Antwort des Immunsystems teilnimmt. Durch die Bildung des Komplexes sinkt die Anzahl der Thrombozyten im Blut drastisch (Larsen, 2012). Zeitgleich wird die Bildung von Thromben begünstigt (Hogan and Berger, 2020). Das führt klinisch zu Mikrozirkulationsstörungen und arteriellen und venösen Thrombosen. Die Thrombosen treten vorwiegend in der Endstrombahn auf. Beim Aufkommen der Verdachtsdiagnose ist eine sofortige Änderung der Antikoagulation auf ein anderes Antikoagulanz und eine Therapie der Thrombosen zwingend notwendig. Ein weiteres Problem während einer ECMO-Therapie stellt die erhöhte Blutungsneigung durch die Antikoagulation dar. Zum Problem wird diese Blutungsneigung im Falle der ECMO-Therapie nach einer Operation (z.B. Herz-Operationen, Operationen nach einem Trauma). Auch die Kanülierungsstellen stellen durch den direkten Einstich in ein großes Gefäß eine potenzielle Blutungsquelle dar.

Eine Komplikation ergibt sich in Bezug auf die Erythrozyten. Der ständige mechanische Kontakt der Erythrozyten mit der Oxygenator-Membran durch den Blutfluss in der ECMO, führt zu Schäden an den Erythrozyten, welche zum Teil zerstört werden. Klinisch zeigt sich diese Komplikation in einem Abfall des Hämoglobins und der Erythrozyten in der laborchemischen Kontrolle. Die Gabe von Erythrozytenkonzentraten ist dann die Therapie der Wahl.

Eine weitere Komplikation ist die sogenannte Plasma Leakage der Oxygenator-Membran. Hierbei tritt Serumplasma durch die Kapillaren der Membran in den Bereich des Gasaustausches über. Dies führt zu einem schlechteren Gasaustausch und einer Verstopfung der Kapillaren der Membran (Wetting). Im schlimmsten Fall muss der Oxygenator ausgewechselt werden (Meyns et al., 2005). Die Plasma Leakage bildet sich langsam aus und kann, abhängig von der

Verdünnung des Patientenblutes, der Antikoagulation und einigen weiteren Parametern, direkt nach Implantation der ECMO bis 30 Tage nach Implantation auftreten. Bei guter Einstellung der Parameter, kann ein Oxygenator teilweise bis zu 30 Tage lang genutzt werden (He et al., 2021). Die angegebene Nutzungsdauer ist herstellerabhängig. Bei Wetting des Oxygenators muss dieser direkt ausgetauscht werden.

In Bezug auf die Kanülierungsstellen und die Wahl der Größe der zu legenden Kanülen kann sich darüber hinaus eine weitere Komplikation ergeben. Durch die Vollantikoagulation im Blut kann es an den Kanülierungsstellen zu Einblutungen kommen. Durch die dauerhafte Einblutung und die daraus entstehende Feuchtigkeit in der Wunde, kann es außerdem zu Infektionen kommen. Zusätzlich können bei peripherer Kanülierung durch die Wahl einer zu großen Kanüle für ein kleines Gefäß Ischämien peripher der Kanülierungsstellen auftreten. Trotz der angelegten retrograden Perfusion kann eine ungenügende Perfusion der Extremität zur Ischämie im Bereich der Endstrombahn führen (Bonicolini et al., 2019).

Durch die Hinzugabe von plasmaisotonen Elektrolytlösungen wird die Fließeigenschaft des Blutes verbessert. Durch die sogenannte Hämodilution (Blutverdünnung) wird die Viskosität des Blutes verringert, sodass der Hämatokrit-Wert in der laborchemischen Kontrolle sinkt. Die Sauerstofftransportkapazität des Blutes wird durch die Hämodilution ebenso verringert. Diese Problematik tritt allerdings nur während des kardiopulmonalen Bypasses auf, da während einer ECMO-Therapie im stationären Bereich keine Hämodilution verwendet wird.

Tabelle 1: Art und Häufigkeit von Komplikationen während einer ECMO-Therapie (Pilarczyk et al., 2013).

Komplikationen	Häufigkeit (%)
Direkt	
Gerinnselformung im ECMO-System	17,8
Versagen des Membranoxygenators	17,5
Kanülierungsprobleme (Dislokation etc.)	8,4
Sonstige	7,9
Indirekt	
Nachblutungen	19
Blutungen im Bereich der Kanülierungsstelle(n)	17,1
Pulmonale Blutung	8,1
Gastrointestinale Blutung	5,1
Intrakranielle Blutung	3,8
Hämolyse	6,9
Disseminierte intravasale Gerinnungsstörung	3,7

1.2. Der Oxygenator

Die Membran im Oxygenator ist zusammen mit der Pumpe das Herzstück der ECMO. Hier finden die Oxygenierung und Decarboxylierung des Patientenblutes statt.

1.2.1. Aufbau und Funktion des Oxygenators und der Oxygenator-Membran

Seit Beginn der ECMO-Entwicklung wurden viele Arten von Oxygenatoren ausprobiert. Die aktuell am häufigsten verwendeten Oxygenatoren sind Hohlfasermembran-Oxygenatoren.

Das Blut gelangt über die venöse Kanüle und die sich anschließende Leitung über die venöse Zufuhr durch die Pumpe in den Oxygenator und zur Oxygenator-Membran. Der Druck, welcher beim Einfluss des Blutes am Oxygenator gemessen werden kann, wird als Pven (Venous Pressure, in mmHg) bezeichnet. Der Druck im Oxygenator selbst und in der Pumpe der ECMO, wird als Pint (Internal Pressure, mmHg) bezeichnet. Außerdem wird der Druck beim Verlassen des Oxygenators erneut gemessen und als Part (Arterial Pressure, mmHg)

bezeichnet. Danach fließt das Blut über die arterielle Leitung in die Kanüle zurück zum Patienten. Der Druckunterschied zwischen dem internen Druck im Oxygenator und dem arteriellen Druck des Blutes am Auslass des Oxygenators wird als Δp (Delta Pressure, mmHg) bezeichnet.

Aktuell werden für den CPB im Operationssaal mikroporöse und für die ECMO-Therapie auf der Intensivstation nicht-mikroporöse Albumin-Heparin-beschichtete Hohlfasermembran-Oxygenatoren genutzt (Abbildung 4).

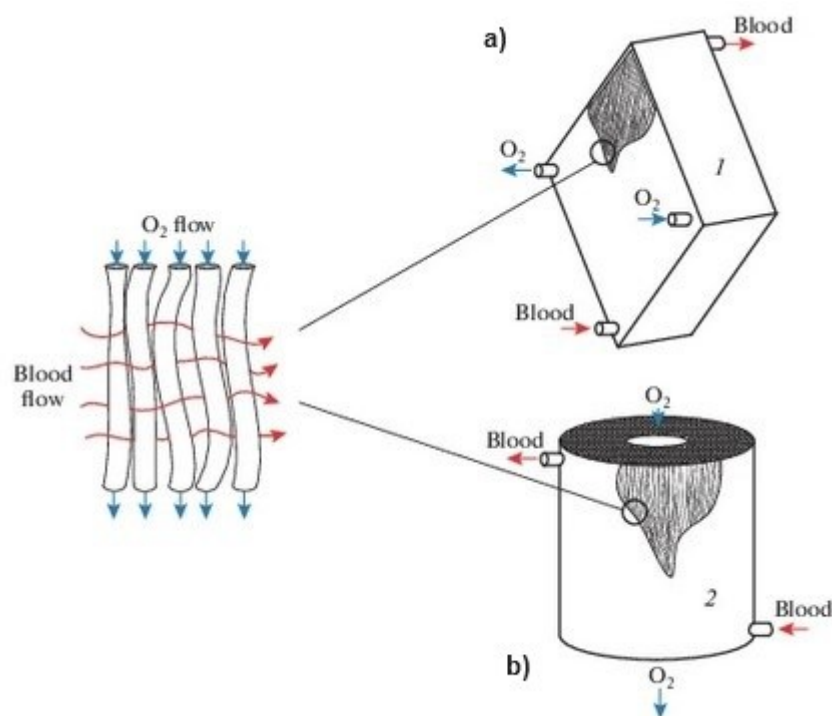


Abbildung 4: Aufbau der (mikroporösen, nicht-mikroporösen) Hohlfasermembran im Oxygenator in der a) Parallel-Platten- (z.B. während der ECMO-Therapie auf der Intensivstation) und in der b) Zylinder-Version (z.B. beim kardiopulmonalen Bypass) (Modifiziert nach Evseev et al., 2019).

Die Membran des an der ECMO verwendeten Oxygenators ist zusätzlich mit Heparin beschichtet, sodass er bis zu 30 Tage am Patienten verwendet werden kann (Getinge Deutschland GmbH, o.J.). Die Hohlfasermembranen (HFMs) unterscheiden sich von anderen Membranen-Arten dadurch, dass ein laminarer Blutfluss generiert werden kann, der wiederum zu einer dünneren Schicht von Blut an der Gas-Blut-Grenze führt (Evseev et al., 2019). Außerdem ergibt sich bei der mikroporösen Struktur zusätzlich eine bessere Möglichkeit zum

Gasaustausch. Die mikroporöse Struktur der Membran erhöht allerdings auch die Wahrscheinlichkeit für eine Plasma Leakage. Deshalb werden mikroporöse Hohlfasermembranen vorwiegend für die Kurzzeit-Unterstützung eingesetzt, z.B. beim CPB (Evseev et al., 2019).

Die zur Kurzzeit-Unterstützung eingesetzten mikroporösen Hohlfasermembranen (HFM) bestehen aktuell zum größten Teil aus Polypropylen (PP). In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen, haben wir die Membranen der Firma 3M verwendet. Die mikroporösen Hohlfasermembranen, haben eine Wanddicke von $50 \pm 10 \mu\text{m}$, sind gekreuzt gewickelt und bieten durch ihre Struktur mit Poren von $\leq 0,2 \mu\text{m}$ die maximale Gas-Austausch-Fläche (3M Deutschland GmbH, 2018). Die zur Langzeit-Unterstützung eingesetzten Hohlfasermembranen bestehen in den meisten Fällen aus Polymethylpenten (PMP). Sie haben eine Wanddicke von $90 \pm 10 \mu\text{m}$ (3M Deutschland GmbH, 2019). Die in dieser Arbeit verwendeten PMP-Membranen stammen ebenfalls von der Firma 3M und ihre Hohlfasern besitzen eine stärkere Außenwand und haben keine Poren. Der direkte Blut-Gas-Kontakt, vergleichbar mit dem der aus PP bestehenden Membranen, bleibt hier also aus (3M Center, o.J.).

1.2.2. Probleme und Komplikationen im Bereich der Oxygenator-Membran

Probleme und Komplikationen im Bereich der Oxygenator-Membran, sind vom Ausmaß her am gravierendsten. Durch die Wichtigkeit des Oxygenators, führen Probleme oder Komplikationen in diesem Bereich sehr schnell zu Funktionsproblemen der gesamten ECMO/HLM und damit zur Gefährdung des Patienten.

Die zur Therapie mit einer ECMO/HLM erforderliche Antikoagulation, kann im Bereich der Oxygenatorprobleme eine große Rolle spielen. Ist die Antikoagulation des Patienten nicht ausreichend oder entwickelt der Patient eine HIT, können sowohl an der unbeschichteten mikroporösen Hohlfasermembran der HLM, als auch an der Heparin-beschichteten Hohlfasermembran der ECMO durch die Aktivierung des Gerinnungssystems Thromben entstehen. Diese können dann entweder die Membran als solches verstopfen oder sich ablösen und im Körper des Patienten als Emboli Komplikationen verursachen. Zudem erhöht eine

Thrombosierung des Oxygenators durch Veränderung der Strömungsparameter das Δp des Oxygenators. Diese Veränderungen können ebenfalls Einfluss auf die Hämodynamik und den Kreislauf des Patienten haben. Durch die Entstehung von Thromben wird außerdem der Gasaustausch an der Oxygenator-Membran verschlechtert. Bei einer Verschlechterung der Oxygenierung des Patienten muss also immer auch an eine Thrombosierung des Oxygenators gedacht werden. Der Entstehungsort der Thromben im Oxygenator kann variieren (Abbildung 5). Am häufigsten sind Thromben im tiefen Oxygenator, aber auch an der Membran in der Nähe des Einflustrakts des Oxygenators können Thromben entstehen (Figueroa Villalba et al., 2022). Solche Thrombosen erfordern im schlimmsten Fall einen Austausch des gesamten Systems. Ein solcher Austausch führt bei einem komplett systemisch unterstützten Patienten zu einem hohen Risiko für Komplikationen.

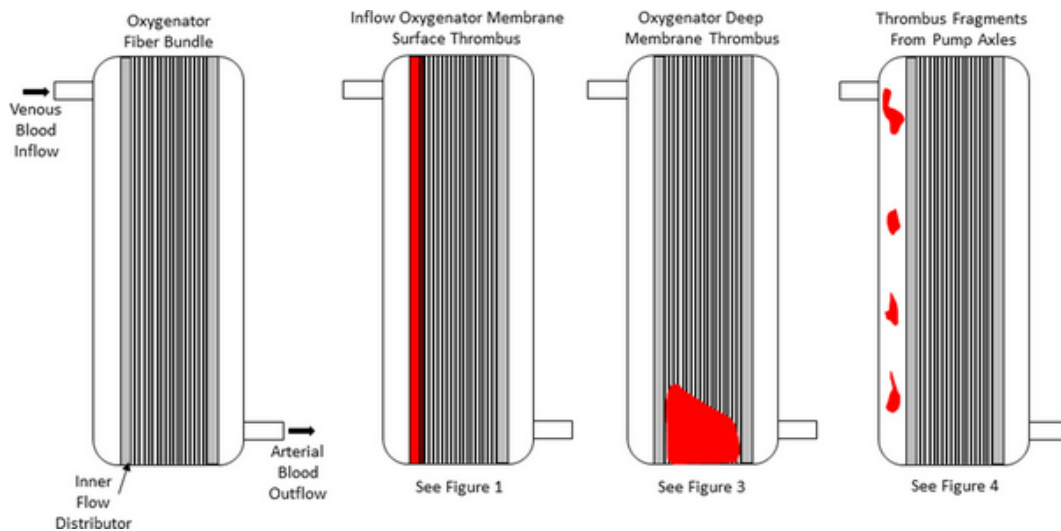


Abbildung 5: Darstellung der Entstehungsorte von Thromben im Oxygenator. Dargestellt sind vier Querschnitte von Oxygenatoren von links nach rechts: 1) Oxygenator ohne Thromben, 2) Oxygenator mit Thrombus auf der Oxygenator-Membran auf der Einfluss-Seite des Blutes, 3) Oxygenator mit tiefem Membranthrombus im Zentrum des Oxygenators, 4) Oxygenator mit Thrombusfragmenten, welche in der Pumpe entstanden sind und nun in den Oxygenator gespült wurden (Figueroa Villalba et al., 2022).

Das sogenannte Wetting und die darauffolgende Plasma-Leakage der Oxygenator-Membran sind weitere schwerwiegende Komplikationen. Das Wetting wurde in der Vergangenheit überwiegend bei mikroporösen Hohlfasermembranen (PP) beobachtet, wurde aber in den letzten Jahren ebenfalls bei nicht-mikroporösen Hohlfasermembranen (PMP) festgestellt. Es definiert sich durch die Verdrängung des Gases an der Blut-Gas-Kontaktfläche durch das Blut. Blutbestandteile dringen als Folge in die Poren der Membran ein und es entsteht eine Plasma Leakage. Durch das Wetting der Membran wird der Stoffaustausch-Widerstand der Membran erhöht und die CO₂-Absorption an der Membran vermindert (Lv et al., 2010). Die Ursache der Entstehung des Wettings und der darauffolgenden Plasma Leakage ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt allerdings Prozesse an der Membran, die diese Komplikationen begünstigen können. Ein Prozess an der Membran der in der Literatur immer wieder erwähnt und als eine der Hauptursachen des Wettings angesehen wird, ist die Kondensatbildung an der Gasaustausch-Fläche und im Gaskompartiment selbst (Condello, 2020). Mit sinkender Temperatur des Gases erhöht sich die

Kondensatmenge an der Blut-Gas-Kontaktfläche. Das Kondensat kann dann durch die Mikroporen in der Membran dringen und mittels Kapillareffekts Blutbestandteile auf die Seite des Gasflusses befördern. Zu Beginn des Einsatzes des Oxygenators, weist die Membran im Inneren hohe hydrophobe Eigenschaften auf, welche sich mit zunehmender Nutzung durch die Plasma Leakage verringert (Lim, 2006). Mit zunehmender Nutzung verringert sich der Kontaktwinkel zwischen Blut und Membranoberfläche, wodurch sich die hydrophobe Eigenschaft der Oberfläche verändert und mehr Blutbestandteile in die Membran eindringen können (Mavroudi et al., 2003). Durch das Eindringen der Blutbestandteile in das Gaskompartiment wird der Gas-Austausch an der Oxygenator-Membran vermindert und damit die Oxygenierung des Blutes reduziert. Außerdem steigen die Drücke im Oxygenator an. Bei unzureichender Funktion muss ein Oxygenator dann im schlimmsten Fall komplett ausgetauscht werden.

Die Zerstörung der Blutbestandteile des Patienten durch den dauerhaften Kontakt mit der Oxygenator-Membran, der Pumpe und den restlichen Bestandteilen der ECMO/HLM, stellt eine weitere Problematik dar. Durch den direkten Kontakt der Erythrozyten mit der Oxygenator-Membran, entstehen Scherkräfte, welche zur Zerstörung der Erythrozyten führen. Folglich haben Patienten mit systemischer Unterstützung einen höheren Transfusionsbedarf und einen geringeren Hämoglobingehalt im Blut. Die hohen Scherkräfte an den Erythrozyten führen außerdem zu einer Veränderung ihrer Verformbarkeit. Das führt zu Problemen in der Mikrozirkulation des Patienten. Die Oxygenierung in der Endstrombahn ist durch die geringere Verformbarkeit der Erythrozyten verringert und es können Mikrothromben entstehen (Lansink-Hartgring et al., 2020). Die hohen Scherkräfte an der Oxygenator-Membran haben in der Folge Einfluss auf die Thrombozyten und führen zu einer Thrombozytopenie.

1.3. Hämokompatibilität der Oxygenator-Membran

Die in 1.1.3 und 1.2.2 aufgeführten Probleme und Komplikationen, verdeutlichen die verminderte Hämokompatibilität des ECMO-/HLM-Systems. Im Extremfall können diese sogar lebensgefährlich für den Patienten werden. Zusätzlich wäre

bei verbesserter Hämokompatibilität der Nutzungszeitraum des Systems der ECMO/HLM deutlich verlängert und komplette Systemwechsel könnten vermieden werden. Hinzu kämen weitere Möglichkeiten der Entwicklung der künstlichen und möglicherweise implantierbaren Lunge.

1.3.1. Ansätze zur Verbesserung der Hämokompatibilität

Wie schon in 1.2.1 beschrieben, sind die heute für den Oxygenator des ECLS auf häufigsten genutzten Materialien PP und PMP. PP und PMP gehören zur Gruppe der Polyolefine und sind thermoplastische Kunststoffe. Beide Stoffe haben eine hohe chemische Beständigkeit und sind hydrophob.

Um die Hämokompatibilität des Systems zu verbessern, sind bisher einige Ansätze ausprobiert worden. Der aktuell in der Forschung am meisten untersuchte Ansatz ist die Modifikation aller mit dem Patientenblut in Kontakt kommenden Oberflächen. Hier erscheinen drei Methoden am vielversprechendsten: Die Generierung einer biomimetischen Oberfläche durch eine Beschichtung mit z.B. Heparin, die Generierung einer biopassiven Oberfläche z.B. durch die Beschichtung mit vernetzbaren zwitterionischen Polymeren oder die Biofunktionalisierung der Oberfläche durch Endothelialisierung (Ontaneda and Annich, 2018). Diese Ansätze haben gemeinsam zum Ziel, die Hämokompatibilität der Oberfläche zu verbessern. Die biomimetische und die biopassive Beschichtung werden zum jetzigen Zeitpunkt schon eingesetzt. In dieser Arbeit wurde der Ansatz der Endothelialisierung der Oxygenator-Membran verfolgt.

1.3.2. Das Endothel und die Hämostase

Als Endothel wird jene Zellschicht bezeichnet, welche das menschliche Gefäßsystem von Innen auskleidet. Hauptaufgabe der Endothelzellschicht ist der Stoffaustausch zwischen dem Blutkreislauf und dem das Gefäß umgebende Gewebe. Hinzu kommt die Aktivierung und Inaktivierung der Gerinnungskaskade, die Aktivierung des Immunsystems, die Produktion und Ausschüttung von Transmittern, sowie das Auslösen des eigenen Wachstums (Angiogenese).

Alle Prozesse, die bei einer Verletzung des Endothels im Zusammenschluss im Blutkreislauf des Menschen zum Stillstand des Blutes oder zur Bildung von Thromben führen, werden unter dem Begriff Hämostase (Blutgerinnung) zusammengefasst. Im stabilen unbeschädigten Blutkreislauf des Patienten hat das Endothel eine anti-thrombotische Funktion. Bei einer Verletzung des Endothels hingegen haben die von der Basallamina der Endothelzellschicht freigesetzten Transmitter eine prothrombotische Wirkung, sodass die Endothelzellschicht sowohl aktivierend als auch deaktivierend in den Ablauf der Hämostase eingreift.

Die unbeschädigte Endothelzellschicht exprimiert 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE), Stickstoffoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) um die Aktivierung und Adhäsion der Thrombozyten zu verhindern. Zusätzlich baut sie die Nucleoside Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) ab. Diese Mechanismen führen zu einer Thrombozytenaggregationshemmung im unbeschädigten Endothel (Félétou, 2011). Weitere antikoagulative Eigenschaften sind die Expression von Thrombomodulin, welches als Transmembranrezeptor in den Endothelzellen die Bindung und Inaktivierung von Thrombin auslöst. Dieser Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktiviert im Folgenden die Protease Protein C, welche dann zusammen mit der Protease Protein S die Gerinnungsfaktoren V und VIII inaktiviert. Der ebenfalls von den Endothelzellen exprimierte Tissue Factor Pathway Inhibitor bindet den Komplex aus Gerinnungsfaktor VIIa und Gewebefaktor (Tissue Factor, TF) und verhindert so den Ablauf der extrinsischen Gerinnungskaskade (Abbildung 6) (Félétou, 2011).

Bei einer Verletzung des Endothels oder einem Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche, wird die Hämostase in Gang gesetzt. Die Blutgerinnung lässt sich in die primäre (zelluläre) und eine sekundäre (plasmatische) Hämostase einteilen. Die primäre Blutgerinnung umfasst die Aktivierung der Thrombozyten, welche die verletzte Endothelstelle vom Inneren des Gefäßes verschließen. Die sekundäre Blutgerinnung beinhaltet die Gerinnungskaskade, welche in einen extrinsischen Weg, einen intrinsischen Weg und eine gemeinsame Endstrecke eingeteilt werden kann (Abbildung 6). Die gesamte

Gerinnungskaskade besteht aus verschiedenen Gerinnungsfaktoren, welche aktiviert werden und durch eine Kette von Reaktionen zur Bildung von Fibrin und damit zur Verklebung und Vernetzung der in der primären Hämostase aggregierten Thrombozyten führt.

Bei Verletzung der Kontinuität des Endothels, kommt das Blut mit den kollagenen Fasern des umliegenden Gewebes in Kontakt. Hierdurch wird die primäre Hämostase ausgelöst. Der im Blut zirkulierende von-Willebrand-Faktor (vWF) hat durch die Verletzung die Möglichkeit, sich an die kollagenen Fasern zu binden. Der vWF ist ein von den Endothelzellen und Megakaryozyten gebildetes Glykoprotein, welches an die kollagenen Fasern des umliegenden Gewebes bindet. Im Anschluss bindet der vWF den auf der Oberfläche der Thrombozyten befindlichen von-Willebrand-Rezeptor (Glykoprotein Ib/IX) und damit die Thrombozyten. Somit fungiert er als Adhäsivprotein zwischen der extrazellulären Matrix und den Thrombozyten im Blut. Die Rolle des vWF ist besonders wichtig in hämodynamischen Systemen mit hohen Scherkräften, wie z.B. einer kapillaren Endstrombahn (Ruggeri and Ware, 1993). Somit kommt dem vWF auch in der Thrombogenese in Oxygenatoren eine größere Bedeutung zu. Nach der Adhäsion der Thrombozyten produzieren diese verschiedenen Stoffe, deren Freisetzung zur Aggregation weiterer Thrombozyten führt. Zu diesen Stoffen zählen der Plättchenaktivierende Faktor (PAF), ADP, ATP, Thromboxan A₂, Serotonin, weiterer vWF und Fibrinogen. Zusätzlich wird die Produktion von vWF und Gewebefaktor (Tissue Factor, Faktor III, TF) in den Endothelzellen erhöht (Félétou, 2011). Der Tissue Factor wird in unbeschädigtem Gewebe von subendothelial gelegenen Zellen gebildet. Wird das Endothel geschädigt, kommt das Blut mit dem Tissue Factor in Kontakt, welcher nun den Gerinnungsfaktor VII aktiviert und damit den Weg der extrinsischen Gerinnungskaskade in Gang setzt (Abbildung 6). Am Ende dieser Kaskade steht das Fibrinogen, welches mit Unterstützung von Thrombin zu Fibrin umgewandelt wird und zusammen mit den aggregierten Thrombozyten ein Gerinnsel bildet. Dieser Teil der Hämostase spielt durch die Kanülierung bei Anlage eines ECLS und durch die dauerhafte Verletzung des Endothels während der Therapie mit einer ECLS eine Rolle.

Der intrinsischen Gerinnungskaskade kommt im Hinblick auf den fortlaufenden Kontakt des Blutes mit der künstlichen Oberfläche des ECLS eine bedeutende Rolle zu. Die Auslösung der intrinsischen Gerinnungskaskade erfolgt über die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII (Hageman-Faktor). Diese Aktivierung kann über zwei Wege erfolgen. Thrombozyten können durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen aktiviert werden und dann in der Folge Polyphosphate freisetzen (Gailani and Renné, 2007). Diese aktivieren dann wiederum den Gerinnungsfaktor XII. Die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII kann allerdings auch durch den direkten Kontakt mit dem subendothelialen Gewebe erfolgen (Kontaktaktivierung). Die (vor-)aktivierte Form des Gerinnungsfaktors XII aktiviert nun selbst das Kallikrein, welches daraufhin Kininogen in Kinin umwandelt. Die entstehenden Kinine sind Peptide, welche vor allem den Blutdruck senken, die Permeabilität der Gefäßwände erhöhen und analgetische Funktion haben. Kinin aktiviert den Gerinnungsfaktor XII daraufhin vollständig, welcher daraufhin die Aktivierung von Gerinnungsfaktor XI auslöst. Der aktivierte Gerinnungsfaktor XI aktiviert in der Folge den Gerinnungsfaktor IX, welcher dann mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor VIII einen Enzymkomplex bildet. Dieser Enzymkomplex katalysiert nun zusammen mit Calcium und Phospholipid die Aktivierung der gemeinsamen Endstrecke (Abbildung 6).

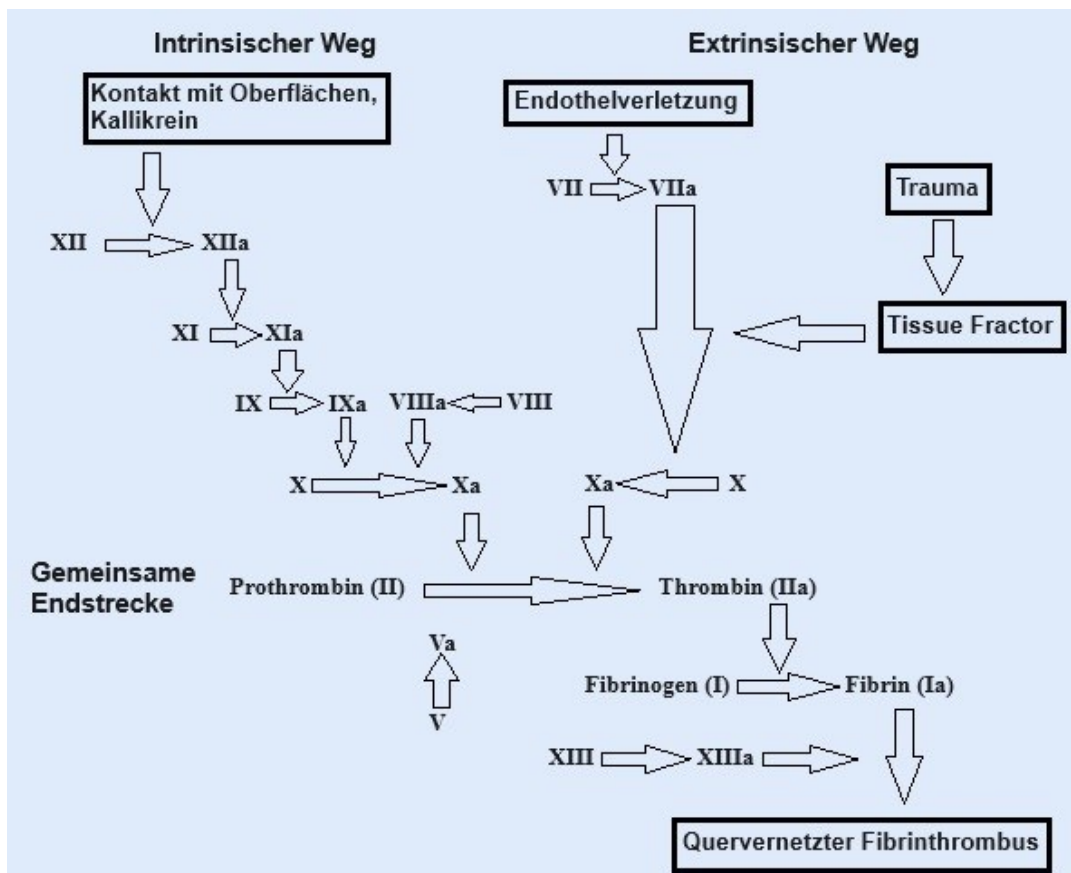


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sekundären Hämostase. Dargestellt ist die sekundäre Hämostase mit extrinsischem, sowie intrinsischem Weg und gemeinsamer Endstrecke. Die Intrinsische Gerinnungskaskade wird unter anderem durch den Kontakt der Thrombozyten mit z.B. negativen Oberflächen, sowie durch den Kontakt des Gerinnungsfaktors XII mit dem subendothelialen Gewebe und der dann folgenden zusätzlichen Autoaktivierung durch Kallikrein ausgelöst. Darauf folgt eine Aktivierung verschiedener Gerinnungsfaktoren. Die extrinsische Gerinnungskaskade wird durch die Verletzung des Endothels ausgelöst. Daraus resultiert der Kontakt des Blutes mit dem von-Willebrand-Faktor (vWF) im subendothelialen Gewebe und die Produktion von Gewebefaktor (Tissue Factor) durch das Gewebe selbst. Durch diese beiden Prozesse wird die Aktivierung von Gerinnungsfaktor VII initiiert, welche dann die Aktivierung der gemeinsamen Endstrecke auslöst. Am Ende der gemeinsamen Endstrecke steht die Formung eines Gerinnsels, bestehend aus Thrombozyten und Fibrin (Gerinnungsfaktoren in römischen Ziffern).

1.3.3. Das vaskulär-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin)

Die Endothelzellen sind auf einer Basalmembran verankert und haben zahlreiche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte. Auf der extrazellulären Seite der Zelle

befindet sich außerdem die Glykokalix. Sie besteht aus Kohlenhydratketten, welche über Proteine und Lipide auf der Zelle verankert sind. Unter den Zell-Zell-Kontakten gibt es auch die Desmosomen und adhärenente Kontaktstellen („Adhärens Junctions“). Unter ihnen versteht man eine Reihe Zellstrukturen und Adhäsionsproteine, welche die Bindung der Zellen untereinander verstärken. Eines dieser Adhäsionsproteine ist das sogenannte vaskulär-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin), welches zur Gruppe der Cadherine gehört. Es ist ein Calcium-abhängiges transmembranes Glykoprotein, das die direkte Verbindung der Zellen untereinander verstärkt (Giannotta et al., 2013). Im Endothel übernimmt VE-Cadherin durch die Abwesenheit von Desmosomen zusätzlich zu den Aufgaben der Adhärens Junctions auch noch desmosomale Aufgaben. Außerdem spielt VE-Cadherin eine wichtige Rolle im Signaltransfer zwischen zwei Zellen. Durch seine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 7), kommt VE-Cadherin bei der Stabilisierung der gesamten Endothelzellschicht eine wichtige Rolle zu.

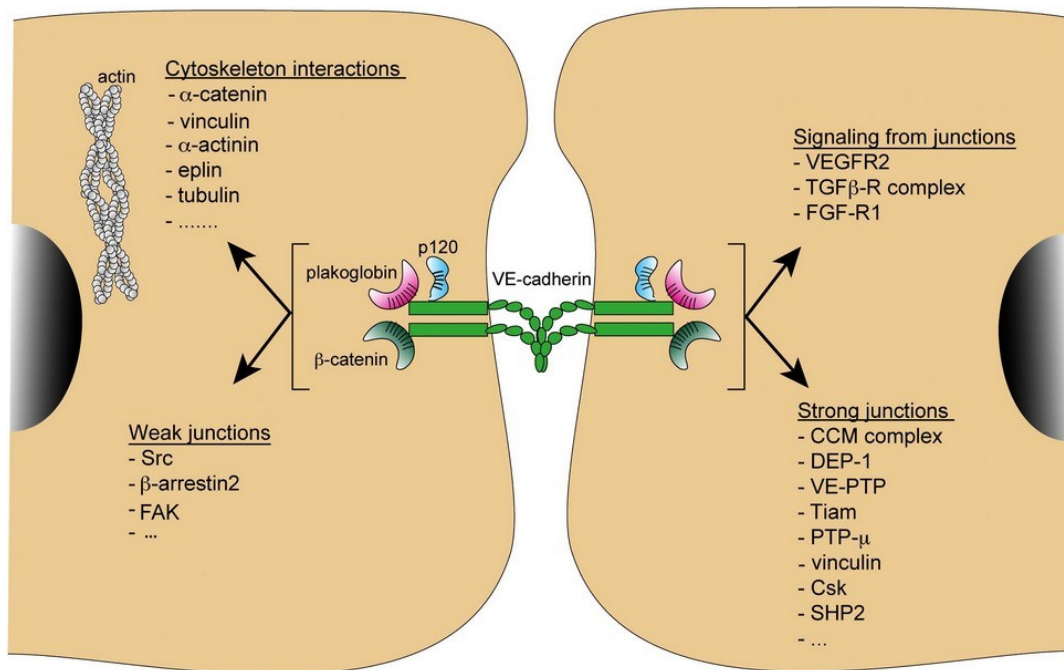


Abbildung 7: VE-Cadherin als transmembranes Glykoprotein. VE-Cadherin fungiert hier als Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei Endothelzellen (grün). Dargestellt sind außerdem die zytosolische Domäne des VE-Cadherin p120 (blau), das Strukturprotein Plakoglobin (rosa) (auch γ -Catenin), welches das VE-Cadherin mit dem Zytoskelett der Zelle verbindet und β -Catenin (grau), ein Strukturprotein, welches eine wichtige Rolle bei der Verbindung des VE-Cadherins mit den Aktinfilamenten der Zelle spielt. Außerdem sind die Funktionen des Cadherinkomplexes aufgeführt (Giannotta et al., 2013).

1.3.4. Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs)

Die Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (*engl.*: human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) sind primäre Endothelzellen und werden oft in der biomedizinischen Forschung eingesetzt. Haupteinsatzpunkte der HUVECs sind die Erforschung der Angiogenese, der Gefäßbiologie, der atherosklerotischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der Onkologie. Zusätzlich lassen sich anhand der Versuche mit HUVECs Rückschlüsse daraus ziehen, wie das humane Endothel auf Scherkräfte und Dehnung der Gefäßwände in Folge von Fluss- und Druckveränderung im Kreislauf reagiert (Park et al., 2006). Aufgrund der angiogenetischen Ähnlichkeit der HUVECs zum adulten Endothel, haben wir in den Versuchen dieser Arbeit HUVECs zur Untersuchung der Endothelialisierung der Oxygenator-Membran genutzt.

1.4. Bedeutung der Endothelialisierung von Oxygenator-Membranen

Um die Hämokompatibilität der Oxygenator-Membran zu verbessern, gibt es aktuell die in 1.3.1 genannten Ansätze. Die in dieser Arbeit verfolgte Methode, ist die Endothelialisierung der Oxygenator-Membran. Durch eine Endothelialisierung könnten mehrere der in 1.1.3 und 1.2.2 genannten Probleme und Komplikationen gleichzeitig adressiert werden.

Eine der größten Verbesserungen durch die Endothelialisierung der Oxygenator-Membran, wäre die Reduktion des Thrombose-, Embolie- und Blutungsrisikos (Alabdullh et al., 2023). Durch eine kontinuierliche Endothelialisierung würde die dauerhafte physiologische Aktivierung der Gerinnungskaskade unterbrochen und die Antikoagulation des Patienten könnte reduziert werden. Bei einer vollständigen Endothelialisierung der gesamten mit Blut in Kontakt kommenden inneren Oberfläche der HLM/ECMO, wäre eine therapeutische Antikoagulation des Patienten mit einer Ziel ACT > 180 sec obsolet. Der Patient wäre schon mit einer Antikoagulation zur Thromboseprophylaxe ausreichend versorgt. Blutungen im Bereich der Kanülierungsstellen würden dabei folglich vermindert. Zusätzlich könnte mit der Reduktion der antikoagulativen Therapie mit Heparin, die Gefahr HIT für den Patienten stark reduziert werden (McGowan et al., 2016). Voraussetzung hierfür, wäre eine kontinuierliche Endothelialisierung der Oxygenator-Membran.

Das Ausbleiben des direkten Kontakts der Blutbestandteile mit der Oxygenator-Membran könnten zusätzlich den Zellschaden im Blut des Patienten senken und den Transfusionsbedarf des Patienten verringern.

Die Verbesserung der Hämokompatibilität greift vorrangig bei Patienten, welche länger durch den Einsatz eines ECLS unterstützt werden. Vor allem das Wetting mit anschließender Plasma Leakage und die Entwicklung einer HIT, finden sich während des Einsatzes einer HLM intraoperativ seltener als Komplikation wieder. Ein weiterer Anspruch an eine endothelialisierte Oberfläche der HFM, wäre der Erhalt der Funktionen des physiologischen Endothels. Die im unbeschädigten Stadium anti-thrombogene und anti-inflammatorische Wirkung des Endothels, sollte ebenfalls im Endothel auf der Oxygenator-Membran zu finden sein. Zu

diesem Zweck verwendeten schon Pflaum et al. Endothelzellen, welche aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) entwickelt wurden, um die vorbehandelte Oxygenator-Membran zu endothelialisieren. Schon hier konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen ein anti-thrombogenes und anti-inflammatorisches Stadium erreichten (Pflaum et al., 2022). Einen solchen Versuchsaufbau zeigten auch Abdullah et al (Alabdullh et al., 2023). Mögliche Zellen für diesen Zweck wären neben den HUVECs außerdem endotheliale Progenitorzellen (EPCs) (Pang et al., 2015). Sie stammen aus dem Knochenmark und zirkulieren in der peripheren Blutstrombahn. EPCs können in Endothelzellen differenzieren, damit ihre Eigenschaften entwickeln und dann an der Vaskulogenese teilnehmen (Murasawa and Asahara, 2005).

Durch die starken hydrophoben Eigenschaften künstlicher Oberflächen, ist eine direkte Endothelialisierung ohne vorherige Funktionalisierung nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft noch nicht möglich. Das macht eine Funktionalisierung der Oberfläche notwendig. Aktuell werden 3 Ansätze zur Funktionalisierung verfolgt: 1.) die physikalische Umstrukturierung der Oberfläche zur Steuerung des Zellverhaltens auf der Oberfläche (z.B. Sauerstoff-Plasma-Behandlung, Argon-Plasma-Behandlung) (Huang et al., 2016), 2.) die chemische Behandlung der Oberfläche mit dem Ziel der Erzeugung funktioneller Gruppen (z.B. Silanisierung) (Vashist et al., 2014) und 3.) die Biofunktionalisierung der HFMs mit Molekülen (Peptiden, Adhäsivproteinen oder Wachstumsfaktoren) (z.B. VE-Cadherin Antikörper (Lee et al., 2012), (Lim et al., 2011)) (Pang et al., 2015).

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Verbesserung der Hämokompatibilität der in Oxygenatoren verwendeten Hohlfasermembranen durch Endothelialisierung mit HUVECs untersucht werden. Der Einsatz einer ECMO kann im Falle eines kardialen Schocks oder eines pulmonalen Versagens die letzte Behandlungsmöglichkeit eines Patienten darstellen. Zusätzlich bietet der Einsatz der HLM der modernen Medizin große Möglichkeiten im operativen Bereich. Die mit dem Einsatz von ECLS eingehende Gefahr einer Thrombose, Embolie, Blutung und die zeitlich begrenzte Nutzungsmöglichkeit, sind hauptsächlich mit der eingeschränkten Hämokompatibilität solcher Systeme und deren Oxygenatoren begründet. Vor diesem Hintergrund ist eine Endothelialisierung der mit dem Blut des Patienten in Kontakt stehenden Oberflächen des ECLS ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Hämokompatibilität. In dieser Arbeit soll die Endothelialisierung der HFMs mit HUVECs untersucht werden.

Da eine direkte Endothelialisierung der HFMs nach aktuellem Stand der Wissenschaft noch nicht möglich ist, sind Schritte zur Funktionalisierung und Biofunktionalisierung der HFMs notwendig, um diese im Anschluss zu endothelialisieren.

Durch eine Sauerstoff-Plasma Behandlung sollen im ersten Schritt der Funktionalisierung auf der Oberfläche der HFMs Hydroxyl-Gruppen (-OH) generiert werden, welche im nächsten Schritt als funktionelle Gruppen fungieren. Durch eine Behandlung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) im nächsten Schritt, sollen Amino-Gruppen zu den Hydroxyl-Gruppen konjugiert werden, welche dann im Folgenden durch eine Anfärbung mit Methylorange unter dem Absorptionsreader analysiert werden können. Die auf der Oberfläche der HFMs generierten Amino-Gruppen, dienen im nächsten Schritt als funktionelle Gruppen. Danach erfolgt eine Behandlung mit N-hydroxysuccinimid-Alkin Ester (NHS-Alkin Ester) zur Generierung von Alkin-Gruppen auf der Oberfläche der HFMs. Die Analyse der auf der Oberfläche der HFMs generierten Alkin-Gruppen, soll dann mittels Labeling mit einem Cy3-Azid erfolgen. Das Labeling der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azids, soll mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid/Alkin Cycloaddition (CuAAC) erfolgen. In dieser Reaktion reagiert die zur Oberfläche

der HFMs konjugierte Alkin-Gruppe mit dem Azid-Rest des Cy3. Durch die fluoreszierende Eigenschaft des Cy3 (Cyanin-3) soll die Konjugation der Alkin-Gruppen zur Oberfläche der HFMs im Anschluss unter dem Fluoreszenz-Reader analysiert werden. Im folgenden Schritt sollen die HFMs dann durch die Konjugation eines Azid-gelabelten VE-Cadherin Antikörpers zu ihrer Oberfläche biofunktionalisiert werden. In dieser Reaktion reagiert der Azid-Rest der VE-Cadherin Antikörper in einer CuAAC mit der zur Oberfläche der HFMs konjugierten Alkin-Gruppe. Der auf der Oberfläche der HFMs gebundene VE-Cadherin Antikörper soll dann mittels Anfärbung mit einem Sekundärantikörper (Ratte anti-Maus IgG) nachgewiesen werden. Am Ende soll die Endothelialisierung der HFMs mit HUVECs über die Kopplung an den VE-Cadherin Antikörper erfolgen. Endothelzellen sind die das humane Gefäßsystem von innen auskleidenden Zellen. Da HUVECs in ihrer Funktion als Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene dem adulten Endothel in ihrer Histologie und Funktion nahestehen, stellt eine Endothelialisierung mit HUVECs eine gute Möglichkeit dar, die Endothelialisierung der HFMs des Oxygenators zu untersuchen. Die Endothelialisierung der HFMs mit HUVECs soll dann mittels Anfärbung der HUVECs mit Calcein AM unter dem Auflichtmikroskop analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Die in den Versuchen verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank (Heraeus 6000)	ThermoScientific, USA
CASY Zellzähler	Roche Innovatis AG, Deutschland
Elisa Reader (Eon Synergy 2)	BioTek Instruments Inc., USA
FACScan	BD Biosciences, USA
Inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135)	Carl Zeiss AG, Deutschland
Inverses Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikroplattenleser (Mithras 940)	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Deutschland
Rollschüttler	Phoenix Instrument, Deutschland
Sonorex Ultraschallbad	Bandelin, Deutschland
Schüttler (Polymax 1040)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Tischzentrifuge (MiniSpin Plus)	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge (5415 R)	Eppendorf, Deutschland
Vortex Mixer	

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Die in den Versuchen verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Becherglas (50ml, 100ml)	SCHOTT, Duran, Deutschland
FACS-Rundboden Röhrchen	Corning Incorporated, USA
Eppendorfgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Deutschland

Kryoröhrchen	Corning™, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH u. Co. KA, Deutschland
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	STARLAB GmbH, Deutschland
Parafilm	
Pasteurpipetten	Fisher Scientific
Polymethylpenten-Membran (PMP)	3M Membrana, Deutschland
Polypropylen-Membran (PP)	3M Membrana, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Corning Incorporated, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Österreich
Zellkulturflasche (75 cm ² und 175 cm ²)	Greiner Bio-one / Österreich

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Die in den Versuchen verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller	Kat. Nr.
Aminoguanidin-hydrochlorid $\geq 98\%$	Sigma Aldrich, Deutschland	396494
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), $\geq 98\%$	Sigma Aldrich, Deutschland	A3648
Amphotericin B, 250 $\mu\text{g/ml}$	Sigma Aldrich, USA	A2942
Ampuwa	Fresenius SE & Co. KGaA, Deutschland	B230673
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma Aldrich, Deutschland	A9418-5G
Calcein-AM (50 μg in 200 μl DMSO)	ThermoFisher, USA	C34852
Cy3-Azid (5mg)	Sigma-Aldrich, USA	777315
dH ₂ O	ThermoFisher, USA	15230162
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deutschland	472301
Ethanol (100%)	VWR Chemicals, Deutschland	20847.307
FACSClean	BD Biosciences, USA	340345
FACSRinse	BD Biosciences, USA	340346
Gentamycin, 50 mg/ml	Sigma Aldrich, USA	G1397
Gelatine	Sigma, Deutschland	G6144
Kaliumdihydrogen-Phosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, Deutschland	P5655
Kupfer(II)-sulfat (CuSO ₄)	Sigma Aldrich, Deutschland	PHR1477
Methylorange	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	A17604.22
Natriumhydroxid/Sodiumhydroxid	Sigma Aldrich, Deutschland	1064980500
NHS-Aлкиn Ester	Sigma Aldrich, USA	764221
PBS pH 7,4 (PBS)	ThermoFisher, USA	10010023

Sodium Ascorbat	Sigma Aldrich, Deutschland	PHR1279
TNS (Trypsin neutralizing solution)	Promocell, Deutschland	C-41110
Toluol (99,8%)	Sigma Aldrich, USA	244511
Tris (3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)	Sigma Aldrich, Deutschland	762342
Trypsin/EDTA 0,04%/0,03%	Promocell, Deutschland	C-41010

3.1.4. Lösungen und Puffer

Die in den Versuchen verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Puffer/Lösung (End.-Konz.)	Zusammensetzung
Methylorange-Lösung (0,001M)	160 mg Methylorange in 488,8 ml Ampuwa
Natriumhydroxid (0,001M)	4 mg NaOH in 100 ml dH ₂ O
Salzsäure-Lösung (0,001N)	0,03 ml 6N HCl in 179,97 ml Ampuwa

3.1.5. Zellen

Die in den Versuchen verwendeten Zellen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Zellen

Zelllinie	Herkunft
HUVECS (Human umbilical cord vein endothelial cells)	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)

3.1.6. Zellkulturmedien

Die in den Versuchen verwendeten Zellkulturmedien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 7: Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Kat.-Nr.
VascuLife Complete Medium (CellSystems), EC-Medium complete	VascuLife Basal Medium EnGS Kit (ohne Hydrocortison) EnGS LifeFactor 0,2 %, rh EGF 5 ng/ml, Ascorbinsäure 50 µg/ml, L-Glutamin 10 mM, Heparansulfat 0,75 U/ml, fetales Kälberserum (FCS) 2 %, Gentamycin 0,05 mg/ml und Amphotericin B 0,125 µg/ml	LL-0002

3.1.7. Lösungen für den Nachweis des NHS-Alkins auf den HFM

Die in den Versuchen verwendeten Stocklösungen für den Nachweis des NHS-Alkin Esters auf den HFM sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 8: Stocklösungen für den Nachweis des NHS-Alkin Esters auf den HFM

Lösung	Zusammensetzung
20 mM Stocklösung aus CuSO ₄ und dH ₂ O	31,9 mg CuSO ₄ in 10 ml Ampuwa gelöst
100 mM KH ₂ PO ₄ Stocklösung	1 ml 1M KH ₂ PO ₄ mit 9 ml Ampuwa verdünnen
50 mM THPTA Stocklösung	10,53 mg THPTA-Pulver in 484,6 µL Ampuwa gelöst
100 mM Natrium Ascorbat Stocklösung	18,09 mg Natrium Ascorbat in 913 µL Ampuwa gelöst
100 mM Aminoguanidin Stocklösung	10,43 mg Aminoguanidin in 943,4 µL Ampuwa gelöst
4 mg/ml Cy3-Azid Stocklösung	5 mg Cy3-Azid-Pulver in 1,25ml Ampuwa gelöst
20 mM CuSO ₄ Stocklösung	32,92 mg CuSO ₄ in 10,03 ml Ampuwa gelöst
6,67 mM CuSO ₄ - 33,34 mM THPTA-Arbeitslösung	22,5 µL der 20mM CuSO ₄ -Stocklösung mit 45 µL der 50mM THPTA-Stocklösung vermischt

3.1.8. Antikörper

Die in den Versuchen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 9: Antikörper

Artikel	Hersteller	Kat. No.
CD144 (VE-Cadherin) monoklonaler Antikörper (100µg)	ThermoFisher, USA	14-1441-82

3.1.9. Kits für Antikörperlabeling und Antikörperkonjugation zu den HFM

Die in den Versuchen verwendeten Kits für Antikörperlabeling und Antikörperkonjugation zu den HFM sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 10: Kits für Antikörperlabeling und Antikörperkonjugation zu den HFM

Kit	Hersteller/Land	Kat.-Nr.
SiteClick™ Antibody Azido Modification Kit	ThermoFisher, USA	S20026

3.1.10. Software

Die in den Versuchen verwendete Software ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 11: Software

Programm	Funktion	Hersteller/Land
CellQuestPro	Durchflusszytometrie (Messung)	BD Biosciences, USA
FlowJo	Durchflusszytometrie (Auswertung)	Tree Star Inc., USA
Gen5	Kolorimetrische Messung/ Photometrische Messung	BioTek Instruments Inc., USA
GraphPad Prism 10	Statistische Auswertung	Statcon GmbH, Deutschland
MikroWin	Fluoreszenzmessung	Mikrotek Laborsysteme GmbH
Zeiss Axio Vision	Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Funktionalisierung von HFM

3.2.1.1. Sauerstoff-Plasma Behandlung

Um die Anbindung der Zellen an die PP- und PMP-HFM zu ermöglichen, mussten funktionelle Gruppen an der Oberfläche der HFM generiert werden. Dies wurde durch die Behandlung mit Sauerstoff-Plasma in einem Parallel-Platten Reaktor erzielt. Die im Parallel-Platten-Reaktor durch die angelegte Spannung entstehenden Ionen, Elektronen und Neutronen, reagieren mit der Oberfläche der HFMs. Dadurch werden auf den Oberflächen der HFMs funktionelle Gruppen wie Hydroxyl- (-OH) und Carboxylgruppen (COOH) generiert (Huang et al., 2016). Hierzu wurden die HFM ausgerollt, in 2x2 cm² große Matten geschnitten und je eine Matte flach in einem Glasschälchen ausgebreitet. Die Schälchen wurden in den Reaktor gestellt. Der Parallel-Platten-Reaktor besteht aus zwei parallelen Elektroden und einer Vakuumpumpe (Abbildung 8). Nach dem Hineinstellen des Glasschälchens wurde ein Vakuum erzeugt und 100% Sauerstoff mit 8 standard cubic centimeters pro Minute (sscm) in die Kammer eingeleitet. Der Reaktor wurde mit 100 W und einer Anregungsfrequenz von 13,56 MHz gestartet. Der Druck im Reaktor betrug während des gesamten Vorgangs 2 Pa. Die Behandlungszeit der HFM im Reaktor betrug 30 min. Danach fand ein Druckablass für 2 min statt.

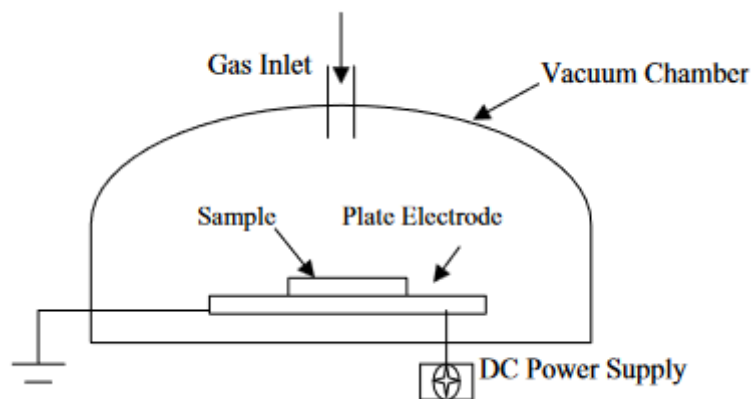


Abbildung 8: Plasma Generator (Wu, 2004).

3.2.1.2. Silanisierung mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)

Nach der Sauerstoffplasma-Behandlung wurden die HFM zur weiteren Biofunktionalisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) behandelt. APTES besteht aus einem Silan-Gerüst, drei Ethoxygruppen und einer 3-Aminopropylgruppe. Die Aminogruppe des APTES reagiert im Prozess der Silanisierung der HFM mit den auf der Oberfläche durch die Sauerstoffplasma-Behandlung generierten Hydroxylgruppen und geht mit ihnen eine kovalente Bindung ein. Über diese Reaktion gelingt folglich eine Bindung der Aminogruppen zur Oberfläche der HFMs (Abbildung 9). Zum Erstellen der 5% APTES Lösung wurde 4 ml APTES mit 76 ml Toluol unter dem Abzug zu einer Lösung vermischt. Zum Erstellen einer 8% APTES-Lösung wurden 1,6 ml APTES mit 18,4 ml Toluol unter dem Abzug zu einer Lösung gemischt. Danach wurden die im ersten Schritt mit Sauerstoff-Plasma behandelten HFM unter dem Abzug in kleine Gläschen gegeben und mit je 8 ml der 5%/8%-APTES-Lösung inkubiert. Zur Kontrolle dienten unbehandelte, nur mit Sauerstoff-Plasma behandelte und mit reinem Toluol inkubierte Proben. Die Inkubation wurde über 24 h bei Raumtemperatur durchgeführt und die Proben danach für 30 min mit je 8 ml reinem Toluol inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 100% EtOH gewaschen und danach mit Ampuwa-Spüllösung gespült. Danach wurden die Proben in 12-Well Platten überführt.

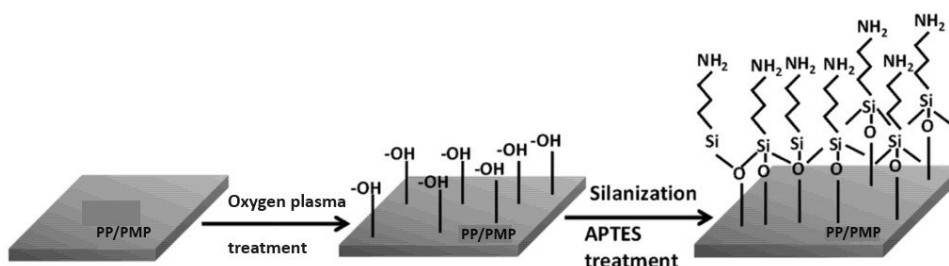


Abbildung 9: Funktionalisierung von PP-/PMP-HFM durch die Behandlung mit Sauerstoff-Plasma und Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES). Die PP-/PMP-HFM wurden 30min mit Sauerstoff-Plasma behandelt, um Hydroxylgruppen an der Oberfläche zu generieren (Modifiziert nach Sarkar and Daniels-Race, 2013).

3.2.1.3. Nachweis der Aminogruppen mittels Methylorange

Der Nachweis der an die Oberfläche der HFM gebundenen Aminogruppen erfolgte mittels Methylorange. Methylorange ist ein Azofarbstoff, der mitunter als pH-Indikator genutzt wird. Im sauren Milieu bindet Methylorange mit seiner Azogruppe an die auf der Oberfläche der HFMs generierten Amino-Gruppen. Sobald sich der pH-Wert im Gemisch ändert und die Azogruppe wieder protoniert wird, kann sich Methylorange von den Aminogruppen lösen. Bei der Inkubation mit Methylorange der mit APTES vorbehandelten HFM, wird das Methylorange durch die Aminogruppen auf der Oberfläche gebunden und färbt die HFM gelb-orange. Nach Desorption der HFM kann die Extinktion des Überstandes mittels des Absorptionsreaders gemessen werden.

Für den Nachweis wurde eine 0,5 mM Arbeitslösung aus Methylorange hergestellt, indem 10 ml 1 mM Stocklösung Methylorange mit 10 ml Ampuwa Spüllösung gemischt wurden. Die HFM wurden in die Well-Platte gelegt und je 2 ml der 0,5mM Methylorange-Arbeitslösung hinzu pipettiert. Danach wurden die HFM über 4 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nach Herausnahme aus dem Inkubator wurden die HFM aus der Well-Platte in eine neue Well-Platte überführt und jeweils mit 0,01 N HCl-Lösung gespült. Im Anschluss wurden die HFM mit Ampuwa-Spüllösung gespült und zum Trocknen auf ein Tuch gelegt. Nach dem Trocknen wurden die HFM jeweils in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 37°C über 30 min mit 400 µl 0,01 M NaOH-Lösung im Inkubator inkubiert. Danach wurden je 100 µL vom Überstand eines jeden Wells abpipettiert und in ein Well einer 96-Well Platte überführt. Die Extinktion der einzelnen Überstände wurden dann bei 465 nm im Absorptionsreader analysiert. Als Kontrolle diente ein mit reinem 0,01 M NaOH gefülltes Well.

3.2.1.4. Konjugation von N-hydroxysuccinimid-Alkin-Ester (NHS-Alkin Ester) zur Oberfläche der HFM

Nach der Silanisierung erfolgte die Bindung von Alkin-Gruppen an die auf der Oberfläche der HFMs generierten Aminogruppen (Abbildung 10). Die Bindung von Alkin-Gruppen zur Oberfläche der HFMs mittels Behandlung mit einem NHS-Alkin Ester, wird im Folgenden für ein Labeling dieser mittels Antikörper genutzt

(Berg and Fishman, 2020). Die PP- oder PMP-HFM wurden hierzu in einer 12-Well-Platte platziert. Als Kontrolle dienten nur mit Sauerstoff-Plasma und 5% oder 8% APTES-Lösung, mit Sauerstoff-Plasma und NHS-Alkin Ester behandelte, sowie lediglich mit Sauerstoff-Plasma behandelte HFM (Negativkontrollen). Als nächstes wurde eine 2 M NHS-Alkin Ester Stocklösung erstellt, indem 27,87 mg NHS-Alkin Ester Pulver in einem Reaktionsgefäß mit 61,87 µL reinem DMSO gemischt wurden. Danach wurde die Lösung für die Wells angesetzt. Für die mit NHS-Alkin Ester zu behandelnden Wells wurde 8,55 ml einer 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat Arbeitslösung, 450 µL reines DMSO und 20,7 µL der 2,22 M NHS-Alkin Ester Stocklösung in einem 50 ml Falcon gemischt. Für die Negativkontrollen wurden 8,55 ml der 0,1M Kaliumdihydrogenphosphat Arbeitslösung und 450 µL reines DMSO mit zusätzlichen 20,7 µL NHS-Alkin Ester-Ersatz (hier reines DMSO) in einem 50 ml Falcon gemischt. Anschließend wurde je 1 ml des jeweiligen Gemisches in die jeweiligen Wells gegeben und die Well-Platte dann für 30 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach erfolgte eine Spülung mit Ampuwa und das Überführen der HFMs in eine neue Well-Platte.

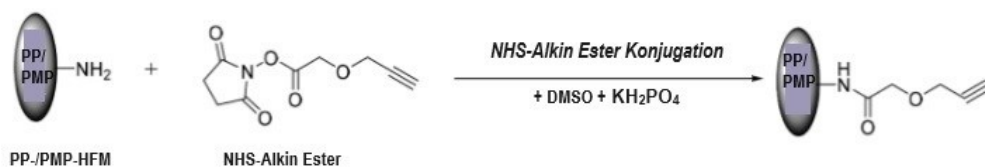


Abbildung 10: Konjugation der Alkin-Gruppen zur Oberfläche der vorbehandelten HFMs.

Die mit Sauerstoffplasma und 5% oder 8% APTES-Lösung vorbehandelten HFM wurden für 30 min bei Raumtemperatur mit einer Arbeitslösung aus NHS-Alkin Ester, DMSO und KH₂PO₄ inkubiert um die Alkin-Gruppen zu den HFMs zu konjugieren (Modifiziert und nachgedruckt mit Erlaubnis von Aïssa et al., 2019, Copyright (2019) American Chemical Society).

3.2.1.5. Nachweis der Alkin-Gruppen auf der Oberfläche der HFMs

Um die Konjugation der Alkin-Gruppen zur Oberfläche der HFMs nachzuweisen, erfolgt eine Fluoreszenzmarkierung des Alkins mit Cyanin-3 (Cy3-Azid). Cyanin-3 gehört zu den nicht wasserlöslichen Fluorophoren und kann unter dem Fluoreszenz Mikropplatten Reader sichtbar gemacht werden. Mittels Kupfer(I)-katalysierter Azid/Alkin Cycloaddition (CuAAC) kann Cy3-Azid an den auf der

Oberfläche fixierten NHS-Alkin binden, sodass dieser unter dem Mikroplatten Reader sichtbar wird (Abbildung 11).

Die Reaktionen der sogenannten „Click-Chemie“ haben eine Kupfer-Katalyse als Basisreaktion. Die klassische 1,3-Dipolare Cycloaddition kann nur unter hohen Temperaturen durchgeführt werden, wohingegen die Reaktion durch die Kupfer-Katalyse schon bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann (Haldón et al., 2015). Durch die Reaktion des Alkin-Rests auf der Oberfläche mit dem Azid-Ende des Cy3 entsteht ein Triazol Ring, welcher das Cy3-Azid an die Alkin-Gruppen bindet (Abbildung 11) (Himo et al., 2005). CuSO_4 dient durch die Oxidation zu Cu(I) als Katalysator der Reaktion (Presolski et al., 2011). Die Oxidationsprodukte des Kupfers sind allerdings zytotoxisch, weshalb als Reduktionsmittel der Reaktion in diesem Fall Natrium Ascorbat eingesetzt wird (Rostovtsev et al., 2002). Das in der Reaktion zusätzlich verwendete Aminoguanidin verhindert Reaktionen zwischen der bei der CuAAC entstehenden Dehydroascorbinsäure und den Seitenketten des NHS-Alkin Esters. Tris(3-hydroxypropyltriazolyl-methyl)amine (THPTA) ist ein Ligand, welcher zum einen den Oxidationsstatus der Kupfer-(I)-Ionen aufrechterhält, sowie die Oxidationsschäden durch Radikale oder Peroxide des Sauerstoffs, Kupfers und des Ascorbats vermindert (Jena Bioscience, o.J.). Nach Konjugation der Alkin-Gruppen wurden die HFMs zur Reaktion unter der Werkbank in eine 12-Well-Platte gelegt. Hier wurden sie je zwei Mal mit je 2 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Danach wurden sie der Well-Platte entnommen und je in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. Anschließend wurden die Stocklösungen wie in Tabelle 8 beschrieben hergestellt.

Für die CuAAC wurden zu den HFM je 432,5 μL der 100 mM KH_2PO_4 -Lösung, 10 μL der 4 mg/ml Cy3-Azid-Arbeitslösung, 7,5 μL der CuSO_4 -THPTA-Lösung, 25 μL der 100mM Natrium Ascorbat Lösung und 25 μL der 10 mM Aminoguanidin Lösung gegeben und das Gemisch in jedem Eppendorf Gefäß ein paar Mal invertiert. Im Anschluss wurden die Eppendorf-Gefäße für eine Stunde an einem lichtgeschützten Ort ruhen gelassen. Nach einer Stunde wurden die HFM in eine 12-Well-Platte überführt und je drei Mal mit je 2 ml Ampuwa gespült und anschließend auf einem Tuch getrocknet. Nach dem letzten Waschvorgang

wurden die HFM mit einem Hochdruckgerät mittels Raumluft getrocknet und dann drei Mal mit je 2 ml 100% EtOH gewaschen. Nach dem ersten Waschgang mit 100% EtOH wurde der Überstand lediglich abgesaugt und neues 100% EtOH hinzugegeben. Nach dem zweiten und dritten Waschgang wurden die HFM über 30 min bei Raumtemperatur mit dem hinzugegebenem 100% EtOH inkubiert, der Überstand im Anschluss aus den Wells gesaugt und neues 100% EtOH hinzugegeben. Nach dem dritten Waschgang wurden erneut je 2 ml 100% EtOH hinzugegeben und die Well-Platte für eine darauffolgende Inkubation über Nacht mit Parafilm eingewickelt und in den Kühlschrank gelegt. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Absaugen des Überstandes aus den Wells und ein Waschgang der einzelnen HFM mit je 2 ml Ampuwa. Zuletzt wurden die HFM in eine neue Well-Platte überführt und mittels Fluoreszenzreader analysiert.

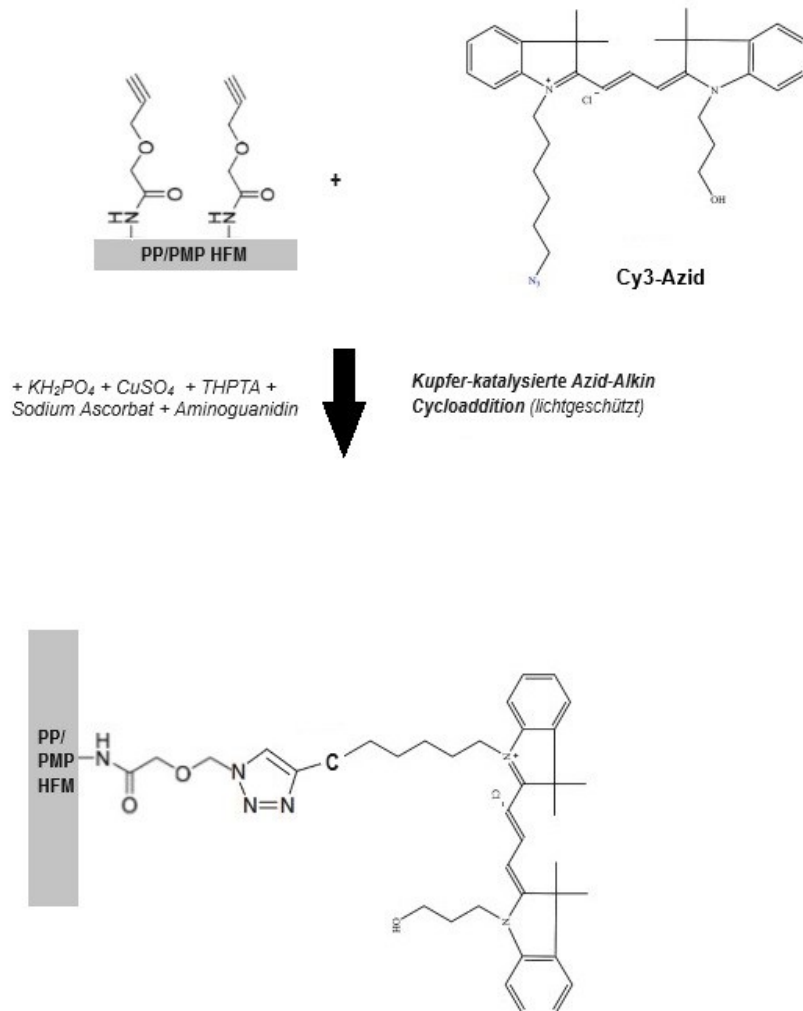


Abbildung 11: Labeling der zur Oberfläche der HFMs konjugierten Alkin-Gruppen mit Cy3-Azid. Nach der Konjugation der Alkin-Gruppen zur Oberfläche der HFM wurden diese für das Labeling der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid über 1 h lichtgeschützt mit einer Lösung aus Cy3-Azid, KH_2PO_4 , CuSO_4 , THPTA, Sodium Ascorbat und Aminoguanidin inkubiert. Im Anschluss erfolgte das Labeling des zur Oberfläche der HFMs konjugierten Alkin-Gruppen mit Cy3-Azid und dessen Analyse mittels Fluoreszenz Reader (Modifiziert und nachgedruckt mit der Erlaubnis von Aïssa et al., 2019, Copyright (2019) American Chemical Society), (Modifiziert nach Qu et al., 2013)

3.2.1.6. Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers (CD144)

Um die Bindung einer menschlichen Nabelvenen-Endothelzelle (HUVEC) an die Oberfläche der HFMs zu ermöglichen, folgt im nächsten Schritt die Biofunktionalisierung der HFMs durch Bindung eines monoklonalen Antikörpers. Durch Labeling des Antikörpers mit einer Azid-Gruppe wird eine Bindung dessen an den zur Oberfläche konjugierten Alkin-Gruppen möglich gemacht. Hierdurch wird der Antikörper kovalent an der Oberfläche fixiert.

Für die Biofunktionalisierung wurde ein vaskulär-endothelialer Cadherin Antikörper (VE-Cadherin Antikörper) genutzt. VE-Cadherin ist Hauptbestandteil des Zell-Zell-Adhäsionskomplexes der Endothelzellschicht des Körpers und geht als Transmembran-Protein eine Bindung mit den Proteinen der anderen Zellen ein (Harris and Nelson, 2010). Der hier genutzte VE-Cadherin Antikörper (CD144) ist ein monoklonales IgG, welches VE-Cadherin bindet. Die schweren Ketten (Fc-Domäne) des Antikörpers besitzen Kohlenhydrat-Seitenketten, welche auf Galactose-*N*-Acetylglucosamine (Gal-GlcNAc) oder auf *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) enden. Durch Abspaltung des Galactose-Rests mittels Galaktosidase bleiben an jeder Fc-Domäne je zwei Enden mit *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) stehen. In der darauffolgenden Reaktion wird der Azid-Rest (UDP-GalNAz) durch das Enzym β -1,4-Galactosyltransferase (GalT) an das GlcNAc-Ende an der Fc-Domäne gebunden (Abbildung 12) (Jena Bioscience GmbH, o.J.). Der somit Azid-gelabelte VE-Cadherin Antikörper kann so an die auf der Oberfläche der HFM generierten Alkin-Gruppen binden.

Für das Azid-Labeling wurden unter einer Werkbank 100 μ g VE-Cadherin Antikörper in 50 μ L Nuclease-freiem Wasser in einem Eppendorf-Gefäß gelöst. Danach wurde zur Modifikation des Antikörpers 10 μ L β -Galaktosidase zum gelösten Antikörper gegeben, das Eppendorf-Gefäß mit Parafilm umwickelt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Vorbereitung der Azid-Labeling-Lösung wurden 75 μ L Ampuwa, 12,5 μ L 1M 20x Tris-Puffer, 25 μ L Puffer-Zusatz und 80 μ L GalT-Enzyme zu 220 μ g UDP-GalNAz gegeben. Anschließend wurden dem Gemisch der aufgelöste VE-Cadherin Antikörper hinzugegeben und alles mittels Vortex-Mischer gemischt. Danach wurde das Gemisch kurz zentrifugiert und zur Inkubation bei 30°C über Nacht mit Parafilm eingewickelt. Für die Reinigung des

Antikörperkonzentrators wurde dieser mit 1 ml 1X Tris-Puffer vermischt und bei 1200 x g für 10min zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgesaugt. In den Antikörperkonzentrator wurden danach 1 ml 1X Tris-Puffer und 250 µL Azid-gelabelter Antikörper hinzugegeben und bei 1200 x g für 6min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt. Zur Sammlung des modifizierten Antikörpers wurde das Gemisch erneut 3 min bei 1000 x g zentrifugiert und danach in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Antikörperkonzentration wurde danach durch eine Messung der OD₂₈₀ (Optische Dichte) gemessen. Danach wurde der Azid-gelabelte VE-Cadherin Antikörper bei 2-8°C gelagert.

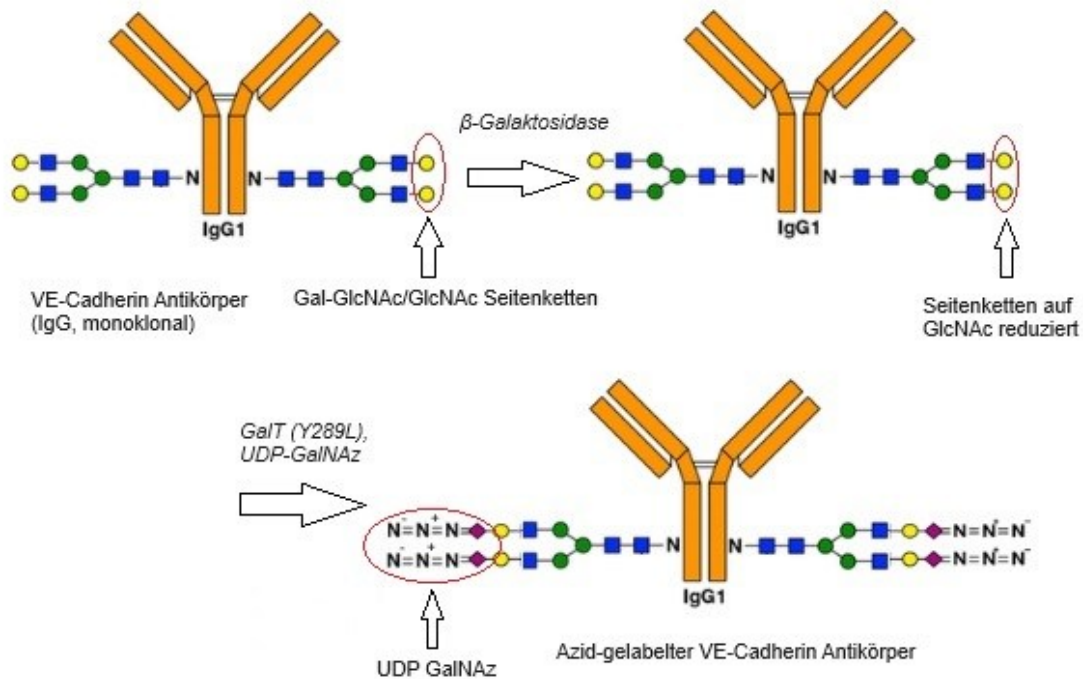


Abbildung 12: Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers (CD144). Durch Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers wird eine Konjugation zu dem an die Oberfläche gebundenen Alkin-Gruppen möglich gemacht. Nach Abspaltung der Kohlenhydrat-Seitenketten von der Fc-Domäne, erfolgte das Azid-Labeling durch Bindung des Azid-Rests (UDP-GalNAz) mittels β -1,4-Galactosyltransferase (GalT) an das GlcNAc-Ende der Kohlenhydrat-Seitenketten (Modifiziert und nachgedruckt mit der Erlaubnis von Qasba, 2015, Copyright (2015) American Chemical Society).

3.2.2. Biofunktionalisierung von HFM

3.2.2.1. Bindung des VE-Cadherin-Antikörpers zur funktionalisierten Oberfläche

Zur weiteren Biofunktionalisierung wurde der Azid-gelabelte VE-Cadherin Antikörper an die zur Oberfläche der HFM konjugierte Alkin-Gruppen gebunden (Finetti et al., 2016). Für diesen und die folgenden Schritte wurden nur noch mit 8% APTES-Lösung vorbehandelte HFMs genutzt. Durch die Bindung des VE-Cadherin Antikörpers wurde im Anschluss eine Bindung von VE-Cadherin-tragenden Zellen an die biofunktionalisierte Membran möglich (Gai et al., 2020). Für die Konjugation des Azid-gelabelten Antikörpers zur Oberfläche der HFM wurde die kupferkatalysierte Azid/Alkin Cycloaddition (CuAAC) genutzt (Abbildung 13).

Für die Anheftung wurden die mit 8% APTES-Lösung vorbehandelten HFM unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank in eine neue Well-Platte überführt. Im Folgenden wurden hier die in 2.2.1.4. hergestellte 20 mM CuSO₄-Stocklösung, die 100 mM Natrium Ascorbat-Stocklösung, die 100 mM Stocklösung aus Aminoguanidin und die 50 mM THPTA-Lösung genutzt. Außerdem wurde eine neue 6,67 mM Lösung durch Mischen von 22,5 µL der 20 mM CuSO₄-Stocklösung mit 45 µL der 50 mM THPTA-Lösung in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß hergestellt. Für die Konjugation der Antikörper mittels CuAAC wurden die HFM in je ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Danach wurde je eine PP- und PMP-HFM, welche mit Sauerstoffplasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin Ester vorbehandelt worden waren, mit je 432,5 µL KH₂PO₄, 10µL Ampuwa, 7,5 µL der CuSO₄-THPTA-Mischung, 25 µL der 100mM Natrium-Ascorbat-Stocklösung und 25 µL der 100mM Aminoguanidin-Stocklösung über 1 h inkubiert (Negativkontrollen). Je eine weitere PP- und PMP-HFM, welche ebenfalls mit Sauerstoffplasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin Ester vorbehandelt worden waren, wurden ebenfalls in separate 0,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben und mit je 432,5 µL KH₂PO₄, 5 µL Ampuwa, 7,5 µL der CuSO₄-THPTA-Mischung, 25 µL der 100 mM Natrium-Ascorbat-Stocklösung, 25 µL der 100 mM Aminoguanidin-Stocklösung und 7 µL Azido-gelabeltem VE-Cadherin Antikörper über 1 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die HFM in eine neue Well-

Platte überführt und je einmal mit Ampuwa gespült und danach auf einem Tuch getrocknet. Anschließend wurde jede Probe noch je zwei Mal mit je 2 ml PBS gespült und der Überstand nach jedem Mal abgesaugt.

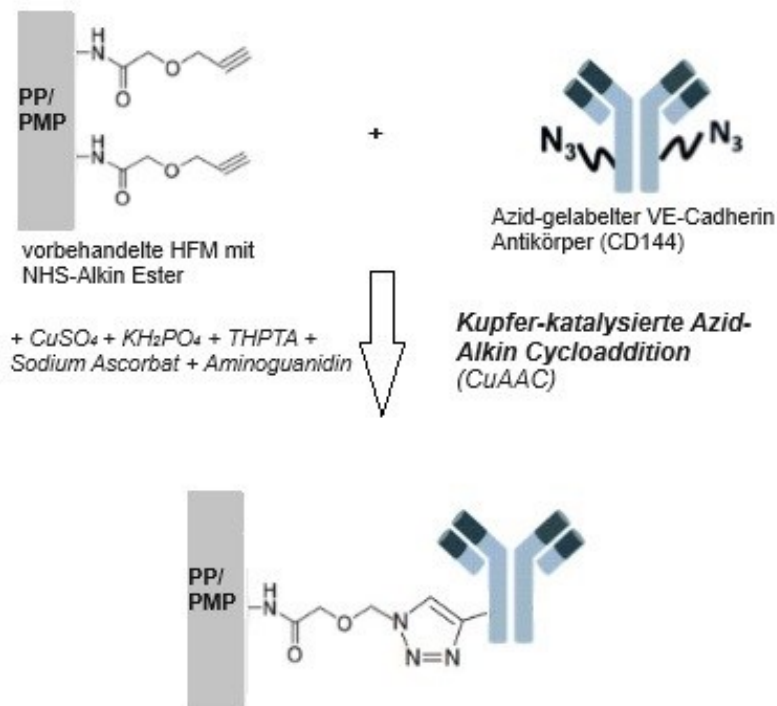


Abbildung 13: Bindung des VE-Cadherin Antikörpers zur funktionalisierten Oberfläche.

Die mit dem Alkin funktionalisierten HFMs wurden über eine Stunde mit einer Lösung aus KH₂PO₄, CuSO₄, THPTA, Sodium Ascorbat, Aminoguanidin und Azid-gelabeltem VE-Cadherin Antikörper inkubiert. Danach wurden die HFM je einmal mit Ampuwa und im Anschluss je zwei Mal mit PBS gespült (Modifiziert und nachgedruckt mit der Erlaubnis von Aïssa et al., 2019, Copyright (2019) American Chemical Society) (Modifiziert nach Gai et al., 2020).

3.2.2.2. Nachweis des VE-Cadherin Antikörpers auf den HFMs

Die Bindung des VE-Cadherin Antikörpers zur Oberfläche der HFMs wurde über die Markierung mit einem Sekundärantikörper (Ratte anti-Maus IgG) nachgewiesen. Aufgrund der Eigenschaft als Fluorophor, kann dieser im Anschluss unter dem Fluoreszenz-Reader sichtbar gemacht werden (Corada et al., 1999). Genutzt wurde ein Ratte-anti-Maus-IgG der Firma Thermo Fisher Scientific. Um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auf der

Oberfläche der HFMs zu verhindern, wurden die Membranen vorher blockiert. Hierfür wurde bovines Serumalbumin (BSA) genutzt. Damit kann eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zur Oberfläche der Membran vermindert werden. Vor der Markierung erfolgte außerdem die Bestimmung der Autofluoreszenz der HFMs, welche nach der Messung abgezogen wurde. Für den Nachweis des VE-Cadherin Antikörpers auf den HFMs wurden die vorbehandelten HFMs in eine neue 6-Well-Platte gegeben und deren Autofluoreszenz unter dem Fluoreszenz-Reader bestimmt. Dann wurde eine 3%-Lösung aus 1,5 g BSA gelöst in 50 ml PBS hergestellt. Die HFMs wurden dann in neue Eppendorf-Gefäße gegeben und zur Blockierung jeweils über 2 h bei Raumtemperatur mit 1,5 ml der 3% BSA-PBS-Lösung inkubiert. Danach wurde erneut die Autofluoreszenz der HFMs unter dem Fluoreszenz-Reader bestimmt und die HFMs im Anschluss in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Zur Markierung der HFMs mit dem Sekundärantikörper (Ratte-anti-Maus-IgG) wurden die HFMs erneut in frische Eppendorf-Gefäße überführt und jeweils mit 1,5 ml einer 1% BSA-PBS-Lösung und 2,5 μ L des Sekundärantikörpers 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die HFMs je drei Mal mit je 1,5 ml der 1% BSA-PBS-Lösung gespült und im Anschluss jeweils in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Markierung mit dem Sekundärantikörper konnte dann durch Messung der Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzreader bestimmt werden.

3.2.3. Auftauen von humanen venösen Nabelschnurzellen (HUVEC)

Die für die Bindung auf der Oberfläche der HFM verwendeten Zellen, entstammten dem Endothel der Vene der humanen Nabelschnur. Um die Zellen aufzutauen, wurden sie dem Gefrierschrank (-80°C) entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. In ein 15 ml Falcon wurden 9 ml EC-Medium vorgelegt. Danach wurde die Zellsuspension aus dem Kryogefäß zum EC-Medium gegeben. Nach 2-maligem invertieren des Falcons wurde dieses für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand aus dem Falcon abgesaugt und die Zellen mit 20 ml EC-Medium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension in eine mit 7 ml 0,1% Gelatinelösung vorbehandelte T175

Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden dann im Inkubator unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

3.2.4. Kultivierung, Passagieren und Ablösung der HUVEC

Um HUVECs zu vermehren und zu nutzen, müssen diese wöchentlich aus der Zellkulturflasche gelöst und vereinzelt werden. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank das EC-Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellkulturflasche mit 10 ml PBS gespült. Danach wurden zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche 5 ml Trypsin in die Flasche gegeben und die Flasche leicht geschwenkt. Danach wurde die Zellkulturflasche mittels Mikroskopie analysiert. Sobald das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte, wurde die Zellkulturflasche erneut unter die Werkbank gebracht und das Trypsin mit 5 ml Trypsin Neutralizing Solution (TNS, 0,05% Trypsin-Inhibitor in 0,1% BSA) neutralisiert. Nach einem leichten Schwenken wurde die gesamte Zellsuspension mit einer Pipette aus der Zellkulturflasche geholt und 50 µL Zellsuspension in einem Casy-Zellzähler gezählt. Hierzu wurden 50 µL der Zellsuspension in einem Casy-Gefäß mit 5 ml der Casyton-Lösung (isotonischer Messpuffer für die Zellzählung) vermischt. Danach wurden nochmal 5 ml Casyton in das Gemisch gegeben und das Casy-Gefäß in den Casy-Zellzähler gebracht. Nach der Zählung wurde die Casy-Zell-Suspension verworfen und das Falcon für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 3,5 ml neues EC-Medium hinzugegeben. Je 900 µL (1,8 Mio Zellen) wurden daraufhin in je eine neue Gelatine beschichtet T175 Zellkulturflasche gegeben und die Flaschen nach Hinzugabe von je 18 ml neuem EC-Medium bei Standardbedingungen im Inkubator aufbewahrt.

3.2.5. Endothelialisierung der biofunktionalisierten HFMs mit HUVECs

Im nächsten Schritt erfolgte die Endothelialisierung der biofunktionalisierten HFMs mit HUVECs. Der HFMs konjugierte VE-Cadherin Antikörper bindet HUVECs an VE-Cadherin auf er Oberfläche und sorgt so für eine Anheftung der Zellen auf den HFM (Abbildung 14). Die vorbehandelten HFMs, wurden hierzu zuerst prophylaktisch mit einem Antibiotikum behandelt. Hierzu wurde ein Gemisch aus 25 ml PBS, 250 µl einer 50 mg/ml Gentamycin-Lösung und 125 µl

einer 250 µg/ml Amphotericin B-Lösung erstellt. Die Membranen wurden dann mit je 1,5 ml des Gemisches für 10 min inkubiert und im Anschluss mit PBS gespült. Danach wurden je 300 µL Zellsuspension ($7,91 \times 10^5$ Zellen/ml) auf die Membranen gegeben. Jedes Falcon wurde mit 1,2 ml EC-Medium aufgefüllt. Die Inkubation fand dann für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler statt. Nach der Inkubation wurden die HFMs aus den Eppendorf-Gefäßen in eine 12-Well-Platte gegeben und je zwei Mal mit je 2ml PBS gewaschen. Danach wurde jedes Well mit Endothelzell-Medium (EC-Medium) aufgefüllt und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde erneut das Medium abgesaugt, die HFMs mit PBS gewaschen und neues Medium auf die HFMs gegeben.

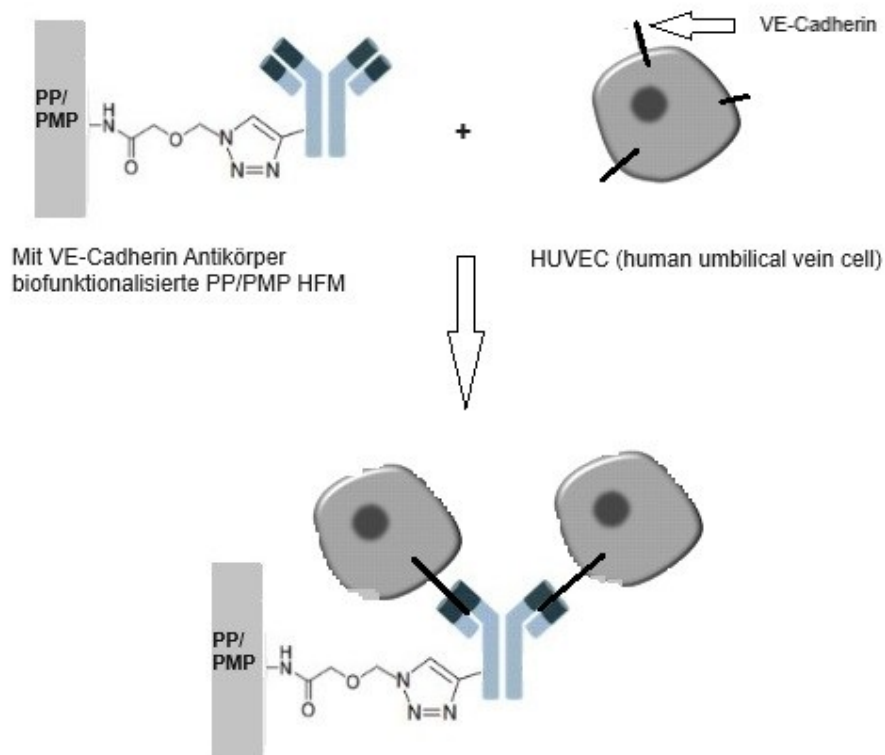


Abbildung 14: Endothelialisierung der HFMs mit HUVECs. Die mit VE-Cadherin Antikörper konjugierten HFMs wurden kurz mit Antibiotika-haltiger Pufferlösung behandelt und im Anschluss über 2 h bei Raumtemperatur mit 300 µL einer auf $7,91 \times 10^5$ /ml Zellen eingestellten Zellsuspension inkubiert. Danach wurden die HFMs mit PBS gewaschen, die Eppendorf-Gefäße erneut mit EC-Medium aufgefüllt und die HFMs für 48 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Modifiziert nach Gai et al., 2020) (Modifiziert und nachgedruckt mit der Erlaubnis von Aïssa et al., 2019, Copyright (2019) American Chemical Society).

3.2.6. Anfärben der angehafteten HUVECs auf den HFMs mit Calcein-AM

Um die zur Oberfläche der HFMs adhärenen HUVECs nachzuweisen, wurden diese mit Calcein-AM (Calcein-Acetoxy-methylester) angefärbt. Calcein-AM ist ein nicht-fluoreszierender Farbstoff, welcher nach Hydrolyse des Acetoxy-methylester in den Zellen zum grün fluoreszierenden Calcein umgewandelt wird. Hierfür wurden 50 µg Calcein-AM in 200 µL DMSO gelöst, sodass die Endkonzentration 0,25 µg/µl betrug.

Nach der 48-stündigen Inkubation der Membranen mit den HUVECs wurde aus der Calcein-AM-Stocklösung und dem EC-Medium eine 0,125 µg/ml Arbeitslösung hergestellt, indem 19,99 ml EC-Medium mit 10 µL einer 0,25 µg/µl Calcein-AM-DMSO-Lösung vermischt wurden. Die HFMs wurden unter der Werkbank in eine neue Well-Platte überführt und je 3 ml des Calcein-AM-EC-Medium Gemisches auf die Wells gegeben. Im Anschluss wurden die HFMs über 30 min bei Raumtemperatur mit dem Gemisch inkubiert und dann mit je 2 ml PBS gewaschen. Nach Hinzugabe von je 2 ml neuen EC-Mediums wurden die HFMs unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4. Ergebnisse

4.1. Silanisierung der HFM

In den folgenden Versuchen wurden PP- oder PMP-HFMs mit 5% oder 8% APTES silanisiert. Anschließend wurden die Aminogruppen mittels Methylorange Färbung analysiert. Das von der Oberfläche eluierte Methylorange Menge korreliert mit der Menge der Aminogruppen an der Oberfläche.

Funktionalisierung der PP-HFM mit 5% APTES-Lösung

Die PP Membranen wurden mit 5%-APTES-Lösung behandelt. Die Absorption des Methylorange im Eluat wurde mittels Absorptionsreader ermittelt (Abbildung 15). Im Vergleich zu unbehandelten, mit O₂-Plasma behandelten und mit Toluol behandelten PP-HFMs zeigten die 5% APTES behandelten HFMs eine stärkere Bindung des Methylorange. Dies zeigt, dass es gelungen ist auf der Oberfläche der PP-HFMs Aminogruppen zu generieren.

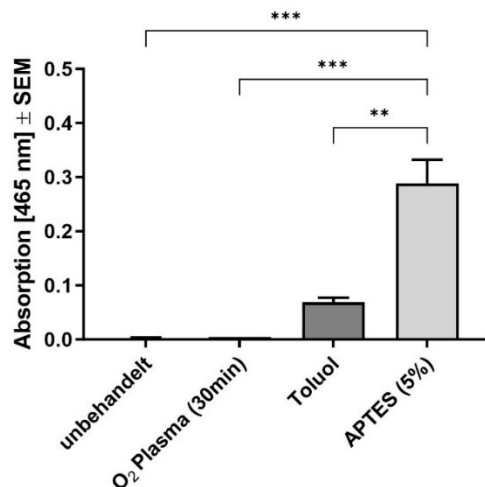


Abbildung 15: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PP-HFMs nach Behandlung mit O₂-Plasma und Inkubation mit 5% APTES-Lösung. Die unbehandelte Probe (*unbehandelt*), dient als Kontrolle. Eine Probe wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (*O₂-Plasma, 30 min*) und eine andere Probe wurde sowohl für 30 min mit O₂-Plasma behandelt als auch mit reinem Toluol inkubiert (*Toluol*). Außerdem wurde eine weitere Probe für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 5% APTES-Lösung inkubiert (*APTES 5%*). Im Anschluss wurden die Proben gleichzeitig mit Methylorange inkubiert und nach Desorption die Extinktion des Überstandes jeder einzelnen Probe bei 465 nm unter dem Absorptionsreader gemessen. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels One-way ANOVA ausgewertet und die Signifikanz anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (** p<0,01; *** p<0,001) ermittelt.

Funktionalisierung der PMP-HFM mit 5% APTES-Lösung

In diesem Versuch wurden PMP-HFMs mit 5%-APTES-Lösung behandelt und anschließend die Bindung der Aminogruppen auf der Oberfläche der Membranen durch Anfärbung mit Methylorange analysiert (Abbildung 16). Die Absorption des Methylorange im Eluat nach Desorption der HFMs wurde danach im Absorptionsreader gemessen. Auch in diesem Versuch zeigen die mit 5%-APTES-Lösung behandelten PMP-HFMs eine stärkere Bindung des Methylorange im Vergleich zu unbehandelten, mit O₂-Plasma behandelten und mit Toluol behandelten PMP-HFMs. Diese stärkere Bindung korreliert mit der Generierung von Aminogruppen auf der Oberfläche der HFMs.

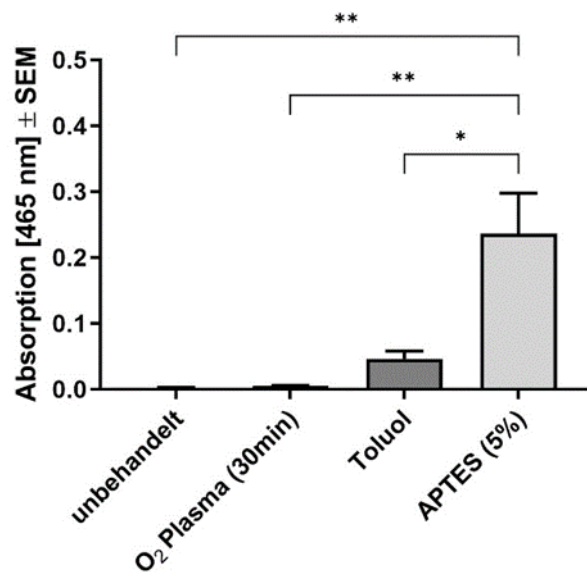


Abbildung 16: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PMP-HFM nach Behandlung mit O₂-Plasma und Inkubation mit 5% APTES-Lösung. Die unbehandelte Probe (*unbehandelt*), dient als Kontrolle. Eine Probe wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (*O₂-Plasma, 30 min*) und eine andere Probe wurde sowohl für 30 min mit O₂-Plasma behandelt als auch mit reinem Toluol inkubiert (*Toluol*). Außerdem wurde eine weitere Probe für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 5% APTES-Lösung inkubiert (*APTES 5%*). Im Anschluss wurden die Proben gleichzeitig mit Methylorange inkubiert und nach Desorption die Extinktion des Überstandes jeder einzelnen Probe bei 465nm unter dem Absorptionsreader gemessen. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels One-way ANOVA ausgewertet und die Signifikanz anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (*p<0,05; ** p<0,01) ermittelt.

Vergleich der Funktionalisierung von PP- und PMP-HFM mit 5% APTES-Lösung

Die mit 5%-APTES-Lösung behandelten PP- und PMP-HFMs wurden mit Methylorange inkubiert und die Absorption des Eluats im Absorptionsreader gemessen. Die Werte beider Materialien wurden miteinander verglichen (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass sich die Werte der Absorption des Eluats in Bezug auf das behandelte Material nicht unterscheiden. Dies zeigt, dass sowohl auf den PP- als auch auf den PMP-HFM eine vergleichbare Generierung der Aminogruppen stattgefunden hat.

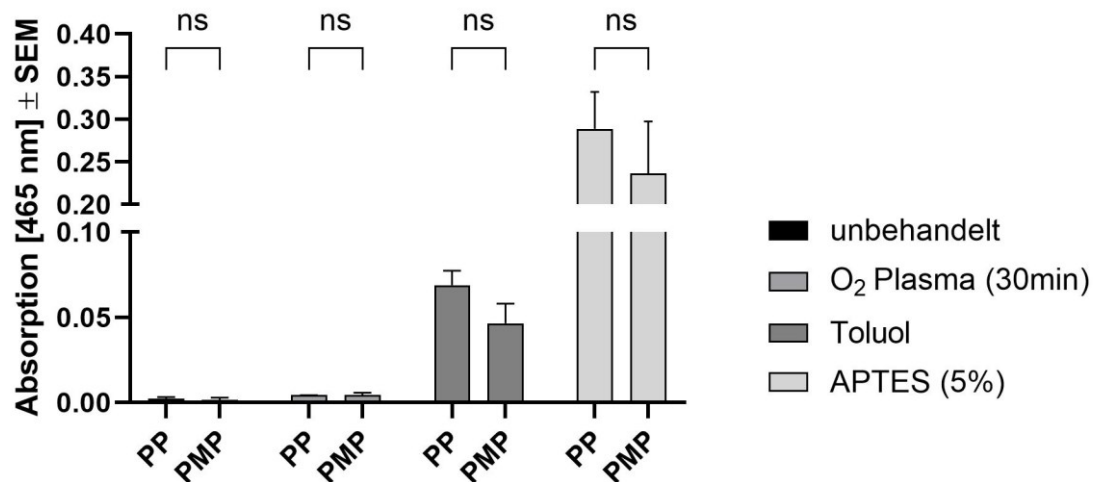


Abbildung 17: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf HFM nach Behandlung mit O₂-Plasma und Inkubation mit 5% APTES-Lösung – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Es wurde je eine PP- und eine PMP-HFM behandelt. Je eine unbehandelte HFM (*unbehandelt*) diente als Kontrolle. Je eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (*O₂, 30 min*) und je eine andere HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und im Anschluss mit reinem Toluol inkubiert (*Toluol*). Außerdem wurde je eine HFM für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 5% APTES-Lösung inkubiert (*APTES 5%*). Im Anschluss wurden die HFM mit Methylorange inkubiert und nach Desorption die Extinktion des Überstandes jeder HFM bei 465nm unter dem Absorptionsreader gemessen. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels one-way ANOVA ausgewertet. Danach wurden die Werte der verschiedenen Versuche der zwei Stoffe statistisch mittels 2way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

Funktionalisierung von PP-HFM mit 8% APTES-Lösung

In diesem Versuch wurden die PP-HFM mit einer höher konzentrierten 8%-APTES-Lösung behandelt. Die Absorption des Methylorange im Eluat wurde erneut mittels Absorptionsreader ermittelt (Abbildung 18). Im Vergleich zu unbehandelten, mit O₂-Plasma behandelten und mit Toluol behandelten PP-HFMs zeigten die 8% APTES behandelten HFMs auch hier eine stärkere Bindung des Methylorange. Im Vergleich zu den Absorptionswerten der mit 5% APTES-Lösung behandelten PP-HFM aus Abbildung 15, zeigt die mit 8%-APTES-Lösung behandelte PP-HFM jedoch deutlich höhere Werte.

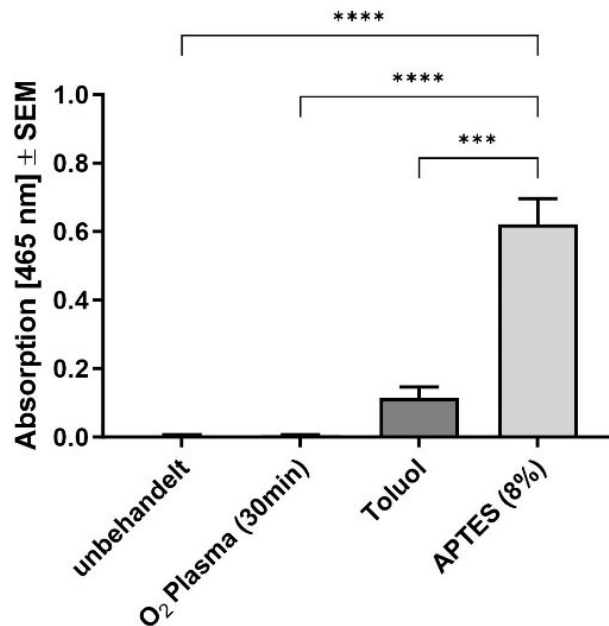


Abbildung 18: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PP-HFM nach Behandlung mit O₂-Plasma und Inkubation mit 8% APTES-Lösung. Die unbehandelte Probe (*unbehandelt*), dient als Kontrolle. Eine Probe wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (*O₂-Plasma, 30min*) und eine andere Probe wurde sowohl für 30 min mit O₂-Plasma behandelt als auch mit reinem Toluol inkubiert (*Toluol*). Außerdem wurde eine weitere Probe für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (*APTES 8%*). Im Anschluss wurden die Proben gleichzeitig mit Methylorange inkubiert und nach Desorption die Extinktion des Überstandes jeder einzelnen Probe bei 465nm unter dem Absorptionsreader gemessen. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels One-way ANOVA ausgewertet und die Signifikanz anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (***) p<0,001; **** p<0,0001) ermittelt.

Funktionalisierung von PMP-HFM mit 8% APTES-Lösung

Die PMP-HFM wurden mit 8%-APTES-Lösung inkubiert und im Anschluss mit Methylorange behandelt. Die Absorption des Eluats wurde mit dem Absorptionsreader analysiert (Abbildung 19). Im Vergleich zu unbehandelten, mit O₂-Plasma behandelten oder mit Toluol inkubierten HFM, zeigten die mit 8%-APTES-Lösung inkubierten HFM eine deutlich höhere Bindung von Methylorange. Auf den mit 8%-APTES-Lösung behandelten Membranen wurden somit deutlich mehr Aminogruppen generiert. Im Vergleich zu den Werten der mit

5% APTES-Lösung behandelten PMP-HFM aus Abbildung 16, sind die Absorptionswerte der mit 8%-APTES-Lösung behandelten Probe hier höher. Die lässt auf eine Generierung von mehr Amino-Gruppen auf der Oberfläche der HFM schließen.

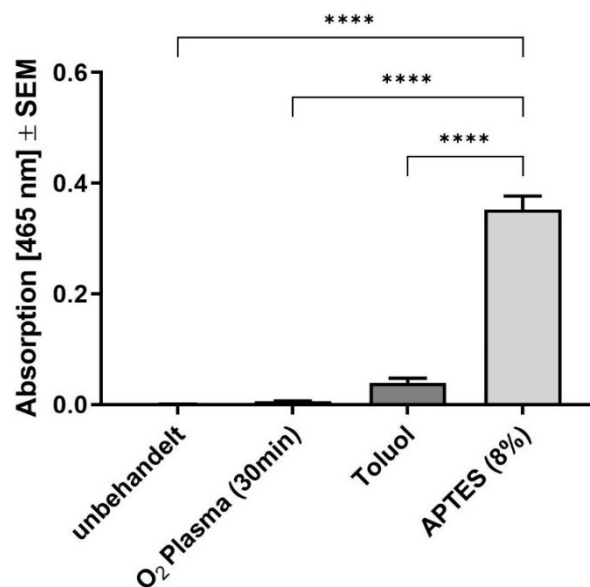


Abbildung 19: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf PMP-HFM nach Behandlung mit O₂-Plasma und Inkubation mit 8% APTES-Lösung. Die unbehandelte Probe (*unbehandelt*), dient als Kontrolle. Eine Probe wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (*O₂-Plasma, 30min*) und eine andere Probe wurde sowohl für 30 min mit O₂-Plasma behandelt als auch mit reinem Toluol inkubiert (*Toluol*). Außerdem wurde eine weitere Probe für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (*APTES 8%*). Im Anschluss wurden die Proben gleichzeitig mit Methylorange inkubiert und nach Desorption die Extinktion des Überstandes jeder einzelnen Probe bei 465nm unter dem Absorptionsreader gemessen. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels One-way ANOVA ausgewertet und die Signifikanz anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (**** p<0,0001) ermittelt.

Vergleich der Funktionalisierung von PP- und PMP-HFM mit 8% APTES-Lösung

Die mit 8%-APTES-Lösung behandelten PP- und PMP-HFM wurden mit Methylorange inkubiert. Danach wurde das Eluat mit einem Absorptionsreader analysiert und die Werte beider Materialien miteinander verglichen (Abbildung 20). Bei den unbehandelten, den mit O₂-Plasma behandelten und den mit Toluol

behandelten Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Generierung von Aminogruppen in Bezug auf das verwendete Material. Die mit 8%-APTES-Lösung behandelten Proben weisen allerdings einen signifikanten Unterschied auf. Hier sind die absoluten Werte der Absorption bei den Proben der aus PP bestehenden HFM nahezu doppelt so hoch wie bei den Proben der aus PMP bestehenden HFM. Dies lässt darauf schließen, dass auf der Oberfläche, der aus PP bestehenden HFM deutlich mehr Aminogruppen generiert werden konnten, wie auf der Oberfläche der aus PMP bestehenden HFM. Dies könnte auf die mikroporöse Struktur der PP-HFMs zurückzuführen sein. Aus PMP bestehende HFMs sind nicht-mikroporöse HFMs, deren Kontaktfläche mit der APTES-Lösung und dem Methyorange dementsprechend geringer ist.

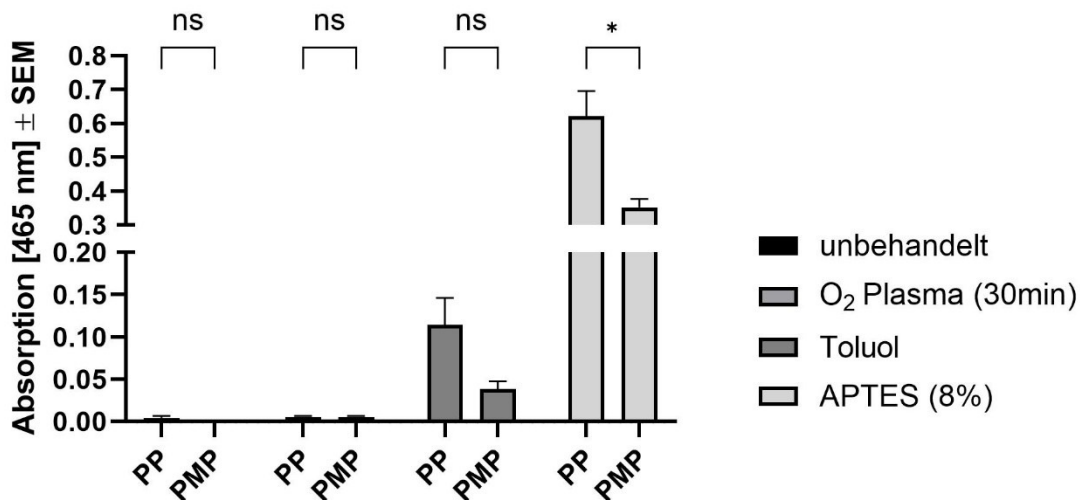


Abbildung 20: Nachweis der Silanisierung mittels Anfärbung mit Methylorange auf HFM nach Behandlung mit O₂-Plasma und Inkubation mit 8% APTES-Lösung – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Es wurde je eine PP- und eine PMP-HFM behandelt. Je eine unbehandelte HFM (*unbehandelt*) diente als Kontrolle. Je eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂, 30 min) und je eine andere HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und im Anschluss mit reinem Toluol inkubiert (*Toluol*). Außerdem wurde je eine HFM für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (*APTES 8%*). Im Anschluss wurden die HFM mit Methylorange inkubiert und nach Desorption die Extinktion des Überstandes jeder HFM bei 465nm unter dem Absorptionsreader gemessen. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels one-way ANOVA ausgewertet. Danach wurden die Werte der verschiedenen Versuche der zwei Stoffe statistisch mittels 2way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant; * p<0,05) ermittelt.

4.2. Nachweis Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling auf den HFMs

In den folgenden Abbildungen wurden mit APTES-Lösung silanisierte HFM mit einem NHS-Alkin-Ester behandelt. Anschließend wurden die Alkin-Gruppen mit Cy3-Azid gelabelt, die HFM mit 100%-EtOH gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Stärke der gemessenen Fluoreszenzintensitäten auf den Oberflächen der HFM korreliert mit der Menge des an die Oberfläche gebundenen Alkin-Gruppen.

4.2.1. Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Konjugation an HFM nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung

4.2.1.1. Einmaliges Waschen der HFMs mit 100% EtOH nach Cy3-Azid-Inkubation

Die mit Sauerstoff-Plasma und 5%-APTES-Lösung vorbehandelten PP- und PMP-HFM wurden mit einer 2,22 M NHS-Alkin-Ester-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Alkin-Gruppen mit einer 4 mg/ml Cy3-Azid-Lösung konjugiert, die HFMs mit 100%-EtOH gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenzreader analysiert (Abbildung 21 und 22). Danach wurden die Fluoreszenzintensitäten beider Materialien miteinander verglichen (Abbildung 23). Zu erkennen ist, dass die mit O₂-Plasma und 5%-APTES-Lösung behandelten HFM (O₂, APTES) und die mit O₂-Plasma, 5%-APTES-Lösung und NHS-Alkin Ester (O₂, APTES, NHS) HFMs im Vergleich zu anderen HFMs eine höhere Fluoreszenzintensität aufweisen (Abbildung 21, 22). Zwischen mit O₂-Plasma und 5%-APTES-Lösung behandelten HFMs (O₂, APTES) und den mit O₂-Plasma, 5%-APTES-Lösung und NHS-Alkin Ester (O₂, APTES, NHS) behandelten HFMs, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Um die spezifische Bindung deutlicher detektieren zu können, wurden die HFMs im Folgenden zwei oder drei Mal mit 100% EtOH gewaschen.

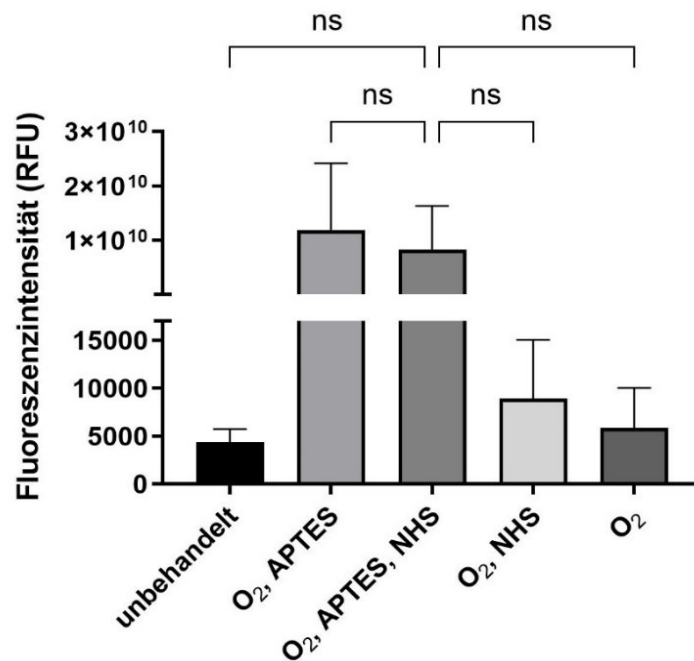


Abbildung 21: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH. Eine unbehandelte PP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte (O₂), eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte und mit dem NHS-Alkin-Ester inkubierte (O₂, NHS), eine, für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5% APTES-Lösung inkubierte (O₂, APTES 5%) und eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5%-APTES-Lösung inkubierte und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester behandelte (O₂, APTES, NHS) Probe wurden mit Cy3-Azid inkubiert und danach mit einer 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Diese wurden statistisch mittels one-way ANOVA analysiert und die Signifikanzen anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

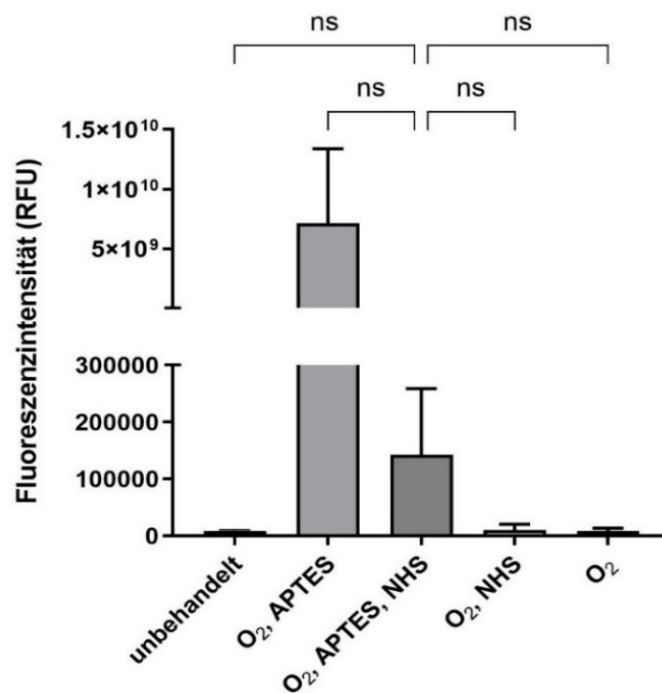


Abbildung 22: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH. Eine unbehandelte PMP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte (O₂), eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte und mit dem NHS-Alkin-Ester inkubierte (O₂, NHS), eine, für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5% APTES-Lösung inkubierte (O₂, APTES 5%) und eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5%-APTES-Lösung inkubierte und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester behandelte (O₂, APTES, NHS) Probe wurden mit Cy3-Azid inkubiert und danach mit einer 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Diese wurden statistisch mittels one-way ANOVA analysiert und die Signifikanzen anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

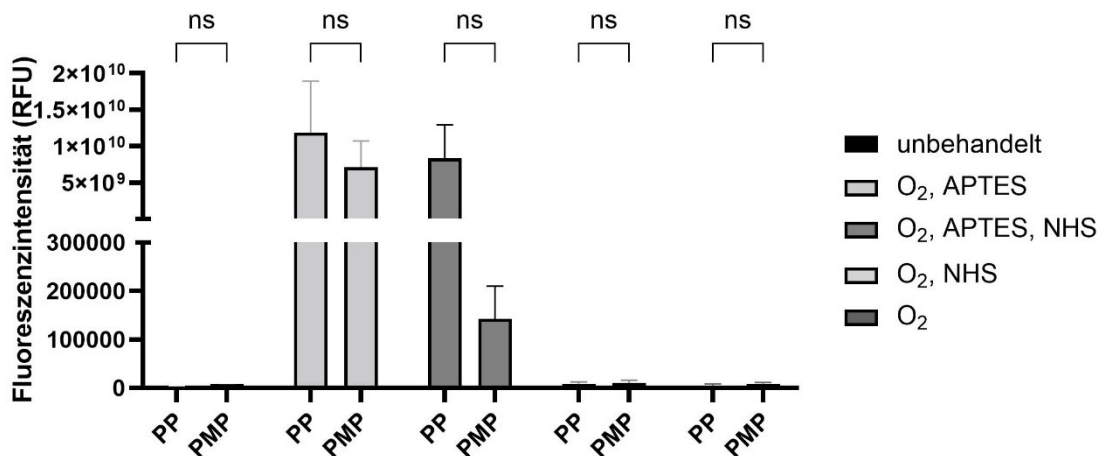


Abbildung 23: Nachweis der Alkin-Gruppen durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Es wurde je eine PP- und eine PMP-HFM behandelt. Je eine unbehandelte HFM (*unbehandelt*) diente als Kontrolle. Je eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂) und je eine andere wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und im Anschluss mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS). Außerdem wurde je eine HFM für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 5% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 5%). Je eine HFM wurde zuerst für 30 min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 5%-APTES-Lösung inkubiert und danach mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden die HFM mit Cy3-Azid inkubiert und danach mit einer 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels one-way ANOVA ausgewertet. Danach wurden die Werte der verschiedenen Versuche der zwei Stoffe statistisch mittels 2way ANOVA analysiert, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

4.2.1.2. Zweimaliges Waschen der HFM mit 100% EtOH nach Cy3-Azid-Inkubation

Die PP- und PMP-HFMs wurden mit O₂-Plasma und 5%-APTES-Lösung vorbehandelt und mit dem 2,22 M NHS-Alkin-Ester inkubiert. Danach wurden alle HFM mit 4 mg/ml Cy3-Azid-Lösung gelabelt und im Anschluss zweimalig mit 100% EtOH gewaschen, um die unspezifische Bindung des Cy3-Azids an die

HFMs zu reduzieren. Daraufgehend wurden die HFMs unter dem Fluoreszenzreader analysiert (Abbildung 24, 25 und 26).

Die mit O₂-Plasma, 5%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten HFMs (O₂, APTES, NHS) weisen eine starke Cy3-Azid-Bindung auf, was auf die erfolgreiche generierten Alkin-Gruppen hinweist. Die unspezifische Bindung des Cy3-Azids an die mit O₂-Plasma und 5%-APTES-Lösung (O₂, APTES) behandelten HFM wurde durch zweimaliges Waschen mit 100% EtOH reduziert. Im Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der PP- und PMP HFMs, welche mit O₂-Plasma, 5% APTES-Lösung und NHS-Alkin Ester behandelt wurden, fallen die höheren Werte der behandelten PP-HFMs auf. Die höheren Werte könnten aufgrund der mikroporösen Struktur der PP-HFMs zustande kommen. Durch die mikroporöse Struktur entsteht eine potenziell größere mit der APTES-Lösung und dem Methylorange in Kontakt kommende Oberfläche. Hierzu wären weitere Versuche nötig.

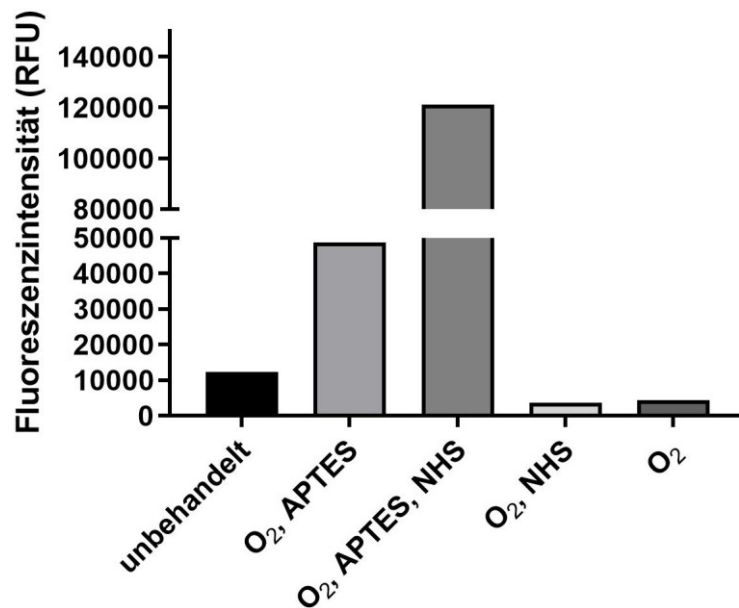


Abbildung 24: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH. Eine unbehandelte PP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte (O₂), eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte und mit dem NHS-Alkin-Ester inkubierte (O₂, NHS), eine, für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5% APTES-Lösung inkubierte (O₂, APTES 5%) und eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5%-APTES-Lösung inkubierte und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester behandelte (O₂, APTES, NHS) Probe wurden mit Cy3-Azid inkubiert und danach zwei Mal mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=1).

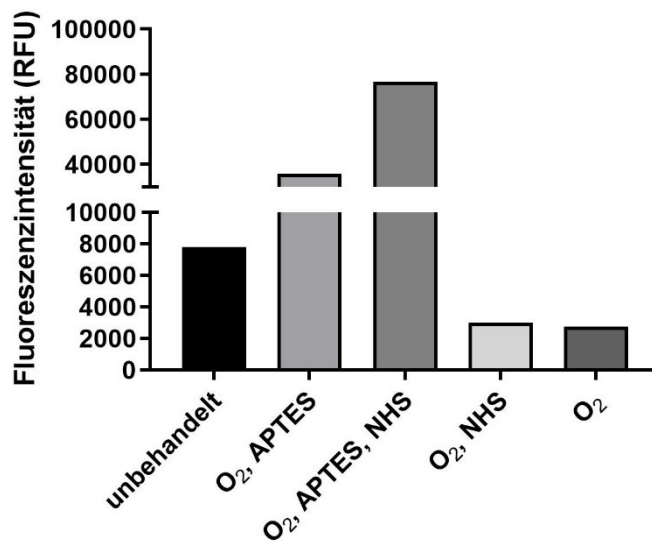


Abbildung 25: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH. Eine unbehandelte PMP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte (O₂), eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte und mit dem NHS-Alkin-Ester inkubierte (O₂, NHS), eine, für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5% APTES-Lösung inkubierte (O₂, APTES 5%) und eine für 30 min mit O₂-Plasma behandelte, mit einer 5%-APTES-Lösung inkubierte und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester behandelte (O₂, APTES, NHS) Probe wurden mit Cy3-Azid inkubiert und danach zwei Mal mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=1).

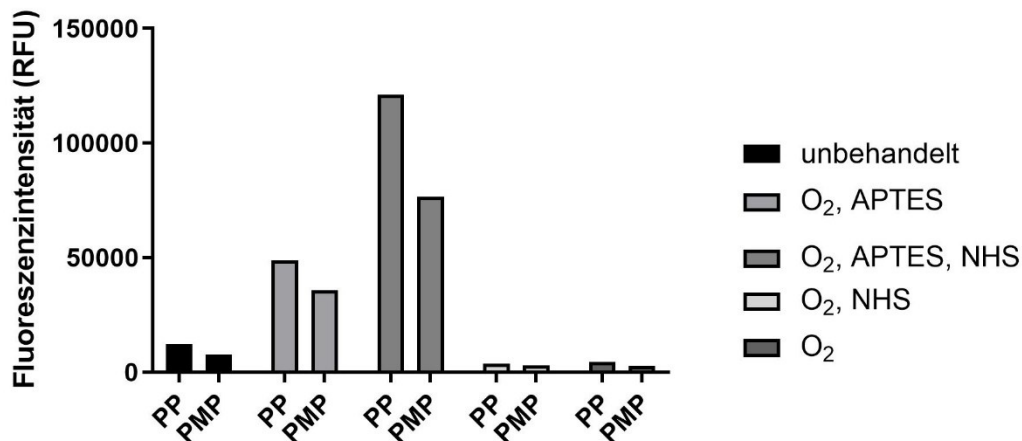


Abbildung 26: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 5%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Je eine unbehandelte PP- und PMP-HFM (*unbehandelt*) dienen als Kontrolle. Je eine PP- und PMP-HFM wurden für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PP- und PMP-HFM für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 5% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 5%) und je eine PP- und PMP-HFM für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 5%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle Proben mit Cy3-Azid inkubiert und danach zwei Mal mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt. Sie wurden statistisch mittels 2way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

4.2.2. Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Konjugation an HFM nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung

4.2.2.1. Einmaliges Waschen der HFM mit 100% EtOH nach Cy3-Azid-Inkubation

Die PP- und PMP-HFM wurden mit 8%-APTES-Lösung behandelt, mit einer 2,22 M NHS-Alkin-Ester-Lösung inkubiert und anschließend mit einer 4 mg/ml Cy3-Azid-Lösung gelabelt. Die HFM wurden danach einmalig mit 100% EtOH gewaschen und unter dem Fluoreszenzreader analysiert (Abbildung 27 und 28). Im Anschluss wurden die Werte der PP- und PMP-HFM miteinander verglichen (Abbildung 29).

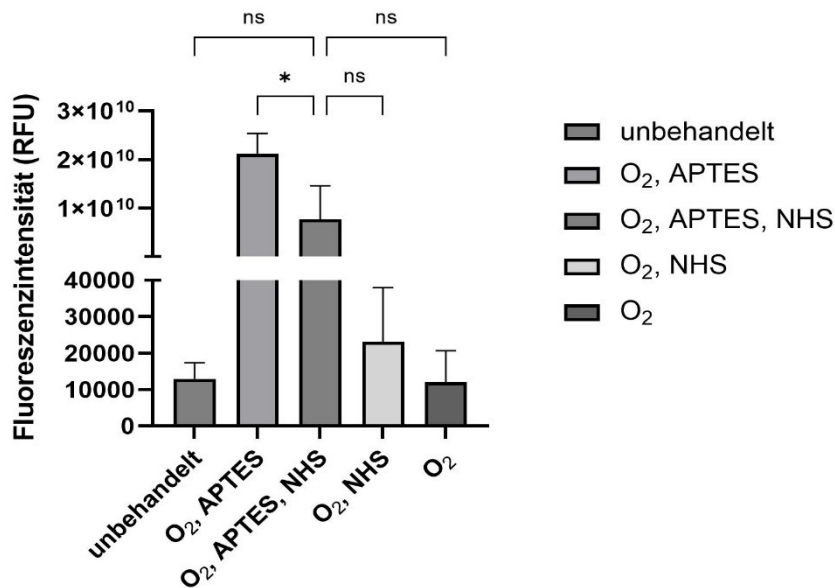


Abbildung 27: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH. Eine unbehandelte PP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt, mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester behandelt (O₂, APTES, NHS). Alle Proben wurden anschließend mit dem Cy3-Azid inkubiert und danach mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Diese wurden statistisch mittels one-way ANOVA analysiert und die Signifikanzen anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant, * p<0,05) ermittelt.

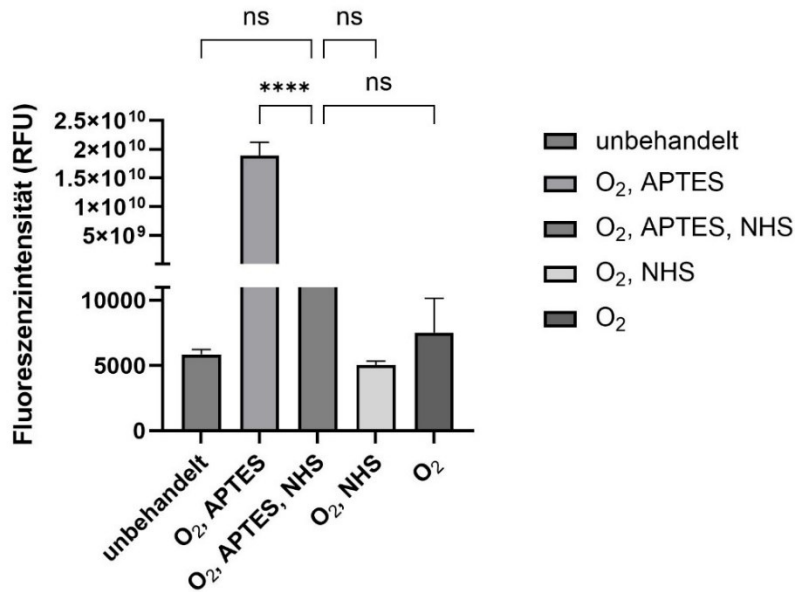


Abbildung 28: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH. Eine unbehandelte PMP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und eine HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt, mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester behandelt (O₂, APTES, NHS). Alle Proben wurden anschließend mit dem Cy3-Azid inkubiert und danach mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Diese wurden statistisch mittels one-way ANOVA analysiert und die Signifikanzen anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant, **** p<0,0001) ermittelt.

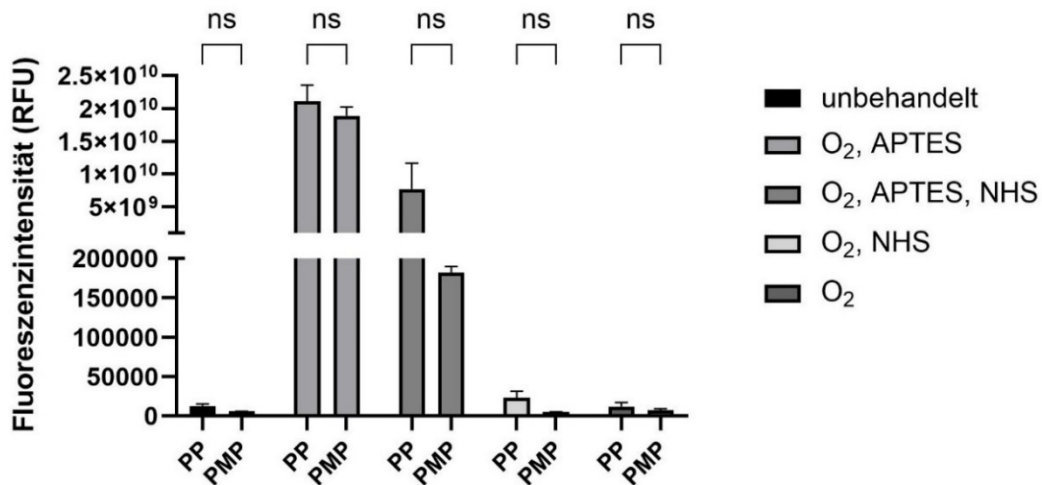


Abbildung 29: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels einmaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Je eine unbehandelte PP- und PMP-HFM (*unbehandelt*) dienen als Kontrolle. Je eine PP- und PMP-HFM wurden für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PP- und PMP-HFM für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PP- und PMP-HFM für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle Proben mit Cy3-Azid inkubiert und danach mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels 2way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

Die HFMs, welche mit O₂-Plasma und 8%-APTES-Lösung behandelt wurden (O₂, APTES), wiesen eine stärkere Bindung des Cy3-Azids auf als die mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten HFMs (O₂, APTES, NHS). Dies könnte auch hier auf eine unspezifische Bindung des Cy3-Azids hindeuten.

4.2.2.2. Zweimaliges Waschen der HFM mit 100% EtOH nach Cy3-Azid-Inkubation

Die HFM wurden mit 8%-APTES-Lösung behandelt und mit einem 2,22 M NHS-Alkin-Ester inkubiert. Dann wurden die HFM mit einer 4 mg/ml Cy3-Azid-Lösung behandelt und zwei Mal mit 100% EtOH gewaschen. Im Anschluss wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert (Abbildung 30 und 31). Danach wurden die Werte der PP- und PMP-HFM miteinander verglichen (Abbildung 32). Die gemessene Fluoreszenzintensität (RFU) korreliert mit der Menge der auf der Oberfläche der HFM generierten Alkin-Gruppen.

Die mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten HFM (O₂, APTES, NHS) weisen die höchsten Werte der Fluoreszenzintensität auf. Vergleichbar mit den Ergebnissen in Abbildung 26 konnte die unspezifische Bindung des Cy3-Azids an die mit O₂-Plasma und 8%-APTES-Lösung behandelten HFM (O₂, APTES) durch einen zweiten Waschgang mit 100% EtOH reduziert werden. Beim Vergleich der mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten HFMs (O₂, APTES, NHS) aus Abbildung 27 mit den ebenso vorbehandelten, aber einmal mehr mit 100% EtOH gewaschenen HFMs aus Abbildung 32, zeigt sich eine stärkere Bindung des Cy3-Azids an die HFMs bei den mit 8% APTES-Lösung vorbehandelten HFMs. Dies deutet auf eine Generierung von mehr Alkin-Gruppen auf den Oberflächen der HFMs durch die Vorbehandlung mit einer stärker konzentrierten APTES-Lösung hin. Die aus PP bestehenden HFM binden den NHS-Alkin-Ester stärker als die aus PMP bestehenden HFM.

Im Vergleich war die Fluoreszenzintensität bei allen mit 5% APTES-Lösung silanisierten HFMs niedriger als nach der Silanisierung mit einer 8% APTES-Lösung (Vergleiche Abbildung 26 und Abbildung 32). Dieser Umstand erklärt sich mit der reduzierten Bindung der Aminogruppen zur Oberfläche der HFMs durch Verwendung einer geringen konzentrierten APTES-Lösung und der damit korrelierenden reduzierten Bildung der Alkin-Gruppen auf der Oberfläche der HFMs.

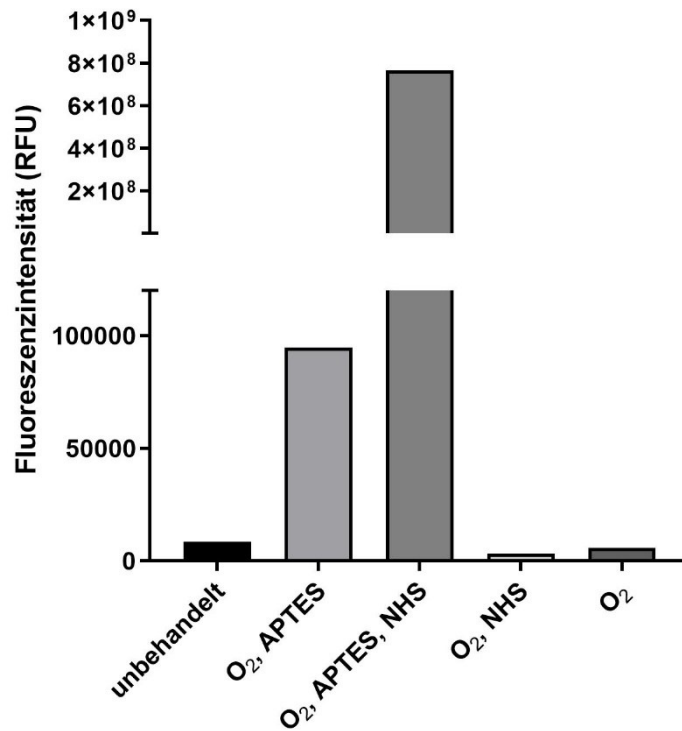


Abbildung 30: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH. Je eine unbehandelte PP -HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine PP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PP-HFM wurde für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle HFMs mit Cy3-Azid inkubiert und danach zweimalig mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt (n=1).

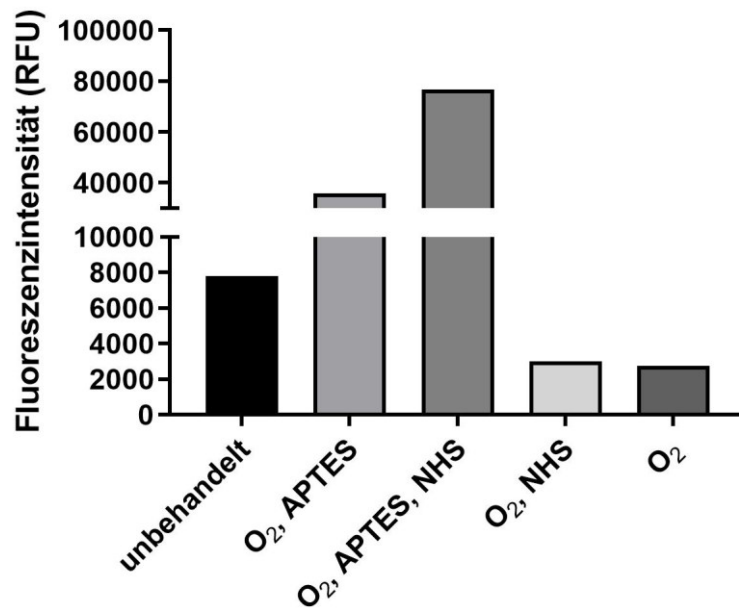


Abbildung 31: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM durch Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH. Je eine unbehandelte PMP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PMP-HFM wurde für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle HFMs mit Cy3-Azid inkubiert und danach zweimalig mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFMs unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt (n=1).

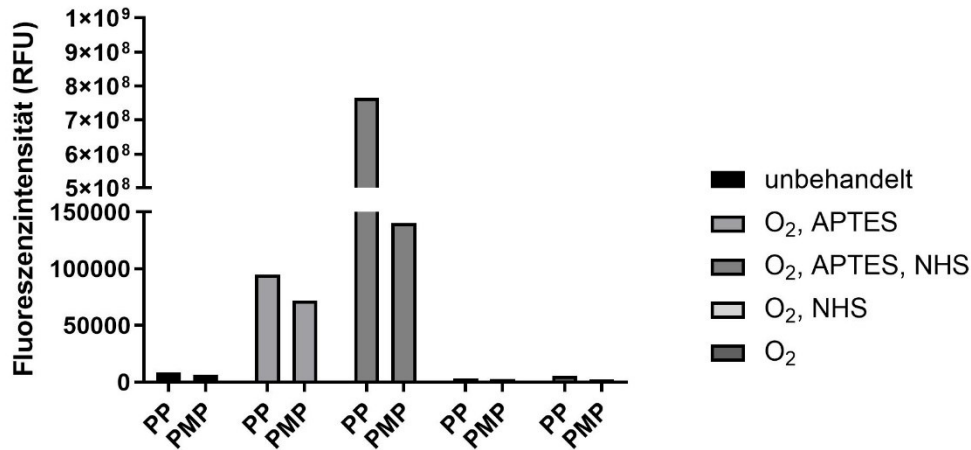


Abbildung 32: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels zweimaliger Spülung mit EtOH – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Je eine unbehandelte PP- und PMP-HFM (*unbehandelt*) dienen als Kontrolle. Je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle Proben mit Cy3-Azid inkubiert und danach zweimalig mit 100% EtOH gewaschen. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt (n=1).

4.2.2.3. Dreimaliges Waschen der HFMs mit 100% EtOH und Inkubation mit 100% EtOH über Nacht nach Cy3-Azid-Inkubation

Die PP- und PMP-HFM wurden mit O₂-Plasma und 8%-APTES-Lösung behandelt und mit einer 2,22 M NHS-Alkin-Ester-Lösung inkubiert. Danach wurden die HFM mit 4 mg/ml Cy3-Azid-Lösung inkubiert und im Anschluss drei Mal mit 100% EtOH gewaschen und über Nacht mit 100% EtOH inkubiert. Am folgenden Tag wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert (Abbildung 33 und 34). Die Werte beider Materialien wurden im Anschluss miteinander verglichen (Abbildung 35).

In Abbildung 33 zeigt sich bei den mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten HFMs (O₂, APTES, NHS) eine höhere Fluoreszenzintensität als bei den restlichen HFMs. Der Unterschied ist lediglich im Vergleich zu den mit O₂-Plasma und NHS-Alkin-Ester (O₂, NHS) behandelten HFMs nicht signifikant. Außerdem konnte die unspezifische Bindung durch einen zusätzlichen Waschvorgang mit 100% EtOH und das Inkubieren der HFMs in 100% EtOH über Nacht weiter reduziert werden. Auch Abbildung 35 zeigt eine Reduktion der unspezifischen Bindung des Cy3-Azids an die PMP-HFMs. Signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten zeigten sich hier lediglich beim Vergleich der mit O₂-Plasma und 8% APTES-Lösung (O₂, APTES) und der mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten HFM (O₂, APTES, NHS) behandelten PMP-HFMs. Die Fluoreszenzintensität der mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester (O₂, APTES, NHS) behandelten PP- und PMP-HFMs nach Cy3-Azid-Inkubation, korreliert mit der Menge der auf der Oberfläche der HFMs generierten Alkin-Gruppen.

Abbildung 35 zeigt den direkten Vergleich der PP- und PMP-HFMs nach Silanisierung mit 8% APTES-Lösung und Nachweis der Generierung der Alkin-Gruppen auf der Oberfläche der HFMs durch Cy3-Azid Inkubation. Im direkten Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der PP- und PMP-HFMs zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Auf der Oberfläche beider Materialien scheinen ähnlich viele Alkin-Gruppen generiert worden zu sein. Dennoch lässt sich die Reduktion der unspezifischen Bindung des Cy3-Azids an die Membranen erkennen. Die Fluoreszenzintensitäten der mit O₂-Plasma, 8%-APTES-Lösung und NHS-Alkin-Ester behandelten PP-HFMs (O₂, APTES, NHS) sind signifikant höher als die der anders behandelten PP-HFMs. Bei den aus PMP bestehenden HFMs lässt sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied erkennen.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 35, dass auf den mit 8% APTES-Lösung funktionalisierten HFMs erfolgreich Alkin-Gruppen generiert werden konnten. Die auf der Oberfläche generierten Alkin-Gruppen, konnten außerdem im Anschluss erfolgreich mit Cy3-Azid gelabelt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Außerdem zeigt Abbildung 35 im Vergleich zu Abbildung 32 die Reduktion der unspezifischen Bindung des Cy3-Azids durch den zusätzlichen

Waschvorgang mit 100% EtOH und der sich anschließenden Inkubation über Nacht.

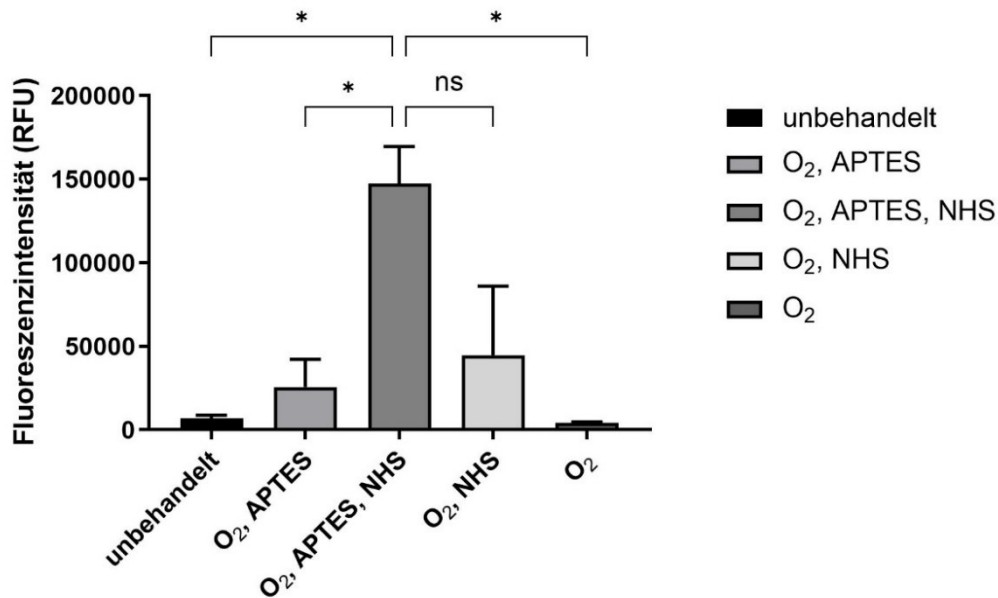


Abbildung 33: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PP-HFM mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels dreimaliger Spülung mit EtOH und Inkubation der HFMs in 100% EtOH über Nacht. Je eine unbehandelte PP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine PP -HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PP-HFM wurde für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle HFM mit Cy3-Azid inkubiert und danach drei Mal mit 100% EtOH gewaschen und über Nacht mit 100% EtOH inkubiert. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels 1way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

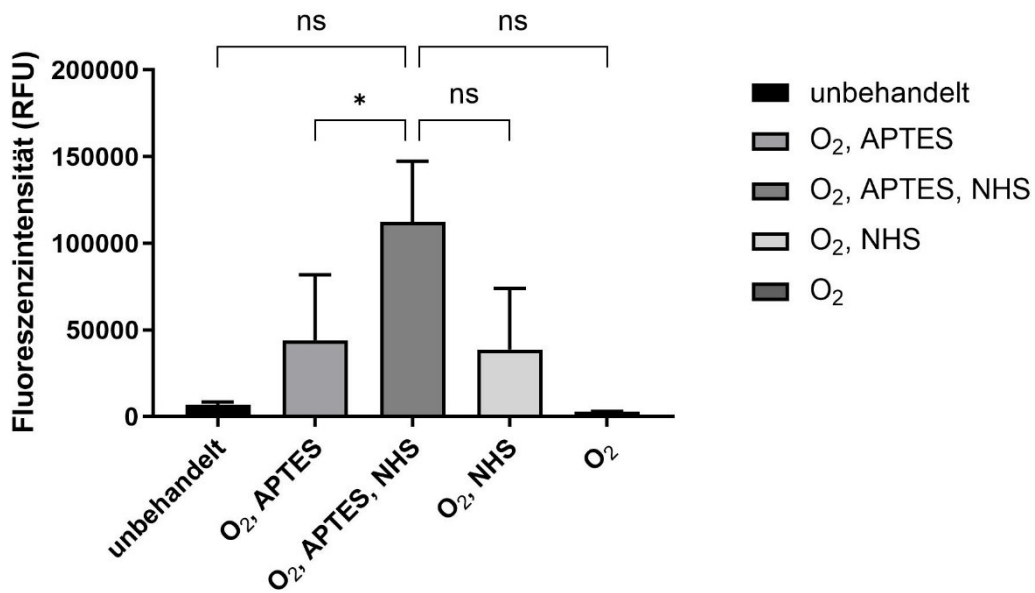


Abbildung 34: Nachweis der Alkin-Gruppen auf PMP-HFM mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels dreimaliger Spülung mit EtOH und Inkubation der HFMs in 100% EtOH über Nacht. Je eine unbehandelte PMP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine PP -HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PMP-HFM wurde für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle HFM mit Cy3-Azid inkubiert und danach drei Mal mit 100% EtOH gewaschen und über Nacht mit 100% EtOH inkubiert. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels 1way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant) ermittelt.

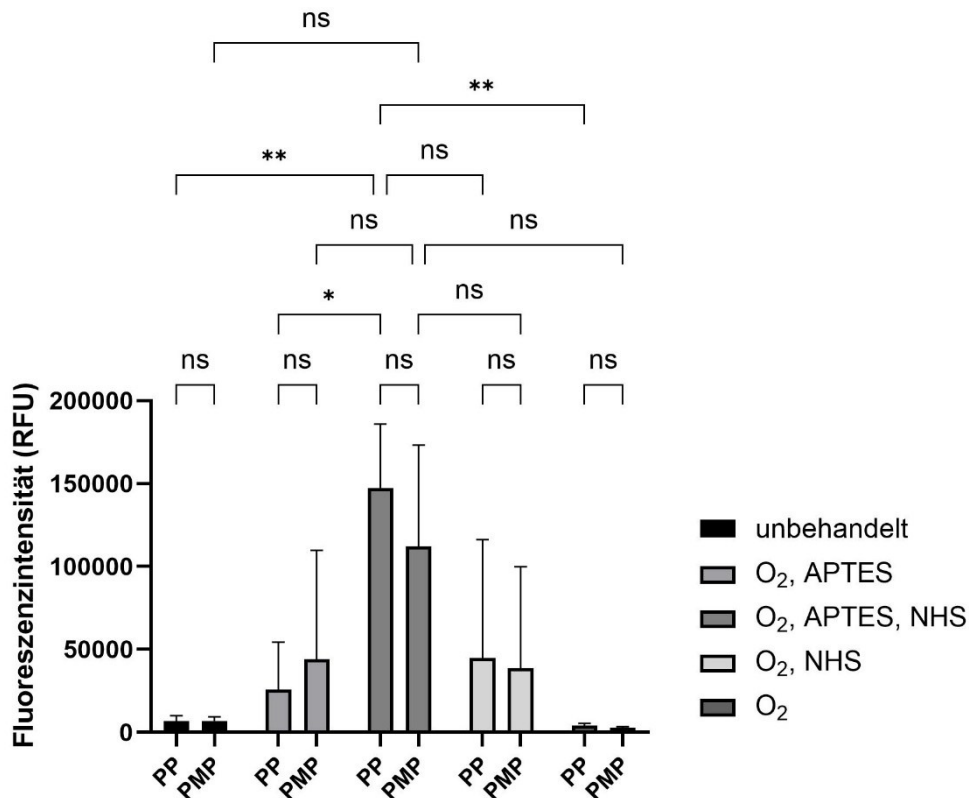


Abbildung 35: Nachweis der Alkin-Gruppen mittels Cy3-Azid-Labeling nach Silanisierung mit 8%-APTES-Lösung und anschließender Desorption mittels dreimaliger Spülung mit 100% EtOH und Inkubation der HFMs mit 100% EtOH über Nacht – PP- und PMP-HFM im Vergleich. Je eine unbehandelte PP- und PMP-HFM (*unbehandelt*) dient als Kontrolle. Je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt (O₂), je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und anschließend mit dem NHS-Alkin-Ester inkubiert (O₂, NHS), je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30 min mit O₂-Plasma behandelt und mit einer 8% APTES-Lösung inkubiert (O₂, APTES 8%) und je eine PP- und PMP-HFM wurde für 30min mit O₂-Plasma behandelt, dann mit einer 8%-APTES-Lösung inkubiert und anschließend mit einer NHS-Alkin-Ester-Lösung behandelt (O₂, APTES, NHS). Im Anschluss wurden alle HFM mit Cy3-Azid inkubiert und danach drei Mal mit 100% EtOH gewaschen und im Anschluss über Nacht mit 100% EtOH inkubiert. Danach wurden die HFM unter dem Fluoreszenzreader analysiert. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt (n=3). Sie wurden statistisch mittels 2way ANOVA ausgewertet, miteinander verglichen und die Signifikanz hieraus anschließend mit dem Bonferroni's multiple comparisons test (ns für nicht signifikant; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) ermittelt.

In Abbildung 36 zeigt sich in der makroskopischen Aufnahme die rötliche Anfärbung der HFM durch das an die Alkin-Gruppen gebundene Cy3-Azid. Bei genauerem Hinschauen ist außerdem die leicht rosa Anfärbung der mit Sauerstoff-Plasma behandelten HFMs (4A und 4B) zu erkennen, welche als unspezifische Bindung gedeutet werden kann.

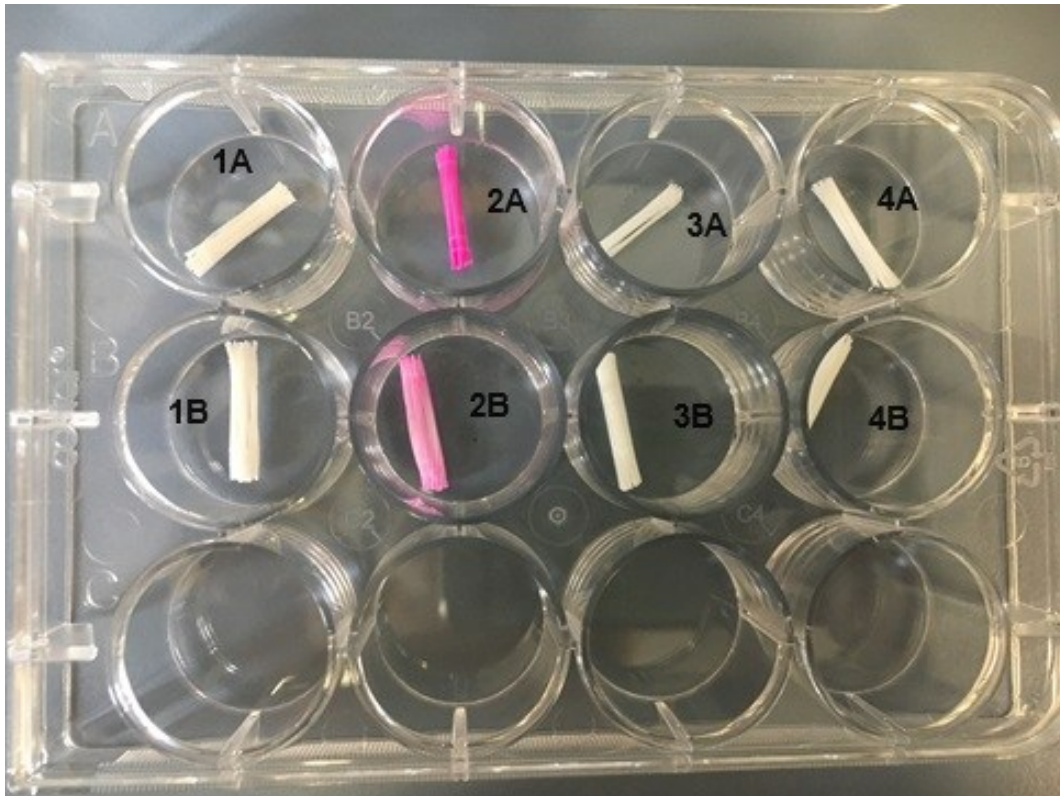


Abbildung 36: Fotografische Aufnahme der unterschiedlich vorbehandelten HFM in der Well Platte für den Nachweis der Alkin-Gruppen auf den HFMs nach Labeling mit Cy3-Azid. Die HFM in Well 1A (PP-HFM) und B (PMP-HFM) wurden je mit Sauerstoff-Plasma und 8% APTES-Lösung und die HFM in 4A (PP-HFM) und B (PMP-HFM) jeweils nur mit Sauerstoff-Plasma vorbehandelt. Die HFM in 4A und 4B dienen als Kontrolle. Die HFM in 2A (PP-HFM) und B (PMP-HFM) wurden je mit O₂-Plasma und 8% APTES-Lösung behandelt und anschließend mit der 2,22 M NHS-Alkin Ester Lösung inkubiert. Die HFM in 3A (PP-HFM) und B (PMP-HFM) wurden lediglich mit O₂-Plasma vorbehandelt und danach mit der 2,22 M NHS-Alkin Ester Lösung inkubiert. Alle HFM wurden im Anschluss mit der 3,9 mM Cy3-Azid-Lösung inkubiert, danach drei Mal mit 100% EtOH gewaschen und über Nacht mit 100% EtOH inkubiert.

Abbildung 37A und 37B zeigt eine Aufnahme der Auflicht-Mikroskopie einer PP-HFM. Die PP-HFM in Abbildung 38B wurde mit O₂-Plasma, 8% APTES-Lösung und dem NHS-Alkin Ester vorbehandelt und dann mit dem VE-Cadherin Antikörper funktionalisiert. Danach wurden sie für 48 h mit HUVECs inkubiert und im Anschluss mit Calcein-AM gefärbt. Die PP-HFM in Abbildung 38A wurde ebenso vorbehandelt, dann jedoch ohne Funktionalisierung mit dem VE-Cadherin Antikörper für 48 h mit HUVECs inkubiert und im Anschluss mit Calcein-AM gefärbt.

Hierfür wurden die PP-HFMs wie oben beschrieben vorbehandelt. Danach wurden 19,99 ml EC-Medium mit 10 µl Calcein-AM in einem Reagenzglas gemischt und dann je 3 ml des Gemisches auf die HFMs gegeben. Die HFMs wurden über 30 min bei Raumtemperatur mit der 0,125 µg/µl Calcein-AM-Lösung inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Analyse der HFMs unter dem Auflicht-Mikroskop mit 3,6-facher Vergrößerung. Das Calcein-AM (AM=Acetoxymethylester) wird in diesem Versuch in das Innere der HUVECs transportiert und die Acetoxymethylestergruppen durch Esterasen abgespalten. Durch die Bindung von Calciumionen durch Calcein innerhalb der HUVECs, entsteht die grüne Fluoreszenz, welche in Abbildung 37B sichtbar wird. Durch die Anfärbung mit Calcein-AM konnten demnach auf der Oberfläche der HFM fixierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Abbildung 37B zeigt eine Bindung der HUVECs an die mit VE-Cadherin Antikörper funktionalisierten HFMs in 6,3-facher Vergrößerung. Die Zellen sind deutlich auf den Lamellen der Membran erkennbar. Im Vergleich sind in Abbildung 37A keine HUVECs auf der HFM zu erkennen. Dieser Umstand erklärt sich durch die fehlende Funktionalisierung mit dem VE-Cadherin Antikörper (Kontrolle). Durch das Fehlen des Antikörpers auf der Oberfläche der HFMs, gab es für die HUVECs keine Bindungsstelle auf der HFM. Demzufolge können keine HUVECs auf der Oberfläche der HFMs nachgewiesen werden. Die Abbildung 37 zeigt eine erfolgreiche Bindung der HUVECs zu den mit O₂-Plasma, 8% APTES-Lösung, NHS-Alkin Ester und VE-Cadherin Antikörper funktionalisierten Membranen.

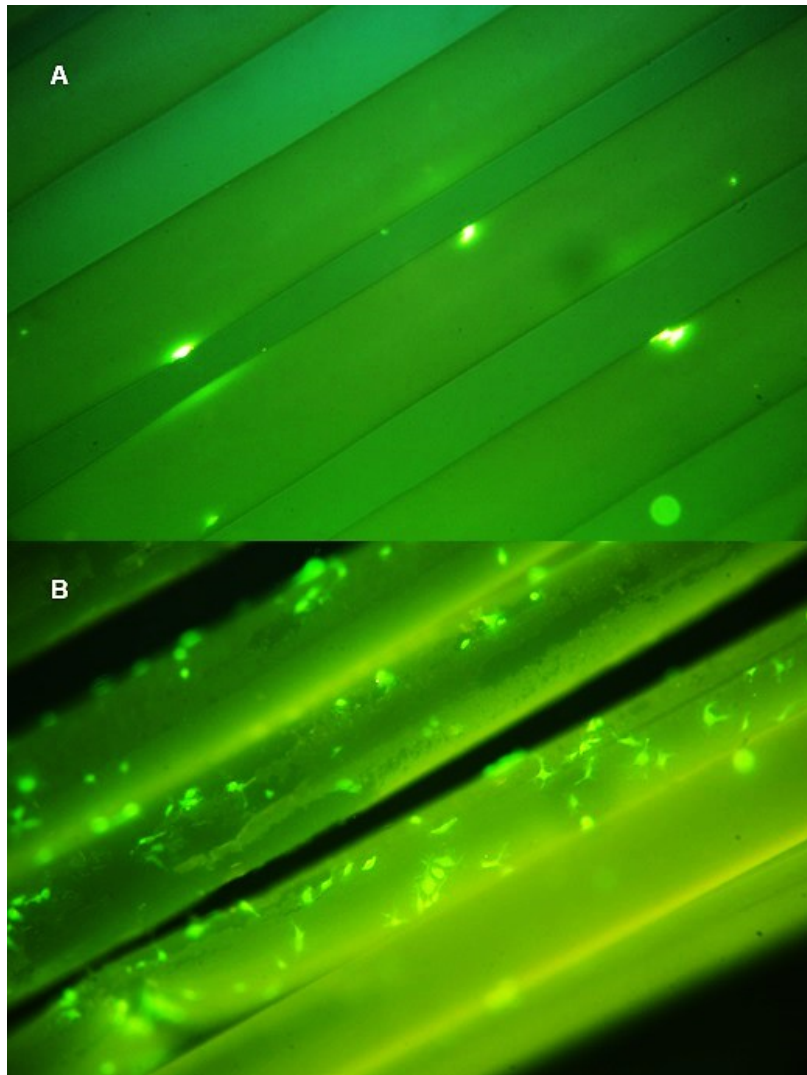


Abbildung 37: Anfärbung der HUVEC auf HFM mit Calcein-AM. Die PP-HFM wurden nach der Vorbehandlung mit O₂-Plasma, 8% APTES-Lösung und dem NHS-Alkin Ester in Bild 37B mit dem VE-Cadherin Antikörper funktionalisiert. In Bild 37A wurde die Funktionalisierung mit dem VE-Cadherin Antikörper ausgelassen. Danach wurden beide PP-HFMs (37A und 37B) für 48 h mit HUVECs inkubiert und im Anschluss mit Calcein-AM gefärbt. Hierfür wurden sie mit je 3 ml eines 0,125 µg/µl Calcein-AM-EC-Medium-Gemisches über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Analyse der HFMs unter dem Fluoreszenzmikroskop, wie hier dargestellt.

5. Diskussion

Der Einsatz eines ECLS, im speziellen die länger andauernde Unterstützung des Patientenkreislaufs durch die ECMO, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Mit Zunahme der Implantationszahlen der ECMO in den letzten Jahren (Abbildung 39), hat die Menge der mit der ECMO-Therapie einhergehenden Komplikationen zugenommen. Die Komplikationen und Problematiken, welche während der ECMO-Therapie auftreten können, stellen eine nicht außer Acht zu lassende Hürde im Rahmen einer Langzeit-Unterstützung eines Patienten dar. Sie führen zu einer hohen 30-Tages-Mortalität mit bis zu fast 50% (Lee et al., 2023) (Abbildung 40). Zurückzuführen sind die meisten Komplikationen auf die schlechte Hämokompatibilität des ECMO-Systems. Die schlechte Hämokompatibilität der Oxygenator-Membran ist mitunter ursächlich für die zeitliche Begrenzung der ECMO-Therapie. Durch eine Endothelialisierung der Oxygenator-Membranen und die damit einhergehende Verbesserung ihrer Hämokompatibilität, könnte der Zeitraum zur Nutzung der ECMO verlängert werden. Eine Beschichtung der Oxygenator-Membran, könnte ihren Einsatz für die Transplantationsmedizin interessant machen (z.B. Lungentransplantation, Ende des Dialyseverfahrens in der Nephrologie). Eine beschichtete Membran könnte in Form von künstlichen Lungen bei final Lungenerkrankten oder als Filtrationsmembran bei Hämofiltration (Dialyse) in der Nephrologie genutzt werden. Vor diesem Hintergrund werden aktuell mehrere Ansätze zur Verbesserung der Hämokompatibilität untersucht. Die drei Hauptansätze sind: 1. Veränderung der physiochemischen Eigenschaften der Oberfläche, um die Interaktionen mit dem Blut des Patienten zu vermindern (z.B. Generierung einer hydrophilen Oberfläche durch Polymerbindung); 2. Bindung eines Antikoagulans zur Oberfläche (z.B. Heparin); 3. Herstellen einer biomimetischen Kontaktfläche auf der Oberfläche (z.B. Endothelialisierung der Oxygenator-Membran) (He et al., 2021). Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz der Endothelialisierung der Oxygenator-Membran, ist in der Forschung aktuell ein vielversprechender Ansatz. Nach aktuellem Wissensstand ist eine direkt Endothelialisierung der Oxygenator-Membran nicht möglich. Daher gibt es verschiedene Strategien zur Funktionalisierung der Oberfläche vor der Endothelialisierung. Diese sind 1.) die

physikalische Umstrukturierung der Oberfläche zur Steuerung des Zellverhaltens auf der Oberfläche (z.B. Sauerstoff-Plasma-Behandlung), darauf folgend 2.) die chemische Behandlung der Oberfläche mit dem Ziel der Erzeugung funktioneller Gruppen (z.B. Silanisierung) und anschließend 3.) die Biofunktionalisierung der HFMs mit Molekülen (Peptiden, Adhäsivproteinen oder Wachstumsfaktoren) (z.B. VE-Cadherin Antikörper) (Pang et al., 2015).

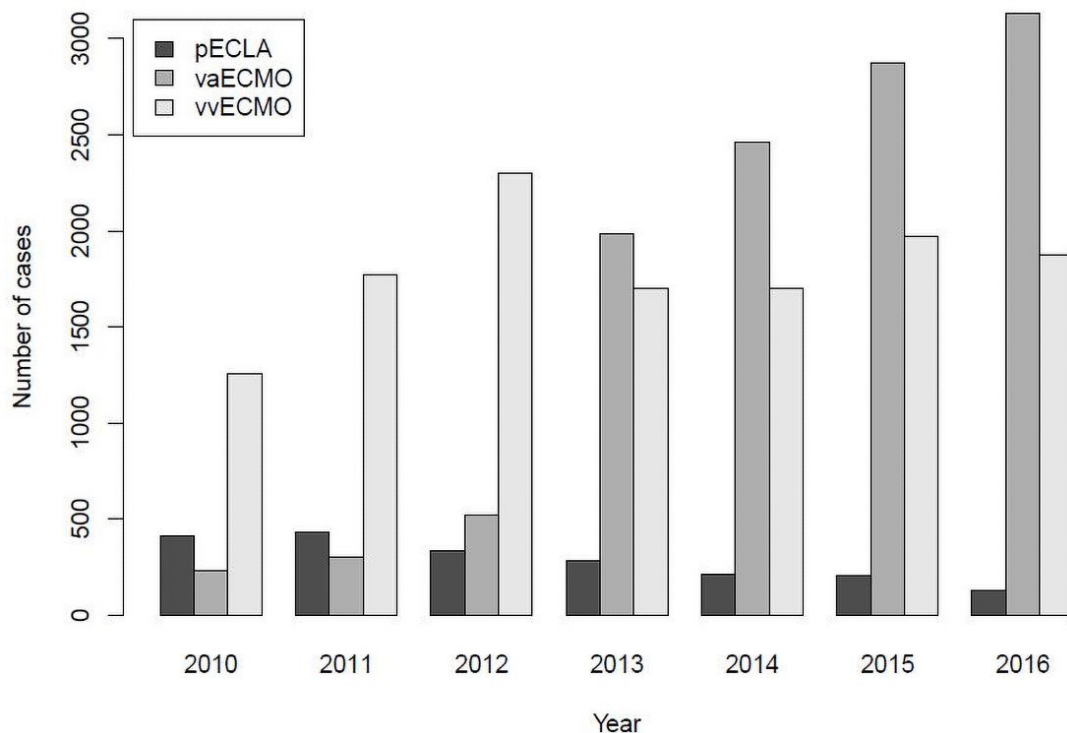


Abbildung 38: Zunahme der implantierten ECMOs von 2010 bis 2016. Dargestellt ist die deutliche Zunahme der VA-ECMO-Implantationen seit 2013, sowie der Abfall der Menge an VV-ECMO-Implantationen nach 2013. Nach 2013 bleibt die Menge der implantierten VV-ECMOs nahezu gleich, wohingegen die Menge der implantierten VA-ECMOs weiter zunimmt. Außerdem zu erkennen ist eine langsame, geringe Abnahme der pECLA-Implantationen seit 2011. *pECLA*: Pumpless extracorporeal lung assist; *vaECMO*: veno-arterielle ECMO; *vvECMO*: veno-venöse ECMO (Bercker et al., 2021).

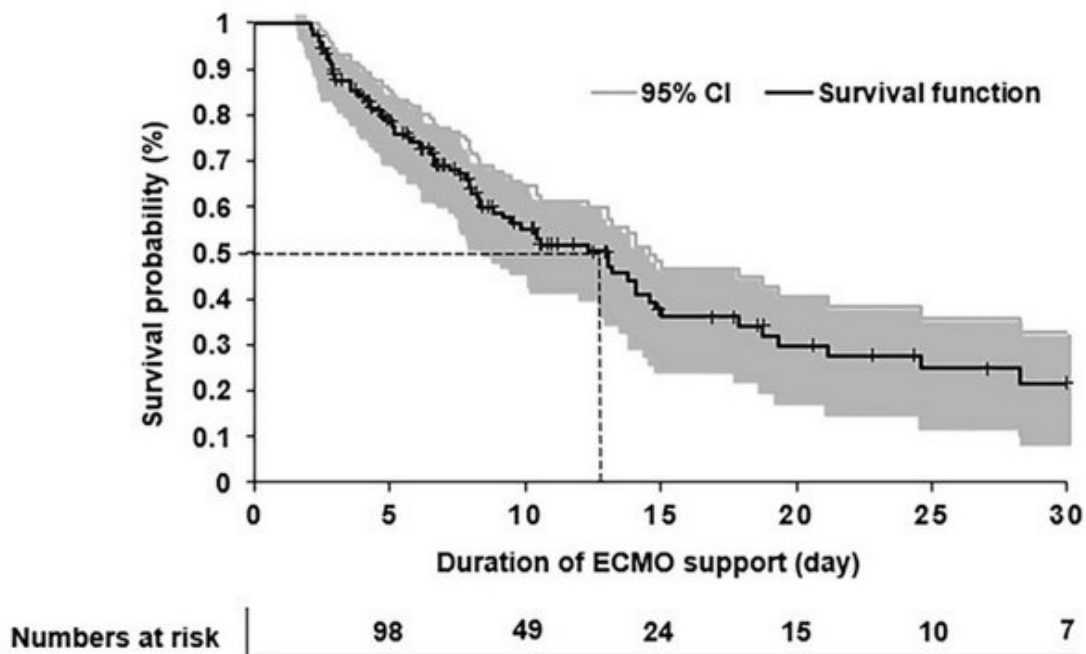


Abbildung 39: Darstellung der 30-Tages Überlebenswahrscheinlichkeit nach Implantation einer ECMO. Zu erkennen ist ein Abfall der Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer ECMO-Behandlung über 30 Tage. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten war hier direkt nach Implantation der ECMO bei 100%, fällt dann langsam und hat ~ 13 Tage nach Implantation erneut einen starken Abfall. 30 Tage nach Implantation liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten dann zwischen 10-35%. Außerdem lässt sich die Zahl der Patienten, die weiterhin mit einer ECMO versorgt sind am unteren Rand erkennen. Hier ist auffällig, dass 15 Tage nach ECMO-Implantation nur noch 24 Patienten, verglichen mit 98 Probanden am 5. Tag nach Implantation, überlebt hatten (Lee et al., 2023).

5.1. Funktionalisierung von PP- und PMP-Hohlfasermembranen

Die Funktionalisierung der PP- und PMP-Hohlfasermembranen dieser Arbeit, hatte als ersten Schritt die Veränderung der physiochemischen Eigenschaften der Oberfläche. Die HFMs wurden hier einer Sauerstoffplasma-Behandlung unterzogen. Eine Behandlung mit Sauerstoff-, Argon-, Stickstoff- und Heliumplasma kann die Oberflächen von Kunststoffen verändern, ohne ihre Kerneigenschaften zu modifizieren. Nach einer Behandlung sind Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobie, chemische Eigenschaften und Rauheit verändert (Jaleh et al., 2010). Durch die Behandlung mit Sauerstoff-Plasma bei niedrigem Druck, können Oberflächen gereinigt werden. Dieses

Verfahren wird heute in der Industrie vermehrt zur Reinigung von Kunststoffen, Keramik und Glas verwendet. Durch die Behandlung mit Sauerstoffplasma werden organische Verschmutzungen oder Schadstoffe von der Oberfläche entfernt. Die Oberfläche kann durch eine Behandlung nicht nur gereinigt, sondern auch chemikalisch modifiziert werden. Mittels Sauerstoffplasma-Behandlung können durch Reaktionen auf der Oberfläche funktionelle Gruppen generiert werden. Zu diesen Gruppen gehören Ether- (-C-O-C-), Hydroxyl- (-COH), Carbonyl- (-CHO), Ester- (-COOR) und Carboxylgruppen (COOH) (Huang et al., 2016). Durch die Sauerstoffplasma-Behandlung der Oberflächen werden C-C- und C-H-Bindungen aufgebrochen, sodass der Kontaktwinkel zwischen Flüssigkeiten und der Membran kleiner wird und ihre Hydrophilie erhöht wird. Schon in einer Arbeit von Yu et al. konnte gezeigt werden, dass sich der Kontaktwinkel von Wasser zur Oberfläche der Membran nach der Behandlung mit Sauerstoffplasma von 128,5° auf 35° gesenkt hat (Yu et al., 2008). Genutzt wurde hier ein Radio-Frequenz Generator mit 13.56 MHz und eine Energie von 30 W. Die Kollegen stellten dar, dass trotz der gering angelegten Energie von nur 30 W die Hydrophilie der Oberfläche der HFMs durch eine Sauerstoffplasma-Behandlung deutlich erhöht werden konnte. Neben der von Yu et al. gibt es weitere Studien zur Funktionalisierung von PP-HFMs mit Sauerstoffplasma (Ozdemir et al., 2002, Huang et al., 2016). Die in diesen Arbeiten angelegte Energie am Plasma-Reaktor, war im Vergleich zu der in dieser Arbeit genutzten Energie von 100 W, nahezu immer unter 100 W (Basarir et al., 2005, Bae et al., 2001, Jaleh et al., 2010). Die mittlere angelegte Energie bei allen Studien betrug 50 W. In einer Arbeit von Ozdemir et al. wurde der direkte Vergleich zwischen der Sauerstoffplasma-Behandlung von Membranen aus Polyurethan (PU) mit 10 W und 100 W hergestellt (Ozdemir et al., 2002). Der Vergleich zeigte, dass auch hier die Hydrophilie der Oberfläche des PU nach einer Behandlung mit 100 W deutlich erhöht werden konnte. Erzielt werden konnte dies durch die stärkere Reduktion des Wasser-Membran-Kontaktwinkels. Die Behandlungsdauer mit Sauerstoffplasma variierte in den einzelnen Studien. Wo die Kollegen Bae et al und Basarir et al (Basarir et al., 2005, Bae et al., 2001) 1-40 min und 10-80 min Behandlungsdauer hatten, gaben die Kollegen Jaleh et al und Yu et al (Yu et al.,

2008, Jaleh et al., 2010) je 1-5 min und 1-8 min Behandlungsdauer an. In dieser Arbeit wurden die HFMs 30 min unter 100 W mit Sauerstoffplasma behandelt. So konnten wir OH-Gruppen auf der Oberfläche generieren, welche im folgenden Schritt, der Silanisierung, als funktionelle Gruppen fungierten. Die Reaktion der Silanisierung erfolgte über die Generierung einer kovalenten Bindung von APTES an die Hydroxylgruppen. Dadurch konnten auf der Oberfläche der HFMs Aminogruppen generiert werden. APTES wurde in Form von Lösungen mit den HFMs zur Reaktion gebracht. Das aktuell hauptsächlich verwendete Lösungsmittel zur Herstellung einer APTES-Lösung ist Toluol (Vashist et al., 2014). Schon Sarkar et al. verwendeten in einer Arbeit 10%, 20%, 50% und 100% APTES-Lösungen zur Silanisierung von Silikon-Membranen (Sarkar and Daniels-Race, 2013). Auch Vashist et al. verfassten 2014 einen Bericht über die Silanisierung zur Funktionalisierung und die danach mögliche Immobilisierung und Biofunktionalisierung von Oberflächen (Vashist et al., 2014). Die Kollegen beschrieben, dass eine Konzentration der APTES-Lösung von >10% zu einer Bildung von Oligo- und Polymeren führe, wohingegen die Konzentration der APTES-Lösung von <0,4% eine einzelne Schicht Amino-Gruppen auf der zu behandelnden Oberfläche generiere. Howarter et al. untersuchten ebenfalls die Silanisierung auf Silikon-Membranen mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen (1%, 10%, 33%) und Reaktionszeit (1 h, 24 h, 72 h) (Howarter and Youngblood, 2006). Howarter et al. behandelten die Membranen in ihrer Arbeit unterschiedlich lange mit unterschiedlich konzentrierten APTES-Lösungen und untersuchten die Membranen danach mit einem Rasterkraftmikroskop, um die Dichte der funktionellen Gruppen auf den Membranen sichtbar zu machen und deren Rauheit zu bestimmen. Hierbei konnte zusätzlich festgestellt werden, dass mit Zunahme der Reaktionszeit das Kohlenstoff-Stickstoffverhältnis (C/N ratio) auf den zu behandelnden Membranen und die Dicke der funktionalen Schicht insgesamt zunimmt. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von APTES-Lösungen verwendet: 5%- und 8%-APTES-Lösung. Die Reaktionszeit betrug immer 24 h. In unseren Versuchen zeigte sich, dass nach einer Funktionalisierung der HFMs mit 8% APTES-Lösung mehr Aminogruppen auf den Oberflächen generiert werden konnten. Dies zeigte sich

durch die sich anschließende Färbung der Aminogruppen auf den Oberflächen mit Methylorange. Die Ergebnisse in dieser Arbeit decken sich also mit den Untersuchungen mit denen von Howarter et al. (Howarter and Youngblood, 2006) und Vashist et al. (Vashist et al., 2014).

Die im letzten Schritt generierten Aminogruppen, ermöglichten im folgenden Schritt die Generierung von Alkin-Gruppen durch Konjugation eines N-Hydroxysuccinimid-Alkin-Esters (NHS-Alkin Ester) zur Oberfläche der HFMs. Der NHS-Alkin Ester ist ein aus N-Hydroxysuccinimid hergestelltes, Amin-reaktives Vernetzungsmittel. Die Carboxylsäure des NHS-Alkin Esters reagiert mit den auf der Oberfläche der HFMs generierten Amino-Gruppen und wird so zur Oberfläche der HFMs konjugiert. Schon Patil et al. verwendeten 2013 einen NHS-Ester zur Markierung von Proteinen und Peptiden durch die Konjugation an deren Aminogruppen (Patil et al., 2013). Die Kollegen untersuchten das Labeling von mit Aminogruppen funktionalisierten Nanopartikeln mit einem NHS-Ester. Hierfür nutzten sie die in einer Arbeit von Qian et al. mit Aminogruppen gelabelten Proteine/Peptide (Qian et al., 2011). Zur Generierung der Aminogruppen verwendeten Patil et al. ebenfalls APTES. Die Konzentration der NHS-DMSO-Lösung der Kollegen war allerdings erheblich niedriger, als die Konzentration der in dieser Arbeit verwendeten NHS-Alkin Ester Lösung. Wir verwendeten eine 2,22 M NHS-Alkin Ester Lösung, während die Kollegen eine 0,247 M NHS Ester Lösung verwendeten. Als Lösungsmittel verwendeten die Kollegen ebenfalls Dimethylsulfoxid (DMSO) und das Waschen der Nanopartikel erfolgte ebenfalls mit Ethanol. Die Reaktionszeit der Kollegen war ebenfalls identisch mit der in dieser Arbeit angewandten Reaktionszeit von 30 min. Auch Perreault et al. verwendeten 2013 in ihrer Arbeit mit NHS veresterte Polyamid- und Graphen-Sauerstoff-Schichten, um beide Schichten in einem weiteren Schritt durch ein Ethyldiamin-Vernetzungsmittel in einer Cycloadditionsreaktion zu verbinden (Perreault et al., 2014). Die Verbindung der beiden Schichten wurde danach mit einem Rasterelektronenmikroskop analysiert. In unserer Arbeit wurde die Generierung von Alkin-Gruppen auf den HFMs mittels Labeling mit Cy3-Azid nachgewiesen. Das für das Labeling verwendete Cy3-Azid gehört zu den fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen und reagiert mit endständigen Alkinen in

einer Kupfer(I)-katalysierten Azid/Alkin Cycloaddition (CuAAC) (AxisPharm, o.J.). Die CuAAC gehört zu den Huisgen-Reaktionen oder Huisgen-Cycloadditionen. Schon 1961 veröffentlichte Rolf Huisgen einen Artikel über die Reaktion, welche die Synthese von 1,2,3-Triazolen zur Folge hat (Huisgen, 1961). Die Reaktion ist eine Form der 1,3-dipolaren Cycloaddition, bei welcher ein Stoff mit der Eigenschaft eines 1,3-Dipol (z.B. ein Azid) mit einem anderen Stoff mit der Eigenschaft eines Dipolarophils (z.B. ein Alkin) reagiert. Dadurch entsteht ein Triazol-Ring. Nicht-katalysierten Cycloadditionen benötigen Energie in Form von hohen Temperaturen um ablaufen zu können. Die Kupfer(I)-katalysierte Azid/Alkin Cycloaddition (CuAAC) kann schon bei Raumtemperatur erfolgen und fällt unter das Konzept der sogenannten „Click-Chemie“. Die CuAAC wurde 2001 entwickelt und erfolgt mit wenig bis keinen Zusatzstoffen. Zusätzlich kann sie auch unter wässrigen Bedingungen stattfinden (Huang et al., 2016). Das heute am häufigsten genutzte Lösungsmittel für die Reaktion ist Kupfersulfat (CuSO_4). Der Nachteil der Kupfer(I)-katalysierten Reaktion, ist die zelltoxische Eigenschaft der Oxidationsprodukte des Kupfers. Schon Agard et al. beschrieben 2004 die Toxizität in Hinblick auf Bakterien und Säugetier-Zellen (Agard et al., 2004). Auch Meldal et al. beschrieben in ihrer Arbeit die zelltoxische Eigenschaft der Oxidationsprodukte des Kupfers (Meldal and Diness, 2020). In dieser Arbeit wurde die Azid/Alkin Cycloaddition Kupfer(I)-katalysiert durchgeführt. Drei Reaktionen wurden so durchgeführt: der Nachweis der Alkin-Gruppen auf den Oberflächen der HFMs mit Cy3-Azid, die Bindung des VE-Cadherin Antikörpers zur funktionalisierten Oberfläche der HFMs und der Nachweis der Bindung des VE-Cadherin Antikörpers an die HFMs. In diesen Reaktionen wurde zusätzlich THPTA und Aminoguanidin verwendet. THPTA ist ein Triazol-Ligand und Aminoguanidin ist ein Derivat des Guanidins. Beide Stoffe stabilisieren den Oxidationsstatus des Kupfers und verringern so dessen Abbau (Pickens et al., 2018, Meldal and Diness, 2020). Nach der Bindung des VE-Cadherin Antikörpers zur Oberfläche der HFMs wurden diese jeweils mit Ampuwa und PBS gewaschen um die mögliche zelltoxische Wirkung der Oxidationsprodukte des Kupfers für die folgenden Reaktionen zu minimieren.

Durch die Anwendung der Click-Chemie, konnte das zur Oberfläche konjugierte NHS-Alkin sichtbar gemacht werden. Es gelang also der Nachweis von erfolgreich zur Oberfläche der HFMs konjugierten Alkin-Gruppen mittels Labeling durch Cy3-Azid. So konnte die erfolgreiche Funktionalisierung der HFMs nachgewiesen werden.

5.2. Biofunktionalisierung der funktionalisierten PP- und PMP Hohlfasermembranen

Zur Vorbereitung der Biofunktionalisierung der HFMs, wurde im nächsten Schritt das Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers (CD144) durchgeführt. Für das Labeling wurde ein von Thermo Fisher geliefertes Site-Specific Antibody Labeling Kit verwendet. Die im Kit enthaltenen Stoffe, ermöglichen die Azid-Modifikation eines Antikörpers mittels SiteClick-Reaktion. Das Modifikations-Kit wurde auch von den Kollegen Gai et al. in ihrer Arbeit zur Modifikation von Anti-Maus CD11c Antikörpern zur Immobilisierung dieser auf Liposom-Oberflächen genutzt (Gai et al., 2020). In ihrer Arbeit modifizierten die Kollegen zuerst Aminogruppen-tragende Liposome, indem sie einen Dibenzocyclooctin (DBCO)-PEG₄-NHS Ester zu den sich auf der Oberfläche der Liposomen befindenden Aminogruppen konjugierten. Wie in dieser Arbeit, nutzten die Kollegen hier die Aminogruppen als Reaktionspartner, um Alkin-Gruppen auf der Oberfläche der Liposome zu generieren. Im folgenden Schritt nutzten die Kollegen allerdings die kupferfreie Azid/Alkin Cycloaddition (SPAAC). Wir verwendeten in dieser Arbeit die CuAAC. In der SPAAC konjugierten die Kollegen den zuvor mit dem Site-Specific Antibody Labeling Kit Azid-gelabelten anti-Maus CD11c Antikörper an die auf der Oberfläche der Liposome generierten Alkin-Gruppen zu binden (Gai et al., 2020). Der mit dem Kit gelabelte Antikörper war in dieser Arbeit der monoklonale IgG VE-Cadherin Antikörper. VE-Cadherin ist Bestandteil der Zellstruktur der Endothelzellen. Es ist ein Transmembranprotein, welches durch die Bindung zu Transmembranproteinen anderer Zellen zur Integrität des Endothels beiträgt. Beim Labeling des VE-Cadherin Antikörpers (CD144), wird durch das Enzym β -1,4-Galactosyltransferase (GalT) ein Azid-Rest (UDP-GalNAz) zur Fc-Domäne des GlcNAc-Endes konjugiert. Antikörper können außerdem noch mit anderen

Substanzen an ihren Seitenketten gelabelt werden. Die Kollegen Berg und Fishman et al. zeigten in einem Übersichtsartikel die Möglichkeiten für das über das Labeling von Antikörpern (Berg and Fishman, 2020). Berg und Fishman erwähnten hier auch die Funktion und Bedeutung von NHS-Estern als Amin-reaktiver Cross-linker (Quervernetzungsmittel) für Antikörper, sowie das Labeling von Antikörpern mit Fluorophoren. Beide Methoden werden in dieser Arbeit angewendet.

Zur weiteren Biofunktionalisierung wurde der Azid-gelabelte VE-Cadherin Antikörper an die zur Oberfläche der HFM konjugierte Alkin-Gruppe gebunden. Für diesen und die folgenden Schritte wurden aufgrund der höheren Dichte an Amino-Gruppen auf den Oberflächen nach Silanisierung mit 8% APTES-Lösung, nur noch mit 8% APTES-Lösung vorbehandelte HFM genutzt. Die Konjugation des gelabelten VE-Cadherin Antikörpers erfolgte erneut mittels CuAAC. In dieser Reaktion reagierte die zur Oberfläche der HFMs konjugierte Alkin-Gruppe mit dem Azid-Ende der Seitenkette des VE-Cadherin Antikörpers. Auf dieselbe Weise konjugierten schon Finetti et al. einen modifizierten anti-Maus IgG Antikörper zu der mit APTES und Azido-PEG₈-NHS Ester funktionalisierten Oberfläche von Gold Nanopartikeln (Finetti et al., 2016). Wie in dieser Arbeit verwendeten die Kollegen zur Konjugation des Antikörpers zur Oberfläche der Nanopartikel CuSO₄, THPTA und Ascorbinsäure. Die Konzentrationen aller Stoffe in den Experimenten waren jedoch deutlich geringer. Zusätzlich verwendeten wir in dieser Arbeit Aminoguanidin, welches die konstitutive und induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase inhibiert. Im Anschluss analysierten Finetti et al. die Konjugation der Antikörper zur Oberfläche der Nanopartikel mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Die Kollegen kamen hier zu dem Schluss, dass eine Kontrolle des Kontakts des Antikörpers zur Oberfläche der Nanopartikel trotz der fehlenden Regioselektivität der Reaktion des Azido-PEG₈-NHS Esters auf der funktionalisierten Oberfläche der Nanopartikel weiterhin gegeben ist. Die Kontrolle ergebe sich hier aus der kontrollierten Azid-Kopplung an die mit den Alkin-Gruppen funktionalisierte Oberfläche der Nanopartikel. Durch die Bindung von nur einer von vier Azid-Gruppen des Antikörpers an die

Oberfläche, blieben die anderen Stellen zur Konjugation weiterer Antigene frei (Finetti et al., 2016).

Die Konjugation des Azid-gelabelten VE-Cadherin Antikörpers zu den HFMs, wiesen wir im folgenden Versuch mittels Markierung mit einem Sekundärantikörper (Ratte anti-Maus IgG) nach. Die fluoreszierende Eigenschaft des hier genutzten Sekundärantikörpers, macht eine Analyse dessen auf den HFMs mittels Fluoreszenz-Reader möglich. Die Kollegen Zhao et al. wiesen 2021 auch die Markierung eines VE-Cadherin Antikörpers mittels Sekundärantikörper auf HUVECs nach (Zhao et al., 2021).

5.3. Endothelialisierung von PP- und PMP-Hohlfasermembranen

Die Endothelialisierung gewinnt in der Forschung immer mehr an Bedeutung. So gibt es aktuell verschiedene Ansätze HFMs zu funktionalisieren, zu biofunktionalisieren und zu endothelialisieren.

Ontaneda et al. publizierten 2018 einen Bericht über die unterschiedlichen Ansätze zu Oberflächenmodifizierungen in Oxygenator-Kreisläufen. Darin beschrieben die Kollegen die auch in dieser Arbeit untersuchte *in-vitro* Endothelialisierung von biomimetischen Oberflächen auf Transplantaten oder Stents durch autologe Endothelzellen (Ontaneda and Annich, 2018). In diesem Zusammenhang wird die Bedeutung der Biofunktionalisierung durch Moleküle der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin) vor der Endothelialisierung erwähnt. Eine Funktionalisierung von HFMs mit Fibronectin und anschließender Endothelialisierung durch Endothelzellen (Pflaum et al., 2022) wird aktuell untersucht. Fibronectin ist ein Glykoprotein, welches als extrazelluläres Matrixprotein mit anderen Plasmaproteinen in Kontakt steht. Außerdem kommuniziert es als lösliches Glykoprotein im Plasma mit den Integrinen (Transmembranproteinen) anderer Zellen. Fibronectin kann einerseits als Matrixprotein die Signalkaskade zur Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation im verletzten Endothel unterstützen und so die Thrombusformation fördern, andererseits kann es Endothelzellen durch die Interaktion mit einem Integrin aktivieren. Diese Aktivierung löst wiederum eine Endothelzellproliferation und Formation neuer Endothelzellketten aus (Davis and

Senger, 2005). Die Kollegen Pflaum et al. machten sich letztere Eigenschaft von Fibronectin zu Nutze. In ihrer Arbeit funktionalisierten die Kollegen PMP-HFMs mit Fibronectin, indem sie sie über Nacht mit einer Lösung aus Fibronectin und Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) inkubierten. Um die Beschichtung mit Fibronectin am drauffolgenden Tag sichtbar zu machen, wurden die HFMs mit 5-Carboxytetramethylrhodamin (5-TAMRA) gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Pflaum et al., 2022). Die Analyse zeigte eine kontinuierliche, gleichmäßige Beschichtung der HFMs mit Fibronectin. Der größte Unterschied zu der in dieser Arbeit genutzten Funktionalisierung, ist der singuläre Schritt mittels einfacher Beschichtung mit Fibronectin. Die physikalische Umstrukturierung der Oberfläche der HFMs oder die chemische Behandlung zur Generierung funktioneller Gruppen auf der Oberfläche der HFMs wurde nicht durchgeführt. Zur anschließenden Endothelialisierung der HFMs wurden in der Arbeit der Kollegen aus humanem Nabelschnurblut abgeleitete Endothelzellen (*engl.*: human cord blood-derived endothelial cells, hCB-ECs) genutzt. hCB-ECs werden aus mononuklearen Zellen des Nabelschnurblutes abgeleitet und differenzieren sich in Endothelzellen (Hess et al., 2010). Von ihnen existieren sogenannte „late outgrowth“ und „early outgrowth“ Nabelschnurblut EPCs. Die „late outgrowth“ Nabelschnurblut EPCs haben im Vergleich ein größeres Potenzial zur Proliferation als die „early outgrowth“ Nabelschnurblut EPCs (Cao et al., 2011). Die in dieser Arbeit genutzten HUVECs unterscheiden sich nur geringfügig von den hCB-ECs, welche von den Kollegen genutzt wurden. Unterschiedlich ist der Differenzierungsstatus der Zellen: Der Vorteil, der in dieser Arbeit genutzten HUVECs, ist die hohe Fähigkeit zur Proliferation. Außerdem stammen die HUVECs direkt aus dem Endothel der Nabelschnurvene (Olmer et al., 2018). Die hCB-ECs wurden in der Arbeit der Kollegen kultiviert und danach auf die mit Fibronectin beschichteten HFMs gegeben. Die Inkubation mit den hCB-ECs erfolgte dann für 4 h rotierend und danach für 48 h statisch. Die quantitative und qualitative Analyse der Endothelzellschicht erfolgte durch Ablösung und Zählen der Zellen, sowie durch Anfärben der Zellen auf den Membranen und anschließender Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop (Pflaum et al., 2022).

In der Analyse zeigte sich eine homogene Schicht aus Endothelzellen auf den HFMs. Trotz der Vorbehandlung der Membranen mit nur einem Schritt, bestehend aus der Beschichtung mit Fibronectin, konnten die Kollegen eine homogene Endothelzellschicht auf den HFMs generieren. Das von Ontaneda et al. in ihrem Bericht beschriebene Problem der diskontinuierlichen Endothelzellschicht trat in der Arbeit der Kollegen nicht auf (Ontaneda and Annich, 2018). Dennoch bleibt die schon von Ontaneda gestellte Frage, ob die Endothelzellschicht auch unter kontinuierlichem Fluss und den Scherkräften des Blutes Bestand hätte.

Ontaneda et al. erwähnen in ihrer Rezension außerdem die *in-vivo* induzierte Endothelialisierung (Ontaneda and Annich, 2018), welche unter anderem im Bereich des Tissue Engineering (*engl.*: Gewebezüchtung, Forschung zur Herstellung biologischer Gewebe durch die kontrollierte Kultivierung von Zellen) und bei der Endothelialisierung von künstlichen Oberflächen wie z.B. vaskulären Stents oder Implantaten (z.B. künstlichen Klappen, vaskuläre Grafts) zur Verbesserung der Hämokompatibilität zum Einsatz kommt

Für die Endothelialisierung genutzte Zellen auf diesem Gebiet sind unter anderem EPCs. EPCs sind mononukleare Zellen, welche sich von den Stammzellen des Knochenmarks ableiten. Sie zirkulieren in der peripheren Blutbahn und haben die Eigenschaft in hämatopoetische und nicht-hämatopoetische EPCs zu differenzieren (Asahara et al., 2011). Die hämatopoetischen EPCs stellen eine Subpopulation der hämatopoetischen Stammzellen dar. Sie sind in der Lage zu den betroffenen Stellen zu migrieren, um dort zu Endothelzellen zu differenzieren und damit die Neovaskularisation zu induzieren (Asahara et al., 2011). Die Kollegen De Visscher et al. publizierten zu diesem Ansatz eine Arbeit (De Visscher et al., 2012). In dieser Arbeit funktionalisierten die Kollegen zwei unterschiedliche vaskuläre, mit Kollagen vorbeschichtete Transplantate (Gelsoft™ [Vaskutech Ltd.], Polymaille®C [Pérouse Laboratoires]) mit einem Diameter von 6 mm und einer Länge von 5 cm mit Fibronectin und biofunktionalisierten sie danach mit SDF-1 α . SDF-1 α ist ein körpereigener Botenstoff aus der Gruppe der CXC-Chemokine, dessen Hauptaufgabe die Steuerung der Migration von hämatopoetischen Stammzellen

ist. Fibronectin präsentiert den Zellen SDF-1 α und erleichtert damit die Bindung an den SDF-1 α -Rezeptor der Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h analysierten die Kollegen die Fibronectin-SDF-1 α -Funktionalisierung mit einem ELISA. Im Anschluss wurden die Transplantate für je 24 h, 3 Tage oder 3 Monate als interpositionelles Implantat in die Arteria carotis von Schafen implantiert. Als Kontrolle dienten Abschnitte der nativen Arteria carotis der Schafe. Nach Implantation erhielten die Schafe für 3 Tage Enoxaparin um eine frühe Thrombosierung der Implantate zu verhindern. Nach den oben angegebenen Zeiträumen wurden die Implantate explantiert. Auf den nach 24 h und 3 Tagen explantierten Implantaten, wurde die Bindung von primitiven Zellen mittels immunhistochemischer Anfärbung mit zwei Stammzellenmarkern CD34 und CD117 und Sichtbarmachung mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) analysiert. Die Bildung einer Neointima wurde danach mittels Anfärbung mit Hematoxylin & Eosin (H&E), sowie immunhistochemischer Anfärbung sichtbar gemacht. Außerdem wurde die auf den Endothelzellen exprimierte Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) mittels Antikörper, und damit die erfolgreiche Endothelialisierung, sichtbar gemacht. Zusätzlich bewerteten die Kollegen mittels mikroskopischer Analyse, ob thrombotische Ablagerungen in den H&E-angefärbten Implantaten vorhanden waren. Die Analyse aller Daten der Arbeit der Kollegen zeigte, dass die Funktionalisierung mit Fibronectin-SDF-1 α die Besiedelung der Implantate mit Endothelzellen signifikant erhöht hat. Vor allem der Ein- und Ausflusstrakt aller Implantate hatten ein nahezu kontinuierliches Endothel. Primitive Zellen konnten ebenfalls am Ein- und Ausflusstrakt der Implantate nachgewiesen werden. Im mittleren Teil der Implantate konnten signifikant weniger primitive und Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Analyse des thrombotischen Materials in den Implantaten ergab den Nachweis einer Thrombozyten-Fibrin-Schicht allein im mittleren Teil der Implantate. Im Ein- und Ausflusstrakt der Implantate ließ sich kein thrombotisches Material nachweisen. Somit konnten die Kollegen eine Endothelialisierung der mit Fibronectin-SDF-1 α -beschichteten Implantate nachweisen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung von thrombotischen Materials durch die Beschichtung reduziert werden konnte (De Visscher et al., 2012). Wie die

Kollegen Pflaum et al., haben auch De Visscher et al. ihre Implantate nur mit Kollagen, Fibronectin und SDF-1 α beschichtet, ohne eine physikalische oder biochemische Veränderung der Oberfläche der Implantate vorzunehmen. Dennoch könnte man die Bindung des Proteins SDF-1 α als abschließenden Schritt der Biofunktionalisierung mit der Immobilisierung des VE-Cadherin Antikörpers auf der Oberfläche der HFMs in dieser Arbeit vergleichen. De Visscher et al. nutzen das Homing-Verhalten der EPCs für die Endothelialisierung der Implantate. Im Vergleich dazu wurden in unserer Arbeit die Expression von VE-Cadherin als Transmembranprotein der HUVECs genutzt, um dieses mittels Antikörper an die Oberflächen der HFMs zu binden. Eine aktive Mobilisierung, Migration und Differenzierung der Zellen am Ort der Neovaskularisation waren in dieser Arbeit nicht notwendig. Ein weiterer Unterschied ist die Testung des neu gebildeten Endothels *in-vivo* unter Einfluss der Scherkräfte durch den Blutfluss der Schafe in der Arbeit der Kollegen. In dieser Arbeit wurden äußere Einflüsse durch den *in-vitro* Aufbau der Arbeit nicht getestet.

Mit einem ähnlichen Ansatz untersuchten Lee et al. die Endothelialisierung von medikamentenfreisetzenden Stents (DES, *engl.*: drug eluting stent) mit HUVECs und EPCs mittels Immobilisierung von VE-Cadherin Antikörpern auf deren Oberfläche (Lee et al., 2012). Genutzt wurden hier Stents aus Metall mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Länge von 18 mm. Zur Funktionalisierung wurden diese elektropoliert (Generierung von Hydroxylgruppen), mit der sogenannten Piranhalösung gereinigt und mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GPTS) silanisiert. Im Anschluss wurde zur Änderung der Hydrophilie der Oberfläche der Stents Polyethylenglycol (PEG) zur silanisierten Oberfläche konjugiert. Durch die darauffolgende Succinylierung der PEG-Enden, wurden die endständigen Aminogruppen in Carboxylgruppen umgewandelt, welche im folgenden Schritt mittels N-Hydroxysuccinimid aktiviert wurden. Dadurch wurden auf der Oberfläche der Stents Alkin-Gruppen generiert. Im Anschluss wurde die Oberfläche der funktionalisierten Stents mit VE-Cadherin Antikörper und CD34-Antikörper als Kontrolle in PBS biofunktionalisiert. Die biofunktionalisierten Stents wurden danach in Zellsuspensionen mit HUVECs und EPCs getaucht. Untersucht wurden hier sanfte Bedingungen mit statischer Inkubation und raue

Bedingungen im Schüttelinkubator über je 1 h (Lee et al., 2012). Die Re-Endothelialisierung und Generierung einer Neointima wurden mittels Rasterelektronenmikroskop (REM), immunhistochemischer Anfärbung der Zellen und histologischer Untersuchung nach H&E Färbung der aus den Versuchsobjekten (Ratten) explantierten Stents ausgewertet. Insgesamt zeigte sich in der Arbeit der Kollegen eine stärkere Bindung der HUVECs und EPCs zur Oberfläche der mit VE-Cadherin Antikörper beschichteten Stents. Zusätzlich ergab sich eine schnellere Re-Endothelialisierung der mit VE-Cadherin Antikörper beschichteten Stents *in-vivo* als in den mit CD34 Antikörper beschichteten Stents 3 Tage nach Einsetzen der Stents (Lee et al., 2012). Die von den Kollegen genutzten Schritte zur Funktionalisierung und Biofunktionalisierung der Oberfläche der Stents, gleichen in einigen Punkten den in dieser Arbeit genutzten Schritte. Die physikalische Veränderung der Oberflächenstruktur der Stents mittels Elektropolitur zur Generierung von Hydroxylgruppen, ist vergleichbar mit der in dieser Arbeit durchgeführten Sauerstoffplasma-Behandlung. Die anschließende Silanisierung zur Generierung von Aminogruppen, allerdings unter Verwendung von APTES, wurde ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführt. Die darauffolgende Konjugation von PEG an die Aminogruppen, wurde in dieser Arbeit ausgelassen. Durch die direkte Behandlung der HFMs mit einem NHS-Alkin Ester in dieser Arbeit, war eine Succinylierung obsolet. Die Behandlung der Oberflächen der Stents mit N-Hydroxysuccinimid, ist allerdings ähnlich zur Generierung der Alkin-Gruppen mittels Behandlung mit einem NHS-Alkin Ester in dieser Arbeit. Sie macht das in dieser Arbeit durchgeführte Azid-Labeling des Antikörpers obsolet. Letztendlich konnte eine Biofunktionalisierung der Oberfläche der Stents, sowie eine Biofunktionalisierung der Oberfläche der HFMs in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Der Nachweis von gebundenen HUVECs auf den funktionalisierten Oberflächen, ist ebenfalls in beiden Arbeiten gelungen. Auch in dieser Arbeit ergab eine Anfärbung der HUVECs mit Calcein-AM auf den mit VE-Cadherin Antikörper biofunktionalisierten HFMs einen positiven Nachweis. Auch wenn die Menge der auf den HFMs immobilisierten, nachgewiesenen Zellen nicht groß war, konnte dennoch ein Nachweis erbracht werden. Die Immobilisierung von

endothelialen Zellen auf mit VE-Cadherin Antikörper biofunktionalisierten HFMs stellt daher einen Ansatz für weitere Untersuchungen dar.

5.4. Fazit und Ausblick

Der Anspruch an die Therapie mit kreislaufunterstützenden Systemen und die Reduktion deren Komplikationen, die Verbesserung der Hämokompatibilität von Implantaten und die Entwicklung künstlicher Lungen, machen die Forschung auf dem Gebiet der Endothelialisierung künstlicher Oberflächen notwendig. Es gibt auf dem aktuellen Wissensstand der Forschung viele Ansätze zur Verbesserung der Hämokompatibilität und der Endothelialisierung künstlicher Oberflächen. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz mit der Funktionalisierung der HFMs zu Beginn, der sich daran anschließenden Biofunktionalisierung der HFMs mittels VE-Cadherin Antikörper und der abschließenden Endothelialisierung mit HUVECs, stellt einen aufwendigen, aber dennoch erfolgversprechenden Ansatz für weitere Untersuchungen dar. Der Nachweis der Aminogruppen auf den HFMs nach der Silanisierung mit 5% und 8% APTES-Lösung, sowie der Nachweis der Konjugation des NHS-Alkins auf den HFMs war in dieser Arbeit erfolgreich. Die stärkere RFU der Proben nach Behandlung mit 8% APTES-Lösung, deutet darauf hin, dass im Vergleich mit den mit 5% APTES-Lösung behandelten HFMs, hier mehr Aminogruppen generiert werden konnten. Die Schritte der Sauerstoffplasma-Behandlung und der Silanisierung mit APTES-Lösung, konnten des Weiteren in einer anderen Studie modifiziert angewendet werden. Damit konnten HUVECs ohne die Verwendung von Antikörpern mittels kupferfreier Azid/Alkin Cycloaddition (SPAAC) an die Oberfläche von HFMs gebunden werden (Canjuga et al., 2022).

Die Biofunktionalisierung mit dem VE-Cadherin Antikörper stellt dennoch einen vielversprechenden Ansatz dar. Die von den Kollegen Lee et al. durchgeführte Untersuchung zur Bindung von HUVECs und EPCs, sowie Re-Endothelialisierung und Generierung einer Neointima auf Stents, unterstützen die Hypothese vom VE-Cadherin Antikörper als effektive Bindungskomponente der Zellen auf funktionalisierten Oberflächen (Lee et al., 2012). In der Arbeit der Kollegen war ein Azid-Labeling des VE-Cadherin Antikörpers durch die direkte

Reaktion der Aminogruppe des VE-Cadherin Antikörpers mit dem N-Hydroxysuccinimid am Ende der PEG-Kette nicht notwendig. Die in dieser Arbeit zur Bindung des VE-Cadherin Antikörpers durchgeführte CuAAC, wurde dadurch folglich von den Kollegen umgangen, was eine mögliche zelltoxische Wirkung der Oxidationsprodukte des Kupfers ausschließt. Eine Untersuchung zur Endothelialisierung von künstlichen Oberflächen mit der in dieser Arbeit durchgeführten Funktionalisierung und Biofunktionalisierung unter Verwendung von EPCs anstatt HUVECs, wäre aufgrund der Eigenschaften von EPCs ebenfalls interessant. Die von den Kollegen De Visscher et al. untersuchte Funktionalisierung mit Fibronectin und SDF-1 α und die anschließende Endothelialisierung mit EPCs, stellt hierzu einen vielversprechenden Ansatz dar (De Visscher et al., 2012). Die Ausnutzung des Homing-Verhaltens, sowie die Möglichkeit zur Migration, Differenzierung und Proliferation der EPCs, könnten eine Endothelialisierung künstlicher Oberflächen möglich machen.

6. Zusammenfassung

Die Therapie mit extrakorporalen Membranoxygenatoren (ECMO) während der akuten Phase der kardiogenen Schocks oder im Rahmen einer pulmonalen Insuffizienz, stellt für Patienten oft die letzte Therapieoption dar. Zusätzlich erweitert der Einsatz der HLM während einer Herzoperation die Therapiemöglichkeiten bei Herzerkrankungen. Viele der mit dem Einsatz der ECMO/HLM einhergehenden Komplikationen, sind auf die eingeschränkte Hämokompatibilität solcher Unterstützungssysteme zurückzuführen. Der Kontakt des Patientenblutes mit der Oberfläche der ECMO/HLM und die damit in Verbindung stehenden Komplikationen, stellen daher eine große Hürde im Rahmen der ECMO-Therapie dar.

Eines der zentralen Bauteile einer ECMO ist die Oxygenator-Membran. Sie besteht aus mikroporösen und nicht-mikroporösen Hohlfasermembranen (HFMs), welche aus Polypropylen (PP) oder Polymethylpenten (PMP) bestehen. Durch seine Funktion als Gasaustauschmembran, ist die Oxygenator-Membran die größte mit dem Patientenblut in Kontakt stehende Fläche der ECMO.

Die das humane Gefäßsystem auskleidende Zellschicht besteht aus Endothelzellen. Grundgedanke dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Strategie zur Endothelialisierung der mit dem Patientenblut in Kontakt stehenden Hohlfasermembranen zur Verbesserung der Hämokompatibilität.

Um die Oberfläche der HFMs zu funktionalisieren, wurden die HFMs zunächst mit Sauerstoffplasma behandelt. Durch die Behandlung wurden Hydroxylgruppen (-OH) auf den Oberflächen der HFMs generiert. Um im darauf folgenden Schritt Amino-Gruppen (-NH₂) an die Hydroxylgruppen zu binden, silanisierten wir die HFMs mit einer 5% und 8% 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)-Lösung. Die Bindung der Amino-Gruppen auf der Membran wurden mittels Anfärbung mit Methylorange nachgewiesen. Im nächsten Schritt konjugierten wir zu den auf den Oberflächen der HFMs gebundenen Amino-Gruppen einen N-hydroxysuccinimid-Alkin-Ester (NHS-Alkin Ester) um Alkin-Gruppen an den Oberflächen zu generieren. Nach Konjugation des NHS-Alkins zu den Amino-Gruppen, wurde dieser unter Verwendung der Kupfer(I)-katalysierten Azid/Alkin Cycloaddition (CuAAC) mittels des Fluorophors Cy3-Azid auf den Oberflächen nachgewiesen.

Die CuAAC gehört zu den Reaktionen der sogenannten „Click-Chemie“ und beschreibt die Reaktion eines Azids mit einem Alkin. Nach erfolgreichem Nachweis des NHS-Alkins auf den HFMs wurden im nächsten Schritt VE-Cadherin Antikörper mit einem Azid markiert, um diese in einer weiteren Reaktion mittels CuAAC auf den Oberflächen zu immobilisieren. Die Azid-Gruppe des VE-Cadherin Antikörpers reagierte in diesem Schritt mit dem zur Oberfläche konjugierten NHS-Alkin. Die Immobilisierung des VE-Cadherin Antikörpers auf den HFMs wurde im nächsten Schritt durch Markierung mit einem Sekundärantikörper (Ratte anti-Maus IgG) mit fluoreszierenden Eigenschaften sichtbar gemacht. Nach Biofunktionalisierung der HFMs mit dem VE-Cadherin Antikörper, wurde die Besiedlung der HFMs mit HUVECs (Endothelzellen aus der Nabelschnurvene) analysiert. Die erfolgreiche Bindung der HUVECs an die HFMs, konnte danach durch Anfärbung der Zellen mit Calcein AM nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Funktionalisierung, sowie eine Biofunktionalisierung der PP- und PMP-HFMs mit den durchgeführten Schritten erfolgreich war. Auch wenn die Menge der auf den Oberflächen der HFMs immobilisierten Zellen gering war und die Zellschicht nicht konfluent war, konnten auf den funktionalisierten HFMs im Vergleich zu nicht biofunktionalisierten HFMs mehr Zellen nachgewiesen werden. Diese etablierte Oberflächenfunktionalisierung kann auch für die Immobilisierung von anderen Azid-markierten Molekülen eingesetzt werden.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. Meltem Avci-Adali durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Avci-Adali, und Ludmilla Hann.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Ludmilla Hann von mir eigenständig oder mit Unterstützung durch Ludmilla Hann durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich oder in Zusammenarbeit mit Ludmilla Hann.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 25.09.2024

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Meltem Avci-Adali bedanken, die mir die Durchführung dieses spannenden Projekts ermöglicht, mich immer unterstützt und trotz manchmal schwieriger Umstände immer an mich und die Erstellung dieser Arbeit geglaubt hat. Vielen herzlichen Dank!

Ein großer Dank gilt auch Ludmilla Hann, für die Einarbeitung in die Forschungsmethoden und die Hilfestellung bei der Korrektur der Arbeit.

Ich möchte mich außerdem ausdrücklich bei meinen Eltern, Dr. Maria und Dr. Thomas Halbrügge, bedanken, die mir mein Studium, die Erstellung dieser Arbeit und meinen gesamten Werdegang durch ihren Glauben an mich ihre bedingungslose Unterstützung erst ermöglicht haben.

Ein letzter, aber mit größter Dank gilt meinen Schwestern, Stephanie und Friederike Halbrügge, meinem Freund und allen anderen Freunden, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Literaturverzeichnis

- 3M CENTER. o.J. *Membrana - Oxygenation Products* [Online]. St. Paul, USA. Available: https://www.3m.com/3M/en_US/membrana-us/products/medical-membranes/membranes-for-blood-oxygenation/ [Accessed 07.07.2024].
- 3M DEUTSCHLAND GMBH. 2018. *3M™ Membrana™ OXYPHAN™ Capillary Membrane, Type PP 50/280 Mat* [Online]. Available: https://multimedia.3m.com/mws/media/1747254O/3m-membrana-oxyphan-50-280-series-capillary-membrane-mat-data-sheet.pdf?&fn=Oxyphan-50_280-Mat-Data-sheet-MM-1044_09-18_R1.pdf [Accessed 07.07.2024].
- 3M DEUTSCHLAND GMBH. 2019. *3M Membrana OXYPLUS, Capillary Membrane, Type PMP 90/200* [Online]. Available: https://multimedia.3m.com/mws/media/1747244O/3m-membrana-oxyplus-pmp-90-200-series-capillary-membrane-data-sheet.pdf?&fn=3M-Membrana-OXYPLUS-Capillary-Membrane-Type-PMP90200-Mat_Rev-01_2019_R1.pdf [Accessed 07.07.2024].
- AGARD, N. J., PRESCHER, J. A. & BERTOZZI, C. R. 2004. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 15046-15047.
- AÏSSA, K., KARAASLAN, M. A., RENNECKAR, S. & SADDLER, J. N. 2019. Functionalizing Cellulose Nanocrystals with Click Modifiable Carbohydrate-Binding Modules. *Biomacromolecules*, 20, 3087-3093.
- ALABDULLH, H. A., PFLAUM, M., MÄLZER, M., KIPP, M., NAGHILOUY-HIDAJI, H., ADAM, D., KÜHN, C., NATANOV, R., NIEHAUS, A., HAVERICH, A. & WIEGMANN, B. 2023. Biohybrid lung Development: Towards Complete Endothelialization of an Assembled Extracorporeal Membrane Oxygenator. *Bioengineering*, 10, 72.
- ASAHARA, T., KAWAMOTO, A. & MASUDA, H. 2011. Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. *Stem Cells*, 29, 1650-1655.
- AXISPHARM. o.J. *Cy3 Azide* [Online]. Available: <https://axispharm.com/product/cy3-azide/> [Accessed 01.03.2024].
- BAE, B., CHUN, B. H. & KIM, D. 2001. Surface characterization of microporous polypropylene membranes modified by plasma treatment. *Polymer*, 42, 7879-7885.
- BARTLETT, R., ARACHICHILAGE, D. J., CHITLUR, M., HUI, S. R., NEUNERT, C., DOYLE, A., RETTER, A., HUNT, B. J., LIM, H. S., SAINI, A., RENNÉ, T., KOSTOUSOV, V. & TERUYA, J. 2024. The History of Extracorporeal Membrane Oxygenation and the Development of Extracorporeal Membrane Oxygenation Anticoagulation. *Semin Thromb Hemost*, 50, 81-90.
- BASARIR, F., CHOI, E. Y., MOON, S. H., SONG, K. C. & YOON, T. H. 2005. Electrochemical properties of PP membranes with plasma polymer coatings of acrylic acid. *Journal of Membrane Science*, 260, 66-74.

- BERCKER, S., PETROFF, D., POLZE, N., KARAGIANIDIS, C., BEIN, T., LAUDI, S., STEHR, S. N. & VOELKER, M. T. 2021. ECMO use in Germany: An analysis of 29,929 ECMO runs. *PLOS ONE*, 16, e0260324.
- BERG, E. A. & FISHMAN, J. B. 2020. Labeling Antibodies. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, 099242.
- BONICOLINI, E., MARTUCCI, G., SIMONS, J., RAFFA, G. M., SPINA, C., LO COCO, V., ARCADIPANE, A., PILATO, M. & LORUSSO, R. 2019. Limb ischemia in peripheral veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: a narrative review of incidence, prevention, monitoring, and treatment. *Crit Care*, 23, 266.
- CANJUGA, D., HANSEN, C., HALBRÜGGE, F., HANN, L., WEIß, S., SCHLENSAK, C., WENDEL, H.-P. & AVCI-ADALI, M. 2022. Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces. *Biomaterials Advances*, 137, 212824.
- CAO, L., WU, A. & TRUSKEY, G. A. 2011. Biomechanical effects of flow and coculture on human aortic and cord blood-derived endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 44, 2150-2157.
- CONDELLO, I. 2020. Water Condensation and Gas Exchange Correlation in Different Models and Fibers of Blood Oxygenators: "How Can We Improve Performance?". *J Extra Corpor Technol*, 52, 43-51.
- CORADA, M., MARIOTTI, M., THURSTON, G., SMITH, K., KUNKEL, R., BROCKHAUS, M., LAMPUGNANI, M. G., MARTIN-PADURA, I., STOPPACCIARO, A., RUCO, L., MCDONALD, D. M., WARD, P. A. & DEJANA, E. 1999. Vascular endothelial cadherin is an important determinant of microvascular integrity *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 9815-9820.
- DAVID, S., NAPP, L. C., KÜHN, C. & HOEPER, M. M. 2016. Extrakorporale Membranoxygenierung. *Der Internist*, 57, 856-863.
- DAVIS, G. E. & SENGER, D. R. 2005. Endothelial Extracellular Matrix. *Circulation Research*, 97, 1093-1107.
- DE VISSCHER, G., MESURE, L., MEURIS, B., IVANOVA, A. & FLAMENG, W. 2012. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1 α . *Acta Biomaterialia*, 8, 1330-1338.
- EVSEEV, A. K., ZHURAVEL, S. V., ALENTIEV, A. Y., GORONCHAROVSKAYA, I. V. & PETRIKOV, S. S. 2019. Membranes in Extracorporeal Blood Oxygenation Technology. *Membranes and Membrane Technologies*, 1, 201-211.
- FÉLÉTOU, M. 2011. The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators.
- FIGUEROA VILLALBA, C. A., MCMULLAN, D. M., REED, R. C. & CHANDLER, W. L. 2022. Thrombosis in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Circuits. *ASAIO Journal*, 68, 1083-1092.
- FINETTI, C., SOLA, L., PEZZULLO, M., PROSPERI, D., COLOMBO, M., RIVA, B., AVVAKUMOVA, S., MORASSO, C., PICCIOLINI, S. & CHIARI, M. 2016. Click Chemistry Immobilization of Antibodies on Polymer Coated Gold Nanoparticles. *Langmuir*, 32, 7435-7441.

- GAI, M., SIMON, J., LIEBERWIRTH, I., MAILÄNDER, V., MORSBACH, S. & LANDFESTER, K. 2020. A bio-orthogonal functionalization strategy for site-specific coupling of antibodies on vesicle surfaces after self-assembly. *Polymer Chemistry*, 11, 527-540.
- GAILANI, D. & RENNÉ, T. 2007. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 1106-1112.
- GETINGE DEUTSCHLAND GMBH. o.J. *GETINGE - Cardiohelp System* [Online]. Available: <https://www.getinge.com/de/produkte/cardiohelp-system/> [Accessed 11.07.2024].
- GIANNOTTA, M., TRANI, M. & DEJANA, E. 2013. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Developmental Cell*, 26, 441-454.
- GMBH, J. B. o.J. *UDP-GalNAz* [Online]. Available: <https://www.jenabioscience.com/click-chemistry/click-reagents-by-chemistry/azide-reagents/monosaccharides/clk-077-udp-galnaz> [Accessed 06.03.2024].
- HALDÓN, E., NICASIO, M. C. & PÉREZ, P. J. 2015. Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13, 9528-9550.
- HARRIS, E. S. & NELSON, W. J. 2010. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 22, 651-658.
- HE, T., HE, J., WANG, Z. & CUI, Z. 2021. Modification strategies to improve the membrane hemocompatibility in extracorporeal membrane oxygenator (ECMO). *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 4, 847-864.
- HESS, C., WIEGMANN, B., MAURER, A. N., FISCHER, P., MÖLLER, L., MARTIN, U., HILFIKER, A., HAVERICH, A. & FISCHER, S. 2010. Reduced Thrombocyte Adhesion to Endothelialized Poly 4-Methyl-1-Pentene Gas Exchange Membranes—A First Step Toward Bioartificial Lung Development. *Tissue Engineering Part A*, 16, 3043-3053.
- HESSEL, E. A. 2014. A Brief History of Cardiopulmonary Bypass. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 18, 87-100.
- HIMO, F., LOVELL, T., HILGRAF, R., ROSTOVTSSEV, V. V., NOODLEMAN, L., SHARPLESS, K. B. & FOKIN, V. V. 2005. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 210-216.
- HOGAN, M. & BERGER, J. S. 2020. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Review of incidence, diagnosis, and management. *Vascular Medicine*, 25, 160-173.
- HOWARTER, J. A. & YOUNGBLOOD, J. P. 2006. Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22, 11142-11147.
- HUANG, X., WANG, W., ZHENG, Z., FAN, W., MAO, C., SHI, J. & LI, L. 2016. Surface monofunctionalized polymethyl pentene hollow fiber membranes by plasma treatment and hemocompatibility modification for membrane oxygenators. *Applied Surface Science*, 362, 355-363.
- HUISGEN, R. 1961. Proceedings of the Chemical Society. October 1961. *Proceedings of the Chemical Society*, 357-396.

- JALEH, B., PARVIN, P., WANICHAPICHART, P., SAFFAR, A. P. & REYHANI, A. 2010. Induced super hydrophilicity due to surface modification of polypropylene membrane treated by O₂ plasma. *Applied Surface Science*, 257, 1655-1659.
- JENA BIOSCIENCE. o.J. *Click Chemistry - THPTA* [Online]. Available: <https://www.jenabioscience.com/click-chemistry/click-reagents-by-chemistry/auxiliary-cu-i-click-reagents/clk-1010-thpta> [Accessed 22.02.2024].
- LANSINK-HARTGRING, A. O., HOFFMANN, R., VAN DEN BERGH, W. & DE VRIES, A. 2020. Changes in Red Blood Cell Properties and Platelet Function during Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Journal of Clinical Medicine*, 9, 1168.
- LARSEN, R. 2012. *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Heidelberg, Springer Berlin.
- LEE, J. M., CHOE, W., KIM, B.-K., SEO, W.-W., LIM, W.-H., KANG, C.-K., KYEONG, S., EOM, K. D., CHO, H.-J., KIM, Y.-C., HUR, J., YANG, H.-M., CHO, H.-J., LEE, Y.-S. & KIM, H.-S. 2012. Comparison of endothelialization and neointimal formation with stents coated with antibodies against CD34 and vascular endothelial-cadherin. *Biomaterials*, 33, 8917-8927.
- LEE, Y., JANG, I., HONG, J. & SON, Y.-J. 2023. Factors associated with 30-day in-hospital mortality in critically ill adult patients receiving extracorporeal membrane oxygenation: A retrospective cohort study. *Intensive and Critical Care Nursing*, 79, 103489.
- LIM, M. W. 2006. The history of extracorporeal oxygenators*. *Anaesthesia*, 61, 984-995.
- LIM, W.-H., SEO, W.-W., CHOE, W., KANG, C.-K., PARK, J., CHO, H.-J., KYEONG, S., HUR, J., YANG, H.-M., CHO, H.-J., LEE, Y.-S. & KIM, H.-S. 2011. Stent Coated With Antibody Against Vascular Endothelial-Cadherin Captures Endothelial Progenitor Cells, Accelerates Re-Endothelialization, and Reduces Neointimal Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31, 2798-2805.
- LINKINS, L.-A., JULIAN, J. A., RISCHKE, J., HIRSH, J. & WEITZ, J. I. 2002. In vitro comparison of the effect of heparin, enoxaparin and fondaparinux on tests of coagulation. *Thrombosis Research*, 107, 241-244.
- LOTZ, C. & MUELLENBACH, R. 2018. Extracorporeal membrane oxygenation. *Anästh Intensivmed*, 59, 316-325.
- LV, Y., YU, X., TU, S.-T., YAN, J. & DAHLQUIST, E. 2010. Wetting of polypropylene hollow fiber membrane contactors. *Journal of Membrane Science*, 362, 444-452.
- MAVROUDI, M., KALDIS, S. P. & SAKELLAROPOULOS, G. P. 2003. Reduction of CO₂ emissions by a membrane contacting process☆. *Fuel*, 82, 2153-2159.
- MCGOWAN, K. E., MAKARI, J., DIAMANTOUROS, A., BUCCI, C., REMPEL, P., SELBY, R. & GEERTS, W. 2016. Reducing the hospital burden of heparin-induced thrombocytopenia: impact of an avoid-heparin program. *Blood*, 127, 1954-1959.

- MELDAL, M. & DINESS, F. 2020. Recent Fascinating Aspects of the CuAAC Click Reaction. *Trends in Chemistry*, 2, 569-584.
- MEYNS, B., VERCAEMST, L., VANDEZANDE, E., BOLLEN, H. & VLASSELAERS, D. 2005. Plasma Leakage of Oxygenators in ECMO Depends on the Type of Oxygenator and on Patient Variables. *The International Journal of Artificial Organs*, 28, 30-34.
- MURASAWA, S. & ASAHARA, T. 2005. Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis. *Physiology*, 20, 36-42.
- MURPHY, D. A., HOCKINGS, L. E., ANDREWS, R. K., AUBRON, C., GARDINER, E. E., PELLEGRINO, V. A. & DAVIS, A. K. 2015. Extracorporeal Membrane Oxygenation—Hemostatic Complications. *Transfusion Medicine Reviews*, 29, 90-101.
- OLMER, R., ENGELS, L., USMAN, A., MENKE, S., MALIK, M. N. H., PESSLER, F., GÖHRING, G., BORNHORST, D., BOLTEN, S., ABDELILAH-SEYFRIED, S., SCHEPER, T., KEMPF, H., ZWEIGERDT, R. & MARTIN, U. 2018. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Endothelial Cells in Scalable Suspension Culture. *Stem Cell Reports*, 10, 1657-1672.
- ONTANEDA, A. & ANNICH, G. M. 2018. Novel Surfaces in Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *Frontiers in Medicine*, 5.
- OZDEMIR, Y., HASIRCI, N. & SERBETCI, K. 2002. Oxygen plasma modification of polyurethane membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13, 1147-1152.
- PANG, J. H., FARHATNIA, Y., GODARZI, F., TAN, A., RAJADAS, J., COUSINS, B. G. & SEIFALIAN, A. M. 2015. In situ Endothelialization: Bioengineering Considerations to Translation. *Small*, 11, 6248-6264.
- PARK, H.-J., ZHANG, Y., GEORGESCU, S. P., JOHNSON, K. L., KONG, D. & GALPER, J. B. 2006. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Reviews*, 2, 93-101.
- PATIL, U. S., QU, H., CARUNTU, D., O'CONNOR, C. J., SHARMA, A., CAI, Y. & TARR, M. A. 2013. Labeling Primary Amine Groups in Peptides and Proteins with N-Hydroxysuccinimidyl Ester Modified Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles Containing Cleavable Disulfide-Bond Linkers. *Bioconjugate Chemistry*, 24, 1562-1569.
- PERREAULT, F., TOUSLEY, M. E. & ELIMELECH, M. 2014. Thin-Film Composite Polyamide Membranes Functionalized with Biocidal Graphene Oxide Nanosheets. *Environmental Science & Technology Letters*, 1, 71-76.
- PFLAUM, M., JURMANN, S., KATSIRNTAKI, K., MÄLZER, M., HAVERICH, A. & WIEGMANN, B. 2022. Towards Biohybrid Lung Development—Fibronectin-Coating Bestows Hemocompatibility of Gas Exchange Hollow Fiber Membranes by Improving Flow-Resistant Endothelialization. *Membranes*, 12, 35.
- PICKENS, C. J., JOHNSON, S. N., PRESSNALL, M. M., LEON, M. A. & BERKLAND, C. J. 2018. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chemistry*, 29, 686-701.

- PILARCZYK, K., TRUMMER, G., JAKOB, H. G., DUSSE, F. & MARGGRAF, G. 2013. [Extracorporeal heart and lung replacement procedures]. *Z Herz Thorax Gefasschir*, 27, 37-48.
- PRESOLSKI, S. I., HONG, V. P. & FINN, M. G. 2011. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr Protoc Chem Biol*, 3, 153-162.
- QASBA, P. K. 2015. Glycans of Antibodies as a Specific Site for Drug Conjugation Using Glycosyltransferases. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 2170-2175.
- QIAN, J., COLE, R. B. & CAI, Y. 2011. Synthesis and characterization of a 'fluorous' (fluorinated alkyl) affinity reagent that labels primary amine groups in proteins/peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 1-11.
- QU, D., ZHOU, L., WANG, W., WANG, Z., WANG, G., CHI, W. & ZHANG, B. 2013. 5-Ethynylcytidine as a new agent for detecting RNA synthesis in live cells by "click" chemistry. *Analytical Biochemistry*, 434, 128-135.
- RORRO, F., FIUSCO, F., BROMAN, L. M. & PRAHL WITTBERG, L. 2024. Backflow at the inlet of centrifugal blood pumps enhanced by geometrical features. *Physics of Fluids*, 36.
- ROSTOVTSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V. & SHARPLESS, K. B. 2002. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 2596-2599.
- RUGGERI, Z. M. & WARE, J. 1993. von Willebrand factor. *The FASEB Journal*, 7, 308-316.
- SARKAR, A. & DANIELS-RACE, T. 2013. Electrophoretic Deposition of Carbon Nanotubes on 3-Amino-Propyl-Triethoxysilane (APTES) Surface Functionalized Silicon Substrates. *Nanomaterials (Basel)*, 3, 272-288.
- UPCHURCH, C., BLUMENBERG, A., BRODIE, D., MACLAREN, G., ZAKHARY, B. & HENDRICKSON, R. 2021. Extracorporeal membrane oxygenation use in poisoning: a narrative review with clinical recommendations. *Clinical Toxicology*, 59, 1-11.
- VASHIST, S. K., LAM, E., HRAPOVIC, S., MALE, K. B. & LUONG, J. H. T. 2014. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chemical Reviews*, 114, 11083-11130.
- WU, G. M. 2004. Oxygen plasma treatment of high performance fibers for composites. *Materials Chemistry and Physics*, 85, 81-87.
- YU, H.-Y., LIU, L.-Q., TANG, Z.-Q., YAN, M.-G., GU, J.-S. & WEI, X.-W. 2008. Surface modification of polypropylene microporous membrane to improve its antifouling characteristics in an SMBR: Air plasma treatment. *Journal of Membrane Science*, 311, 216-224.
- ZHAO, Y., LI, J., TING, K. K., CHEN, J., COLEMAN, P., LIU, K., WAN, L., MOLLER, T., VADAS, M. A. & GAMBLE, J. R. 2021. The VE-Cadherin/ β -catenin signalling axis regulates immune cell infiltration into tumours. *Cancer Letters*, 496, 1-15.