

**Präklinische Charakterisierung und Optimierung von  
blut- und gewebekontaktierenden Implantatmaterialien  
zur Reduktion Biomaterial-assoziiertes  
Komplikationen**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Antonia Theurer (geb. Link)  
aus Böblingen

Tübingen

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 29.09.2021

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter: Apl. Prof. Dr. Hans Peter Wendel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Boris Macek

„Es wird ja fleißig gearbeitet und viel mikroskopiert, aber es müsste mal wieder einer einen gescheiten Gedanken haben.“

– Rudolf Virchow

# Inhalt

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Biomaterialien .....	4
1.2 Biomaterial-assoziierte Komplikationen .....	5
1.3 Interaktion blutkontaktierender Biomaterialien .....	7
1.3.1 Proteinadsorption .....	7
1.3.2 Zelladhäsion .....	7
1.3.3 Aktivierung des Komplementsystems .....	9
1.3.4 Aktivierung der Gerinnungskaskade .....	11
1.4 Wundheilung .....	12
1.5 Untersuchung der Hämokompatibilität von Biomaterialien .....	15
1.5.1 Regulatorische Vorgaben .....	15
1.5.2 Testmodelle und Testparameter .....	15
1.6 Optimierung von Biomaterialien .....	17
1.6.1 Senkung der Thrombogenität .....	17
1.6.2 Förderung der Endothelialisierung .....	18
1.6.3 Förderung der Wundheilung .....	19
1.6.4 Biomaterialien zum Transport von messenger RNA .....	20
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1 Publikation I .....	25
3.2 Publikation II .....	27
3.3 Publikation III .....	29
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>31</b>
4.1 Erprobung eines In-vitro-Modells zur Testung von tubulären blutkontaktierenden Implantaten .....	31
4.2 In-vitro-Testung einer Nanobeschichtung für Flow Diverter zur Behandlung intrakranieller Aneurysmen .....	35
4.3 Etablierung einer mRNA-haltigen Beschichtung von chirurgischem Nahtmaterial zur Unterstützung der Wundheilung .....	41
<b>5 Ausblick</b> .....	<b>47</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>49</b>

<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>69</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	69
7.2	Eigenanteil der Publikationen .....	71
7.3	Publikationsliste.....	74
<b>8</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>75</b>
8.1	Publikation I.....	75
8.2	Publikation II.....	83
8.3	Publikation III.....	95
	<b>Danksagung</b> .....	<b>113</b>



### Zusammenfassung

Biomaterialien finden im 21. Jahrhundert vielfältige Anwendung in der Medizin: In ihrer einfachsten Form als Verbands- und Nahtmaterialien zum Wundverschluss, nach Implantation zur Unterstützung der Frakturheilung oder Ersatz von Gelenkstrukturen sowie im vaskulären System zum Abstützen von Gefäßwänden oder als Gefäßprothesen. Dadurch kann ein großer Beitrag zur Verbesserung der Mobilität und Lebensqualität von Betroffenen diverser Erkrankungen geleistet werden.

Jedoch konnten unerwünschten Biomaterial-assoziierten Komplikationen bis heute nicht vollständig eliminiert werden und so ist beispielsweise beim Einsatz von blutkontaktierenden Biomaterialien zu berücksichtigen, dass thrombotische Reaktionen induziert werden könnten oder es zu initialen Immunreaktion bis hin zu chronischen Entzündungen kommt. Zudem sind chirurgisch implantierte Materialien anfällig für Infektionen, da die lokale Gewebeabwehr durch das Operationstrauma beeinträchtigt ist. Diese Effekte sind vorher nur schwer abzuschätzen und können den Heilungsverlauf negativ beeinflussen oder sogar einen erneuten operativen Eingriff nötig machen, was in einer zusätzlichen Belastung für die Betroffenen resultiert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Optimierung von Biomaterialien hinsichtlich präklinischer Testung, Hämokompatibilität, sowie zur Verbesserung der Wundheilung voranzubringen: Dazu wurde ein dynamisches Modell für die Inkubation von tubulären Implantaten mit humanem Vollblut etabliert, welches es in Übereinstimmung mit der EU-Norm ISO 10993-4 ermöglichte, die Hämokompatibilität verschiedener Materialien basierend auf der Analyse von Parametern wie Blutzellzahlen und verschiedenen plasmatischen Hämokompatibilitätsmarkern zu bewerten.

Im nächsten Schritt wurden zur Evaluierung einer neuartigen Fibrin-Heparin-Beschichtung für neurovaskuläre Stents zwei Vollblut-Hämokompatibilitätsmodelle angewendet und die Blutzellzahlen sowie die Sekretion von plasmatischen Entzündungs- und Gerinnungsmarkern analysiert. Die Resultate der Testung zeigten, dass Implantate mit der Fibrin-Heparin-Beschichtung im Vergleich zum unbeschichteten Metallimplantaten eine signifikant geringere Neigung zur Aktivierung der Thrombozytenadhäsion auf der Oberfläche, sowie zur Bildung des Thrombin-Antithrombin III (TAT)-Komplexes nach Inkubation mit Blut aufwiesen. Im weiteren Verlauf wurde die endothelialisierungsfördernde Charakteristik der Beschichtung analysiert, wobei durch die Fibrin-Heparin-Beschichtung eine leichte Verbesserung erzielt wurde.

Weiterhin wurde eine neuartige messenger RNA-Beschichtung entwickelt, welche die Wundheilung und Zellproliferation durch die autologe Expression von Wachstumsfaktoren fördern soll und beispielhaft auf chirurgischem Nahtmaterial aufgebracht wurde. Dazu wurde im ersten Schritt evaluiert, welches Transfektionsreagenz für die Verwendung in einem Coating am geeignetsten ist und anschließend verschiedene Hautzelltypen durch die etablierte Beschichtung mit wachstumsfaktor-kodierender messenger RNA transfiziert. Die Resultate zeigten, dass die Expression von therapeutischem Protein durch die Beschichtung ermöglicht wurde und dabei weder die Zellvitalität

## Zusammenfassung

---

beeinflusst, noch eine proinflammatorische Reaktion induziert wurde. Auch bei der Inkubation mit humanem Vollblut zeigte sich kein negativer Einfluss auf die Zellzahlen oder das Gerinnungs- bzw. Komplementsystem durch die bioaktive Beschichtung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation stellen somit einen neuartigen Ansatz zur Optimierung von verschiedenen Biomaterialien für die klinische Anwendung dar, mit welchem bestehende, Biomaterial-assoziierte Komplikationen hinsichtlich unerwünschter Aktivierung der Gerinnungs- oder Komplementkaskaden sowie Wundheilungsstörungen minimiert oder sogar verhindert werden können.

### Abstract

In the 21st century, biomaterials have numerous applications in medicine: most simple as bandage or suture material for wound closure, after implantation to support fracture healing or replacement of joints, as well as in the vascular system to support vessel walls or as vascular grafts. This can greatly contribute to improving the mobility and quality of life of patients suffering from a wide range of diseases. However, undesired complications associated with biomaterials have not yet been completely eliminated. For example, the use of blood-contacting biomaterials might induce thrombotic reactions or lead to initial immune reactions up to chronic inflammations. In addition, surgically implanted materials are prone to infections since the local tissue defense is impaired by surgery trauma. These factors are difficult to assess in advance and can have a negative impact on the healing process or even make a further surgical intervention necessary, resulting in additional stress for the patient.

Therefore, the aim of this work is to promote the optimization of biomaterials with a focus on preclinical testing, advanced hemocompatibility, and the improvement of wound healing: A dynamic model for the incubation of tubular implants with human whole blood was established, which - in accordance with the EU standard ISO 10993-4 - allowed the evaluation of the hemocompatibility of different materials based on the analysis of parameters such as blood cell count and multiple plasmatic hemocompatibility markers. In a next step, two whole blood hemocompatibility models were used to evaluate a novel fibrin-heparin coating for neurovascular stents and blood cell count and secretion of plasmatic inflammation and coagulation markers were analyzed. The results of the testing demonstrated that the implant with the fibrin-heparin coating had a significantly lower tendency to induce platelet adhesion on the surface, as well as to form the thrombin-antithrombin III complex after incubation with blood, compared with the bare metal implant. In the further process, the endothelialization-promoting characteristics of the coating were tested whereby a slight improvement was achieved through the fibrin-heparin coating. Also, a novel messenger RNA coating was developed and exemplary applied to surgical sutures with the aim to promote wound healing and cell proliferation by autologous expression of growth factors. In the first step the most suitable transfection reagent for the use in a coating was evaluated and subsequently different skin cell types were transfected with growth factor-encoding messenger RNA through the established coating. The results showed that the expression of therapeutic protein was enabled by the coating and neither cell viability was affected, nor a pro-inflammatory response was induced. Hemocompatibility testing also exhibited no negative effect on cell numbers or the coagulation cascade as well as the complement system induced by the bioactive coating.

Thus, the results of this thesis represent a further novel approach towards the optimization of biomaterials for clinical application. Existing biomaterial-associated problems causing undesired activation of the coagulation or complement cascades as well as wound healing disorders can be minimized or even prevented.

# 1 Einleitung

## 1.1 Biomaterialien

Gemäß der internationalen Union für reine und angewandte Chemie (IUPAC) ist ein Biomaterial definiert als Material, das dem Kontakt mit lebendem Gewebe, Organismen oder Mikroorganismen ausgesetzt ist <sup>1</sup>. Biomaterialien werden in der Medizin entweder zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken eingesetzt und treten dabei in biologische, chemische und physikalische Wechselwirkung mit dem biologischen System des Empfängers <sup>2</sup>.

Die eingesetzten Materialien dürfen nicht entzündlich wirken und keine kanzerogene Wirkung entfalten. Sie sollten physikalischen Belastungen (z. B. Biegung, Kompression, Abrieb und Zug) standhalten, müssen anpassungsfähig und sterilisierbar sein <sup>3,4</sup>.

Es gibt eine große Anzahl von Materialien, welche diese Kriterien erfüllen, darunter biologisch abbaubare und nicht biologisch abbaubare Polymere <sup>5</sup>, Keramiken <sup>6</sup>, Silikone <sup>7</sup> und Metalle <sup>8</sup>.

Diese Biomaterialien finden vielfältige Anwendung in der Medizin: In ihrer einfachsten Form werden sie als Verbands- und Nahtmaterialien zum Verschluss und zur Abdeckung von Wunden verwendet <sup>9</sup>. Bei einer Implantation ins Körperinnere können sie die Heilung von Knochenbrüchen unterstützen oder ganze Gelenkstrukturen ersetzen <sup>10</sup>. Im vaskulären System können Gefäßwände durch Stents gestützt werden oder Blutgefäße komplett durch Gefäßprothesen ausgetauscht werden <sup>11,12</sup>. Durch künstliche Herzklappen, Harnblasen oder Cochleaimplantate ist es sogar möglich ganze Organe oder Organteile durch Biomaterialien zu substituieren <sup>13-15</sup>. Biomaterialien finden ebenfalls außerhalb des Körpers als Organersatzsystem in Form von Herz-Lungen-Maschinen oder Dialyseapparaturen Einsatz <sup>16,17</sup>.

Für eine lange Verweildauer und gute Einheilung eines (implantierten) Biomaterials im Körper ist die Biokompatibilität des Materials entscheidend: Biokompatibilität bezeichnet die Fähigkeiten des Materials, bei einer bestimmten Anwendung eine angemessene Reaktion beim Empfänger auszulösen <sup>18</sup>. Das bedeutet, dass biokompatible Materialien beim Kontakt mit lebendem Gewebe keine unerwünschten oder negativen Effekte auf (sub-)zellulären Ebene nach sich ziehen dürfen.

### 1.2 Biomaterial-assoziierte Komplikationen

Der klinische Erfolg verschiedener Biomaterialien und Implantate ist eine wichtige Antwort auf die medizinischen Bedürfnisse einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung weltweit. Die Langzeitanalysen verschiedener Implantatarten wie Skelettprothesen oder künstlicher Herzklappen zeigen jedoch, dass 30-50% der Implantate innerhalb von 10-25 Jahren versagen<sup>19,20</sup>. Dies hat zur Folge, dass die betroffenen Patienten sich erneut einem oder mehreren operativen Eingriffen zur Korrektur oder zum Wechsel des Implantats unterziehen müssen. Dies ist sowohl für die Patienten belastend als auch für die Gesellschaft kostspielig und trägt wesentlich zu den schnell steigenden Kosten im Gesundheitswesen bei<sup>19</sup>.

Die Beispiele für Implantatversagen sind vielfältig und können von thrombogen Reaktionen auf Gefäßprothesen<sup>21,22</sup>, Degradation und Spannungsrisse von Herzschrittmacherkabel<sup>23</sup>, Gewebefibrose um Brustprothesen herum<sup>24</sup> bis zum Abrieb von orthopädischen Gelenkprothesen reichen<sup>25</sup>.

Die primären Wechselwirkungen von Biomaterial und Empfänger sind dadurch bestimmt, dass beinahe jedes implantierte Material zuerst in Kontakt mit Blut kommt. Dabei adsorbiert eine Vielzahl von Plasmaproteinen an der Implantatoberfläche<sup>26</sup>, welche nachfolgend eine Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems vermitteln<sup>27,28</sup>. Dadurch werden schließlich inflammatorische Reaktionen sowie die Zelladhäsion auf der Oberfläche reguliert, was in Entzündungen oder thrombotischen Komplikationen nach der Implantation resultieren kann<sup>29,30</sup>.

Bei blutkontaktierenden Biomaterialien muss immer davon ausgegangen werden, dass thrombotische Reaktionen induziert werden, denn bislang ist keine Biomaterialoberfläche in der Lage, die Koagulation vollständig zu verhindern<sup>31</sup>. Thrombotische und thromboembolische Komplikationen sowie Blutungsrisiken, aufgrund der unerlässlichen Antikoagulanzen-Therapie, bleiben daher bei kardiovaskulär, neurovaskulär und peripher angewendeten Biomaterialien ein ernsthaftes Problem<sup>32</sup>. Unter normalen Bedingungen steht das Blut im Kontakt mit der gefäßauskleidenden Endothelschicht, welche eine gerinnungshemmende und antithrombotische Reaktion vermittelt<sup>33</sup>. Durch die Einführung einer als fremd erkannten Oberfläche in den Kreislauf ist diese Regulation gestört. Auf der Implantatoberfläche adsorbiert eine Schicht aus Plasmaproteinen, welche die Gerinnungskaskade aktivieren, was eine Thrombozyten-

adhäsion und -aktivierung zur Folge hat und schließlich in der Bildung eines Fibrinnetzes resultiert in dem Erythrozyten adhären. Die Bildung solcher Thromben manifestiert sich klinisch durch die plötzliche und vollständige Obstruktion von Stents und Gefäßprothesen innerhalb von Tagen oder Wochen<sup>34</sup> und kann ferner zu embolischen Komplikationen wie einem Myokardinfarkt<sup>35</sup>, einem ischämischen Schlaganfall<sup>36</sup> oder einem akuten peripheren Arterienverschluss führen<sup>37</sup>.

Postoperativ kommt es bei den meisten Biomaterialien aufgrund der Interaktion mit vaskularisiertem Gewebe des Empfängers zu einer initialen Immunreaktion<sup>38</sup>. Der Einheilungsprozess beginnt dann mit der Rekrutierung von Neutrophilen an die verletzte Stelle, um den erkannten Fremdkörper durch Phagozytose zu entfernen<sup>39</sup>. Um den Phagozytoseprozess zu beschleunigen, erzeugen die Neutrophilen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die Gewebeschäden verursachen können<sup>40</sup>. Die Neutrophilen sind ebenfalls für die Produktion der Entzündungsmediatoren verantwortlich, welche später Monozyten rekrutieren und zu M0-Makrophagen differenzieren. Diese unterlaufen eine Polarisierung zu M1- oder M2-Makrophagen, die eine proinflammatorische (M1) oder regenerative (M2) Reaktion induzieren<sup>41</sup>. Wenn die Integration ins Wirtsgewebe nicht gelingt und die M1-Makrophagenpopulation die Überhand gewinnt, kommt es zur Entstehung chronischer Entzündungen sowie fibröser Verkapselungen und damit einhergehend zum Implantatversagen<sup>42</sup>.

Zudem sind chirurgisch implantierte Materialien anfällig für Infektionen, da die lokale Gewebeabwehr durch das operativ verursachte Gewebetrauma beeinträchtigt ist. Diese Faktoren können in Kombination mit der Besiedlung von Implantatoberflächen zum Zeitpunkt der Implantation zu einer offenen Infektion führen<sup>43</sup>. Ebenso können Biomaterialien nach Kontakt mit mikroflorakontaminierten Körperoberflächen, wie Haut, Darm, Nasopharynx und Urogenitaltrakt<sup>44</sup>, mit Bakterienkolonien, die in eine Polysaccharid-Matrix eingebettet sind, besiedelt werden<sup>45</sup>. Bakterien in diesem Biofilm können nicht durch Antibiotika beseitigt werden und sind resistent gegen normale immunologische Abwehrmechanismen<sup>46</sup>. Zusätzlich wird das Problem des Biofilms dadurch verschärft, dass die inhärente Pathogenität endogener Bakterien, wie *Staphylococcus epidermidis*, durch die bloße Anwesenheit von Fremdkörpern erhöht wird<sup>47</sup>. Die daraus resultierenden Folgen sind postoperatives Prothesenversagen, chronische Schmerzen und Unbeweglichkeit<sup>48</sup>, im schlimmsten Fall kann es zu Osteomyelitis

oder septischer Arthrose kommen, was mit der Zerstörung von intaktem Knochen- und Gelenksgewebe einhergeht <sup>49,50</sup>.

Daher sollten potentielle nachteilige Wechselwirkungen zwischen neu entwickelten Materialien und Blut eingehend analysiert werden, um eine Aktivierung und Zerstörung von Blutkomponenten zu verhindern.

### **1.3 Interaktion blutkontaktierender Biomaterialien**

Die Interaktion von Biomaterialien mit Blut führt zu zellulären und humoralen Reaktionen, welche zu unerwünschten Entzündungsreaktionen oder der Aktivierung der Koagulationskaskade führen können. Die Entwicklung von Biomaterialien mit verbesserter Hämokompatibilität erhöht daher die Verträglichkeit und minimiert unerwünschte Nebenwirkungen.

#### **1.3.1 Proteinadsorption**

Der Kontakt der künstlichen Oberfläche mit Blut führt zu einer sofortigen Adsorption von Serumproteinen, wie Fibrinogen, Albumin und Immunglobulin G (IgG), an der Oberfläche des Materials <sup>51</sup> und es kommt zu einem kinetischen Wettbewerb zwischen den Proteinen auf der Materialoberfläche, der als Vroman-Effekt bezeichnet wird <sup>52</sup>: Während der ersten Minuten werden die häufig vorkommenden Proteine wie Fibrinogen adsorbiert und danach durch weniger häufig vorkommende Proteine mit einer höheren Oberflächenaffinität wie hochmolekulares Kininogen (HMWK), Faktor XII und Plasminogen verdrängt <sup>53</sup>.

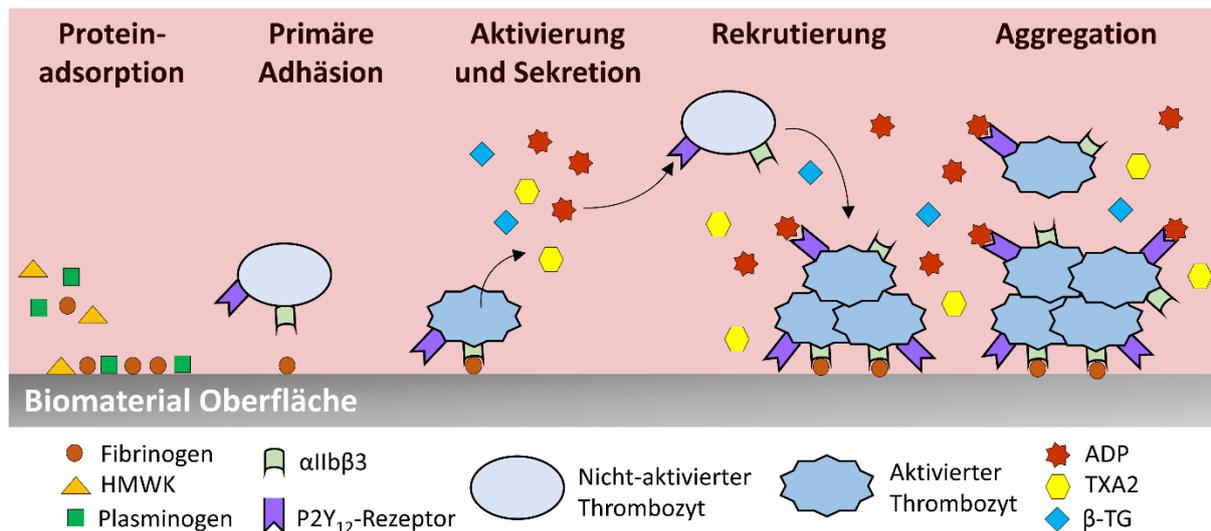
Diese Proteinschicht gilt als dynamischer Modulator der Thrombusbildung auf künstlichen Oberflächen, denn des gebundenem Fibrinogen und der Faktor XII spielen eine Schlüsselrolle bei nachgelagerten Prozessen: Dadurch wird die Adhäsion verschiedener Blutzellen an die Oberfläche ermöglicht und die Bildung von Thrombin sowie die Komplementaktivierung induziert <sup>22</sup>.

#### **1.3.2 Zelladhäsion**

Durch die Adsorption von Proteinen an die Oberfläche des Biomaterials nach Blutkontakt wird die Anlagerung von Thrombozyten, Leukozyten und roten Blutkörperchen an künstliche Oberflächen ermöglicht.

## Einleitung

Fibrinogen ist dabei der wichtigste Mediator für die Adhäsion von Thrombozyten: Durch das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  (Glykoprotein GP IIb/IIIa / Fibrinogenrezeptor), welches das am häufigsten vorkommende Adhäsionsmolekül auf der Thrombozytenoberfläche ist, wird die Interaktion mit Fibrinogen vermittelt<sup>54</sup>. Wenn Fibrinogen auf künstlichen Oberflächen adsorbiert ist, kann das Integrin selbst im Ruhezustand ohne vorherige Aktivierung daran binden<sup>54</sup>. Durch die Adhäsion auf der Oberfläche werden die Thrombozyten aktiviert und setzen aggregierungsfördernde Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A2 (TXA2)<sup>55</sup>. ADP aktiviert nachfolgend benachbarte Thrombozyten durch Bindung an deren purinerge  $\text{P2Y}_2/\text{P2Y}_{12}$ -Rezeptoren<sup>56</sup>, welche nun wiederum vorbeiziehende Thrombozyten aktivieren, was zu deren Adhäsion und Aggregation und der Bildung von fibringestützten Thromben auf der Oberfläche führt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten an der Oberfläche eines blutkontaktierenden Biomaterials.

Bei der Aktivierung von Thrombozyten werden auch große Mengen  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG) freigesetzt, was die Rekrutierung von Leukozyten fördert<sup>57,58</sup>. Diese Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, haften über das Adhäsionsmolekül CD11b/CD18<sup>59,60</sup> am adsorbierten Fibrinogen. Parallel dazu fördern die anhaftenden aktivierten Thrombozyten über die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche die Leukozytenadhäsion über eine Wechselwirkung mit dem leukozytären P-Selektin-Glykoproteinligand-1 (PSGL-1)<sup>61</sup>, ebenso wie die aktivierten Komplementkomponenten<sup>62</sup>. Zusätzlich zur Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies können anhaftende

Leukozyten Signalmoleküle wie den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), Interleukine und Tumornekrosefaktoren freisetzen, welche wiederum die lokale Thrombozytenaktivierung verstärken und die Expression des Gewebefaktors Faktor III durch umgebende Monozyten induzieren <sup>55</sup>.

Im Gegensatz zur rezeptorvermittelten Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Proteinschicht auf der Implantatoberfläche, ist die Adhäsion der roten Blutkörperchen passiv <sup>63</sup>. Adhärente Erythrozyten können ADP freisetzen, welches die Thrombozyten aktiviert, und unter hohen Scherbedingungen kann es zur Erythrozyten-Hämolyse kommen. Daher fördert die Proteinadsorption an künstlichen Oberflächen die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, und die Adhäsion der Erythrozyten folgt.

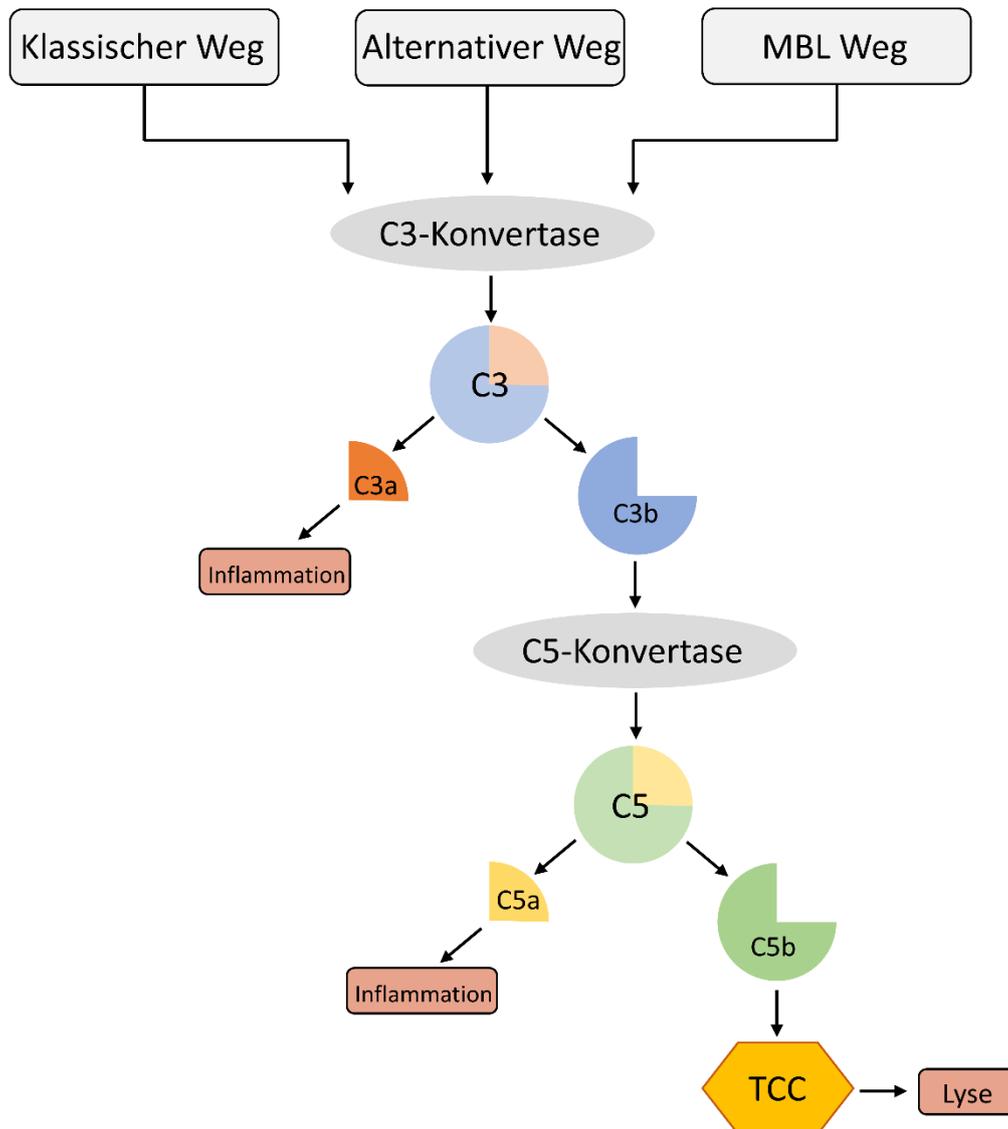
### 1.3.3 Aktivierung des Komplementsystems

Die akute Entzündungsreaktion, die durch den Kontakt des Biomaterials mit Blut ausgelöst wird, ist ähnlich derer, des physiologischen Wund- und Frakturheilungsprozess <sup>64</sup> und besteht aus zellulären und molekularen Komponenten. Ausmaß und Dauer des Entzündungsprozesses haben einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und Verträglichkeit des implantierten Biomaterials <sup>65</sup>. Die Fremdkörperreaktion beginnt innerhalb von Sekunden oder Minuten nach dem Gewebekontakt <sup>66</sup> mit der Bildung eines „Konditionierungsfilm“ aus Komplementfaktoren und Antikörpern, auf der Implantatoberfläche <sup>67</sup>.

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Proteinen, die im Blut zirkulieren und als membranassoziierte Proteine vorliegen <sup>68</sup>. Als Reaktion auf das Erkennen fremder Oberflächenstrukturen werden Komplementfaktoren in einer Enzymkaskade über drei verschiedene Wege aktiviert: Den klassischen, den alternativen oder den Mannosebindendes-Lektin-(MBL)-Weg. Alle Wege führen zur Bildung der Serinprotease C3-Konvertase, welche den Komplementfaktor C3 in zwei Fragmente spaltet: Das kleine Fragment C3a wirkt als Anaphylatoxin und fördert Entzündungen und das große Fragment C3b, wirkt als Opsonin und bildet einen Teil der C5-Konvertase. Dieser Enzymkomplex spaltet den Komplementfaktor C5 in seine Untereinheiten C5a, ebenfalls ein Anaphylatoxin, und C5b, welches an die fremde Oberfläche bindet und die Bildung des terminalen Lysekomplexes (C5b-9, TCC) initiiert. Infolgedessen sollen als fremd

## Einleitung

erkannte Strukturen, wie Mikroorganismen, durch Lyse, Opsonierung und Auslösen einer Reihe von Entzündungsreaktionen eliminiert werden.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Aktivierung des Komplementsystems ausgehend von der Serinprotease C3-Konvertase bis zur Bildung des terminalen Lysekomplexes.

Die Komplementaktivierungsprodukte C3a und C5a führen zu einer erhöhten Expression von P-Selektin, welches die Vermittlerposition bei der Rekrutierung von Neutrophilen und der Akkumulation von Thrombozyten übernimmt <sup>69</sup>. C5a ist das stärkste Anaphylatoxin: Es erhöht die Durchlässigkeit der Blutgefäße um neutrophile Granulozyten und Monozyten anziehen und zu aktivieren, mit dem Ziel die Phagozytose zu stimulieren <sup>70</sup>. Gleichzeitig stimuliert C5a die Endothelzellen zur verstärkten

Expression von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selektin<sup>71</sup>. Darüber hinaus kann es an Mastzellen binden und die Entzündung verstärken und ist in der Lage, die Freisetzung des Gewebefaktors Faktor III aus Neutrophilen und Monozyten auszulösen, wodurch die Gerinnungskaskade über den extrinsischen Weg in Gang gesetzt werden kann<sup>72</sup>. Es besteht also eine enge Verbindung zwischen der Aktivierung des Komplementsystems und dem durch C5a vermittelten Gerinnungsweg<sup>73</sup>.

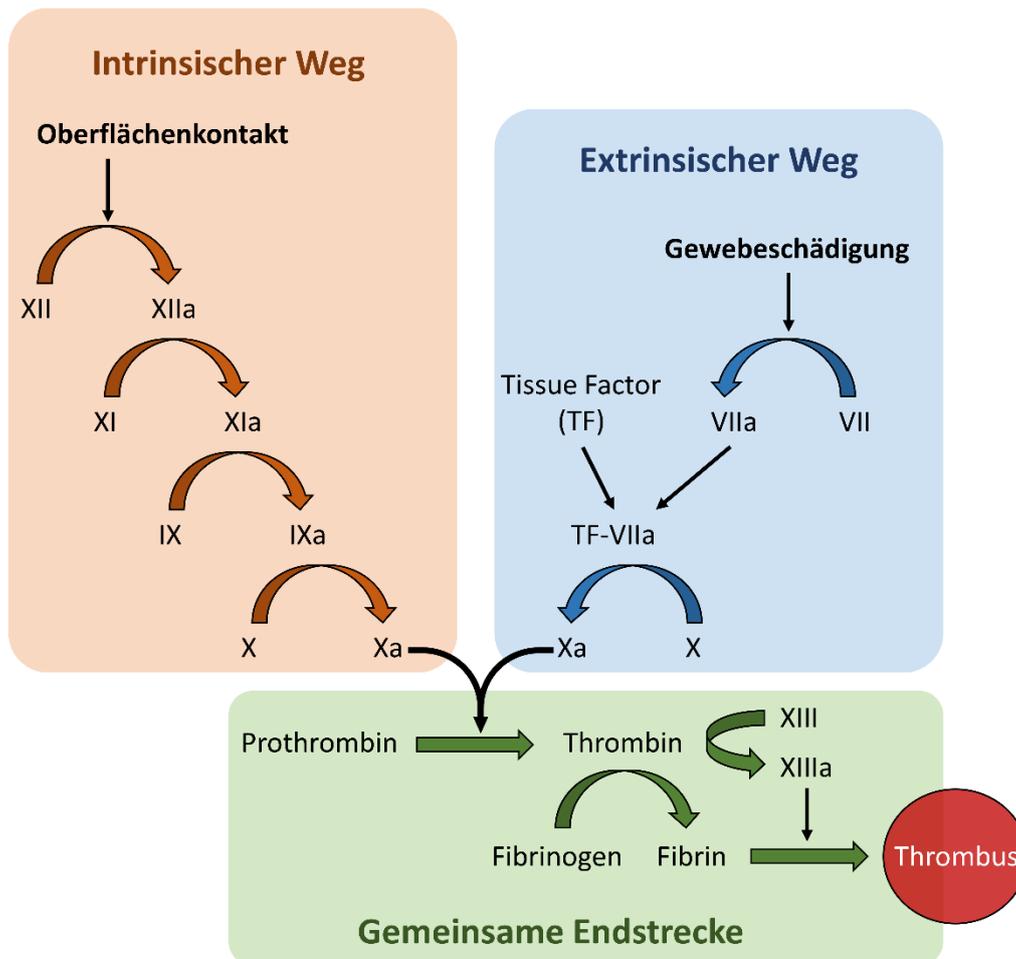
### 1.3.4 Aktivierung der Gerinnungskaskade

Die Oberfläche von Biomaterialien kann die Koagulation in kontaktierendem Blut induzieren, ähnlich dem hämostatischen Vorgang, der bei einer Verletzung zur Kontrolle des Blutverlustes ausgelöst wird. Dies stellt eine Herausforderung für die Anwendung von Biomaterialien dar, da die Thrombusbildung die Funktion der Medizinprodukte wesentlich beeinträchtigen und Embolien sowie Infarkt verursachen kann. Die Leistungsfähigkeit und Sicherheit von Biomaterialprodukten wie Kathetern, Gefäßprothese und vaskulären Stents wird dadurch erheblich geschmälert<sup>74</sup>.

Die Interaktion von Plasmaproteinen mit künstlichen Biomaterialoberflächen löst durch Kontaktaktivierung den intrinsischen Koagulations-Pathway aus: Das verantwortliche plasmatisches Kallikrein-Kinin-System (KKS) besteht aus den drei Serinproteinasen Faktor XII, Faktor XI und plasmatischem prä-Kallikrein (PK) sowie dem Kofaktor HMWK<sup>75</sup>.

Der Kontakt des Blutes mit künstlichen, negativ geladenen Oberflächen führt zur Umwandlung des Faktors XII in das aktive Enzym Faktor XIIa. Faktor XIIa konvertiert ebenfalls Faktor XI zu aktiviertem Faktor XIa. Dieser aktiviert dann im folgenden Schritt Faktor IX zu IXa, welcher schlussendlich Faktor X aktiviert. Die Umwandlung von Faktor X in Faktor Xa ist der erste gemeinsame Schritt in der Gerinnungskaskade durch den intrinsischen und extrinsischen Weg<sup>76</sup>.

Der Faktor Xa wandelt Prothrombin in Thrombin um, welches Fibrinogen zu Fibrinmonomeren hydrolysiert. Thrombin wirkt ebenfalls als potenter Thrombozytenagonist und fördert dadurch die lokale Thrombozytenaggregation. Die Fibrinmonomere polymerisieren und werden durch den ebenfalls vom Thrombin aktivierten Faktor XIIIa quervernetzt. Die Fibrinstränge stabilisieren die Thrombozytenaggregate, wodurch ein Thrombozyten-Fibrin-Thrombus entsteht<sup>77</sup>.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Aktivierung der Gerinnungskaskade über den intrinsischen Weg nach Oberflächenkontakt oder den extrinsischen Weg nach Gewebeschädigung mit gemeinsamer Endstrecke die zur Thrombusbildung führt.

Faktor XIIa wandelt ebenfalls PK in aktives Kallikrein und HMWK in Bradykinin um. Kallikrein und Bradykinin fördern nicht nur die Gerinnung, sondern auch entzündliche Reaktionen<sup>78</sup>: Kallikrein kann Neutrophile direkt aktivieren<sup>79</sup>, und Bradykinin kann die Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO)<sup>80</sup>, TNF alpha (TNF  $\alpha$ ) und Interleukin 1(IL-1)<sup>81</sup> stimulieren.

## 1.4 Wundheilung

Die Verwendung eines Biomaterials als Implantat geht in den meisten Fällen mit einem invasiven Eingriff wie dem Einsetzen einer Gelenkprothese, der Fixation eines Knochenbruchs mit Schrauben und Platten oder auch dem Legen eines Stents über einen Zugang in der Femoralarterie einher.

Die dabei entstehende Wunde im Gewebe ist definiert als Verlust der Integrität eines Organs durch exogene Einflüsse<sup>82</sup>. Ziel der Wundheilung ist es daher, die Integrität und Funktion des geschädigten Gewebes wiederherzustellen um unerwünschte Folgen wie die Besiedlung mit Pathogenen, inflammatorische Reaktionen oder Blut- und Lymphzirkulationsstörungen zu vermeiden<sup>82</sup>.

Bei der Heilung einer akuten Wunde läuft ein komplexer, genau regulierter Reparaturprozess in drei zeitlich überlappenden Phasen ab<sup>83,84</sup>. Die erste Phase der Wundheilung dient dem Abräumen von Gewebetrümmer sowie der Wundreinigung<sup>85</sup>: Diese inflammatorische Phase kann mehrere Tage andauern und beginnt mit der Adhäsion von Thrombozyten am Endotheldefekt verletzter Gefäße durch den Von-Willebrand-Faktor bindenden Rezeptor GPIIb-IIIa<sup>86</sup>. Durch die Sekretion von ATP, PAF oder Serotonin aus den Thrombozyten kommt es dabei zu einer Konstriktion der verletzten Gefäße und zur Aggregation der Thrombozyten durch Fibrinogenmoleküle<sup>87</sup>. Da der aus Thrombozyten bestehende „weiße Thrombus“ nicht stabil genug ist, das Gefäß dauerhaft zu verschließen, wird durch Aktivierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren die Gerinnungskaskade aktiviert. Dieser Vorgang resultiert in der Aktivierung von Thrombin, was die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert, wodurch ein stabiles quervernetztes Gerüst entsteht, welches die verletzte Gefäßstelle fest verschließt und als Matrix für einwandernde Zellen dient<sup>86</sup>. Die Thrombozyten im Wundpfropf setzen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren frei und rekrutieren damit andere Zellen in das Wundgebiet<sup>88</sup>. Zuerst tauchen neutrophile Granulozyten auf und sorgen mit der Bildung von ROS für die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen<sup>89</sup>. Zeitgleich bauen sie Zellstrukturen und Gewebetrümmer durch Phagozytose ab. Zusammen mit den Granulozyten wandern auch Monozyten ins Wundgebiet ein, welche dort zu Makrophagen differenzieren<sup>90</sup>. Durch die Gewebemakrophagen wird eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sezerniert, welche die Fibroblasten im umliegenden Gewebe zur Proliferation anregen<sup>91</sup>.

In der zweiten Phase der Wundheilung ist das Ziel neues Gewebe aufzubauen und entstandene Defekte aufzufüllen<sup>85</sup>. Die Bildung des Granulationsgewebes geht auf die Fibroblasten zurück<sup>92</sup>, welche der zelluläre Anteil des Bindegewebes sind und aus dem unverletzten Nachbargewebe in den Wundherd einwandern. Sie migrieren in das bei der Gerinnung entstandene Fibrinnetz und bilden eine neue extrazelluläre Matrix<sup>83</sup>. Durch den transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ), den thrombozytären

Wachstumsfaktor (PDGF) und den fibroblastären Wachstumsfaktor (FGF) werden die Fibroblasten zur Proliferation, Migration und Synthese neuer Kollagenmoleküle angeregt<sup>87</sup>. Die dadurch gebildete Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern und Proteoglykanen, welche das Granulationsgewebe stabilisiert<sup>93</sup>. Zusätzlich exprimieren die Fibroblasten Fibronectin, welches in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird und eine Bindestelle für Integrin-Proteine anderer Zellen darstellt<sup>94</sup>, damit sich diese dort verankern und proliferieren können. Um eine ausreichende Versorgung des neu gebildeten Gewebes zu gewährleisten, wird ausgehend von den Blutgefäßen am Wundrand die Angiogenese angeregt<sup>95</sup>. Dazu werden Endothelzellen durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und FGF zur Proliferation angeregt, sodass sie in röhrenförmiger Anordnung in das Wundgebiet eindringen und neue Gefäßstrukturen ausbilden<sup>96</sup>.

Während der dritten und abschließenden Wundheilungsphase kommt es zur Reepithelialisierung und der Gewebedefekt wird unter Bildung einer Narbe verschlossen<sup>97</sup>. Das Granulationsgewebe strukturiert sich durch zunehmende Dehydrierung zu Narbengewebe um und verfestigt sich während die Gefäße zurückgebildet werden<sup>98</sup>. Myofibroblasten koordinieren dabei die Annäherung der Wundränder um die zu epithelialisierende Defektfläche zu minimieren<sup>99</sup>. Wundrandkeratinozyten sowie epitheliale Stammzellen aus der äußeren Haarwurzelscheide der Haarfollikel sind dabei der Ausgangspunkt für die Regeneration der Epidermis<sup>100</sup>: Die Zellmigration geschieht durch eine wiederkehrende Reorganisieren des Zytoskeletts der Keratinozyten wodurch die Zellschicht an der Oberfläche passiv in Richtung Wundzentrum verrückt wird<sup>93</sup>. Dieser Bewegungszyklus wird durch Ausbildung und Kontraktion von Mikrofilamenten aus Aktin ermöglicht, deren Reorganisation durch die Rho-GTPasen enzymatisch reguliert wird<sup>101,102</sup>. Der Prozess stoppt wenn die Zellfortsätze mehrerer migrierender Keratinozyten in Kontakt miteinander treten und die Aktinfilamente zu Intermediärfilamenten umgewandelt werden und über Desmosomen mit den anderen Zellen verknüpft werden<sup>103</sup>. Damit ist die Wundheilung abgeschlossen.

### 1.5 Untersuchung der Hämokompatibilität von Biomaterialien

#### 1.5.1 Regulatorische Vorgaben

Der zunehmende Verwendung von Biomaterialien in Form von Gefäßprothesen, Stents oder Kathetern, welche vorübergehend oder dauerhaft im Körper verbleiben, erfordert einen verlässlichen und multiparametrischen Ansatz, der mögliche hämatologische Komplikationen, wie die Aktivierung und Zerstörung von Blutbestandteilen, durch das Produkt aufzeigen und bewerten kann <sup>104</sup>.

Die geltenden Vorgaben der Internationalen Organisation für Normung (ISO) dafür, wurde in Deutschland durch die DIN EN ISO 10993-4 umgesetzt <sup>105</sup>. Darin sind Prüfverfahren festgelegt, die es ermöglichen die Wechselwirkungen zwischen Medizinprodukten und Blut zu beurteilen: „Bei der Auswahl und Gestaltung von Prüfverfahren für die Wechselwirkungen von Medizinprodukten mit Blut sollten die Gestaltung des Produkts, seine Werkstoffe, der klinische Nutzen, die Umgebung des Anwendungsfeldes und das Risiko-Nutzen-Verhältnis berücksichtigt werden“ <sup>106</sup>. Umfassende In-vitro-Hämokompatibilitätstests von blutkontaktierenden Implantaten sind daher der erste Schritt zu einer erfolgreichen In-vivo-Implementierung <sup>104</sup>.

#### 1.5.2 Testmodelle und Testparameter

Für eine zuverlässige, aussagekräftige und unverfälschte In-vitro-Hämokompatibilitätstestung ist die Qualität des verwendeten Blutes von äußerster Wichtigkeit: Voraussetzung dafür ist eine atraumatische Blutentnahme durch Minimierung der Venostase während der Abnahme und die Verwendung von 21-Gauge-Nadeln, um die Voraktivierung von Thrombozyten und der Gerinnungskaskade während der Entnahme zu minimieren <sup>107</sup>. Das so gewonnene Blut soll so schnell wie möglich verwendet werden, denn nach über 4 h stationärer Lagerung wird die Thrombozytenfunktion und die Aktivität der Leukozyten merklich beeinflusst <sup>108</sup>. Zudem soll es sich bei den Blutspendern um gesunde Personen handeln, bei denen der Hämostaseprozess nicht durch Nikotinabusus <sup>109</sup>, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva <sup>110</sup>, eine Schwangerschaft <sup>111</sup> oder die Einnahme von Medikamenten (z.B. Acetylsalicylsäure, Naproxen oder Carbenicillin <sup>112-114</sup>) beeinflusst wird.

Zur Durchführung der Hämokompatibilitätsanalyse stehen drei Arten von Modellen zur Verfügung: Bei den statischen Blutinkubationsmodellen wird das Material direkt in einem Probengefäß mit dem Blut inkubiert und ermöglicht damit eine rudimentäre, schnelle Bewertung hinsichtlich der Thrombogenität des Materials <sup>115</sup>. Bei den bewegten Blutinkubationsmodellen wird eine vollständig befüllte Testkammer mit dem Testmaterial auf einer schaukelnden Plattform inkubiert und somit die Zellsedimentation sowie Proteinaggregation durch die Blut-Luft-Kontaktfläche minimiert <sup>116</sup>. Die Klasse der Schwerströmungsmodelle zeichnet sich dadurch aus, dass der vaskuläre Blutstrom imitiert werden kann, wodurch die realen Interaktion zwischen dem Biomaterial und den Blutzellen abgebildet werden kann <sup>117</sup>.

Alternativ könnte die Hämokompatibilitätstestung unter Schwerströmung am Tiermodelle erfolgen, was aber nach Möglichkeit zu vermeiden ist, da Tierblut im Vergleich zu menschlichem Blut wesentliche Unterschiede, insbesondere in Bezug auf die Gerinnung und Thrombozytenfunktion, aufweist <sup>118,119</sup>.

Nach der DIN EN ISO 10993-4 ist die Bewertung folgender fünf Kategorien für die Hämokompatibilitätstestung indiziert: Thrombose, Gerinnung, Thrombozyten, Hämatologie und Komplementsystem. Thrombose ist dabei definiert als In-vivo-Phänomen, das zum teilweisen oder vollständigen Verschluss eines Gefäßes oder Geräts durch einen Thrombus führt <sup>105</sup>. Der Thrombus besteht aus einer Mischung aus Erythrozyten, aggregierten Thrombozyten, Fibrin und anderen zellulären Elementen und kann durch Ex-vivo- oder In-vivo-Methoden, entweder im Tierversuch oder in der klinischen Prüfung charakterisiert werden. Die prozentuale Okklusion wird dabei visuell quantifiziert, nachdem das Implantat in Gebrauch war und entfernt wurde <sup>120</sup>. Für die Gerinnungsanalyse wird die Aktivierung der Gerinnungskaskade untersucht <sup>105</sup>. Zur Charakterisierung der Gerinnungsfähigkeit kann die partielle Thromboplastinzeit (PTT) Messwert herangezogen werden, indem mit Citrat antikoaguliertes Blut rekalkifiziert und die Zeit bis zur Gerinnung nach Zugabe von partiellem Thromboplastin ermittelt wird <sup>121</sup>. Wenn die PTT nach Materialkontakt verkürzt ist, zeigt das eine intrinsische Aktivierung der Gerinnungskaskade an. Bei den Thrombozyten ist vor allem die Zellzahl entscheidend, da sie eine Schlüsselrolle bei der Verhinderung von Blutungen spielt <sup>122</sup>. Ein signifikanter Abfall der Thrombozytenzahl in Blut, das mit einem Testmaterial inkubiert wurde, kann durch Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaggregation oder Blutgerinnung auf der Materialoberfläche verursacht werden. Die Aktivierung der Thrombozyten

kann durch die Quantifizierung von freigesetzten Signalmolekülen aus den Alpha-Granula, wie  $\beta$ -TG oder Plättchenfaktor 4 (PF4) mittels Immunassay ermittelt werden<sup>123,124</sup>. Bei der Hämatologie liegt der Fokus primär auf der Bestimmung der aktivierten Leukozyten sowie der Hämolyse. Die Leukozytenaktivierung kann entweder durch die mikroskopische Untersuchung der Materialoberfläche oder die quantitative durchflusszytometrische Analyse bestimmt werden, wobei auf Aktivierungsmarker wie L-Selektin und CD 11b getestet wird<sup>125,126</sup>. Hämolyse beschreibt die Zerstörung von Erythrozyten. Dieser Vorgang wird durch die Freisetzung von Hämoglobin begleitet, weshalb eine erhöhte Hämoglobin Plasmakonzentration nach der Inkubation mit einer Testmaterial ein direkter Indikator für Hämolyse ist. Hämoglobin kann auch durch die Cyanmethämoglobin-Methode photometrisch quantifiziert werden um eine Aussage über den hämolytischen Charakter einer Materials zu machen<sup>127</sup>. Die Analyse der Komplementaktivierung ist ein relevantes Kriterium bei der Prüfung von Biomaterialien, denn eine quantitative Erhöhung der aktivierten Komplementbestandteile führen wiederum zur Aktivierung von Leukozyten. Die Komplementaktivierung kann durch den quantitativen Nachweis der Spaltprodukte von C3a oder C5a, die enzymatische Aktivität der C3- oder C5-Konvertase oder der Quantifizierung C5b-9-Komplexes analysiert werden<sup>128,129</sup>.

## 1.6 Optimierung von Biomaterialien

### 1.6.1 Senkung der Thrombogenität

Um die Verträglichkeit von Biomaterialien im vaskulären System zu optimieren, liegt der Fokus bei der Entwicklung darauf, die Thrombogenität künstliche Oberflächen zu reduzieren. Damit könnte eine systemische Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern oder Antikoagulantien obsolet werden, die aktuell noch notwendig ist, um den Patienten gegen thrombotische Ereignisse abzusichern.

Da bekannt ist, dass die Proteinadsorption und Zelldeposition auf der Kontaktfläche die Thrombusbildung auslöst, konzentrieren sich die Bemühungen auf Oberflächenmodifikationen, die der Adsorption von Blutproteinen widerstehen sollen. Ansätze zur Verringerung der Protein- und Zelladsorption orientieren sich an dem Konzept, dass die Proteinadsorption an der Oberfläche durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem adsorbierten Protein und der künstlichen Oberfläche

begünstigt wird <sup>130</sup>. Verschiedene synthetische und natürliche Materialien wurden bezüglich ihrer Fähigkeit diesen Prozess zu modulieren untersucht: Beispielsweise induziert das globuläre Protein Albumin im Vergleich zu Plasmaproteinen wie Fibrinogen eine geringere Thrombozytenadhäsion <sup>131,132</sup>, weshalb Albumin prädestiniert für die Verwendung in einer inerten thromboresistenten Beschichtung ist <sup>133,134</sup>.

Alternativ wird ein biomimetischer Ansatz zur Materialoptimierung verfolgt, bei dem bestehende biologische Strukturen künstlich nachgeahmt werden sollen. Dazu zählt die Verwendung von Phosphorylcholin-Beschichtungen auf der Oberfläche von blutkontaktierenden Materialien. Phosphorylcholin ist das vorherrschende Lipid auf der Außenseite nicht-aktivierter Zellmembranen und widersteht Protein- und Zelladhäsion aufgrund seiner hydrophilen Struktur und der zwitterionischen polaren Kopfgruppe, die bei physiologischem pH-Wert elektrisch neutral ist <sup>135</sup>. Auch die kovalente Bindung von Heparinmolekülen an das Material wird zur Erzeugung von biomimetischen Oberflächen genutzt: Heparin ist ein Analogon des Glykosaminoglykans Heparansulfat, welches in großen Mengen in Endothelgeweben exprimiert wird, antikoagulatorisch sowie antiinflammatorisch wirkt <sup>22,136</sup>. Die Wirkung von Heparin resultiert primär aus der Komplexbildung mit Antithrombin III wodurch dessen Aktivität um das 1000-fache gesteigert wird. Durch den Heparin-Antithrombin III-Komplex wird Prothrombin inaktiviert und die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen verhindert <sup>137</sup>.

### 1.6.2 Förderung der Endothelialisierung

Der Erfolg von blutkontaktierenden Biomaterialien, einschließlich vaskulärer Gefäßprothesen, Stents und Herzklappen ist von ihrer Fähigkeit abhängig, gegenüber Thrombosen, intimaler Hyperplasie und Verkalkung zu bestehen. Im nativen Gewebe spielt das Endothel eine wichtige Rolle bei der Hemmung dieser Prozesse. Verschiedene Optimierungsstrategien zielen daher darauf ab, die Endothelialisierung von Oberflächen entweder bereits vor der Implantation oder in-situ zu induzieren und zu beschleunigen <sup>138</sup>. Durch die vollständige Besiedelung der Materialoberfläche mit (autologen) Endothelzellen soll die Thrombozytenadhäsion, Thrombusformation und Infiltration inflammatorischer Zellen verhindert werden <sup>139</sup>.

Eine Strategie zur Förderung der Endothelialisierung von Biomaterialoberflächen besteht darin, Eigenschaften der physiologischen extrazellulären Matrix (ECM) zu imitieren und die Zelladhäsion zu fördern <sup>140</sup>. Dazu kommt die Verwendung funktioneller

ECM-Proteine wie Kollagen, Fibronectin, Laminin und Vitronectin in Frage, die entweder aus bestehender ECM extrahiert und aufgereinigt oder rekombinant hergestellt werden<sup>141</sup>. Ergänzend dazu hat sich auch die Verwendung von spezifischen ECM-Peptidsequenzen, die direkt mit den Zellrezeptoren interagieren und von Ankerproteinen wie Fibronectin oder Laminin oder Kollagen Typ I angeleitet sind bewährt<sup>142–144</sup>.

Des Weiteren stellen die zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) im menschlichen Blut eine bedeutsame Quelle autologer Stammzellen für die In-vivo-Endothelialisierung von blutkontaktierenden Materialien dar: Dazu können die Materialoberflächen mit Fängermolekülen beschichtet werden, die natürliche Homing-Faktoren nachahmen und zirkulierende EPCs anziehen<sup>145</sup>. Es konnten verschiedene Liganden wie Aptamere, monoklonale Antikörper, Peptide, Selektine oder magnetische Moleküle eingesetzt werden, um Oberflächen für die Anlagerung endothelialer Vorläuferzellen aus der Blutbahn zu funktionalisieren<sup>146–149</sup>. Anschließend können die angedockten EPCs zu Endothelzellen differenzieren und ein autologes Endothel erzeugen auf dem Biomaterial generieren.

### 1.6.3 Förderung der Wundheilung

Modifizierte Biomaterialien zur Wundversorgung sollen modulierend in den physiologischen Prozess der Wundheilung eingreifen und ihn gezielt verbessern. Dazu können Präparate mit Kollagenen, Hyaluronsäure, Wachstumsfaktoren und Nano-Oligo-Saccharid-Faktor zum Einsatz kommen<sup>150</sup>. Ziel der therapeutischen Intervention ist es beispielsweise die Aktivität der Matrixmetalloproteasen (MMPs) zu regulieren. Diese sind zwar für die Wundreinigung essenziell, zerstören aber bei Überaktivität neu gebildetes Gewebe, wenn sie in zu hoher Konzentration vorkommen<sup>84</sup>. Zur Förderung der Wundheilung sind Kollagenaufgaben ebenfalls induziert: MMPs degradieren das zugeführte Kollagen im Wundbett und durch die Stoffwechselprodukte werden zusätzliche Fibroblasten rekrutiert, welche physiologische Kollagene im Wundareal sekretieren<sup>151</sup>. Zusätzlich wird die Proteaseaktivität reguliert und proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$ , -6 und -8 werden gebunden was zu einer Milderung des aggressiven Wundmilieus führt<sup>152</sup>.

Auch Hyaluronsäure ist ein potenter Mediator im Wundheilungsprozess, der in Biomaterialien inkorporiert werden kann: Die Applikation von Hyaluronsäure wirkt sich positiv in allen Wundheilungsphasen aus, ermöglicht die Modulation inflammatorischer

Prozessen, die Aufrechterhaltung des Feuchtigkeitsspiegels in der Wunde sowie die Anregung von Neoangiogenese, Fibroblastenproliferation und Migration von Epithelzellen<sup>153</sup>. Bei Wunden mit problematischem Heilungsverlauf ist auch eine Anreicherung der Wundauflagen mit rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren denkbar. Durch eine endogene Zufuhr von PDGF, FGF, TGF- $\beta$  oder VEGF kann ein vollständiger Wundverschluss erreicht werden<sup>154</sup>.

### 1.6.4 Biomaterialien zum Transport von messenger RNA

Messenger-RNA (mRNA)-basierte Therapien gelten als potentielle Behandlungsmethoden für eine Vielzahl von Erkrankungen: Da jedes Protein durch mRNA codiert und unter physiologischen Bedingungen in den Zielzellen exprimiert werden kann, eröffnet sich ein weites Feld für die Entwicklung von Vakzinen, Therapeutika zur Behandlung von monogenetischen Erkrankungen und Anwendung in der regenerativen Medizin<sup>155–157</sup>. Ebenso ist es möglich durch eine bioaktive mRNA-Beschichtung die Thrombogenität von Implantatoberflächen zu senken, indem mRNA welche für das ADP-hydrolysierende CD39-Protein kodiert auf der Materialoberfläche immobilisiert wird, um in einem zeitabhängigen Manier freigesetzt und translatiert zu werden und wodurch die Thrombozytenaggregation lokal inhibieren werden soll<sup>158</sup>.

mRNA besitzt als Therapeutikum mehrerer Vorteile gegenüber der DNA-Applikation: Für die Transfektionsaktivität muss die mRNA nicht in den Nukleus eingeschleust werden und somit besteht nicht das Risiko einer falsch lokalisierten Integration in das Wirtsgenom<sup>159</sup>. Die Transfektionseffizienz ist nicht vom Zellzyklus abhängig und die Expression des gewünschten Gens tritt schnell ein und ist steuerbar. Anders als bei der DNA-Transfektion kann bei der Transfektion von mRNA das Expressionslevel des gewünschten Gens durch die Menge transfizierter mRNA und die Transfektionsfrequenz gesteuert werden<sup>160,161</sup>. Durch strukturelle Modifikationen während der Synthese und den Einsatz von modifizierten Nukleotiden konnte die Stabilität sowie die Transfektionseffizienz von In-vitro-generierter mRNA gesteigert werden<sup>162,163</sup> und gleichzeitig das Immunaktivierungspotential signifikant gesenkt werden<sup>164,165</sup>.

Mit  $10^5$ - $10^6$  Dalton (Da) sind mRNA-Moleküle zu groß für eine ungehinderte Diffusion in das Zytosol, und ihre durch das Phosphatrückgrad bedingte negative Ladung stößt sie elektrostatisch von der anionischen Zellmembran ab<sup>166</sup>. Für spezifische Anwendungen ist es möglich, die unverhüllte mRNA lokal zu injizieren<sup>167</sup>, jedoch erfordern

die meisten therapeutischen Anwendungen eine systemische Verabreichung. Dies kann durch nanopartikuläre Biomaterialien erreicht werden, welche die mRNA inkapseln und auf dem Weg zum Zytoplasma der Zielzellen eine Reihe von extrazellulären und intrazellulären Barrieren überwinden. Am häufigsten werden dazu kationische Lipide oder kationische Polymere verwendet<sup>168</sup>: Dabei bilden die positiv geladenen Lipid- oder Polymerpartikel Komplexe mit der negativ geladenen Nukleinsäure. Je nach verwendetem Ausgangsmaterial spricht man bei den gebildeten Komplexen von Lipoplex oder Polyplexen<sup>161</sup>. Diese mRNA-Komplexe werden dann mittels Endozytose durch die Zellmembran ins Zytosol transportiert.

Lipoplex-Formulierungen basieren typischerweise auf Materialien, die polare Kopf- und apolare Schwanzgruppen enthalten, da die hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen zwischen diesen Gruppen die Vesikelbildung anregen<sup>169</sup>. Die ersten liposomalen Komponenten die zur Verabreichung von Nukleinsäuren verwendet wurden, sind kationische Lipide wie DOTMA (1,2-Di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propan), die aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung freiwillig Komplexe mit anionischen Nukleinsäuren, einschließlich mRNA, bilden<sup>170</sup>. Andere Lipide wie das kationische DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan) und das zwitterionische DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) konnten ebenfalls allein oder in Kombination mit anderen Materialien erfolgreich zur mRNA-Delivery eingesetzt werden<sup>171,172</sup>. Der hohe Grad an Wirksamkeit bei verschiedenen Zelllinien und die Reproduzierbarkeit der Formulierung aus kationischen Lipiden, hat zu einer Vielzahl kommerzieller erhältlicher Produkte geführt (z. B. *Lipofectamine*), die für die mRNA Applikation, auch In-vivo, verwendet werden können<sup>173-175</sup>.

Obwohl sie klinisch noch nicht so ausgereift sind wie Lipidsysteme, haben auch Polymere ein beträchtliches Potenzial für den Einsatz zum Transport therapeutischer mRNA. Kationische Polymere sind vor allem aufgrund ihrer flexiblen Eigenschaften bezüglich Design, Formulierung und Funktionalisierbarkeit interessant<sup>176</sup>. Polyethylenimin (PEI) wurde dafür erstmals 1995 verwendet und ist heute in mehreren in vivo Studien zur Testung von nicht-viralen Transfektionsmittel In-vivo im Einsatz<sup>177</sup>. Ein großer Nachteil bei der Verwendung von PEI war jedoch der säurevermittelte Abbau im Endosom während der Endozytose. Um dem zu entgehen liegt der Schwerpunkt der Entwicklung aktuell auf der Erhöhung der Pufferkapazität von PEI durch chemische Modifikationen<sup>178</sup>. Mit der kommerziell erhältlichen *Viromer*-Technologie gelang es,

## Einleitung

---

ein PEI-basiertes Transfektionsmittel zu schaffen, welches dem Abbau durch Endosomen widersteht. Hierbei wurde die PEI-Kernstruktur mit hydrophoben und anionischen Seitenketten modifiziert, sodass ein Polyplex mit neutraler Oberflächenladung entsteht <sup>179</sup>.

## 2 Zielsetzung

Der Einsatz von Biomaterialien in der modernen Medizin als Stent, Implantatmaterial oder zur Wundversorgung hat einen großen Beitrag zur Patientenversorgung geleistet und erhöhte die Mobilität und Lebensqualität der Betroffenen nachhaltig.

Jedoch kommt es mit dem steigenden Einsatz von Biomaterialien in der klinischen Anwendung auch zu einer Häufung von unerwünschten Biomaterial-assoziierten Komplikationen: Beim Einsatz von blutkontaktierenden Biomaterialien muss immer berücksichtigt werden, dass thrombotische Reaktionen induziert werden können oder es zu initialen Immunreaktion bis hin zu chronischen Entzündungen kommen kann. Zudem sind chirurgisch implantierte Materialien anfällig für Infektionen, da die lokale Gewebeabwehr durch das Operationstrauma beeinträchtigt ist. Diese Umstände sind oftmals vorher nicht absehbar und können den Heilungsverlauf negativ beeinflussen oder sogar einen erneuten operativen Eingriff nötig machen.

Daher war das Ziel der vorliegenden Dissertation Biomaterialien hinsichtlich präklinischer Testung, Thrombogenität, Endothelialisierung und Wundheilungsförderung zu optimieren.

Dabei sollte:

- (1) Ein dynamisches In-vitro-Modell zur Hämkompatibilitätstestung etabliert werden, welches die Bewertung tubulärer Materialien gemäß DIN EN ISO 10993-4 ermöglicht.
- (2) Eine Beschichtung für neurovaskuläre Stents hinsichtlich Reduktion der Thrombogenität und Förderung der Endothelialisierung evaluiert werden.
- (3) Eine bioaktive Beschichtung zur Unterstützung der Zellproliferation und Wundheilung für chirurgisches Nahtmaterial entwickelt werden.

Um diese Ziele zu erreichen, sollte zunächst ein dynamisches Modell für die Inkubation von tubulären Implantaten mit humanem Vollblut etabliert werden, welches es ermöglicht die Hämkompatibilität verschiedener Materialien basierend auf einer Analyse hämatologischer Parameter zu bewerten. Im nächsten Schritt sollte dieses Modell für die Evaluierung einer neuartigen Nano-Beschichtung für neurovaskuläre Stents angewendet werden und im weiteren Verlauf die endothelialisierungsfördernden Charakteristika dieser Beschichtung getestet werden. Weiterhin soll eine neuartige messenger RNA-Beschichtung entwickelt werden, welche die Wundheilung und Zellproliferation durch

## Zielsetzung

---

die autologe Expression von Wachstumsfaktoren fördern und beispielhaft auf chirurgischem Nahtmaterial aufgebracht werden soll.

Die vorliegende Arbeit stellt einen weiteren wichtigen Schritt in Richtung Optimierung von Biomaterialien für die klinische Anwendung dar, damit die heute bestehenden Probleme hinsichtlich einer ungewollten Gerinnungsaktivierung oder Immunantwort sowie einer schlechten Wundheilung überwunden werden können.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Publikation I

##### **Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow**

**Antonia Link**, Giorgio Cattaneo, Eduard Brynda, Tomas Riedel, Johanka Kucerova, Christian Schlensak, Hans Peter Wendel, Stefanie Krajewski, Tatjana Michel

**Journal of Visualized Experiments**

Veröffentlicht am: 05.03.2020

##### **Zusammenfassung:**

Der zunehmende Einsatz von Medizinprodukten (z.B. Gefäßprothesen, Stents und Herzkatheter) für den temporären oder dauerhaften Verbleib im Gefäßsystem des Körpers, erfordert einen zuverlässigen und multiparametrischen Ansatz, mit welchem die möglichen hämatologischen Komplikationen dieser Produkte (z.B. Aktivierung und Zerstörung von Blutbestandteilen) abgeschätzt werden können. Eine umfassende In-vitro-Hämokompatibilitätstestungen gemäß der Richtlinie 10993-4 der internationalen Organisation für Normung ist daher vor der klinischen Anwendung obligatorisch.

Das entwickelte Flow Loop Modell beschreibt eine empfindliche Testmethode, um den hämostatischen Effekt von neurovaskulären Stents und tubulären Implantaten zu analysieren und potenzielle Nebenwirkungen aufzudecken. Hierfür wurde frisches humanes Vollblut unter geringer Stauung entnommen, um die Voraktivierung der Blutbestandteile zu vermeiden. Ein heparinierter Schlauch, welcher das zu testende Implantat enthielt, wurde mit Blut befüllt, mit einer peristaltischen Pumpe verknüpft und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Es wurde ein Schlauchinnendurchmesser von 3.2 mm und eine Flussrate von 150 mL/ min gewählt, um physiologische zerebrale Strömungsbedingungen und Arteridurchmesser zu imitieren.

Vor und nach der Perfusion wurden hämatologische Marker (d.h. Blutbild, Hämoglobin, Hämatokrit und plasmatische Marker), welche die Aktivierung von Leukozyten, Thrombozyten, dem Gerinnungssystem und der Komplementkaskade anzeigen, analysiert.

## Ergebnisse

---

Beim Vergleich von unbeschichteten mit Fibrin-Heparin-beschichteten neurovaskulären Stents zeigen die Ergebnisse der umfassenden Hämokompatibilitätstestung eine verbesserte Blutverträglichkeit bei den beschichteten Stents. Die unbeschichteten Stents induzieren eine Aktivierung der Gerinnungskaskade, was sich durch einen Anstieg der TAT-Komplex-Konzentration und eine Verminderung der Plättchenzahl, aufgrund der Adhäsion der Thrombozyten an der Stentoberfläche, zeigte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass diese Methode eine breite Analyse verschiedener Parameter wie Blutzellzahlen und verschiedene plasmatische Hämokompatibilitätsmarker nach Blutkontakt ermöglicht. Mit Hilfe dieses Testmodells können potenzielle Unterschiede bezüglich der Blutverträglichkeit verschiedener Biomaterialien erkannt werden.

### 3.2 Publikation II

#### **In vitro Investigation of an Intracranial Flow Diverter with a Fibrin-based, hemostasis mimicking, Nanocoating**

**Antonia Link**, Tatjana Michel, Martin Schaller, Tina Tronser, Stefanie Krajewski, Giorgio Cattaneo

**Biomedical Materials**

Akzeptiert am: 09.11.2020

#### **Zusammenfassung:**

Bei intrakraniellen Aneurysmen handelt es sich um sackartige Ausstülpungen der Gefäßwand von Hirnarterien. Eine Ruptur dieser Aneurysmen kann lebensbedrohliche Subarachnoidalblutung zur Folge haben, welche schwere Behinderung sowie den Tod nach sich ziehen können.

Die Anwendung von Flow Divertern zielt auf die Behandlung intrakranieller Aneurysmen durch gefäßmodellierende Mechanismen ab, wobei das komplexe Implantationsverfahren sowie die hohe Metaldichte der Oberfläche in der klinischen Praxis immer noch ein Risiko für thromboembolische Komplikationen darstellen. Deshalb wurde eine Nanobeschichtung auf Fibrin- und Heparinbasis, die als hämokompatibles Gerüst für die Bildung der Neointima gilt, hinsichtlich Thrombogenität und Endothelialisierungspotential untersucht.

Die Fibrin-Heparin-Beschichtung wurde im Vergleich mit unbeschichteten sowie mit Fibrin- oder Heparin-beschichteten Flow Divertern getestet: Dazu wurden die Implantate sowohl im Flow Loop Modell als auch im Chandler Loop Modell mit humanem Vollblut inkubiert und die resultierenden Zellzahlen sowie die Sekretion von plasmatischen Entzündungs- und Gerinnungsmarkern analysiert. Die Möglichkeit zur Endothelialisierung wurde durch ein neu etabliertes, dynamisches Besiedlungsmodell untersucht, bei dem primäre humane Zellen mit den Implantaten inkubiert und anschließend deren Vitalität auf der Biomaterialoberfläche bestimmt wurde.

Die Ergebnisse beider Modelle zeigten, dass das Implantat mit der Fibrin-Heparin-Beschichtung im Vergleich zum unbeschichteten Metallimplantat eine signifikant geringere Neigung zur Auslösung der Thrombozytenadhäsion auf der Stentoberfläche sowie zur Bildung des TAT-Komplexes nach Inkubation mit Blut aufweist. Darüber hinaus

## Ergebnisse

---

wurde die Sekretion von  $\beta$ -TG reduziert, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung von Thrombozyten durch das Aufbringen der Fibrin-Heparin-Beschichtung auf das Implantat vermindert werden kann. Die Vitalität der Endothelzellen auf der Fibrin-Heparin-Beschichtung war vergleichbar zu der des unbeschichteten Implantats, wobei in der Fibrin-Heparin-Gruppe eine leichte, nicht signifikante Verbesserung beobachtet wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Nanobeschichtung das Potenzial hat, thromboembolische Komplikationen in der klinischen Anwendung zu reduzieren, während gleichzeitig die Möglichkeit zur Gefäßregeneration ausgehend von der Bildung einer Neointimalschicht gegeben ist.

### 3.3 Publikation III

#### Development of a Novel Polymer-Based mRNA Coating for Surgical Suture to Enhance Wound Healing

Antonia Link, Hanna Haag, Tatjana Michel, Markus Denzinger, Hans Peter Wendel, Christian Schlensak, Stefanie Krajewski

Coatings

Akzeptiert am: 04.06.2019

#### Zusammenfassung:

Therapeutische Strategien zur Verbesserung der Wundheilung werden zu einer zunehmend wichtigeren medizinischen Aufgabenstellung, denn durch die Behandlung schlecht heilender Wunden steigt die finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem immer weiter.

Zur Unterstützung der Wundregeneration wurde ein neuer Ansatz für eine bioaktive Beschichtung auf polyfilm Nahtmaterial generiert: Die Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)-basierte mRNA-Beschichtung soll die spezifische Transfektion von Zellen im Wundgebiet ermöglichen und durch die induzierte Expression des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (KGF) die Wundheilung durch die Differenzierung und Proliferation von Epithelzellen stimulieren.

Im ersten Schritt wurde evaluiert welches Transfektionsmittel für den Aufbau einer mRNA-haltigen Beschichtung geeignet ist. Die Ergebnisse zeigten, dass das polymerbasierte Transfektionsmittel *Viromer RED* für die direkte Transfektion von eukaryotischen HEK293 Zellen geeignet ist. Die mRNA wird dadurch komplexiert und in ein funktionales Protein translatiert wobei die Transfektionseffizienz höher ist als die des etablierten Transfektionsmittels *Lipofectamine 2000*. Bei der Integration in die PLGA-Beschichtung war eine Zelltransfektion nur dann möglich, wenn *Viromer RED* als Transfektionsreagenz verwendet wurde – mit *Lipofectamine 2000* gelang dies nicht.

Die Transfektion mit eGFP-mRNA durch die Beschichtung gelang ebenso bei den Keratinozyten der HaCaT-Zelllinie sowie primären Fibroblasten. Wenn KGF-kodierende mRNA in der Beschichtung verwendet wurde, war es auch möglich die Expression des Wachstumsfaktors in Hautzelle auszulösen. Darüber hinaus beeinträchtigte die Transfektion über das mRNA-beschichtete chirurgische Nahtmaterial weder die Zellvitalität,

## Ergebnisse

---

noch wurde eine proinflammatorische Reaktion in den transfizierten Zellen induziert. Bei der Inkubation mit humanem Vollblut zeigte sich, dass weder die PLGA-Beschichtung allein noch in Kombination mit der Transfektionsreagenz *Viromer RED* oder der KGF-mRNA einen negativen Einfluss auf die Zellzahlen hatten oder das Gerinnungs-, bzw. Komplementsystem aktivierte.

Diese gewonnenen Erkenntnisse machen die mRNA-PLGA-Beschichtung für die In-vivo-Anwendung sehr attraktiv. Für die Zukunft könnte dies bedeuten, dass durch den Einsatz von mRNA-haltigen Beschichtungen beim chirurgischen Wundverschluss Zellen im Wundgebiet direkt transfiziert werden können, wodurch die Wundheilung beschleunigt und verbessert werden kann.

### 4 Diskussion

Der klinische Erfolg von Biomaterialien und Implantaten ist essenziell für die medizinischen Bedürfnisse einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung in Europa. Ob als Implantatmaterialien oder zur Wundversorgung müssen Biomaterialien mit dem Empfänger kompatibel sein und dürfen weder Zellen noch Biomoleküle schädigen.

Zur Charakterisierung und Optimierung von Biomaterialien die zukünftig in der Klinik Anwendung finden sollen, ist es unabdingbar verlässliche Testsysteme zu etablieren und neue biokompatible und bioaktive Beschichtungen zu entwickeln welche keinen negativen Einfluss auf physiologische Prozesse haben und das Potenzial besitzen den Heilungsprozess am Einsatzort unterstützen zu können.

#### 4.1 Erprobung eines In-vitro-Modells zur Testung von tubulären blutkontaktierenden Implantaten

Für die In-vivo-Anwendung von Implantaten und Biomaterialien, die mit dem menschlichen Blut interagieren, ist eine intensive präklinische Testung erforderlich, welche den Einfluss der Materialien auf verschiedene hämatologische Parameter beleuchtet. In der EU-weit gültigen Richtlinie ISO 10993-4 sind die zentralen Grundsätze für die Bewertung von blutkontaktierenden Medizinprodukten wie Stents und Gefäßprothesen, unter Berücksichtigung von Produktdesign und klinischem Nutzen, festgelegt und daher ist eine normgerechte Prüfung vor der klinischen Anwendung unerlässlich.

In dieser Arbeit wurde ein umfassendes und zuverlässiges Verfahren zur Hämokompatibilitätsprüfung von blutkontaktierenden Implantaten in Übereinstimmung mit den Anforderungen der Richtlinie ISO 10993-4 vorgestellt: Dabei wird in einem Schwerströmungsmodell, dem sogenannten Flow Loop, das Blut durch eine peristaltische Pumpe mit einer definierten Geschwindigkeit durch einen heparinisierten Schlauch, welcher das Testmaterial enthält, befördert und dabei der physiologische Blutfluss imitiert. Diese Arbeit wurde für die Prüfung von Implantaten zur Therapie intrakranieller Stenosen ausgelegt und deshalb eine Flussrate von 150 ml/min Blut in Schläuchen mit einem Durchmesser von 3,2 mm gewählt, um zerebralen Strömungskonditionen und Arterien Durchmesser zu imitieren <sup>180</sup>.

Neben der Anforderung, das In-vitro-Modell optimal auf die physiologischen Konditionen am Einsatzort anzupassen, ist auch die Qualität des zu testenden Blutes ein wichtiger Faktor, um zuverlässige und unverfälschte Ergebnisse bei der Analyse der Hämostase eines Biomaterials zu erhalten: Der erste Punkt, welcher beachtet werden muss ist die Blutabnahme. Lippi *et al.* weisen darauf hin, dass es spezielle Unterschiede bei der Probennahme für die klinisch-chemische Analyse und die Hämostastestung gibt, die beachtet werden müssen. Dazu gehört es, eine längere venösen Stauung zu vermeiden, potentiell hämolysierend-wirkende Praktiken zu vermeiden und die Entnahmegefäße vollständig zu befüllen und ordnungsgemäß zu durchmischen<sup>181</sup>. Die Gruppe von Braun empfiehlt daher zur Umsetzung dieser Vorgaben eine atraumatische Blutentnahme durch das nur lockere Anlegen eines Tourniquet, die Verwendung von 21-Gauge-Nadeln und das Auffangen von Blut in Probengefäßen aus Polypropylen oder silanisierendem Glas um hämolytische Effekte sowie die Voraktivierung von Thrombozyten und der Gerinnungskaskade während der Entnahme zu minimieren<sup>107,181</sup>. Um unverfälschte Hämostasergebnisse zu erhalten, ist es ebenfalls wichtig die Blutproben zu antikoagulieren, um eine spontane Gerinnung während der In-vitro-Testung zu vermeiden. Bei der Auswahl des Antikoagulans wird empfohlen, sich am klinischen Hintergrund des Materials (z.B. Kontakt mit Vollblut, plättchenreichem Plasma oder plättchenarmem Plasma) sowie der spezifischen Fragestellung der Studie (z.B. grundlegendes Screening verschiedener Materialien oder umfassende Untersuchung des Entzündungs- und Gerinnungspotentials eines Materials) zu orientieren<sup>107</sup>. Darüber hinaus ist es entscheidend, die geeigneten Konzentrationen des jeweiligen Antikoagulans zu ermitteln, um die Funktionalität der Blutkomponenten zu gewährleisten und gleichzeitig die Hemmung der Gerinnungsaktivierung im Testsystem so gering wie möglich zu halten<sup>108</sup>. Für In-vitro-Studien mit Vollblut ist Heparin das am häufigsten verwendete Antikoagulans<sup>116,124,182</sup>. Blok *et al.* empfehlen daher, in Anlehnung an kardiovaskuläre Eingriffe in der Klinik, eine Dosierung von 1,5 Einheiten Heparin pro ml Blut, womit die Blutgerinnung verhindert werden kann, ohne die Gerinnungskaskaden an sich zu inaktivieren, welche für die Hämostastests entscheidend ist<sup>108,118</sup>. Das so gewonnene und antikoagulierte Blut sollte so schnell wie möglich verwendet werden, denn Blok *et al.* zeigten auch, dass bereits bei Lagerungsdauern von bis zu einer Stunde die Plättchen- sowie Gerinnungsaktivierung signifikant beeinflusst wird, wenn heparinisierendes Vollblut bei 30 °C oder 37 °C aufbewahrt wird. In ihrer Studie war die Einwirkung zwar nicht so gravierend, wenn das Blut bei

Raumtemperatur gelagert wurde, jedoch fordern die Autoren dazu auf, das Blut spätestens nach zwei bis maximal vier Stunden stationärer Lagerung zu verwenden, da sonst die Thrombozytenfunktion und die Aktivität der Leukozyten merklich verändert ist <sup>108</sup>. Außerdem muss beachtet werden, dass es sich bei den Blutspendern um gesunde Personen handelt, bei denen der Hämostaseprozess nicht durch Nikotinabusus <sup>109</sup>, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva <sup>110</sup>, eine Schwangerschaft <sup>111</sup> oder die Einnahme von Medikamenten (z.B. Acetylsalicylsäure, Naproxen oder Carbenicillin <sup>112-114</sup>) beeinflusst wird.

Für Hämokompatibilitätsprüfungen könnten entweder In-vivo-Tiermodelle oder In-vitro-Humanblutmodelle verwendet werden. Jedoch tendieren Engels *et al.* angesichts der Nachteile von Tiermodellen jenseits der ethischen Aspekte, wie z. B. höheren Kosten, größerer Variabilität, größerem Zeitaufwand und mangelnder Sensitivität aufgrund überlagernder kurzzeitiger Effekte durch Gewebesverletzungen, dazu In-vitro-Modelle mit humanem Vollblut den größeren Nutzen zuzusprechen <sup>180</sup>. Darüber hinaus kann die Zusammensetzung des Blutes zwischen verschiedenen Spezies erheblich variieren, was sich auch auf die daraus resultierende Gerinnungs- und Thrombozytenfunktion auswirkt, infolgedessen es zu einer Über- oder Unterschätzung der Reaktion des menschlichen Blutes gegenüber dem Biomaterial kommen kann <sup>118,119,183</sup>.

Für die In-vitro-Hämokompatibilitätsanalyse stehen drei Modellarten zur Auswahl: (1) statische Blutinkubationsmodelle, (2) bewegte Blutinkubationsmodelle und (3) Scherströmungsmodelle <sup>184</sup>. Bei allen Modelltypen werden die Hämokompatibilitätsmarker vor und nach der Inkubation des Biomaterialies mit frischem Humanblut analysiert.

Beim statischen Modell wird das Testmaterial direkt in einem Röhrchen oder einer Wellplatte mit dem humanen Blut inkubiert und stellt damit eine einfache und schnelle Methode zur rudimentären qualitativen Bestimmung der Thrombogenität dar. Dieses Modell wird zwar von der amerikanischen Gesellschaft für Testung und Materialien (ASTM) zur Bestimmung der Thrombogenität eines Materials oder der Hämolyse-Analyse empfohlen <sup>115</sup>, allerdings zeigt eine Studie von Haycox *et al.*, dass statische Modelle eindeutige Nachteile aufweisen, da es zur Sedimentation von Blutzellen kommt und die große Luft-Blut-Kontaktfläche zu Proteinaggregation und damit zu Thrombozytenaktivierung führen kann <sup>185</sup>.

Um die Hauptnachteile des statischen Modells zu überwinden, empfiehlt die Gruppe von Streller ein bewegtes Humanblutmodell, bei dem eine Testkammer die das Implantat enthält oder damit ausgekleidet ist, vollständig mit Blut gefüllt und auf einer schaukelnden Plattform inkubiert wird <sup>116</sup>. Mit diesem Modell ist der Blut-Luft-Kontakt nahezu ausgeschlossen und die Zellsedimentation wird reduziert, jedoch ist es primär für die Testung planarer Materialien geeignet und nicht in der Lage physiologische Umstände wie einen gerichteten Blutstrom zu imitieren.

Daher sind auch die bewegten Modelle der dritten Modellart weiterhin unterlegen: Die Quintessenz der Scherströmungsmodelle ist, dass der vaskuläre Blutstrom imitiert werden kann, wodurch die realen Interaktion zwischen dem Biomaterial und den Blutzellen abgebildet werden kann <sup>117</sup>. Das ist unerlässlich für die Evaluierung von vaskulären Implantaten wie Stets, zentrale Venenkatheter und Gefäßprothesen <sup>104</sup>. Für diese Testung existieren perfundierte Strömungskammern <sup>116,186</sup> oder Viskosimeter <sup>187</sup>, am verbreitetsten sind jedoch tubuläre Modelle wie der Chandler Loop <sup>188–190</sup> oder der Flow Loop <sup>191,192</sup>. Der Chandler Loop ist ein geschlossenes Schlauchsystem, welches das Implantat enthält und sowohl mit Blut als auch mit Luft befüllt ist. Der verschlossene Schlauch wird in eine rotierende Vorrichtung eingespannt, welche mit einer definierten Umdrehungszahl auch die Blutzirkulation innerhalb des Schlauchs und durch den Probenkörper ermöglicht <sup>193</sup>. Jedoch muss aufgrund der zwingend notwendigen Anwesenheit von Luft im Schlauch auch bei diesem Modell beachtet werden, dass aufgrund der ständigen Interaktion von Blut und Luft es zur Aggregation von Leukozyten und Thrombozyten sowie der Denaturierung von Proteinen kommen kann <sup>194,195</sup>. Ebenso ist die Blutumlaufgeschwindigkeit begrenzt, da die Luft im Schlauch immer am höchsten Punkt verbleiben muss, sodass nicht alle Strömungsprofile simuliert werden können <sup>196</sup>.

Im Vergleich dazu ist beim Flow Loop Modell, wie es in der vorliegenden Studie beschrieben wird, der Schlauch mit dem Probenkörper vollständig mit Blut befüllt und der Durchfluss wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe erzeugt. Der dabei erzeugte pulsierende Fluss mit entsprechender Wandschubspannung, hat sich laut Engels *et al.* auch als relevanter für die Aufrechterhaltung der Hämostase erwiesen und ermöglicht damit eine authentischere Simulation physiologischer Zustände <sup>180</sup>. Auch die Gruppe von van Oeveren empfiehlt die Verwendung eines pumpengesteuerten Modells, da somit die luftbedingte Thrombozytenaktivierung vermieden werden kann, was in einem

niedrigen Hintergrund für thrombotische Ereignisse, selbst bei hohen Flussraten, resultiert <sup>118</sup>. Da sowohl die pumpengeregelte Blutflussrate als auch der Schlauchdurchmesser vom Anwender frei gewählt werden können, ist es nahezu unbegrenzt möglich die physiologischen Bedingungen eines Gefäßes, welches dem zu testenden Implantat entspricht, zu imitieren und übertragbare Resultate zu erzielen <sup>197</sup>. Dieser Vorteil ist jedoch gleichzeitig eine Einschränkung, und van Oeveren *et al.* warnen davor, dass durch die pumpenbedingte mechanische Beanspruchung des Blutes eine Zerstörung von Erythrozyten auftreten kann. Dies reduziert die Sensitivität der Methode und erschwere daher eine länger währende Inkubation der Blutes mit dem Testmaterial <sup>118,196</sup>.

Nach Meinung von Münch *et al.* müsste ein optimales In-vitro-Humanblutmodell eine einfache mechanische Vorrichtung ohne Luft und ohne Pumpe sein, um eine Verbesserung der Testmethodik durch Minimierung der Blutschädigung, Erhöhung der Sensitivität sowie Verlängerung der Blutinkubationsdauer zu ermöglichen <sup>198</sup>. Jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass diese Methode eine umfassende Analyse verschiedener hämatologischer Parameter ermöglicht und unter Anwendung dieses Protokolls mögliche Unterschiede hinsichtlich der Hämokompatibilität verschiedener Materialien erkannt werden können.

Der bedeutendste Unterschied zwischen allen In-vitro-Modellen und den In-vivo-Mechanismen besteht jedoch aus dem Fehlen der intravaskulären Endothelschicht welche durch die Expression von Zytokine, antithrombotischen Signalmolekülen und Adhäsionsproteinen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion zwischen dem Implantat und dem zirkulierenden Blut spielt <sup>33</sup>.

## **4.2 In-vitro-Testung einer Nanobeschichtung für Flow Diverter zur Behandlung intrakranieller Aneurysmen**

Intrakranielle Aneurysmen sind als Aussackungen in der Wand von Hirnarterien definiert und bergen das Risiko einer Ruptur, was mit einer Einblutung in das umliegende Hirngewebe einhergehen und schwere Behinderung sowie den Tod nach sich ziehen kann. Zur Behandlung von intrakraniellen Aneurysmen können Flow Diverter eingesetzt werden: Diese dicht gewebten Stents aus metallischen Drähten werden in das Gefäß vor dem Aneurysma eingesetzt und leiten den Blutstrom größtenteils an der

Aussackung vorbei, sodass es zu einer graduellen Gerinnung im Aneurysmasack kommt und die Gefahr einer Ruptur gebannt ist<sup>199</sup>. Gleichzeitig stellt der Flow Diverter ein Gerüst für die Anlagerung von Endothelzellen dar und soll die Bildung einer gesunden Neointimalschicht fördern<sup>200,201</sup>. Die endoluminale Präsenz des Implantats kann jedoch zu einer Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten führen, was zu unerwünschten Effekten wie thromboembolischen Komplikationen, Blutungen oder proinflammatorischen Reaktionen führen kann<sup>202,203</sup>.

In der vorliegenden Studie wurde eine neuartige Nanobeschichtung für Flow Diverter getestet, wobei ein Nitinolnetz im ersten Schritt mit einer Fibrinschicht überzogen und im zweiten Schritt Heparinmoleküle kovalent daran gebunden wurden. Die Optimierung von Oberflächen ist ein zentraler Punkt bei der Entwicklung von Biomaterialien für die klinische Anwendung, da der Körper einerseits eine herausfordernde Umgebung darstellt und gleichzeitig die Materialien eine negative Wirkung auf die biologische Umgebung hervorrufen könnten<sup>3,204</sup>. Während die ursprüngliche Idee darin bestand, potenziell thrombotische oder korrosive Metalloberflächen unter einer inerten Beschichtung zu verbergen<sup>205–207</sup>, liegt der Fokus inzwischen darauf, biokompatible sowie biomimetische Beschichtung zu etablieren, die verhindern sollen, dass das Biomaterial als Fremdkörper erkannt wird<sup>208,209</sup>. Dabei ist zu beachten, dass je nach Anwendungsort andere Prioritäten bei der Funktionalisierung der Implantatoberfläche bestehen können: Während die Gruppen von Fattori und Park die Restenose durch intimale Hyperplasie als größten Risikofaktor bei der Langzeitanwendung von Koronarsents sehen und diese durch den Einsatz von Zytostatika zur Hemmung der Zellproliferation einzudämmen versuchen<sup>210,211</sup>, könnte dieser Ansatz bei der Behandlung von intrakraniellen Gefäßen kontraproduktiv sein. Die Arbeit von Aoki *et al.* legt dar, dass eine Vielzahl von Studien ergeben hat, dass dadurch die Regeneration der Neointimalschicht nach einer Implantation verzögert ist und die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Aneurysmas steigt<sup>212</sup>. Vielmehr steht bei der intrakraniellen Anwendung neben der Vermeidung thromboembolischer Komplikation durch Aktivierung der Gerinnungskaskade<sup>197</sup> sowie die Rekonstruktion der Gefäßwand am Aneurysmenhals, welcher die Öffnung zwischen Gefäß und Aneurysma darstellt, durch kontrollierte Proliferation von Endothelzellen und Bildung einer Neointimalschicht im Vordergrund<sup>213</sup>.

Bereits 1984 postulierten Hayward und Chapman, dass es die Zukunft der Biomaterialforschung sein müsse, biomimetische Oberflächen zu generieren und durch eine Hydrophilierung der Oberfläche die Proteinadsorption aus dem Blut und daraus resultierend die Thrombozytenadhäsion zu verhindern<sup>214</sup>. Durch die Verwendung von Phosphorylcholin, welches die nicht-reaktiven Oberflächen von Erythrozyten imitiert, als Flow-Diverter-Beschichtung gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen, die Thrombogenität der Implantate signifikant zu reduzieren<sup>200,203,215</sup>. Darüber hinaus konnte auch eine hydrophile Polymerbeschichtung auf Glykanbasis für Flow-Diverter-Implantate etabliert werden: Die Arbeiten der Gruppe um Lenz-Habijan zeigen, dass die Verwendung dieser hydrophilen Beschichtungen die Adhäsion von Thrombozyten an den Implantatoberflächen reduziert und somit die Hämostase verbessert wird<sup>216–218</sup>.

Die hier vorliegende Studie orientiert sich ebenfalls am Prinzip der Biomimetik und setzt auf die Verwendung von immobilisiertem Heparin zur Reduktion der Thrombogenität der Implantatoberfläche, denn Heparin ist ein Analogon des Glykosaminoglykans Heparansulfat, welches in großen Mengen in Endothelgeweben exprimiert wird und antikoagulatorisch sowie antiinflammatorisch wirkt<sup>22,136</sup>. Heparin wird häufig als Antikoagulant in der Klinik eingesetzt und konnte auch in seiner immobilisierten Form in diversen Studien die Thrombogenität eines Materials durch die Reduktion der Thrombozytenaktivierung signifikant senken<sup>219–222</sup>. Jedoch besagen die Studien von Sperling *et al.*, dass immobilisiertes Heparin nur 1% der Aktivität von ungebundenem Heparin besitzt und von einer Langzeitwirkung der Beschichtung aufgrund der begrenzten Halbwertszeit des Moleküls nicht ausgegangen werden kann<sup>223,224</sup>. Deswegen ist es von besonderer Wichtigkeit, dass sich auf der Implantatoberfläche eine physiologische Endothelzellschicht bilden kann, um das Risiko für thromboembolische Komplikationen weiter zu minimieren. Daher wurde in dieser Arbeit ein künstliches Fibrinnetzwerk in die Beschichtung integriert, welches in Anlehnung an den natürlichen Wundheilungsprozess, den Endothelzellen als Gerüst zur Migration dienen soll, wodurch die ungestörte Bildung einer Neointimalschicht und damit die Gefäßheilung und Aneurysmenhalsrekonstruktion ermöglicht werden soll<sup>116,225</sup>. Durch die Arbeiten von der Gruppe um Brynda konnte bereits hinreichend belegt werden, dass dieses artifiziell modifizierte Fibrinnetzwerk keinerlei prothrombotische Aktivität mehr besitzt, sondern ausschließlich als biomimetische Ankerstruktur für Endothelzellen fungiert<sup>226,227</sup>.

In dieser Studie wurde die Hämokompatibilität der beschichteten Flow Diverter im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten aus Nitinol anhand von zwei verschiedenen Perfusionsmodellen mit heparinisiertem humanem Vollblut getestet. Die umfassende Testung erfolgte mit einem Chandler Loop Modell, bei dem das Implantat unter Anwesenheit von Luft in einem rotierenden Schlauch mit Blut inkubiert wird, sowie in einem Flow Loop Modell, bei dem das Testobjekt unter Ausschluss von Luft mit Blut durchströmt wird, wobei der Blutfluss pumpengesteuert ist. Die Implantatbeschichtungen wurden hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Gerinnungskaskade, die Aktivierung der Thrombozyten sowie des Komplementsystems untersucht. Diese Parameter sind auch gemäß der Norm ISO 10993-4 für die Bewertung der Hämokompatibilität indiziert und könnten noch durch eine Analyse des thrombotischen Potentials sowie einer hämatologischen Untersuchung ergänzt werden <sup>105</sup>.

Für die Gerinnungsanalyse soll die Aktivierung der Gerinnungskaskade untersucht werden: Der Gerinnungsvorgang wird durch die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin und anschließender Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin beendet <sup>228</sup>. Bei diesen Vorgängen werden verschiedene Aktivierungspeptide freigesetzt: Die Prothrombinfragmente F1+2 werden abgespalten und entstandenes Thrombin wird durch Antithrombin gehemmt und bildet einen Thrombin-Antithrombin III-Komplex. Durch spezifische Immunassays kann die Konzentration dieses Komplexes im Plasma bestimmt werden und ein Rückschluss auf den Aktivierungszustand des Gerinnungssystems gezogen werden <sup>104,229</sup>. Für die Analyse des Thrombozytenstatus ist vor allem die Zellzahl entscheidend, da sie eine Schlüsselrolle bei der Verhinderung von Blutungen spielt <sup>122</sup>. Ein signifikanter Abfall der Thrombozytenzahl in Blut, welches mit einem Testmaterial inkubiert wurde, deutet auf einen thrombogenen Charakter hin und kann durch Thrombozytenadhäsion, -aggregation oder Blutgerinnung auf der Materialoberfläche verursacht werden. Die Aktivierung der Thrombozyten kann durch die Quantifizierung von freigesetzten Signalmolekülen aus den Alpha-Granula, wie  $\beta$ -TG mittels Immunassay ermittelt werden <sup>123,124</sup>. Die Analyse der Komplementaktivierung ist ein relevantes Kriterium bei der Prüfung von Biomaterialien, denn eine quantitative Erhöhung der aktivierten Komplementbestandteile führt wiederum zur Aktivierung von Leukozyten. Die Komplementaktivierung kann durch den quantitativen Nachweis der Spaltprodukte von C3a oder C5a, die enzymatische Aktivität der C3- oder C5-Konvertase oder der Quantifizierung des C5b-9-Komplexes analysiert werden <sup>128,129</sup>.

## Diskussion

---

Die Testung der (beschichteten) Implantate im Chandler Loop Modell ergab, dass bei der Inkubation von Blut mit dem unbeschichteten Implantat die Thrombozytenzahl im Vergleich zu den anderen Testgruppen signifikant reduziert war. Das bedeutet, dass die Thrombogenität des Materials durch das Aufbringen einer Beschichtung mit Fibrin oder/und Heparin in bedeutendem Umfang gesenkt werden konnte. Die Quantifizierung der plasmatischen Hämokompatibilitätsmarker nach der Inkubation im Chandler Loop Modell zeigte, dass die Aktivierung der Gerinnungskaskade, repräsentiert durch die Quantifizierung des TAT-Komplexes, in Anwesenheit des unbeschichteten Implantats signifikant erhöht war, während die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Thrombozytenaktivierung durch die beschichteten Implantate unbeeinflusst blieb. Die Hämokompatibilitätstestung der im Flow Loop Modell perfundierten Implantate zeigte, dass die Anwesenheit des unbeschichteten Flow Diverters zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl führte und ebenfalls eine bezeichnende Abnahme der Hämoglobinwerte und der Thrombozytenzahl, im Vergleich zu den beschichteten Implantaten, zur Folge hatte. Die Bestimmung der plasmatischen Aktivierungsmarker nach der Inkubation im Flow Loop Modell ergab, dass das Komplementsystem nicht signifikant durch die Anwesenheit der beschichteten Implantate beeinflusst wurde. Jedoch zeigte sich, dass die Anwesenheit des unbeschichteten Implantates zu einer signifikanten Aktivierung der Thrombozyten, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von  $\beta$ -TG, führte und auch eine nicht-signifikante Erhöhung des TAT-Gehaltes nach sich zog. Beide Modelle zeigten unabhängig voneinander eine signifikante Reduktion der Thrombozytenadhäsion bei Fibrin-Heparin-Beschichtungen im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten. Die Ergebnisse der Quantifizierung plasmatischer Hämokompatibilitätsmarker unterstützen die Erkenntnis, dass die Hämokompatibilität der Oberfläche durch eine Fibrin-Heparin-Beschichtung verbessert werden kann, da sowohl die Bildung des TAT-Komplexes als auch die Sekretion von  $\beta$ -TG im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten reduziert ist.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen bereits Kaplan *et al.* in einer Studie, bei welcher sie ein Polyvinylchlorid-Substrat mit einer Fibrin-Heparin Beschichtung versehen hatten und nachweisen konnten, dass damit, im Vergleich zum unbeschichteten Substrat, die Thrombozytenaktivierung, Thrombinbildung und Thrombusformation sowie entzündliche Reaktionen deutlich reduziert werden konnten<sup>226</sup>. Auch die Modifikation einer Gefäßprothese aus expandiertem Polytetrafluorethylen, durch das

Aufbringen einer Fibrin-Heparin-Beschichtung welche zusätzlich mit Wachstumsfaktoren angereichert wurde, zeigte im Vergleich zum Ausgangsmaterial exzellente antithrombogene Eigenschaften nach Kontakt mit heparinisierendem Humanblut <sup>230</sup>.

Für eine langfristige Materialkompatibilität und die Rekonstruktion des Aneurysmahalses ist es essenziell, dass die Bildung einer Neointimalschicht entlang des Implantats ungehindert erfolgen kann. Jedoch ist bekannt, dass synthetische Materialien mit einem strikt antithrombogenen Charakter in der Regel kein geeignetes Substrat für die Re-Endothelialisierung darstellen <sup>231</sup>. Um diese Einschränkung zu überwinden, gibt es verschiedene Ansätze die Endothelialisierung von Biomaterialien zu unterstützen, beispielsweise durch die Modifikation der Materialoberfläche mit immobilisierten zellbindenden extrazellulären Matrixproteinen oder Oligopeptidsequenzen <sup>232,233</sup>.

Der Ansatz in der hier diskutierten Studie ist die Imitation des Fibrinnetzwerks, welches den nach einer Gefäßverletzung entstehenden Thrombus verstärkt, und später als temporäres Gerüst für einwandernde Zellen dient, die das Gefäßendothel reparieren <sup>86</sup>. Das Potenzial von Fibrin als Zellmatrix für vaskuläre Tissue-Engineering-Anwendungen in verschiedenen Studien wurde von Ahmed *et al.* bereits umfassend diskutiert <sup>225</sup>. Um die Interaktion von Fibrin-Heparin-beschichteten Implantaten und unbeschichteten Oberflächen mit humanen primären Endothelzellen zu evaluieren, wurden die verschiedenen Implantate für 48 h in einem dynamischen Modell mit einer Endothelzell-Lösung perfundiert. Die Ergebnisse des Zellvitalitätstests sowie der Rasterelektronen- und konfokaler Mikroskopie, zeigen, dass die Fibrin-Heparin-Beschichtung in Bezug auf die Endothelzellproliferation leicht, aber nicht signifikant besser ist als die unbeschichtete Oberfläche.

Bei dem Ausgangsmaterial für die Flow Diverter handelt es sich um elektropoliertes Nitinol, eine Legierung welche für ihre exzellente Biokompatibilität bekannt ist und deren Endothelialisierungseigenschaften in einer Studie von Cattaneo *et al.* bereits als vielversprechend eingestuft wurde <sup>123,234</sup>. Ebenfalls konnte der positive Effekt von immobilisiertem Heparin auf die Endothelialisierung verschiedener Oberflächen bereits in mehreren Studien gezeigt werden <sup>235,236</sup>, jedoch beschreiben zugleich sowohl Melchiorri als auch Hoshi in ihren Studien, dass eine Oberflächenheparinisierung die Endothelzelladhäsion und Proliferation In-vitro nicht verbessert oder sogar verringert hat <sup>139,237</sup>. Die Arbeitsgruppe um Riedel und Brynda konnte dagegen in der Vergangenheit bei der Testung einer Fibrin-Heparin-Beschichtung auf PVC-Substraten gute

Ergebnisse hinsichtlich der Endothelialisierung erzielen: Bereits nach 24-stündiger Kultivierung entstand auf dem Fibrin-Heparin-beschichteten Substrat eine konfluente Endothelzellschicht, während dieser Zustand auf einem Substrat, welches nur mit Fibrin beschichtet war, erst nach 96 h eintrat <sup>226</sup>. Mit der Weiterentwicklung der Fibrin-Heparin-Beschichtung, durch die Anreicherung von Wachstumsfaktoren innerhalb des Fibrinnetzes, gelang es der Gruppe auch, die Endothelialisierung von Gefäßprothesen aus expandiertem Polytetrafluorethylen zu verbessern: Endothelzellen, welche auf der Innenseite der beschichteten Prothese ausgesät wurden, bildeten innerhalb von 5 Tagen eine konfluente Schicht, während auf der unbeschichteten Prothese sowie den Beschichtungen ohne Wachstumsfaktoren nur kleinere Zellkolonien wuchsen <sup>230</sup>.

### **4.3 Etablierung einer mRNA-haltigen Beschichtung von chirurgischem Nahtmaterial zur Unterstützung der Wundheilung**

Eine therapeutische Strategie zum Erreichen einer schnellen und vollständigen Wundheilung ist aufgrund der fortschreitenden Veralterung der Bevölkerung sowie der steigenden Inzidenz von Adipositas und Typ-II-Diabetes zu einer zunehmend wichtigen medizinischen Aufgabe geworden. Zur Therapie von Wunden mit problematischem Heilungsverlauf scheint der Einsatz von rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren sinnvoll, da auch der physiologische Heilungsprozess durch diese Signalmoleküle reguliert wird. Speziell der Keratinozytenwachstumsfaktor KGF spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, da er die Differenzierung und Proliferation der Epithelzellen stimuliert und eine antiapoptotische Wirkung vermittelt <sup>238</sup>.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Expression des Wachstumsfaktors KGF durch körpereigene Zellen direkt im Wundgebiet über eine Transfektion mit In-vitro-transkribierter mRNA zu erreichen. Dafür wurde ein Verfahren etabliert, bei dem chirurgisches Nahtmaterial mit einer polymerbasierten, mRNA-haltigen Beschichtung überzogen wurde. Um die mRNA, die für das gewünschte Protein kodiert, zu immobilisieren, wurde die Beschichtung auf Basis des biodegradierbaren Copolymers Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) aufgebaut: Das Copolymer kann von eukaryotischen Zellen degradiert werden und weist eine gute Gewebe- und Zellkompatibilität auf, ohne toxisch zu wirken. Aufgrund dieser Eigenschaften ist PLGA von der Food and Drug

Administration (FDA) für den klinischen Einsatz am Menschen zugelassen und wird häufig zur Herstellung von Extended-Release-Formulierungen mit Wirkstoffen und als Implantatbeschichtung verwendet <sup>239–241</sup>.

Der Ansatz, Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Wundheilung einzusetzen wurde bereits in der Vergangenheit verfolgt und 1999 mit der Zulassung des *Becaplermin*-Gels zur topischen Anwendung verwirklicht. Es enthielt als pharmazeutischen Wirkstoff den rekombinanten humanen Platelet-derived Growth Factor (rhPDGF), der in Studien eine verbesserte Wundheilung im Vergleich zum Placebo zeigte <sup>242</sup>. Das Potential von Wachstumsfaktoren zur therapeutischen Anwendung zeigte sich ebenfalls in der Studie von Pierce *et al.*, in der demonstriert wurden, dass die Applikation von 4 µg/cm<sup>2</sup> rekombinatem KGF die Wundheilung beschleunigen und zur Bildung einer stabileren Epidermis führen konnte <sup>243</sup>. Dennoch war die topische Applikation von Wachstumsfaktoren, unter anderem wegen der unzureichenden Bioverfügbarkeit, bisher nicht zufriedenstellend <sup>244</sup>. Die Gruppen um Cross und Dijon konnten zeigen, dass nach topischer Applikation des endothelialen Wachstumsfaktors EGF nur 2% - 6% der applizierten Dosis in oberflächlichen Schichten des behandelten Granulationsgewebes detektiert wurden, während in tieferen Schichten sogar nur 0,1%-2% nachgewiesen werden konnten <sup>245,246</sup>. Daher sollte mit der vorliegenden Studie die Expression von KGF direkt in der genähten Wunde gefördert werden und die therapeutische mRNA gezielt an Zellen auf der Hautoberfläche sowie in den tieferen Hautschichten abgegeben werden.

Ein weiterer Nachteil der topischen Applikation ist, dass die Wachstumsfaktorkonzentration in den behandelten Wunden rasch abnimmt, da die Signal-Proteine durch Proteasen des Wundmilieus abgebaut oder durch Adsorption an extrazellulären Matrixproteine inaktiviert werden <sup>247,248</sup>. Um einen therapeutisch wirksamen Spiegel von 100-200 ng/mL EGF im Gewebe zu erreichen müsste ergo eine enorm hohe Menge des Wachstumsfaktors dermal appliziert werden. Um dieses Hindernis zu überwinden, wurden gentherapeutische Ansätze etabliert <sup>249</sup>: Kopp *et al.* konnten den Heilungsprozess von Verbrennungswunden zweiten Grades im Schweinmodell um zwei Tage beschleunigen, indem sie Zellen einer Keratinozytenlinie im Wundbett aussäten, welchen den Keratinozytenwachstumsfaktor nach KGF-kodierender Plasmid-Transfektion stabil exprimieren <sup>250</sup>. In ähnlicher Weise führte bei der Mausstudie von Marti *et al.* die Transfektion von KGF-DNA zu einer kontinuierlichen Expression des

Wachstumsfaktors und einer verbesserten Wundheilung<sup>251</sup>. Jedoch existieren bei der DNA-basierten Gentherapie einige bekannte Nachteile, wie beispielsweise eine potenzielle mutagene Wirkung durch falsche Integration der DNA in das Wirtsgenom sowie die ungewollt dauerhafte Expression des Proteins<sup>252,253</sup>. Dieses Risiko kann vermieden werden, wenn, wie in der vorliegenden Studie, ein mRNA-basierter Gentherapieansatz verfolgt wird: Hierbei gelangt die Nukleinsäure nicht wie bei der DNA Applikation in den Nukleus und kann erst nach Integration in das Genom zur Proteinexpression beitragen, stattdessen verbleibt die messenger RNA im Zytosol und wird durch die Ribosomen zum Protein translatiert. Somit wird gleichzeitig eine ungewollte Überexpression des therapeutischen Proteins verhindert, da die Proteinexpression mit Abbruch der mRNA-Applikation – in dem hier vorliegenden Fall mit der Entfernung der Naht – endet.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche mRNA-Therapie ist die Wahl eines geeigneten Transfektionsmittels, welches den Transport der mRNA in die Zelle ermöglicht sowie deren Abbau durch Nukleasen im extrazellulären Raum verhindert<sup>254</sup>. Nach der endozytotischen Aufnahme werden die Transportmoleküle abgebaut und die Nukleinsäure wird im Zytoplasma freigesetzt, sodass die Translation beginnen kann<sup>255</sup>. Daher wurden für diese Studie im ersten Schritt zwei kommerziell erhältlich Transfektionsmittel bezüglich ihrer Eignung für den Aufbau einer Beschichtung evaluiert: *Lipofectamine 2000* und *Viromer RED* wurden verwendet, um mRNA zu komplexieren, welche für das grün fluoreszierende Protein (eGFP) kodierte. Die komplexierte mRNA wurde anschließend mit einer PLGA-Lösung gemischt und schichtweise auf chirurgische Fäden aufgetragen, welche dann In-vitro mit verschiedenen Zelltypen inkubiert wurden. Bei *Lipofectamine 2000* handelt es sich um ein Gemisch aus kationischen Lipiden, welche mit der anionischen mRNA Lipidkomplexe (sog. Lipoplexe) bildet, die positiv geladen sind<sup>161</sup>. *Viromer RED* hingegen besteht aus einer PEI-Kernstruktur, die mit hydrophoben und anionischen Seitenketten modifiziert ist und in wässriger Lösung neutral geladene Poly[merkom]plexe mit der mRNA bildet<sup>179</sup>. Die Ergebnisse zeigen, dass nur *Viromer RED* als Transfektionsmittel für mRNA in einer PLGA-Beschichtung geeignet ist: Bei der Transfektion durch die beschichteten Fäden mit *Viromer RED* exprimierten 29 % der Modellzelllinie HEK293 das grün fluoreszierende Protein, während die Beschichtung mit *Lipofectamine 2000* keine detektierbare eGFP-Expression auslöste. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu den Arbeiten von Abraham *et al.*, welche

ebenfalls eine mRNA-PLGA-Beschichtung evaluierten: Die Gruppe verwendete ein Protokoll, bei dem die mRNA mit *Lipofectamine 2000* komplexiert, mit einer PLGA-Lösung vermischt und die Beschichtung schichtweise auf Thermanox-Plättchen aufgebracht wurde. Dadurch gelang es einen signifikanten Anteil von HEK293-Zellen In-vitro zu transfizieren<sup>158</sup>. Bei Thermanox handelt es sich um ein Polymer auf Polyolefinbasis, das durch Polymerisation von Alkenen gewonnen wird und einen unpolaren Charakter besitzt<sup>256</sup>, während in der vorliegende Studie multifilamentöses Nahtmaterial aus Polyethylenterephthalat(PET)-Fasern verwendet wurde. Ein PET-Monomer hingegen ist ein starkes polares Molekül, welches zwei Carbonylgruppen mit einer positiven (Kohlenstoff) und einer negativen (Sauerstoff) Partialladung trägt<sup>257</sup>. Da *Lipofectamine 2000* zusammen mit der mRNA positiv geladene Lipoplexe bildet, ist es denkbar, dass es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den polaren PET-Fasern kommt. Dadurch kann die Integrität und Stabilität der Lipoplexe beeinträchtigt werden und die mRNA bereits während des Beschichtungsprozesses freigesetzt werden, so dass keine Zelltransfektion und Proteinexpression stattfinden kann.

Da Fibroblasten und Keratinozyten eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielen, weil sie aus dem umliegenden Gewebe in das Wundareal einwandern und den Gewebedefekt auffüllen, wurde im nächsten Schritt der Studie überprüft ob auch diese Zellen für eine Transfektion durch die Beschichtung empfänglich sind. Dafür wurden BJ-Fibroblasten und eine Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) mit unterschiedlichen Mengen an eGFP-mRNA transfiziert, entweder durch direkte Zugabe der mit *Viomer RED* komplexierten mRNA oder indirekt über die mRNA-PLGA-Beschichtung. Eine erfolgreiche Proteinexpression in den Zellen nach der Transfektion konnte sowohl mikroskopisch beobachtet als auch durchflusszytometrisch quantifiziert werden: Die eGFP-Expression nach der Transfektion von 1 µg mRNA war bei der direkten und indirekten Transfektion über die Beschichtung nahezu vergleichbar, jedoch erzielte der Einsatz von 2,5 µg mRNA in der Beschichtung eher eine höhere Proteinsynthese, als die direkten Transfektion mit dieser mRNA Menge. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass die Transfektion über eine mRNA-PLGA-Beschichtung auf Basis von *Viomer RED* als Transfektionsmittel zu einer effizienten Proteinexpression in Zellen der Haut führt.

Bei der Wundheilung spielen besonders die Reepithelisierung der geschädigten Hautoberfläche durch Keratinozyten eine essenzielle Rolle; ein Prozess der maßgeblich

durch KGF stimuliert wird <sup>238</sup>. Eine artifizielle Erhöhung von KGF im Wundgebiet, könnte somit die Wundheilung verbessern. Denzinger *et al.* konnte in einer Studie bereits nachweisen, dass die Applikation von KGF-kodierender mRNA die Zellproliferation und Migration von Keratinozyten In-vitro beschleunigt <sup>258</sup>. Mit der *Viromer RED*-basierten mRNA-PLGA-Beschichtung konnte die Expression des Wachstumsfaktors KGF sowohl in Fibroblasten als auch Keratinozyten ausgelöst werden, wenn auch noch in signifikant geringerem Maße als bei einer direkten Zugabe der mRNA. Die von Pierce *et al.* genannte therapeutisch wirksame KGF-Konzentration von 4 µg/cm<sup>2</sup> Haut <sup>243</sup> wurde in dieser Studie nicht erreicht, jedoch wurde auch nur 1 cm des beschichteten Nahtmaterials verwendet. Wenn eine kutane Wunde mit mehreren Stichen genäht wird, steigt die benötigte Nahtmenge und mehr mRNA kann in das Wundareal abgegeben werden.

Allerdings könnte die Beschichtung hinsichtlich ihrer Effizienz noch optimiert werden: So postulierten Ludwick *et al.*, dass PEI-Nukleinsäure-Komplexe, wozu auch die mit *Viromer RED* komplexierte mRNA zählt, nur eine bedingte Beständigkeit gegenüber Ethylacetatlösungen aufweisen <sup>259</sup>. Wenn also nun diese Komplexe beim Beschichtungsprozess in Kontakt mit der ethylacetatbasierten PLGA-Lösung kommen, könnten die Polyplexe ihre Stabilität verlieren, was zu einer vorzeitigen mRNA-Freisetzung führt. Um dies zu umgehen und die Transfektion über die Beschichtung noch effizienter zu gestalten, könnte perspektivisch ein anderes Lösungsmittel für PLGA verwendet werden: Der organische Ether Tetrahydrofuran (THF) eignet sich als Lösungsmittel für PLGA, degradiert aber gleichzeitig das PEI nicht <sup>260</sup>, so dass die mRNA-beladenen Polyplexe nicht geschädigt werden. Außerdem ist THF bis zu einer Temperatur von 72 °C gut in Wasser löslich <sup>261</sup>, so dass sich die resultierende PLGA-Lösung für die Mischung mit der wasserbasierten mRNA-Lösung eignet.

Durch die Arbeiten von Karikó *et al.* wurde bekannt, dass synthetisch hergestellte Nukleinsäuren das Immunsystem durch Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) stimulieren können, jedoch der Einsatz von modifizierten Nukleotidmolekülen bei der Synthese das Auftreten von potenzielle Immunreaktionen eindämmen kann <sup>262,263</sup>. Die gute Immunkompatibilität der mRNA-PLGA-Beschichtung zeigt sich durch die minimale Expression von Entzündungsmarkern nach der Transfektion: Während bei der direkten Zugabe von mRNA die Expression der proinflammatorischen Zytokine Interferon-β und Tumornekrosefaktor-α in Fibroblasten signifikant anstieg, zeigten Zellen,

die über die mRNA-PLGA-Beschichtung transfiziert wurden, nur eine leicht erhöhte Expression von Interferon(IFN)- $\beta$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Gruppen von Masotti und Zolnik zeigten bereits, dass die Immunaktivierung durch Nukleinsäuren stark von der Menge abhängt, die auf die Zellen appliziert wird, und dass kationische Polyplexe selbst TLR aktivieren und die Freisetzung von Zytokinen induzieren können<sup>264,265</sup>. Der große Vorteil der Transfektion über die mRNA-PLGA-Beschichtung besteht also darin, dass eine graduelle mRNA-Freisetzung erfolgt und die Zellen im Vergleich zur direkten Transfektion mit weniger mRNA auf einmal transfiziert werden. Das Potential der mRNA-Beschichtung, die Blutgerinnungs- oder Komplementkaskaden zu beeinflussen, spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle für den potenziellen Einsatz in klinischen Anwendungen. Jedoch zeigen die Ergebnisse der Hämokompatibilitätsprüfung mit humanem Vollblut, dass keine Veränderung hinsichtlich der Blutzellzahlen oder der plasmatischen Marker durch das beschichtete Nahtmaterial hervorgerufen wurde.

Diese Ergebnisse der Studie dokumentiert die Funktionalität und Biokompatibilität der therapeutischen mRNA-PLGA-Beschichtung und eröffnet damit die Möglichkeit, das Verfahren auch zur Optimierung anderer Biomaterialien einzusetzen.

### 5 Ausblick

Im 21. Jahrhundert sind Biomaterialien nicht mehr nur passive Werkstoffe, die ausschließlich bioinert sind und das umliegende Gewebe nicht schädigen. Die Perspektive für moderne Biomaterialien soll sein, dass sie aktiv mit ihrer biologischen Umwelt interagieren können, indem sie molekulare Strukturen bereitstellen, welche beispielsweise die Adhäsion von Zellen fördern, ungewünschte Kaskadenaktivierungen unterbinden oder das umliegende Gewebe zur Proliferation anregen.

Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab diesen Weiterentwicklungsprozess zu unterstützen und verschiedene Biomaterialien für die klinische Anwendung zu charakterisieren und zu optimieren: Es wurde ein dynamisches Hämokompatibilitätsmodell mit humanem Vollblut zur präklinischen Materialtestung vorgestellt, eine antithrombogene und endothelialisierungsfördernde Nanobeschichtung für neurovaskuläre Implantate evaluiert sowie eine bioaktive, proliferationsfördernde Beschichtung für chirurgisches Nahtmaterial etabliert.

Zum Beginn neuer Technologiesierungsschritte wie dem hier vorgestellten Testsystem und den blutkontaktierenden Beschichtungen bleiben jedoch viele Herausforderungen, die überwunden werden müssen: So ist die größte Lücke zwischen allen In-vitro-Modellen und den In-vivo-Mechanismen das fehlende Endothel, welches Zytokine, anti-thrombotische Komponenten und Adhäsionsmoleküle exprimiert. Daher ist die Etablierung einer Endothelschicht für das In-vitro-Modell ein essenzieller Punkt, um die Interaktion zwischen dem Implantat und dem zirkulierenden Blut zukünftig noch exakter simulieren zu können. Die zu testenden Beschichtungen müssen hinsichtlich langfristiger Wirksamkeit und Sicherheit der Oberflächentechnologie bewertet werden. Obwohl In-vitro-Tests reproduzierbare und standardisierte Bedingungen ermöglichen, sind In-vivo-Studien erforderlich, um die komplexen Entzündungs- und Gerinnungsprozesse zu berücksichtigen, die in einem lebenden Organismus ablaufen. Danach könnten sowohl die Fibrin-Heparin-Nanobeschichtung als auch die mRNA-PLGA-Beschichtung für andere Anwendungsgebiete etabliert werden: Eine antithrombogen- und endothelialisierungsfördernd-wirkende Beschichtung ist auch für die Optimierung von kardiovaskulären Implantaten und Herzklappenprothesen gefragt. Die zu transfizierende mRNA in der Beschichtung kann frei gewählt und auch kombiniert werden, sodass die Wundheilung beispielsweise durch die Expression von weiteren

## Ausblick

---

Wachstumsfaktoren, Enzymen oder ECM-Proteinen unterstützt werden kann. Um die Wundheilung zu verbessern und gleichzeitig die Gefahr von postoperativen Wundinfektionen zu minimieren könnten zusätzlich antibakteriell wirkenden (Natur)Substanzen in die Beschichtung eingebracht werden.

Die Optimierung von Biomaterialien ist ein kontinuierlich voranschreitender Prozess, welcher großes therapeutisches Potential beherbergt, um die Lebensqualität von vielen Betroffenen nachhaltig zu steigern und bisher noch unlösbare Probleme zu überwinden.

### 6 Literaturverzeichnis

1. Vert M, Doi Y, Hellwich KH, et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure Appl Chem*. 2012;84(2):377-410. doi:10.1351/pac-rec-10-12-04
2. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*. 2013;3(3):e24717. doi:10.4161/biom.24717
3. Lemons JE, Lucas LC. Properties of biomaterials. *J Arthroplasty*. 1986. doi:10.1016/S0883-5403(86)80053-5
4. Stynes G, Kiroff GK, Morrison WAJ, Kirkland MA. Tissue compatibility of biomaterials: Benefits and problems of skin biointegration. *ANZ J Surg*. 2008;78(8):654-659. doi:10.1111/j.1445-2197.2008.04609.x
5. Goor OJGM, Hendrikse SIS, Dankers PYW, Meijer EW. From supramolecular polymers to multi-component biomaterials. *Chem Soc Rev*. 2017;46(21):6621-6637. doi:10.1039/C7CS00564D
6. Spitznagel FA, Boldt J, Gierthmuehlen PC. CAD/CAM Ceramic Restorative Materials for Natural Teeth. *J Dent Res*. 2018. doi:10.1177/0022034518779759
7. Henstock JR, Canham LT, Anderson SI. Silicon: The evolution of its use in biomaterials. *Acta Biomater*. 2015;11:17-26. doi:10.1016/j.actbio.2014.09.025
8. Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Mater Sci Eng R Reports*. 2015. doi:10.1016/j.mser.2014.10.001
9. Martin C, Low WL, Amin MCIM, Radecka I, Raj P, Kenward K. Current trends in the development of wound dressings, biomaterials and devices. *Pharm Pat Anal*. 2013;2(3):341-359. doi:10.4155/ppa.13.18
10. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008;5(27):1137-1158. doi:10.1098/rsif.2008.0151
11. Xue L, Greisler HP. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg*. 2003;37(2):472-480. doi:10.1067/mva.2003.88
12. Chen D, Jepson N. Coronary stent technology: a narrative review. *Med J Aust*. 2016;205(6):277-281. doi:10.5694/mja16.00444
13. Mohammadi H. Nanocomposite biomaterial mimicking aortic heart valve leaflet mechanical behaviour. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 2011;225(7):718-722. doi:10.1177/0954411911399826
14. Lam Van Ba O, Aharony S, Loutochin O, Corcos J. Bladder tissue engineering: A literature review. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83:31-37. doi:10.1016/j.addr.2014.11.013
15. Stöver T, Lenarz T. Biomaterialien bei Cochlea-Implantaten. *Laryngo-Rhino-Otologie*. 2009;88(S 01):S12-S31. doi:10.1055/s-0028-1119552

## Literaturverzeichnis

---

16. Gourlay T. Biomaterial development for cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2001. doi:10.1177/026765910101600508
17. Cheah W-K, Ishikawa K, Othman R, Yeoh F-Y. Nanoporous biomaterials for uremic toxin adsorption in artificial kidney systems: A review. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2017;105(5):1232-1240. doi:10.1002/jbm.b.33475
18. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press; 1999. doi:10.5949/upo9781846314438
19. Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface*. 2010;7(SUPPL. 4). doi:10.1098/rsif.2010.0151.focus
20. Schoen FJ, Levy RJ, Piehler HR. Pathological considerations in replacement cardiac valves. *Cardiovasc Pathol*. 1992;1(1):29-52. doi:10.1016/1054-8807(92)90006-A
21. Kottke-Marchant K, Anderson JM, Umemura Y, Marchant RE. Effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Dacron® arterial prostheses. *Biomaterials*. 1989;10(3):147-155. doi:10.1016/0142-9612(89)90017-3
22. Gorbet MB, Sefton M V. Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681-5703. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.023
23. Zhao Q, Topham N, Anderson JM, Hiltner A, Lodoen G, Payet CR. Foreign-body giant cells and polyurethane biostability: In vivo correlation of cell adhesion and surface cracking. *J Biomed Mater Res*. 1991. doi:10.1002/jbm.820250205
24. Destouet JM, Monsees BS, Oser RF, Nemecek JR, Young VL, Pilgram TK. Screening mammography in 350 women with breast implants: prevalence and findings of implant complications. *Am J Roentgenol*. 1992;159(5):973-978. doi:10.2214/ajr.159.5.1414810
25. Voronov I, Santerre JP, Hinek A, Callahan JW, Sandhu J, Boynton EL. Macrophage phagocytosis of polyethylene particulate in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199801)39:1<40::AID-JBM6>3.0.CO;2-I
26. Vroman L. The life of an artificial device in contact with blood: initial events and their effect on its final state. *Bull N Y Acad Med*. 1988;64(4):352-357. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3233429>.
27. Gong J, Larsson R, Ekdahl KN, Mollnes TE, Nilsson U, Nilsson B. Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: Both the biomaterial and the blood-gas phase interfaces induce complement activation in an in vivo model. *J Clin Immunol*. 1996. doi:10.1007/BF01541228
28. Hong J, Andersson J, Ekdahl KN, et al. Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: Possible implications for osteogenesis. *Thromb Haemost*. 1999. doi:10.1055/s-0037-1614630
29. Tang L, Eaton JW. Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *J Exp Med*. 1993;178(6):2147-2156. doi:10.1084/jem.178.6.2147

## Literaturverzeichnis

---

30. Kanagaraja S. Platelet binding and protein adsorption to titanium and gold after short time exposure to heparinized plasma and whole blood. *Biomaterials*. 1996;17(23):2225-2232. doi:10.1016/0142-9612(95)00311-8
31. Sabino RM, Kauk K, Movafaghi S, Kota A, Papat KC. Interaction of blood plasma proteins with superhemophobic titania nanotube surfaces. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2019. doi:10.1016/j.nano.2019.102046
32. Schomig A, Sarafoff N, Seyfarth M. Triple antithrombotic management after stent implantation: when and how? *Heart*. 2009;95(15):1280-1285. doi:10.1136/hrt.2008.160457
33. Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 1999;12(3):329-341. doi:10.1053/beh.1999.0028
34. Grove ECL, Kristensen SD. Stent thrombosis: definitions, mechanisms and prevention. *E-Journal Cardiol Pract*. 2007.
35. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, et al. Safety and Efficacy of Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Coronary Stents. *N Engl J Med*. 2007. doi:10.1056/nejmoa067193
36. Saal-Zapata G, Durand W, Ghodke B V., Walker M. Endovascular strategies for stroke management after subacute in-stent thrombosis. *J Clin Neurosci*. 2020;81:18-20. doi:10.1016/j.jocn.2020.09.020
37. Katsanos K, Al-Lamki SAM, Parthipun A, et al. Peripheral Stent Thrombosis Leading to Acute Limb Ischemia and Major Amputation: Incidence and Risk Factors in the Aortoiliac and Femoropopliteal Arteries. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2017;40(3):351-359. doi:10.1007/s00270-016-1513-0
38. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*. 2016;86:68-82. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.003
39. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010. doi:10.1093/rheumatology/keq045
40. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog*. 2015. doi:10.1371/journal.ppat.1004651
41. Parisi L, Gini E, Baci D, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res*. 2018;2018:1-25. doi:10.1155/2018/8917804
42. Yanez M, Blanchette J, Jabbarzadeh E. Modulation of Inflammatory Response to Implanted Biomaterials Using Natural Compounds. *Curr Pharm Des*. 2018;23(41):6347-6357. doi:10.2174/1381612823666170510124348
43. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger DE. Pathogenesis of foreign body infection: Description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis*. 1982;146(4):487-497. doi:10.1093/infdis/146.4.487

## Literaturverzeichnis

---

44. Barr JJ. A bacteriophages journey through the human body. *Immunol Rev.* 2017;279(1):106-122. doi:10.1111/imr.12565
45. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(7):397-409. doi:10.1038/s41579-018-0019-y
46. Høiby N, Espersen F, Fomsgaard A, et al. Biofilm, foreign bodies and chronic infections. *Ugeskr Laeger.* 1994.
47. Lew DP. Physiopathology of foreign body infections. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989;25(9):1379-1382. doi:10.1016/0277-5379(89)90091-6
48. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater.* 2012;2(4):176-194. doi:10.4161/biom.22905
49. Cai X-Y, Yang C, Zhang Z-Y, Qiu W-L, Chen M-J, Zhang S-Y. Septic Arthritis of the Temporomandibular Joint: A Retrospective Review of 40 Cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(4):731-738. doi:10.1016/j.joms.2009.07.060
50. Brady RA, Leid JG, Costerton JW, Shirliff ME. Osteomyelitis: Clinical overview and mechanisms of infection persistence. *Clin Microbiol Newsl.* 2006;28(9):65-72. doi:10.1016/j.clinmicnews.2006.04.001
51. Wetterö J, Bengtsson T, Tengvall P. Complement activation on immunoglobulin G-coated hydrophobic surfaces enhances the release of oxygen radicals from neutrophils through an actin-dependent mechanism. *J Biomed Mater Res.* 2000;51(4):742-751. doi:10.1002/1097-4636(20000915)51:4<742::AID-JBM24>3.0.CO;2-D
52. Vroman L, Adams A, Fischer G, Munoz P. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood.* 1980;55(1):156-159. doi:10.1182/blood.V55.1.156.bloodjournal551156
53. Ballet T, Boulange L, Brechet Y, Bruckert F, Weidenhaupt M. Protein conformational changes induced by adsorption onto material surfaces: an important issue for biomedical applications of material science. *Bull Polish Acad Sci Tech Sci.* 2010;58(2). doi:10.2478/v10175-010-0028-0
54. Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem.* 1991;266(17):11227-11233. doi:10.1016/S0021-9258(18)99152-0
55. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: What causes it and how can we prevent it? *J Thromb Haemost.* 2015;13(S1):S72-S81. doi:10.1111/jth.12961
56. Wijeyeratne YD, Heptinstall S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):647-657. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.03999.x
57. Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehlert JE, Bock L, Flad H-D. The  $\beta$ -thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil

## Literaturverzeichnis

---

- regulation. *J Leukoc Biol.* 2000;67(4):471-478. doi:10.1002/jlb.67.4.471
58. Fröhlich E. Action of Nanoparticles on Platelet Activation and Plasmatic Coagulation. *Curr Med Chem.* 2016;23(5):408-430. doi:10.2174/0929867323666160106151428
59. Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(20):7734-7738. doi:10.1073/pnas.85.20.7734
60. Loike JD, Sodeik B, Cao L, et al. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A $\alpha$  chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(3):1044-1048. doi:10.1073/pnas.88.3.1044
61. Morley DJ, Feuerstein IA. Adhesion of Polymorphonuclear Leukocytes to Protein-Coated and Platelet Adherent Surfaces. *Thromb Haemost.* 1989;62(03):1023-1028. doi:10.1055/s-0038-1651046
62. Kazatchkine MD, Carreno MP. Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces. *Biomaterials.* 1988;9(1):30-35. doi:10.1016/0142-9612(88)90066-X
63. Bowers VM, Fisher LR, Francis GW, Williams KL. A micromechanical technique for monitoring cell?substrate adhesiveness: Measurements of the strength of red blood cell adhesion to glass and polymer test surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1989;23(12):1453-1473. doi:10.1002/jbm.820231208
64. Rosengren A, Wallman L, Danielsen N, Laurell T, Bjursten LM. Tissue reactions evoked by porous and plane surfaces made out of silicon and titanium. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2002;49(4):392-399. doi:10.1109/10.991167
65. Misiek DJ, Kent JN, Carr RF. Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984;42(3):150-160. doi:10.1016/S0278-2391(84)80025-7
66. Nuss KMR, Rechenberg B von. Biocompatibility Issues with Modern Implants in Bone - A Review for Clinical Orthopedics. *Open Orthop J.* 2008;2(1):66-78. doi:10.2174/1874325000802010066
67. Gristina AG. Biomaterial-Centered Sepsis and the Total Artificial Heart. *JAMA.* 1988;259(6):870. doi:10.1001/jama.1988.03720060038027
68. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34-50. doi:10.1038/cr.2009.139
69. Sukavaneshvar S. Device thrombosis and pre-clinical blood flow models for assessing antithrombogenic efficacy of drug-device combinations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;112:24-34. doi:10.1016/j.addr.2016.07.009
70. Kourtzelis I, Markiewski MM, Doumas M, et al. Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis. *Blood.* 2010. doi:10.1182/blood-2010-01-264051
71. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect*

## Literaturverzeichnis

---

- Biol.* 2012. doi:10.1101/cshperspect.a006049
72. Ritis K, Doumas M, Mastellos D, et al. A Novel C5a Receptor-Tissue Factor Cross-Talk in Neutrophils Links Innate Immunity to Coagulation Pathways. *J Immunol.* 2006. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4794
73. Oikonomopoulou K, Ricklin D, Ward PA, Lambris JD. Interactions between coagulation and complement—their role in inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):151-165. doi:10.1007/s00281-011-0280-x
74. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86-100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004
75. Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J.* 2015;13(1):17. doi:10.1186/s12959-015-0048-y
76. Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care.* 2016;20(1):387. doi:10.1186/s13054-016-1570-4
77. Weber M, Steinle H, Golombek S, et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6. doi:10.3389/fbioe.2018.00099
78. Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renné T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost.* 2016;14(3):427-437. doi:10.1111/jth.13235
79. Wachtfogel YT, Hack CE, Nuijens JH, et al. Selective kallikrein inhibitors alter human neutrophil elastase release during extracorporeal circulation. *Am J Physiol Circ Physiol.* 1995;268(3):H1352-H1357. doi:10.1152/ajpheart.1995.268.3.H1352
80. Bae SW, Kim HS, Cha YN, Park YS, Jo SA, Jo I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(4):981-987. doi:10.1016/S0006-291X(03)01086-6
81. Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* 1989;247(2):189-192. doi:10.1016/0014-5793(89)81331-6
82. Heinlin J, Schreml S, Babilas P, Landthaler M, Karrer S. Wundheilung Therapeutische Interventionen. doi:10.1007/s00105-010-1978-8
83. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(1):a023267. doi:10.1101/cshperspect.a023267
84. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-321. doi:10.1038/nature07039
85. Ross R, Odland G. Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. *J Cell Biol.* 1968;39(1):152-168.

## Literaturverzeichnis

---

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5678446>. Accessed March 29, 2018.
86. Larsen R. Blutgerinnung. In: *Anästhesie Und Intensivmedizin Für Die Fachpflege*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016:276-281. doi:10.1007/978-3-662-50444-4\_18
  87. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-870. doi:10.1152/physrev.2003.83.3.835
  88. Wu L, Yu YL, Galiano RD, Roth SI, Mustoe TA. Macrophage Colony-Stimulating Factor Accelerates Wound Healing and Upregulates TGF- $\beta$ 1 mRNA Levels through Tissue Macrophages. *J Surg Res*. 1997;72(2):162-169. doi:10.1006/jsre.1997.5178
  89. Klar AS, Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, et al. Differential expression of granulocyte, macrophage, and hypoxia markers during early and late wound healing stages following transplantation of tissue-engineered skin substitutes of human origin. *Pediatr Surg Int*. 2014;30(12):1257-1264. doi:10.1007/s00383-014-3616-5
  90. Leal EC, Carvalho E, Tellechea A, et al. Substance P Promotes Wound Healing in Diabetes by Modulating Inflammation and Macrophage Phenotype. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1638-1648. doi:10.1016/j.ajpath.2015.02.011
  91. You H-J, Han S-K. Cell Therapy for Wound Healing. *J Korean Med Sci*. 2014;29(3):311. doi:10.3346/jkms.2014.29.3.311
  92. Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med*. 1972;135(4):719-734. doi:10.1084/JEM.135.4.719
  93. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998-1008. doi:10.1038/SJ.JID.5700786
  94. Grinnell F. Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem*. 1984;26(2):107-116. doi:10.1002/jcb.240260206
  95. DiPietro LA. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(1):87-91. doi:10.1097/BOR.0b013e32835b13b6
  96. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11(1):73-91. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000445
  97. Ferguson MW, Whitby DJ, Shah M, Armstrong J, Siebert JW, Longaker MT. Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plast Reconstr Surg*. 1996;97(4):854-860. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8628785>. Accessed April 1, 2018.
  98. Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MWJ. Skin scarring. *BMJ*. 2003;326(7380):88-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12521975>. Accessed April 1, 2018.
  99. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005;13(1):7-12. doi:10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x

## Literaturverzeichnis

---

100. SANTORO M, GAUDINO G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):274-286. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.033
101. Rubinstein B, Fournier MF, Jacobson K, Verkhovsky AB, Mogilner A. Actin-Myosin Viscoelastic Flow in the Keratocyte Lamellipod. *Biophys J.* 2009;97(7):1853-1863. doi:10.1016/j.bpj.2009.07.020
102. Chapman S, McDermott DH, Shen K, Jang M, McBride AA. The effect of Rho kinase inhibition on long-term keratinocyte proliferation is rapid and conditional. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(2):60. doi:10.1186/scrt449
103. Zaozao Chen Z, Atchison L, HaYeun Ji H, Leong KW. Nanograting structure promotes lamellipodia-based cell collective migration and wound healing. In: *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.* Vol 2014. IEEE; 2014:2916-2919. doi:10.1109/EMBC.2014.6944233
104. Link A, Cattaneo G, Brynda E, et al. Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow. *J Vis Exp.* 2020;2020(157):e60610. doi:10.3791/60610
105. Standard I. INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-4: Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood. *ISO.* 2002.
106. DIN EN ISO 10993-4 - 2017-12 - Beuth.de. doi:10.31030/2597308
107. Braune S, Grunze M, Straub A, Jung F. Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials? *Biointerphases.* 2013;8(1):33. doi:10.1186/1559-4106-8-33
108. Blok SLJ, Engels GE, van Oeveren W. In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. *Biointerphases.* 2016;11(2):029802. doi:10.1116/1.4941850
109. Benowitz NL, Fitzgerald GA, Wilson M, Zhang Q. Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: Comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22(4):1159-1167. doi:10.1016/0735-1097(93)90431-Y
110. Norris LA, Bonnar J. Haemostatic changes and the oral contraceptive pill. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1997;11(3):545-564. doi:10.1016/S0950-3552(97)80027-2
111. Millar CM, Laffan M. Hemostatic Changes in Normal Pregnancy. In: *Disorders of Thrombosis and Hemostasis in Pregnancy.* Cham: Springer International Publishing; 2015:1-13. doi:10.1007/978-3-319-15120-5\_1
112. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: Beyond strictly antiplatelet actions. *Blood.* 2007. doi:10.1182/blood-2006-01-010645
113. Schafer AI. Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs on Platelet Function and Systemic Hemostasis. *J Clin Pharmacol.* 1995;35(3):209-219. doi:10.1002/j.1552-4604.1995.tb04050.x

## Literaturverzeichnis

---

114. Brown CH, Natelson EA, Bradshaw W, Williams TW, Alfrey CP. The Hemostatic Defect Produced by Carbenicillin. *N Engl J Med.* 1974;291(6):265-270. doi:10.1056/NEJM197408082910601
115. ASTM. Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials 1. *Practice.* 2013.
116. Steller U, Sperling C, Hübner J, Hanke R, Werner C. Design and evaluation of novel blood incubation systems for in vitro hemocompatibility assessment of planar solid surfaces. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2003;66B(1):379-390. doi:10.1002/jbm.b.10016
117. Sanak M, Jakiela B, Węgrzyn W. Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests. *Bull Polish Acad Sci Tech Sci.* 2010;58(2). doi:10.2478/v10175-010-0029-z
118. van Oeveren W. Obstacles in Haemocompatibility Testing. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:1-14. doi:10.1155/2013/392584
119. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost.* 2008;100(09):397-404. doi:10.1160/TH08-02-0103
120. Zhang L, Casey B, Galanakis DK, et al. The influence of surface chemistry on adsorbed fibrinogen conformation, orientation, fiber formation and platelet adhesion. *Acta Biomater.* 2017;54:164-174. doi:10.1016/j.actbio.2017.03.002
121. Miale JB. *Laboratory Medicine, Hematology.* C. V. Mosby Co.; 1977. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300551938>. Accessed December 16, 2020.
122. Lewis SM, Rowan RM, Kubota F. Evaluation of a prototype for a reference platelet counter. *J Clin Pathol.* 1990;43(11):932-936. doi:10.1136/jcp.43.11.932
123. Cattaneo G, Bräuner C, Siekmeyer G, et al. In vitro investigation of chemical properties and biocompatibility of neurovascular braided implants. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(6):1-12. doi:10.1007/s10856-019-6270-6
124. Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Fröhlich E. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology.* 2009;258(2-3):139-147. doi:10.1016/j.tox.2009.01.015
125. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol.* 1992;119(1):229-238. doi:10.1083/jcb.119.1.229
126. Alipour A, van Oostrom AJHH., Izraeljan A, et al. Leukocyte Activation by Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(4):792-797. doi:10.1161/ATVBAHA.107.159749
127. Neun BW, Dobrovolskaia MA. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties In Vitro. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.).* ; 2011:215-224. doi:10.1007/978-1-60327-198-1\_23
128. Kopp R, Mottaghy K, Kirschfink M. Mechanism of Complement Activation During Extracorporeal

## Literaturverzeichnis

---

- Blood-Biomaterial Interaction: Effects of Heparin Coated and Uncoated Surfaces. *ASAIO J.* 2002;48(6):598-605. doi:10.1097/00002480-200211000-00005
129. Engberg AE, Rosengren-Holmberg JP, Chen H, et al. Blood protein-polymer adsorption: Implications for understanding complement-mediated hemoincompatibility. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2011. doi:10.1002/jbm.a.33030
130. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol.* 2007;44(1-3):82-94. doi:10.1016/j.molimm.2006.06.020
131. Kim SW, Lee RG, Oster H, et al. Platelet adhesion to polymer surfaces. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1974;20 B:449-455. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4141527>.
132. Park K, Mosher DF, Cooper SL. Acute surface-induced thrombosis in the canine ex vivo model: Importance of protein composition of the initial monolayer and platelet activation. *J Biomed Mater Res.* 1986. doi:10.1002/jbm.820200506
133. Kang IK, Kwon BK, Lee JH, Lee HB. Immobilization of proteins on poly(methyl methacrylate) films. *Biomaterials.* 1993. doi:10.1016/0142-9612(93)90045-4
134. EBERHART RC, MUNRO MS, FRAUTSCHI JR, et al. Influence of Endogenous Albumin Binding on Blood-Material Interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;516(1 Blood in Cont):78-95. doi:10.1111/j.1749-6632.1987.tb33032.x
135. Ishihara K. Blood-Compatible Surfaces with Phosphorylcholine-Based Polymers for Cardiovascular Medical Devices. *Langmuir.* 2019;35(5):1778-1787. doi:10.1021/acs.langmuir.8b01565
136. Liu J, Pedersen LC. Anticoagulant heparan sulfate: Structural specificity and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(2):263-272. doi:10.1007/s00253-006-0722-x
137. Björk I, Lindahl U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol Cell Biochem.* 1982;48(3):161-182. doi:10.1007/BF00421226
138. de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review. *Biomacromolecules.* 2008;9(11):2969-2979. doi:10.1021/bm800681k
139. Melchiorri AJ, Hibino N, Yi T, et al. Contrasting biofunctionalization strategies for the enhanced endothelialization of biodegradable vascular grafts. *Biomacromolecules.* 2015;16(2):437-446. doi:10.1021/bm501853s
140. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2005;23(1):47-55. doi:10.1038/nbt1055
141. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering. *J Cell Physiol.* 2004;199(2):174-180. doi:10.1002/jcp.10471
142. Zheng W, Wang Z, Song L, et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular

## Literaturverzeichnis

---

- grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials*. 2012;33(10):2880-2891. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.047
143. Jun H-W, West J. Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2004;15(1):73-94. doi:10.1163/156856204322752246
144. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated  $\beta$ -cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials*. 2007;28(19):3004-3011. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.005
145. Avci-Adali M, Stoll H, Wilhelm N, Perle N, Schlensak C, Wendel HP. In vivo Tissue Engineering: Mimicry of Homing Factors for Self-Endothelialization of Blood-Contacting Materials. *Pathobiology*. 2013;80(4):176-181. doi:10.1159/000347222
146. Markway BD, McCarty OJT, Marzec UM, Courtman DW, Hanson SR, Hinds MT. Capture of flowing endothelial cells using surface-immobilized anti-kinase insert domain receptor antibody. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2008;14(2):97-105. doi:10.1089/ten.tec.2007.0300
147. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 2003;101(1):168-172. doi:10.1182/blood-2002-03-0755
148. Aoki J, Serruys PW, Van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: The HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First in Man) registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1574-1579. doi:10.1016/j.jacc.2005.01.048
149. Hoffmann J, Paul A, Harwardt M, et al. Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *J Biomed Mater Res Part A*. 2008;84A(3):614-621. doi:10.1002/jbm.a.31309
150. Heinlin J, Schreml S, Babilas P, Landthaler M, Karrer S. Wundheilung. *Der Hautarzt*. 2010;61(7):611-628. doi:10.1007/s00105-010-1978-8
151. Frieß W, Metzmacher I, Wild T. Die Bedeutung von Kollagen und Kollagenasen in der Wundheilung. In: *Manual Der Wundheilung*. Vienna: Springer Vienna; 2007:89-97. doi:10.1007/978-3-211-69454-1\_12
152. Wiegand C, Schönfelder U, Abel M, Ruth P, Kaatz M, Hipler U-C. Protease and pro-inflammatory cytokine concentrations are elevated in chronic compared to acute wounds and can be modulated by collagen type I in vitro. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(6):419-428. doi:10.1007/s00403-009-1011-1
153. Goa KL, Benfield P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs*. 1994;47(3):536-566. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514978>. Accessed March 31, 2018.

## Literaturverzeichnis

---

154. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J Vasc Surg.* 1995;21(1):71-78; discussion 79-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823364>. Accessed March 31, 2018.
155. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018. doi:10.1038/nrd.2017.243
156. Michel T, Kankura A, Salinas Medina ML, et al. In Vitro Evaluation of a Novel mRNA-Based Therapeutic Strategy for the Treatment of Patients Suffering from Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Nucleic Acid Ther.* 2015;25(5):235-244. doi:10.1089/nat.2015.0537
157. Patel S, Athirasala A, Menezes PP, et al. Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Tissue Eng - Part A.* 2019;25(1-2):91-112. doi:10.1089/ten.tea.2017.0444
158. Abraham MK, Nolte A, Reus R, et al. In vitro study of a novel stent coating using modified CD39 messenger RNA to potentially reduce stent angioplasty-associated complications. Ahrens I, ed. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138375. doi:10.1371/journal.pone.0138375
159. Xiong Q, Lee GY, Ding J, Li W, Shi J. Biomedical applications of mRNA nanomedicine. doi:10.1007/s12274-018-2146-1
160. Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J, Rudolph C. Current prospects for mRNA gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(3):484-489. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.016
161. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(8):3173-3178. doi:10.1007/s00216-010-3821-6
162. Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA.* 2001;7(10):1486-1495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11680853>. Accessed March 30, 2018.
163. Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *J Biol Chem.* 2006;281(4):1857-1867. doi:10.1074/jbc.M509121200
164. Karikó K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007;10(5):523-532. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786850>. Accessed March 30, 2018.
165. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther.* 2008;16(11):1833-1840. doi:10.1038/mt.2008.200
166. Hajj KA, Whitehead KA. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery.

## Literaturverzeichnis

---

- Nat Rev Mater.* 2017;2(10):1-17. doi:10.1038/natrevmats.2017.56
167. Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, et al. Immunize and disappear-Safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):1070-1077.e11. doi:10.1016/j.jaci.2009.06.036
168. Washbourne P, McAllister AK. Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12(5):566-573. doi:10.1016/S0959-4388(02)00365-3
169. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):145-160. doi:10.1038/nrd1632
170. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(16):6077-6081. doi:10.1073/pnas.86.16.6077
171. Anderson DM, Hall LL, Ayyalapu AR, Irion VR, Nantz MH, Hecker JG. Stability of mRNA/cationic lipid lipoplexes in human and rat cerebrospinal fluid: Methods and evidence for nonviral mRNA gene delivery to the central nervous system. *Hum Gene Ther.* 2003;14(3):191-202. doi:10.1089/10430340360535751
172. Abraham M-K, Peter K, Michel T, Wendel HP, Krajewski S, Wang X. Nanoliposomes for Safe and Efficient Therapeutic mRNA Delivery: A Step Toward Nanotheranostics in Inflammatory and Cardiovascular Diseases as well as Cancer. *Nanotheranostics.* 2017;1(2):154-165. doi:10.7150/ntno.19449
173. Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol.* 2011;29(2):154-159. doi:10.1038/nbt.1733
174. Karikó K, Muramatsu H, Keller JM, Weissman D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol Ther.* 2012;20(5):948-953. doi:10.1038/mt.2012.7
175. Thess A, Grund S, Mui BL, et al. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol Ther.* 2015;23(9):1456-1464. doi:10.1038/mt.2015.103
176. Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(7):581-593. doi:10.1038/nrd1775
177. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(16):7297-7301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638184>. Accessed March 31, 2018.
178. Singh B, Maharjan S, Park T-E, et al. Tuning the Buffering Capacity of Polyethylenimine with Glycerol Molecules for Efficient Gene Delivery: Staying In or Out of the Endosomes. *Macromol Biosci.* 2015;15(5):622-635. doi:10.1002/mabi.201400463
179. Panzner S. Transfection: Viral and Synthetic Techniques Converge. *Genet Eng Biotechnol*

- News. 2014;34(4):20-21. doi:10.1089/gen.34.04.12
180. Engels GE, Blok SLJ, van Oeveren W. In vitro blood flow model with physiological wall shear stress for hemocompatibility testing—An example of coronary stent testing . *Biointerphases*. 2016;11(3):031004. doi:10.1116/1.4958979
181. Lippi G, Salvagno G, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(6):565-575. doi:10.1055/s-0032-1315961
182. Michel T, Luft D, Abraham M-K, et al. Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2017;8(September):459-468. doi:10.1016/j.omtn.2017.07.013
183. Dewanjee MK, Kapadvanjwala M, Ruzius K, Serafini AN, Zilleruelo GE, Sfakianakis GN. Quantitation of thrombogenicity of hemodialyzer with technetium-99m and indium-111 labeled platelets. *Nucl Med Biol*. 1993;20(5):579-587. doi:10.1016/0969-8051(93)90026-Q
184. Seyfert UT, Biehl V, Schenk J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. In: *Biomolecular Engineering*. ; 2002. doi:10.1016/S1389-0344(02)00015-1
185. Haycox CL, Ratner BD. In vitro platelet interactions in whole human blood exposed to biomaterial surfaces: Insights on blood compatibility. *J Biomed Mater Res*. 1993;27(9):1181-1193. doi:10.1002/jbm.820270909
186. Van Kruchten R, Cossemans JMEM, Heemskerk JWM. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers – a practical guide. *Platelets*. 2012;23(3):229-242. doi:10.3109/09537104.2011.630848
187. Lackner JM, Waldhauser W, Hartmann P, et al. Hemocompatibility of Inorganic Physical Vapor Deposition (PVD) Coatings on Thermoplastic Polyurethane Polymers. *J Funct Biomater*. 2012;3(2):283-297. doi:10.3390/jfb3020283
188. Stang K, Krajewski S, Neumann B, et al. Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: Discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation. *Mater Sci Eng C*. 2014;42:422-428. doi:10.1016/j.msec.2014.05.070
189. McClung WG, Babcock DE, Brash JL. Fibrinolytic properties of lysine-derivatized polyethylene in contact with flowing whole blood (Chandler loop model). *J Biomed Mater Res Part A*. 2007;81A(3):644-651. doi:10.1002/jbm.a.31018
190. Krajewski S, Pucek R, Panacek A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7460-7468. doi:10.1016/j.actbio.2013.03.016
191. Podias A, Groth TH, Missirlis Y. The effect of shear rate on the adhesion/activation of human platelets in flow through a closed-loop polymeric tubular system. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1995. doi:10.1163/156856294X00392

192. Wang D, Ji J, Gao C, Yu G, Feng L. Surface coating of stearyl poly(ethylene oxide) coupling-polymer on polyurethane guiding catheters with poly(ether urethane) film-building additive for biomedical applications. *Biomaterials*. 2001;22(12):1549-1562. doi:10.1016/S0142-9612(00)00311-2
193. Mueller M, Krolitzki B, Glasmacher B. Dynamic in vitro hemocompatibility testing – improving the signal to noise ratio. *Biomed Eng / Biomed Tech*. 2012;57(SI-1 Track-D). doi:10.1515/bmt-2012-4211
194. Ritz-Timme S, Eckelt N, Schmidtke E, Thomsen H. Genesis and diagnostic value of leukocyte and platelet accumulations around “air bubbles” in blood after venous air embolism. *Int J Legal Med*. 1997;111(1):22-26. doi:10.1007/s004140050105
195. Miller R, Fainerman VB, Wüstneck R, Krägel J, Trukhin DV. Characterisation of the initial period of protein adsorption by dynamic surface tension measurements using different drop techniques. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 1998;131(1-3):225-230. doi:10.1016/S0927-7757(97)00075-7
196. van Oeveren W, Tielliu IF, de Hart J. Comparison of Modified Chandler, Roller Pump, and Ball Valve Circulation Models for In Vitro Testing in High Blood Flow Conditions: Application in Thrombogenicity Testing of Different Materials for Vascular Applications. *Int J Biomater*. 2012;2012:1-7. doi:10.1155/2012/673163
197. Krajewski S, Neumann B, Kurz J, et al. Preclinical Evaluation of the Thrombogenicity and Endothelialization of Bare Metal and Surface-Coated Neurovascular Stents. *Am J Neuroradiol*. 2015;36(1):133-139. doi:10.3174/ajnr.A4109
198. Münch K, Wolf MF, Gruffaz P, et al. Use of simple and complex in vitro models for multiparameter characterization of human blood-material/device interactions. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000;11(11):1147-1163. doi:10.1163/156856200744246
199. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Rezek I, Lewis DA, Kallmes DF. Cellular mechanisms of aneurysm occlusion after treatment with a flow diverter. *Radiology*. 2014;270(2):394-399. doi:10.1148/radiol.13130796
200. Martínez Moreno R, Bhogal P, Lenz-Habijan T, et al. In vivo canine study of three different coatings applied to p64 flow-diverter stents: initial biocompatibility study. *Eur Radiol Exp*. 2019;3(1):3. doi:10.1186/s41747-018-0084-z
201. Ravindran K, Salem MM, Alturki AY, Thomas AJ, Ogilvy CS, Moore JM. Endothelialization following flow diversion for intracranial aneurysms: A systematic review. *Am J Neuroradiol*. 2019;40(2):295-301. doi:10.3174/ajnr.A5955
202. Nelson PK, Lylyk P, Szikora I, Wetzel SG, Wanke I, Fiorella D. The pipeline embolization device for the intracranial treatment of aneurysms trial. *Am J Neuroradiol*. 2011;32(1):34-40. doi:10.3174/ajnr.A2421

## Literaturverzeichnis

---

203. Girdhar G, Andersen A, Pangerl E, et al. Thrombogenicity assessment of Pipeline Flex, Pipeline Shield, and FRED flow diverters in an in vitro human blood physiological flow loop model. *J Biomed Mater Res Part A*. 2018;106(12):3195-3202. doi:10.1002/jbm.a.36514
204. Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1564-1571. doi:10.1021/bm0341834
205. Chen XH, Chen CS, Xiao HN, Cheng FQ, Zhang G, Yi GJ. Corrosion behavior of carbon nanotubes-Ni composite coating. *Surf Coatings Technol*. 2005;191(2-3):351-356. doi:10.1016/j.surfcoat.2004.04.055
206. Gu XN, Li N, Zhou WR, et al. Corrosion resistance and surface biocompatibility of a microarc oxidation coating on a Mg-Ca alloy. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1880-1889. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.034
207. Prasai D, Tuberquia JC, Harl RR, Jennings GK, Bolotin KI. Graphene: Corrosion-inhibiting coating. *ACS Nano*. 2012;6(2):1102-1108. doi:10.1021/nn203507y
208. Gong YK, Winnik FM. Strategies in biomimetic surface engineering of nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. 2012;4(2):360-368. doi:10.1039/c1nr11297j
209. Lavery KS, Rhodes C, Mcgraw A, Eppihimer MJ. Anti-thrombotic technologies for medical devices. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;112:2-11. doi:10.1016/j.addr.2016.07.008
210. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet*. 2003;361(9353):247-249. doi:10.1016/S0140-6736(03)12275-1
211. Park S-J, Shim WH, Ho DS, et al. A Paclitaxel-Eluting Stent for the Prevention of Coronary Restenosis. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1537-1545. doi:10.1056/NEJMoa021007
212. Aoki J, Kirtane A, Leon MB, Dangas G. Coronary Artery Aneurysms After Drug-Eluting Stent Implantation. *JACC Cardiovasc Interv*. 2008;1(1):14-21. doi:10.1016/j.jcin.2007.10.004
213. Lieber BB, Sadasivan C. Endoluminal scaffolds for vascular reconstruction and exclusion of aneurysms from the cerebral circulation. In: *Stroke*. Vol 41. Lippincott Williams & Wilkins; 2010. doi:10.1161/STROKEAHA.110.595066
214. Hayward JA, Chapman D. Biomembrane surfaces as models for polymer design: the potential for haemocompatibility. *Biomaterials*. 1984;5(3):135-142. doi:10.1016/0142-9612(84)90047-4
215. Starke RM, Thompson J, Pagani A, et al. Preclinical safety and efficacy evaluation of the Pipeline Vantage Embolization Device with Shield Technology. *J Neurointerv Surg*. 2020;12(10):981-986. doi:10.1136/neurintsurg-2020-016043
216. Henkes H, Bhogal P, Aguilar Pérez M, et al. Anti-thrombogenic coatings for devices in neurointerventional surgery: Case report and review of the literature. *Interv Neuroradiol*. 2019;25(6):619-627. doi:10.1177/1591019919858000

## Literaturverzeichnis

---

217. Lenz-Habijan T, Bhogal P, Peters M, et al. Hydrophilic Stent Coating Inhibits Platelet Adhesion on Stent Surfaces: Initial Results In Vitro. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2018;41(11):1779-1785. doi:10.1007/s00270-018-2036-7
218. Lenz-Habijan T, Bhogal P, Bannewitz C, et al. Prospective study to assess the tissue response to HPC-coated p48 flow diverter stents compared to uncoated devices in the rabbit carotid artery model. *Eur Radiol Exp*. 2019;3(1):47. doi:10.1186/s41747-019-0128-z
219. Brubert J, Krajewski S, Wendel HP, Nair S, Stasiak J, Moggridge GD. Hemocompatibility of styrenic block copolymers for use in prosthetic heart valves. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(2):1-12. doi:10.1007/s10856-015-5628-7
220. Pan C-J, Pang L-Q, Gao F, et al. Anticoagulation and endothelial cell behaviors of heparin-loaded graphene oxide coating on titanium surface. *Mater Sci Eng C*. 2016;63:333-340. doi:10.1016/j.msec.2016.03.001
221. Bae I-H, Park I-K, Park DS, Lee H, Jeong MH. Thromboresistant and endothelialization effects of dopamine-mediated heparin coating on a stent material surface. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(5):1259-1269. doi:10.1007/s10856-012-4587-5
222. Huang L-Y, Yang M-C, Tsou H-M, Liu T-Y. Hemocompatibility and anti-fouling behavior of multilayer biopolymers immobilized on gold-thiolized drug-eluting cardiovascular stents. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;173:470-477. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.014
223. Werner C, Maitz MF, Sperling C. Current strategies towards hemocompatible coatings. *J Mater Chem*. 2007;17(32):3376-3384. doi:10.1039/b703416b
224. Sperling C, Houska M, Brynda E, Streller U, Werner C. In vitro hemocompatibility of albumin-heparin multilayer coatings on polyethersulfone prepared by the layer-by-layer technique. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;76(4):681-689. doi:10.1002/jbm.a.30519
225. Ahmed TAE, Dare E V., Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(2):199-215. doi:10.1089/ten.teb.2007.0435
226. Kaplan O, Hierlemann T, Krajewski S, et al. Low-thrombogenic fibrin-heparin coating promotes *in vitro* endothelialization. *J Biomed Mater Res Part A*. 2017;105(11):2995-3005. doi:10.1002/jbm.a.36152
227. Riedelová-Reichelová Z, Brynda E, Riedel T. Fibrin Nanostructures for Biomedical Applications. *Physiol Res*. 2016;65:263-272. doi:10.33549/physiolres.933428
228. Harenberg J. Thrombin-antithrombin (TAT) complexes. In: *Laboratory Techniques in Thrombosis - a Manual*. Springer Netherlands; 1999:209-216. doi:10.1007/978-94-011-4722-4\_22
229. Maitz MF, Sperling C, Wongpinyochit T, Herklotz M, Werner C, Seib FP. Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2017. doi:10.1016/j.nano.2017.07.012
230. Táborská J, Riedelová Z, Brynda E, Májek P, Riedel T. Endothelialization of an ePTFE vessel

- prosthesis modified with an antithrombogenic fibrin/heparin coating enriched with bound growth factors. *RSC Adv.* 2021;11(11):5903-5913. doi:10.1039/D1RA00053E
231. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med.* 2010;5(1):107-120. doi:10.2217/rme.09.77
232. Williams SK, Kleinert LB, Patula-Steinbrenner V. Accelerated neovascularization and endothelialization of vascular grafts promoted by covalently bound laminin type 1. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2011;99 A(1):67-73. doi:10.1002/jbm.a.33138
233. Ren X, Feng Y, Guo J, et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev.* 2015;44(15):5680-5742. doi:10.1039/c4cs00483c
234. Ryhänen J. Biocompatibility of Nitinol. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2000;9(2):99-105. doi:10.3109/13645700009063056
235. Ding Y, Yang M, Yang Z, et al. Cooperative control of blood compatibility and re-endothelialization by immobilized heparin and substrate topography. *Acta Biomater.* 2015;15:150-163. doi:10.1016/j.actbio.2014.12.014
236. Yang Z, Tu Q, Wang J, Huang N. The role of heparin binding surfaces in the direction of endothelial and smooth muscle cell fate and re-endothelialization. *Biomaterials.* 2012;33(28):6615-6625. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.055
237. Hoshi RA, Van Lith R, Jen MC, Allen JB, Lapidos KA, Ameer G. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials.* 2013;34(1):30-41. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.046
238. Beer HD, Gassmann MG, Munz B, et al. Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000. doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00009.x
239. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377-1397. doi:10.3390/polym3031377
240. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv.* 2015;6(1):41-58. doi:10.4155/tde.14.91
241. Marquette S, Peerboom C, Yates A, et al. Stability study of full-length antibody (anti-TNF alpha) loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm.* 2014;470(1-2):41-50. doi:10.1016/J.IJPHARM.2014.04.063
242. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care.* 1998;21(5):822-827. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9589248>. Accessed April 18, 2019.
243. Pierce GF. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth

## Literaturverzeichnis

---

- factor. *J Exp Med.* 2004;179(3):831-840. doi:10.1084/jem.179.3.831
244. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. Epstein FH, ed. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-746. doi:10.1056/NEJM199909023411006
245. Cross SE, Roberts MS. Defining a Model to Predict the Distribution of Topically Applied Growth Factors and Other Solutes in Excisional Full-Thickness Wounds. *J Invest Dermatol.* 1999;112(1):36-41. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00473.x
246. Dijon AJ, Gallup DG, Behzadian MA, Metheny WP. Assessment of epidermal growth factor in the healing process of clean full-thickness skin wounds. *Am J Obstet Gynecol.* 1989. doi:10.1016/0002-9378(89)90945-9
247. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6):442-452. doi:10.1046/j.1524-475X.1999.00442.x
248. Braun-Falco M. Getherapeutische Konzepte zur Förderung der Wundheilung. *Der Hautarzt.* 2002;53(4):238-243. doi:10.1007/s00105-002-0353-9
249. Branski LK, Gauglitz GG, Herndon DN, Jeschke MG. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns.* 2009;35(2):171-180. doi:10.1016/j.burns.2008.03.009
250. Kopp J, Wang GY, Kulmburg P, et al. Accelerated Wound Healing by In vivo Application of Keratinocytes Overexpressing KGF. *Mol Ther.* 2004;10(1):86-96. doi:10.1016/J.YMTHE.2004.04.016
251. Marti G, Ferguson M, Wang J, et al. Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model. *Gene Ther.* 2004. doi:10.1038/sj.gt.3302383
252. Youn H, Chung J-K. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(9):1337-1348. doi:10.1517/14712598.2015.1057563
253. Michel T, Wendel H-P, Krajewski S. Next-Generation Therapeutics: mRNA as a Novel Therapeutic Option for Single-Gene Disorders. In: *Modern Tools for Genetic Engineering.* InTech; 2016. doi:10.5772/62243
254. Zhdanov RI, Podobed O V, Vlassov V V. Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry.* 2002;58(1):53-64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401571>. Accessed March 31, 2018.
255. Choi CHJ, Hao L, Narayan SP, Auyeung E, Mirkin CA. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(19):7625-7630. doi:10.1073/pnas.1305804110
256. White JL, Choi DD. *Polyolefins: Processing, Structure Development and Properties.* Hanser; 2005. [https://books.google.de/books/about/Polyolefins.html?id=N8cGnwEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.de/books/about/Polyolefins.html?id=N8cGnwEACAAJ&redir_esc=y). Accessed April 9, 2018.

## Literaturverzeichnis

---

257. Franck A, Herr B, Ruse H, Schulz G. *Kunststoff-Kompendium*. Vogel Business Media; 2011.
258. Denzinger M, Link A, Kurz J, et al. Keratinocyte Growth Factor Modified Messenger RNA Accelerating Cell Proliferation and Migration of Keratinocytes. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(6):335-347. doi:10.1089/nat.2018.0737
259. Ludwick AG, Overberger CG. Synthesis and characterization of polyethylenimine backbone polynucleotide models. *J Polym Sci Polym Chem Ed.* 2003. doi:10.1002/pol.1982.170200816
260. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3640-3659. doi:10.3390/ijms15033640
261. Matouš J, Hrnčířík J, Novák JP, Šobr J. Liquid-liquid equilibrium in the system water-tetrahydrofuran. *Collect Czechoslov Chem Commun.* 1970;35(6):1904-1905. doi:10.1135/cccc19701904
262. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12542-12550. doi:10.1074/jbc.M310175200
263. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165-175. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008
264. Masotti A, Mossa G, Cametti C, et al. Comparison of different commercially available cationic liposome–DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2009;68(2):136-144. doi:10.1016/J.COLSURFB.2008.09.017
265. Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology.* 2010;151(2):458-465. doi:10.1210/en.2009-1082

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
C5b9	Terminaler Lysekomplex
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Da	Dalton
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
DOTMA	1,2-Di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propan
ECM	Extrazelluläre Matrix ( <i>extracellular matrix</i> )
eGFP	Verstärktes grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
EPCs	Endothliale Vorläuferzellen ( <i>endothelial progenitor cells</i> )
FDA	Behörde für Lebens- und Arzneimittel ( <i>food and drug administration</i> )
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
HMWK	Hochmolekulares Kininogen ( <i>high molculare weigth kininogen</i> )
IFN-β	Interferon-β
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
ISO	Internationale Organisation für Normung ( <i>international organization for standardization</i> )
IUPAC	Internationalen Union für reine und angewandte Chemie ( <i>international union of pure and applied chemistry</i> )
KGF	Keratinocyten Wachstumsfaktor ( <i>keratinocyte growth factor</i> )
KKS	Kallikrein-Kinin-System
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
min	Minuten
mL	Milliliter
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )

## Anhang

---

NO <sub>2</sub>	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PDGF	Thrombozytären Wachstumsfaktor ( <i>platelet derived growth factor</i> )
PEI	Polyethylenimin
PET	Polyethylenterephthalat
PF4	Plättchenfaktor 4
PK	Prä-Kallikrein
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PSGL-1	P-Selektin-Glykoproteinligand-1
PTT	Partielle Thromboplastinzeit ( <i>partial thromboplastin time</i> )
rhPDGF	Rekombinanter humaner Thrombozytären Wachstumsfaktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
TAT	Thrombin-Antithrombin III
TCC	Terminaler Lysekomplex ( <i>terminal complement complex</i> )
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
THF	Tetrahydrofuran
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren ( <i>toll like receptor</i> )
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
αIIbβ <sub>3</sub>	Glykoprotein IIb/IIIa
β-TG	β-Thromboglobulin

### 7.2 Eigenanteil der Publikationen

#### Publikation I

Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow

- A. Link: Studiendesign, Durchführung der Versuche, Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen, Manuskriptentwurf und -korrektur
- G. Cattaneo: Etablierung des Flow Loop Modells, Dateninterpretation und Manuskriptkorrektur
- E. Brynda: Etablierung der Fibrin-Heparin-Beschichtung, Manuskriptkorrektur
- T. Riedel: Etablierung der Fibrin-Heparin-Beschichtung, Manuskriptkorrektur
- J. Kucerova: Etablierung der Fibrin-Heparin-Beschichtung, Manuskriptkorrektur
- C. Schlensak: Studiendesign, Manuskriptkorrektur
- H. P. Wendel: Studiendesign, Manuskriptkorrektur
- S. Krajewski: Studiendesign, Dateninterpretation, Manuskriptentwurf und -korrektur
- T. Michel: Studiendesign, Durchführung der Versuche, Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen, Manuskriptentwurf und -korrektur

### Publikation II

In vitro investigation of an intracranial flow diverter with a fibrin-based, hemostasis mimicking, nanocoating

- A. Link: Studiendesign, Durchführung der Versuche, Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen, Manuskriptentwurf und -korrektur
- T. Michel: Durchführung der Versuche, Dateninterpretation, Manuskriptentwurf und -korrektur
- M. Schaller: Durchführung der Konfokalmikroskopie, Manuskriptkorrektur
- T. Tronser: Applikation der Nanobeschichtung, Manuskriptkorrektur
- S. Krajewski: Studiendesign, Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen und Manuskriptkorrektur
- G. Cattaneo: Applikation der Nanobeschichtung, Studiendesign, Dateninterpretation, Manuskriptentwurf und -korrektur

### Publikation III

Development of a Novel Polymer-Based mRNA Coating for Surgical Suture to Enhance Wound Healing

- A. Link: Studiendesign, Durchführung der Versuche, Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen, Manuskriptentwurf und -korrektur
- H. Haag: Durchführung der Versuche, Dateninterpretation und Manuskriptkorrektur
- T. Michel: Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen, Manuskriptkorrektur
- M. Denzinger: Dateninterpretation, Manuskriptkorrektur
- H. P. Wendel: Studiendesign, Manuskriptkorrektur
- C. Schlensak: Studiendesign, Manuskriptkorrektur
- S. Krajewski: Studiendesign, Dateninterpretation, Erstellung von Abbildungen und Manuskriptkorrektur

### 7.3 Publikationsliste

**Link, Antonia**, Tatjana Michel, Martin Schaller, Tina Tronser, Stefanie Krajewski, and Giorgio Cattaneo, '*In Vitro Investigation of an Intracranial Flow Diverter with a Fibrin-Based, Hemostasis Mimicking, Nanocoating*', *Biomedical Materials*, 16.1 (2020), 015026 <<https://doi.org/10.1088/1748-605X/abc8d3>>

---

Denzinger, Markus, Manuel Held, Adrien Daigeler, Stefanie Krajewski, and **Antonía Link**, '*Complement Activation at the Interface of Wound Dressings and Blood Does Not Influence Keratinocyte Migration/Proliferation in Vitro*', *Wound Repair and Regeneration*, 28.4 (2020), 573–75 <<https://doi.org/10.1111/wrr.12817>>

---

**Link, Antonia**, Giorgio Cattaneo, Eduard Brynda, Tomas Riedel, Johanka Kucerova, Christian Schlensak, and others, '*Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow*', *Journal of Visualized Experiments*, 2020.157 (2020), e60610 <<https://doi.org/10.3791/60610>>

---

**Link, Antonia**, Hanna Haag, Tatjana Michel, Markus Denzinger, Hans Peter Wendel, Christian Schlensak, and others, '*Development of a Novel Polymer-Based mRNA Coating for Surgical Suture to Enhance Wound Healing*', *Coatings*, 9.6 (2019), 374 <<https://doi.org/10.3390/coatings9060374>>

---

Michel, Tatjana, **Antonía Link**, Meike Kristin Abraham, Christian Schlensak, Karlheinz Peter, Hans Peter Wendel, and others, '*Generation of Cationic Nanoliposomes for the Efficient Delivery of In Vitro Transcribed Messenger RNA*', *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 144, (2019) <<https://doi.org/10.3791/58444>>

---

Denzinger, Markus, **Antonía Link**, Julia Kurz, Sabrina Krauss, Robert Thoma, Christian Schlensak, and others, '*Keratinocyte Growth Factor Modified Messenger RNA Accelerating Cell Proliferation and Migration of Keratinocytes*', *Nucleic Acid Therapeutics*, 28.6 (2018), 335–47 <<https://doi.org/10.1089/nat.2018.0737>>

---

Huber, Birgit, **Antonía Link**, Kirstin Linke, Sandra A. Gehrke, Marc Winnefeld, and Petra J. Kluger, '*Integration of Mature Adipocytes to Build-Up a Functional Three-Layered Full-Skin Equivalent*', *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 22.8 (2016), 756–64 <<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2016.0141>>

## 8 Publikationen

### 8.1 Publikation I

#### **Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow**

Journal of Visualized Experiments

2020

## Video Article

## Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow

Antonia Link<sup>1</sup>, Giorgio Cattaneo<sup>2,3</sup>, Eduard Brynda<sup>4</sup>, Tomas Riedel<sup>4</sup>, Johanka Kucerova<sup>4</sup>, Christian Schlensak<sup>1</sup>, Hans Peter Wendel<sup>1</sup>, Stefanie Krajewski<sup>1</sup>, Tatjana Michel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, University Hospital Tuebingen

<sup>2</sup>Acandis GmbH

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Engineering, University of Stuttgart

<sup>4</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic

Correspondence to: Tatjana Michel at [tatjana.michel@uni-tuebingen.de](mailto:tatjana.michel@uni-tuebingen.de)

URL: <https://www.jove.com/video/60610>

DOI: [doi:10.3791/60610](https://doi.org/10.3791/60610)

Keywords: Medicine, Issue 157, hemocompatibility, flow loop model, blood-contacting devices, human blood, ISO 10993-4, evaluation of medical devices

Date Published: 3/5/2020

Citation: Link, A., Cattaneo, G., Brynda, E., Riedel, T., Kucerova, J., Schlensak, C., Wendel, H.P., Krajewski, S., Michel, T. Hemocompatibility Testing of Blood-Contacting Implants in a Flow Loop Model Mimicking Human Blood Flow. *J. Vis. Exp.* (157), e60610, doi:10.3791/60610 (2020).

### Abstract

The growing use of medical devices (e.g., vascular grafts, stents, and cardiac catheters) for temporary or permanent purposes that remain in the body's circulatory system demands a reliable and multiparametric approach that evaluates the possible hematologic complications caused by these devices (i.e., activation and destruction of blood components). Comprehensive in vitro hemocompatibility testing of blood-contacting implants is the first step towards successful in vivo implementation. Therefore, extensive analysis according to the International Organization for Standardization 10993-4 (ISO 10993-4) is mandatory prior to clinical application. The presented flow loop describes a sensitive model to analyze the hemostatic performance of stents (in this case, neurovascular) and reveal adverse effects. The use of fresh human whole blood and gentle blood sampling are essential to avoid the preactivation of blood. The blood is perfused through a heparinized tubing containing the test specimen by using a peristaltic pump at a rate of 150 mL/min at 37 °C for 60 min. Before and after perfusion, hematologic markers (i.e., blood cell count, hemoglobin, hematocrit, and plasmatic markers) indicating the activation of leukocytes (polymorphonuclear [PMN]-elastase), platelets ( $\beta$ -thromboglobulin [ $\beta$ -TG]), the coagulation system (thrombin-antithrombin III [TAT]), and the complement cascade (SC5b-9) are analyzed. In conclusion, we present an essential and reliable model for extensive hemocompatibility testing of stents and other blood-contacting devices prior to clinical application.

### Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/60610/>

### Introduction

The in vivo application of implants and biomaterials, which interact with human blood, requires intense preclinical testing focusing on the investigation of various markers of the hemostatic system. The International Organization for Standardization 10993-4 (ISO 10993-4) specifies the central principles for the evaluation of blood-contacting devices (i.e., stents and vascular grafts) and considers the device design, clinical utility, and materials needed<sup>1</sup>.

Human blood is a fluid that contains various plasma proteins and cells, including leukocytes (white blood cells [WBCs]), erythrocytes (red blood cells [RBCs]), and platelets, which carry out complex functions in the human body<sup>2</sup>. The direct contact of foreign materials with blood can cause adverse effects, such as activation of the immune or coagulation system, which can lead to inflammation or thrombotic complications and serious issues after implantation<sup>3,4,5</sup>. Therefore, in vitro hemocompatibility validation offers an opportunity prior to implantation to detect and exclude any hematologic complications that may be induced upon contact of the blood with a foreign surface<sup>6</sup>.

The presented flow loop model was established to assess the hemocompatibility of neurovascular stents and similar devices by applying a flow rate of 150 mL/min in tubing (diameter of 3.2 mm) to mimic cerebral flow conditions and artery diameters<sup>2,7</sup>. Besides the need for an optimal in vitro model, the source of blood is an important factor in gaining reliable and unaltered results when analyzing hemocompatibility of a biomaterial<sup>8</sup>. The collected blood should be used immediately after sampling to prevent changes caused by prolonged storage. In general, a gentle collection of blood without stasis using a 21 G needle should be performed to minimize the preactivation of platelets and the coagulation cascade during blood drawing. Furthermore, donor exclusion criteria include those who smoke, are pregnant, are in a poor state of health, or have taken oral contraceptives or painkillers during the previous 14 days.

This study describes an in vitro model for the extensive hemocompatibility testing of stent implants under flow conditions. When comparing uncoated to fibrin-heparin-coated stents, results of the comprehensive hemocompatibility tests reflect improved hemocompatibility of the fibrin-

heparin-coated stents<sup>9</sup>. In contrast, the uncoated stents induce activation of the coagulation cascade, as demonstrated by an increase in thrombin-antithrombin III (TAT) concentrations and loss of blood platelet numbers due to the adhesion of platelets to stent surface. Overall, integrating this hemocompatibility model as a preclinical test is recommended to detect any adverse effects on the hemostatic system that are caused by the device.

## Protocol

The blood sampling procedure was approved by the Ethics Committee of the medical faculty at the University of Tuebingen (project identification code: 270/2010BO1). All subjects provided written, informed consent for inclusion before participation.

### 1. Preparation of Heparin-loaded Monovettes

1. Mix the undiluted heparin (5,000 IU/mL) with sodium chloride (NaCl, 0.9%) solution and prepare a solution with a resulting concentration of 15 IU/mL of heparin.
2. Add 900  $\mu$ L of the diluted heparin solution to each neutral monovette (9 mL) to obtain a final heparin concentration of 1.5 IU/mL after blood sampling. Prepare three monovettes per donor plus three reserve monovettes and store the heparin-loaded monovettes at 4 °C until blood sampling.

### 2. Blood Sampling

1. Take the heparin-loaded monovettes out of the refrigerator 30 min prior to blood sampling.
2. Collect a 27 mL blood sample from each healthy donor (n = 5) by venipuncture for the flow loop. Only apply a smooth tourniquet to avoid premature activation of the platelets and the blood clotting cascade.
3. Collect blood samples in three monovettes containing 900  $\mu$ L of the heparin solution (1.5 IU/mL) and pool all three monovettes in one plastic container to ensure that all components are evenly distributed.
4. Directly transfer the pooled heparinized blood into three different monovettes containing either EDTA (1.2 mL), citrate (1.4 mL), or a mixture of citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD, 2.7 mL) to collect baseline values. Proceed with the samples as described in sections 5–8.

NOTE: To guarantee uninfluenced clotting behavior, donors should avoid the intake of hemostasis-affecting drugs (e.g., acetylsalicylic acid, naproxen, and carbenicillin) within the last 14 days, as well as oral contraceptives and smoking.

### 3. Preparation of the Flow Loop

1. Cut three heparin-coated polyvinyl chloride tubes with a length of 75 cm and inner diameter of 3.2 mm. Load the tubes with the neurovascular laser-cut implants with or without the fibrin-heparin coating. Remember to leave one tube unloaded as a control.
2. Place one end of the tube in a reservoir filled with 0.9% NaCl, connect the tubing to the pump head, and insert the other end into a measuring cylinder.
3. Adjust the settings of the peristaltic pump to achieve a flow rate of 150 mL/min by using a timer while checking the fill level in the measuring cylinder.

### 4. Performance of Hemocompatibility Testing

1. Use a 12 mL syringe to fill the tubes with blood. Let 6 mL of blood flow smoothly into each tube containing a sample or unloaded control.
2. Form a circuit and close the tubes tightly using a 0.5 cm length of silicone connection tubing. Place the tubes in a water bath of 37 °C and start the perfusion for 60 min.

### 5. Whole Blood Count Analysis

1. Put 1.2 mL of blood after sampling (baseline) or after perfusion into a monovette containing EDTA and carefully invert the tube 5x.
2. Insert the monovette into the blood analyzer and perform a blood count analysis for every sample. Then, incubate the monovettes on ice for 15–60 min after the blood count measurement for further analysis, as described in section 7.

### 6. Collection of Citrate Plasma

1. Fill the monovettes containing citrate with 1.4 mL of blood (freshly drawn or after circulation) and carefully invert 5x.
2. Centrifuge the tubes for 18 min at 1,800  $\times$  g at room temperature (RT). Aliquot three 250  $\mu$ L samples of the plasma fraction into 1.5 mL reaction tubes and freeze the plasma samples in liquid nitrogen. Store them at -20 °C until analysis.

### 7. Collection of EDTA Plasma

1. Incubate the monovettes on ice for 15–60 min after the blood count measurement. Then, centrifuge the tubes for 20 min at 2,500  $\times$  g and 4 °C.
2. Aliquot three 250  $\mu$ L samples of the plasma fraction into 1.5 mL reaction tubes after centrifugation and freeze the tubes in liquid nitrogen. Store them at -80 °C until analysis.

## 8. Collection of CTAD Plasma

1. Fill the monovettes containing the CTAD mixture with 2.7 mL of blood (freshly drawn or after incubation) and carefully invert 5x. Afterwards, incubate the monovettes on ice for 15–60 min. Then, centrifuge the tubes for 20 min at 2,500 x g and 4 °C.
2. Transfer 700 µL of the middle plasma fraction into a 1.5 mL reaction tube and centrifuge the filled reaction tubes for 20 min at 2,500 x g and 4 °C.
3. Aliquot two 100 µL samples of the middle fraction into 1.5 mL reaction tubes after centrifugation and freeze the tubes in liquid nitrogen. Store them at -20 °C until analysis.

NOTE: The collection of EDTA plasma and CTAD plasma can be performed together because the operating conditions are the same.

## 9. Measurement of Human TAT from Citrate Plasma

1. Thaw the citrate plasma in a water bath of 37 °C.
2. Use the TAT enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions. Reconstruct the plasma standards and control and dilute the washing solution, anti-human-TAT peroxidase (POD)-conjugated antibody, and chromogen solution. Leave all reagents and the microtiter plate at RT (15–25 °C) for 30 min before starting the test.
3. Pipet 50 µL of the sample buffer into each well of the microtiter plate and add 50 µL of the sample buffer (blank), plasma standard, plasma control, and undiluted plasma sample in duplicates to the well plate. Seal the plate and incubate at 37 °C for 15 min with gentle shaking. Then, wash the plate 3x with 300 µL of washing solution.
4. Add 100 µL of the POD-conjugated anti-human-TAT antibody to each well. Seal the plate and incubate at 37 °C for 15 min with gentle shaking. Then, wash the plate 3x with 300 µL of washing solution.
5. Add 100 µL of the freshly prepared chromogen solution to each well. Seal the plate and incubate at RT for 30 min.
6. Remove the seal film and add 100 µL of stop solution to each well. Read the optical density (OD) with a photometer at 490–500 nm. Fit the standard curve data as a trend line and calculate the concentration of the samples.

## 10. Measurement of PMN-elastase from Citrate Plasma

1. Thaw the citrate plasma in a water bath at 37 °C.
2. Use the polymorphonuclear (PMN)-elastase ELISA kit according to the manufacturer's instructions: reconstruct the PMN-elastase control and the PMN-elastase standard to prepare a standard curve using the kit's dilution buffer.
3. Dilute the washing solution according to the manufacturer's description. Leave all reagents and the microtiter plate at RT for 30 min before starting the test. Dilute the citrate plasma samples to 1:100 with the dilution buffer.
4. Add 100 µL of the sample buffer (blank), PMN-elastase standard curve (15.6–1,000 ng/ mL), PMN-elastase controls (high and low concentrations), and diluted plasma samples in duplicates to the well plate. Seal the plate and incubate at RT for 60 min with gentle shaking. Afterwards, wash the plate 4x with 300 µL of washing solution.
5. Add 150 µL of the enzyme-conjugated antibody to each well. Seal the plate and incubate at RT for 60 min with gentle shaking. Afterwards, wash the plate 4x with 300 µL of washing solution.
6. Add 200 µL of the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)-substrate solution to each well. Seal the plate and incubate at RT for 20 min in the dark. Then, remove the seal film and add 50 µL of the stop solution to each well.
7. Read the OD with a photometer at 450 nm with a reference reading at 630 nm. Fit the standard curve data as a trend line and calculate the concentration of the samples.

## 11. Measurement of Terminal Complement Complex (TCC) from EDTA Plasma

1. Thaw the EDTA plasma in a water bath at 37 °C, and store on ice after defrosting.
2. Use the complement cascade SC5b-9 ELISA kit according to the manufacturer's instructions: dilute the washing solution as described in the manufacturer's protocol. Leave all reagents and the microtiter plate at RT for 30 min before starting the test. Dilute the EDTA plasma samples to 1:10 with the kit's dilution buffer.
3. Add 300 µL of washing solution to each well to rehydrate the surface and aspirate after 2 min. Add 100 µL of the sample buffer (blank), SC5b-9 standards, SC5b-9 controls (high and low concentrations), and the diluted plasma samples in duplicates to the well plate.
4. Seal the plate and incubate at RT for 60 min. Next, wash the plate 5x with 300 µL of washing solution.
5. Add 50 µL of the enzyme-conjugated antibody to each well. Seal the plate and incubate at RT for 30 min. Then, wash the plate 5x with 300 µL of washing solution.
6. Add 100 µL of the TMB-substrate solution to each well. Seal the plate and incubate at RT for 15 min in the dark.
7. Remove the seal film and add 100 µL of the stop solution to each well. Read the OD with a photometer at 450 nm. Fit the standard curve data as a trend line and calculate the concentration of the samples.

## 12. Measurement of $\beta$ -thromboglobulin from CTAD Plasma

1. Thaw the CTAD plasma in a water bath at 37 °C.
2. Use the  $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) ELISA kit according to the manufacturer's instructions: reconstruct the  $\beta$ -TG control and the  $\beta$ -TG standard and dilute the washing solution using distilled H<sub>2</sub>O. Reconstruct the POD-conjugated antibody using the provided phosphate buffer. Leave all reagents and the microtiter plate at RT for 30 min before starting the test.
3. Prepare the standard curve and the control according to the manufacturer's instructions with the provided phosphate buffer. Dilute the CTAD plasma samples to 1:21.

4. Add 200  $\mu\text{L}$  of the phosphate buffer (blank),  $\beta$ -TG standards,  $\beta$ -TG controls (high and low concentrations), and diluted plasma samples in duplicates to the well plate. Seal the plate and incubate at RT for 60 min. Afterwards, wash the plate 5x with 300  $\mu\text{L}$  of washing solution.
5. Add 200  $\mu\text{L}$  of the enzyme-conjugated antibody to each well. Seal the plate and incubate at RT for 60 min. Afterwards, wash the plate 5x with 300  $\mu\text{L}$  of washing solution.
6. Add 200  $\mu\text{L}$  of the TMB-substrate solution to each well. Seal the plate and incubate at RT for 5 min in the dark. Remove the seal film and stop the reaction by adding 50  $\mu\text{L}$  of 1 M sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) to each well.
7. Leave the plate for 15–60 min, then read the OD with a photometer at 450 nm. Fit the standard curve data as a trend line and calculate the concentration of the samples.

### 13. Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy

1. Remove the implant from the tube using forceps and rinse the implant briefly by dipping it into 0.9% NaCl solution 3x.
2. Store in glutaraldehyde solution (2% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline [PBS-buffer without  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ]) overnight at 4 °C.
3. Next, incubate the implants in PBS-buffer for 10 min. Dehydrate the samples by incubating in ethanol with increasing concentration for 10 min each: 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, and 100%. Store the dehydrated samples in 100% ethanol until further analysis.
4. Perform critical point drying according to the instructions of the drying device or literature<sup>10</sup> just before scanning electron microscopy (SEM).

### 14. Scanning Electron Microscopy

1. Attach the dried implants to a sample carrier for the scanning microscope and sputter the samples with gold palladium.
2. Introduce the sputtered implants into the sample chamber. Take pictures in 100-, 500-, 1,000- and 2,500-fold magnification of the areas with the representative surface and cell adhesion.

## Representative Results

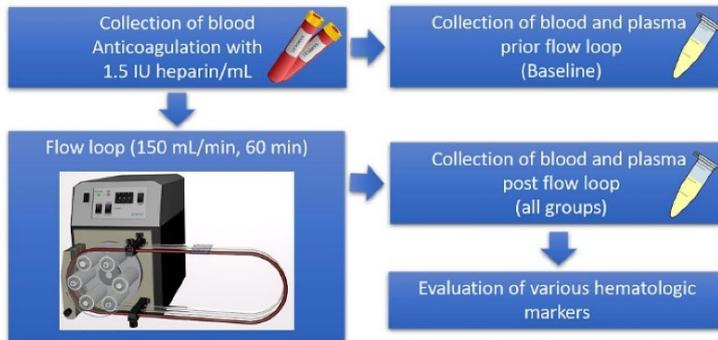
Briefly summarized, human whole blood was collected in heparin-loaded monovettes then pooled and used to evaluate the baseline levels of cell counts as well as plasmatic hemocompatibility markers.

Subsequently, the tubing containing the neurovascular implant samples was filled, and the blood was perfused for 60 min at 150 mL/min and 37 °C using a peristaltic pump. Again, the number of cells was analyzed in all groups, and the plasma samples were prepared for ELISA analyses (Figure 1). The quantification of the blood cells and blood parameters, such as hemoglobin and hematocrit, was performed directly after blood collection as well as after perfusion in the flow loop model for all sample types and the control. No changes were detected regarding the number of WBCs (Figure 2A), RBCs (Figure 2B), or the hematocrit values (Figure 2C). However, a decrease in hemoglobin levels was detected after the incubation of blood in the flow loop model when compared to the baseline values, which was due to the perfusion of blood in the flow loop system (Figure 2D). In addition, a decrease in platelet numbers was observed due to blood perfusion. Furthermore, this effect was increased when an uncoated stent was present in the tubing, indicating the adhesion of platelets to the biomaterial. Nonetheless, it was clearly demonstrated that the loss of platelets was significantly higher when the uncoated stent was incubated with blood, as opposed to the fibrin-heparin-coated stent (Figure 2E).

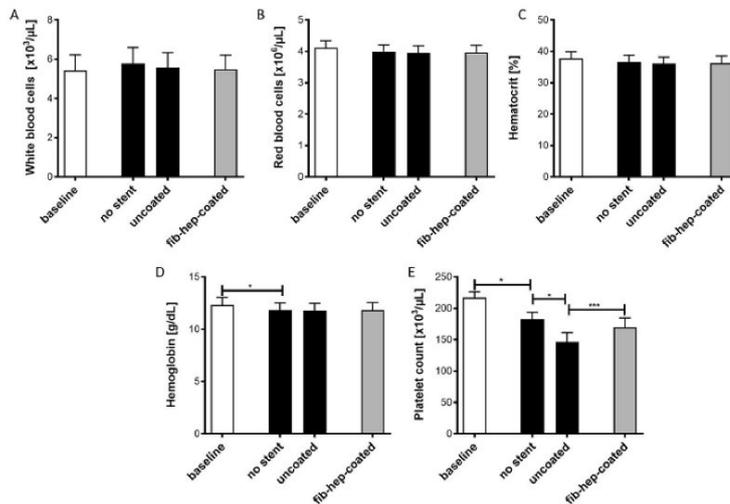
Potential alterations of the hematologic plasma markers were also investigated in the test groups after perfusion and compared to the baseline values of the freshly drawn blood. The TAT complex concentration, which reflects the activation status of the coagulation system, was mildly increased due to blood perfusion (Figure 3A). In the bare metal stent group, however, a significant increase in the TAT was detected, indicating a profound activation of the coagulation system. The fibrin-heparin-coated stent prevented the activation of the coagulation system, since no increase in the TAT was determined.

The perfusion led to an increased activation of the complement cascade, which was determined by measuring SC5b-9 (Figure 3B). However, incubation with uncoated or fibrin-heparin-coated stents did not further increase the SC5b-9 concentration. Similar results were obtained when analyzing the activation of the neutrophil granulocytes through the quantification of PMN-elastase concentrations (Figure 3C).

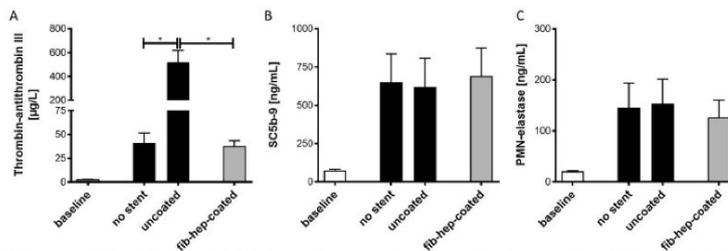
Visualization of the stent surface was performed using SEM. Clear differences between the two stent groups were detected after blood incubation. While on the surface of the uncoated stent a dense network of blood cells and proteins was present, no adhesion of proteins or cells was detected on the surface of the fibrin-heparin-coated stent (Figure 4).



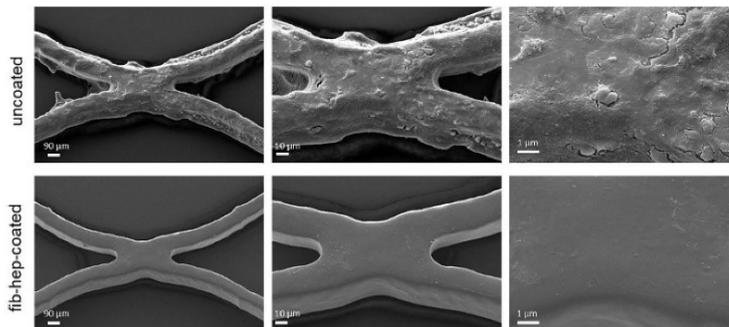
**Figure 1: Schematic overview of the hemocompatibility evaluation of stents in a well-established flow loop model.** Fresh human whole blood is collected from healthy donors in blood tubes containing heparin for anticoagulation. For each donor, an empty tube as well as tubes preloaded with the sample material are subsequently filled with fresh blood and incubated in the flow loop at a rate of 150 mL/min at 37 °C for 60 min. Additionally, plasma samples are prepared from freshly drawn blood to obtain the baseline values of each donor. After the incubation, the plasma samples from the test tubing, with and without sample materials, are prepared and analyzed using a specific ELISA. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 2: Analysis of different cell types and blood parameters before and after incubation of different stent implants in the flow loop model.** The determination of white blood cells (A), red blood cells (B), hematocrit (C), hemoglobin (D), and platelets (E) was performed. The data are displayed as mean ± SEM (n = 5, p\* < 0.5, p\*\*\* < 0.001). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3: Determination of platelet or immune system activation markers before and after incubation with neurovascular implants.** The markers for the (A) activation of blood coagulation (TAT), (B) complement system (SC5b-9), and (C) neutrophils (PMN-elastase) were quantified using ELISA. The analysis was performed on plasma samples gained from freshly drawn blood or blood incubated with different stents in the flow loop model. The data are displayed as mean ± SEM (n = 5, p\* < 0.5). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 4:** Scanning electron microscopic analysis of stents after incubation with blood. The aggregation of blood plasma proteins and platelets on uncoated stent material was observed. In comparison, stent materials with the fibrin-heparin coating did not demonstrate adhesion of cells or other blood components on the surface (magnification of 500-, 1,000-, and 2,500-fold). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

## Discussion

The presented protocol describes a comprehensive and reliable method for the hemocompatibility testing of blood-contacting implants in accordance with ISO 10993-4 in a shear flow model imitating human blood flow. This study is based on the testing of laser-cut neurovascular implants but can be performed with a variety of samples. The results demonstrate that this method enables the broad analysis of various parameters such as the blood cell count, prevalence of several hemocompatibility markers, and microscopic visualization of the device surface after blood contact. Using this protocol, potential differences regarding the hemocompatibility of different devices can be detected.

An alternative to in vitro hemocompatibility assessment consists of in vivo animal testing, which is associated with several disadvantages, such as higher variability and distortion of device-related effects due to the overwhelming short-term effects of tissue injury<sup>6</sup>.

For in vitro hemocompatibility testing, three types of models are available: (1) static blood incubation models, (2) agitated blood incubation models, and (3) shear flow models. The static model provides a simple and rapid method to determine thrombogenicity by incubating the device directly with blood, but it only leads to rudimentary results regarding hemocompatibility<sup>11</sup>. To overcome the main disadvantages of static models (i.e., sedimentation of blood cells and the large air-contacting surface), the agitating blood incubation model may be used, in which a test chamber containing the implants is filled with blood and incubated on a rocking platform<sup>12</sup>. However, these model types are still inferior compared to the existing shear flow models, such as the flow loop presented here. The quintessence of these models is that vascular human blood flow can be imitated; thus, a close depiction of the real interaction between the implant and blood cells can be displayed<sup>13</sup>. In addition to the flow loop model, models such as the Chandler loop or several perfused flow chamber exist<sup>14,15,16</sup>.

The Chandler loop is a closed tube system that is partly filled with air and clamped into a rotating device, resulting in blood circulation through the tubing<sup>17</sup>. In the present flow loop system, the tube is completely filled with blood, and the flow is forced by using a peristaltic pump. When using the Chandler loop model, operators face two major disadvantages due to the requirement of including air into the test tubing. First, it is known that the constant interaction of blood and air triggers the aggregation of leukocytes and platelets as well as protein denaturation<sup>18,19</sup>. Second, the blood circulation rate is limited, because the air always remains at the highest point of the loop<sup>20</sup>.

These drawbacks can be overcome when using the flow loop system. Since no air-liquid interface is present in the system, no platelet activation occurs. Thus, the model has a low background for thrombotic events so that a low concentration of anticoagulants, typically 1 IU/mL or 1.5 IU/mL of heparin, is sufficient to prevent clotting, even if high flow rates are applied<sup>6</sup>. The adjustable pump-regulated blood flow rate and the freely selectable tube diameter allow the operator to mimic the physiological conditions of a vein or artery, which correspond to the implant to be tested, and achieve relevant test results<sup>21</sup>. However, this advantage is at the same time a limitation, due to the mechanical stress applied to the blood through the pump, and the destruction of erythrocytes (i.e., hemolysis) may occur<sup>2</sup>. This arising intrinsic blood damage reduces the method sensitivity and impedes prolonged exposure to the blood<sup>21</sup>. Nevertheless, several studies have demonstrated the effective use of the flow loop model for hemocompatibility evaluation<sup>22,23,24</sup>.

However, the main gap between all in vitro models and the in vivo mechanisms includes the missing endothelium, which expresses cytokines, anti-thrombotic components, and adhesion molecules; therefore, this component plays a crucial role in the interaction of the implant and circulating blood<sup>25</sup>. In conclusion, the flow loop model is adjustable, efficient, reliable, and cost-effective to assess the hemocompatibility of implants before clinical use.

## Disclosures

The authors have nothing to disclose.

## Acknowledgments

For the performance of scanning electron microscopy, we thank Ernst Schweizer from the section of Medical Materials Science and Technology of the University Hospital Tuebingen. The research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the CR within National Sustainability Program II (Project BIOCEV-FAR LQ1604) and by Czech Science Foundation project No. 18-01163S.

## References

1. ISO. *Biological evaluation of medical devices*. ISO 10993-4, (2002).
2. Weber, M. et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **6**, 99 (2018).
3. Li, Y., Boraschi, D. Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies. *Nanomedicine (Lond)*. **11** (3), 269-287 (2016).
4. Cattaneo, G. et al. In vitro investigation of chemical properties and biocompatibility of neurovascular braided implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **30** (6), 67 (2019).
5. Stang, K. et al. Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*. **42**, 422-428 (2014).
6. van Oeveren, W. Obstacles in haemocompatibility testing. *Scientifica (Cairo)*. 392584 (2013).
7. Engels, G. E., Blok, S. L., van Oeveren, W. In vitro blood flow model with physiological wall shear stress for hemocompatibility testing—An example of coronary stent testing. *Biointerphases*. **11** (3), 031004 (2016).
8. Blok, S. L., Engels, G. E., van Oeveren, W. In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. *Biointerphases*. **11** (2), 029802 (2016).
9. Kaplan, O. et al. Low-thrombogenic fibrin-heparin coating promotes in vitro endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **105** (11), 2995-3005 (2017).
10. JoVE. *SEM Imaging of Biological Samples*. <https://www.jove.com/science-education/10492/sem-imaging-of-biological-samples> (2019).
11. Mohan, C. C., Chennazhi, K. P., Menon, D. In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications. *Acta Biomaterialia*. **9** (12), 9568-9577 (2013).
12. Streller, U., Sperling, C., Hubner, J., Hanke, R., Werner, C. Design and evaluation of novel blood incubation systems for in vitro hemocompatibility assessment of planar solid surfaces. *The Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **66** (1), 379-390 (2003).
13. Sanak, M., Jakiela, B., Węgrzyn, W. Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*. **58** (2), 317-322 (2010).
14. Krajewski, S. et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomaterialia*. **9** (7), 7460-7468 (2013).
15. Podias, A., Groth, T., Missirlis, Y. The effect of shear rate on the adhesion/activation of human platelets in flow through a closed-loop polymeric tubular system. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **6** (5), 399-410 (1994).
16. Van Kruchten, R., Cossemans, J. M., Heemskerk, J. W. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers—a practical guide. *Platelets*. **23** (3), 229-242 (2012).
17. Müller, M., Krolitzki, B., Glasmacher, B. Dynamic in vitro hemocompatibility testing—improving the signal to noise ratio. *Biomedical Engineering/Biomedizinische Technik*. **57** (SI-1 Track-D), 549-552 (2012).
18. Ritz-Timme, S., Eckelt, N., Schmidtke, E., Thomsen, H. Genesis and diagnostic value of leukocyte and platelet accumulations around "air bubbles" in blood after venous air embolism. *International Journal of Legal Medicine*. **111** (1), 22-26 (1998).
19. Miller, R., F. V. B., Wüstneck, R., Krägel, J., Trukhin, D. V. Characterisation of the initial period of protein adsorption by dynamic surface tension measurements using different drop techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **131** (1), 225-230 (1998).
20. van Oeveren, W., Tielliu, I. F., de Hart, J. Comparison of modified chandler, roller pump, and ball valve circulation models for in vitro testing in high blood flow conditions: application in thrombogenicity testing of different materials for vascular applications. *International Journal of Biomaterials*. 673163 (2012).
21. Krajewski, S. et al. Preclinical evaluation of the thrombogenicity and endothelialization of bare metal and surface-coated neurovascular stents. *AJNR American Journal of Neuroradiology*. **36** (1), 133-139 (2015).
22. Monnick, S. H. et al. Silicon-carbide coated coronary stents have low platelet and leukocyte adhesion during platelet activation. *Journal of Investigative Medicine*. **47** (6), 304-310 (1999).
23. Amoroso, G., van Boven, A. J., Volkers, C., Crijns, H. J., van Oeveren, W. Multilink stent promotes less platelet and leukocyte adhesion than a traditional stainless steel stent: an in vitro experimental study. *Journal of Investigative Medicine*. **49** (3), 265-272 (2001).
24. Mulvihill, J., Crost, T., Renaux, J. L., Cazenave, J. P. Evaluation of haemodialysis membrane biocompatibility by parallel assessment in an ex vivo model in healthy volunteers. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **12** (9), 1968-1973 (1997).
25. Nordling, S., Nilsson, B., Magnusson, P. U. A novel in vitro model for studying the interactions between human whole blood and endothelium. *Journal of Visualized Experiments*. (93), e52112 (2014).

## 8.2 Publikation II

**In vitro Investigation of an Intracranial Flow Diverter with a Fibrin-based, hemostasis mimicking, Nanocoating**

Biomedical Materials

2020

## Biomedical Materials



## PAPER

## OPEN ACCESS

RECEIVED  
7 September 2020REVISED  
6 November 2020ACCEPTED FOR PUBLICATION  
9 November 2020PUBLISHED  
17 December 2020Original content from  
this work may be used  
under the terms of the  
Creative Commons  
Attribution 4.0 licence.Any further distribution  
of this work must  
maintain attribution to  
the author(s) and the title  
of the work, journal  
citation and DOI.

## *In vitro* investigation of an intracranial flow diverter with a fibrin-based, hemostasis mimicking, nanocoating

Antonia Link<sup>1</sup>, Tatjana Michel<sup>1,2</sup>, Martin Schaller<sup>3</sup>, Tina Tronser<sup>4</sup>, Stefanie Krajewski<sup>1,2</sup>   
and Giorgio Cattaneo<sup>5</sup><sup>1</sup> Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany<sup>2</sup> Section Medical Materials Science & Technology, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany<sup>3</sup> Department of Dermatology, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany<sup>4</sup> Acandis GmbH, Pforzheim, Germany<sup>5</sup> Institute of Biomedical Engineering, University of Stuttgart, Stuttgart, GermanyE-mail: [Stefanie.Krajewski@med.uni-tuebingen.de](mailto:Stefanie.Krajewski@med.uni-tuebingen.de)**Keywords:** intracranial aneurysm, flow diverter, nanocoating, *in vitro* hemocompatibility model, endothelialization scaffold

### Abstract

Flow diversion aims at treatment of intracranial aneurysms via vessel remodeling mechanisms, avoiding the implantation of foreign materials into the aneurysm sack. However, complex implantation procedure, high metal surface and hemodynamic disturbance still pose a risk for thromboembolic complications in the clinical praxis. A novel fibrin and heparin based nano coating considered as a hemocompatible scaffold for neointimal formation was investigated regarding thrombogenicity and endothelialization. The fibrin-heparin coating was compared to a bare metal as well as fibrin- or heparin-coated flow diverters. The implants were tested separately in regard to inflammation and coagulation markers in two different *in vitro* hemocompatibility models conducted with human whole blood ( $n = 5$ ). Endothelialization was investigated through a novel dynamic *in vitro* cell seeding model containing primary human cells with subsequent viability assay. It was demonstrated that platelet loss and platelet activation triggered by presence of a bare metal stent could be significantly reduced by applying the fibrin-heparin, fibrin and heparin coating. Viability of endothelial cells after proliferation was similar in fibrin-heparin compared to bare metal implants, with a slight, non-significant improvement observed in the fibrin-heparin group. The results suggest that the presented nanocoating has the potential to reduce thromboembolic complications in a clinical setting. Though the new model allowed for endothelial cell proliferation under flow conditions, a higher number of samples is required to assess a possible effect of the coating.

### 1. Introduction

Intracranial aneurysms are defined as a sagging in the wall of brain arteries and entail a certain risk of rupture [1], depending among others on morphological and hemodynamical factors. The consequences of a bleeding into the surrounding tissue include severe disability and death. The lethality of these incidents still remains at 35% in Europe and only one third of the survivors can return to their previous quality of life [2, 3]. Thus, the early detection and therapy of intracranial aneurysms is of utmost importance. Treatment of intracranial aneurysm with flow diverters has become established in the last 20 years [4], representing a paradigm shift compared

to intraaneurysmal embolization techniques, where foreign material—e.g. in the form of metal coils—is inserted into the aneurysm to trigger clot formation [5, 6]. By means of a tightly woven fine meshed structure with a high metal density, flow diverters direct the blood flow mostly past the aneurysm. Intraaneurysmal blood flow deceleration as well as contact with foreign material favors coagulation in the aneurysm sack and thus a gradual development of an intraaneurysmal thrombus which prevents further bleeding [7]. At the same time flow diverters serve as a scaffold for endothelial cell proliferation and neointimal formation [8]. Both intraaneurysmal thrombus formation and primarily endothelialization of the scaffold [9] result in high occlusion rates within

6–12 months following flow diverter placement [10]. Subsequently, the *in situ* vessel reconstruction occurs without any direct catheterization and implantation of foreign material within the aneurysm, decreasing the procedure risks and potentially allowing for a complete aneurysm reabsorption while successfully eradicating mass effect and related compression symptoms on surrounding neuronal tissue [11, 12]. However, aneurysm treatment using flow diverters implies, based on flow diverter design, a high-density of foreign material within the vessel lumen. This in contrast increases the occurrence of clinical complication such as in-stent thrombosis [13–15] and distal embolism [16, 17]. These are both, periprocedural or delayed, the most common complications in patients treated with flow diverters, reaching a rate of 3%–7% according to clinical literature [18]. Hence a crucial factor in aneurysm treatment using flow diverters is antiplatelet therapy prior and post flow diverter implantation [19], which on the other hand increases the risk for hemorrhagic complications, reaching 3%–4% occurrence based on clinical literature [20].

In vascular implants, surface treatment and coating technologies are targeted at improving biocompatibility, particularly in term of reduced thrombogenicity and moderate vessel reaction [21, 22]. Other than in drug eluting coatings, where a slow release of cytostatic substances actively influences the cellular behavior [23], surface passivation techniques normally aim at masking the foreign material of the implant from the coagulation system thereby preventing thrombotic reactions [24]. Heparin is already known for its positive impact against thrombogenicity [25, 26] and was used in different formats like dopamine-immobilized heparin [27], heparin-loaded graphene oxide on titanium surfaces [28] and in a combination with chondroitin 6-sulfate [29] to reduce platelet activation. Phosphorylcholine was also applied as a flow diverter surface coating, aimed at improving the implant hemocompatibility under the definition of a shield technology [30, 31]. Furthermore, a hydrophilic polymer coating consisting of a multilayer glycan-based polymer applied on flow diverter implants was suggested [32]. The underlying concept is the prevention of the protein attachment and thus thrombus formation caused by surface hydrophilicity.

In our study, we present the *in vitro* investigation of a flow diverter for treatment of intracranial aneurysms processed with a novel nanocoating technology: a nitinol mesh is covered with a fibrin network in a first step and, to further reduce thrombogenicity, covalently attached to heparin molecules in a second step. While the immobilization of heparin on the surface of the blood-contacting material is a reliable, well-tested and widely used technique to prevent platelet activation and coagulation [25, 33], the application of a fibrin network to the implant surface

represents a novel, biomimicking approach. In biological tissue repair processes, at the wound side fibrin is made up from soluble fibrinogen polymerized by thrombin molecules. The resulting fibrin strands reinforce the platelet plug after vessel injury, stopping the bleeding and marking the final step of hemostasis [34]. The fibrin network remains at the wound side later and assists the cells repairing the vessel endothelium by functioning as a temporary scaffold [35]. Since the building of a fibrin network is presumably reduced or missed at strongly antithrombogenic surfaces, we hereby present a coating which mimics the structure of a naturally occurring vessel injury with the aim of an unimpaired or even promoted neointima formation and thus vessel healing and aneurysmal neck reconstruction.

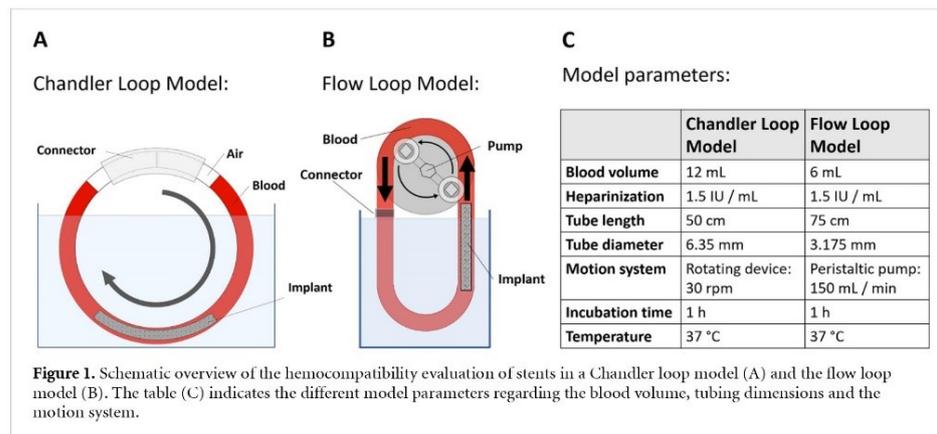
For this study we investigated the passive behavior of the coated flow diverter in comparison to the bare implant surface in terms of coagulation, platelet activation and adhesion using two different mock circulatory loops perfused with heparinized human whole blood. The Chandler loop as well as the flow loop model belong to the class of shear flow models, which stand out due to their ability to mimic vascular blood flow. The first mentioned requires the presence of air within the closed tube to enable blood circulation which comes with the risk of triggering aggregation of leukocytes and platelets as well as protein denaturation [36]. The second model overcomes these drawbacks since it is pump controlled. However, this can at the same time be a disadvantage due to the mechanical stress that is applied to the blood through the pump. It may induce destruction of erythrocytes and reduce the models sensitivity [37]. In order to avoid that certain effects are overlooked due to the disadvantages of one or the other model, we have used both models for our evaluation.

Furthermore, we developed a new model for the perfusion of implants with a highly concentrated solution of primary human endothelial cells and evaluated their adherence and viability on the surfaces of both coated and bare implants. We discuss the potential impact of this new technology in the scope of *in situ* tissue regeneration as an alternative healing strategy to mere antithrombogenic or drug delivery based approaches.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Coating procedure

For assessment of thrombogenicity, implants were coated with heparin-bounded fibrin or with fibrin alone in accordance with the procedure previously depicted by Kaplan *et al* [38]. Briefly, fibrinogen was adsorbed on the surface and thrombin was attached to the binding site of the adsorbed molecule. Subsequently, the surface was exposed to a solution containing more fibrinogen as well as antithrombin III and heparin. Due to the catalytic action of the



fibrin-bound thrombin, protected from inhibition through heparin-antithrombin III, the growth of a fibrin mesh on the surface was enabled up to a thickness of around 10 nm. For further heparin coating, heparin was activated and immediately covalently attached to the fibrin mesh. Reference implants were coated with (a) fibrin alone (following previous steps except for the covalent bonding of heparin), (b) heparin alone (performed as previously described [25]) or (c) without coating (bare surface). For endothelialization tests, only heparin-bounded fibrin and bare surface stents were evaluated.

Bare as well as coated implants were provided by Acanadis GmbH (Pforzheim, Germany) based on the design of the Flow Diverter Derivo Embolization Device®, a self-expanding braided device with flared ends intended for the treatment of intracranial aneurysms of 2.5 mm to 6.0 mm vessel diameter. The device consists of 24 radiopaque Nitinol composite wires with electropolished surface finishing (BlueXide®) looped at the distal end resulting in a 48-wired braid. The sample dimensions (diameter × length) of the samples for the later described flow loop and Chandler loop model was 4.0 × 40 mm and 6.0 × 50 mm, respectively.

### 2.2. Blood sampling

For hemocompatibility testing, blood of healthy donors was drawn by venipuncture. The collected blood samples were anticoagulated with 1.5 IU heparin ml<sup>-1</sup> blood (LEO Pharma, Neu-Isenburg, Germany) and the intake of hemostasis-affecting drugs within the last 14 d were set as exclusion criteria to guarantee uninfluenced clotting behavior. This procedure is approved by the Ethics Committee of the medical faculty at the University of Tübingen (Project identification code: 270/2010BO1) and all subjects gave their written informed consent for inclusion before they participated in the study. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 2.3. Blood circulation models

Hemocompatibility investigation of the samples were conducted in two different models with different tube sizing and flow mechanisms.

The Chandler loop is a closed tube system that is partly filled with air and clamped into a rotating device resulting in blood circulation through the tubing [39]. Polyvinyl chloride (PVC) tubes with an inner diameter of 6.35 mm (Medtronic, Dublin, Ireland) and a length of 50 cm were loaded with the different test specimen (one specimen for each tube). Subsequently, the tubes were filled with 12 ml of heparinized (1.5 IU ml<sup>-1</sup>) human whole blood (*n* = 5), closed with a silicon tubing and connected to the rotating device. The tubings were rotated vertically at 30 rotations per minute (rpm) in a water bath at 37 °C for the next 60 min (figures 1(A) and (C)).

In the flow loop model blood is perfused through a heparinized tubing containing the test specimen by using a peristaltic pump at a specific rate as previously described extensively [40]. First, heparin-coated (Enson, Pittsburgh, USA) PVC tubes with an inner diameter of 3.175 mm (Saint-Gobain Performance Plastics, Courbevoie, France) and a length of 75 cm were loaded with a test specimen each. Subsequently, the tubings were connected to the pump head (Cole Parmer, Wertheim, Germany), and filled with a 0.9% sodium chloride (NaCl) solution (Fresenius-Kabi, Bad-Homburg, Germany) and the flow rate of the peristaltic pump was adjusted to 150 ml min<sup>-1</sup>. After removal of the NaCl solution tubings were filled with 6 ml heparinized human whole blood (*n* = 5) through a syringe (Henke-Sass-Wolf, Tuttlingen, Germany) and tightly closed by using a silicon connection tubing. The tubings were placed in a 37 °C water bath before the perfusion was started for 60 min (figures 1(B) and (C)). In each model, one empty tubing served as a control.

### 2.4. Blood count analysis and plasma collection

Several hemocompatibility markers were investigated from the freshly drawn blood (defined as

baseline) as well as after the tests in both flow models. Whole blood count analysis was performed for every sample using the blood analyzer (Axon Lab, Baden-Dättwil, Switzerland). Also, different plasmas were generated by incubating freshly drawn or perfused blood in monovettes containing either ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sarstedt, Nümbrecht, Germany), citrate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), or the citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole mixture (CTAD; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) as anticoagulatory agents. A comprehensive protocol for plasma generation was previously published [40].

### 2.5. Quantification of hematological markers from plasma samples

Specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed to quantify thrombin-antithrombin(TAT)-complex (Siemens Healthcare, Marburg, Germany) from citrate plasma,  $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) (Stago, Düsseldorf, Germany) from CTAD plasma and the terminal complement complex (TCC = SC5b-9) (Tecommedical, Sissach, Switzerland) from EDTA plasma. All ELISAs were carried out in strict accordance with the manufacturer's protocols.

### 2.6. Cell culture of human umbilical vein endothelial cells

For the investigation of the different stent surfaces interacting with endothelial cells, human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) of five different donors were used. The cells were cultivated in VascuLife basal medium supplemented with the EnGS-Mv Microvascular Endothelial Kit except for hydrocortisone hemisuccinate (medium and supplements: Lifeline cell technologies, Frederick, USA) at 37 °C and 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). Medium was changed twice a week and when confluent, HUVECs were trypsinized and centrifugated. After resuspension, HUVECs were counted with the CASY cell counter (Schärfe System, Reutlingen, Germany) and seeded at the desired density.

### 2.7. Dynamic endothelialization model

To investigate the proliferation and viability of endothelial cells on the different substrates a novel, dynamic cell seeding model with subsequent vitality assay was established.

A PVC tubing with a length of 15 cm was filled with a gelatin solution (0.1% in ultrapure water; Merck, Darmstadt, Germany) and incubated for 15 min at room temperature. Subsequently, the gelatin solution was removed from the tubing and the uncoated or coated implant was inserted. A cell suspension containing  $5.0 \times 10^5$  HUVECs was poured into the tubing and its ends were sealed using sterile syringe filters (Sartorius, Goettingen, Germany). The loaded tubing was statically incubated at 37 °C and

5% CO<sub>2</sub> for 4 h. Afterwards for dynamic cell seeding the tube was attached to a rotating device (neoLab Migge, Heidelberg, Germany) with a rotation rate of 5 rpm and incubated for another 20 h. After a total of 24 h incubation the cell suspension was removed from the tube and replaced with fresh medium containing again  $5.0 \times 10^5$  HUVECs. The tubings containing the implants were incubated rotating for another 24 h until they were removed for subsequent analysis.

### 2.8. Cell viability assay

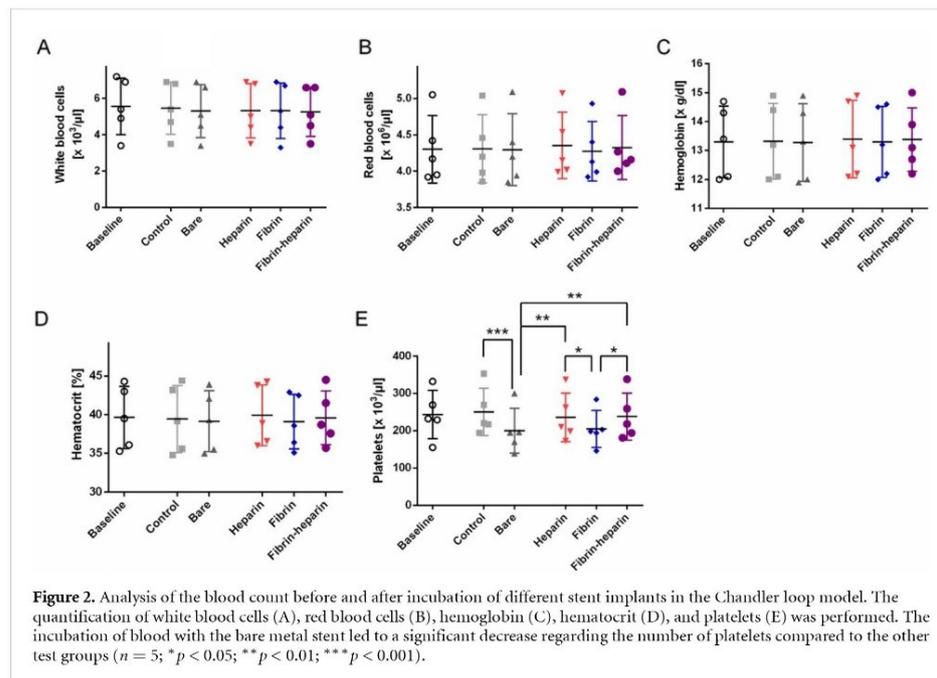
To determine the metabolic activity and viability of the adherent HUVECs on the surface of the uncoated or coated implants a colorimetric assay was used. The cell covered stents were removed from the tubing and washed three times with Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-medium without phenol red (Life technologies, Carlsbad, USA) and incubated for 4 h at 37 °C with a 0.05% solution of 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; AppliChem, Darmstadt, Germany). Afterwards, the MTT solution was removed and 300  $\mu$ l dimethyl sulfoxide (DMSO; Serva, Heidelberg, Germany) were added to dissolve the generated formazan crystals. Subsequently the absorbance of the formazan-DMSO solution was measured at 540 nm with the Mithras LB 940 Microplate Reader (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany).

### 2.9. Scanning electron microscopy

To be able to visualize the structure of adherent HUVECs on the implants surface, three samples of each group were prepared for scanning electron microscope (SEM) analysis. Subsequently to cell seeding, the implants were removed from the tubing and rinsed in phosphate buffered saline without Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (PBS-buffer; Life technologies, Carlsbad, USA) and incubated in 2% glutaraldehyde solution (SERVA electrophoresis, Heidelberg, Germany) overnight at 4 °C. To remove the remaining water, the samples were dehydrated in ethanol p.A. (Merck, Darmstadt, Germany) with increasing concentration of 40%–100%. Finally, the samples were dried by critical point drying then sputtered with gold palladium and subsequently analyzed with the SEM (Cambridge Instruments, Cambridge, UK).

### 2.10. Confocal laser scanning microscopy

To show the adherent HUVECs in their native state on the implants, two samples for each group were examined using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The samples were removed from the tubing and cut into small pieces, which have been washed in a solution of PBS-buffer containing bovine serum albumin (BSA) and Tween-20 for 10 min. The fragments were incubated for 30 min in a PBS/BSA/Tween-20 solution containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, dilution 1:1000; Sigma, St. Louis, USA)



**Figure 2.** Analysis of the blood count before and after incubation of different stent implants in the Chandler loop model. The quantification of white blood cells (A), red blood cells (B), hemoglobin (C), hematocrit (D), and platelets (E) was performed. The incubation of blood with the bare metal stent led to a significant decrease regarding the number of platelets compared to the other test groups ( $n = 5$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

and Phalloidin Alexa 546 (dilution 1:300; Molecular Probes, Eugene, USA) to stain the cells nuclei and the actin filaments. After another wash step the sample pieces were embedded with Mowiol 4–88 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and imaged using the LSM 800 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

### 2.11. Statistics

All data obtained are given as mean with standard deviation. The ROUT method was applied to detect outliers. The data were tested for normal distribution with the Kolmogorov–Smirnov test. Normally distributed data were tested for differences between groups by a repeated measure ANOVA with Bonferroni’s multiple comparison test. Non-normally distributed data was compared by a non-parametric test (Friedman test with Dunn’s multiple comparison test). Statistical significance has been defined as  $p < 0.05$ . The entire statistical analysis was carried out with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## 3. Results

### 3.1. Hemocompatibility analysis

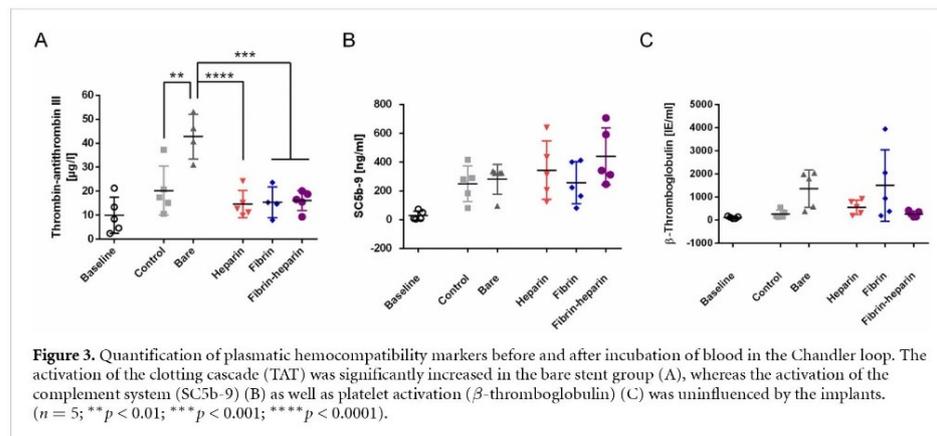
The capability of the flow diverters to interact with blood plays an essential role for their possible use in clinical application. To analyze whether the differently coated materials influence hematological

processes, the implants were subjected to two circulating loop systems for *in vitro* hemocompatibility evaluation. Each of these methods has its specific advantages and disadvantages, so for a comprehensive overview of blood-implant-interactions both tests were performed and separately interpreted.

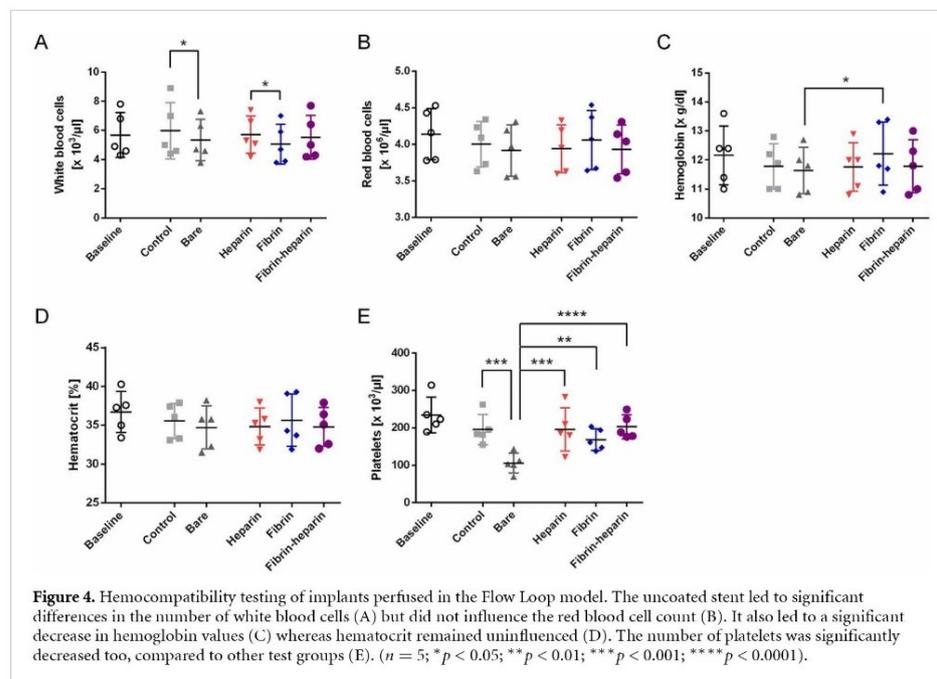
### 3.2. In vitro Chandler loop model

The quantification of blood cells and blood parameters revealed that the incubation of the implants with blood did not lead to any alterations regarding the numbers of white blood cells (figure 2(A)), red blood cells (figure 2(B)) as well as hemoglobin values (figure 2(C)) and the hematocrit (figure 2(D)). However, the presence of an uncoated or fibrin-only coated implant led to a significantly decreased number of platelets ( $200 \pm 60.5 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$  and  $205 \pm 49.7 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$  respectively) in comparison to the implants covered with a heparin ( $236 \pm 65.1 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0074$ ) or a fibrin-heparin coating ( $238 \pm 63.3 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0044$ ) as well as to the control ( $250 \pm 63.4 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0002$ ) (figure 2(E)).

The analysis of the hematologic plasma markers in the test groups after blood incubation showed a similar picture (figure 3(A)). The TAT complex concentration, which is an indicator of the activation status of the coagulation system, was significantly increased in the bare metal stent group ( $42.8 \pm 9.3 \mu\text{g l}^{-1}$ ) (versus control:  $20.2 \pm 10.2 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p = 0.0014$ ; versus heparin:



**Figure 3.** Quantification of plasmatic hemocompatibility markers before and after incubation of blood in the Chandler loop. The activation of the clotting cascade (TAT) was significantly increased in the bare stent group (A), whereas the activation of the complement system (SC5b-9) (B) as well as platelet activation ( $\beta$ -thromboglobulin) (C) was uninfluenced by the implants. ( $n = 5$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



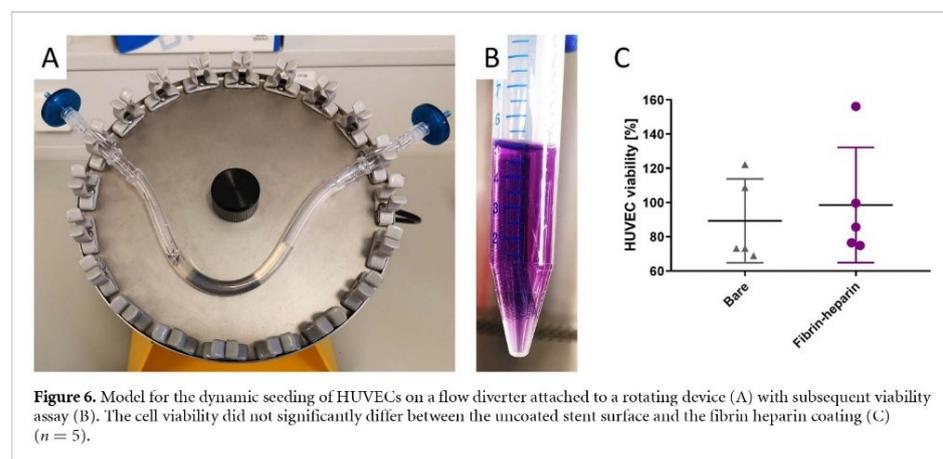
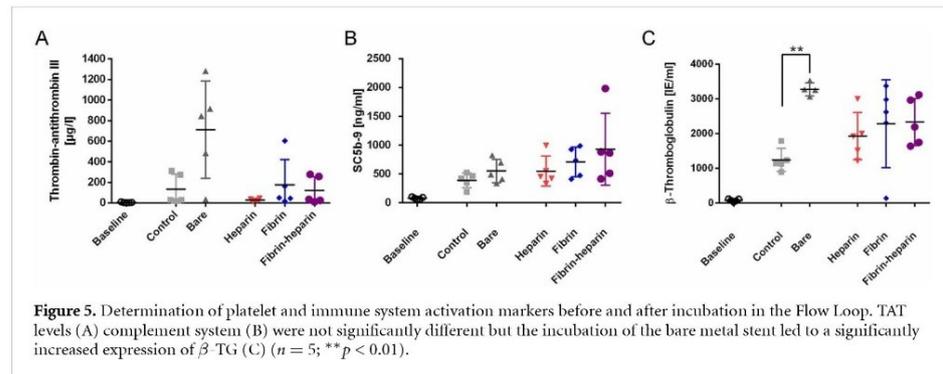
**Figure 4.** Hemocompatibility testing of implants perfused in the Flow Loop model. The uncoated stent led to significant differences in the number of white blood cells (A) but did not influence the red blood cell count (B). It also led to a significant decrease in hemoglobin values (C) whereas hematocrit remained uninfluenced (D). The number of platelets was significantly decreased too, compared to other test groups (E). ( $n = 5$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

$14.6 \pm 5.7 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0.0001$ ; versus fibrin:  $15.4 \pm 6.4 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p = 0.0003$ ; versus fibrin-heparin:  $16.1 \pm 4.2 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p = 0.0002$ ), indicating a significant increase regarding the clotting activity. The heparin, as well as the fibrin and the fibrin-heparin coated stents prevented the activation of the coagulation system, since no increased TAT levels compared to the control tubing were determined.

No significant differences of SC5b-9 levels, representative for the complement cascade, and  $\beta$ -thromboglobulin, a marker for platelet activation, were observed between the test groups (figures 3(B) and (C)).

### 3.3. In vitro flow loop model

The analysis of the blood count showed that the presence of different implants led to significant changes regarding the number of white blood cells (figure 4(A)). Perfusion of a bare metal implant resulted in a significantly decreased number of white blood cells ( $5.3 \pm 1.4 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ) compared to the control ( $6.0 \pm 1.9 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0293$ ) and the incubation of blood with a fibrin coated implant resulted in a significant decrease of leukocytes ( $5.1 \pm 1.4 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ) in comparison to the heparin coated implant ( $5.7 \pm 1.3 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0231$ ). Regarding the number of red blood cells, the different test groups did not distinguish



significantly (figure 4(B)). The measured values for hemoglobin were almost equal, solely the hemoglobin content in the blood incubated with the bare metal stent was significantly lower ( $11.6 \pm 0.8 \text{ g dl}^{-1}$ ) than in the blood incubated with the fibrin coated implant ( $12.2 \pm 1.1 \text{ g dl}^{-1}$ ,  $p = 0.0148$ ) (figure 4(C)). The hematocrit of the blood samples did not show significant differences (figure 4(D)). However, also in this test the number of platelets was strongly affected by the incubation of blood with a bare metal implant (figure 4(E)). A significant decrease in platelet number was observed when comparing the uncoated stent ( $105.6 \pm 26.5 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ) to any other test group (versus control:  $195.4 \pm 40.0 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0002$ ; versus fibrin:  $168.6 \pm 28.7 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0079$ ; heparin:  $196.0 \pm 57.9 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p = 0.0002$ ; versus fibrin-heparin:  $202.8 \pm 32.0 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ,  $p < 0.0001$ ).

When assessing the TAT complex levels, a tendency towards increased values for incubation with the bare metal implant were observed although there was no significant evidence (figure 5(A)).

When measuring SC5b-9 levels to determine activation of the complement system, (figure 5(B)), no significant differences between the differently coated implants could be reported.

The quantification of the platelet activation marker  $\beta$ -TG (figure 5(C)) showed that the activation in blood incubated with the uncoated implant ( $3280 \pm 189.2 \text{ IU ml}^{-1}$ ), but not with the coated ones, was significantly increased in comparison to the control ( $1238 \pm 333.7 \text{ IU ml}^{-1}$ ,  $p = 0.0014$ ).

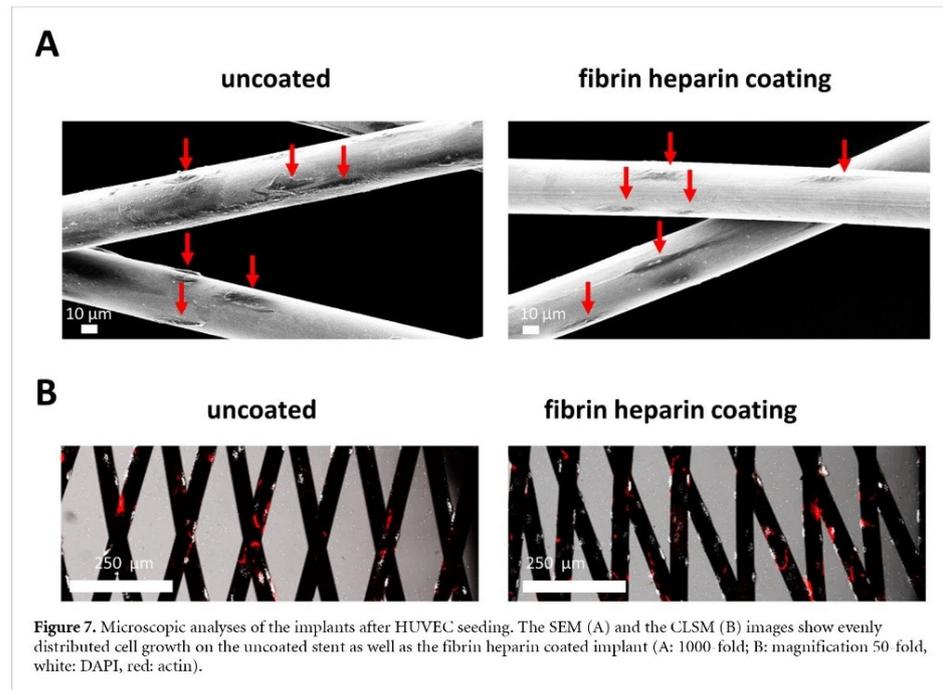
### 3.4. Dynamic cell seeding and endothelialization

The dynamic cell seeding (figure 6(A)) with subsequent viability assay (figure 6(B)) revealed a non-significant difference ( $p = 0.2793$ ) with a tendency towards increased cell viability on the surface of the fibrin heparin coated implant compared to the uncoated implant (figure 6(C): 98.55% versus 89.28%).

Visualization of the stent surface was performed using SEM (figure 7(A)) and CLSM (figure 7(B)). The results agree with the cell viability assay: HUVECs have adhered to both implants and grow with their typical outstretched morphology.

## 4. Discussion

Endoluminal implants for intracranial vessel treatments face high challenges in term of anatomical,



physiological and biological compatibility. Small vessel dimensions ranging between 5 mm in the internal carotid artery and 2 mm or less in vessels distally to the circle of Willis and a moderate flow regime ranging between 250 and 150 ml min<sup>-1</sup> [41] represent critical conditions in terms of blood coagulation. Particularly in flow diverters, several micro wires crossing each other at hundreds of intersection points lead to fluid dynamical changes possibly resulting in blood stagnation or shear stress modulation effects [42, 43] that are potentially responsible for activation of coagulatory pathways and platelet activation. Moreover, despite a highly flexible implant geometry and manipulation efforts during the implantation, inadequate vessel apposition is reported in clinical cases with the potential implication of blood flow disturbance such as blood stagnation between the implant structure and the vessel wall [44]. Radial expansion force and possibly a repetitive implant elongation and axial contraction affected by the pulsatile blood pressure curve can potentially stress the endothelium. Finally, a foreign surface is known to be a potential trigger for thrombotic reactions and can intensify the fluid dynamic effects and resulting endothelium damage. Taken together, the mentioned factors are probably the cause for the observed clinical complications after flow diverter implantation, like in-stent thrombosis, side branch occlusion or distal embolism, during the procedure as well as in the short-middle term [45]. These circumstances bear the risk that the prevention of

aneurysm rupture can quickly turn into a device-related ischemic stroke, a dramatic scenario for patients who undergo the treatment in part without having become symptomatic. Reflecting this background, it appears reasonable to design an implant surface that can prevent platelet activation and coagulation.

Moreover, the main requirements for the coating of implants for blood vessels that run through the head and neck are crucially different from the ones used for coronary stents. Whereas usually, for the latter kind of implants prevention of restenosis is the main requirement to coating performance and is mostly achieved by using cytostatic drugs to impede cell proliferation, this approach could be counterproductive in intracranial vessel treatment. Indeed, the focus is shifted here to the reconstruction of the vessels wall at the aneurysm neck, depicting the opening between the vessel and the aneurysm, by controlled proliferation of endothelial cells and thus neointima formation. These considerations result in two main requirements for the implant surface. First, a fast and controlled neointima reconstruction at the aneurysm neck and along the whole implant structure should assure the complete separation of the implant from the blood flow for a long-term prevention of the thrombus formation. Second, the implant should be antithrombogenic, avoiding acute thromboembolic complications before completed endothelialization, possibly leading to an ischemic stroke. As soon as the complete vessel regeneration has occurred, an

antiplatelet therapy is obsolete, bearing the advantage of reduced bleeding complications.

Considering the physiology of wound healing, the thrombus formation and the related thromboinflammatory process is the main mechanism which triggers cell proliferation and thus the regeneration of the injured tissue [46]. With other words, the fibrin network forming the scaffold for the thrombus is the natural, biological substrate where endothelial cells, among other cells like fibroblasts and leukocytes, infiltrate, proliferate and finally build a new vessel wall, while at the same time providing blood supply into the new formed tissue [47]. Since formation of a fibrin strain network is impaired on the surface of strictly antithrombogenic stents, we conceived and developed a novel coating technology with the aim of an unhindered or even intensified neointima formation despite an antithrombogenic behavior. The artificial fibrin network in the coating is conceived to mimic the final step of hemostasis, the phase in which further thrombus formation is inhibited and endothelial cells proliferate and support tissue regeneration. At the same time, integration of covalent bonded heparin aiming at a reduction of coagulation.

Referring thereto, extensive analysis about the interaction of human whole blood with the novel as well as control coatings was performed in this study. The implants consisted on a mesh of microwires made of nitinol, an alloy well known for its outstandingly biocompatibility [48] were tested separately with two different *in vitro* hemocompatibility models. Both models independently of each other showed a significant reduction of platelet adhesion in fibrin-heparin and heparin coatings compared to bare implants, while formation of the TAT complex was reduced for all coated implants in Chandler Loop model. The anticoagulatory character of the fibrin heparin coating is especially reflected in the increased number of platelets compared to a fibrin only coating on the stent surface in the Chandler Loop model: it is a well-known fact that heparin prevents blood clotting [33, 49]. Moreover, fibrin alone reduced platelet adhesion compared to bare implants in the Flow Loop model, confirming a certain passive behavior of the fibrin network also in absence of heparin.

To evaluate and compare the interaction of coated and bare surfaces with endothelial cells, a novel dynamic cell seeding model was developed and for the first time presented in this study. Implants were perfused for 48 h by an endothelial cell containing solution. Due to the fixation of the implant containing a tube to a rotation device, an alternate flow was produced within the tube lumen.

The results, including viability assay, SEM and confocal microscopy, indicate that the coating is slightly though not-significant superior in term of endothelial cell proliferation then the bare electropolished surface of the Nitinol implant, whose

good cell compatibility was proved in a previous study [50].

The findings make in our view the novel approach potentially superior to a complete inhibition of hemostasis by means of a mere antithrombogenic stent surface, since this could potentially interact with the crucial mechanisms of vessel regeneration and compromise, delay or in the worst case inhibit the building of a neointima layer.

Surface optimization is a very central area of research regarding the clinical application of biomedical progresses since the body is a harsh environment for materials and, at the same time, materials can provoke an adverse effect on the biological environment [51]. Whereas the initial idea was to hide potentially corrosive surfaces under an inert coating [52] the focus today is put on biomimicking coating strategies, which prevent the biomaterial from being recognized as foreign bodies. As mentioned before multiple approaches are used to address this such as the immobilization of biomolecules like heparin [53]. Another type of coating, besides heparin based, is the use of phosphorylcholine, which has been applied as flow diverter coating mimicking the nonreactive surfaces of red blood cells [54] and resulting in improved thrombogenicity of the implant [30, 55]. Moreover, use of hydrophilic coatings have been shown to reduce the adhesion of platelets on the implant surfaces and hence provide anti-thrombogenic properties [56].

Further research is needed to evaluate long-term efficacy and safety of surface technology. Though *in vitro* tests allow reproducible and standardized conditions, *in vivo* studies are needed to account for the complex inflammatory and coagulatory pathways occurring in a living organism. Further limitations of our study relate to the tube material, which implies an inherent thrombogenicity and thus makes the use of heparinized blood unavoidable. Moreover, standardized tube geometry does not account for mechanical properties in complex vessel geometries. Coating of surface could potentially influence wire friction in the phase of the implantation and thus wall apposition and influence on blood flow.

Last, we performed the study with five samples per group. At this size, no significant differences were detected for different parameters, though a trend was detectable. A higher number of samples would be favorable for future experiments, particularly if small differences are expected because of a relatively small implant surface compared to the tube setting.

## 5. Conclusion

In an *in vitro* setup, we investigated and proved the cell as well as blood compatibility of a novel, fibrin-based coating technology compared to different control surfaces. A novel mock loop allowed

for the evaluation of endothelial cell proliferation under dynamic conditions. It could be shown that the implant with the fibrin-heparin coating has a significantly lower tendency to trigger platelet adhesion on the stent surface as well as to cause the formation of TAT after incubation with blood when compared to the bare metal implant. Furthermore, there is a reduced tendency towards the secretion of  $\beta$ -TG indicating that the activation of platelets can be reduced with applying the fibrin-heparin coating to the implant.

### Acknowledgments

There are no conflicts of interest to disclose. All authors have reviewed and approved this manuscript. For performance of scanning electron microscopy, we thank Ernst Schweizer from the section of medical materials science & technology of the University Hospital Tuebingen. This research was supported by the German Federal Ministry for Economic Affairs and Energy as part of 'Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand' with project No. ZF4325304AJ8.

### ORCID iD

Stefanie Krajewski  <https://orcid.org/0000-0002-4829-6192>

### Reference

- [1] Etmann N and Rinkel G J 2016 Unruptured intracranial aneurysms: development, rupture and preventive management *Nat. Rev. Neurol.* **12** 699–713
- [2] Etmann N, Chang H S, Hackenberg K, De Rooij N K, Vergouwen M D I, Rinkel G J E and Algra A 2019 Worldwide incidence of aneurysmal subarachnoid hemorrhage according to region, time period, blood pressure, and smoking prevalence in the population: a systematic review and meta-analysis *JAMA Neurol.* **76** 588–97
- [3] Rinkel G J E and Algra A 2011 Long-term outcomes of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage *Lancet Neurol.* **10** 349–56
- [4] Briganti F, Leone G, Marseglia M, Mariniello G, Caranci F, Brunetti A and Maiuri F 2015 Endovascular treatment of cerebral aneurysms using flow-diverter devices: a systematic review *Neuroradiol. J.* **28** 365–75
- [5] Li H, Pan R, Wang H, Rong X, Yin Z, Milgrom D P, Shi X, Tang Y and Peng Y 2013 Clipping versus coiling for ruptured intracranial aneurysms: a systematic review and meta-analysis *Stroke* **44** 29–37
- [6] Ihu Y K, Shin S H, Baik S K and Choi I S 2018 Complications of endovascular treatment for intracranial aneurysms: management and prevention *Interv. Neuroradiol.* **24** 237–45
- [7] D'Urso P I, Lanzino G, Cloft H J and Kallmes D F 2011 Flow diversion for intracranial aneurysms: a review *Stroke* **42** 2363–8
- [8] Kallmes D F, Ding Y H, Dai D, Kadirvel R, Lewis D A and Cloft H J 2007 A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms *Stroke* **38** 2346–52
- [9] Kadirvel R, Ding Y H, Dai D, Rezek I, Lewis D A and Kallmes D F 2014 Cellular mechanisms of aneurysm occlusion after treatment with a flow diverter *Radiology* **270** 394–9
- [10] Brinjikji W, Murad M H, Lanzino G, Cloft H J and Kallmes D F 2013 Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: a meta-analysis *Stroke* **44** 442–7
- [11] Szikora I, Berentei Z, Kulcsar Z, Marosfoi M, Vajda Z S, Lee W, Berez A and Nelson P K 2010 Treatment of intracranial aneurysms by functional reconstruction of the parent artery: the budapest experience with the pipeline embolization device *Am. J. Neuroradiol.* **31** 1139–47
- [12] Szikora I, Marosfoi M, Salomváry B, Berentei Z and Gubucz I 2013 Resolution of mass effect and compression symptoms following endoluminal flow diversion for the treatment of intracranial aneurysms *Am. J. Neuroradiol.* **34** 935–9
- [13] Mühl-Benninghaus R, Haufmann A, Simgen A, Tomori T, Reith W and Yilmaz U 2019 Transient in-stent stenosis: a common finding after flow diverter implantation *J. Neurointerv. Surg.* **11** 196–9
- [14] De Vries J, Boogaarts J, Van Norden A and Wakhloo A K 2013 New generation of flow diverter (surpass) for unruptured intracranial aneurysms: a prospective single-center study in 37 patients *Stroke* **44** 1567–77
- [15] Byrne J V, Beltechi R, Yarnold J A, Birks J and Kamran M 2010 Early experience in the treatment of intra-cranial aneurysms by endovascular flow diversion: a multicentre prospective study *PLoS One* **5** e12492
- [16] Becske T et al 2013 Pipeline for uncoilable or failed aneurysms: results from a multicenter clinical trial *Radiology* **267** 858–68
- [17] Shankar J J S, Vandorpe R, Pickett G and Maloney W 2013 SILK flow diverter for treatment of intracranial aneurysms: initial experience and cost analysis *J. Neurointerv. Surg.* **5** 11–5
- [18] Alderazi Y J, Shastri D, Kass-Hout T, Prestigiacomo C J and Gandhi C D 2014 Flow diverters for intracranial aneurysms *Stroke Res. Treat.* **2014** 1–12
- [19] Koch M, Stapleton C and Walcott B 2017 The advent of flow diversion and its implications for cerebral aneurysm treatment *Endovasc. Today* **16** 71–76
- [20] Zhou G, Su M, Yin Y L and Li M H 2017 Complications associated with the use of flow-diverting devices for cerebral aneurysms: a systematic review and meta-analysis *Neurosurg. Focus* **42** E17
- [21] Lavery K S, Rhodes C, McGraw A and Eppihimer M J 2017 Anti-thrombotic technologies for medical devices *Adv. Drug Deliv. Rev.* **112** 2–11
- [22] Brynda E, Houska M, Jiroukova M and Dyr J E 2000 Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices *J. Biomed. Mater. Res.* **51** 249–57
- [23] Gu X, Zheng Y, Cheng Y, Zhong S and Xi T 2009 In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys *Biomaterials* **30** 484–98
- [24] O'Brien B, Carroll W M and Kelly M J 2002 Passivation of nitinol wire for vascular implants—a demonstration of the benefits *Biomaterials* **23** 1739–48
- [25] Krajewski S, Neumann B, Kurz J, Perle N, Avci-Adali M, Cattaneo G and Wendel H P 2015 Preclinical evaluation of the thrombogenicity and endothelialization of bare metal and surface-coated neurovascular stents *Am. J. Neuroradiol.* **36** 133–9
- [26] Brubert J, Krajewski S, Wendel H P, Nair S, Stasiak J and Moggridge G D 2016 Hemocompatibility of styrenic block copolymers for use in prosthetic heart valves *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **27** 1–12
- [27] Bae I-H, Park I-K, Park D S, Lee H and Jeong M H 2012 Thromboresistant and endothelialization effects of dopamine-mediated heparin coating on a stent material surface *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23** 1259–69
- [28] Pan C-J, Pang L-Q, Gao F, Wang Y-N, Liu T, Ye W and Hou Y-H 2016 Anticoagulation and endothelial cell behaviors of heparin-loaded graphene oxide coating on titanium surface *Mater. Sci. Eng. C* **63** 333–40

- [29] Huang L-Y, Yang M-C, Tsou H-M and Liu T-Y 2019 Hemocompatibility and anti-fouling behavior of multilayer biopolymers immobilized on gold thiolized drug eluting cardiovascular stents *Colloids Surf. B* **173** 470–7
- [30] Starke R M, Thompson J, Pagani A, Choubey A, Wainwright J M, Wolf M F, Jahanbekam R and Girdhar G 2020 Preclinical safety and efficacy evaluation of the pipeline vantage embolization device with shield technology *J. Neurointerv. Surg.* **12** 981–6
- [31] Girdhar G, Li J, Kostousov I, Wainwright J and Chandler W L 2015 In-vitro thrombogenicity assessment of flow diversion and aneurysm bridging devices *J. Thromb. Thrombolysis* **40** 437–43
- [32] Lenz-Habijan T, Bhogal P, Bannewitz C, Hannes R, Monstadt H, Simgen A, Mühl-Benninghaus R, Reith W and Henkes H 2019 Prospective study to assess the tissue response to HPC-coated p48 flow diverter stents compared to uncoated devices in the rabbit carotid artery model *Eur. Radiol. Exp.* **3** 47
- [33] Beythien C, Gutensohn K, Bau J, Hamm C W, Kühnl P, Meinertz T and Terres W 1999 Influence of stent length and heparin coating on platelet activation *Thromb. Res.* **94** 79–86
- [34] Jurk K and Kehrel B E 2005 Platelets: physiology and biochemistry *Semin. Thromb. Hemost.* **31** 381–92
- [35] Ahmed T A E, Dare E V and Hincke M 2008 Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications *Tissue Eng. B* **14** 199–215
- [36] van Oeveren W, Tielliu I F and de Hart J 2012 Comparison of modified Chandler, roller pump, and ball valve circulation models for in vitro testing in high blood flow conditions: application in thrombogenicity testing of different materials for vascular applications *Int. J. Biomater.* **2012** 1–7
- [37] Münch K, Wolf M F, Gruffaz P, Ottenwaelder C, Bergan M, Schroeder P and Fogt E J 2000 Use of simple and complex in vitro models for multiparameter characterization of human blood-material/device interactions *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11** 1147–63
- [38] Kaplan O et al 2017 Low-thrombogenic fibrin-heparin coating promotes in vitro endothelialization *J. Biomed. Mater. Res. A* **105** 2995–3005
- [39] Krajewski S, Prucek R, Panacek A, Avci-Adali M, Nolte A, Straub A, Zboril R, Wendel H P and Kvitek L 2013 Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood *Acta Biomater.* **9** 7460–8
- [40] Link A, Cattaneo G, Brynda E, Riedel T, Kucerova J, Schlensak C, Wendel H P, Krajewski S and Michel T 2020 Hemocompatibility testing of blood-contacting implants in a flow loop model mimicking human blood flow *J. Vis. Exp.* **2020** e60610
- [41] Uematsu S, Yang A, Preziosi T J, Kouba R and Toung T J 1983 Measurement of carotid blood flow in man and its clinical application *Stroke* **14** 256–66
- [42] Casa L D C, Deaton D H and Ku D N 2015 Role of high shear rate in thrombosis *J. Vasc. Surg.* **61** 1068–80
- [43] Chiu J J and Chien S 2011 Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives *Physiol. Rev.* **91** 327–87
- [44] Kühn A L et al 2017 Use of self-expanding stents for better intracranial flow diverter wall apposition *Intervent. Neuroradiol.* **23** 129–36
- [45] Gorbet M B and Sefton M V 2004 Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes *Biomaterials* **25** 5681–703
- [46] Takeo M, Lee W and Ito M 2015 Wound healing and skin regeneration *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **5** a023267
- [47] Werner S and Grose R 2003 Regulation of wound healing by growth factors and cytokines *Physiol. Rev.* **83** 835–70
- [48] Ryhänen J 2000 Biocompatibility of nitinol *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* **9** 99–105
- [49] Björk I and Lindahl U 1982 Mechanism of the anticoagulant action of heparin *Mol. Cell. Biochem.* **48** 161–82
- [50] Cattaneo G et al 2019 In vitro investigation of chemical properties and biocompatibility of neurovascular braided implants *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **30** 1–12
- [51] Thierry B, Winnik F M, Merhi Y, Silver J and Tabrizian M 2003 Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers *Biomacromolecules* **4** 1564–71
- [52] Guelcher S A, Gallagher K M, Didier J E, Klinedinst D B, Doctor J S, Goldstein A S, Wilkes G L, Beckman E J and Hollinger J O 2005 Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders *Acta Biomater.* **1** 471–84
- [53] Werner C, Maitz M F and Sperling C 2007 Current strategies towards hemocompatible coatings *J. Mater. Chem.* **17** 3376–84
- [54] Hayward J A and Chapman D 1984 Biomembrane surfaces as models for polymer design: the potential for haemocompatibility *Biomaterials* **5** 135–42
- [55] Martínez Moreno R, Bhogal P, Lenz-Habijan T, Bannewitz C, Siddiqui A, Lylyk P, Hannes R, Monstadt H and Henkes H 2019 In vivo canine study of three different coatings applied to p64 flow-diverter stents: initial biocompatibility study *Eur. Radiol. Exp.* **3** 3
- [56] Lenz-Habijan T, Bhogal P, Peters M, Bufe A, Martínez Moreno R, Bannewitz C, Monstadt H and Henkes H 2018 Hydrophilic stent coating inhibits platelet adhesion on stent surfaces: initial results in vitro *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* **41** 1779–85

### 8.3 Publikation III

**Development of a Novel Polymer-Based mRNA Coating for Surgical Suture to Enhance Wound Healing**

Coatings

2019



Article

# Development of a Novel Polymer-Based mRNA Coating for Surgical Suture to Enhance Wound Healing

Antonia Link <sup>1</sup>, Hanna Haag <sup>1</sup>, Tatjana Michel <sup>1</sup>, Markus Denzinger <sup>2</sup>, Hans Peter Wendel <sup>1</sup>, Christian Schlensak <sup>1</sup> and Stefanie Krajewski <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Clinical Research Laboratory, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Medical Center, 72076 Tuebingen, Germany; antonia.link@uni-tuebingen.de (A.L.); hanna.haag@klinikum.uni-tuebingen.de (H.H.); tatjana.michel@uni-tuebingen.de (T.M.); hans-peter.wendel@med.uni-tuebingen.de (H.P.W.); christian.schlensak@med.uni-tuebingen.de (C.S.)

<sup>2</sup> Department of Plastic Surgery, BG Trauma Center, 72076 Tuebingen, Germany; m.denzinger@t-online.de

\* Correspondence: stefanie.krajewski@uni-tuebingen.de; Tel.: +49-(0)7071-2983303

Received: 30 April 2019; Accepted: 4 June 2019; Published: 8 June 2019



**Abstract:** A therapeutic strategy to improve wound healing has become an increasingly important medical task due to the rising incidence of adiposity and type II diabetes as well as the proceeding population aging. In order to cope with the resulting burdens, new strategies to achieve rapid and complete wound healing must now be developed. Accordingly, the development of a bioactive wound dressing in the form of a messengerRNA (mRNA)-bearing poly(lactide-co-glycolide acid) (PLGA) coating on surgical suture is being pushed further with this study. Furthermore, the evaluation of the polymer-based transfection reagent Viromer RED has shown that it can be used for the transfection of eukaryotic cells: The mRNA gets properly complexed and translated into a functional protein. In addition, the mRNA-PLGA coating triggered the expression of the keratinocyte growth factor (KGF) in HaCat cells although KGF is not expressed under physiological conditions. Moreover, transfection via surgical sutures coated with mRNA does not affect the cell viability and a proinflammatory reaction in the transfected cells is not induced. These properties make the mRNA-PLGA coating very attractive for the in vivo application. For the future, this could mean that through the use of mRNA-coated sutures in surgical wound closure, cells in the wound area can be transfected directly, thus accelerating and improving wound healing.

**Keywords:** messengerRNA; poly(lactic-co-glycolic acid); surgical suture; coating; wound healing; keratinocyte growth factor

## 1. Introduction

In industrialized nations, the incidence of obesity and type II diabetes continues to increase as society simultaneously grows older [1]. In Germany alone, 2.5% of the population suffers from chronic wounds with rising tendencies [2]. Furthermore, chronic wounds are, on the one hand, a major burden for the person concerned and, on the other hand, they pose a socio-economic challenge: About 2% of the health budget must be raised each year to treat poorly healing wounds [3]. Therefore, in order to cope with the enormous financial burden, new strategies must be developed for achieving rapid and complete wound healing. Moreover, wound healing is a complex three-stage process mediated by a large number of molecules such as different enzymes, cytokines, and growth factors [4]. Since the process of wound healing is determined by the nature of the wound, the healing prospects are best with smooth and closely adjacent wound edges [5]. Therefore, surgical sutures are used for wound closure to achieve this state whenever tissue separation occurs due to an incision, puncture, abrasion, or other injuries [6].

Additionally, sutures can consist of natural or synthetic textile biomaterials and they can be either monofilament with a smooth surface or braided to a multifilament structure [7,8]. The sutures' physical and mechanical properties, handling properties, biocompatibility, and antimicrobial characteristic are of utmost importance [9]. Moreover, various types of research have provided good anesthetic and antineoplastic properties to the surgical threads [6]. Consequently, several groups have incorporated different antimicrobial agents into sutures to impart microbe resistance characteristics and prevent infections at the surgical site [10,11]. A suture modification that promotes wound healing by triggering cell differentiation and proliferation in the wound area had not been introduced until now. The growth factor KGF plays an important role in wound healing because it stimulates the differentiation and proliferation of epithelial cells and conveys an anti-apoptotic effect [12]. Therefore, the idea is to trigger the expression of the growth factor by the body's own cells directly in the wound area via transfection of in vitro transcribed mRNA. This therapy works by delivering a modified mRNA encoding for the desired protein in order to target cells, which then translate the mRNA into the corresponding protein [13,14]. Accordingly, mRNA-based technology is already in use for the development of vaccines against different medical conditions, different cancer types, and monogenetic diseases. The mRNA therapy has several advantages over the DNA-based gene therapy where a permanent change in the genome is achieved. Moreover, with no risk of wrongly localized integration in the host genome, which could lead to mutagenic effects, the transfection efficiency is not dependent on the cell cycle and the synthesis of the desired protein occurs fast through the cells own translational machinery under physiological conditions that can be controlled [15,16].

Since mRNA is a relatively large molecule, no transporter proteins are available for transportation through the cell membrane. Therefore, in order to initiate the mRNA transfer, various physical, biological, or chemical methods exist, each of which has specific advantages and disadvantages. Additionally, since chemical transfection methods are the most common, cationic polymers such as polyethylenimine (PEI) or cationic lipids/lipid mixtures such as Lipofectamine 2000 are used [17–19]. This method is based on the principle that positively charged polymer or lipid particles form complexes with negatively charged nucleic acids and prevent the mRNA from nucleases digesting it in extracellular space [20]. Subsequently, these positively charged complexes are attracted to the cell membrane and the uptake is conducted via endocytosis. After absorption, the carrier molecules are broken down and the mRNA is released in the cytoplasm, where it can be translated into a protein [21]. However, the transfections of cells with cationic reagents lead to rapid mRNA intake and translation with the peak in protein translation after 24 h. As a result, it is crucial to guarantee continuous therapeutic protein production for the treatment of chronic wounds.

Furthermore, PLGA-based delivery systems enable targeted and controllable local drug release [22] and lay the foundation stone for the development of a bioactive coating for multifilament seam material: A polymer-based mRNA-PLGA coating should enable the in vivo transfection of cells in the wound area. In order to immobilize the encapsulated mRNA encoding for the desired protein, the approach is to set up a coating on the surface of surgical suture based on PLGA. Accordingly, the copolymer can be well degraded by eukaryotic cells while showing good compatibility with tissue and cells without bearing any toxic effects. Due to these positive characteristics, PLGA is one of the few polymers that have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for clinical use in humans [23]. Therefore, PLGA is widely used to produce extended release formulations (for encapsulation of drug substances) and implants with adjustable properties for local delivery [24,25].

To our knowledge, we are the first group to have established a novel mRNA-based coating for surgical suture material. This is intended to transfect cells in the wound area and, thus, improve wound healing through the expression of the growth factor KGF. Therefore, therapeutic KGF-encoding mRNA with a suitable transfection agent was incorporated into a PLGA coating. In doing so, the coating should degrade as well as release and translate mRNA in a constant manner. Thus, physiological processes such as wound healing can be improved and remodeled through the targeted expression of growth factors [26].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture

As human skin is mainly made up of fibroblasts and keratinocytes, the human keratinocyte cell line HaCat (CLS Cell Lines Service Inc, Eppelheim, Germany) and BJ fibroblast (ATCC, Manassas, VA, USA) from human foreskin were used in this study. The HEK293 cell line was used as a control. All cells were grown in 175 cm<sup>2</sup> cell culture flasks at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. HaCat or HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific Inc) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc.). For BJ fibroblast cultivation, 3% HEPES-buffer (1 M; Gibco by life technologies Inc., Darmstadt, Germany) was further added. When cells reached 90% confluency, they were trypsinized with 0.25% trypsin in buffered ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Thermo Fisher Scientific Inc.). Cell detachment was stopped using the corresponding cell culture medium. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min and resuspended. Afterwards, cells were counted with the CASY cell counter (Roche Diagnostics Inc., Mannheim, Germany).

For each experiment, cells were seeded with different density onto a 12-well plate: HEK293 cells were seeded at  $1.0 \times 10^5$  cells/well, keratinocytes at  $1.5 \times 10^5$  cells/well, and BJ fibroblasts at  $0.75 \times 10^5$  cells/well. All cells were seeded 1 day prior to transfection.

### 2.2. mRNA Synthesis

mRNAs encoding for enhanced green fluorescent protein (eGFP) and KGF were generated using a procedure previously described [14]. This multi-step procedure starts with amplification of the DNA templates of eGFP or KGF, which are encoded in the associated pcDNA 3.3 plasmids (Eurofins Genomics Inc., Ebersberg, Germany). The amplification was conducted via polymerase chain reaction (PCR) by using the HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) according to manufacturer's instruction (TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG as forward primer and T<sub>120</sub>CTTCCTACTCAGGCTTTATCAAAGACCA as reverse primer (Ella Biotech Inc., Martinsried, Germany)). The in vitro transcription (IVT) of DNA to mRNA was performed by using the T7 MEGAscript Kit (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA). The mRNA was modified by attaching a 3'-0-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (New England Biolab, Inc., Ipswich, UK) as well as adding pseudouridine-5'-triphosphate and 5-methylcytidine-5'-triphosphate (TriLink Biotech Inc., San Diego, CA, USA) to the reaction, which were substitutes for UTP and CTP. The in vitro transcribed mRNA was dephosphorilized using the Antarctic Phosphatase Kit (New England Biolab Inc.) and purified with the RNeasy Kit (Qiagen Inc.). The nucleic acid products of PCR and IVT were controlled with gel electrophoresis using a 1% agarose-TBE gel.

### 2.3. Coating of Multifilament Suture with mRNA and PLGA following Transfection of Cells

In this study, PLGA was used to immobilize complexed mRNA on multifilament seam material and to achieve transfection of cells by degradation of the coating and release of mRNA. In the first step, a stock solution was prepared by dissolving 20 mg PLGA (Evonik Inc., Essen, Germany) in 1000 µL of ethyl acetate (Honeywell Riedel-de Haën Inc., Seelze, Germany). This stock solution was sterile-filtered and stored at +4 °C. Before each experiment, 10 µL of the stock solution was diluted with 990 µL of sterile ethyl acetate as a working solution. For the coating, the mRNA was complexed with either Viomer RED (Lipocalyx Inc., Halle (Saale), Germany) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) as a transfection agent. For the Viomer RED-based coating, 0.5 µL of the transfection agent was placed in a reaction tube and mixed with 12 µL Viomer RED buffer solution. Next, mRNA was added, so the resulting concentration was 1 µg mRNA per 15 µL. Complex formation occurred during 15 min incubation at room temperature (RT). For the Lipofectamine 2000-based coating, 0.5 µL Lipofectamine 2000 was mixed with 12 µL Opti-MEM I medium (Invitrogen Inc.) and 2.5 µg mRNA, and incubated for 20 min at RT. After complex formation, 15 µL of each transfection solution was

mixed with 20  $\mu\text{L}$  of the PLGA utility solution. A 1 cm piece of multifilament suture was placed on a glass slide and the mRNA PLGA solution was added drop by drop. When the solvent ethyl acetate evaporated and the filaments were dry, they were turned, and the other side was coated by dropwise adding of the mRNA-PLGA solution. This procedure was repeated until the entire coating solution was applied to the suture. According to this procedure, 1  $\mu\text{g}$  mRNA should be immobilized on the seam material. In order to increase the amount of mRNA immobilized on the surface, the volume of the coating solution was increased proportionally. The coated filament was put on the cells in the 12-well plates and incubated at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$  until analysis. Seam material coated with only PLGA or PLGA and the transfection agent were used as controls. The transfection efficiency of the coated suture was compared to that of direct cellular transfection. For this purpose, 15  $\mu\text{L}$  of the mRNA, which was complexed with Viromer RED, was taken from the same transfection mixture as the one used for the coating and added directly to the cell culture medium of the cells. For comparing the direct and indirect transfection efficiency of mRNA, which was complexed with Lipofectamine 2000, the cells were first washed twice with 1000  $\mu\text{L}$  PBS buffer (w/o  $\text{Ca}^+/\text{Mg}^+$ ) (Gibco by life technologies Inc.). Then, 15  $\mu\text{L}$  of the already prepared Lipofectamine 2000 transfection solution was taken and mixed with 500  $\mu\text{L}$  Opti-MEM I and added drop by drop to the cells. After 4 h of incubation, the transfection complexes were removed, and cells were cultured in full medium until analysis. Cells incubated with the transfection agent only were used as a control.

#### 2.4. Scanning Electron Microscopy

To be able to visualize the structure of the mRNA-PLGA coating applied to the surgical suture after the coating process, the suture had to be prepared for scanning electron microscope (SEM) analysis. To remove the remaining water, the samples were incubated in ethanol p.A. (Merck Inc., Darmstadt, Germany) with increasing concentration of 40%–100%. Finally, the samples were dried using a desiccator, then sputtered with gold palladium, and subsequently analyzed with SEM (Cambridge Instruments Inc., Cambridge, UK).

#### 2.5. KGF Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

To quantify the amount of KGF expressed by the cells after mRNA transfection, the supernatant was analyzed using the KGF-ELISA (human FGF-7 enzyme-linked immunosorbent assay kit, Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA). The assay was performed according to the specifications of the manufacturer.

#### 2.6. Flow Cytometry

Flow cytometric analyses of the transfected HEK293, HaCat, and BJ fibroblasts were performed to determine the level of eGFP-expressing cells. Thus, 24 h or 48 h post transfection, cells were detached from 12-well plates, washed with PBS (w/o  $\text{Ca}^+/\text{Mg}^+$ ), and fixed using 250  $\mu\text{L}$  1x CellFix (BD Biosciences Inc., Franklin Lakes, NJ, USA). Flow cytometry was performed using a FACScan cytometer (BD Biosciences Inc.). For each sample, a total of 10,000 events were acquired. Fluorescence microscopic analyses were performed before cell detachment.

#### 2.7. Real-Time qPCR

To determine how the transfection of 1  $\mu\text{g}$  KGF mRNA impacts the gene expression of inflammatory markers in primary fibroblasts 6 h or 24 h post transfection, the total RNA of the cells was isolated using the Aurum total RNA isolation kit (Bio-Rad Laboratories Inc., München, Germany). The isolated RNA was converted to copy DNA (cDNA) using the iScript kit (Bio-Rad Laboratories Inc.). Expression of interferon alpha (IFN- $\alpha$ ), interferon beta (IFN- $\beta$ ), and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (IFN- $\alpha$ : Forward Primer 5'-ACC CCT GCT ATA ACT ATG ACC ATG C-3', Reverse Primer 5'-CAC AGT GTA AAG GTG CAC ATG ACG-3'; IFN- $\beta$ : Forward Primer 5'-TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AG-3', Reverse Primer 5'-CGG AGG TAA CCT GTA AGT CTG TTA A-3'; TNF- $\alpha$ : Forward Primer 5'-CCC AGG CAG TCA GAT CAT CTT C-3', Reverse Primer 5'-GTT ATC TCT CAG CTC CAC GCC-3' (Ella

Biotech Inc.)) was analyzed. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was used as reference (Forward Primer 5'-TCA ACA GCG ACA CCC ACT CC-3', Reverse Primer 5'-TGA GGT CCA CCA CCC TGT TG-3' (Ella Biotech Inc.)). The real-time qPCR was performed using the CFX Connect Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories Inc.).

## 2.8. Cell Viability Assay

The colorimetric MTT assay, which is based on the glycolysis-dependent conversion of the yellow tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; AppliChem Inc., Darmstadt, Germany) to violet formazan, was used to determine cell metabolic activity and viability. Cells were washed three times with RPMI without phenol red (Life technologies Inc.) and incubated for 4 h at 37 °C with 330 µL of a 0.05% solution of MTT. Afterwards, the MTT solution was removed and 300 µL DMSO (dimethyl sulfoxide; Serva Inc., Heidelberg, Germany) were added to dissolve the generated formazan. The absorbance of the DMSO solution was measured at 540 nm with the Mithras LB 940 Microplate Reader (Berthold technologies Inc., Bad Wildbad, Germany).

## 2.9. Hemocompatibility Testing

For hemocompatibility testing, blood samples of four healthy donors were collected by venipuncture. This procedure is approved by the Ethics Committee of the medical faculty at the University of Tübingen (Project identification code: 270/2010BO1) and all subjects gave their written informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The collected blood samples were anticoagulated with 1.5 IU heparin/ mL blood (LEO Pharma Inc., Neu-Isenburg, Germany) and the intake of hemostasis-affecting drugs within the last 14 days, oral contraceptives, and smoking were set as exclusion criteria to guarantee uninfluenced clotting behavior.

To prove whether the mRNA-PLGA coating on the suture does not affect blood clotting, baseline values of several hemocompatibility markers were gained by directly transferring the heparinized blood after blood draw into three different monovettes containing either EDTA (Sarstedt Inc., Nümbrecht, Germany), CTAD (BD Biosciences Inc.), a mixture of citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole, or citrate (Sarstedt Inc.). Coated pieces of suture (3 cm) were incubated with 9 mL of fresh human blood in round polypropylene bottom tubes (BD Biosciences Inc.) at 37 °C for 60 min under dynamic conditions. A tube filled with just 9 mL of blood was used as a control. After incubation, the blood was transferred into the respective monovettes, containing EDTA, CTAD, or citrate. Blood anticoagulated with EDTA was first used to draw a hemogram, while afterwards, all blood samples were centrifuged followed by blood plasma collection. Plasma samples were stored at −20 °C or −80 °C until the analysis of various hemocompatibility markers. ELISAs were performed to quantify thrombin-antithrombin-complex (Enzygnost®TAT micro–Siemens Healthcare Inc., Marburg, Germany), Polymorphonuclear (PMN) elastase (Demeditec Diagnostics Inc., Kiel, Germany), β-thromboglobulin (Stago Inc., Düsseldorf, Germany), and SC5b9-complex (Tecomedical Inc. Sissach, Switzerland).

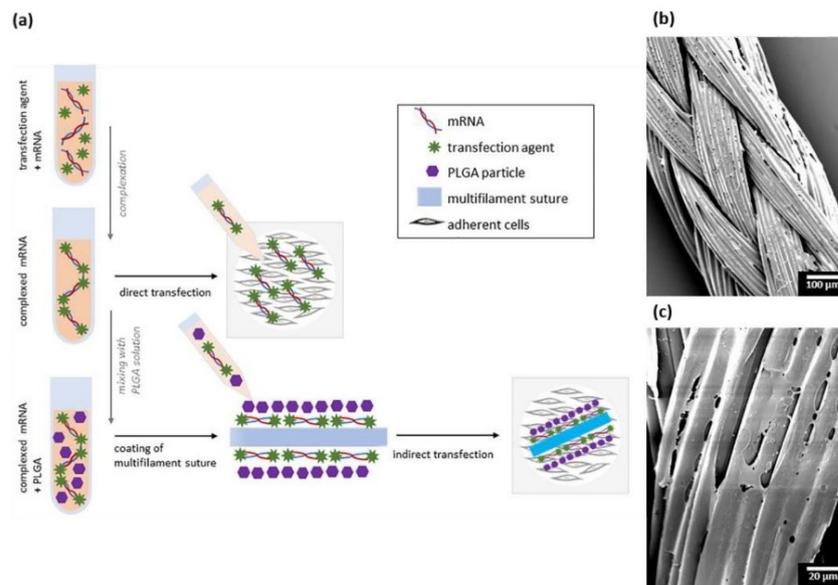
## 2.10. Statistics

All data are given as means with standard error of the mean (SEM). To test normal distribution, the Kolmogorov–Smirnov test was used. Normally distributed datasets were analyzed using one-way or repeated measures (RM) ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test to analyze differences between groups. The Kruskal–Wallis test was used for non-normal distributed datasets. All analyses were performed using the statistical software package GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Evaluation of a suitable Transfection Agent for the Construction of a mRNA Coating for Seam Material

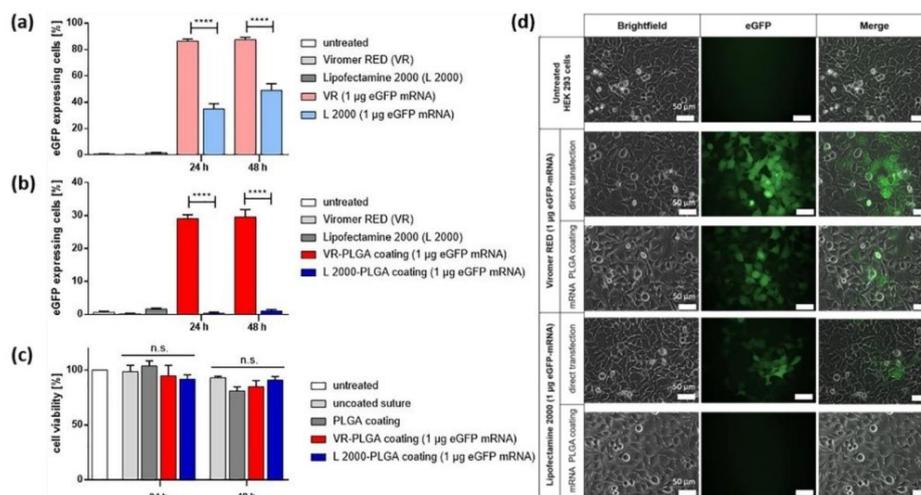
During previous studies, it could be shown that mRNA can be delivered to cells with a variety of different transfections agents, all leading to the expression of a functional protein. For the present study, it was important to check whether the complexed mRNA could be incorporated into a coating made up of PLGA (Figure 1a). The resulting coating is extensively spread on the surface of the suture (Figure 1b,c) and ought to work as a carrier system that transfects epithelial cells with growth factor-encoding mRNA and, thus, improves wound healing.



**Figure 1.** Schematic overview of the coating process and microscopic view of the coating. After complexation of a specific mRNA, cells can either be transfected in a direct manner or the complexed mRNA can be mixed with a PLGA solution followed by coating of multifilament sutures and subsequent indirect transfection (a). Scanning electron microscope visualization of the surface of the mRNA-PLGA coated multifilament suture in 100-fold (b) and 500-fold (c) magnification.

In order to evaluate whether Viromer RED or Lipofectamine 2000 is more suitable to build a functional mRNA-PLGA coating, HEK293 cells were transfected with 1 µg eGFP mRNA either by direct transfection or by coated sutures.

To assess the efficiency of transfection, the transfected HEK293 cells were analyzed 24 and 48 h post transfection by flow cytometry (Figure 2a,b). After 24 h, 86.35% ± 1.55% of the cells transfected with Viromer RED directly expressed eGFP while only 34.92% ± 4.16% of the cells transfected with Lipofectamine 2000 did. After 48 h, the percentage of eGFP-expressing cells after Viromer RED treatment was nearly stable (87.45% ± 1.85%), while the number of cells producing eGFP after transfection with Lipofectamine 2000 slightly increased to 49.11% ± 5.09% (Figure 2a). When it came to transfection via the coated sutures, the Viromer RED based coating was able to transfect 29.11% ± 1.16% of HEK293 cells after 24 h and the eGFP expression remained stable for another 24 h (29.59% ± 2.24%). The coating made up of Lipofectamine 2000 could not trigger a detectable eGFP expression: 0.4% ± 0.29% (24 h) or 1.12% ± 0.39% (48 h) of HEK293 cells were recognized as fluorescent. This is roughly the same percentage as the non-transfected HEK293 cells (0.69% ± 0.37%) (Figure 2b).



**Figure 2.** Comparison of different cationic transfection reagents for direct and indirect mRNA transfection of cells. Flow cytometric analysis of eGFP mRNA-transfected HEK293 cells using Viromer RED and Lipofectamine 2000 for direct transfection (a) or transfection via mRNA-PLGA coated sutures (b) 24 and 48 h post transfection ( $n = 4$ ;  $**** p < 0.0001$ ). Determination of cell viability after exposition to different kinds of suture for 24 or 48 h (c) ( $n = 4$ ; n.s. = not significant). Fluorescence microscopic images of HEK293 cells 48 h after transfection by direct addition of 1  $\mu\text{g}$  of complexed mRNA or mRNA-coated sutures (d).

To exclude cytotoxic effects of coated sutures on HEK293 cells, a cell viability assay was performed (Figure 2c). The cells were subjected to the sutures over periods of 24 and 48 h, respectively. Untreated cells were used as a reference and their viability was set to 100%. For comparison, uncoated and PLGA-only-coated suture materials were used as well as mRNA- and PLGA-coated sutures either using Viromer RED or Lipofectamine 2000 as a transfecting agent. Within 48 h, no significant reduction in cell viability of the HEK293 cells, exposed to different kinds of suture, could be detected.

The results of flow cytometry could be confirmed by analysis with fluorescent microscopy 48 h post transfection (Figure 2d). The direct transfection with Viromer RED led to visible more eGFP-expressing cells than Lipofectamine 2000. An indirect transfection via a mRNA-PLGA coating was only successful when using Viromer RED.

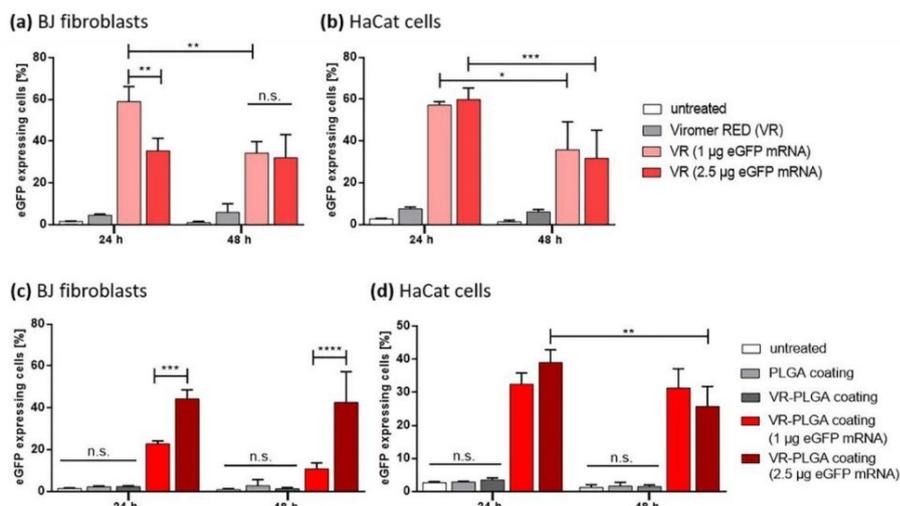
### 3.2. eGFP Transfection of Skin Cells by mRNA-Coated Seam Material

Since fibroblasts and keratinocytes play an important role in the wound healing as they migrate from the surrounding tissue into the wound area and fill up the tissue defect, improvement in wound healing could be achieved if cells in the wound area are able to be transfected with therapeutic mRNA. The transfection can occur via seam material that is in contact with fibroblasts and keratinocytes in the case of a cutaneous wounds.

For this experiment, BJ fibroblasts and HaCat cells were transfected with different amounts of eGFP mRNA whether in a direct manner with Viromer RED-mRNA or through the mRNA-PLGA coating. Successful protein expression in cells after transfection was observed microscopically as well as quantified by flow cytometry.

When BJ fibroblasts were treated with eGFP mRNA, the direct transfection of 1  $\mu\text{g}$  mRNA led to a significantly higher percentage of protein expression than transfections performed with 2.5  $\mu\text{g}$  mRNA after 24 h (Figure 3a:  $59.06\% \pm 7.12\%$  vs.  $35.43\% \pm 6.00\%$ ). eGFP expression was regulated to a uniform level after 48 h incubation: Of the cells transfected with 1  $\mu\text{g}$  mRNA,  $34.37\% \pm 2.74\%$  expressed the

fluorescent protein and  $32.05\% \pm 5.58\%$  of the fibroblasts transfected with  $2.5 \mu\text{g}$  mRNA did. The direct transfection of HaCat cells with different amounts of mRNA led to no significant differences regarding the transfection efficiency: After 24 h,  $57.14\% \pm 1.17\%$  and  $59.85\% \pm 5.44\%$  of the cells transfected with 1 and  $2.5 \mu\text{g}$  eGFP mRNA, respectively, expressed the fluorescent protein (Figure 3b). After 48 h of incubation, the number of eGFP-expressing cells was significantly reduced to  $35.78\% \pm 6.68\%$  ( $1 \mu\text{g}$  mRNA) and  $31.78\% \pm 6.65\%$  ( $2.5 \mu\text{g}$  mRNA) in both treatment groups.



**Figure 3.** Determination of the transfection efficiencies 24 or 48 h after direct or indirect eGFP mRNA transfection. Flow cytometric analysis 24 or 48 h after the direct transfection of BJ fibroblasts (a) or HaCat cells (b) with Viromer RED-encapsulated eGFP-encoding mRNA. BJ fibroblasts (c) and HaCat cells (d) were also analyzed after the indirect transfection via the mRNA-PLGA coating ( $n = 4$ ;  $**** p < 0.0001$ ,  $*** p < 0.001$ ,  $** p < 0.01$ ,  $* p < 0.05$ , n.s. = not significant).

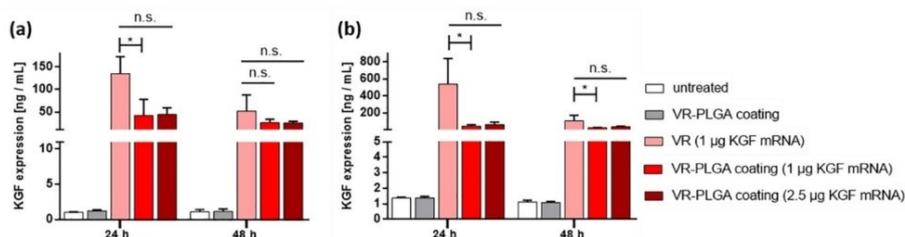
After transfection of BJ fibroblasts via the PLGA coating containing  $1 \mu\text{g}$  mRNA,  $22.78\% \pm 1.47\%$  of the cells expressed eGFP after 24 h. After another 24 h, the percentage of eGFP-expressing cells decreased to  $10.82\% \pm 1.41\%$  (Figure 3c). Transfection via the mRNA-PLGA coating that contained  $2.5 \mu\text{g}$  eGFP mRNA was significantly more effective, since  $44.26\% \pm 4.30\%$  of the cells expressed the fluorescent protein after 24 h. Also, there was no significant reduction in eGFP expression ( $42.55\% \pm 7.34\%$ ) after 48 h of incubation. When the transfection of HaCat cells was performed via the PLGA coating, similar effects of protein expression could be observed: After 24 h, no significant difference between the different coatings had occurred (Figure 3d:  $32.50\% \pm 3.35\%$  for  $1 \mu\text{g}$  mRNA vs.  $39.08\% \pm 3.87\%$  for  $2.5 \mu\text{g}$  mRNA). The coating containing  $1 \mu\text{g}$  eGFP mRNA led to a stable eGFP expression over 48 h, while the number of eGFP-expressing cells significantly declined when using the coating containing  $2.5 \mu\text{g}$  of mRNA.

### 3.3. Induction of therapeutic Protein Expression by KGF mRNA-Coated Sutures

During wound healing, keratinocytes play an important role: They ensure reepithelialization of the damaged skin layer by migrating into the wound area, whereby this process is stimulated by KGF. An artificial increase of KGF in the wound area, triggered by cell transfection via a mRNA-PLGA coating, could, thus, improve cell proliferation and wound healing.

For the quantification of secreted therapeutic KGF protein BJ fibroblasts and HaCat cells were transfected with different amounts of KGF mRNA through a Viromer RED based mRNA-PLGA coating and the protein level was analyzed in the supernatants using KGF-ELISA.

The direct transfection of BJ fibroblasts with 1 µg of KGF mRNA resulted in a secretion of  $135.2 \pm 37.44$  ng/mL KGF protein during the first 24 h post transfection, whereas after 48 h, the KGF expression decreased to a level of  $52.06 \pm 17.72$  ng/mL (Figure 4a). The indirect transfection via the mRNA-PLGA coating led to the expression of  $42.23 \pm 17.86$  ng/mL for 1 µg KGF mRNA and  $44.33 \pm 7.44$  ng/mL for 2.5 µg KGF mRNA after 24 h. After 48 h, the amount of released KGF decreased to  $26.44 \pm 3.83$  ng/mL and  $25.71 \pm 1.19$  ng/mL in the mRNA-PLGA suture groups containing 1 and 2.5 µg KGF mRNA, respectively.



**Figure 4.** Quantification of the release of KGF protein after the in vitro incubation of cells with mRNA complexes of mRNA-coated sutures. Analysis of KGF secreted by BJ fibroblasts (a) or HaCat cells (b) 24 or 48 h after transfection via the mRNA-PLGA coating that contained either 1 or 2.5 µg KGF-mRNA. For comparison, the amount of expressed KGF after the direct transfection with 1 µg KGF mRNA was quantified ( $n = 4$ ; \*  $p < 0.05$ , n.s. = not significant).

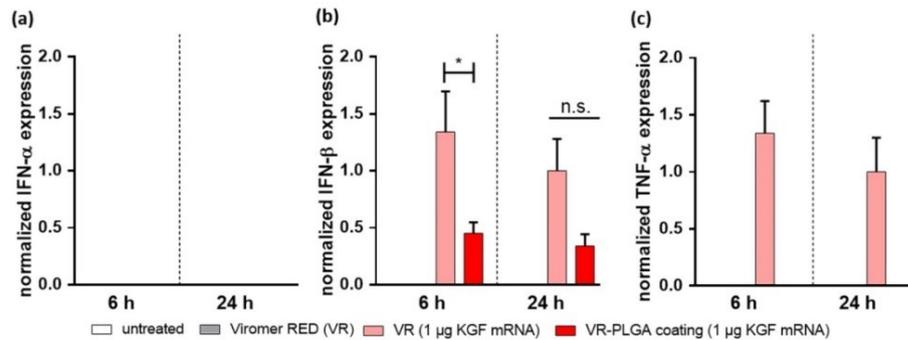
When HaCat cells were directly transfected with 1 µg mRNA, a KGF concentration of  $537.60 \pm 302.30$  ng/mL was measured after 24 h. The transfection via the coating bearing 1 µg KGF mRNA led to a significantly lower amount of protein ( $42.51 \pm 8.31$  ng/mL) though the transfection with 2.5 µg mRNA in the coating resulted in increased protein levels of  $62.35 \pm 14.46$  ng/mL (Figure 4b). After 48 h, the amount of secreted KGF following direct transfection decreased to  $105.20 \pm 32.72$  ng/mL. HaCat cells that were transfected by a coating containing 1 µg mRNA secreted  $25.65 \pm 1.18$  ng/mL KGF after 48 h and for the coating bearing 2.5 µg mRNA, the measured KGF level after 48 h was  $35.85 \pm 3.14$  ng/mL.

### 3.4. Cytokine Release Post Transfection

It is known that nucleic acids can stimulate the immune system by activating toll-like receptors (TLRs). Although immunogenicity can be reduced by using modified nucleotides in the in vitro synthesis of mRNA, potential immune reactions, which may be induced, must be excluded.

To determine the effect of the mRNA transfection on gene expression of inflammatory markers in BJ fibroblasts, the whole RNA content of the cells was isolated and prepared for quantitative real-time PCR 6 h and 24 h after transfection.

An expression of IFN-α could not be detected at any time in the fibroblasts (Figure 5a). The direct transfection with 1 µg KGF mRNA led to an increased expression of IFN-β compared to the transfection via the PLGA coating 6 h and 24 h post transfection (Figure 5b). When it came to the expression of TNF-α, the directly transfected fibroblasts showed increased gene expression compared to all other treatment groups (Figure 5c).

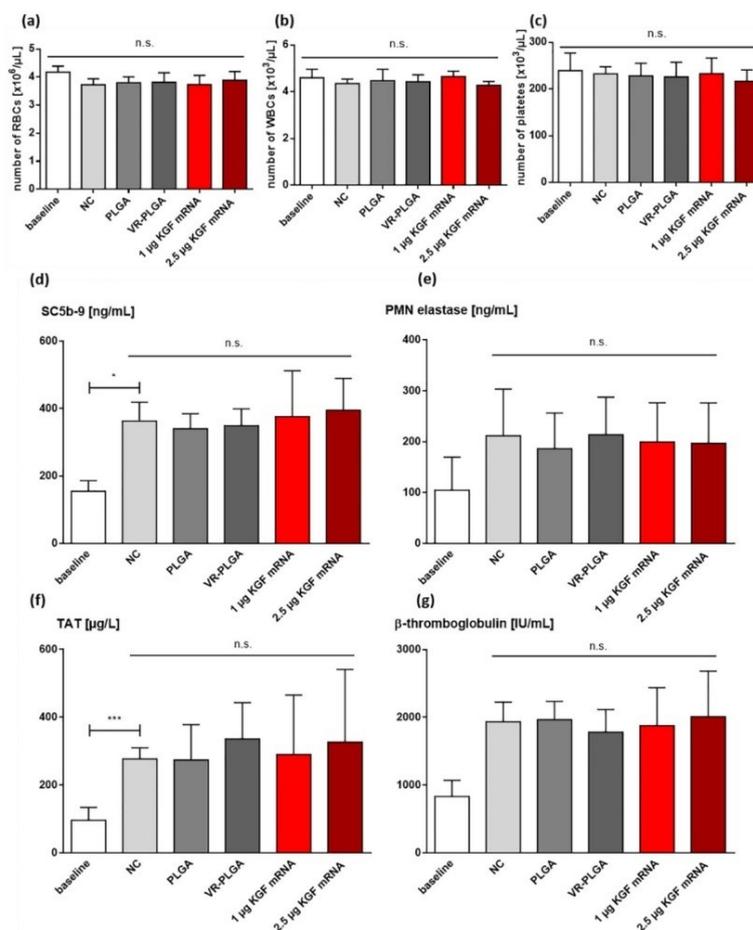


**Figure 5.** Analyses of different proinflammatory genes in BJ fibroblasts after transfection with therapeutic mRNA-complexes or mRNA-coated sutures. qRT-PCR was used to determine the release of interferon alpha (a), interferon beta (b), and tumor necrosis factor alpha (c) 6 h and 24 h post transfection. The expression pattern of untreated cells was compared to the one of cells treated with Viromer RED only, cells transfected with 1 μg KGF mRNA in a direct manner, or transfected via the mRNA-PLGA coating containing 1 μg KGF mRNA. ( $n = 4$ ; \*  $p < 0.05$ , n.s. = not significant).

### 3.5. Hemocompatibility of KGF-Encoding mRNA-PLGA Seam Material

The ability of the mRNA-coated sutures to interact with blood coagulation or the complement cascades plays a pivotal role for its potential use in clinical applications. To analyze whether the mRNA-PLGA coating influences hematological processes, sutures with different coatings were incubated with heparinized, fresh human whole blood and blood cell count, as well as various hematological markers were determined using specific ELISAs.

It could be shown that neither the PLGA coating alone nor in combination with Viromer RED or KGF-encoding mRNA had a measurable effect on the blood. When examining the blood cell count before and after incubation, no differences regarding the numbers of red blood cells, white blood cells or platelets were found (Figure 6a–c). Likewise, the levels for the complement complex SC5b-9 as well as for PMN elastase were not altered compared to the negative control where blood without any test specimen was incubated. Moreover, no differences in thrombin-antithrombin-complex (TAT) formation and the platelet activation marker β-thromboglobulin were detectable between the groups after incubation (Figure 6d–g).



**Figure 6.** Hemocompatibility testing of sutures coated with PLGA and/or Viromer RED and KGF mRNA. Numbers of red blood cells (RBCs) (a), white blood cells (WBCs) (b), and platelets per microliter (c) were not altered in all treatment groups. The blood markers for detecting the activation of the complement system (SC5b-9) (d), neutrophil activation (PMN elastase) (e), as well as activation of the clotting cascade (TAT) (f) and platelets ( $\beta$ -thromboglobulin) (g) were quantified before and after incubation in blood, using specific ELISA. ( $n = 4$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ , n.s. = not significant).

#### 4. Discussion

This study aimed to present a novel approach in the development of bioactive suture material using a polymer-based, mRNA-containing coating, which supports wound regeneration by specific transfection of cells in the wound area. Consequently, through the induced expression of the growth factor KGF, wound healing should be stimulated by the differentiation and proliferation of epithelial cells and the additional mediated anti-apoptotic effect. The results show that polymer-based reagents are more effective in the transfection of cells with mRNA than lipid-based reagents. Most importantly, establishing a mRNA coating based on the biodegradable polymer PLGA with Viromer RED used as transfection reagent has been successful: HEK293 cells, HaCat cells, and primary fibroblasts could be transfected by coated seam material, and the mRNA-PLGA coating even triggered the expression of KGF in HaCat cells, although they do not form this growth factor under physiological conditions [27].

Furthermore, the transfection via the coated seam material did not affect the vitality of cells or cause a proinflammatory reaction in the transfected cells. These properties make the mRNA-PLGA coating very attractive for the *in vivo* application and the hemocompatibility testing, which shows that the suture did not interact with the blood clotting process or complement cascades after an incubation time of 60 min, thereby further qualifying the coating for surgical use. This study established the coating of suture material with mRNA-PLGA complexes to promote the KGF expression at the needed location directly on the sewn wound. This approach guarantees targeted delivery to cells on the skin surface as well as the deeper skin layers with minimal or no loss of therapeutic molecules.

The development of coatings for surgical suture, until now, was mostly targeted at antimicrobial characteristics to prevent surgical site infections using antiseptic agents such as chlorhexidine, natural products such as totarol, or different kinds of silver nanoparticles [28–30]. Additionally, several kinds of drug-eluting sutures have been produced by a variety of manufacturing processes [31]. When it comes to the task of improving wound healing, wound dressings are dominating the market. Moreover, bioactive wound pads seemingly modulate and improve the physiological stages of wound healing [32]. Therefore, products containing collagen and hyaluronic acid are used [33,34]. In addition, another interesting approach to improve wound healing is the use of growth factors due to their immense importance in mediating the wound closure processes. The Becaplermin gel for topical application was released on the market in 1999, containing a recombinant human platelet-derived growth factor (rhPDGF) as its active pharmaceutical ingredient, which showed improved wound healing compared to the placebo in studies [35]. Furthermore, a study by Pierce et al. has shown that the application of 4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  recombinant KGF could accelerate wound healing and lead to the formation of a more stable epidermis [36]. Nevertheless, the topical application of growth factors was unsatisfying: Less than 10% of the applied dose was measurable in superficial layers of the treated granulation tissue and less than 2% in deeper layers [37]. One idea to overcome this obstacle is gene therapy approaches [38]: Kopp et al. accelerated the healing process of second degree burn wounds by two days through the application of HaCat cells stably expressing KGF after KGF-encoding plasmid transfection [39]. Similarly, electroporative transfection of KGF DNA led to continuous expression of KGF protein and improved wound healing in the treated mice [40].

However, several known disadvantages exist when it comes to DNA-based gene therapy such as the approaching potential mutagenic effect through false integration into the host's genome [41,42]. But this threat does not exist when pursuing a mRNA-based gene therapy approach where the nucleic acid does not enter the nucleus and furthermore the administration of therapeutic mRNA is only temporary and will end when the suture is removed. Moreover, our group recently showed that the application of KGF-encoding mRNA accelerates cell proliferation and migration of keratinocytes *in vitro* [43]. In order to find out whether it is possible to develop a functional mRNA-containing coating for surgical suture, two different commercially distributed transfection agents were tested in this study: Lipofectamine 2000 and Viromer RED. Here, Lipofectamine 2000 is a mixture of cationic lipids, which forms the supposed lipoplexes when complexing negatively charged mRNA [20]. Furthermore, Viromer RED consists of a polyethyleneimine (PEI) core structure, modified with hydrophobic and anionic side chains, which forms polyplexes with mRNA in aqueous solutions [44]. The results show that only Viromer RED can be used as a transfection agent for mRNA to be incorporated into a PLGA coating. Therefore, when using Lipofectamine 2000, no transfection of cells could be detected. In addition, Abraham et al. described the development of an mRNA-PLGA coating for stents: The group used a protocol in which the mRNA is complexed with Lipofectamine 2000, mixed with a PLGA solution, and applied the coating in layers on Thermanox slides [45]. Consequently, Thermanox is a polyolefin-based polymer gained by polymerization of alkenes and, therefore, has a nonpolar character [46]. The group was able to transfect a significant number of HEK293 cells via this Lipofectamine 2000-based coating. For the present study, multifilament seam material made from polyethylene terephthalate (PET) fibers was used. Accordingly, a PET monomer is a strong polar molecule that carries two carbonyl groups with a positive (carbon) and a negative (oxygen) partial

charge [47]. Additionally, polymer fibers develop electrostatic charges [48]. Lipofectamine 2000 is formulated by cationic lipids, which form positively charged lipoplexes when complexing mRNA. When cationic lipoplexes are encountered on a polar material such as PET fibers, it is conceivable that their molecular interactions are present in between. Thus, since the integrity and stability of the lipoplexes could be harmed, the mRNA is already released during the coating process. When the coating lacks properly encapsulated mRNA, no cell transfection can occur. In order to avoid this effect, a polymer-based suture material with a non-charged surface—for example, polypropylene (PP)—can be used.

However, the results of this study show that transfection via a mRNA-PLGA coating based on Viromer RED as a transfecting agent leads to efficient protein expression. The transfection efficiency between direct and indirect transfection is comparable as regards the eGFP expression, but unfortunately, the amount of secreted KGF after a transfection via the mRNA-PLGA coating is presently lower compared to the direct transfection. Therefore, to overcome this problem in the future, certain possibilities can help optimize the coating: Viromer RED is a PEI-based transfection agent, which only has limited resistance to ethyl acetate and was used as a solvent for PLGA. This could lead to a decrease in weight and mass after a certain time period [49] and thus make polyplexes lose their stability, thereby leading to a premature mRNA release. In order to bypass this effect and make the transfection via the coating even more efficient, another solvent for PLGA could be used prospectively: The organic ether tetrahydrofuran (THF) works as a solvent for PLGA but, at the same time, does not degrade PEI [50] so the mRNA-loaded polyplexes will not be harmed. Additionally, THF is infinitely soluble in water up to the temperature of 72 °C [51], which makes the resulting PLGA solution perfectly suitable for the mixture with the water-based mRNA solution and the transfection buffer.

Using the Viromer RED-based mRNA-PLGA coating, encouragingly, it was possible to trigger the expression of the growth factor KGF in HaCat cells, although these cells do not form KGF under physiological conditions. The therapeutically effective level of 4 µg KGF mentioned by Pierce et al. was not achieved in the experiments but on the other hand, only 1 cm of the coated seam material was used. When sewing a cutaneous wound with several stitches, the amount of needed suture exceeds 1 cm and, therefore, more mRNA will be delivered to the wound territory.

The good cytocompatibility of the mRNA-PLGA coating reflects through the minimal expression of inflammatory markers post transfection: While in the case of direct transfection, the expression of IFN-β and TNF-α in BJ fibroblasts significantly increased, cells that were transfected via mRNA-PLGA coating just showed a slightly increased expression of IFN-β compared to untreated cells. Consequently, a great advantage of the transfection via the mRNA-PLGA coating is that a gradual mRNA release occurs. It has previously been shown that immune activation through mRNA depends highly on the amount applied to the cells and, additionally, cationic polyplexes themselves are believed to be able to activate TLRs and induce the release of cytokines [52,53]. Therefore, when the coating is degraded piece by piece, the cells are transfected with less encapsulated mRNA at once as compared to direct transfection. In addition, the positive properties of the mRNA-PLGA coating reflect in the results of the hemocompatibility testing where it could be proved that none of the investigated blood parameters was altered by the coated seam material.

In order to deepen the knowledge gained here, further studies need to be carried out: It would be interesting to know how transfection efficiency can be increased by using other solvents or higher amounts of mRNA. The release characteristics of the coating need to be evaluated extensively so that in the next step, the transfection rate can be controlled by the usage of a specially adjusted PLGA. Finally, the use of a skin model or ex vivo testing on human skin is essential for understanding how the mRNA-coated suture can improve the wound healing in detail.

## 5. Conclusions

In conclusion, our work describes a novel approach to support the process of wound healing by mRNA-coated suture materials. For the development of a bioactive suture coating, modified

mRNA was complexed with Viromer RED and incorporated into a solution of the biodegradable polymer PLGA. The coating enabled the transfection of different cell lines as well as primary cells: The mRNA coating led to both the expression of a functional fluorescent protein as well as of the growth factor KGF. The transfection of cells via the mRNA-PLGA coating was not accompanied by cytotoxic or immunogenic effects in vitro and the results of this study suggest that the performance of the mRNA-PLGA coating can be improved even further by using other solvents for the coating solution. The excellent cytocompatibility of the coated seam material indicates that even higher amounts of mRNA could be incorporated.

To our knowledge, the present study describes, for the first time, the development of an mRNA-based suture coating aiming to transfect cells in the wound area and thus improve wound healing, which would also be of particular interest in other fields of wound management.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.L. and S.K.; Methodology, A.L. and H.H.; Software, A.L. and H.H.; Validation, S.K., M.D., and T.M.; Formal Analysis, T.M.; Investigation, A.L.; Resources, S.K. and M.D.; Data Curation, M.D.; Writing—Original Draft Preparation, A.L.; Writing—Review and Editing, T.M., S.K., M.D., H.H., C.S., and H.P.W.; Visualization, A.L., T.M., and S.K.; Supervision, S.K.; Project Administration, H.P.W.; Funding Acquisition, S.K.

**Funding:** We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tuebingen.

**Acknowledgments:** We thank Ernst Schweizer from the section of medical materials science & technology of the University Hospital Tuebingen for assistance with scanning electron microscopy.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Boateng, J.; Catanzano, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—A review. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 3653–3680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Stuecker, M.; Harke, K.; Rudolph, T.; Altmeyer, P. Pathogenesis of therapy refractory ulcerus cruris. *Der Hautarzt* **2003**, *54*, 750–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Menke, N.B.; Ward, K.R.; Witten, T.M.; Bonchev, D.G.; Diegelmann, R.F. Impaired wound healing. *Clin. Dermatol.* **2007**, *25*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Werner, S.; Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 835–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lippert, H. *Wundatlas*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, 2012.
6. Gokarneshan, N.; Velumani, K. Recent innovations in textile sutures—An approach towards improved surgical procedures. *Sci. J. Biomed. Eng. Biomed. Sci.* **2018**, *2*, 001–007.
7. Firestone, D.E.; Lauder, A.J. Chemistry and mechanics of commonly used sutures and needles. *J. Hand Surg. Am.* **2010**, *35*, 486–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Reckhenrich, A.K.; Kirsch, B.M.; Wahl, E.A.; Schenck, T.L.; Rezaeian, F.; Harder, Y.; Foehr, P.; Machens, H.-G.; Egaña, J.T. Surgical sutures filled with adipose-derived stem cells promote wound healing. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Saxena, S.; Ray, A.R.; Kapil, A.; Pavon-Djavid, G.; Letourneur, D.; Gupta, B.; Meddahi-Pellé, A. Development of a new polypropylene-based suture: plasma grafting, surface treatment, characterization, and biocompatibility studies. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 373–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Viju, S.; Thilagavathi, G. Effect of chitosan coating on the characteristics of silk-braided sutures. *J. Ind. Text.* **2013**, *42*, 256–268. [[CrossRef](#)]
11. Liu, H.; Ge, Z.; Wang, Y.; Toh, S.L.; Sutthikhum, V.; Goh, J.C.H. Modification of sericin-free silk fibers for ligament tissue engineering application. *J. Biomed. Mater. Res.—Part B Appl. Biomater.* **2007**, *82*, 129–138. [[CrossRef](#)]

12. Beer, H.D.; Gassmann, M.G.; Munz, B.; Steiling, H.; Engelhardt, F.; Bleuel, K.; Werner, S. Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **2000**, *5*, 34–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Koziak, K.; Bojakowska, M.; Robson, S.C.; Bojakowski, K.; Soin, J.; Csizmadia, E.; Religa, P.; Gaciong, Z.; Kaczmarek, E. Overexpression of CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 decreases smooth muscle cell proliferation and prevents neointima formation after angioplasty. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 1191–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Avci-Adali, M.; Behring, A.; Keller, T.; Krajewski, S.; Schlensak, C.; Wendel, H. Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression. *J. Biol. Eng.* **2014**, *8*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics—Developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pardi, N.; Hogan, M.J.; Porter, F.W.; Weissman, D. mRNA vaccines—A new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 261–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Washbourne, P.; McAllister, A.K. Techniques for gene transfer into neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 566–573. [[CrossRef](#)]
18. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M.A.; Mergny, M.D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297–7301. [[CrossRef](#)]
19. Cardarelli, F.; Digiacomo, L.; Marchini, C.; Amici, A.; Salomone, F.; Fiume, G.; Rossetta, A.; Gratton, E.; Pozzi, D.; Caracciolo, G.; et al. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25879. [[CrossRef](#)]
20. Kim, T.K.; Eberwine, J.H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3173–3178. [[CrossRef](#)]
21. Choi, C.H.J.; Hao, L.; Narayan, S.P.; Auyeung, E.; Mirkin, C.A. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 7625–7630. [[CrossRef](#)]
22. Liechty, W.B.; Kryscio, D.R.; Slaughter, B.V.; Peppas, N.A. Polymers for drug delivery systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2010**, *1*, 149–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sadat Tabatabaei Mirakabad, F.; Nejadi-Koshki, K.; Akbarzadeh, A.; Yamchi, M.R.; Milani, M.; Zarghami, N.; Zeighamian, V.; Rahimzadeh, A.; Alimohammadi, S.; Hanifehpour, Y.; et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 517–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hu, C.; Feng, H.; Zhu, C. Preparation and characterization of rifampicin-PLGA microspheres/sodium alginate in situ gel combination delivery system. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *95*, 162–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Marquette, S.; Peerboom, C.; Yates, A.; Denis, L.; Langer, I.; Amighi, K.; Goole, J. Stability study of full-length antibody (anti-TNF alpha) loaded PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* **2014**, *470*, 41–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M.S.; Brem, H.; Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 585–601. [[CrossRef](#)]
27. Kujath, P.; Michelsen, A. Wounds—From physiology to wound dressing. *Deutsches Ärzteblatt Int.* **2008**, *105*, 239–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Reinbold, J.; Uhde, A.-K.; Müller, I.; Weindl, T.; Geis-Gerstorfer, J.; Schlensak, C.; Wendel, H.-P.; Krajewski, S.; Reinbold, J.; Uhde, A.-K.; et al. Preventing surgical site infections using a natural, biodegradable, antibacterial coating on surgical sutures. *Molecules* **2017**, *22*, 1570. [[CrossRef](#)]
29. Obermeier, A.; Schneider, J.; Harrasser, N.; Tübel, J.; Mühlhofer, H.; Pfürringer, D.; von Deimling, C.; Foehr, P.; Kiefel, B.; Krämer, C.; et al. Viable adhered Staphylococcus aureus highly reduced on novel antimicrobial sutures using chlorhexidine and octenidine to avoid surgical site infection (SSI). *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190912. [[CrossRef](#)]
30. Chandrasekaran, N.; Dhas, S.; Anbarasan, S.; Mukherjee, A. Biobased silver nanocolloid coating on silk fibers for prevention of post-surgical wound infections. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 159. [[CrossRef](#)]

31. Champeau, M.; Thomassin, J.-M.; Tassaing, T.; Jérôme, C. Current manufacturing processes of drug-eluting sutures. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2017**, *14*, 1293–1303. [[CrossRef](#)]
32. Heinlin, J.; Schreml, S.; Babilas, P.; Landthaler, M.; Karrer, S. [Cutaneous wound healing. Therapeutic interventions]. *Der Hautarzt* **2010**, *61*, 611–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Frieß, W.; Metzmacher, I.; Wild, T. Die Bedeutung von Kollagen und Kollagenasen in der Wundheilung. In *Manual der Wundheilung*; Springer: Vienna, Austria, 2007; pp. 89–97.
34. Goa, K.L.; Benfield, P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* **1994**, *47*, 536–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wieman, T.J.; Smiell, J.M.; Su, Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* **1998**, *21*, 822–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pierce, G.F.; Yanagihara, D.; Klopchin, K.; Danilenko, D.M.; Hsu, E.; Kenney, W.C.; Morrisg, C.F. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *J. Exp. Med.* **2004**, *179*, 831–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Singer, A.J.; Clark, R.A.F. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 738–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Branski, L.K.; Gauglitz, G.G.; Herndon, D.N.; Jeschke, M.G. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns* **2009**, *35*, 171–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kopp, J.; Wang, G.Y.; Kulmburg, P.; Schultze-Mosgau, S.; Huan, J.N.; Ying, K.; Seyhan, H.; Jeschke, M.D.; Kneser, U.; Bach, A.D.; et al. Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF. *Mol. Ther.* **2004**, *10*, 86–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Marti, G.; Ferguson, M.; Wang, J.; Byrnes, C.; Dieb, R.; Qaiser, R.; Bonde, P.; Duncan, M.D.; Harmon, J.W. Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model. *Gene Ther.* **2004**, *11*, 1780–1785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Youn, H.; Chung, J.-K. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1337–1348. [[CrossRef](#)]
42. Michel, T.; Wendel, H.-P.; Krajewski, S. Next-Generation Therapeutics: mRNA as a Novel Therapeutic Option for Single-Gene Disorders. In *Modern Tools for Genetic Engineering*; InTech: London, UK, 2016; ISBN 978-953-51-2234-0.
43. Denzinger, M.; Link, A.; Kurz, J.; Krauss, S.; Thoma, R.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; Krajewski, S. Keratinocyte growth factor modified messenger RNA accelerating cell proliferation and migration of keratinocytes. *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 335–347. [[CrossRef](#)]
44. Panzner, S. Transfection: Viral and Synthetic Techniques Converge. *Genet. Eng. Biotechnol. News* **2014**, *34*, 20–21. [[CrossRef](#)]
45. Abraham, M.K.; Nolte, A.; Reus, R.; Behring, A.; Zengerle, D.; Avci-Adali, M.; Hohmann, J.D.; Peter, K.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; et al. In vitro study of a novel stent coating using modified CD39 messenger RNA to potentially reduce stent angioplasty-associated complications. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. White, J.L.; Choi, D.D. *Polyolefins: Processing, Structure Development and Properties*; Hanser: Cincinnati, OH, USA, 2005.
47. Franck, A.; Herr, B.; Ruse, H.; Schulz, G. *Kunststoff-Kompendium*; Vogel Business Media: Würzburg, Germany, 2011; ISBN 3834331643.
48. Zeltobrujchov, V.F. Elektrostatische Aufladung von Fasern und Möglichkeiten zu ihrer Beseitigung. Fortschrittsbericht. *Acta Polym.* **1982**, *33*, 447–453. [[CrossRef](#)]
49. Ludwick, A.G.; Overberger, C.G. Synthesis and characterization of polyethylenimine backbone polynucleotide models. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **2003**, *20*, 2123–2138. [[CrossRef](#)]
50. Gentile, P.; Chiono, V.; Carmagnola, I.; Hatton, P. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3640–3659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Matouš, J.; Hrnčířik, J.; Novák, J.P.; Šobr, J. Liquid-liquid equilibrium in the system water-tetrahydrofuran. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1970**, *35*, 1904–1905. [[CrossRef](#)]

52. Masotti, A.; Mossa, G.; Cametti, C.; Ortaggi, G.; Bianco, A.; Del Grosso, N.; Malizia, D.; Esposito, C. Comparison of different commercially available cationic liposome–DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, *68*, 136–144. [[CrossRef](#)]
53. Zolnik, B.S.; González-Fernández, Á.; Sadrieh, N.; Dobrovolskaia, M.A. Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* **2010**, *151*, 458–465. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist niemals das Werk eines Einzelnen und daher möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank richtet sich an Prof. Hans Wendel für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie durchzuführen, die Unterstützung während dieser Zeit, die wissenschaftliche Diskussion und die Begutachtung der Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Prof. Boris Macek für die Begutachtung dieser Dissertation bedanken.

Ganz besonders möchte ich auch meiner „Doktormutter in Elternzeit“ Prof. Stefanie Krajewski für ihre herausragende Unterstützung und Förderung in den letzten Jahren danken.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Dr. Tatjana Michel, Prof. Meltem Avci-Adali, Prof. Giorgio Cattaneo und Dr. med. Markus Denzinger für ihre tatkräftige Unterstützung.

Nicht zu vergessen sind natürlich alle Kollegen im THG-Labor die durch ihre Herzlichkeit, Unterstützung und Kreativität jeden Tag in etwas verwandelt haben, dass einem nur entfernt wie „Arbeit“ vorkommt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich über all die Jahre motiviert und unterstützt hat, ohne sie wäre ich so weit nicht gekommen. Insbesondere möchte ich meinem Mann danken, der mit viel Liebe und Verständnis diesen Weg mit mir gegangen ist.