

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Entwicklung, Evaluierung und Validierung einer Vorrichtung zum
Schnellverschluss von Gefäßpunktionen nach perkutanen
transluminalen, kardiologischen und radiologischen Eingriffen**

von

Jakob Biesinger

aus Tübingen

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinik für Wiederkäuer

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Angefertigt am
klinischen Forschungslabor für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
des Universitätsklinikums Tübingen

Mentor: Univ.-Prof. Dr. Hans Peter Wendel

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	11
II.	LITERATURÜBERSICHT UND STAND DER TECHNIK.....	12
1.	Der arterielle femorale Zugang.....	12
1.1.	Ablauf der Punktion und Legen der Zugangsschleuse.....	12
1.2.	Grundlegende topographische Anatomie zur Punktion der A. femoralis beim Menschen	13
1.3.	Diagnostische und interventionelle angiologische Eingriffe über den transfemorale Zugang.....	14
2.	Entfernung der Zugangsschleuse und Hämostase an der Punktionsstelle	15
2.2.	Manuelle Kompression	16
2.3.	Vaskuläre Verschlussysteme (vascular closure devices).....	17
2.3.1.	Aktive Verschlussysteme.....	19
2.3.1.1.	Angio-Seal® (Kollagenpfropf-basierter Verschluss).....	19
2.3.1.2.	Femoseal®	20
2.3.1.3.	FastSeal® (Polymerpfropf-basierter Verschluss)	21
2.3.1.4.	Perclose Proglide® und Prostar XL® (Naht-basierter Verschluss).....	22
2.3.1.5.	StarClose SE® (Clip-basierter Verschluss)	23
2.3.2.	Passive Verschlussysteme	25
2.3.2.1.	ExoSeal®	25
2.3.2.2.	Mynx®	26
2.3.2.3.	FISH®	26
2.3.2.4.	Catalyst®.....	27
2.3.3.	Neu entwickelte Verschlussmechanismen	28
2.3.3.1.	Axera®	28
3.	Hämostaseologie	29
3.1.	Physiologie der Hämostase	29
3.1.1.	Primäre Hämostase (zelluläre Gerinnung)	29
3.1.2.	Sekundäre Hämostase (plasmatische Gerinnung).....	30
3.1.2.1.	Extrinsisches System (tissue-factor-pathway)	31
3.1.2.2.	Intrinsisches System.....	31
3.1.2.3.	Gemeinsames System.....	32

3.1.3.	Fibrinolyse und Hemmung der Gerinnung.....	32
4.	Gewebe-Material-Interaktionen (Fremdkörperreaktion).....	34
5.	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	39
III.	MATERIAL UND METHODEN	40
1.	In-vitro-Tests	40
1.1.	Testung der Rückstellkraft und des Spannverhaltens	41
1.2.	Test von Verschlussstopfenmustern im Flussmodell	42
1.3.	Hämokompatibilitätsprüfung	43
1.3.1.	Blutentnahme	43
1.3.2.	Vorbereitung der Proben und Inkubation auf der Rocking Platform	44
1.3.3.	Überführung des Probenblutes in Spezialmonovetten	44
1.3.4.	Aliquotierung des Probenblutes	45
1.3.5.	Bestimmung der Hämokompatibilitätsparameter nach ISO 19993-4	46
1.3.5.1.	Thrombin-Anti-Thrombin-Komplex (TAT)	47
1.3.5.2.	SC5b-9 (Terminaler Komplementkomplex (TCC)).....	47
1.3.5.3.	β-Thromboglobulin (β-TG).....	48
1.3.5.4.	PMN-Elastase.....	48
1.3.6.	Rasterelektronenmikroskopie.....	50
1.3.7.	Statistische Auswertung	51
1.4.	Testung des Stopfendesigns (Flügelanzahl).....	51
1.5.	Dichtigkeitstest/Designstudie.....	52
2.	In-vivo-Machbarkeitsstudie (Tiermodell).....	56
2.1.	Versuchstiere	56
2.2.	Haltung der Versuchstiere	56
2.3.	Zeitliche Versuchsabfolge.....	56
2.4.	Funktionsweise des neu entwickelten arteriellen Verschlussystems.....	57
2.5.	Versuchsprozedere	59
2.5.1.	Prämedikation und Anästhesie	59
2.5.2.	Vorbereitung der Punktionsstelle	59
2.5.3.	Ablauf der Punktion und Setzen des Stopfens	60
2.5.4.	Beobachtung und Dokumentation der Stopfenapplikationen.....	61
2.5.5.	Euthanasie der Versuchstiere und Carotidenexplantation.....	61

2.6.	Histologie	61
2.6.1.	Herstellung von Trenn-Dünnschliffpräparaten	62
2.6.2.	Herstellung von Paraffinschnitten	62
2.6.3.	Histologische Färbungen	63
2.6.3.1.	Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung	63
2.6.3.2.	Masson-Trichrom-Färbung	63
2.6.4.	Histomorphologische/Histopathologische Beurteilung	64
IV.	ERGEBNISSE	65
1.	In-vitro-Tests	65
1.1.	Testung der Rückstellkraft und des Spannverhaltens	65
1.2.	Flussmodell	66
1.3.	Hämokompatibilitätstest	68
1.3.1.	Erythrozyten	68
1.3.2.	Leukozyten	69
1.3.3.	Thrombozyten	70
1.3.4.	β -Thromboglobulin (β -TG)	71
1.3.5.	Thrombin-Anti-Thrombin-Komplex (TAT)	72
1.3.6.	SC5b-9 (Terminaler Komplementkomplex (TCC))	73
1.3.7.	PMN-Elastase	74
1.3.8.	Rasterelektronenmikroskopisches Bildmaterial	75
1.4.	Stopfendesign (Flügelanzahl)	79
1.5.	Dichtigkeitstest/Designstudie	80
2.	In-vivo-Tests	82
2.1.	Versuchsbeobachtungen	82
2.2.	Zustand der Tiere während und nach der Stopfenlegung	85
2.3.	Makroskopische Beurteilung der Carotiden	86
2.4.	Histomorphologische Beurteilung	86
2.4.1.	0 Tage im Tier	87
2.4.2.	2 Tage im Tier	88
2.4.3.	3 Tage im Tier	89
2.4.4.	7 Tage im Tier	90
2.4.5.	9 Tage im Tier	91
2.4.6.	10 Tage im Tier	94

2.4.7.	13 Tage im Tier	94
2.4.8.	14 Tage im Tier	95
2.4.9.	16 Tage im Tier	96
2.4.10.	23 Tage im Tier	96
2.4.11.	30 Tage im Tier	98
V.	DISKUSSION	100
1.	In-vitro-Testungen	101
2.	In-vivo-Testungen	111
3.	Limitationen und Schlussfolgerungen.....	116
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	118
VII.	SUMMARY.....	121
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	124
IX.	TABELLENVERZEICHNIS	127
X.	LITERATURVERZEICHNIS	128
XI.	DANKSAGUNG	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

”	Zoll	g	Gramm
µg	Mikrogramm	g	Erdbeschleunigung
µl	Mikroliter	h	Stunden
A.	Arteria	HE	Hämalaun-Eosin
ACT	activated clotting time	i. d. R.	in der Regel
ADP	Adenosindiphosphat	ISO	Internat. Organization for Standardization
aqua dest.	Destilliertes Wasser	ITV	Institut für Textil- und Verfahrenstechnik
bzw.	beziehungsweise	IU	international unit
ca.	circa	kg	Kilogramm
cm	Zentimeter	KGW	Körpergewicht
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	l	Liter
etc.	et cetera	Lig.	Ligamentum
EvG	Elastika-van-Gieson	M.tr	Masson-Trichrom
F	French	MC	manuelle Kompression
F(dann römische Zahl)	Gerinnungsfaktor	MEUV	Polymere mit langer Resorptionsdauer
G	Gauge	mg	Milligramm
		Min.	Minuten

mm	Millimeter	TCC	Terminaler Komplementkomplex
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	TF	Tissue factor
MQ	Polymere mit kurzer Resorptionsdauer	tPA	tissue plasminogen activator
Mrd.	Milliarde	u. a.	unter anderen
N.	Nervus	UKT	Universitätsklinikum Tübingen
ng	nanogramm	V.	Vena
PAF	platelet activating factor	VCD	Vascular Closure Device
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitoren	vgl.	vergleiche
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	vWF	von-Willebrand-Faktor
PCI	Perkutane Koronarintervention	z. B.	zum Beispiel
PMN	polymorphkernige Leukozyten	β-TG	β-Thromboglobulin
PTA	perkutane transluminale Angioplastie		
PTT	partial thromboplastin time		
rpm	rounds per minute		
s	Sekunden		
SC5b-9	Terminaler Komplementkomplex (TCC)		
SD	Standardabweichung		
TAT	Thrombin-Anti-Thrombin- Komplex		

I. EINLEITUNG

In Deutschland wurden 2011 circa 750 000 Herzkathetereingriffe durchgeführt. Dabei ist zwischen diagnostischen Eingriffen und perkutanen Koronarinterventionen (PCI) zu unterscheiden. 2008 wurde in 35,95 Prozent aller diagnostischen Eingriffe auch eine PCI durchgeführt. Das entspricht pro 100 000 Einwohnern 1031 diagnostischen Herzkathetereingriffen und 371 PCIs (van Buuren, 2010).

Üblicherweise wird dazu ein arterieller Zugang über die A. femoralis gewählt (Erbel et al., 2012). Hierzu werden gewöhnlicherweise 4F (French) Zugangsschleusen für diagnostische Zwecke und 5-10F Zugangsschleusen für Interventionen verwendet (Hepp & Kogel, 2006; Erbel et al., 2012).

Nach Beendigung des Eingriffs und dem Ziehen der Zugangsschleuse wird entweder auf eine manuelle Kompression oder auf eines der auf dem Markt erhältlichen Verschlussysteme zurückgegriffen um die arterielle Blutung zu stillen. In ca. 50-60 Prozent der perkutanen Koronarinterventionen wird eines dieser Systeme verwendet (Koreny et al., 2004; Tavriss et al., 2012).

Häufig sind Patienten, an denen ein perkutaner transluminaler Eingriff durchgeführt wird, antikoaguliert z. B. durch systemische Thrombolyse nach Myokardinfarkt mittels Heparin, Acetylsalicylsäure, Thienopyridinen, Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren und Phenprocoumon (Marcumar®). Vor allem bei diesen Patienten kann es zu beträchtlichen Blutungen nach dem Entfernen der arteriellen Zugangsschleuse kommen.

Auch aus diesem Grund kam 1991 das erste Verschlussystem auf den Markt (Ernst et al., 1993), mit dem Ziel, im Vergleich zu der manuellen Kompression eine schnellere Hämostase zu erreichen, sowie das Risiko von Nachblutungen und peripheren Komplikationen abzusenken (Öhrlein, Schilling & Kreissler-Haag, 2006; Knapp & Stroszczyński, 2008).

Damit können die Krankenhausaufenthalte von Patienten nach transluminalen Eingriffen verkürzt und dadurch zudem der Patientenkomfort erhöht werden (Weber et al., 2007).

Die Entwicklung dieser Systeme wird in den letzten Jahren von den mittlerweile

zahlreichen Herstellern bis heute immer weiter vorangetrieben. Dabei gelingt es jedoch nicht immer, leichte Handhabbarkeit, Materialverträglichkeit, Kosteneffizienz und Sicherheit zu verbinden. Es wird ein weltweites Umsatzvolumen von circa 1 Mrd. US-Dollar im Zusammenhang mit Gefäßverschlussystemen für das Jahr 2013 geschätzt (Patel et al., 2010).

Diese Arbeit befasst sich mit der Weiterentwicklung und anschließenden In-vivo-Testung eines neuartigen aktiven Verschlussystems am Schafmodell.

II. LITERATURÜBERSICHT UND STAND DER TECHNIK

1. Der arterielle femorale Zugang

Der arterielle Zugang ist grundlegender Bestandteil eines jeden Linksherzkathetereingriffs. Für Kathetereingriffe am rechten Herz wird hingegen ein venöser Zugang benötigt (Hamm et al., 2008). Neben der A. femoralis werden sowohl die A. radialis als auch die A. brachialis als arterieller Zugang für Herzkathetereingriffe genutzt (Kiemeneij et al., 1997).

In über 90 Prozent der heute durchgeführten Linksherzkathetereingriffe und Koronarinterventionen wird jedoch die A. femoralis als Zugangsgefäß herangezogen (Heintzen & Strauer, 1998).

Die A. femoralis gilt zudem als das am einfachsten anwendbare Zugangsgefäß bei Herzkathetereingriffen (Hamm et al., 2008).

1.1. Ablauf der Punktion und Legen der Zugangsschleuse

Nachdem die Punktionsstelle gereinigt und gründlich desinfiziert wurde, wird die pulsierende A. femoralis palpatorisch aufgesucht und nach örtlicher Betäubung mit einem einprozentigem Lokalanästhetikum (Hepp & Kogel, 2006), perkutan, in einem relativ kleinen Winkel mittels einer Hohnadel punktiert. Das dabei dann pulsierend austretende arterielle Blut gibt dem Operateur dabei die Sicherheit, dass er sich in der Arterie befindet. Daraufhin wird dann ein Führungsdraht über die Hohnadel in das Gefäß vorgeschoben. Der Draht wird anschließend mit einer Hand in Position gehalten und die Punktionskanüle aus der Arterie entfernt. Anschließend kann die Zugangsschleuse über den Führungsdraht in das Gefäß installiert werden.

Diese hier beschriebene, bekannte Methode bezeichnet man als Seldingertechnik, welche bereits das erste Mal 1953 publiziert wurde (Seldinger, 1953).

Beim arteriellen Zugang wird in den meisten Fällen in retrograder Richtung punktiert, während beim venösen Zugang i. d. R. eine antegrade Punktion des Gefäßes durchgeführt wird. Es können so auf beide Weisen Zugangskatheter (Schleusen) in verschiedenen Größen installiert werden (Reithoffer & Grillenberger, 2009; Hepp & Kogel, 2006).

Für diagnostische Herzkathetereingriffe wird, wie bereits weiter oben beschrieben, auf eine 4-5F Zugangsschleuse zurückgegriffen, wohingegen für interventionelle Koronarangiographien zumeist auf eine Schleusengröße zwischen 5F und 10F zurückgegriffen wird (Erbel et al., 2012; Hepp & Kogel, 2006). Ein French (F) entspricht dabei 0,33 mm und ist eine Maßeinheit für den Außendurchmesser von Kanülen bzw. Kathetern (Reithoffer & Grillenberger, 2009).

Über die in der Arterie platzierte Zugangsschleuse ist es möglich einen Katheter in das Gefäßsystem einzuführen und so diagnostische und/oder interventionelle Eingriffe in oder über dieses durchzuführen. Die Zugangsschleusen sind in der Regel mit einem Ventil ausgestattet, welches den Austritt von Blut, z. B. beim Katheterwechsel, verhindert. Außerdem ist es möglich über einen seitlichen Zugangsschlauch („Sideport“), z. B. Kontrastmittel oder Medikamente in das Gefäßsystem zu applizieren (Hamm et al., 2008).

1.2. Grundlegende topographische Anatomie zur Punktion der A. femoralis beim Menschen

Über die retrograde Punktion der A. femoralis communis kann Zugang zu nahezu allen Gefäßabschnitten im Körper erlangt werden (Hepp & Kogel, 2006).

Die A. femoralis communis verläuft distal des Lig. inguinale (Leistenband) und liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zum N. femoralis, sowie der V. femoralis. Dabei wird das Gefäß-Nerven-Bündel von einer gemeinsamen Vagina femoralis umhüllt. Der N. femoralis liegt dabei am weitesten lateral, gefolgt von der A. femoralis communis und der am weitesten medial liegenden V. femoralis (Kaiser et al., 2013).

Die Punktion wird knapp distal unterhalb des Leistenbandes durchgeführt. Dazu kann als Orientierungspunkt sowohl das Leistenband selbst als auch der

Femoralispuls herangezogen werden. Nach palpierter Pulsation ist es möglich die A. femoralis communis entweder gegen das Caput ossis femoris, die Eminentia iliopubica oder gegen den Ramus superior ossis pubis zu drücken. Da sich die Palpation des Lig. inguinale zeitweise als schwierig herausstellen kann, ist es möglich, mittels Fluoroskopie die Mitte des Caput ossis femoris als Orientierungspunkt für die Punktion ausfindig zu machen. Als von außen sichtbare Orientierungshilfe wäre noch die Leistenfalte (inguinale Hautfalte) zu erwähnen (Knapp & Stroszczyński, 2008).

1.3. Diagnostische und interventionelle angiologische Eingriffe über den transfemorale Zugang

Durch das Platzieren einer arteriellen femoralen Zugangsschleuse ergibt sich eine Vielzahl an diagnostischen und interventionellen angiologischen Eingriffsmöglichkeiten.

Unter anderem sind darüber diagnostisch z. B. Linksherzkatherisierungen mit Koronarangiographien sowie Angiokardiographien möglich (Greten, Rinninger & Greten, 2010). Des Weiteren z. B. auch Myokardbiopsien und hämodynamische Messungen (Hamm et al., 2008).

Ebenso können über den Zugang arterielle Angiographien durchgeführt werden. Als interventionelle Maßnahmen können z. B. perkutane koronare Interventionen (PCI) durchgeführt werden (Bücheler, Lackner & Thelen, 2005).

Diese haben ihren Ursprung in der sogenannten PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie), die 1977 das erste Mal von Andreas Grüntzig in Zürich angewendet worden ist. Er und seine Kollegen schafften es als erste, stenosierte Koronar- und Nierengefäße beim Menschen mittels eines Ballonkatheters wieder zu dilatieren (Grüntzig, Senning & Siegenthaler, 1979; Grüntzig & Kumpe, 1979).

Neben der Ballondilatation wird während der PCI in fast 90 Prozent der Fälle auch eine zusätzliche Stentimplantation durchgeführt (van Buuren, 2010; Greten, Rinninger & Greten, 2010).

Außerdem stehen zusätzliche interventionelle Maßnahmen wie die Rotablation, die Laserangioplastie und die Atherektomie zur Verfügung.

Aber auch Interventionen an den Herzklappen, wie z. B. die transkatheterale Aortenklappenimplantation (TAVI), können heute über eine femorale

Zugangsschleuse realisiert werden (Bekeredjian, 2013).

Neben der PCI am Herzen sind natürlich auch sogenannte perkutane transluminale Angioplastien (PTA) am übrigen arteriellen Gefäßsystem über die gelegte Zugangsschleuse durchführbar. Eine PTA wird überwiegend bei kurzen Stenosen zur Gefäßdilatation angewendet (Greten, Rinninger & Greten, 2010).

2. Entfernung der Zugangsschleuse und Hämostase an der Punktionsstelle

Die Entfernung der Zugangsschleuse erfolgt bei diagnostischen Herzkatheteruntersuchungen normalerweise unmittelbar nach Beendigung des Eingriffs. Die Schleusenextraktion nach einer PCI hingegen wird meist erst nach einer Wartezeit von mehreren Stunden durchgeführt, da die Patienten meist antikoaguliert sind und zuerst ein Abklingen der Wirkung des vorher verabreichten Heparins abgewartet wird. Vor dem Ziehen der Schleuse wird über deren seitlichen Zugangsschlauch Blut aspiriert. Daraufhin wird die Schleuse dann mit einer mit Heparin versetzten Kochsalzlösung gespült (Bonzel et al., 2008; Hamm et al., 2008; Lapp & Krakau, 2013; Erbel et al., 2012).

Zur Extraktion der Schleuse wird die Arterie oberhalb der Punktionsstelle mit der linken Hand komprimiert, während man mit der rechten Hand die Schleuse langsam aus dem Gefäß zieht.

Nach diagnostischen Herzkathetereingriffen mit 4F-Zugangsschleusen wird in der Regel auf eine manuelle Kompression zurückgegriffen, wohingegen bei interventionellen Eingriffen mit Schleusenvolumina größer oder gleich 5F häufig alternativ auch arterielle Verschlussysteme zum Einsatz kommen (Hamm et al., 2008).

Die American Heart Association spricht u. a. fünf Empfehlungen für die Anwendung von Verschlussystemen und der manuellen Kompression aus:

1. Bei Patienten an denen ein Verschlussystem anwendet werden soll, sind eine vorhergehende Angiographie zur Bestimmung der anatomischen Lage (Atherosklerose, Calcifikationen, etc.) und eine Identifikation der Einführungsschleuse für die richtige Wahl des Verschlussystems zu

- empfehlen.
2. Einrichtungen, bei denen eine manuelle Kompression routinemäßig durchgeführt wird, sollen versuchen, bei Patienten, welche sich einfachen diagnostischen Angiographien mit 5F-Schleusen unterziehen, die beschriebene Komplikationsrate von (<1 Prozent) zu erreichen.
 3. Die Anwendung von Verschlussystemen ist bei invasiven kardiovaskulären Eingriffen über die Femoralarterie berechtigt, um eine schnellere Hämostase, eine kürzere Bettruhe und eventuell einen höheren Patientenkomfort zu erreichen. Der Einsatz eines VCD sollte gegenüber dem für zahlreiche Patientengruppen erhöhten Komplikationsrisiko abgewogen werden. Außerdem sollen der Body-Mass-Index, die Lokalisation der Punktionsstelle, die Größe und Beschaffenheit des Gefäßes, frühere und bestehende Krankheiten des Patienten, sowie die Größe der Schleuse in die Entscheidung mit einfließen.
 4. VCDs sollten nicht routinemäßig dafür eingesetzt werden, um den Zweck der Absenkung der vaskulären Komplikationsrate bei Patienten, an denen ein invasiver kardiovaskulärer Eingriff durchgeführt wird, zu erreichen.
 5. Komplikationsdaten während und nach den Eingriffen mit VCDs sollten systematisch in lokalen oder nationalen Datenbanken gesammelt werden.

(Patel et al., 2010)

2.2. Manuelle Kompression

Ziel der manuellen Kompression ist es, den Blutaustritt aus der Femoralarterie durch Kompression der Arterie zu stoppen und ein Beginn der Blutgerinnung zuzulassen (Hamel, 2009).

Die manuelle Kompression stellt nach wie vor den „Goldstandard“ zum Erreichen der Hämostase nach perkutanen transluminalen Eingriffen dar (Prabhu et al., 2013; Schwartz et al., 2010; Hon et al., 2010).

Nach Beendigung des (angiologischen) Eingriffs wird aus dem Blut, welches über den Seitenarm der Zugangsschleuse entnommen wurde, die ACT (activated clotting time) bestimmt. Liegt diese unter 170 s, darf die Schleuse entnommen werden.

Zur Sicherstellung einer für die manuelle Kompression ausreichenden Gerinnung sollte der Quickwert größer als 50 Prozent, die PTT (Partial Thromboplastin Time) kleiner als 50 s und die Thrombozytenzahl größer als 50000/ μ l sein (Wielpütz &

Radeleff, 2013).

Bei diagnostischen Herzkathetereingriffen wird die Schleuse üblicherweise sofort nach dem Eingriff entfernt. Für die bei diesen Eingriffen häufig verwendeten 4F-Zugangsschleusen reicht eine Kompression der A. femoralis gegen den Caput ossis femoris von circa 10-15 Minuten meist aus um eine komplette Blutungsstillung zu erreichen (Erbel et al., 2012).

Dazu wird wenn die Schleuse entfernt wurde, ein relativ fester manueller Druck, typischer Weise 2 cm proximal der Hautpunktionsstelle, für circa 10 Min. auf die Arterie aufgebaut. Daraufhin wird der feste Druck für etwa 2-5 Min. etwas gelockert und während des Anlegens eines Druckverbandes wird nur noch leichter Druck ausgeübt (Schwartz et al., 2010).

Der Druck wird je nach Antikoagulationszustand des Patienten und verwendeter Schleusengröße entsprechend länger aufrechterhalten.

Bei interventionellen Eingriffen wird der Kompressionsdruck gewöhnlicher Weise zwischen 20 und 45 Minuten aufrechterhalten (Kern, 2012).

Daraufhin sollte bei 4-5F Schleusen die Immobilisation des Patienten (Bettruhe) von 4-6 h eingehalten werden (Lapp & Krakau, 2013).

Bei Zugangsschleusen ab 8F sollte der Patient mindestens 12 h immobilisiert werden (Erbel et al., 2012).

2.3. Vaskuläre Verschlusssysteme (vascular closure devices)

Neben der herkömmlichen manuellen Kompression nach der Extraktion der Zugangsschleuse aus der Arterie stehen drei weitere Möglichkeiten zum Erreichen der Hämostase an der Punktionsstelle zur Verfügung: Hämostasepads, Kompressionshilfen und zwei Gruppen von vaskulären Verschlusssystemen (Hon et al., 2010), welche sich im Allgemeinen in passive und aktive Systeme unterteilen lassen.

Die passiven Systeme bewirken entweder eine Kompression von der Gefäßinnenseite auf die Punktionsstelle, oder sie unterstützen/verbessern die Koagulation im Punktionskanal durch das Einbringen von Dichtstoffmaterial (Treitl et al., 2013; Dauerman, Applegate & Cohen, 2007; Turi, 2010).

Zu den aktiven Systemen gehören Nahtautomaten, Clips und kollagenbasierte

Verschlussstopfen bzw. -platten. Diese werden perkutan eingebracht, werden an der Gefäßwand befestigt und ziehen einen umgehenden aktiven Verschluss der Punktionsstelle nach sich (Patel et al., 2010; Lochow & Silber, 2004; Treitl et al., 2013; Dauerman, Applegate & Cohen, 2007; Caputo, 2012).

Des Weiteren sind Systeme verfügbar, die neben einem aktiven auch auf einen passiven Mechanismus zum Erreichen der Hämostase zurückgreifen (Caputo, 2012).

Die Datenlage zur Wirksamkeit und Sicherheit der Systeme ist aufgrund sich unterscheidender oder fehlender Studienergebnisse teilweise noch umstritten (Bangalore & Bhatt, 2011).

Einige Studien bescheinigen dabei den Verschlussystemen eine Wirksamkeit, die derjenigen der manuellen Kompression entspricht (Nikolsky et al., 2004; Applegate et al., 2006).

Andere wiederum zeigen eine Überlegenheit der Verschlussysteme gegenüber der manuellen Kompression auf (Tavris et al., 2004; Arora et al., 2007; Vaitkus, 2004; Chevalier et al., 2003).

Außerdem gibt es Studien, welche Bedenken bezüglich eines wachsenden Komplikationsrisikos bei der Verwendung von VCDs äußern.

Koreny et al. (2004) sprechen von einem nicht signifikant höheren Anteil an Hämatomen, AV-Fisteln, Blutungen und Pseudoaneurysmen bei VCDs gegenüber der manuellen Kompression. Des Weiteren geht aus der Studie hervor, dass jeder 43. Patient, an dem ein Closure device angewendet wird, danach eine chirurgische Behandlung benötigt.

Dennoch hat die Metanalyse von Koreny, zusammengefasst aus 30 randomisierten Studien, ergeben, dass die Zeit bis zur Hämostase mit einem VCD gegenüber MC im Mittel um 17 Min. verkürzt werden kann. Des Weiteren kann die Zeit der Bettruhe um 10.8 h verkürzt werden. Außerdem kann die Zeit bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus durch die Systeme um 0,6 Tage herabgesetzt werden (Koreny et al., 2004; Treitl et al., 2013).

Eine weitere Metaanalyse aus 30 Studien, von Nikolsky et al. (2004), in der ebenfalls mehrere VCDs mit der manuellen Kompression hinsichtlich der Komplikationsrate verglichen wurden, bescheinigt einigen VCDs ein äquivalentes

Risiko an vaskulären Komplikationen gegenüber der MC, wohingegen andere Systeme wiederum ein höheres Risiko an vaskulären Komplikation gegenüber der manuellen Kompression aufweisen. Nikolsky und Kollegen präferieren in der Gesamtanalyse die manuelle Kompression im Vergleich zu VCDs bezüglich des vaskulären Komplikationsrisikos (Nikolsky et al., 2004).

Wohingegen Vaitkus (2004) in einer Metanalyse, zusammengefasst aus 16 Studien, zum Schluss kommt, dass die Verwendung von VCDs im Vergleich zur manuellen Kompression das Risiko vaskulärer Komplikationen absenkt (Vaitkus, 2004).

Biancari et al. (2010) stellen in einer weiteren Metaanalyse, welche aus 31 Studien zusammengestellt wurde, fest, dass die Zeit der Blutstillung durch VCDs signifikant verkürzt wird. Dies trifft vor allem auf die Patientengruppe zu, die sich einer PCI unterzieht. Die Studie kommt aber auch zum Ergebnis, dass für bestimmte Komplikationen wie z. B. eine akute Ischämie und eine Infektion an der Punktionsstelle in der Leistengegend oder eine Komplikation mit der Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs ein erhöhtes Risiko bei der Verwendung von VCDs im Vergleich zur MC besteht (Biancari et al., 2010; Treitl et al., 2013; Patel et al., 2010).

Eine weitere Studie von Tavriss et al. (2012), in der über 1,8 Mio. PCIs analysiert wurden, zeigte bei vier der in der Studie untersuchten VCDs und Hämostasepatches eine signifikant niedrigere Blutungs- und vaskuläre Komplikationsrate gegenüber der manuellen Kompression (Tavriss et al., 2012).

Die Höhe der technischen Fehlerquote im Umgang mit VCDs ist abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und lässt sich mit einer höheren Anzahl an durchgeführten Eingriffen absenken (Balzer et al., 2001).

Somit lassen sich Effizienz und Wirksamkeit von VCDs verbessern.

2.3.1. Aktive Verschlussysteme

2.3.1.1. Angio-Seal® (Kollagenpfropf-basierter Verschluss)

Das Angio-Seal® (St. Jude Medical, St. Paul, USA) Verschlussystem ist den aktiven Verschlussystemen zuzuordnen. Angio-Seal® ist mit einem Marktanteil von über 50 % in den USA das am häufigsten angewendete Verschlussystem (Bangalore & Bhatt, 2011; Treitl et al., 2013).

Angio-Seal® ist auf dem Markt mit drei sich in ihrem Aufbau geringfügig voneinander unterscheidenden Varianten (Evolution®; VIP®; STS Plus®) vertreten.

Bevor es zur Anwendung von Angio-Seal® kommen kann, muss zunächst die für den vorhergegangenen Eingriff verwendete Zugangsschleuse entfernt werden und diese über einen Führungsdraht gegen eine spezielle Angio-Seal®schleuse getauscht werden (Schwartz et al., 2010).

Dann wird ein resorbierbarer, aus Polymilchsäurepolymeren und Polyglykolsäure bestehender Anker in die Arterie vorgeschoben und mittels eines ebenso resorbierbaren Fadens gegen die Punktionsläsion zurückgezogen. Dabei wird der Anker gegen einen am selben Faden hängenden, an der Gefäßaußenseite befindlichen Kollagenpfropf komprimiert. Dies führt dann zu einem mechanischen Verschluss der Punktionsstelle und bewirkt damit, unterstützt von der die Koagulation anregenden Eigenschaft des Kollagenschwamms, eine sofortige Hämostase (Erbel et al., 2012; Lapp & Krakau, 2013; Treitl et al., 2013; Grech, 2004; St. Jude Medical, 2007).

Angio-Seal® ist sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Eingriffe anwendbar und ist je nach verwendeter Zugangsschleuse in zwei Größen (6F und 8F) erhältlich (Rashid & Bailey, 2007). Für 4F-, 5F- oder 7F-Schleusen bedient man sich des jeweils nächstgrößeren erhältlichen Systems. In diesen Fällen ist dann allerdings auch eine Erweiterung der Punktionsstelle vonnöten (Lapp & Krakau, 2013; Treitl et al., 2013).

Alle Bestandteile des Verschlusssystems (Anker, Verbindungsfaden und Kollagenpfropf) sind innerhalb von 60-90 Tagen vollständig resorbierbar (Hamel, 2009). Metaanalysen kommen zum Schluss, dass Angio-Seal® im Vergleich zur manuellen Kompression das Risiko von großen vaskulären Komplikationen absenkt (Nikolsky et al., 2004; Vaitkus, 2004).

Angio-Seal® ist zudem einfach anzuwenden und hat eine hohe technische Erfolgsrate (über 95 %) (Schwartz et al., 2010; Turi, 2010).

2.3.1.2. Femoseal®

Das Femoseal® (St. Jude Medical Systems, Uppsala, Sweden) System besteht aus drei resorbierbaren Komponenten: Zum einen aus einer inneren und äußeren

Polymerplatte und zum anderen aus einem Faden, der beide Platten miteinander verbindet. Nach dem Entfernen der prozeduralen Schleuse wird das System über einen Führungsdraht in die Femoralarterie vorgeschoben. Dabei wird eine als Anker dienende Polymerscheibe an der Gefäßinnenwand platziert, während die über einen Faden in Verbindung stehende an der Gefäßaußenwand zum Liegen kommende Polymerscheibe als Sicherung dient. Dabei wird die Punktionsläsion im „Sandwichprinzip“ durch die beiden Platten komprimiert und dadurch verschlossen (Byrne et al., 2013).

Das System ist einsetzbar bis zu einer Schleusengröße von 7F. Es ist nur auf bestimmten Märkten verfügbar, nicht aber in den USA.

Eine 2014 veröffentlichte Studie mit 1509 Patienten an denen Femoseal® angewendet wurde kommt zum Schluss, dass bei der Verwendung von Femoseal® im Vergleich mit Exoseal® weniger vaskuläre Komplikationen auftraten. Zudem war bei Femoseal® sowohl die Zeit bis zur Hämostase (0,5 Min. vs. 2 Min.) kürzer, als auch die technische Fehlerrate niedriger (Schulz-Schüpke et al., 2014).

2.3.1.3. FastSeal® (Polymerpfropf-basierter Verschluss)

FastSeal® (Vascular Closure Systems, Inc; USA) ist ein neu entwickelter Verschlusspfropfen aus den USA. Dieser kann über einen bereits liegenden Schleusenzugang in das Gefäß vorgeschoben werden. Der nietenartige Pfropfen besteht aus einem bioresorbierbaren Polymer und keilt sich beim Ziehen der Schleuse in der Gefäßwand der Arterie ein. Dies führt zu einem unmittelbaren Verschluss der Punktionsstelle. Der Pfropfenanteil, welcher an der Innenwand des Gefäßes zum Liegen kommt ist dabei dünner als der Teil an der Außenseite des Gefäßes. Dies führt nach Firmenangaben dazu, dass der intraluminale Teil des Pfropfens nach 10 bis 14 Tagen und der restliche Teil des Pfropfens nach 21 Tagen resorbiert wird. An dem Verschlusspfropfen ist darüber hinaus ein resorbierbarer Sicherungsfaden angebracht.

Die ersten klinischen Tests wurden 2013 auf einem Kongress (Joint Interventional Meeting) in Rom präsentiert. Es handelte sich dabei um Phase 1 und Phase 2 Tests, bei denen das Verschlusssystem jeweils an 10 und 20 Personen getestet wurde. Dabei betrug die Zeit bis zum Erreichen der Hämostase durchschnittlich 43 und 73 s. Schmerzen bei den Patienten während und nach der Installation des Pfropfens traten dabei nicht auf und die technische Erfolgsquote lag bei 100 %.

2.3.1.4. Perclose Proglide® und Prostar XL® (Naht-basierter Verschluss)

Perclose Proglide® (Abbott Vascular, Illinois, USA) ist ein nahtbasiertes vaskuläres Verschlusssystem und ist das in den USA am zweithäufigsten eingesetzte System. Es sorgt für einen aktiven Verschluss der Punktionsstelle ohne die Verwendung von Dichtstoffmaterialien oder koagulierend wirkenden Substanzen (Turi, 2010).

Bei Anwendung des Perclose Proglide®systems ist zunächst die Entfernung der bereits liegenden Schleuse vonnöten. Nur ein Führungsdraht bleibt im Gefäß zurück. Über diesen Draht wird dann das Perclose Proglide®system in das Gefäßlumen vorgeschoben, solange bis aus dem an der Außenseite des Systems angebrachten Indikatorschlauch pulsierendes Blut austritt. Der Indikator stellt dabei für den Operateur eine Kontrolle über die richtige intraluminale Positionierung des Systems dar. Daraufhin werden intraluminal am System befindliche Seitenfüße entfaltet und diese durch das Zurückziehen des Systems an der Gefäßwand positioniert. Durch die Freigabe von zwei Nitinolnadeln wird dann die Gefäßwand von extra- nach intraluminal durchstoßen. Mithilfe der beiden schon intraluminal entfalteten Seitenarme kann die Punktionsstelle dann mit einem monofilen Polypropylen-Faden, der an den Nadeln befestigt ist, umstoßen werden. Die Fäden werden dann über das System an die Hautoberfläche gezogen und der schon vorbereitete Knoten wird mittels eines Knotenschiebers bis zur Punktionsstelle zurückgeschoben. Danach kann dann das Proglide®system entfernt werden und bei endgültigem Erreichen der Hämostase der Faden mittels eines Knotenmessers am Knoten abgesetzt werden (Bechara, Annambhotla & Lin, 2010; Schwartz et al., 2010; Treitl et al., 2013; Caputo, 2012; Erbel et al., 2012).

Die technische Erfolgsquote von Perclose-Systemen liegt laut Studien bei bis zu 94 % (Applegate et al., 2002; Schwartz et al., 2010; Thomas et al., 2013).

In einer anderen Studie wird das Perclose-System mit dem Angio-Seal®system verglichen. Dabei ist das Perclose Proglide®system, Angio-Seal® sowohl in der Zeit bis zur Hämostase, als auch bei der Zeit bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus, nicht aber bei den Majorkomplikationen unterlegen (Martin et al., 2008).

Nahtsysteme sind darüber hinaus in ihrer Handhabung komplizierter als andere Verschlusssysteme (Caputo, 2012; Hon et al., 2010).

In einer Studie von Gerckens et al. mit 600 Patienten wird die manuelle Kompression mit der Anwendung eines Perclose-Systems verglichen. Die Studie bescheinigt dem Perclose-System dabei eine schnellere Hämostasezeit, eine kürzere Zeit bis zur Entlassung und dieselbe oder eine niedrigere Komplikationsrate als bei der manuellen Kompression (Gerckens, Cattelaens & Müller, 1998).

Das Perclose Proglide®system kann nach diagnostischen und interventionellen Eingriffen mit 5F- bis 8F-Zugangsschleusen eingesetzt werden (Caputo, 2012).

Bei Schleusengrößen zwischen 8,5F und 10F kann auch das ProstarXL®system zum Verschluss der Punktionsstelle herangezogen werden. Das Prostar-System ist dabei grundsätzlich ähnlich wie das oben beschriebene Proglide-System aufgebaut. Es beinhaltet aber insgesamt vier Nitinolnadeln, welche die Punktionsstelle im Gegensatz zum Proglide-System mit zwei Einzelheften von intra- nach extraluminal umstechen (Hon et al., 2010; Haas, Krajcer & Diethrich, 1999; Bechara, Annambhotla & Lin, 2010).

Des Weiteren kann für große Punktionsläsionen bis 26F (z. B. bei Aortenklappenimplantationen) auch die sogenannte „Preclose“ Technik angewendet werden. Bei dieser werden mehrere Nähte über Perclose-Systeme schon vor dem Legen der eigentlichen Zugangsschleuse um die Punktionsstelle herum platziert. Nach Beendigung des dann folgenden interventionellen Eingriffs kann die Zugangsschleuse gezogen werden und die vorher schon angebrachten Nähte können verknotet werden. Dies führt dann in aller Regel zur Hämostase an der Punktionsläsion (Erbel et al., 2012; Hoffer & Bloch, 2003; Hon et al., 2010).

2.3.1.5. StarClose SE® (Clip-basierter Verschluss)

Starclose SE® (Abbott Vascular, Illinois, USA) ist ein clipbasiertes, aktives vaskuläres Verschlusssystem mit einem Marktanteil von 19,4 % in den USA im Jahr 2008 (Treitl et al., 2013; Patel et al., 2010).

Über das Starclose-System können durch ein Nitinol-Clip (4 mm Durchmesser) Punktionsläsionen von Schleusen (bis 6F) verschlossen werden (Bechara, Annambhotla & Lin, 2010).

Bei Anwendung von nicht mit StarClose SE® kompatiblen Schleusen müssen diese vor der Verwendung der Verschlussclips entfernt werden und die spezifische StarClose SE® Zugangsschleuse muss mittels eines Führungsdrahtes samt

Dilatator in das Gefäß vorgeschoben werden (Abbott-Vascular, 2012; Rosenko, 2012).

Danach werden der Führungsdraht und der Dilatator wieder aus der Schleuse entfernt und diese wird mit einem Clipapplikator bestückt. Der Applikator wird über Seitenarme der Schleuse an der Gefäßinnenwand in die richtige Position gebracht. Über den Applikator kann dann ein flexibler Nitinolclip an der Gefäßaußenwand circumferentiell um die Punktionsläsion herum platziert werden. Der Clip greift dabei die Ränder der Punktionsstelle und führt diese zusammen, wodurch es dann zum Verschluss der Punktionsläsion und zur Hämostase kommt. Es verbleibt dabei nur der Nitinolclip an der Tunica adventitia des Gefäßes, alle anderen Bestandteile des Systems werden nach Beendigung des Eingriffs entnommen (Caputo, 2012; Bechara, Annambhotla & Lin, 2010; Hamel, 2009).

Im Gegensatz zu Systemen, die auf Kollagen basieren, handelt es sich bei Nitinol, welches in StarClose SE® verwendet wird, um ein metallisches Material, das häufig z. B. bei intraarteriellen Stents zur Anwendung kommt. Dadurch ist ein geringeres Maß an entzündlichen Weichteilreaktionen zu erwarten (Hon et al., 2010; Bechara, Annambhotla & Lin, 2010; Hoffer & Bloch, 2003; Imam et al., 2007).

Die technische Erfolgsquote liegt bei Starclose-Systemen zwischen 87 % und 97 % (Hermiller et al., 2006; Deuling et al., 2008; Chiu et al., 2010; Williams et al., 2007; Gray et al., 2009; Schwartz et al., 2010).

Der Median für die Länge des Aufenthalts der Patienten bei ambulant vorgenommenen Eingriffen beträgt 157 Min. (Gray et al., 2009).

Die Rate der erfolgreich erreichten Hämostasen ist bei Starclose-Systemen (94 %) niedriger als bei Angio-Seal (99 %). Dies ist vor allem auf die relativ häufig (in 38 % der Fälle) auftretenden Sickerblutungen zurückzuführen (Deuling et al., 2008).

Daher sollten Starclose-Systeme eher für diagnostische, als für interventionelle Eingriffe mit voll antikoagulierten Patienten eingesetzt werden.

2.3.2. Passive Verschlusssysteme

2.3.2.1. ExoSeal®

ExoSeal® (Cordis Corporation, Miami Lakes, USA) ist ein passives Verschlusssystem, das einen resorbierbaren Pfropf aus Polyglykolsäure im unmittelbar an das Gefäß anliegenden adventitiellen Gewebe verankert. Der Pfropf verschließt dadurch vollständig den Punktionskanal, kommt dabei aber nicht mit der Gefäßwand in Berührung (Boschewitz et al., 2013; Schwartz et al., 2010; Treitl et al., 2013; Turi, 2010).

Die richtige Positionierung des Pfropfens wird dabei durch zwei am ExoSeal-System angebrachte Indikatorsysteme gewährleistet. Das Blutrückstrom Indikatorsystem kann dabei zwischen intraarterieller Lage des Systems (Rückblutung aus Indikatorschlauch) oder extraarterieller Lage (keine Blutung aus Indikatorschlauch) unterscheiden. Das zweite System besteht aus zwei Komponenten. Einem Nitinoldraht, der eine intraluminale Schleife mit einem Durchmesser von 4 mm formt. Und aus einem Indikatordisplay, welches am Griff des ExoSeal-Systems angebracht ist. Die Drahtschleife bewirkt in der richtigen Position bei Kontakt mit der Gefäßinnenseite ein entsprechendes optisches Signal auf dem Indikatordisplay (Boschewitz et al., 2013).

Durch Hydrolyse ist der Pfropfen nach 60 bis 90 Tagen vollständig resorbiert. ExoSeal® ist für Schleusengrößen von 5 bis 7F erhältlich und kann über die bereits liegende Schleuse eingeführt werden. Das System kann dabei sowohl für diagnostische als auch für interventionelle Eingriffe eingesetzt werden (Caputo, 2012).

Eine randomisierte Studie mit 401 Patienten, in der ExoSeal® mit der manuellen Kompression verglichen wird, zeigt, dass Exoseal® hinsichtlich der Zeit bis zum Erreichen der Hämostase (4,4 Min. vs. 20,1 Min.) der MC überlegen ist. Ebenso verhält es sich bei der Zeit bis zur Entlassung (2,5 h vs. 6,2 h). Außerdem wurden innerhalb des untersuchten Personenkreises keine Majorkomplikationen festgestellt (Wong et al., 2009).

Eine andere Studie mit 682 Patienten berichtet von einem erfolgreichen Erreichen der Hämostase in 95,5 % der Fälle, bei einer Minorkomplikationsrate von 1,17 % und wiederum von einer Majorkomplikationsrate von 0 % (Boschewitz et al., 2013; Sheth et al., 2014).

2.3.2.2. Mynx®

Das Mynx® System (AccessClosure; Santa Clara, USA) ist den passiven Verschlussystemen zuzuschreiben. Das seit zwei Jahren auch in Deutschland erhältliche Verschlussystem ist über die bereits liegende prozedurale Schleuse anwendbar und platziert einen Pfropfen aus wasserlöslichem Polyethylenglykol im Stichkanal. Nach der Platzierung des Materials nimmt dieses umgehend das aus der Arterie austretende Blut auf. Dadurch kommt es zur Expansion des Materials und zu einer mechanischen Abdichtung des Stichkanals. Des Weiteren dient das Material als Gerüst für die Anlagerung von Thrombozyten und führt damit zu einer Gerinnselbildung im Stichkanal. Während der Platzierung und Expansion des Materials wird die Punktionsstelle von einem intraarteriell liegenden, ebenfalls über die Schleuse vorgebrachten Ballon verschlossen. Dies verhindert das Eindringen von Dichtstoffmaterial in das arterielle System. 30 Tage nach Positionierung des Materials im Stichkanal ist es vollständig resorbiert (Turi, 2010; Treitl et al., 2013; Sheth et al., 2014).

Die derzeit verfügbaren Systeme aus der Mynxproduktfamilie, MynxGrip® und Mynx Ace® sind für 5-7F Schleusen verfügbar.

Eine Studie mit 190 Patienten kam zum Ergebnis, dass die mittlere Zeit bis zur Hämostase 1,3 Min. und die mittlere Zeit bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus 2,6 h beträgt (Scheinert et al., 2007).

Eine kleinere Studie mit 27 Patienten berichtet, dass in fünf von 27 Fällen (18 %) Dichtstoffmaterial in der Arterie aufzufinden war und bei drei von den 27 (11 %) Patienten ein Pseudoaneurysma aufgetreten ist (Fields et al., 2010).

Eine weitere Studie mit 238 Patienten bescheinigt eine Majorkomplikationsrate von 2,1 % (Azmoon et al., 2010).

2.3.2.3. FISH®

FISH® (Morris Innovative, Bloomington; USA) ist ein passives vaskuläres Verschlussystem, das nach diagnostischen Eingriffen mit Zugangsschleusen zwischen 5F und 8F angewendet werden kann. Zum Verschluss des Punktionskanals wird ein resorbierbarer Pfropf aus extrazellulärer Matrix verwendet. Das Pfropfenmaterial wird dabei aus der intestinalen Submukosa von Schweinen hergestellt. Der Pfropf wird beim Zurückziehen des Systems aus der Arterie im Punktionskanal freigegeben und durch eine Kompressionsnaht richtig

positioniert. Dies führt dann letztlich zum Verschluss der Punktionsstelle (Caputo, 2012; Treitl et al., 2013; Turi, 2010).

Das FISH-System ist als Kombination aus Zugangsschleuse und Verschlussystem erhältlich, kann aber auch erst nach dem Eingriff als reines Verschlussystem angewendet werden.

In einer randomisierten Studie mit 297 Patienten, in der 191-mal das FISH-System zum Einsatz kam, beträgt die technische Erfolgsquote 98 %. In den 191 Patienten sind 27 nicht enthalten, bei denen zu einem frühen Zeitpunkt, wegen zu erwartender suboptimaler Hämostase, ein Wechsel auf manuelle Kompression vorgenommen wurde. Die mittlere Zeit bis zu Entlassung aus dem Krankenhaus belief sich auf 2,4 h (Bavry et al., 2008; Schwartz et al., 2010).

Derzeit existieren noch keine Vergleichsstudien zu anderen Systemen.

2.3.2.4. Catalyst®

Die Catalyst II® und III® Systeme (Cardiva Medical, Inc, USA) sind den passiven Verschlussystemen zuzuschreiben. Sie sind durch die bereits liegende 5-7F Schleuse bei diagnostischen und interventionellen Eingriffen anwendbar und können als unterstützende Maßnahme zur manuellen Kompression angesehen werden (Caputo, 2012).

Die Catalyst-Systeme verwenden eine Nitinolscheibe, welche über einen Einführungsdraht durch die prozedurale Schleuse eingeführt und entfaltet wird. Durch die Nitinolscheibe wird dann von intraluminal, durch Zug von extraluminal, der Punktionsdefekt in der Gefäßwand zeitweise mechanisch okkludiert. Währenddessen beginnt die Hämostase einzusetzen. Der Zug auf die Nitinolscheibe wird weiter aufrechterhalten und die Schleuse wird vollständig über den Einführungsdraht aus dem Stichkanal zurückgezogen. Dadurch kann dann der Einführungsdraht, dessen Oberfläche mit koagulationsfördernden Substanzen beschichtet ist, die Hämostase erleichtern bzw. beschleunigen (Turi, 2010; Treitl et al., 2013).

Nach einer Wartezeit von 15 Min. bei diagnostischen Eingriffen und 120 Min. bei interventionellen Eingriffen wird der Zug auf den Nitinolclip beendet. Dadurch kollabiert dieser und kann dann durch ein nur noch 18 G großes Punktionsloch, mithilfe des Einführungsdrahtes herausgezogen werden. Danach wird bis zur

vollständigen Hämostase auf manuelle Kompression zurückgegriffen. Es bleiben nach Ende des Eingriffs keine Fremdmaterialien im Körper des Patienten zurück (Kiesz et al., 2011; Doyle et al., 2007).

Der Unterschied zwischen den Systemen Catalyst II® und III® besteht rein in deren Beschichtung. Zusätzlich zu den von Cardiva entwickelten koagulationsfördernden Substanzen, Kaolin und Chitosan, welche die Gerinnungskaskade aktivieren und eine Plättchenaggregation bewirken sollen, ist das Catalyst III® System noch mit einem Protaminsulfat beschichtet. Dies bewirkt eine lokale Neutralisierung von Heparin und ist somit vor allem bei antikoagulierten Patienten von Interesse.

In einer 2011 veröffentlichten Studie mit 351 Patienten, an denen insgesamt 400 perkutane Eingriffe (100 interventionelle und 200 diagnostische Eingriffe) vorgenommen worden sind, lag die technische Erfolgsquote bei 99,3 %. Die Majorkomplikationsrate belief sich bei dieser Studie auf 0,25 % und die Minorkomplikationsrate auf 1,75 %. Die mittlere Zeit bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus betrug nach diagnostischen Eingriffen 145 Min. und bei interventionellen Prozeduren 295,1 Min (Kiesz et al., 2011).

2.3.3. Neu entwickelte Verschlussmechanismen

2.3.3.1. Axera®

Axera® (Arstasis Inc, Fremont, USA) ist ein Verschlussystem, das nicht wie herkömmliche Systeme auf Dichtstoffe, koagulationsfördernde Substanzen, Clips, Verschlussstopfen oder Nähte zurückgreift um eine Hämostase zu erreichen. Der Mechanismus von Axera® basiert vielmehr darauf, dass der arterielle Zugang in einem deutlich flacheren Winkel (5°) als bei der gewöhnlich angewendeten Seldingerpunktionstechnik (45°) gelegt wird. Dadurch kommt es später beim Ziehen der Zugangsschleuse zu einer Überlappung der Wandschichten der Arterie, was unterstützt durch manuelle Kompression und den von der intraluminalen Seite ausgehenden hydrostatischen Druck zu einem Verschluss des Punktionsdefekts führt. Nach Beendigung des Eingriffs bleibt dabei kein Fremdmaterial im Körper des Patienten zurück (Sheth et al., 2014; Turi et al., 2013; Treitl et al., 2013; Caputo, 2012).

Derzeit ist das Axera-System nur in in 5- und 6F Zugangsgröße erhältlich.

In einer Studie aus dem Jahr 2013 wurde bei 346 Patienten, während einer

diagnostischen Katheterisierung, das Axera-System angewendet. Dabei lag die technische Erfolgsquote bei 97 %. Die mittlere Zeit bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus betrug dabei 1,5 h und die Zeit bis zur vollständigen Hämostase belief sich im Mittel auf 4 Min. Es kam dabei zu keinen Majorkomplikationen und in 1,2 % der Fälle zu Minorkomplikationen, die sich aber weitestgehend im subklinischen Bereich bewegten (Turi et al., 2013).

3. Hämostaseologie

3.1. Physiologie der Hämostase

Kommt es zu einer Verletzung eines Blutgefäßes, führt dies zum Austritt und dem Verlust von Blut aus dem Gefäßsystem. Der Organismus, mit dem Ziel der Hämostase (Blutstillung), stellt den Verletzungen eine Reihe komplex ablaufender Mechanismen entgegen. Im physiologischen Zustand herrscht ein hämostatisches Gleichgewicht zwischen Pro- und Antikoagulantien, was einerseits für einen ausreichenden Blutfluss sorgt, jedoch andererseits bei kleineren Gefäßwandverletzungen durch sofortige Abdichtung der Gefäßläsion eine Begrenzung der Blutverluste gewährleistet. Die Blutstillung kann generell in eine initiale Phase (primäre Hämostase) und eine Phase der Gerinnung (sekundäre Hämostase) untergliedert werden (Golenhofen, 2006; Pries, Wenger & Zakrzewicz, 2013; Kaspers & Göbel, 2005).

3.1.1. Primäre Hämostase (zelluläre Gerinnung)

Die Verletzung eines Gefäßes führt zu einer schnellen Vasokonstriktion und einer damit verbundenen Reduktion des Blutflusses (Kaspers & Göbel, 2005; Dickerhof et al., 2013). Auslöser dieses Mechanismus sind neben nervalen Reflexen auch lokale Ereignisse wie myogene Spasmen und humorale Faktoren (z. B. Thromboxan A₂) (Kaspers & Göbel, 2005).

Im Verletzungsbereich der Gefäßwand kommt es an den freiliegenden Kollagenfasern des Bindegewebes zu einer durch den von-Willebrand-Faktor vermittelten Adhäsion von Thrombozyten. Beim vWF handelt es sich um ein Glykoprotein, das sowohl in den Endothelzellen als auch in den Megakaryozyten gebildet wird. Der vWF kommt sowohl als Träger des Gerinnungsfaktors VIII in geringen Mengen im Blutplasma als auch, abgegeben von den Endothelzellen, in

der subendothelialen Matrix vor. Die Bindung des vWF an durch eine Verletzung freigelegtes Kollagen zieht eine Änderung seiner Konformation nach sich. Diese Konformationsänderung wiederum macht eine Bindung an die GP-Ib/IX-Rezeptoren der Thrombozyten möglich (Walzog & Fandrey, 2014; Jelkmann, 2010; Kaspers & Göbel, 2005).

Durch die Thrombozytenadhäsion kommt es zu einer Aktivierung der Blutplättchen. Im Rahmen der Aktivierung kommt es zu einer Sekretion verschiedener Stoffe aus den Granula der Thrombozyten. Dabei sorgen u. a. Thromboxan-A₂, Adrenalin und Serotonin für eine Vermittlung einer Vasokonstriktion, ADP, Thrombospondin und Fibronektin für eine Förderung der Thrombozytenadhäsion, sowie PAF (platelet activating factor) für eine Aktivierung weiterer Thrombozyten (Silbernagl & Despopoulos, 2012; Golenhofen, 2006).

Neben der Sekretion kommt es aber auch zu einer Formänderung der Thrombozyten. Diese sind dann nicht mehr scheibchenförmig, sondern mit Pseudopodien ausgestattet und haben eine rundliche Form. Durch die Pseudopodien ist eine bessere Verzahnung der Thrombozyten untereinander möglich. Des Weiteren kommt es auf der Membran der Thrombozyten zur Ausbildung eines Rezeptorkomplexes (GPIIb/IIIa-Komplex), an den wiederum Thrombospondin und Fibrinogen aus den Granula der Thrombozyten, aber auch Plasmafibrinogen bindet. Auf diese Weise kommt es innerhalb von wenigen Minuten zur Ausbildung eines Thrombozytenaggregats (weißer Thrombus), welches für eine erste Abdichtung der Gefäßverletzung sorgt (Walzog & Fandrey, 2014).

Darüber hinaus werden zur Sicherung dieses ersten Primärverschlusses von den aktivierten Thrombozyten Stoffe sezerniert, die entweder die Fibrinolyse (Plasminogenaktivatorinhibitoren, PAI) oder Antithrombin (Plättchenfaktor 4) inhibieren (Silbernagl & Despopoulos, 2012).

3.1.2. Sekundäre Hämostase (plasmatische Gerinnung)

Durch die sekundäre Hämostase wird der initial während der zellulären Gerinnung gebildete Thrombozytenpfropf (weißer Thrombus) durch einen das Gefäß endgültig verschließenden, Leukozyten und Erythrozyten enthaltenden, roten Abscheidungsthrombus ersetzt (Jelkmann, 2010).

In der zentralen, durch Thrombin katalysierten Reaktion der Gerinnungskaskade wird im Plasma enthaltenes Fibrinogen in Fibrin umgewandelt und so eine

Vernetzung und Stabilisierung des Thrombus erreicht. Die Gerinnungskaskade stellt ein Multienzymsystem dar, bei dem verschiedene enzymatische Reaktionen nacheinander ablaufen und es dabei zu einem gegenseitigen Aktivieren der Gerinnungsfaktoren durch eine limitierte Proteolyse (das Abspalten von Peptiden) kommt. Die Gerinnungsfaktoren werden bis auf Ca^{2+} in der Leber synthetisiert und liegen dann in einer inaktiven Form als Proenzym im Plasma vor. Aktivierte Gerinnungsfaktoren werden in der Nomenklatur durch ein „a“ hinter der römischen Zahl kenntlich gemacht. Zudem ist die Synthese einiger Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X) abhängig von Vitamin K. Die Gerinnung kann entweder durch den sogenannten Gewebefaktor (Tissue factor; TF; Gewebethromboplastin) über den extrinsischen Weg oder durch den Kontakt mit Fremdoberflächen über den intrinsischen Weg in Gang gesetzt werden (Linke, 2015; Silbernagl & Despopoulos, 2012; Jelkmann, 2010; Huppelsberg & Walter, 2013; Madlener & Pötzsch, 2013).

3.1.2.1. Extrinsisches System (tissue-factor-pathway)

Eine Läsion des Endothels/Gewebes bedingt eine Freisetzung von Gewebethromboplastin (tissue factor, TF) aus Endothelzellen, Thrombozyten und Monozyten. Dies führt zu einer anschließenden Komplexbildung zwischen dem einzigen bereits in geringen Mengen im Plasma aktiviert vorliegenden Gerinnungsfaktor (VIIa), dem TF, sowie Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden. Dies bewirkt wiederum beim Gerinnungsfaktor VIIa eine Steigerung seiner proteolytischen Aktivität und bedingt letztlich die Aktivierung von FVII und FIX und FX (Linke, 2015; Walzog & Fandrey, 2014; Kaspers & Göbel, 2005). Dieser extrinsische Pfad wird bereits nach kurzer Zeit durch den tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gehemmt (Walzog & Fandrey, 2014).

3.1.2.2. Intrinsisches System

Der intrinsische Gerinnungsweg wird durch den Kontakt zwischen Faktor XII und negativ geladenen Oberflächen wie Kollagen oder Fremdoberflächen (z. B. Gefäßprothesen) initiiert. Dabei kommt es unter der Beteiligung von hochmolekularem Kininogen (HMWK), Präkallikrein und Kallikrein zur Aktivierung von Faktor XII. Darauf folgend wird FXI aktiviert, der dann wiederum zu einer Stimulation von FIX führt. Zwischen aktiviertem Faktor IX (IXa), Faktor VIIIa, dem Plättchenfaktor 3 (Phospholipide der inneren Thrombozytenmembran)

sowie Calciumionen kommt es zu einer Komplexbildung. Der gebildete Komplex wird auch als endogene Tenase bezeichnet und aktiviert wiederum Faktor X (Pries, Wenger & Zakrzewicz, 2013; Walzog & Fandrey, 2014; Silbernagl & Despopoulos, 2012).

3.1.2.3. Gemeinsames System

Das extrinsische und das intrinsische System enden in einer gemeinsamen Schlussstrecke, bei der es zunächst zur Komplexbildung von Faktor Xa, Faktor Va, Ca^{2+} und Phospholipiden kommt. Dieser Komplex, der als Prothrombinaktivator oder auch als Thromboplastin bezeichnet wird, bewirkt eine Umwandlung des inaktiven Plasmaproteins Prothrombin in enzymatisch aktives Thrombin, welches wiederum für eine Abspaltung von Fibrinopeptiden des Fibrinogens sorgt. Die so entstandenen Fibrinmonomere lagern sich dann zu Fibrinpolymeren zusammen. Das zunächst nur instabil zusammengelagerte Fibringerinnsel wird erst durch die Aktivität des Faktor XIIIa, der ebenfalls durch Thrombin aktiviert wird, stabilisiert. Außerdem aktiviert Thrombin die Faktoren XI, IX, V, VIII und sorgt über einen positiven Rückkopplungseffekt für die Förderung seiner eigenen fortschreitenden Bildung. Zudem fördert Thrombin die Aktivierung der kontraktilen Aktin- und Myosinfilamenten des Zytoskeletts der im Thrombus enthaltenen Thrombozyten. Durch die Retraktion (Schrumpfung) des Thrombus und den damit verbundenen Zug auf die Fibrinfäden wird eine weitere Stabilisierung erreicht (Walzog & Fandrey, 2014; Jelkmann, 2010; Linke, 2015; Golenhofen, 2006; Pries, Wenger & Zakrzewicz, 2013).

3.1.3. Fibrinolyse und Hemmung der Gerinnung

Um eine überschießende Koagulation des Blutes zu verhindern, stehen dem Organismus eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung.

Zunächst wäre hier das im Blutplasma vorzufindende Antithrombin zu nennen. Es handelt sich bei diesem in der Leber produzierten Glykoprotein um den wichtigsten physiologischen in Erscheinung tretenden Hemmer der Blutgerinnung. Antithrombin hemmt neben Thrombin auch die Faktoren Xa, XIa, IXa und XIIIa und verhindert so eine Ausbreitung der Blutgerinnung. Heparin stellt einen Antithrombin-Cofaktor dar und kann eine Affinitätssteigerung des Antithrombins zu Thrombin um das Tausendfache bewirken, wodurch wiederum eine deutlich beschleunigt ablaufende Gerinnungshemmung erreicht wird. Ein weiterer

Hemmfaktor ist das Protein C, welches durch Thrombin aktiviert wird und Faktor Va und VIIIa hemmt. Außerdem sind noch das Protein S, alpha2-Makroglobulin (Hemmung von Thrombin, Kallikrein und Plasmin), alpha1-Antitrypsin (Hemmung von Thrombin und Plasmin), sowie der C1-Inaktivator (Hemmung der Faktoren XIa und XIIa) als Hemmfaktoren der Gerinnung zu erwähnen (Pries, Wenger & Zakrzewicz, 2013; Silbernagl & Despopoulos, 2012; Walzog & Fandrey, 2014; Jelkmann, 2010).

Der Limitation und der Auflösung von Gerinnselbildungen dient die sogenannte Fibrinolyse, die sich in einem intakten Gefäßsystem mit der Fibrinbildung die Waage hält. Bei der Bildung von Thromben wird immer auch eine größere Menge Plasminogen in dem Blutgerinnsel gebunden. Plasminogen wird dann während der Fibrinolyse durch den von Endothelzellen freigesetzten Gewebe-Plasminogenaktivator (tissue plasminogen activator, tPA), sowie durch weitere Gewebeaktivatoren zu Plasmin aktiviert. Des Weiteren kann Plasminogen aber auch endogen durch den Hageman-Faktor (Faktor XIIa) in seine aktive Form (Plasmin) überführt werden, da der Faktor XIIa Präkallikrein zu Kallikrein umsetzt, welches dann wiederum Plasminogen zu Plasmin aktiviert. Die Serinprotease Plasmin sorgt durch Abspaltungen von Fibrinolyseprodukten (FDP, fibrin degradation products) für einen Abbau der Fibrinpolymere und somit letztlich für die Auflösung des Netzwerks aus Fibrin. Darüber hinaus spaltet Plasmin neben Fibrin auch die Faktoren V und VIII, IX, XI, XII, sowie Fibrinogen und Prothrombin (Jelkmann, 2010; Walzog & Fandrey, 2014; Kaspers & Göbel, 2005; Pries, Wenger & Zakrzewicz, 2013; Hick & Hick, 2013).

4. Gewebe-Material-Interaktionen (Fremdkörperreaktion)

Die Biokompatibilität kann weiter in eine Hämo- und Zytokompatibilität untergliedert werden und wird definiert als die Fähigkeit eines Materials, in einer spezifischen Anwendung eine zumutbare Wirtsantwort hervorzurufen. Bei einem Biomaterial handelt es sich definitionsgemäß um ein nicht lebensfähiges Material, das in einem medizinischen Device mit der Absicht verwendet wird, mit biologischen Systemen zu interagieren (Ratner et al., 2004; Williams, 1999; Wintermantel et al., 2009).

Die Implantation von Biomaterialien ruft im Wirtsorganismus stets eine Reihe von Reaktionen hervor (siehe Abbildung 1). Neben der operativ hervorgerufenen Verletzung kommt es zu Blut-Material-Interaktionen, zur Bildung einer provisorischen Matrix, akuten und chronischen Entzündungen, Granulationsgewebsbildung, Fremdkörperreaktionen und Fibrose/fibrösen Einkapselungen (Anderson, 2001; Anderson, Rodriguez & Chang, 2008).

Die Implantationsprozedur führt dabei zu lokalen und/oder systemischen Reaktionen des Wirtsorganismus, sowie zur Aktivierung von Mechanismen zur Beeinflussung der Homöostase (Gleichgewicht/Selbstregulation der physiologischen Körperfunktionen). Der Grad der durch das Material und die Implantation hervorgerufenen Verletzung homöostatischer Mechanismen wiederum ist ein Maß für dessen Biokompatibilität. Trotz der häufig aus praktischen Gründen vorgenommenen Unterscheidung zwischen Blut-Material- und Gewebe-Material-Interaktion muss jedoch die Tatsache beachtet werden, dass einige Mechanismen und Komponenten sowohl im Blut als auch im Gewebe vorkommen und in einem physiologischen Zusammenhang stehen (Anderson, 2013).

Bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Implantation beginnt die Interaktion zwischen dem Fremdmaterial und dem Blut mit der Adsorption von Proteinen auf dessen Oberfläche und der Ausbildung einer auf der Basis von Blut bestehenden, das Material umgebenden, provisorischen Matrix (Anderson, Rodriguez & Chang, 2008).

Das durch die Implantation verletzte vaskularisierte Bindegewebe startet nicht nur die Immunantwort, es führt auch zur Thrombusformation und damit u. a. zur Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungssystems, des

Komplementsystems und des fibrinolytischen Systems. Diese Proteinkaskaden können wiederum eng in das dynamische Phänomen der Proteinadsorption und Desorption, des bekannten Vromann-Effektes, eingebunden sein. Bei der provisorischen Matrix handelt es sich um das initiale Thrombozytenaggregat, welches konsekutiv mit polymerem Fibrin zum weißen Thrombus stabilisiert wird und damit die Grenzfläche zwischen Gewebe und dem Fremdmaterial darstellt (Anderson, Rodriguez & Chang, 2008).

Die gebildete provisorische Matrix dient mit den in ihr enthaltenen oder aus ihr freigesetzten Bestandteilen z. B. der Rekrutierung von Entzündungszellen und Fibroblasten und initiiert damit Ab-, Auf- und Umbauprozesse. Die provisorische Matrix stellt dabei sowohl strukturelle als auch biochemische Stoffe zur Verfügung und kann durch die Freisetzung von z. B. Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren als natürliches, bioresorbierbares Unterstützungssystem für den Wundheilungsprozess angesehen werden (Anderson, 2013).

Bei der nur relativ kurz (Minuten bis Tage) andauernden akuten Entzündungsphase, die abhängig vom Ausmaß der Verletzung ist, kommt es zur Exsudation von Flüssigkeit und Plasmaproteinen (Ödembildung) und zur Emigration von Leukozyten. Bei den Leukozyten handelt es sich dabei vornehmlich um neutrophile Granulozyten, die gemeinsam mit anderen beweglichen weißen Blutzellen aus dem Gefäßsystem zur Implantationsstelle auswandern. In Teilen unterliegen diese Vorgänge auch chemotaktischer Kontrolle (unidirektionale Migration entlang eines chemischen Gradienten) (Anderson, 2001).

Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten in der akuten inflammatorischen Phase ist das „Aufräumen“ der Implantationsstelle, also die Phagozytose von Mikroorganismen, Fremdmaterial, Zell-/Gewebe-Debris und von toten Zellen. Es kommt jedoch meist bedingt durch die Größe der Biomaterialien nicht zu einer kompletten Phagozytose. Dies kann wiederum zu einer sogenannten „frustrated phagocytosis“ führen. Dabei kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von leukozytären Enzymen, mit denen versucht wird, das Fremdmaterial abzubauen (Anderson, 2001; Henson, 1971; Henson, 1980; Srinivasan & Babensee, 2014; Anderson, 2013).

Des Weiteren werden von den Granulozyten auch Cyto- und Chemokine freigesetzt, welche die Intensität der akuten Entzündung, sowie die Rekrutierung

von Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen weiter differenzieren, kontrollieren (Srinivasan & Babensee, 2014).

Aus histologischer Sicht stellt sich die chronische Entzündung weniger einheitlich als die akute Entzündung dar und ist vor allem charakterisiert durch die Anwesenheit von Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten. Außerdem kommt es an der Verletzungsstelle zu Gefäß- und Bindegewebsproliferationen, welche einer Rekonstruktion dienen (Anderson, 2013; Morais, Papadimitrakopoulos & Burgess, 2010; Anderson, 2001; Johnston, 1988; Williams & Williams, 1983).

Andauernde inflammatorische Stimuli wie Biomaterialien sind in der Lage eine chronische Entzündung auszulösen (Morais, Papadimitrakopoulos & Burgess, 2010; Kumar, Abbas & Fausto, 2005).

Dabei können sowohl die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Materials, als auch eine Bewegung des Materials im verletzten Gewebe, aber auch Infektionen zu einer chronischen Entzündung führen. Makrophagen sind die wahrscheinlich wichtigsten Zellen der chronischen Entzündung, da sie eine Vielzahl an biologisch wirksamen Stoffen produzieren und sezernieren. Dabei handelt es sich u. a. um Proteasen, Koagulationsfaktoren, Chemokine, Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie z. B. FGF (fibroblast growth factor) oder TNF- α (tumor necrosis factor). Durch die Wachstumsfaktoren kann eine Stimulation der Bildung von Blutgefäßen und Fibroblasten, sowie eine Regeneration des Epithels und weiterer Zellen erfolgen. Makrophagen initiieren die Zell-Migration, die Differenzierung und die Gewebe-Remodellierung. Innerhalb des ersten Tages nach der Einführung eines Fremdmaterials in einen Organismus wird der Heilungsprozess, initiiert durch Monozyten und Makrophagen, in Gang gesetzt. Dabei kommt es zu einer Proliferation von Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen an der Verletzungsstelle und somit zu einem Beginn der Granulationsgewebsbildung. Abhängig vom Verletzungsgrad kann bereits 3-5 Tage nach Materialeinführung eine Granulationsgewebsbildung beobachtet werden. Granulationsgewebe gilt dabei als Kennzeichen der Wundheilung. Histologisch ist dabei eine Proliferation von kleinen, neuen Kapillaren und von Fibroblasten zu erkennen (Neovaskularisation). Bei der Proliferation der Fibroblasten kommt es zur Bildung eines Anfangs von Proteoglykanen, später dann von Kollagen III dominiertem Granulationsgewebe. Außerdem sorgen Aktin und Myosinfilamente enthaltende Myofibroblasten für die bei der Granulationsgewebsbildung zu beobachtende

Wundkontraktion. Des Weiteren ist mit einer Anwesenheit von Makrophagen in einem Granulationsgewebe zu rechnen. Es gilt jedoch zu beachten, dass sich ein Granulationsgewebe deutlich von einem Granulom unterscheidet. Ein Granulom stellt eine Ansammlung von modifizierten Makrophagen (z. B. Epitheloidzellen) dar. Zudem können nicht phagozytierbare Partikel innerhalb eines Granuloms von sogenannten Fremdkörperriesenzellen umgeben werden. Die mehrkernigen Zellen entstehen durch Monozyten- und Makrophagen-Fusion. Die Fremdkörperreaktion gegenüber Biomaterialien ist aus Fremdkörperriesenzellen und den Bestandteilen des Granulationsgewebes (Makrophagen, Fibroblasten, Neovaskularisation) zusammengesetzt und wird dabei sehr stark durch die Größe, Form und Lage der Oberfläche des Implantats beeinflusst. Dabei kommt es z. B. bei Textilimplantaten zu größeren Anteilen an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen an der Implantationsstelle, als dies bei Biomaterialien mit einer glatteren Oberfläche der Fall ist. Bei diesen ist dann eher eine größere Fibrosekomponente zu erwarten (Anderson, 2001; Anderson, 2013).

Dies verdeutlicht, dass der Grad und das Ausmaß einer Fremdkörperreaktion von der Materialzusammensetzung, der Dauer des Kontakts, der Degradationsrate, der Morphologie, der Porigkeit, der Rauigkeit, der Form, der Größe, der Sterilität und der Oberflächenchemie des Devices abhängt (Arshady, 2003; Ratner, 2004; Morais, Papadimitrakopoulos & Burgess, 2010; Schoen, 2004).

Trotz der Tatsache, dass Fremdkörperriesenzellen teilweise ein Leben lang in der Implantationsstelle persistieren, ist nur wenig über deren Aktivität bekannt (Anderson, 2013).

Üblicherweise stellt die Fibrose/fibröse Einkapselung, deren Vorstufe das Granulationsgewebe ist, die Endstufe des Heilungsprozesses nach der Implantation eines Biomaterials dar (Anderson, 2001; Anderson, 2013; Anderson, Rodriguez & Chang, 2008).

Die fibröse Wand sorgt für eine Abschottung des Implantats und verhindert somit folglich dessen Interaktion mit dem umgebenden Gewebe (Morais, Papadimitrakopoulos & Burgess, 2010).

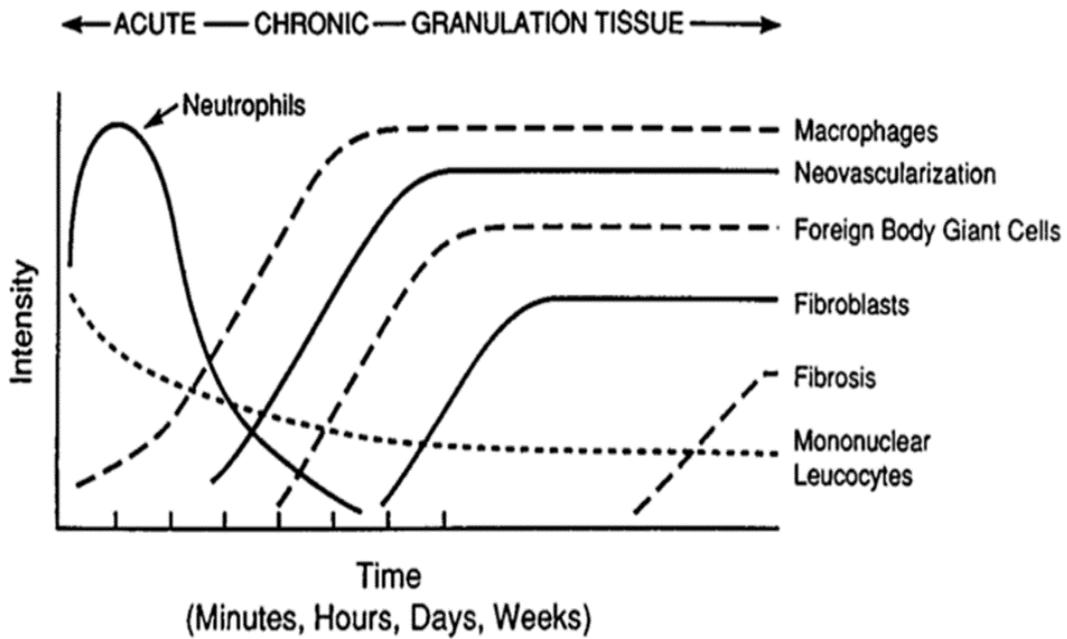


Abbildung 1: Phasen der Wirtsreaktion bei Fremdkörperkontakt und die dabei beteiligten Zellen nach Implantation eines Biomaterials; (aus Anderson, Rodriguez & Chang (2008)).

5. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen dem Universitätsklinikum Tübingen (UKT) und dem Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) in Denkendorf ein Verschlussystem zum sofortigen Verschließen der Punktionsstelle nach dem Ziehen der arteriellen Zugangsschleuse bei perkutanen, angiologischen und transluminalen Eingriffen zu entwickeln und eine optimierte Version *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren.

Dazu wurde von den Kooperationspartnern ein neuartiges Verschlussystem (Closure Device) aus einem resorbierbaren Spezialpolymer entwickelt, das über die bereits liegende Schleuse in der Gefäßwand verankert werden kann. Der Verschlussstopfen wird zunächst über die Zugangsschleuse in das Gefäßlumen vorgeschoben und beim Ziehen des Zugangs unter Zuhilfenahme von einem Sicherungsfaden und der am Stopfen angebrachten Flügel und Widerhaken in seiner endgültigen Position in der Gefäßwand zum Liegen gebracht.

Das System sollte zudem schnell und sicher platziert werden können und, wie bereits angedeutet, über die für den angiologischen Eingriff gelegte Schleuse in Position gebracht werden können. Des Weiteren sollte der Stopfen aus einem vollständig resorbierbaren Material bestehen.

Aufgabe dieser Studie war es also zunächst, *In-vitro*-Versuche durchzuführen, in denen nach einem ersten Test des Verschlussystems und des Stopfenmaterials im Flussmodell an explantierten Schweineaorten durch Hämokompatibilitätstests und Stopfendesigntests verschiedene Materialien und Designs auf ihre Handhabbarkeit und Funktionalität überprüft wurden.

Aus den Erkenntnissen der *In-vitro*-Versuche wurde vom Projektpartner in Denkendorf ein optimierter Prototyp des Schnellverschlussystems gefertigt.

Mit dem optimierten Prototyp des Verschlussystems sollten in dieser Arbeit die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse im Rahmen einer Machbarkeitsstudie (Proof of Principle) *in vivo*, im Schafmodell, validiert werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

Die ursprüngliche Form und Funktionsweise des für den Tierversuch zu optimierenden aktiven Verschlusssystems ist in III.2.4 beschrieben (siehe Abbildung 12). Zur Entwicklung des Prototyps für die Testung im Schafmodell dienten folgende In-vitro-Versuche:

1. In-vitro-Tests

In den In-vitro-Versuchen wurden mehrere vom Projektpartner (ITV in Denkendorf) zur Verfügung gestellte neu entwickelte sich aber in ihrem Design und Material unterscheidende vereinfachte Verschlussstopfenmuster hinsichtlich verschiedener Parameter getestet. Ziel der Vorversuche war es, den für den Tierversuch und den späteren Einsatz am Menschen am besten geeigneten Verschlussstopfen ausfindig zu machen. Hierfür wurden sowohl Material- und Designtests als auch Hämokompatibilitätstests mit den Verschlussstopfen durchgeführt (Übersicht über die durchgeführten Testungen siehe Abbildung 2).

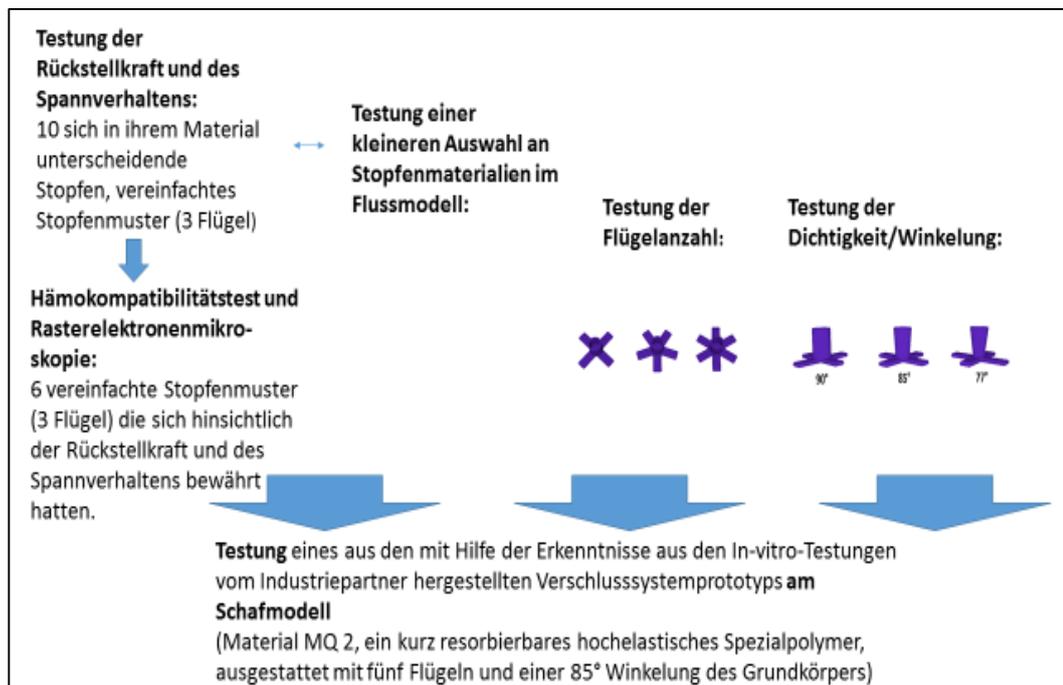


Abbildung 2: Übersicht über die durchgeführten Testungen.

1.1. Testung der Rückstellkraft und des Spannverhaltens

Es wurden je drei Stopfen von zehn sich in ihrem Material unterscheidenden vom Projektpartner zur Verfügung gestellten Verschlussstopfen hinsichtlich ihres Spannverhaltens beim Bestücken (siehe Abbildung 3) eines Applikatorsystems und hinsichtlich der Rückstellkraft ihrer Flügel bewertet. Die getesteten Materialien waren: MEUV 2, MEUV 7, MEUV 11, MEUV 12, MEUV 12 violett, MQ 2, MQ 2 violett, MQ 3, MQ 3 violett und ein weiteres Material (LCT 682012H6), das nach dem ersten Test ausgeschlossen wurde.

Die Bewertung des Spannverhaltens (siehe Tabelle 1) und der Rückstellkraft (siehe Tabelle 2) wurde unter standardisierten Bedingungen (Einzug, 10-minütiger Verbleib im Applikator, Ausschub) von immer derselben Person nach folgendem Schema vorgenommen:

Tabelle 1: Bewertungsschema Spannverhalten (Einzugsverhalten in den Testapplikator).

starker Zug beim Einzug in den Testapplikator erforderlich	1
mittlerer Zug erforderlich	2
wenig Zug erforderlich	3
sehr leicht einziehbar	4



Abbildung 3: Verschlussstopfen beim Einzug in den Testapplikator.

Tabelle 2: Bewertungsschema Rückstellkraft (Rückverformbarkeit der Stopfenflügel nach Ausschub des gespannten Verschlussstopfens aus dem Testapplikator).

sehr gute Rückstellkraft	1
gute Rückstellkraft	2
befriedigende Rückstellkraft	3

1.2. Test von Verschlussstopfenmustern im Flussmodell

Die Tests wurden an explantierten Aorten von Schweinen (60-70 kg) durchgeführt. Hierfür wurden die Aorten in ein geschlossenes Flussmodell (Schema siehe Abbildung 4) implantiert. In diesem Modell wurden dann mittels eines Quetschhahns nach Hoffmann, einer Rollerpumpe (Typ 10-40-00, Stöckert Instrumente, München), sowie eines Manometers (Exacta®, Riester, Jungingen) in-vivo-ähnliche Bedingungen geschaffen (siehe Abbildung 5). Anschließend wurden je drei Stopfen von sechs zur Verfügung gestellten unterschiedlichen Materialien (MEUV 2, MEUV 12, MEUV 12 violett, MQ 2 violett, MQ 3 und MQ 3 violett) durch eine zuvor über Seldingertechnik gelegte Zugangsschleuse (Radiofocus Introducer II Set, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn) in das Gefäß eingebracht. Nach dem Legen der Zugangsschleuse wurde diese samt Applikator wieder aus dem Gefäß entfernt und der Verschlussstopfen blieb in der Gefäßwand zurück. Zur korrekten Verankerung wurde zusätzlich ein leichter Zug auf den mit dem Stopfen verbundenen Sicherungsfaden ausgeübt. Daraufhin folgte die Entfernung des Gefäßes aus dem Flussmodell, an dem dann eine Beurteilung der Lage sowie des Verhaltens der Stopfen erfolgte.

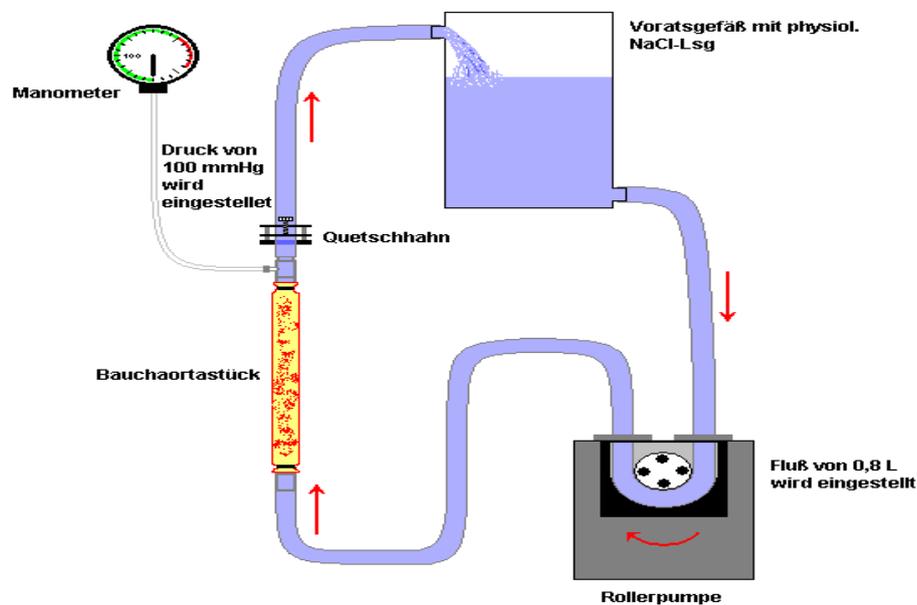


Abbildung 4: Schemazeichnung des Flussmodells.

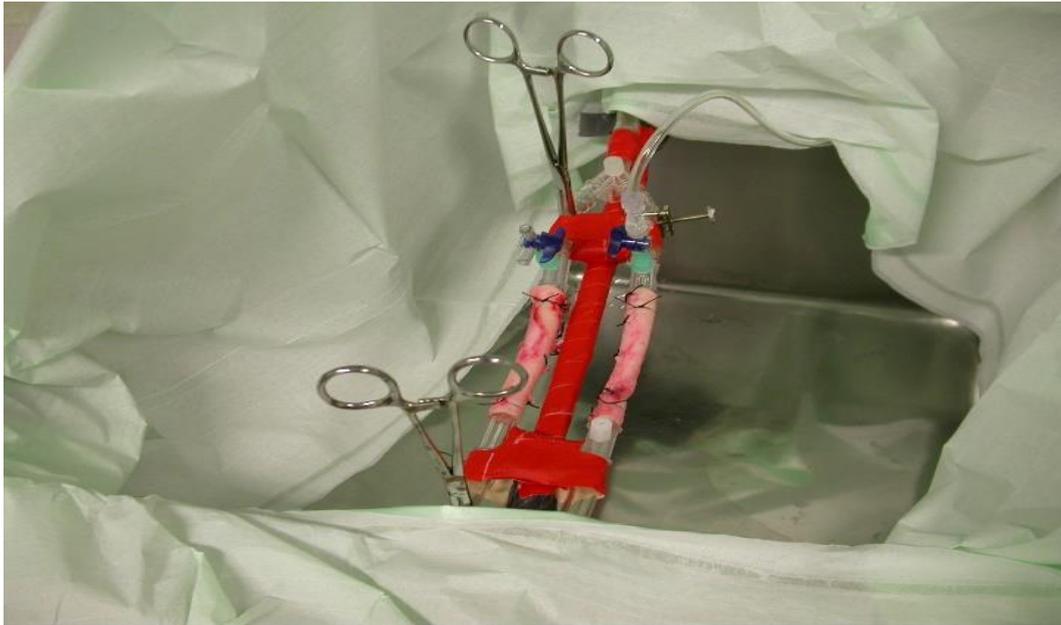


Abbildung 5: Schweineaorten-Flussmodell.

1.3. Hämokompatibilitätsprüfung

Zur Überprüfung der Blutverträglichkeit der Stopfen und deren Auswirkung auf die Blutparameter wurde in Anlehnung an die ISO-Norm 19993-4 ein Hämokompatibilitätstest mit heparinisierendem humanem Vollblut durchgeführt (siehe Tabelle 5). Das Blut stammte von 3 gesunden, freiwilligen und nicht unter Medikamenteneinfluss stehenden Spendern. Mit dem Blut von jedem dieser Spender wurden je 3 Verschlussstopfen 6 unterschiedlicher Materialien (MEUV 7, MEUV 11, MQ 3, MQ 2, MQ 3 violett, MQ 2 violett), die sich hinsichtlich der Rückstellkraft und ihres Spannverhaltens in den vorangegangenen Materialtests bewährt hatten, getestet.

1.3.1. Blutentnahme

Zunächst wurde allen drei Spendern aus einer derer Unterarmvenen mittels einer Butterflykanüle (1,44 mm Durchmesser, Safety Multifly®, Sarstedt, Nümbrecht) von einer Mitarbeiterin des Forschungslabors Blut entnommen.

Das Blut der Spender wurde in Neutralmonovetten (Firma Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland) mit einem Fassungsvermögen von 9 ml aufgefangen. Die Monovetten wurden zuvor mit 1 IU pro ml Blut heparinisiert (Heparin 25 000, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Anschließend wurden die gefüllten Monovetten eines jeden Spenders in einem Sammelbehälter (Schraubbecher 100

ml, Sarstedt, Nümbrecht) gepoolt.

1.3.2. Vorbereitung der Proben und Inkubation auf der Rocking Platform

Anschließend wurde von dem Blut jedes Spenders jeweils 6 ml in 7 Falcon-Blutröhrchen (14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube, Firma Becton, Dickinson and Company, Franklin Wales, USA) gegeben. Die Falconröhrchen wurden zuvor jeweils mit drei gleichen Stopfen von einem der sechs zu untersuchenden Materialien bestückt. Eines der sieben Probenröhrchen enthielt lediglich humanes Vollblut und diente als Kontrollgruppe. Nach dem Verschluss der Probenröhrchen folgte eine 90-minütige Inkubation bei 37° Celsius auf einem Horizontalschüttler (Polymax 1040, Firma Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei 25 rpm (rounds per minute).

1.3.3. Überführung des Probenblutes in Spezialmonovetten

Nach der Inkubation wurde das Blut aus den Falcon-Blutröhrchen für die Untersuchung spezifischer Blutparameter in entsprechende Spezial-Monovetten überführt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersichtstabelle zur Aufbereitung des Probenblutes.

Monovettentyp	Zentrifugieren	Blutparameter
S-Monovette®1,4 ml 9NC Tri- Natriumcitratlösung 0,106 mol/l; 0,3 ml Citrat-Lösung REF: 0.51165 Firma Sarstedt, Nümbrecht- Rommelsdorf, Deutschland	bei Raumtemperatur/ 18 Minuten/1800g	TAT PMN-Elastase

S-Monovette® EDTA 1,2 ml K3E REF: 06.1664.001 Firma Sarstedt, Nümbrecht- Rommelsdorf, Deutschland	vor dem Zentrifugieren Zellcounter (Micros 60 ABX Hematology, Montpellier, Frankreich) für Bestimmung der Erythrozyten/Leukozyten/ Thrombozyten 4° Celsius/20 Min/2500g	SC5b-9
BD Vacutainer; CTAD; Blood Collection Tube 2,7ml 13x75mm REF: 367562 Firma Becton, Dickinson and Company	zuerst 15 Min. auf Eis lagern, dann bei 4° Celsius/20 Min/2500g, dann aus Überstand 700µl in neue S-Monovette® 4,5 ml ohne Präparierung	β-TG

1.3.4. Aliquotierung des Probenblutes

Nach der Zentrifugation der Proben wurde das Plasma (Überstand) aus den Spezialmonovetten auf Eppendorf Safe-Lock Tubes® (Firma Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) aliquotiert. Anschließend wurden die Eppendorf Safe-Lock Tubes® bis zur weiteren Bearbeitung zwischen -20° und - 80° Celsius in flüssigem Stickstoff schockgefroren und eingelagert (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersichtstabelle über die Lagerung des Probenblutes.

Monovettentyp	Umfüllung in Eppendorf Safe-Lock Tubes	Temperatur des Schockgefrierens für die Lagerung
S-Monovette® 1,4 ml 9NC Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l; 0,3ml Citrat-Lösung REF: 0.51165 Firma Sarstedt,	Umfüllung in 5 Eppendorf Safe-Lock Tubes® à 300 µl	-20° Celsius

Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland		
S-Monovette® EDTA 1,2 ml K3E REF: 06.1664.001 Firma Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland	Umfüllung in 2 Eppendorf Safe-Lock Tubes® à 200 µl	-80° Celsius
S-Monovette® 4,5 ml ohne Präparierung (gefüllt mit 700 µl Überstand aus der CTAD Vacutainer) REF: 05.1727.001	Umfüllung in 3 Eppendorf Safe-Lock Tubes® à 50 µl	-20° Celsius

1.3.5. Bestimmung der Hämkompatibilitätsparameter nach ISO 1993-4

Um die Auswirkungen des Stopfenmaterials auf das Komplementsystem, die Koagulation, die korpuskulären Blutbestandteile und auf deren Aktivierung zu ermitteln wurde das Spenderblut vor und nach dem Kontakt mit den Verschlussstopfen hinsichtlich verschiedener hämatologischer Parameter untersucht. Dazu diente SC5b-9 als Marker für die Aktivierung des Komplementsystems und der Thrombin-anti-Thrombin-Komplex wurde als Marker für die Koagulation herangezogen. Des Weiteren wurde β -Thromboglobulin als Marker für die Aktivierung von Thrombozyten und die PMN-Elastase als Hinweisgeber für die Leukozytenaktivierung verwendet. Zur Bestimmung der Parameter wurden kommerziell verfügbare ELISA-Testkits angewendet. Es handelte sich bei allen verwendeten Testkits um sogenannte Festphasen ELISAs. Bei der Durchführung der ELISAs wurden streng die Protokolle und Methoden aus den Anwendungshinweisen der entsprechenden Testkits befolgt. Außerdem wurde mittels eines Zellcounters die Zellzahl der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten bestimmt.

Um Hinweise auf die Thrombogenität der Stopfenmaterialien zu erhalten wurden diese nach der Inkubation im humanen Spenderblut in einem weiteren Schritt unter dem Elektronenmikroskop untersucht. (Siehe 1.3.6)

1.3.5.1. Thrombin-Anti-Thrombin-Komplex (TAT)

Prinzip der Testung:

Für die Bestimmung des TAT im Probenblut wurde der Enzygnost® TAT micro, ein ELISA nach dem Sandwich-Prinzip, herangezogen.

Das im Probenblut enthaltene TAT geht während der ersten Inkubation mit den Antikörpern gegen Thrombin, welche auf einer Mikrotitrationsplatte fixiert sind, in Bindung. Im Anschluss an das Auswaschen binden sich in einer weiteren Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Antithrombin III an freie Antithrombin III Determinaten. Der überschüssige Anteil der Peroxidase-konjugierten Antikörper wird im darauffolgenden Schritt ausgewaschen. Im Anschluss folgt die Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität. Durch den Zusatz von verdünnter Schwefelsäure wird eine Unterbrechung der Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen erreicht. Danach wird die Farbintensität, welche proportional zu der Konzentration von TAT ist, photometrisch bestimmt.

1.3.5.2. SC5b-9 (Terminaler Komplementkomplex (TCC))

Die Bestimmung des SC5b-9 erfolgte mit dem Enzym-Immunoassay MicroVue SC5b-9 Plus®.

Prinzip der Testung:

MicroVue SC5b-9 Plus ist ein aus drei Phasen bestehender Test, welcher der quantitativen Bestimmung von SC5b-9 dient. In der ersten Inkubationsphase kommt es zwischen dem SC5b-9 aus der Probe und den auf der Oberfläche der Mikroassay-Platte fixierten monoklonalen Antikörpern (Anti-human SC5b-9 Antikörpern) zu einer Komplexbildung. Nach einem Waschschrift zur Entfernung des ungebundenen Konjugats werden Peroxidase konjugierte Antikörper gegen SC5b-9 auf die Mikroassayplatte gegeben. Darauf kommt es zur Bindung der bereits durch die monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche der Mikroassayplatte gehaltenen SC5b-9-Komplexe mit den enzymkonjugierten Antikörpern. Anschließend folgt ein weiterer Waschschrift, der weiteres ungebundenes Konjugat entfernt. Im abschließenden 3. Inkubationsschritt wird ein Substrat für das Peroxidase-Konjugat zugegeben, was letztlich zu einer Blaufärbung führt. Durch Zugabe eines weiteren Reagenz wird die Farbentwicklung gestoppt und die Farbintensität, die proportional zur Konzentration von SC5b-9 ist, wird photometrisch bestimmt.

1.3.5.3. β -Thromboglobulin (β -TG)

Das β -TG im Probenblut wurde mit Asserachrom® β -TG immunenzymatisch bestimmt.

Prinzip der Testung:

Bei dem nach dem Sandwich-Prinzip ablaufenden Test kommt es zur Bindung zwischen den an der Oberfläche eines Kunststoffträgers fixierten Kaninchen Antikörpern (anti humane β -TG Antikörper) und dem β -TG aus der zu untersuchenden Probe. Nach einem Waschschrift kommt es in einem weiteren Schritt durch Zugabe von Peroxidase-konjugierten Kaninchen-Antikörpern gegen humanes β -TG zur Anlagerung der Antikörper an freie Antigeneterminaten des bereits fixierten β -TG. Anschließend folgt eine weitere Waschung zum Entfernen der nicht gebundenen Peroxidase-konjugierten Antikörper. Durch Zugabe eines Substrates (Tetramethylbenzidin) für die Peroxidase können durch Änderungen der Farbintensität Rückschlüsse auf die Aktivität der gebundenen Peroxidase gezogen werden. Nach Zugabe einer Stopplösung (einer starken Säure) kann die ursprüngliche Konzentration an β -TG im Medium, welche mit der Farbintensität korreliert, photometrisch bestimmt werden.

1.3.5.4. PMN-Elastase

Die PMN-Elastase wurde quantitativ über den PMN-Elastase-ELISA der Firma Demeditec bestimmt.

Prinzip der Testung:

Beim vorliegenden Test handelt es sich um ein Festphasen-ELISA, welcher der Konzentrationsbestimmung der PMN-Elastase und des α 1-Proteinase-Inhibitors im Plasma dient. Nach Pipettierung der Proben auf eine mit polyklonalen Antikörpern gegen menschliche PMN-Elastase beschichtete Mikrotiterplatte kommt es nach 60-minütiger Inkubation zu einer Bindung zwischen der PMN-Elastase und den Antikörpern. Im darauffolgenden Waschschrift werden die nicht gebundenen Probenbestandteile entfernt. Im Anschluss wird ein neuer polyklonaler Antikörper hinzugegeben, dieser ist jedoch mit Meerrettichperoxidase konjugiert und gegen den α 1-Proteinase-Inhibitor gerichtet. Nach einer Inkubationsphase bindet der peroxidasemarkierte Antikörper spezifisch an den bereits an den ersten Antikörper gebundenen PMN-ELASTASE/ α 1-Proteinase-Inhibitor-Komplex. In einer weiteren Waschung wird überschüssiges Enzymkonjugat entfernt und nur der

Sandwich-Komplex bleibt zurück. Durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (Substrat) wird dieses nach einer Inkubation von 20 Min. von der gebundenen Meerrettichperoxidase zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Im Anschluss daran wird durch die Zugabe von Salzsäure die Enzymreaktion gestoppt. Zuletzt wird die Farbintensität, welche proportional zu der Konzentration der PMN-Elastase ist, photometrisch bestimmt.

Tabelle 5: Prüfparameter und Testverfahren der Hämokompatibilitätstests.

Prüf-kategorie	Bewer-tungs-verfahren	Parameter	Testverfahren und Hersteller
Koagulation	Marker für Thrombin-bildung (Koagulation)	Thrombin-Anti-Thrombin-III Komplex (TAT)	ELISA: Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Deutschland
Thrombo-zyten	Anzahl der Thrombo-zyten	Zählung von Blutzellen	Zellzählgerät: Micros 60 ABX Hematolog, Montpellier, Frankreich
	Marker für Thrombo-zyten-aktivierung	β -Thromboglobulin	ELISA: Diagnostica Stago/Roche, Mannheim, Deutschland
Hämatologie	Anzahl von weißen und roten Blutzellen	Zählung von Blutzellen (Leukozyten, Erythrozyten)	Zellzählgerät: Micros 60 ABX Hematolog, Montpellier, Frankreich
	Produkt von Leukozyten-aktivierung	PMN-Elastase	ELISA: Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Deutschland
Komplement-system	Marker für Aktivierung des	SC5b-9	ELISA: Quidel, San Diego, CA, USA

	terminalen Komple- ment- komplex		
Thrombo- genität	SEM (scanning electron microscopy: Elektronen- mikroskop)	(Thrombozyten) Adhäsion und Aggregation, Leukozyten Adhäsion, Fibrinlagerungen	Elektronenmikroskopie: Zeiss Evo Ls10, Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland

1.3.6. Rasterelektronenmikroskopie

Um Hinweise auf die Thrombogenität der Oberflächen der unterschiedlichen Verschlussstopfen zu erhalten, wurden die mit Humanblut inkubierten Stopfen auch unter dem Elektronenmikroskop untersucht. Dafür wurden die Stopfen nach 90-minütiger Inkubation auf der Rocking Platform in einem ersten Schritt vorsichtig mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; Firma PAA laboratories, Cölbe, Deutschland) gespült um nicht anhaftende Thrombozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Stopfen bei einer Temperatur von 4° Celsius in einer 2 % Glutaraldehydlösung (in PBS) (Firma Serva, Heidelberg, Deutschland) über Nacht inkubiert. Nach einer erneuten Waschung der Stopfen mit PBS zur Entfernung des verbliebenen Glutaraldehyds wurde mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (von 40 % bis auf 100 % Ethanol, (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)) eine Entwässerung der Proben vorgenommen. Abschließend wurden die Proben einer Critical-Point-Trocknung (in einem Polaron E3100, Firma GaLs Instruments, Bad Schwalbach, Deutschland) unterzogen, mit Gold-Palladium (Emitech K550X, Firma GaLa Instruments, Bad Schwalbach, Deutschland) gesputtert und dann unter einem Rasterelektronenmikroskop (Zeiss Evo Ls10, Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Dabei wurde nach Adhäsionen und Aggregationen von Blutplättchen, sowie nach Adhäsionen von Leukozyten und Anlagerungen von Fibrin an der Stopfenoberfläche gesucht. Zur Negativkontrolle wurde von jedem Material je ein nicht mit Spenderblut inkubierter Stopfen untersucht.

1.3.7. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Statistik-Software GraphPad Prism (Version 6, GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Aus den Daten der Hämokompatibilitätstests wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) errechnet. Gepaarte Daten wurden mit dem Friedman-Test und nachfolgendem Dunn-Test analysiert. Nicht gepaarte Daten wurden unter der Verwendung von einem Kruskal-Wallis-Test und darauffolgendem Dunn-Test analysiert. Statistische Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ definiert.

1.4. Testung des Stopfendesigns (Flügelanzahl)

Um Hinweise auf die benötigte Flügelanzahl eines Verschlussstopfens zu erhalten, wurden je zwei Stopfen mit derselben Flügelanzahl ($n = 2$) an einem euthanasierten weiblichen Schwein (60 kg) getestet. Es wurden Stopfen mit einer Flügelanzahl von vier, fünf und sechs Flügeln einer Prüfung unterzogen. Dazu wurde das euthanasierte Schwein zunächst auf dem Rücken liegend ausgebunden und dann dessen A. carotis communis freipräpariert. Anschließend wurden von cranial nach caudal je zwei Stopfen mit vier, fünf und sechs Flügeln in die Arterie implantiert. Die Verschlussstopfen wurden aufgrund der höheren Anzahl an Flügeln nicht wie in den vorherigen Versuchen in das Applikatorrohr hineingezogen, sondern bereits ausgebreitet auf dem Applikator sitzend in die zugehörige Schleuse vorgeschoben (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Einschub des Verschlussstopfens in die Zugangsschleuse.

Nach dem Platzieren der Verschlussstopfen mittels Seldingertechnik wurde das Gefäß dann am cranialen und caudalen Ende abgesetzt und explantiert. Daraufhin wurde die entnommene A. carotis communis der Länge nach aufgeschnitten und

die Lage sowie der Zustand der Verschlussstopfen überprüft.

1.5. Dichtigkeitstest/Designstudie

In einem weiteren Test wurden drei verschiedene Stopfendesigns hinsichtlich ihrer abdichtenden Wirkung am Schweineaortenmodell getestet. Die Teststopfen in diesem Versuch waren aus einem nichtelastischen Material (da es in diesem Versuch ausschließlich um die Winkelung der Stopfen ging) und unterschieden sich im jeweiligen Abfallwinkel ihres Grundkörpers.

Ein Schema der getesteten Verschlussstopfen mit unterschiedlichem Abfallwinkel ist der Abbildung 7 zu entnehmen.

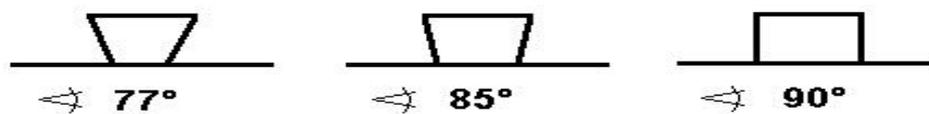


Abbildung 7: Winkelungen der getesteten Stopfengrundkörper.

Zunächst wurde die Aorta abdominalis und ein Teil der Aorta thoracica eines zuvor euthanasierten Schweines freipräpariert und an der cranialen Seite abgesetzt. An der caudalen Seite des Gefäßes wurde eine Arterienklemme angebracht, in einem Abstand von ca. 10 cm in cranialer Richtung wurde eine ca. 3 cm große Inzision an der ventralen Gefäßseite gesetzt. Das craniale Ende des Gefäßes wurde über einen Konnektor (3/8'' auf 1/4'') mittels Ligatur mit einem Schlauch (1/4''), welcher zur Druckregulierung diente, verbunden (siehe Abbildungen 8 und 9).

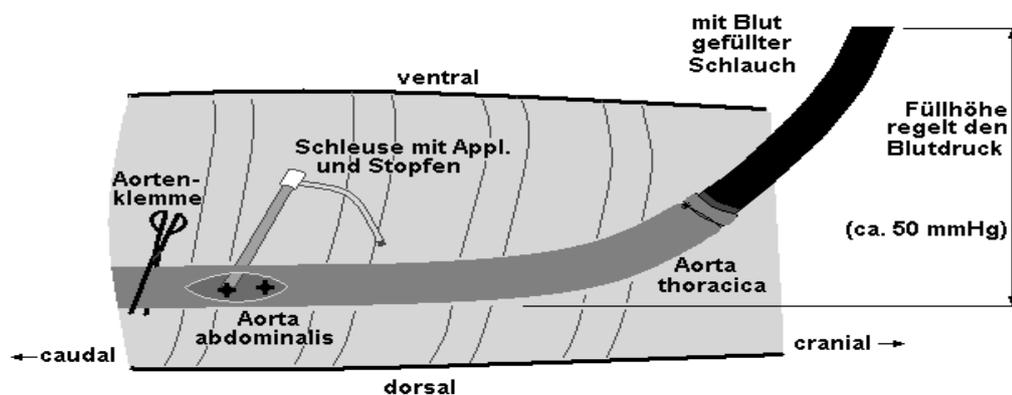


Abbildung 8: Schemazeichnung der Dichtigkeits/Designstudie.

Daraufhin wurden die Zugangsschleusen mit Applikator an der dorsalen Seite, gegenüberliegend der zuvor gesetzten Inzision, über Seldingertechnik in die Gefäßwand platziert. Die Bestückung der Applikatoren mit den Stopfen erfolgte aufgrund der nichtelastischen Materialeigenschaften über die Inzision.



Abbildung 9: Schweineaortenmodell vor der Stopfenapplikation.

Durch das Zurückziehen der Schleusen und der in diese eingesetzten bestückten Applikatoren konnten die Stopfen gesetzt und ausgerichtet werden. Bei der manuellen unterstützenden Ausrichtung über das Inzisionsloch wurde darauf geachtet, dass möglichst kein Flügel im Stichkanal zu liegen kommt (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Schweineaortenmodell nach Applikation der Stopfen.

Nach der Platzierung und Ausrichtung der Stopfen wurden diese mittels eines an diesen angebrachten Sicherungsfadens unter leichtem Zug in Position gehalten. Die zur Bestückung der Applikatoren und zum eventuellen korrigierenden Ausrichten der Stopfen angelegte Inzisionsstelle wurde mittels einer Gefäßnaht wieder verschlossen (siehe Abbildung 11).

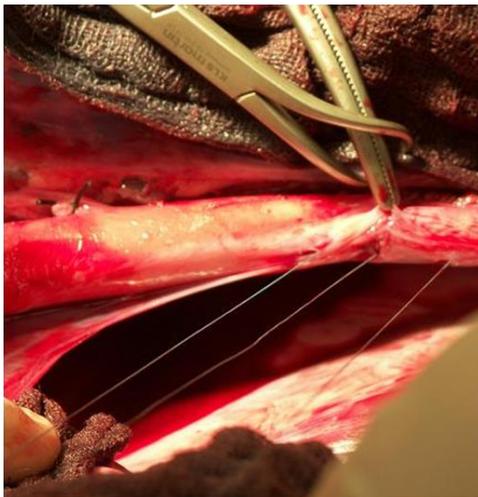


Abbildung 11: Ventrale Ansicht des Gefäßes, bei jetzt vernähter Inzisionstelle. Auf dem Bild sind die Sicherungsfäden der Verschlussstopfen zu erkennen.

Eine Beurteilung der Dichtigkeit und der Lage der Verschlussstopfen wurde unter Berücksichtigung der folgenden Bewertungskriterien vorgenommen (siehe Tabellen 6 und 7):

Tabelle 6: Schema für die Dichtigkeitsbewertung.

Blutdurchlässigkeit	Bewertung der Dichtigkeit
keine Blutung	sehr gut
Sickerblutung	gut
leichte Blutung	befriedigend
mittlere Blutung	ausreichend
starke Blutung	mangelhaft

Tabelle 7: Kriterien zur Lagebewertung der Stopfen.

Lage des Stopfens nach Eröffnung der Aorta
alle Flügel im Lumen
ein Flügel im Stichkanal
mehrere Flügel im Stichkanal
ganzer Stopfen nicht mehr im Stichkanal

In einem ersten Test wurde nur ein Stopfen pro Design getestet ($n = 1$). Dabei wurde bei einem aufgebauten Druck von 50 ± 5 mmHg auf eine Heparinisierung von 200 IU/kg KGW zurückgegriffen. Wegen der sehr hoch gewählten Heparindosis und der gewählten Probenanzahl von $n = 1$ pro Stopfendesign konnten aus diesem Test nur erste Hinweise auf die Dichtigkeit der Verschlussstopfen gewonnen werden.

Aufgrund dessen wurde der Test mit $n = 2$ pro Stopfendesign und einer niedriger gewählten Heparindosis (100 IU/kg KGW (Standardheparinisierung)) später wiederholt.

2. In-vivo-Machbarkeitsstudie (Tiermodell)

2.1. Versuchstiere

Für den In-vivo-Versuch standen nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen (Antragsnummer: C7/15) sechs Schafe zur Verfügung. Es handelte sich dabei um Merinolandschafe aus Tierhaltungen in der Umgebung von Tübingen. Die Schafe waren entweder männlichen Geschlechts und kastriert oder weiblich und nicht tragend. Die Tiere wogen bei ihrer Ankunft zwischen 56 kg und 76 kg (siehe Tabelle 8) und waren zwischen 4 und 5 Jahren alt.

Tabelle 8: Versuchstiere für die Applikation der Verschlussstopfen.

Ohrmarkennummer	Interne Nummer	Ankunftsgewicht	Geschlecht
DE 01 08 004 91895	1	66,8 Kg	männlich
DE 01 08 004 91908	2	72,7 Kg	männlich
DE 01 08 006 55110	3	56,0 Kg	weiblich
DE 01 08 004 08228	4	76,3 Kg	weiblich
DE 01 08 004 26384	5	55,1 Kg	weiblich
DE 01 08 004 84773	6	61,5 Kg	weiblich

2.2. Haltung der Versuchstiere

Die Schafe wurden während des Versuchszeitraums in den Stallungen des Tier-OP der Universität Tübingen (Experimentelle Medizin) gehalten. Die Tiere waren in 3er-Gruppen in 3 m x 4 m großen mit Stroh eingestreuten Boxen untergebracht und hatten tagsüber bei entsprechenden Wetterverhältnissen Zugang zu einem planbefestigten Außenbereich. Um eine gewisse Eingewöhnungszeit an die neue Umgebung zu gewährleisten, wurden die Tiere spätestens eine Woche vor Versuchsbeginn in die Stallungen des Tier-OPs verbracht. Die Tiere wurden 1-mal am Tag mit Mineral- und Kraftfutter gefüttert. Heu, Stroh und Wasser stand den Schafen in den Boxen ad libitum zur Verfügung.

2.3. Zeitliche Versuchsabfolge

Mit den Ergebnissen der In-vitro-Versuche wurde vom Projektpartner ein für die In-vivo-Versuche geeignet scheinender Stopfen-Prototyp entwickelt und gefertigt. Die Funktionsfähigkeit des entwickelten Stopfens sollte unter klinischen Bedingungen im Tiermodell validiert werden. Jedem der sechs zur Verfügung

stehenden Schafe sollten dazu insgesamt sieben Verschlussstopfen in deren linke und rechte A. carotis implantiert werden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Geplante zeitliche Versuchsabfolge (Schafe Nr. 1-2).

Tag 0	Punktion rechte A. carotis
Tag 6	Punktion linke A. carotis
Tag 12	Punktion rechte A. carotis
Tag 18	Punktion linke A. carotis
Tag 21	Punktion rechte A. carotis
Tag 24	Punktion linke A. carotis
Tag 27	Punktion rechte A. carotis
Tag 30	Euthanasie und Explantation linke und rechte A. carotis

Bei der Testung der ersten beiden Versuchstiere stellte sich die gewählte Anzahl der Punktionen pro Schaf als nicht praktikabel heraus. Aufgrund dessen wurde die Anzahl der geplanten Punktionen pro Tier bei den noch zu untersuchenden Schafen auf vier abgesenkt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Geplante zeitliche Versuchsabfolge (Schafe Nr. 3-6).

Tag 0	Punktion linke A. carotis
Tag 7	Punktion rechte A. carotis
Tag 14	Punktion linke A. carotis
Tag 21	Punktion rechte A. carotis
Tag 28	Euthanasie und Explantation rechte und linke A. carotis.

2.4. Funktionsweise des neu entwickelten arteriellen Verschlusssystems

Das ursprünglich entwickelte arterielle Verschlusssystem besteht aus drei Bestandteilen. Zum einen aus dem eigentlichen Verschlussstopfen, zum anderen aus einem Stempel, der als Ausschubvorrichtung dient, sowie aus einer äußeren Hülle (siehe Abbildung 12).

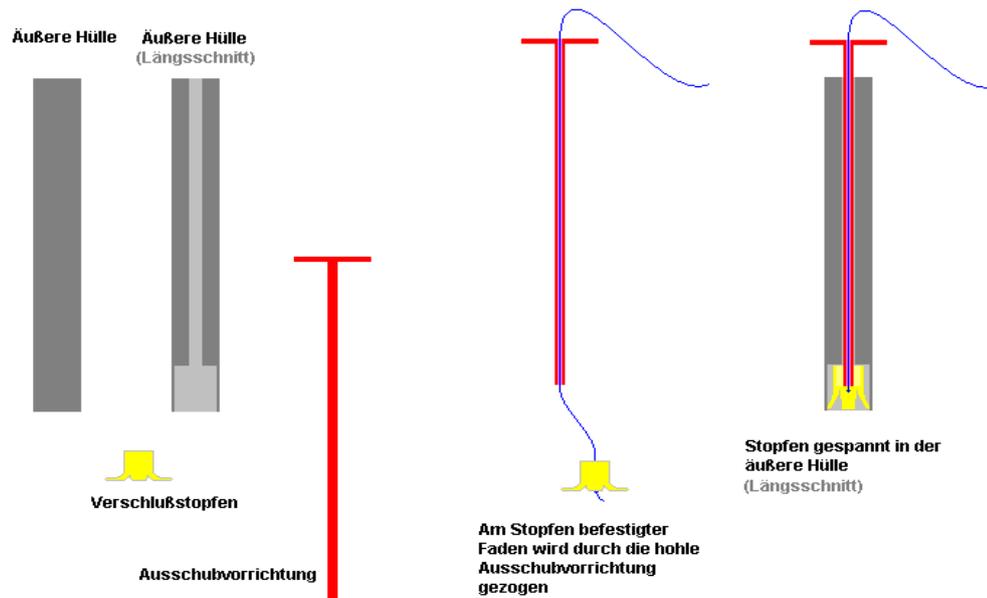


Abbildung 12: Das ursprünglich entwickelte Verschlusssystem.

Für den Tierversuch hingegen wurde ein aus den Erkenntnissen der In-vitro-Versuche vom Projektpartner weiter entwickeltes Verschlusssystem verwendet (siehe Abbildung 13). Das in den In-vivo-Testungen verwendete System besteht letztlich nur noch aus dem eigentlichen Verschlussstopfen und einer Ausschubröhre. Der aus einem resorbierbaren spritzgussfähigen hochelastischen Spezial-Polymer hergestellte Verschlussstopfen ist über ein Kugelgelenk auf die Ausschubröhre aufgesetzt und über einen Sicherungsfaden fixiert. Die Ausschubröhre kann über einen an ihr angebrachten Konnektor (Clip-Mechanismus) mit einer handelsüblichen 8F-Zugangsschleuse von der Firma Terumo (Radiofocus Introducer II Set) verbunden werden und so samt Verschlussstopfen in selbige vorgeschoben werden. Über das am oberen Teil der Ausschubröhre angebrachte Sicherungs- und Feedbackmodul kann anschließend der nun bündig am Schleusenende liegende Verschlussstopfen freigegeben und in das Gefäßlumen vorgeschoben werden. Nach der Freigabe des Stopfens in das Gefäß und Lösung der Fixation des Sicherungsfadens wird die Schleuse samt Ausschubröhre langsam aus der Arterie extrahiert. Unterdessen verankert sich der Verschlussstopfen mit seinen fünf Flügeln in der Gefäßwand und kann so für einen Verschluss der Punktionsstelle sorgen.

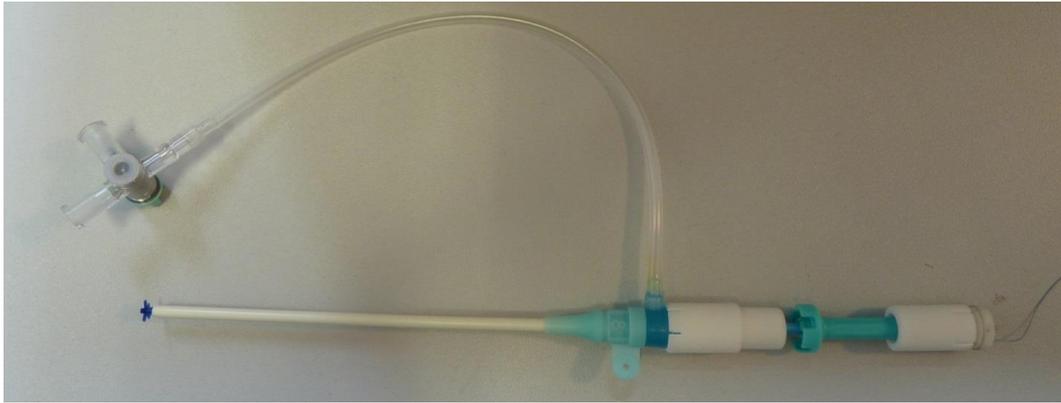


Abbildung 13: In den In-vivo-Versuchen verwendetes Verschlusssystem (hier bereits in die Zugangsschleuse eingeführt).

2.5. Versuchsprozedere

2.5.1. Prämedikation und Anästhesie

Einen Tag vor dem jeweiligen Eingriff wurde den Tieren ein langwirksames Breitbandpräparat (Veracin compositum® (1 ml enthält: 80.000 I.E. (76,19 mg) Benzathin-Benzylpenicillin, 120.000 I.E. (120 mg) Benzylpenicillin-Procaïn, 200.000 I.E. (258 mg) Dihydrostreptomycinsulfat, 20 mg Procainhydrochlorid.); Dosierung: 3 ml/50 kg KGW) zur antibiotischen Abdeckung verabreicht. Außerdem wurde jeweils eine präoperative Nahrungskarenz (12 Stunden vorher kein Futter) eingehalten. Die Punktion der A. carotis erfolgte am sedierten Tier. Den Schafen wurde dazu 0,05-0,1 mg/kg KGW Xylazin und zehn Minuten später 5 mg/kg KGW Ketamin intramuskulär verabreicht. Zusätzlich wurde den Schafen ein peripherer Venenkatheter in die Ohrvene gelegt, über den im Bedarfsfall Propofol (3-6 mg/kg KGW) appliziert werden konnte. Eine postoperative Analgesie wurde einerseits über das bereits verabreichte Xylazin und andererseits durch die einmalige intramuskuläre Gabe von Meloxicam erreicht. Die Tiere wurden während der gesamten Narkose überwacht und erst bei ausreichendem Gang-, Stand-, und Orientierungsvermögen wieder zu ihrer Gruppe verbracht.

2.5.2. Vorbereitung der Punktionsstelle

Zur Vorbereitung des Operationsfeldes wurden die leicht anästhesierten Tiere in Brustlage gesetzt. Daraufhin wurden die Tiere mit einer Schermaschine der Firma Eickemeyer aus Tuttlingen an beiden Halsseiten geschoren. Anschließend wurde die für die jeweilige Punktion vorgesehene Halsseite gereinigt und mit

Braunoderm® (100 g Lösung enthalten: 2-Propanol 50,0 g, Povidon-Iod mit 10 % verfügbarem Iod 1,0 g; B. Braun AG, Melsungen) desinfiziert. Die für die Punktion, die Schleusenlegung und die Stopfenapplikation benötigten Materialien wurden auf einem steril abgedeckten Beistelltisch ausgelegt. Die Punktion selbst erfolgte unter sterilen Kautelen.

2.5.3. Ablauf der Punktion und Setzen des Stopfens

Der Kopf des zu punktierenden, sedierten Schafes wurde während der Dauer des Eingriffs von einer auf einem Stuhl sitzenden Person zu der zur Punktion kontralateral liegenden Seite nach oben überstreckt. Eine andere Person suchte unter sterilen Bedingungen palpatorisch die sich meist pulsierend darstellende A. carotis communis auf. Daraufhin wurde die Arterie von derselben Person mittels einer Hohlnadel in einem relativ kleinen Winkel von lateral craniocaudal punktiert. Anschließend wurde von einer weiteren Person unter Gebrauch der Seldingertechnik eine handelsübliche 8F-Zugangsschleuse von der Firma Terumo (Radiofocus Introducer II Set) in das Gefäßlumen vorgeschoben. Zur Kontrolle der korrekten Platzierung der Zugangsschleuse wurde der sich an der Schleuse befindende Dreiwegehahn geöffnet. Bei pulsierend austretendem hellem Blut konnte von einer korrekten Platzierung der Schleuse in der A. carotis communis ausgegangen werden.

Nachfolgend wurde das neu entwickelte arterielle Verschlussystem mittels des oben beschriebenen Clip-Mechanismus auf die schon im Gefäß liegende Schleuse aufgesteckt, um bei Extraktion der Schleuse, wie unter 2.4 beschrieben, nur den Verschlussstopfen mit dem Ziel der Abdichtung der Punktionsstelle in der Gefäßwand zurückzulassen.

Bis zur vollständigen Blutstillung wurde auf den am Stopfen befestigten Sicherungsfaden ein leichter Zug aufrechterhalten. Daraufhin wurde der Sicherungsfaden auf Hautniveau abgetrennt und die Punktionsstelle mit einem antibiotischen Sprühverband benetzt. Vor jeder weiteren Stopfenapplikation an einem der Versuchstiere wurde am jeweiligen Tag des Versuches die Durchgängigkeit der Gefäße mittels Doppler-Sonographie (Vivid i, GE Healthcare GmbH, Solingen), sowohl proximal als auch distal des zuletzt eingesetzten Verschlussstopfens überprüft.

2.5.4. Beobachtung und Dokumentation der Stopfenapplikationen

Auffälligkeiten und Komplikationen während der Punktionen, Schleusen- oder Stopfenlegungen wurden neben dem Alter, dem Geschlecht und dem Gewicht der Tiere, sowie der Ohrmarkennummern und auch dem verwendeten Stopfenmaterial bei jedem Versuch in einem Formular protokolliert.

Die postprozedurale visuelle Überwachung der Punktionsstelle sollte sowohl der Erkennung von externen Blutungen, als auch dem Nachweis der Bildung von Hämatomformationen dienen.

Zudem wurde die Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand festgehalten. Diese Zeitspanne wird in Anlehnung an die Literatur als Zeit bis zur Hämostase bezeichnet (Silber et al., 1999).

Von einer technisch erfolgreichen Stopfenapplikation wurde in dieser Arbeit gesprochen, wenn bei liegender Zugangsschleuse, in einer Zeit von unter 5 Min., das Applikationsset auf die Schleuse aufgesetzt, der Stopfen in das Gefäßlumen vorgeschoben wurde und danach die Schleuse samt Applikator, bei Zurückbleiben des Stopfens in der Gefäßwand, wieder entfernt worden war. Und wenn zudem nach 5 Min. keine äußerlichen Blutungen mehr sichtbar waren.

2.5.5. Euthanasie der Versuchstiere und Carotidenexplantation

Die Schafe wurden drei Tage nach dem letzten Setzen eines Stopfens (an Tag 27) euthanasiert. Dazu wurde den zuvor sedierten (vgl. 2.5.1) Tieren nach vorheriger intravenöser Gabe von 100 IU/kg KGW Heparin eine Überdosis Pentobarbital (100 mg/kg KGW) intravenös verabreicht. Während der Explantation wurden die Carotiden sowie die Punktionsstelle hinsichtlich auffälliger Veränderungen makroskopisch untersucht.

2.6. Histologie

Die explantierten Carotiden wurden nach ihrer Entnahme an deren caudalen Enden mit einem Faden markiert und nach einer Spülung mit NaCl in ein 50 ml Falcon-Probenröhrchen der Firma Becton, Dickinson und Company mit 4 % Formalinlösung gegeben.

2.6.1. Herstellung von Trenn-Dünnschliffpräparaten

Die Proben für die Dünnschliffpräparate wurden 48 h in 4 % Formalinlösung fixiert und zur Entwässerung je 2 h in aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 %) im offenen Probenröhrchen in einen Exsikkator gestellt. Anschließend wurden die Proben 24 h abgedunkelt bei 4° Celsius zur Einleitung der Infiltration mit Technovit 7200 VLC in ein Gemisch aus 50 % Alkohol und 50 % Technovit 7200 VLC gegeben. Nachfolgend wurden die Proben, ebenfalls für 24 h, abgedunkelt bei 4° Celsius in reines Technovit 7200 VLC gelegt. Dann wurde das Probenmaterial in einem dafür vorgesehenen Einbettungsbehältnis mittels eines Fixationsklebers (Technovit 7230 VLC) befestigt und mit Technovit 7200 VLC ausgegossen. Daraufhin wurde das Einbettungsbehältnis zur vollständigen Aushärtung der Proben je 10 h unter blaues und weißes Licht in ein Lichtpolymerisationsgerät gestellt. Die ausgehärteten Kunststoffblöcke wurden dann mit einer Diamantbandsäge (300 CP Firma Exakt, Norderstedt) unter Wasserkühlung solange zurechtgeschnitten, bis die zu untersuchenden Gewebsschichten hervortraten. Auf der zu untersuchenden Seite des Technovitblocks wurde dann mit Technovit 7210 VLC, einem Einkomponenten-Präzisionskleber, ein Acrylglasobjekträger befestigt, wodurch mit Hilfe der Diamantbandsäge (300 CP Firma Exakt Norderstedt) Schnitte mit einer Dicke von circa 400 µm hergestellt werden konnten. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit einem Tellerschleifgerät (400 Cs Firma Exakt, Norderstedt), zunächst mit Nassschleifpapier (Körnung: 800; 1200) planparallel geschliffen und anschließend mit 4000er Polierpapier poliert. Nach Betrachtung der Nativschnitte, die unter dem Mikroskop zu diesem Zeitpunkt eine Schnittdicke von circa 350 µm aufwiesen, wurden diese unter selbigem mit einem Kameraaufsatz fotografiert und digitalisiert.

2.6.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Die Proben für die Paraffinschnitte wurden 24 h in 4 % Formalinlösung fixiert und dann in 70 % Alkohollösung zum Einbetten in das pathologische Institut der Universität Tübingen verbracht. Die Entwässerung und die Einbettung in Paraffin erfolgten dort maschinell. Die Paraffinblöcke wurden in einer Schnittdicke von 2 µm geschnitten und anschließend auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objekträger aufgezogen.

2.6.3. Histologische Färbungen

2.6.3.1. Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung

Die HE-Färbung ist die am häufigsten angewendete und bekannteste Färbung der Histologie. Sie stellt eine Übersichtsfärbung dar und dient der Unterscheidung von Zellkernen und Cytoplasma. Der basische Kernfarbstoff Hämalaun sorgt für eine Blaufärbung der Zellkerne, wohingegen das saure Eosin für eine Rotfärbung des Cytoplasmas sorgt.

Von den Schnitten der Kunststoff- und Paraffinblöcke wurden HE-Färbungen angefertigt. Zunächst wurden die Präparate dazu in Xylol (5 Min.) entparaffiniert. Darauf folgte zur Rehydrierung der Präparate eine absteigende Alkoholreihe in Ethanol (100 %, 90 %, 70 %, 50 % für jeweils 5 Min.). Nach einer Spülung der Proben in destilliertem Wasser wurden die Objektträger zur Kernfärbung der Präparate in eine Hämatoxylin-Lösung nach Mayer (9 Min.) gegeben. Nach einem fünfzehnminütigen Wasserbad zur Stabilisierung der blauen Farbe wurden die Proben zur Anfärbung des Cytoplasmas in Eosin (2 Min.) gegeben. Darauf folgte eine kurze aufsteigende Alkoholreihe (90 %, 100 %) zur Dehydrierung der Präparate. Nach einem anschließenden Xylolbad (5 Min.) zur Entfernung des Alkohols wurden die Präparate mit Euckit® und einem Deckgläschen eingedeckt.

2.6.3.2. Masson-Trichrom-Färbung

Bei der Masson-Trichrom-Färbung kommen drei Farbstoffe zur Anwendung. Diese Färbung dient vor allem dem besseren Erkennen von Kollagenfasern, welche sich am Ende der Färbeprozedur blau darstellen. Das Cytoplasma stellt sich in dieser Färbung rot und die Kerne stellen sich blau-schwarz/grau-violett dar (Aescht et al., 2010).

Von jedem Paraffinblock wurden zusätzlich Masson-Trichrom gefärbte Schnitte angefertigt. Zunächst wurden die Schnitte 5 Min. in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol (100 %, 90 %, 70 %, 50 % für jeweils 5 Min.) und einem 5-minütigen Bad in destilliertem Wasser rehydriert. Anschließend wurden die Proben für 5 Min. in eine Celestinblaulösung gegeben und im Anschluss mit Aqua dest. gespült. Daraufhin wurden die Proben 5 Min. lang in einer Hämatoxylin-Lösung nach Mayer gefärbt und danach unter Leitungswasser 10 Min. gebläut (Auswaschen des überschüssigen Hämatoxylins). Dann wurden die Schnitte 5 Min. in Säurefuchsinlösung gebadet und danach wiederum mit Aqua

dest. gespült. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 5 Min. in 1 % Phosphormolybdänsäure gegeben. Nach dem Abtropfen der Objektträger folgte eine ebenfalls 5 Min. dauernde Färbung in Methylblau-Lösung. Im letzten Schritt der Färbeprozedur wurden die Proben nach erneuter Spülung mit destiliertem Wasser 2 Min. in 1 % Essigsäure gebadet.

2.6.4. Histomorphologische/Histopathologische Beurteilung

Die Beurteilung der histologischen Paraffin- und Dünnschliffpräparate wurde qualitativ-deskriptiv durchgeführt. Dabei wurden die 0 bis 30 Tage alten Präparate unter besonderer Berücksichtigung der Gefäßmorphologie, entzündlicher Infiltrate, Hämorrhagien, der Lage der Implantate, der Ausbildung von Thromben, dem Einwachsverhalten der Verschlussstopfen in die Gefäßwand (Neointimabildung/Reendothelialisierung), des Degradationsverhaltens des Stopfenmaterials und hinsichtlich der Wundheilung ausgewertet. Die histologische Befundung wurde mittels eines Durchlichtmikroskops (Optiphot – 2, Nikon, Tokio; Photomakroskop M400, Wild, Heerbrugg) unter 4- bis 40-facher Vergrößerung vorgenommen. Anschließend erfolgte mit der über einen Aufsatz mit dem Mikroskop verbundenen Fotokamera (Dslr, Nikon, Tokio) und unter Verwendung der Bildbearbeitungssoftware (EOS Utility, Canon, Tokio) die Digitalisierung der histologischen Präparate.

IV. ERGEBNISSE

1. In-vitro-Tests

1.1. Testung der Rückstellkraft und des Spannverhaltens

Die Resultate der Testung (siehe Abbildung 14) bezüglich des Rückstellvermögens und des Einzugverhaltens der Stopfen führten zu einer Konzentration von ursprünglich 10 Materialien auf dann nur noch sechs Materialien (MEUV 7, MEUV 11, MQ 3, MQ 3 violett, MQ 2 violett), die in noch ausstehenden Versuchen im Hinblick auf weitere Parameter (siehe unten) getestet werden sollten. Bei der Auswahl wurde neben einer guten Rückstellkraft auch auf einen mittleren bis starken Kraftaufwand beim Einziehen des Stopfens in den Testapplikator geachtet.

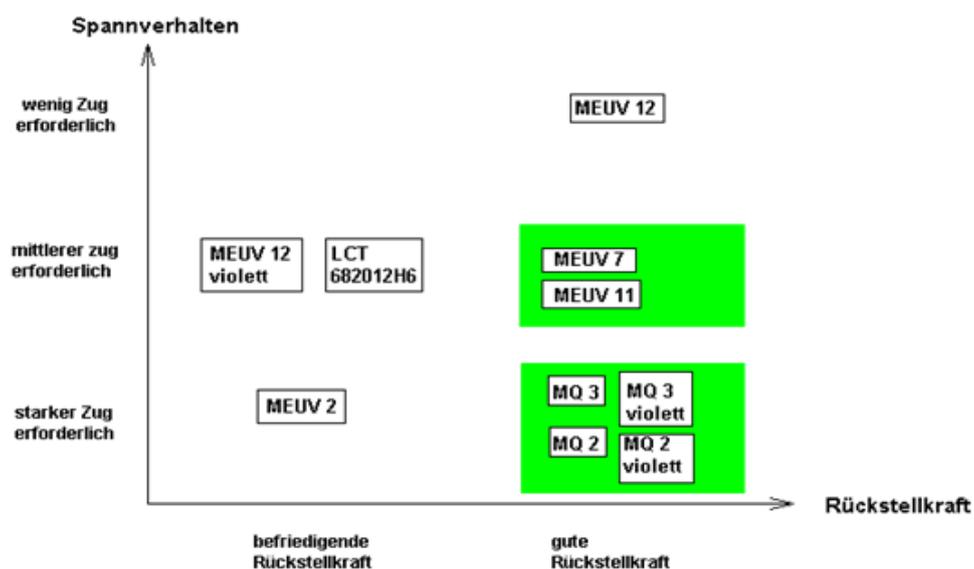


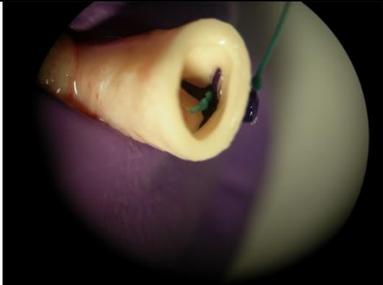
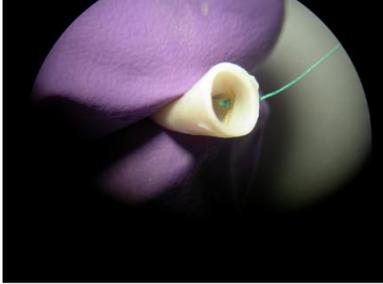
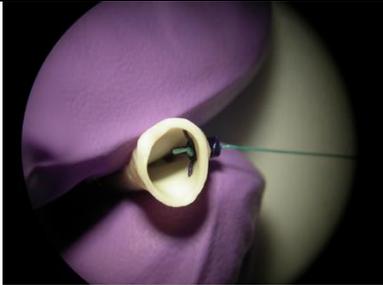
Abbildung 14: Ergebnisübersicht der Spann- und Rückstelltestungen

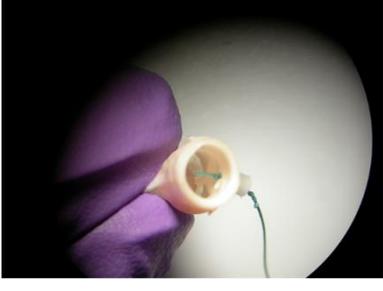
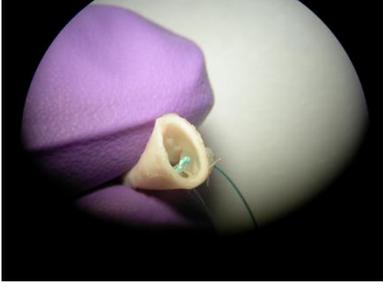
(Die grün markierten Materialien wurden für weitere Testungen berücksichtigt.)

1.2. Flussmodell

Vier der getesteten Verschlussstopfen (MQ 2 violett, MQ 3, MQ 3 violett, MEUV 12 violett) ließen sich nach Entfernung der Gefäßzugangsschleuse unter leichtem Zug am Sicherungsfaden in der Gefäßwand sicher verankern, aber auch bei einem mittleren Kraftaufwand nicht aus dieser herausziehen. Das Stopfenmaterial MEUV 2 wies bis auf den etwas leichteren Einzug in die Gefäßwand die gleichen Eigenschaften wie die anderen Materialien auf. Nur der Verschlussstopfen aus dem Material MEUV 12 ließ sich bereits unter relativ geringem Kraftaufwand aus dem Gefäß herausziehen (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammenstellung der Ergebnisse des Flussmodell-Versuchs.

Getestetes Stopfenmaterial	Verhalten und Lage im Gefäß	Bild des Stopfens im Gefäß nach Entnahme aus dem Flussmodell
MQ 2 violett	Lässt sich nach leichtem Zug in die Gefäßwand ziehen. Ein Herausziehen des Stopfens aus der Gefäßwand unter mittlerem Zug ist nicht möglich.	
MQ 3	Siehe oben.	
MQ 3 violett	Siehe oben.	

MEUV 12 violett	Siehe oben.	
MEUV 2	Lässt sich etwas leichter als die anderen Stopfen in die Gefäßwand ziehen. Sonst siehe oben.	
MEUV 12	Lässt sich nach leichtem Zug in die Gefäßwand ziehen. Der Stopfen lässt sich durch mäßigen Zug aus der Gefäßwand herausziehen.	

1.3. Hämokompatibilitätstest

1.3.1. Erythrozyten

Die Erythrozytenanzahl betrug vor dem Kontakt mit dem Stopfenmaterial im Mittel (arithmetisches Mittel vom Blut der 3 Spender vor der Inkubation) $4,23 \pm 0,43 \times 10^6 / \mu\text{l}$ (Baseline-Wert) (siehe Abbildung 15). In der Kontrollgruppe (Blut ohne Verschlussstopfen) wurde nach 90 Min. eine mittlere Anzahl an Erythrozyten von $4,10 \pm 0,24 \times 10^6 / \mu\text{l}$ ermittelt. MEUV 11 wies mit $4,20 \pm 0,34 \times 10^6 / \mu\text{l}$ eine geringfügig höhere Anzahl an Erythrozyten als die Kontrollgruppe auf. Alle anderen Proben nahmen Werte knapp unterhalb des Kontrollwertes an. Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Materialien und der Kontrollgruppe (90 Min.) festgestellt werden.

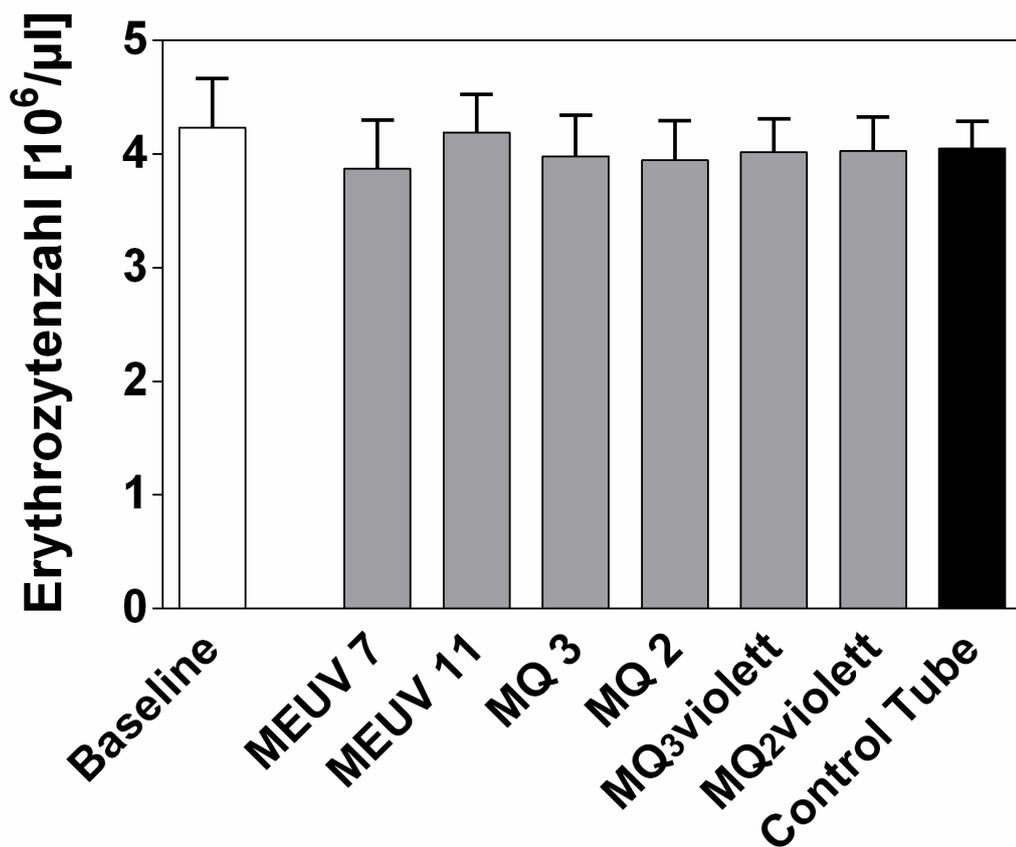


Abbildung 15: Mittelwerte der Erythrozytenzahl \pm SD (n=3) [$10^6 / \mu\text{l}$] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.2. Leukozyten

Der Baseline-Wert der Leukozytenanzahl betrug $4,60 \pm 0,17 \times 10^3/\mu\text{l}$ (siehe Abbildung 16). Bei den Proben mit den Stopfenmaterialien MEUV 7, MQ 3 und MQ 2 violett bestand nach 90-minütiger Inkubation mit einem Wert von $4,00 \pm 0,578 \times 10^3/\mu\text{l}$ keine Veränderung zur Kontrollgruppe. Die Proben MEUV 11, MQ 2 und MQ 3 violett wiesen eine geringfügig niedrigere Leukozytenanzahl als in der Kontrollgruppe auf. Zwischen den Proben mit den Stopfenmaterialien und der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

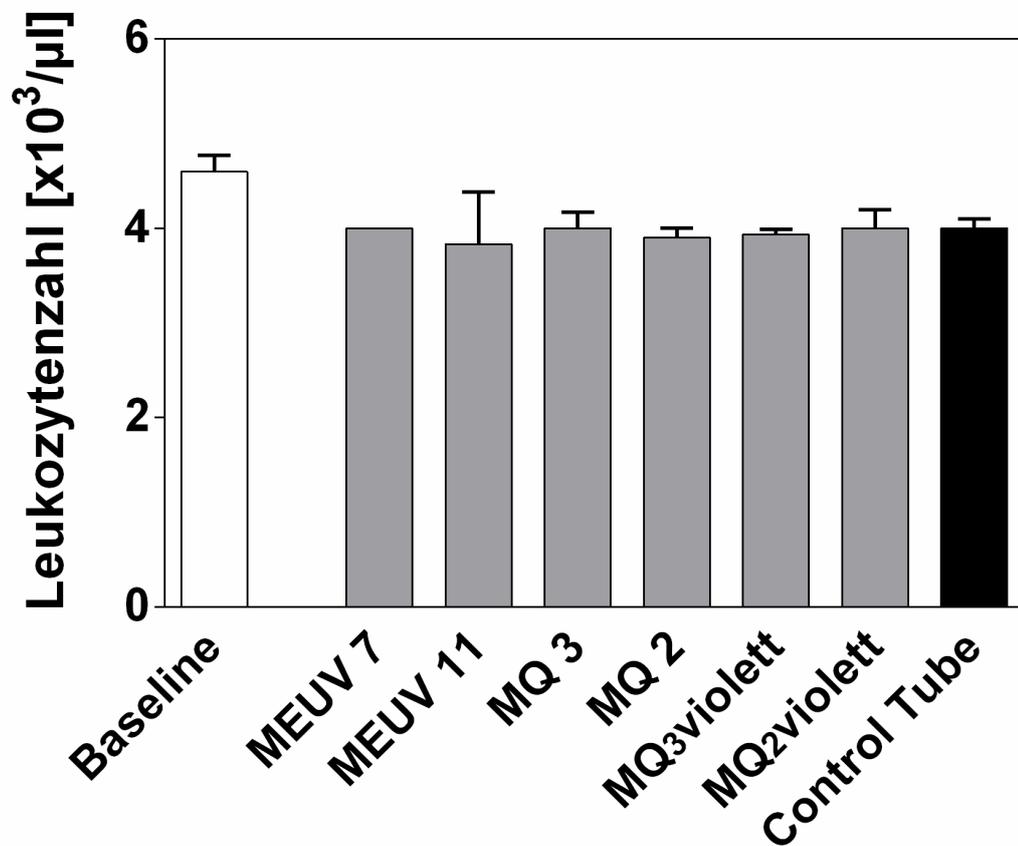


Abbildung 16: Mittelwerte der Leukozytenzahl \pm SD (n=3) [$10^3/\mu\text{l}$] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.3. Thrombozyten

Der Mittelwert der im Zellcounter ermittelten Thrombozytenanzahl lag bei allen Blutproben unter dem Baseline-Wert von $203,67 \pm 40,28 \times 10^3/\mu\text{l}$ (siehe Abbildung 17). Auch die Kontrollgruppe hatte nach 90 Minuten mit einem Wert von $165,00 \pm 38,20 \times 10^3/\mu\text{l}$ ein geringeres Niveau als der Baseline-Wert. Die Proben MEUV 11 und MQ 2 blieben mit einer Thrombozytenzahl von $156,00 \pm 8,00 \times 10^3/\mu\text{l}$ und $151,33 \pm 21,73 \times 10^3/\mu\text{l}$ unter dem Wert der Kontrollgruppe (nach 90 Min.). Die übrigen Proben blieben nach 90-minütiger Inkubation mit dem Stopfenmaterial knapp über dem Kontrollwert (nach 90 Min.). In keinem der Probenröhrchen konnten aber im Vergleich mit der Kontrollgruppe statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf die Thrombozytenzahl ermittelt werden.

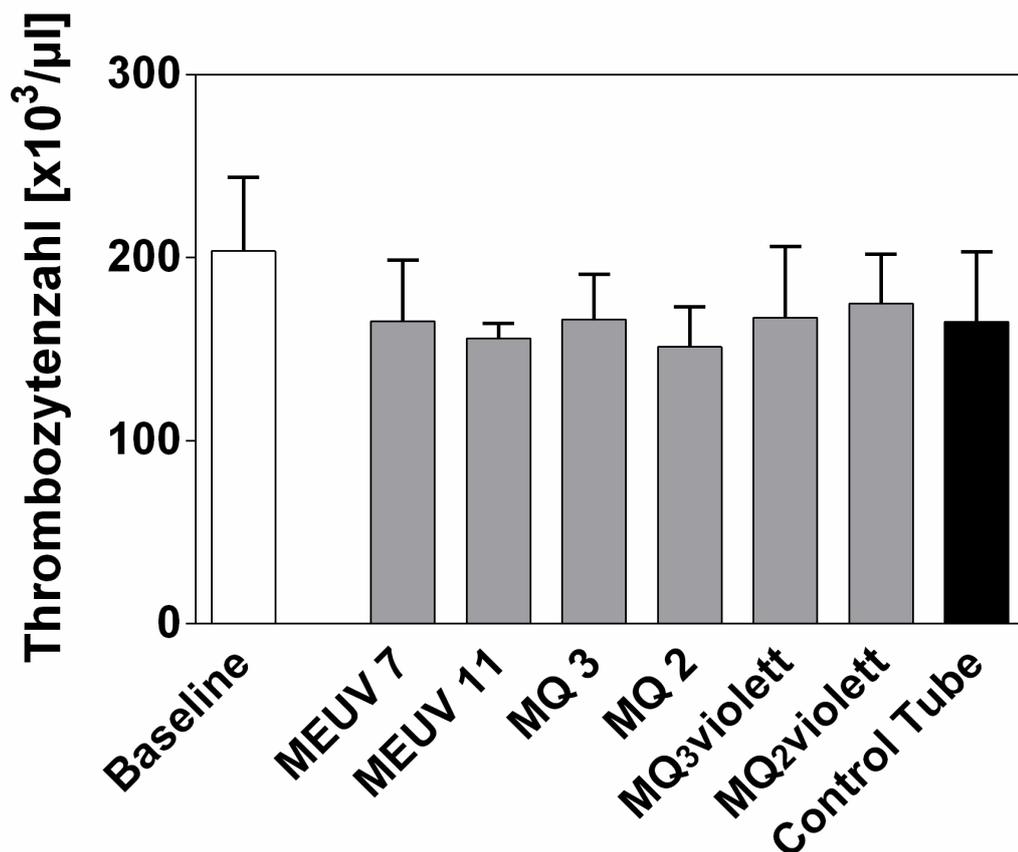


Abbildung 17: Mittelwerte der Thrombozytenzahl \pm SD ($n=3$) [$10^3/\mu\text{l}$] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.4. β -Thromboglobulin (β -TG)

Die β -TG-Konzentration betrug bei der Kontrollgruppe nach 90 Min. Inkubation $856,88 \pm 436,50$ IU/ml (siehe Abbildung 18). Der Baseline-Wert lag bei $43,23 \pm 13,532$ IU/ml. Den niedrigsten Wert nach 90 Min. erzielte die Probe mit dem Stopfenmaterial MQ 2 violett mit $626,91 \pm 221,92$ IU/ml. Der höchste Wert mit $1091,20 \pm 876,51$ IU/ml wurde im Blut der Probe MQ 2 gemessen. Trotz sichtbarer Unterschiede zwischen einigen Materialien und der Kontrollgruppe konnten keine statistisch signifikanten Differenzen festgestellt werden.

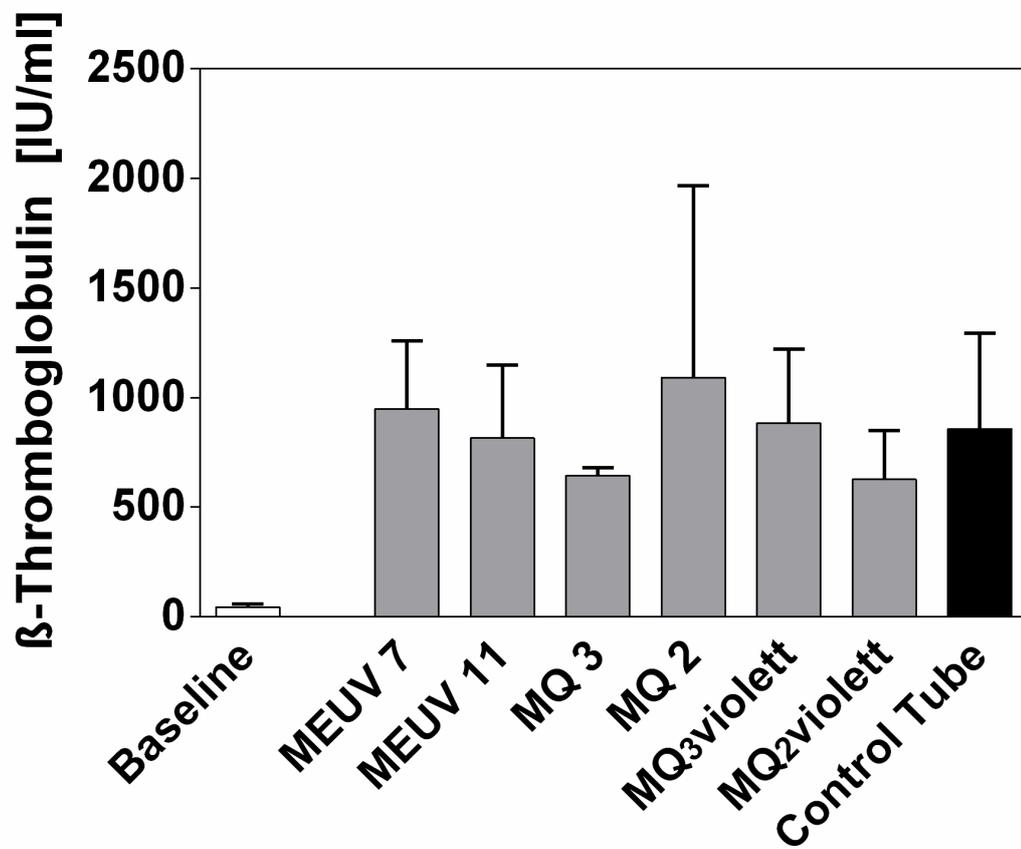


Abbildung 18: Mittelwerte der β -TG-Konzentrationen \pm SD (n=3) [IU/ml] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.5. Thrombin-Anti-Thrombin-Komplex (TAT)

Die TAT-Konzentration, die einen Marker für die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung darstellt, hatte bei den drei Spendern vor dem Kontakt mit dem Stopfenmaterial einen mittleren Baseline-Wert von $3,82 \pm 1,47 \mu\text{g/l}$ (siehe Abbildung 19). Die Kontrollgruppe zeigte nach 90 Min. in der Rocking Platform einen mittleren Wert von $142,74 \pm 153,73 \mu\text{g/l}$. Die Probe MQ 3 wies mit $96,26 \pm 98,93 \mu\text{g/l}$ von allen mit Stopfenmaterial versehenen Proben die niedrigste mittlere TAT-Konzentration nach 90 Min. auf. Wohingegen die Probe MQ 3 violett mit $162,85 \pm 174,05 \mu\text{g/l}$ die höchste mittlere TAT-Konzentration aufwies. Statistisch konnten keine Unterschiede zwischen den Materialproben und der Kontrollgruppe ausfindig gemacht werden.

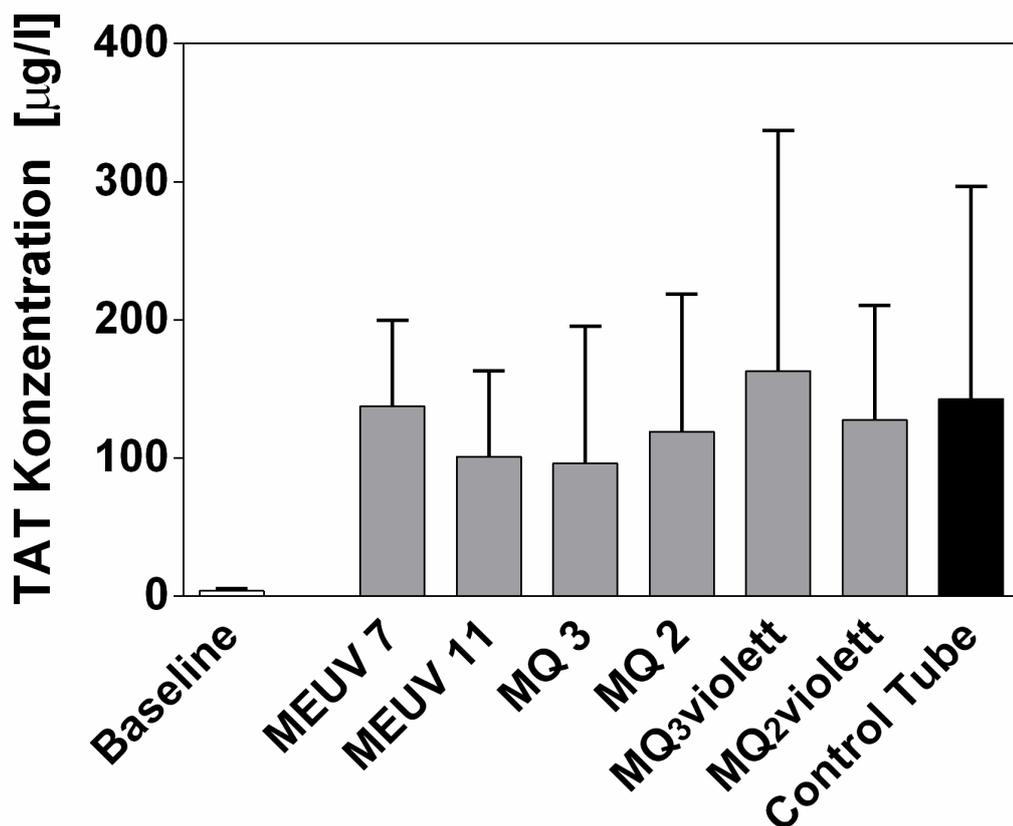


Abbildung 19: Mittelwerte der TAT-Konzentrationen \pm SD (n=3) [$\mu\text{g/l}$.] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.6. SC5b-9 (Terminaler Komplementkomplex (TCC))

Die SC5b-9 Konzentration, ein Indikator für das Maß der Aktivierung des Komplementsystems im Probenblut, hatte einen mittleren Baseline-Wert von $100,36 \pm 21,51$ ng/ml (siehe Abbildung 20). Nach 90 Min. auf dem Horizontalschüttler (Rocking Platform) wies die Kontrollgruppe eine Konzentration von $532,29 \pm 191,68$ ng/ml auf. Die Konzentrationen aller mit Stopfenmaterial versehener Proben lag nach 90 Min. über dem Kontrollwert, wobei die Probe MEUV 7 mit $666,00 \pm 119,97$ ng/ml die geringste Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe aufwies und MEUV 11 mit $770,41 \pm 242,78$ ng/ml die höchste Konzentration. Signifikante Differenzen zwischen den Proben mit dem Verschlussstopfenmaterial und der Kontrollgruppe bestanden nicht.

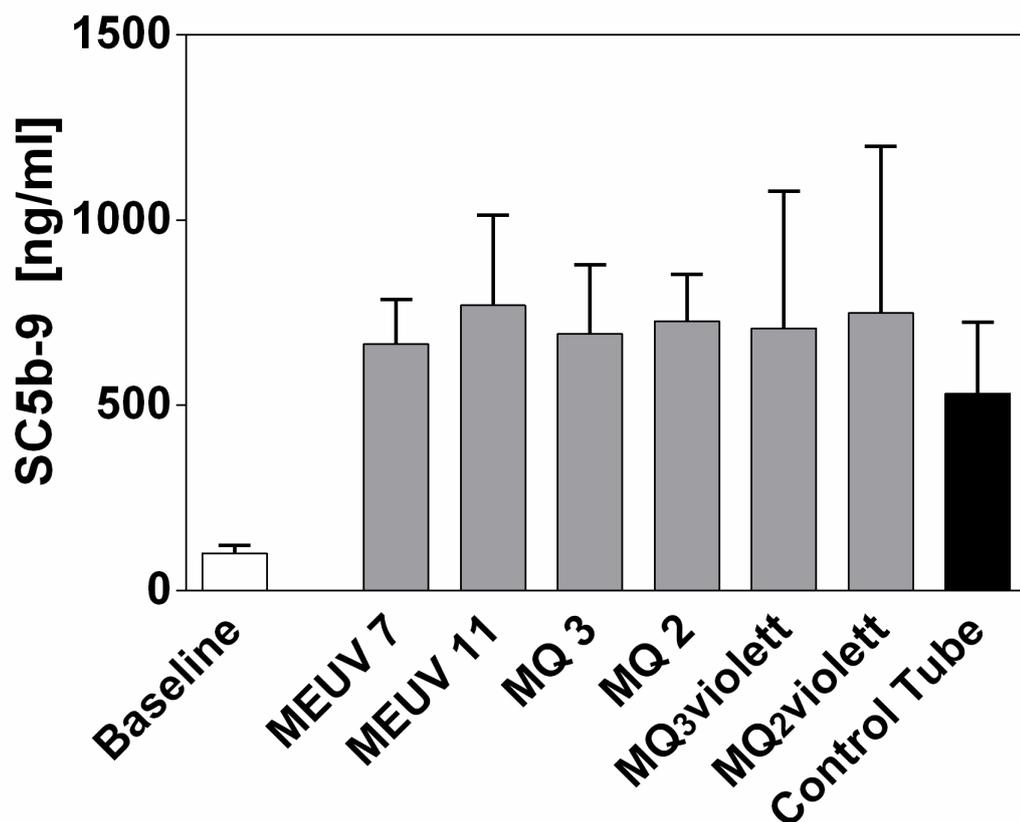


Abbildung 20: Mittelwerte der SC5b-9-Konzentrationen \pm SD (n=3) [ng/ml] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.7. PMN-Elastase

Bei der PMN-Elastase handelt es sich um eine in den azurophilen Granula der PMN (polymorphkernigen Granulozyten) lokalisierte Proteinase. Diese und andere Proteinasen werden von den neutrophilen Granulozyten zur Verdauung von untergegangenen Gewebe und körperfremdem Material verwendet. Die PMN-Elastase-Konzentration kann als Indikator für die Aktivierung der Granulozyten verwendet werden. Die PMN-Konzentration aller Proben (inklusive Kontrollgruppe) war nach 90-minütiger Inkubation im Vergleich zum Baseline-Wert deutlich erhöht. Der mittlere Baseline-Wert betrug $58,75 \pm 13,57 \mu\text{g/l}$ (siehe Abbildung 21). Die Kontrollgruppe (nach 90 Min.) wies einen Wert von $432,47 \pm 186,64 \mu\text{g/l}$ auf. Am weitesten über dem Wert der Kontrollgruppe lag mit $585 \pm 217,91 \mu\text{g/l}$ die Konzentration der Probe MEUV 7. Die niedrigste Konzentration an PMN-Elastase hatte die Probe MQ 3 mit einem Wert von $371,83 \pm 132,80 \mu\text{g/l}$. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe errechnet werden.

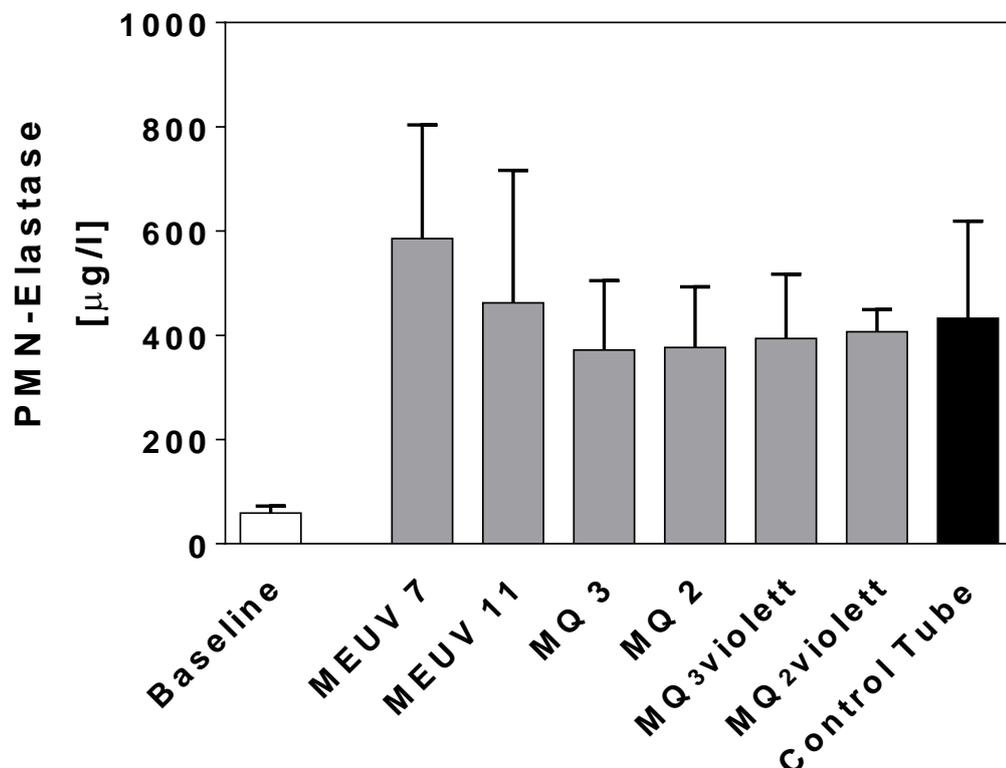


Abbildung 21: Mittelwerte der PMN-Elastase-Konzentrationen \pm SD (n=3) [$\mu\text{g/l}$] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.

1.3.8. Rasterelektronenmikroskopisches Bildmaterial

Die Betrachtung und Auswertung des rasterelektronenmikroskopischen Bildmaterials visualisierte eine meist lokale, aber zum Teil auch diffuse Adhäsion von Thrombozyten, Erythrozyten, Fibrinfäden und auch Leukozyten auf der Oberfläche der zuvor in Humanblut inkubierten Verschlussstopfen (siehe Tabellen 12-14 sowie Abbildungen 22-24) . Die Adhäsionen der Blutzellen waren jedoch vom jeweiligen Stopfenmaterial unabhängig und sind somit auf den jeweiligen Blutspender zurückzuführen.

Tabelle 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Verschlussstopfen nach 90-minütiger Inkubation mit Spenderblut (Ansicht von ventral; 40x Vergrößerung).

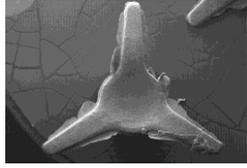
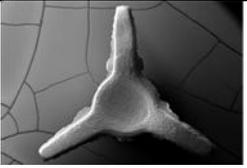
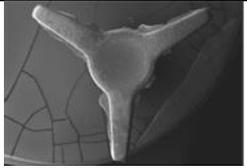
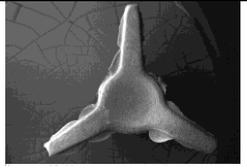
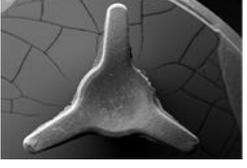
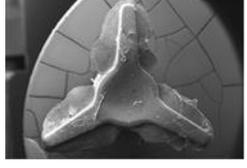
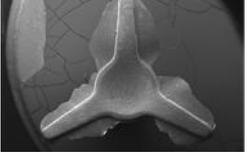
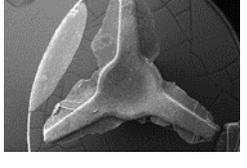
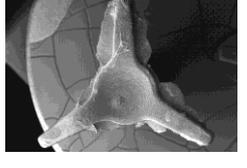
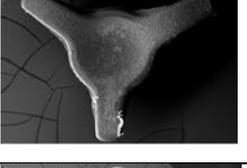
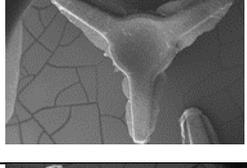
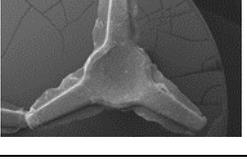
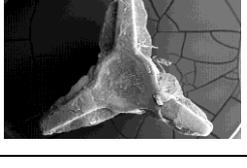
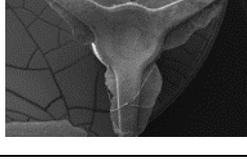
Material	Spender 1	Spender 2	Spender 3
MEUV 7			
MEUV 11			
MQ 3			
MQ 2			
MQ 3 violett			
MQ 2 violett			

Tabelle 13: REM-Aufnahmen der Verschlussstopfen nach Inkubation (90 Min.) mit Spenderblut (Ansicht von dorsal; 40x Vergrößerung).

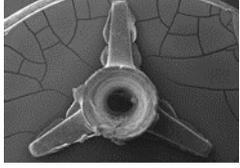
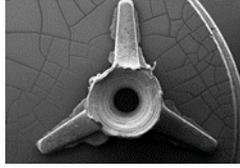
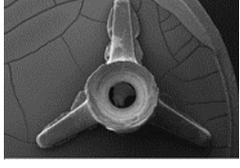
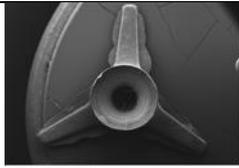
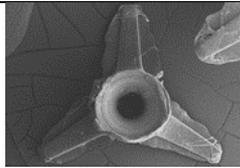
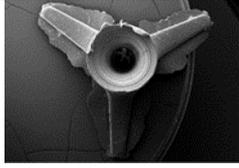
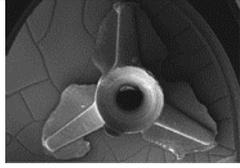
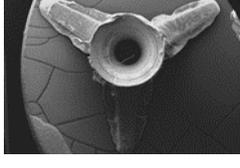
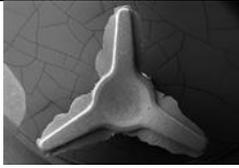
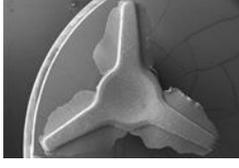
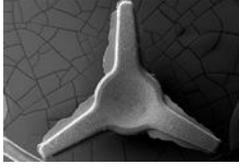
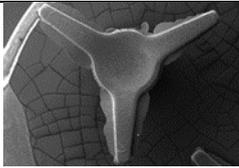
Material	Spender 1	Spender 2	Spender 3
MEUV 7	Kein Bild		
MEUV 11	Kein Bild		
MQ 3			
MQ 2			
MQ 3 violett			
MQ 2 violett			

Tabelle 14: REM-Aufnahmen der nicht mit Spenderblut inkubierten Negativkontrollen (Ansicht von ventral; 40x Vergrößerung).

Material	Negativkontrolle
MEUV 7	 A scanning electron micrograph (SEM) showing a three-lobed, Y-shaped structure, likely a biological specimen, viewed from a ventral perspective. The structure is light gray against a dark background.
MEUV 11	Kein Bild
MQ 3	 A scanning electron micrograph (SEM) showing a three-lobed, Y-shaped structure, similar to MEUV 7, viewed from a ventral perspective. The structure is light gray against a dark background.
MQ 2	 A scanning electron micrograph (SEM) showing a three-lobed, Y-shaped structure, viewed from a ventral perspective. The structure is light gray against a dark background.
MQ 3 violett	 A scanning electron micrograph (SEM) showing a three-lobed, Y-shaped structure, viewed from a ventral perspective. The structure is light gray against a dark background.
MQ 2 violett	 A scanning electron micrograph (SEM) showing a three-lobed, Y-shaped structure, viewed from a ventral perspective. The structure is light gray against a dark background.

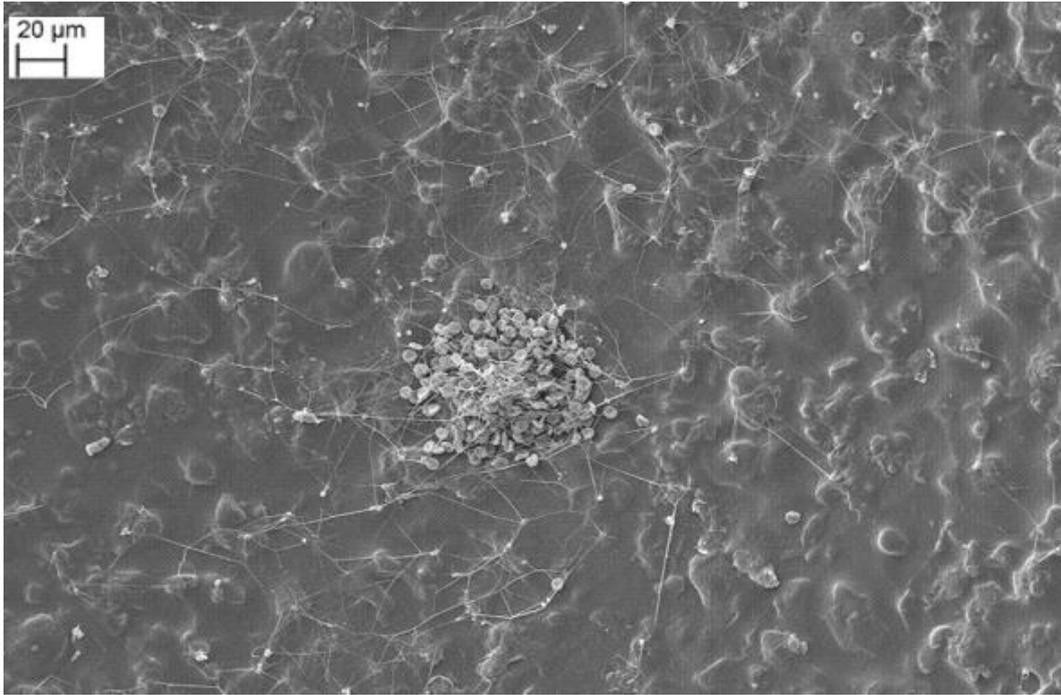


Abbildung 22: Punktuelle Besiedlung der Stopfenoberfläche (MQ 2 violett, inkubiert mit Blut von Spender 1) mit Erythrozyten (500x Vergrößerung).

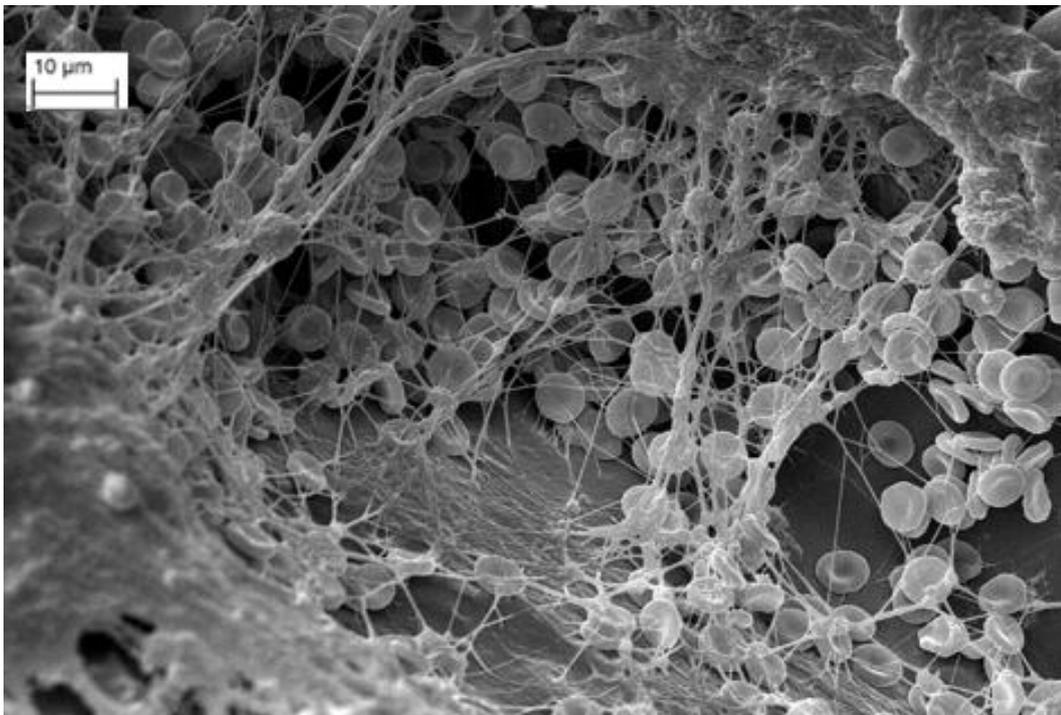


Abbildung 23: Erythrozyten und Fibrinfäden auf MEUV 11-Stopfen (Spender 1) (2000x Vergrößerung).

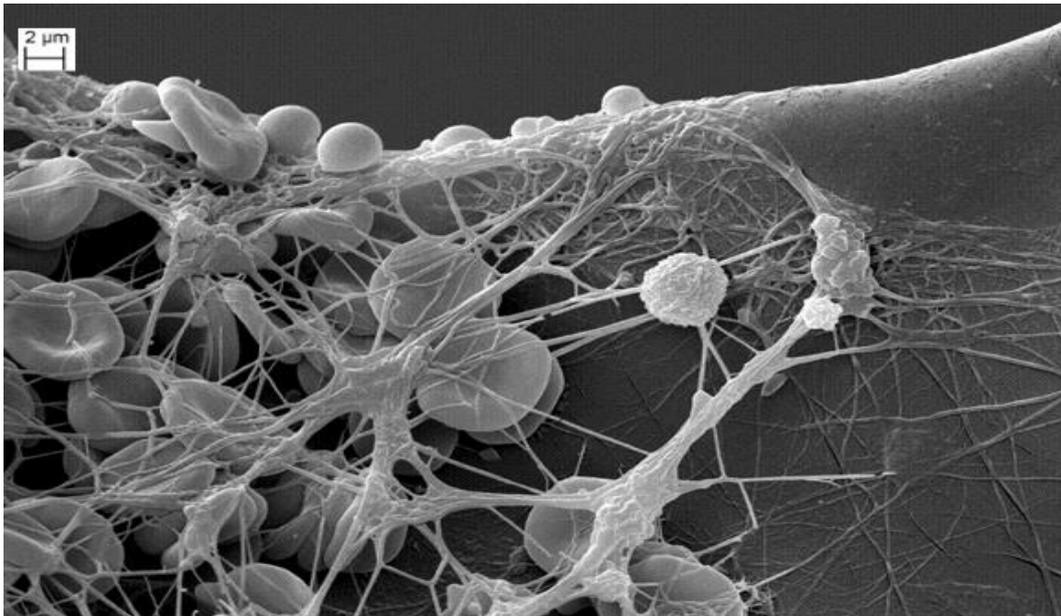


Abbildung 24: Erythrozyten und Fibrinfäden auf MEUV 11-Stopfen (Spender 1) (5000x Vergrößerung).

1.4. Stopfendesign (Flügelanzahl)

Alle Stopfen verschlossen erwartungsgemäß die zuvor mit der Punktionsnadel und der Schleuse gesetzte Läsion in der Gefäßwand (siehe Abbildung 25). Sämtliche Verschlussstopfen lagen nach der Implantation mit ihren Flügeln der Gefäßwand an und waren auch durch leichte bis mittlere Zugkräfte am Faden nicht aus der Arterie herauszuziehen. Während der Explantation des Gefäßes wurde jedoch der Sicherungsfaden eines 4-flügeligen Stopfens durch einen versehentlichen Scherenschlag durchtrennt. Daraufhin kam es zu einer Dislokation des Stopfens in das Gefäßlumen. Zudem kam es bei einem der 6-flügeligen Verschlussstopfen zum Abbruch eines Flügels.

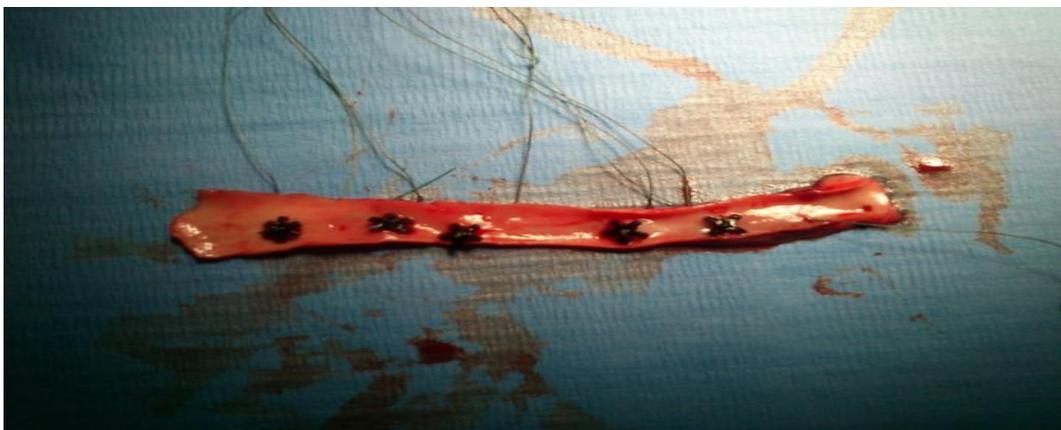


Abbildung 25: Lage von Verschlussstopfen mit unterschiedlicher Flügelanzahl.

1.5. Dichtigkeitstest/Designstudie

Ergebnisse der ersten Testung:

In der Bewertung des ersten Dichtigkeitstests (siehe Tabellen 15 und 16) konnten lediglich zwei der drei Stopfen miteinander verglichen werden (Abbildungen 26 und 27), da nur der 77°-Verschlussstopfen sowie der 85°-Verschlussstopfen eine ähnliche (vergleichbare) Position im Gefäß aufwiesen. Der 90°-Stopfen wurde nicht korrekt implantiert und konnte deshalb nicht berücksichtigt werden.

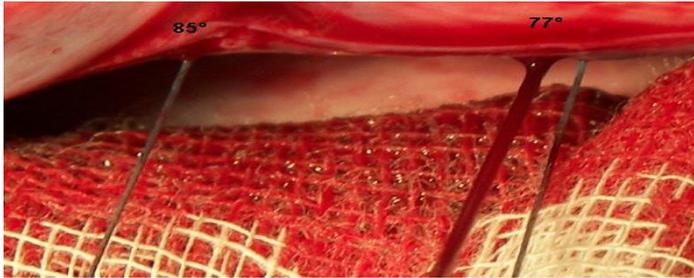


Abbildung 26: Blutaustritt beim Dichtigkeitstest mit unterschiedlichen Winkelungen der Stopfenbasis (Ansicht von oben).

Tabelle 15: Ergebnistabelle des ersten Dichtigkeitstest.

Winkelung Stopfen	Grad der Blutung	Bewertung Dichtigkeit
77°	starke Blutung (im Strahl)	mangelhaft
85°	Sickerblutung	gut



Abbildung 27: Lage der Stopfen nach dem ersten Dichtigkeitstest (Ansicht der Gefäßinnenseite).

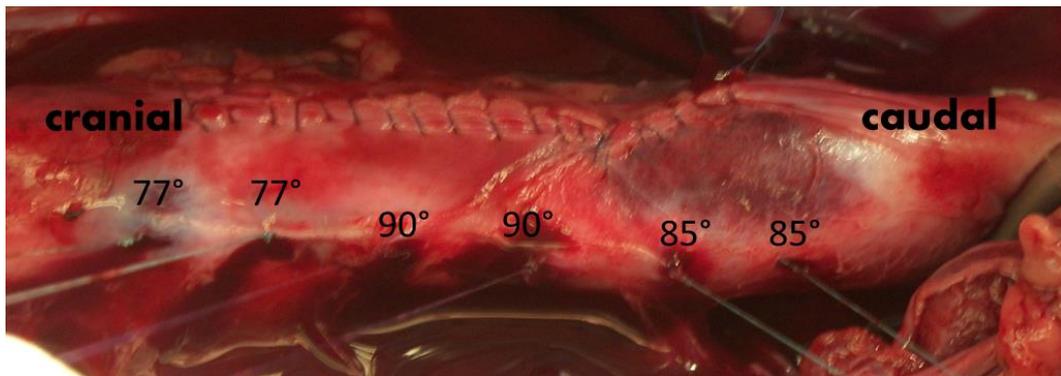
Tabelle 16: Ergebnisse der Lagebewertung nach dem ersten Dichtigkeitstest.

Winkelung Stopfen	Lage des Verschlussstopfens nach Eröffnung des Gefäßes
77°	ein Flügel im Stichkanal
85°	ein Flügel im Stichkanal

Da das Ergebnis aufgrund der sehr gering gewählten Fallzahl ($n = 1$) pro Stopfenmaterial nur sehr bedingt aussagekräftig ist, konnten aus diesem Materialprüfungsversuch nur erste Hinweise gewonnen werden.

Ergebnisse der 2. Testung:

Bei einem zweiten mit einer erhöhten Fallzahl ($n = 2$) pro Stopfenmaterial durchgeführten Test kam es bei allen implantierten Stopfen zu einer leichten Blutung (siehe Abbildung 28). Daher wurden alle sechs untersuchten Verschlussstopfen in der Kategorie Dichtigkeit mit „befriedigend“ beurteilt.

**Abbildung 28: Blutaustritt beim zweiten Dichtigkeitstest.**

Nach der Eröffnung des Gefäßes konnte lediglich bei einem der 85° Stopfen alle Flügel im Lumen vorgefunden werden. Bei allen anderen Verschlussstopfen befand sich jeweils einer der Flügel in der Gefäßwand (siehe Abbildung 29).

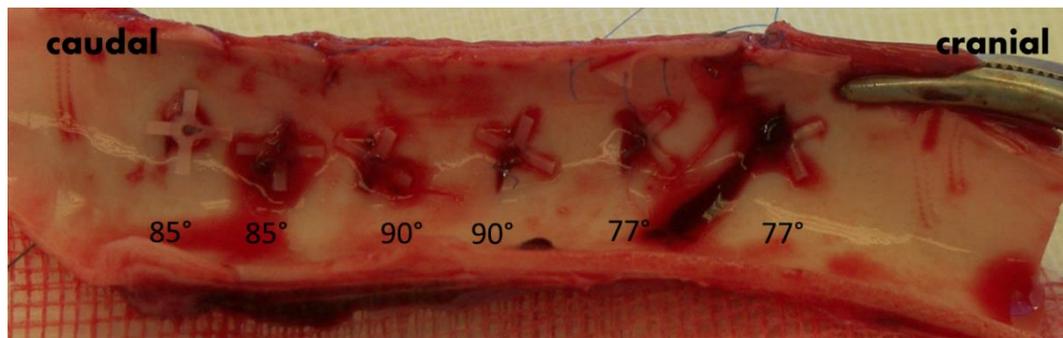


Abbildung 29: Lage der Stopfen nach dem zweiten Dichtigkeitstest (Ansicht der Gefäßinnenseite).

2. In-vivo-Tests

2.1. Versuchsbeobachtungen

Insgesamt wurden bei sechs Schafen 29 Versuche unternommen jeweils eine derer beiden Carotiden zu punktieren, dann über Seldinger-Technik eine Zugangsschleuse zu legen und letztlich einen die Punktionsstelle verschließenden Verschlussstopfen in der Gefäßwand zurückzulassen (siehe Tabellen 17-22).

In drei der 29 Fälle war eine Schleusenlegung nicht möglich, da die Zugangsschleuse aufgrund eines zu großen Gewebewiderstands nicht vorgeschoben werden konnte. Bei einem weiteren Schaf konnte zwar die Gefäßzugangsschleuse gelegt werden, jedoch wurde durch einen zu starken Zug am Sicherungsfaden der mit diesem verbundene Verschlussstopfen wieder aus dem Gefäß herausgezogen.

25 der 29 Stopfenapplikationen waren technisch erfolgreich (Definition siehe Material und Methodenteil). Wobei wiederum bei vier der 25 erfolgreichen Stopfenapplikationen jeweils nicht die geplante Punktionsseite mit einer Schleuse bestückt werden konnte, da entweder die Punktion (3x) selbst oder das Vorschieben der Schleuse (1x) nicht möglich war.

Bei 21 der 25 technisch erfolgreichen Stopfenapplikationen gelang es, bei bereits liegender Gefäßzugangsschleuse in einem Zeitraum unter 90 s sowohl die Applikationsvorrichtung auf die Schleuse aufzustecken, diese in das Gefäß vorzuschieben, daraufhin die Schleuse samt Applikator wieder aus dem Gefäß herauszuziehen und dabei die Punktionsstelle mit dem Verschlussstopfen zu

verschließen, sodass ein kompletter Stopp der äußerlich sichtbaren Blutung erreicht war. Nur bei drei Applikationen betrug die Zeit bis zur Hämostase zwischen 90-180 s und lediglich in einem der 25 Fälle dauerte es länger als 180 s, bis ein äußerlich sichtbarer Blutungsstopp erreicht war.

Von den 25 technisch erfolgreichen Applikationen wurden nach der Explantation der Gefäße 16 Stopfen (64 %), die in der Gefäßwand verankert waren, aufgefunden. fünf Stopfen (20 %) lagen im umliegenden Gewebe und weitere vier Stopfen (16 %) wurden weder im Gewebe noch in der Gefäßwand aufgefunden.

Tabelle 17: Beobachtungen Versuchstier Nr. 1 (Schaf 1).

Versuchstag	Punktionsseite	Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand			Komplikationen
		< 90 s	Zwischen 90 – 180 s	> 90 s	
Tag 0	rechts	X			keine
Tag 8	links	X			keine
Tag 16	rechts				Beim Ziehen der Schleuse und Entfalten des Stopfens versehentliches Herausziehen des Verschlussstopfens aus der A. Der Stopfen ist nur in der Unterhaut platziert und nicht im Gefäß.
Tag 21	links/rechts				Punktion gelingt sowohl links als auch rechts, jedoch ist es nicht möglich, die Schleuse vorzuschieben. (eventuell auf Narbengewebe zurückzuführen).
Tag 24	links	X			keine
Tag 28	links	X			rechte A. carotis wurde getroffen, der Seldinger-Draht konnte aber nicht vorgeschoben werden. dann Wechsel auf linke Seite, dort dann Schleusenlegung komplikationslos.
Tag 32	links	X			rechts war eine Punktion nicht möglich, aber auf der linken Seite komplikationslos.
Tag 36	rechts	X			keine
Tag 38					Explantation

Tabelle 18: Beobachtungen Versuchstier Nr. 2 (Schaf 2).

Versuchstag	Punktionsseite	Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand			Komplikationen
		< 90 s	Zwischen 90 – 180	> 90 s	
Tag 0	links	X			rechts gelingt die Punktion nicht
Tag 6	rechts	X			mehrere Punktionen notwendig
Tag 12	links	X			keine
Tag 13					Exitus/ Explantation

Tabelle 19: Beobachtungen Versuchstier Nr. 3 (Schaf 3).

Versuchstag	Punktionsseite	Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand			Komplikationen
		< 90 s	Zwischen 90 – 180 s	> 90 s	
Tag 0	links	X			keine
Tag 7	rechts	X			wenig Blutfluss aus der Schleuse (nicht sicher ob im Gefäß)
Tag 14	links	X			keine
Tag 21	rechts/links				Punktion war sowohl links als auch rechts möglich, jedoch nicht das Verschieben der Schleuse
Tag 28	rechts	X			keine

Tabelle 20: Beobachtungen Versuchstier Nr. 4 (Schaf 4).

Versuchstag	Punktionsseite	Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand			Komplikationen
		< 90 s	Zwischen 90 – 180 s	> 90	
Tag 0	links	X			keine
Tag 7	rechts		X		keine
Tag 14	links/rechts				Schleuse nicht verschiebbar.
Tag 21	links	X			keine
Tag 28	rechts	X			keine

Tabelle 21: Beobachtungen Versuchstier Nr. 5 (Schaf 5).

Versuchstag	Punktionsseite	Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand			Komplikationen
		< 90 s	Zwischen 90 – 180 s	> 90 s	
Tag 0	links		X		keine
Tag 7	rechts	X			keine
Tag 14	rechts	X			keine
Tag 21	links	X			keine

Tabelle 22: Beobachtungen Versuchstier Nr. 6 (Schaf 6).

Versuchstag	Punktionsseite	Zeit vom Aufsetzen des Applikationssets auf die Zugangsschleuse bis zum vollständigen äußeren Blutungsstillstand			Komplikationen
		< 90 s	Zwischen 90 – 180 s	> 90 s	
Tag 0	rechts		X		links gelingt die Punktion nicht
Tag 7	links	X			keine
Tag 14	rechts			X	relativ starke Blutung
Tag 21	links	X			keine

2.2. Zustand der Tiere während und nach der Stopfenlegung

Bei einem der Tiere kam es zu einer narkosebedingten Aufgasung des Pansens, dieser wurde mit dem Legen einer oro-ruminalen Sonde gegengesteuert. Bei einer anderen Punktion kam es beim selben Tier noch vor dem Legen der Zugangsschleuse zu einem Herzstillstand. Nach erfolgter Renanimation und der Gabe von Adrenalin setzten der Herzschlag und die Atmung jedoch nach kurzer Zeit wieder ein und das Tier überlebte ohne einen Schaden davonzutragen. Schaf 2 verendete einen Tag nach der an ihm durchgeführten 3. Punktion. Das Tier wies nachmittags einen stark aufgegasen Pansen auf, wurde (leider erfolglos) behandelt und ist dann vermutlich (keine Sektion durchgeführt) an den Folgen der Pansentympanie verstorben. Die am vorherigen Tag durchgeführte Punktion war

völlig komplikationslos verlaufen. Bei allen anderen Stopfenlegungen zeigten die Tiere ihren klinischen Allgemeinzustand betreffend keine Auffälligkeiten. Auch jeweils am Tag nach der Punktion waren die durchgeführten klinischen Untersuchungen unauffällig. Lediglich waren bei zwei Tieren nach jeweils einer Punktion, palpatorisch kleinere Verdickungen (< 2 cm) im Halsbereich feststellbar, die wohl auf Blutungen, verursacht durch Fehlpunktionen, zurückzuführen sind. Der Gewichtsverlauf der Versuchstiere unterlag während des Versuchszeitraums nur kleineren Schwankungen. Zudem konnte bei allen Tieren mittels der Doppler-Sonographie vor der jeweiligen Stopfenapplikation die Durchgängigkeit der A. carotis festgestellt werden.

2.3. Makroskopische Beurteilung der Carotiden

Bei der makroskopischen Betrachtung der noch in situ befindlichen Arterien wurden keine signifikanten Komplikationen, wie größere äußerlich sichtbare Hämatome in der Umgebung der Punktionsstelle oder Gefäßläsionen beobachtet. Lediglich im Gewebe um die null und zwei Tage alten Stopfen herum waren kleinere frische Blutungen zu erkennen, die wohl auf die Punktion bzw. die Punktionsversuche für die Schleusenlegung zurückzuführen waren.

2.4. Histomorphologische Beurteilung

Es wurden alle Gefäßabschnitte ($n = 16$) in denen ein Verschlussstopfen in der Gefäßwand zum Liegen gekommenen war histomorphologisch beurteilt. Zudem wurden exemplarisch zwei der fünf im umliegenden Gewebe vorgefundenen Stopfen einer Beurteilung unterzogen. Unabhängig vom jeweiligen Versuchstier konnte somit eine kontinuierliche Beurteilung der Verschlussstopfen in einem Zeitraum von 0 bis 30 Tagen (im Tier) auf histologischer Ebene durchgeführt werden (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Übersichtstabelle über verfügbares histologisches Material.

Tage im Tier	Anzahl der Stopfen pro Tag
<u>30 Tage</u>	2x
<u>23 Tage</u>	2x + 1 Gewebe
<u>16 Tage</u>	1x
<u>14 Tage</u>	2x
<u>13Tage</u>	1x
<u>10 Tage</u>	1x
<u>9 Tage</u>	2x + 1 Gewebe
<u>7 Tage</u>	2x
<u>3 Tage</u>	1x
<u>2 Tage</u>	1x
<u>0 Tage</u>	1x

2.4.1. 0 Tage im Tier



Abbildung 30: 0 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 2) (a) Nativ-Dünnschliffpräparat (b) & (c) HE-Dünnschliffpräparat.

Im vorliegenden HE-Kunststoffpräparat (siehe Abbildung 30) konnte eine frische Blutung festgestellt werden. Ob tatsächlich eine zelluläre Entzündungsreaktion als Reaktion auf die Prozedur im Gewebe vorliegt, konnte am vorliegenden Material nicht definitiv beurteilt werden. Die im Präparat vorgefundenen neutrophilen Granulozyten wurden als Erythrozyten assoziiert bewertet, die im Rahmen der Blutung, verursacht durch die Punktion, angeschwemmt wurden.

2.4.2. 2 Tage im Tier

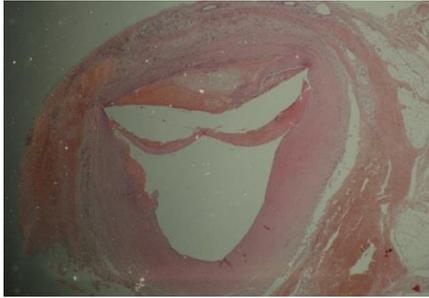


Abbildung 31: 2 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 3) HE-Paraffinpräparat.

In diesem Paraffinschnitt (siehe Abbildung 31) stellte sich eine ausgeprägte perivasale Blutung mit Zeichen einer beginnenden Organisation dar. Im Bereich des Granulationsgewebes wurde ein gering- bis mittelgradiger Gehalt an teilweise zerfallenden neutrophilen Granulozyten festgestellt. Auf dem Fremdkörper im Lumen aufsitzend zeigten sich Anteile eines Thrombus mit bereits zerfallenden neutrophilen Granulozyten (Kerntrümmern). Unterhalb des Kunststoffmaterials, zur Gefäßwand hin, war ebenfalls eine in Organisation stehende Blutung festzustellen. Das Granulationsgewebe unterhalb des Polymerstopfens ließ teilweise einen granulomatösen Effekt vermuten, wobei sich jedoch keine Riesenzellen darstellten, sodass eine granulomatöse Entzündung nicht sicher festgestellt werden konnte. Die Tunica media der Gefäßwand mit ihren vitalen Myozyten wurde an der Stelle unterhalb des Polymerstopfens intakt vorgefunden, wobei aber die Wand des Gefäßes an dieser Stelle diffus neutrophil granulozytär durchsetzt war. Im Randbereich des Stopfens war fokal ein kleines Ulcus des Endothels sichtbar. Die dem Kunststoff gegenüberliegende Gefäßwand wurde mit allenfalls leicht reaktiv veränderten Endothelzellen als unauffällig bewertet.

Die entzündliche Reaktion und die Gefäßwandveränderung mit einem wohl frischen Thrombus und bereits zerfallenden neutrophilen Granulozyten sowie einer beginnenden Granulationsgewebsbildung bei einer noch diffusen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten blieb somit auf den Eingriffsbereich beschränkt.

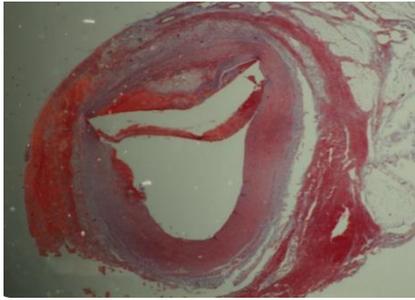


Abbildung 32: 2 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 3) M.tr-Paraffinpräparat.

In dem Masson-Trichrom gefärbten Paraffinschnitt (siehe Abbildung 32) wurde im Bereich der Blutung eine Aufspaltung der Gefäßmedia, ähnlich wie bei einem Aneurysma dissecans, festgestellt. Im Dissektionsspalt war eine Ansammlung von älterem Blut vorzufinden. Der lumenseitige Anteil der Gefäßwand zeigte sich degenerativ verändert und stellte sich auch in der Trichrom-Färbung nicht im üblichen Rot, sondern eher bläulich (Hinweis auf Kollagen) angefärbt dar. Die glatten Muskelzellen der Media in dem dissezierten luminalen Anteil der Gefäßwand wurden somit wohl zerstört oder haben sich umdifferenziert. Die Membrana elastica interna schien in diesem luminalen Dissektionsanteil der Media jedoch regelhaft subintimal weiterzulaufen. Somit war die dissektionsartige Aufspaltung der Media im Bereich der Perforationsstelle wohl auf eine von dieser ausgehenden Wühlblutung zurückzuführen.

2.4.3. 3 Tage im Tier

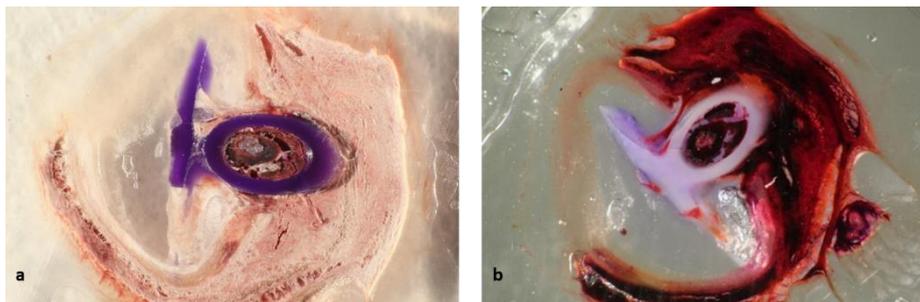


Abbildung 33: 3 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) (a) Nativ-Dünnschliffpräparat (b) HE-Dünnschliffpräparat.

In diesem Kunststoffpräparat (siehe Abbildung 33) zeigte sich abermals eine ausgedehnte perivasale Blutung, die sich jedoch nicht bis in den Bereich der Media erstreckte. An der Gefäßwand war die scharf perforierte Durchtrittsstelle des Verschlussstopfens zu erkennen. Soweit eine Beurteilung aufgrund der Schnittdicke des Kunststoffpräparates möglich war, zeigten sich bei diesem Präparat keine besonderen Auffälligkeiten (z. B. Dissektion) an der Gefäßwand.

Der Verschlussstopfen scheint jedoch zu weit intraluminal zu liegen.

2.4.4. 7 Tage im Tier

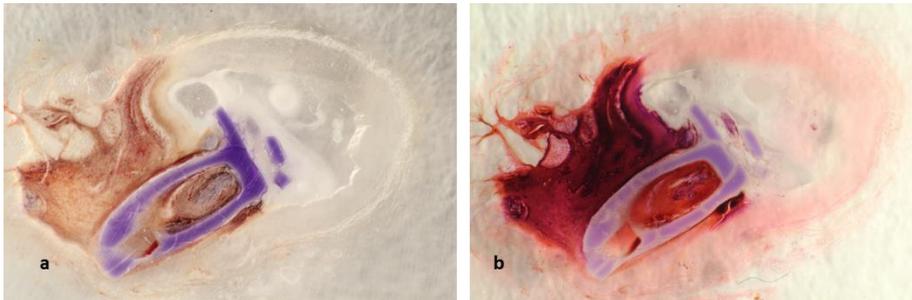


Abbildung 34: 7 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) (a) Nativpräparat (b) HE-Dünnschliffpräparat.

In diesem sieben Tage alten Präparat (siehe Abbildung 34) wurde insbesondere perivasal im Randbereich des Polymerstopfens eine ausgeprägte granulierende, bereits fortgeschrittene fibrosierende Entzündung vorgefunden. In der Gefäßwand im Bereich des Stopfens konnte eine Granulationsgewebsbildung beobachtet werden. Die übrigen Gefäßwandanteile machten jedoch einen vollständig unauffälligen Eindruck.

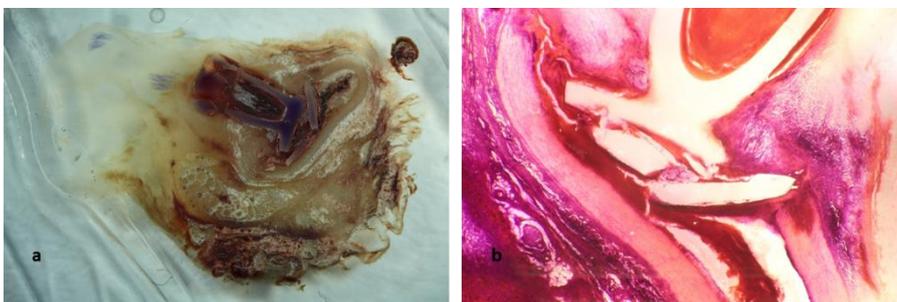


Abbildung 35: 7 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 2) (a) Nativpräparat (b) HE-Dünnschliffpräparat.

Aufgrund der Dicke des vorliegenden Kunststoffpräparates (siehe Abbildung 35) war eine definitive Beurteilung dieses Schnittes nicht möglich. Im Randbereich des Stopfens zeigte sich wohl wiederum eine Granulationsgewebsbildung. Es konnte nicht gesichert festgestellt werden, ob es intraluminal zur Ausbildung eines Thrombus gekommen ist und ob das Gefäß intra vitam noch offen war.

2.4.5. 9 Tage im Tier



Abbildung 36: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) HE-Paraffinpräparat.

In diesem HE-Paraffinschnitt (siehe Abbildung 36) zeigte sich perivaskal insbesondere im Randbereich des extravasal gelegenen Stopfenanteils eine ausgeprägte bereits stärker fibrosierte Granulationsgewebsbildung. Außerdem konnten insbesondere im Randbereich der Stopfen aufgelagerte in Organisation stehende Thrombusanteile gesichtet werden. Ferner konnten ebenfalls in Organisation stehende Thrombusanteile im Raum zwischen der Unterseite des Stopfens und der Gefäßintima festgestellt werden. Der vorliegende Schnitt lieferte keinen Anhaltspunkt für das Vorliegen einer Dissektion oder eines Dissektionspaltes. Die Perforation des Stopfens durch die Gefäßwand gelang scharf. Bei der übrigen Gefäßwand kam es zu keinen nennenswerten Veränderungen durch den durchgeführten Eingriff. Das Gefäßlumen erschien offen, es kam jedoch eventuell zu einer leichten Einengung des Lumens durch den Verschlussstopfen selbst und durch den aufgelagerten, insbesondere im Randbereich in Organisation stehenden Thrombus.



Abbildung 37: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) M.tr-Paraffinpräparat.

Auch in der Masson-Trichrom-Färbung (siehe Abbildung 37) des gerade beschriebenen Schnittes zeigte sich die glattwandig und scharf erfolgte Perforation der Gefäßwand bei der Stopfenlegung. Eine Bindegewebsneubildung zwischen dem Stopfen und der Media des angrenzenden Gefäßes war nur in geringem Ausmaß erkennbar.

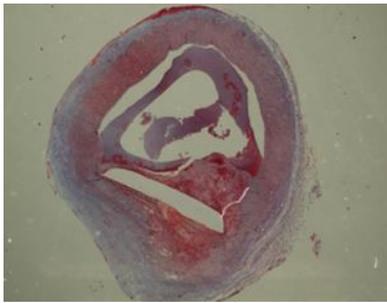


Abbildung 38: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) (andere Schnittebene) M.tr-Paraffinpräparat.

Im vorliegenden Präparat (siehe Abbildung 38) zeigte sich bereits perivasal eine verstärkte Fibrose. Im Bereich des intraluminalen Stopfenanteils war ein auf der Oberfläche des Stopfens in Organisation stehender Thrombus mit herdförmig vom Randbereich her beginnender Neointimabildung zu erkennen. Unterhalb des Stopfens, zur eigentlichen Gefäßwand hin, zeigte sich wiederum eine ausgedehnte Blutung mit Granulationsgewebsbildung und Fibrose. Die Tunica media der Gefäßwand wies vor allem im Randbereich unterhalb des Stopfens, erkennbar durch verstärkte Fibrose-Areale, eine Schädigung auf. Möglicherweise kam es im Randbereich des Stopfens zu einer Blutung zwischen dem Gefäßlumen und dem perivasalen Raum, da in diesem Präparat der Polymerstopfen nur im Bereich der Flügel zu sehen war und die Gefäßwand sehr stark bindegewebig verändert erschien.

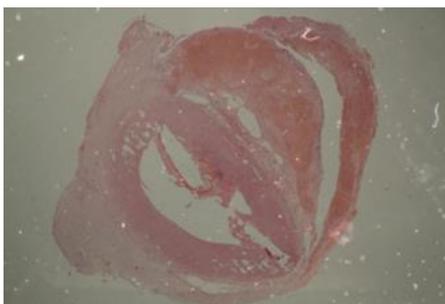


Abbildung 39: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) HE-Paraffinpräparat.

In diesem HE-Paraffinpräparat (siehe Abbildung 39) war eine ausgeprägte perivasale Fibrose mit reichlich Siderophagen, vereinbar mit der Organisation einer ausgedehnten paravasalen Blutung, zu erkennen. Intravasal, im Bereich des Stopfens, waren fragliche Anteile eines relativ frisch wirkenden Thrombus zu sehen. Unterhalb des Stopfens im Bereich der Gefäßwand zeigte sich ein umschriebenes neutrophil granulozytäres Infiltrat, welches eher an eine Reaktion

denken ließe, die eventuell zwei bis möglicherweise acht Stunden alt wäre.

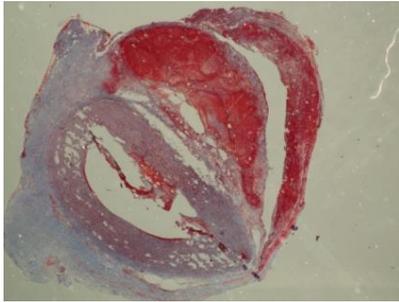


Abbildung 40: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) M.tr-Paraffinpräparat.

In der Masson-Trichrom-Färbung dieses Präparats (siehe Abbildung 40) zeigte sich ebenfalls die ausgeprägte perivasale/paravasale Fibrose mit fokalen Siderophagen. Außerdem war im perivasalen Bereich eine noch ausgedehnte Blutung zu erkennen, wobei es sich entweder um eine erneute Blutung, also um eine zweiseitige Blutung, handelte oder aber um noch nicht organisierte Restanteile der alten punktionsbedingten Blutung. Am wahrscheinlichsten erschien jedoch eine erneute Blutung. Unterhalb des Flügels, im dem Bereich zur Gefäßwand hin, war ein relativ frisch wirkender Thrombus mit noch gut erhaltenen neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Die Gefäßwand selbst wirkte insgesamt, auch unter den Flügeln, weitestgehend unauffällig.

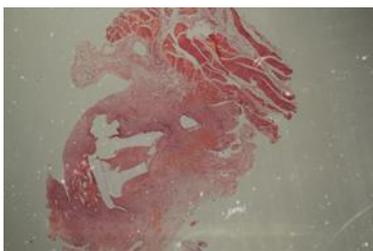


Abbildung 41: 9 Tage alter im Gewebe liegender Stopfen (Schaf Nr. 4) HE-Paraffinpräparat.

Der Stopfen dieses Präparates (siehe Abbildung 41) kam im Gewebe und nicht in einem Gefäß zum Liegen. Im Randbereich des Stopfens war eine dünne Lage von Makrophagen sichtbar, welche versuchte den Fremdkörper abzubauen. An die Makrophagen angrenzend zeigte sich ein bereits stärker fibrosiertes, wohl auch makrophagenreiches Granulationsgewebe. Riesenzellen im Sinne einer granulomatösen Entzündung waren nicht aufzufinden. Auf der Stopfenoberfläche

war fokal altes Blut mit reichlich zerfallenden neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Es scheint aber eher so zu sein, dass das Fremdmaterial weniger neutrophile Granulozyten anzieht, sondern eher Makrophagen. Eine ausgeprägte eitrige Entzündung scheint also durch den Stopfen nicht ausgelöst worden zu sein und die dem Stopfen aufsitzenden neutrophilen Granulozyten waren wohl eher blutungsassoziiert.

2.4.6. 10 Tage im Tier



Abbildung 42: 10 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) HE-Dünnschliffpräparat.

Soweit dies am vorliegenden, relativ dicken HE-Kunststoffpräparat (siehe Abbildung 42) zu beurteilen war, kann hier von einer hochgradigen paravasalen Granulationsgewebsbildung mit einer bereits verstärkten Fibrose gesprochen werden. Die Gefäßwand selbst wirkte relativ unauffällig. Intraluminal im Randbereich des Stopfens und des Fadenmaterials konnte mit großer Wahrscheinlichkeit von einem bereits in Organisation stehenden Thrombus ausgegangen werden.

2.4.7. 13 Tage im Tier



Abbildung 43: 13 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 2) (a) HE-Dünnschliffpräparat (b) Nativ-Dünnschliffpräparat.

Soweit dies am wiederum relativ dicken Schnittpräparat (siehe Abbildung 43) zu beurteilen war, konnte im Randbereich des Stopfens, extravasal, eine ausgeprägte, bereits stärker fibrosierte Granulationsgewebsbildung festgestellt werden.

Intraluminal zeigte sich auf dem Stopfen und dem Fadenmaterial aufsitzend möglicherweise ein Thrombus. Sichere Zeichen einer Organisation waren an diesem Präparat aber nicht definitiv zu erkennen. Die stopfennahe Gefäßwand erschien jedoch völlig unauffällig.

2.4.8. 14 Tage im Tier



Abbildung 44: 14 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) HE-Dünnschliffpräparat.

An diesem erneut relativ dicken HE-Kunststoffpräparat (siehe Abbildung 44) konnte die korrekte Lage der Flügel des Stopfens (der Gefäßwand direkt anliegend) visualisiert werden. Extravasal im Randbereich des Stopfens konnte zudem wiederum eine ausgeprägte fibrosierende Granulationsgewebsbildung beobachtet werden. Intraluminal war in diesem Präparat keine Ausbildung eines Thrombus zu erkennen. Die an den Stopfen unmittelbar angrenzende aber auch die weiter entfernt gelegene Gefäßwand erschien weitestgehend unauffällig.



Abbildung 45: 14 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) HE-Dünnschliffpräparat (andere Schnittebene).

An diesem relativ dicken Schnittpräparat (siehe Abbildung 45) war wiederum eine gute Lage der Stopfenflügel zu erkennen. Die Flügel waren von einem bereits stärker fibrosierten Granulationsgewebe umgeben. Zudem fanden sich definitiv keine Hinweise auf eine ausgedehnte Thrombose bzw. Thrombosierung des Gefäßes. Das Gefäßlumen war weitestgehend frei und extravasal konnte erneut eine

verstärkte Granulationsgewebsbildung gezeigt werden.

2.4.9. 16 Tage im Tier

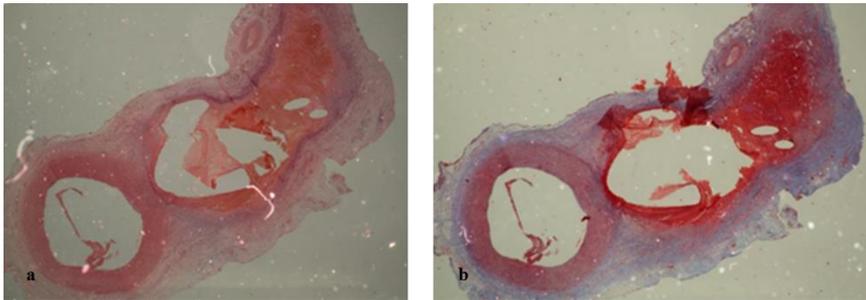


Abbildung 46: 16 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) (a) HE- und (b) M.tr-Paraffinpräparat.

Extravasal im Bereich des Stopfens konnte eine ausgedehnte Blutung und eine bereits stärker fibrosierende Granulationsgewebsbildung beobachtet werden. In einem an das Stopfenmaterial angrenzenden Bereich waren in der Tunica media herdförmige Fibrosen zu erkennen. Zudem zeigte sich eine ebenfalls relativ kurzstreckige und flache Intimafibrose. Zentral im Lumen des Gefäßes konnte ein dislozierter Stopfenteil (siehe Abbildung 46), umgeben von dünnem thrombotischem Material mit einer fokalen Ausbildung von Riesenzellen, dargestellt werden. Die Riesenzellen sind als Ausdruck einer fremdkörpergranulomatösen Entzündung zu sehen. Die übrige Gefäßwand erschien jedoch unauffällig.

2.4.10. 23 Tage im Tier



Abbildung 47: 23 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) HE-Paraffinpräparat.

Im vorliegenden HE-Präparat (siehe Abbildung 47) konnte perivasal im Bereich des Fremdmaterials eine ausgedehnte Blutung mit bereits verstärkt fibrosiertem Granulationsgewebe und einer herdförmigen Siderose beobachtet werden. Intraluminal waren die Flügel auch hier nicht direkt der Gefäßwand aufsitzend, sondern durch ein jetzt bereits ausgebildetes Granulationsgewebe von der ehemaligen Intima getrennt. Außerdem war eine dem Stopfenflügel luminal

aufsitzende Fibrose mit Neointimabildung zu erkennen.

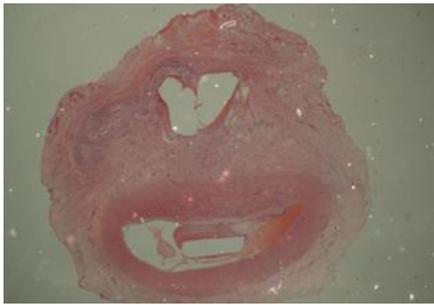


Abbildung 48: 23 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) HE-Paraffinpräparat.

Auch in diesem HE-Schnitt (siehe Abbildung 48) zeigte sich abermals eine ausgeprägte perivasale Fibrose im Randbereich des Fremdkörpers und im Bereich des Fadenmaterials. Die Gefäßwand wies im Bereich unterhalb des Flügels eine Granulationsgewebsbildung auf und zudem konnten in diesem Bereich Reste eines Thrombus beobachtet werden. Das Bindegewebe unterhalb des Stopfens war bereits teilweise mit einer Endothelschicht überzogen. Eine Reendothelialisierung an der Oberfläche des Verschlussstopfens konnte jedoch noch nicht festgestellt werden. An der Stopfenoberfläche konnte wohl frisches Fibrin gesehen werden. Die sonstige Gefäßwand wirkte weitestgehend unauffällig.

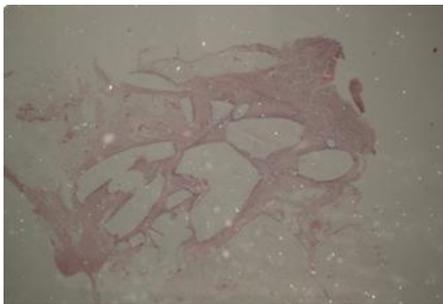


Abbildung 49: 23 Tage alter im Gewebe liegender Stopfen (Schaf Nr. 3) HE-Paraffinpräparat.

In diesem HE-Präparat (siehe Abbildung 49) wurde erneut ein nicht in der Gefäßwand sondern im umliegenden Gewebe zum Liegen gekommener Stopfen beurteilt. In unmittelbarer Nachbarschaft an ein Fettgewebe stellte sich reichlich Fremdmaterial und eine angrenzende fremdkörpergranulomatöse Entzündung mit herdförmiger Riesenzellbildung dar. Daran angrenzend konnte ein stärker fibrosiertes Granulationsgewebe mit einer ausgeprägten Siderose, welche wohl durch eine stopfen- bzw. punktionsbedingte Blutung entstanden ist, gesehen werden.

2.4.11. 30 Tage im Tier

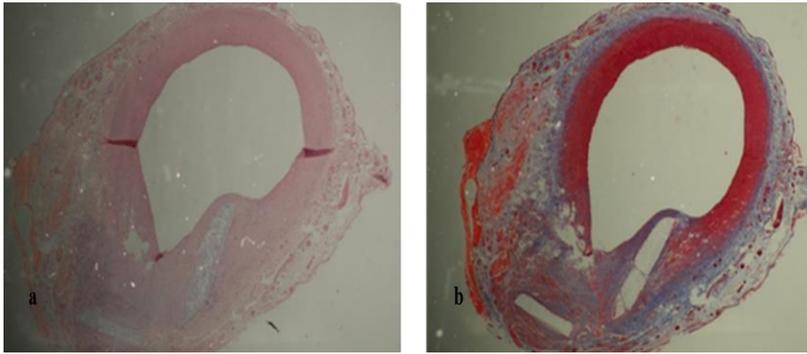


Abbildung 50: 30 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 4) (a) HE- (b) M.tr-Paraffinpräparat.

Soweit dies am vorliegenden HE-Präparat (siehe Abbildung 50) und Masson-Trichrompräparat zu beurteilen war, konnte hier ein Gefäßwanddefekt, der bereits mit Granulationsgewebe und ausgeprägter Fibrosierung gefüllt war, festgestellt werden. Im Granulationsgewebe war fokal Stopfenmaterial zu sehen. Auch zum Lumen hin war das Stopfenmaterial von Granulationsgewebe überzogen, sodass hier wohl am ehesten ein organisierter Thrombus vorlag.

Das Gefäß wirkte zumindest deformiert und leicht oval verändert. Dies könnte möglicherweise auch auf ein Schnittartefakt zurückzuführen sein. Die zu erwartende Struktur eines Gefäßes nach einer Stopfeneinlage und einer Organisation des Stopfens mit rundem Lumen und mit nur noch fokal an einer leicht fibrosierten Intima erkennbaren Manipulation, lag hier definitiv nicht vor.

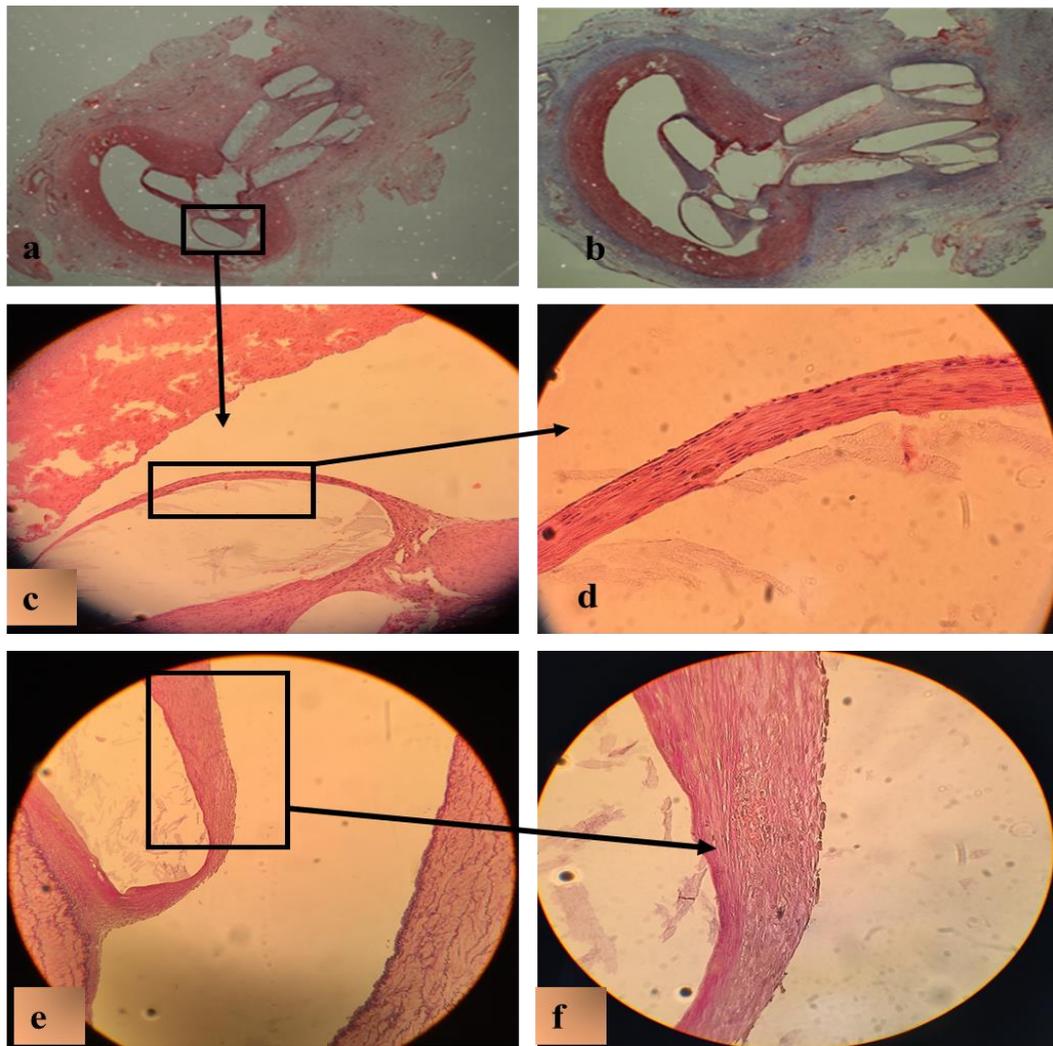


Abbildung 51: 30 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) (a) (c) (d) HE- (b) M.tr- (e-f) EvG-Paraffinpräparat.

In den vorliegenden Präparaten (siehe Abbildung 51) ist der Stopfen nahezu zentral angeschnitten worden. Im Bereich der Durchtrittsstelle durch die Media war die Gefäßwand nur fokal durch Granulationsgewebe verändert. Ansonsten erfolgte die Perforation der Gefäßwand bei der Stopfenlegung glattwandig und scharf. Zudem war der sich mit seinen Flügeln voluminös in das Gefäßlumen vorwölbende Verschlussstopfen zu erkennen. Auf einer Seite lag der Stopfenflügel direkt dem Gefäßendothel der ursprünglichen Intima an, wohingegen auf der anderen Seite eine leichte Dislokation von der ursprünglichen Intima vorlag. Der Polymerstopfen war luminal sowohl mit bereits stärker fibrosiertem Granulationsgewebe unterfüttert, als auch mit diesem überzogen. Das Granulationsgewebe an der Oberfläche des Stopfens wies zudem bereits eine Neoendothelialisierung auf. Im extravasalen Bereich war außerdem eine hochgradig fibrosierte Granulationsgewebsbildung mit einer ausgeprägten Siderose zu erkennen.

V. DISKUSSION

Die Grundlage der Diskussion wird von den Ergebnissen aus den In-vitro- und In-vivo-Testungen, die im Rahmen dieser präklinischen Machbarkeitsstudie durchgeführt worden sind, gebildet. Die Ergebnisse werden interpretiert und soweit möglich mit den anderen schon auf dem Markt befindlichen Verschlussystemen verglichen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zunächst in diversen In-vitro-Versuchen vom Projektpartner zur Verfügung gestellte Materialien hinsichtlich der Hämokompatibilität, des Designs und weiterer Materialeigenschaften untersucht, um dann resultierend aus diesen Ergebnissen einen Verschlussstopfen-Prototyp in einem In-vivo-Versuch zu testen. Mit den Ergebnissen sollten nicht nur die Praktikabilität und die Biokompatibilität des Devices gezeigt werden, sondern auch erste Hinweise auf die Sicherheit und die Effektivität des Verschlussystems gewonnen werden.

Ein im klinischen Alltag eingesetztes arterielles Verschlussystem sollte idealerweise folgendes Anforderungsprofil erfüllen: Neben einem schnellen, sicheren und effektiven Verschluss der Punktionsläsion sollte das Closure Device auch eine gewisse Anwenderfreundlichkeit an den Tag legen. Zudem sollten durch das Verschlussystem möglichst wenig Irritationen an der Punktionsstelle und im umliegenden Gewebe verursacht werden (Treitl et al., 2013; Hoffer & Bloch, 2003).

Clip-basierte, Naht-basierte, sowie bioresorbierbare Verschlussysteme sind nach intraarteriellen Eingriffen die am häufigsten angewendeten Systeme für den anschließenden Verschluss der Punktionsläsion in der Gefäßwand. Nichtsdestotrotz treten bis heute in jeder dieser Produktklassen immer noch Komplikationen auf (Kranokpiraksa et al., 2010).

Die Devices können bei ihrer Anwendung z. B. Blutungen, Pseudoaneurysmen, arteriovenöse Fisteln, Fremdkörperreaktionen, sowie Infektionen an der Punktionsstelle und arterielle Okklusionen verursachen (Azmoon et al., 2010; Gonze et al., 1999; Hoffer & Bloch, 2003; Kranokpiraksa et al., 2010; Tavis et al., 2012).

In der Literatur wird des Weiteren nach vorausgegangener arterieller Manipulation (z. B. durch die Schleusenlegung) zumindest beim Schwein von einer erhöhten Neigung zu einem Angiospasmus ausgegangen (Hofmann et al., 2003; Lam et al.,

1987; Sanghi et al., 2008).

Die durch die Manipulation möglicherweise plötzlich auftretende Kontraktion der Gefäßmuskulatur bedingt nicht nur eine transiente Verengung des Gefäßlumens, sondern hat gegebenenfalls Auswirkungen auf die Effektivität des Gefäßverschlusses (Dichtigkeit).

Dazu ergänzte Bailey (2008), dass von extravaskulären Verschlussystemen das kleinste Risiko für einen Gefäßspasmus auszugehen scheint.

Das Auftreten von Komplikationen wird je nach Device aufgrund deren unterschiedlich komplexer Handhabung auch von der Erfahrung des Operators mit dem jeweiligen Verschlussystem beeinflusst. In der Literatur sind individuelle Lernkurven für verschiedene Systeme beschrieben (Eggebrecht et al., 1999; Cremonesi et al., 1998; Warren, Warren & Miller, 1999; Resnic et al., 2012; Rashid & Bailey, 2007; Boschewitz et al., 2013; Balzer et al., 2001).

Um die Komplikationen weiter zu minimieren, die Kosten für die Devices zu senken und deren Handhabung zu erleichtern werden viele der bereits bestehenden Systeme weiterentwickelt oder komplett neuartige Lösungsansätze vorgestellt. Bis zu deren klinischem Einsatz am Patienten sind neben In-vitro-Versuchen auch In-vivo-Pilotstudien am Tiermodell unerlässlich. Relativ zu den zahlreichen groß angelegten klinischen Studien gesehen gibt es aber bis jetzt nur eine kleine Anzahl an tierexperimentellen Studien, in denen vaskuläre Verschlussysteme zum Einsatz kamen. Neben Schweinen (Isfort et al., 2014; Sanghi et al., 2008; Leppäniemi et al., 1997; Hofmann et al., 2003) wurden in diesen Studien auch Hunde (Gershony, Brock & Powell, 1998; Gargiulo et al., 2007) als entsprechende Tiermodelle herangezogen.

1. In-vitro-Testungen

Rückstellkraft und Spannverhalten

Um eine erste Vorauswahl eines geeigneten Materials für die weiteren In-vitro-Versuche zu erhalten wurde sowohl die Rückstellkraft als auch die Schwere des Einzugs in einen Testapplikator bestimmt. Die Rückstellkraft des Verschlussstopfens ist diejenige Kraft, die der Verschlussstopfen nach dem

Durchschub durch die Zugangsschleuse aufbringt, um wieder zurück in seine ursprüngliche Lage vor dem Ausschleiben zu gelangen und gibt somit Aufschluss über die Rückverformbarkeit des Verschlussstopfenmaterials. Als Spanverhalten wurde das Einzugverhalten/Einschubverhalten des Verschlussstopfens in ein Teströhrchen bezeichnet. Letztlich wurden durch diesen Versuch sechs der zehn zur Verfügung stehenden Materialien für die nachfolgenden Testungen selektiert. Da sowohl eine ausreichende Rückverformbarkeit, aufgrund der sonst fehlerhaften oder unzureichenden Abdichtung der Gefäßläsion, als auch ein nicht zu leichtes Einschubverhalten/Einzugverhalten wegen einer sonst eventuellen schlechteren Handhabung gewünscht ist, wurden nur Stopfen mit einer guten Rückstellkraft und einem starken und mittleren Kraftaufwand beim Einschub für die weiteren In-vitro-Prüfungen berücksichtigt.

Flussmodell

Um einen sicheren Verschluss der Punktionsläsion nach Entfernung einer arteriellen Zugangsschleuse zu gewährleisten, darf der Verschlussstopfen auch bei einem versehentlich etwas höheren Kraftaufwand während des Zuges am Sicherungsfaden nicht aus der Gefäßwand herausgezogen werden. Ein Auszug des Stopfens vom intra- in den extravasalen Raum kann zum Nichtverschließen der Punktionsstelle und zu Lacerationen an der Gefäßwand führen. Die dadurch unkontrollierte Blutung müsste dann je nach verwendeter Schleusengröße und Gefäßwandverletzung entweder mit manueller Kompression oder durch einen Gefäßchirurgen gestoppt werden und würde unweigerlich zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt und zu einem erhöhten Risiko anderer bereits genannter Komplikationen führen. Eine Testung bezüglich des Einzugverhaltens der Verschlussstopfen in die Gefäßläsion zeigte, dass lediglich eines der Stopfenmaterialien bei höherem Kraftaufwand aus der Gefäßwand herauszuziehen war. Zudem sollte der Einzug in die Punktionsläsion nicht automatisch beim Ziehen der Schleuse geschehen, oder bereits durch einen sehr leichten Zug am Sicherungsfaden, da bei einem zu einfachen Einzug der Widerstand der Gefäßwand auf den Verschlussstopfen nicht ausreichend groß ist. Dies hätte zur Folge, dass der Operateur aufgrund der dadurch fehlenden haptisch fühlbaren Übertragung auf den Sicherungsfaden keine Feedbackmöglichkeit über die Lage des Verschlussstopfens bekommen würde.

Hämokompatibilitätstests

Weil die Wechselwirkungen zwischen Blut und Fremdmaterial noch nicht vollständig geklärt sind, stellen In-vitro-Hämokompatibilitätstests stets eine Herausforderung dar (Harrison, 2000; Sanak, Jakiela & Węgrzyn, 2010).

Die internationale Standardisierungs-Organisation (ISO) hat international akzeptierte Standards für die präklinischen Testungen von medizinischen Devices entwickelt. In der ISO-Norm 19993 sind die Teststandards für implantierte Devices in Tieren festgehalten (Swindle, Smith & Helke, 2013; ISO 19993).

Auch die Empfehlungen der FDA (Food and Drug Administration) sind größtenteils an die ISO-Norm angelehnt. Darüber hinaus werden bei Devices, die aus neuartigen Materialien bestehen, weiterreichende Tests empfohlen (Swindle, Smith & Helke, 2013).

Bei den in der In-vivo-Studie getesteten Stopfenmaterialien handelte es sich aber um bereits zugelassene Materialien, sodass weiterführende Tests nach den FDA-Statuten nicht vonnöten waren. Bei den an die ISO-Norm 19993-4 angelegten Überprüfungen bestimmter Hämokompatibilitätsparameter konnten weitestgehend keine gravierenden Abweichungen zu den nicht mit den Stopfenmaterialien in Kontakt gebrachten Kontrollgruppen festgestellt werden. Bei den Hämokompatibilitätstests diente eine Rocking Platform zur kontinuierlichen Bewegung der mit den Stopfen und dem Spenderblut versehenen Probenröhrchen und stellte somit ein einfaches Blutzirkulationsmodell dar.

Dieses Zirkulationsmodell wurde schon mehrfach erfolgreich z. B. bei der Hämokompatibilitätsprüfung von Stents oder bei der Testung von Konnektoren für extrakorporale Zirkulationssysteme angewendet (Wendel et al., 2002; Sinn et al., 2011; Schleicher et al., 2012).

Ein In-vitro-Blutzirkulationsmodell stellt eine attraktive Möglichkeit dar, Materialien für den späteren intravasalen Einsatz hinsichtlich ihrer Hämokompatibilität zu testen. Dabei ist es unter der Verwendung von humanem Blut möglich, sowohl die Temperatur als auch die Antikoagulation zu standardisieren. Aufgrund des modellbedingten Fehlens der Nieren- und Leberaktivität können Aktivierungsprodukte ohne die Clearance-Eigenschaften dieser Organe bei einem zusätzlichen Fehlen der die Aktivierung hemmenden

Endothelzellen leichter akkumulieren. Dies erklärt die Tatsache, dass im In-vitro-Versuch Reaktionen zwischen Blut und Prüfmaterial schneller als in einem In-vivo-Modell ablaufen. In diesem Zusammenhang wird, die Hämokompatibilität betreffend, in In-vitro-Zirkulationsmodellen auch von einem worst-case-Szenario ausgegangen (van Oeveren, 2013).

Thrombozyten

Unmittelbar nach dem Kontakt zwischen Blut und einer Fremdoberfläche kommt es zu einer Adsorption von Plasmaproteinen, was zu einer Veränderung der biokompatiblen Eigenschaften des Fremdmaterials führen kann. In weiteren Schritten kommt es daraufhin zu einer Anheftung von Thrombozyten an die bereits an der Fremdoberfläche befindlichen Plasmaproteine. Außerdem werden weitere benachbarte Thrombozyten aktiviert und der Thrombus durch Fibrin stabilisiert (Jung, Braune & Lendlein, 2013; Baier & Dutton, 1969; Seyfert & Jung, 2000; van Oeveren, 2013; Shenkman et al., 2000; Gemmell, 2001; Sanak, Jakiela & Węgrzyn, 2010).

Scherstress spielt sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Adhäsion von Blutzellen eine entscheidende Rolle. Wenn Blut einem erhöhten Scherstress oder den Oberflächen von Fremdmaterialien ausgesetzt ist, kann dies zur Schädigung von Erythrozyten und Thrombozyten führen. Dabei halten Erythrozyten höheren Scherkräften stand als Thrombozyten, wobei die Thrombozytenbeschädigung nicht nur von der Höhe der Scherkraft, sondern auch von der Dauer der Scherwirkung abhängt (Yoganathan, 1995; Keller, 1981; Anderson et al., 1978; van Oeveren, 2013).

Die Adhäsion von Thrombozyten ist ein sehr schnell ablaufender Prozess. Es kommt innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Anlagerung an Oberflächen von Fremdmaterialien (Goodman et al., 2005; van Oeveren, 2013).

Die bestimmte Thrombozytenzahl aller Proben aus den Hämokompatibilitätstests dieser Arbeit, die mit einem der Stopfenmaterialien bestückt waren und auch die Kontrollgruppe wiesen nach 90-minütiger Inkubation auf der Rocking Platform eine geringere Anzahl an Thrombozyten als der Leerwert (Kontrollgruppe nach 0 Min.) auf. Lediglich die Proben MQ 2 und MEUV 11 zeigten eine geringere Anzahl an Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (nach 90 Min).

Aufgrund der Tatsache, dass es auch bei den Kontrollgruppen zu einem ähnlichen Absinken der Thrombozytenzahl wie bei den mit den Stopfenmaterialien versehenen Proben gekommen ist, kann von einer modellinduzierten Reduzierung der Thrombozyten ausgegangen werden. Die Reduzierung der Blutplättchenanzahl wurde also einerseits durch die Scherkräfte und andererseits durch die dadurch erleichterte Anlagerung der Blutplättchen an die Wand der Probenröhrchen hervorgerufen. Dabei scheinen die Effekte des Stopfenmaterials eine eher untergeordnete Rolle gespielt zu haben.

Hämatologie (Erythrozyten/ Leukozyten)

Leukozyten, insbesondere Monozyten und neutrophile Granulozyten, haben eine starke Neigung sich an Oberflächen anzuhaften; sie interagieren mit Thrombozyten, dem Komplementsystem, dem Gerinnungs- und dem fibrinolytischen- System und des Weiteren sind sie Hauptmediatoren von Entzündungsreaktionen (Alain Carré, 2011; Gorbet & Sefton, 2004). Aus der möglichen Adhäsion von Leukozyten an die aus dem Plasma resorbierte Proteinschicht auf den künstlichen Oberflächen von Fremdmaterialien kann ein Abfall der Leukozytenzahl resultieren.

Der direkten Anlagerung von Erythrozyten an künstliche Oberflächen wird hingegen eine eher geringe Bedeutung beigemessen. Erythrozyten spielen im Prozess der Hämostase und der Thrombosebildung eine eher passive Rolle (Hanson & Tucker, 2012).

Um die Zelladhäsionen am Stopfenmaterial zu quantifizieren wurde mittels eines Zellcounters die Leukozyten- und Erythrozytenzahl vor und nach der Inkubation bestimmt. Sowohl bei den Erythrozyten als auch bei Leukozyten lagen alle Werte (inklusive Kontrollgruppe) nach 90-minütiger Inkubation unter dem Leerwert. Die Proben mit den Stopfenmaterialien entsprachen jedoch den Kontrollwerten oder wichen nur geringfügig von diesen ab. Somit kann auch hier von einem modellbedingten Absinken der Zellzahlen ausgegangen werden.

Die oben gezeigte relativ geringe Adhäsion von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten an das Stopfenmaterial lässt darauf schließen, dass vom Stopfenmaterial keine oder nur eine sehr geringe inflammatorische und thrombotische Reaktion zu erwarten ist. Die Aktivierung der Thrombozyten, der Granulozyten und des Gerinnungssystems wurden durch Messungen der β -TG, der PMN-Elastase und der TAT-Konzentration genauer untersucht.

TAT (Thrombin-Anti-Thrombin-Komplex)

Der Kontakt zwischen Blut und der Oberfläche von Fremdmaterial startet die intrinsische Blutgerinnung, wobei über die Faktoren XII, XI und Xa Prothrombin zu Thrombin umgewandelt wird, wodurch wiederum eine Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin vermittelt wird. Das generierte Thrombin wirkt neben Fibrinogen u. a. noch auf weitere physiologisch vorkommende Substrate ein (Protein C, Thrombozyten, etc.) und wird durch Komplexbildung mit Antithrombin III neutralisiert. Somit stellt die TAT-Plasma-Konzentration einen guten Marker für die Thrombinbildung dar. Folglich indiziert ein Anstieg der TAT-Konzentration ein Anstieg der Thrombin-vermittelten Gerinnung (Wendel et al., 2002; Aytemiz et al., 2014; Pelzer, Schwarz & Heimbürger, 1988).

Über die TAT-Konzentration können somit Rückschlüsse auf die vom Stopfenmaterial ausgehenden thrombotischen Risiken gezogen werden. Die TAT-Konzentration lag nach der Inkubation auf der Rocking Platform nur bei der Probe mit dem Stopfenmaterial MQ 3 violett über dem Wert der Kontrollgruppe. Somit kann angenommen werden, dass von allen Materialien, bis auf MQ 3 violett, ähnlich niedrige über die TAT-Konzentration ableitbare thrombotische Risiken ausgehen.

Die Erhöhung der TAT-Konzentration kann zu einem gewissen Teil auch auf die Heparinisierung (1 IU/ml) zurückzuführen sein (Gulba et al., 1988; Seitz et al., 1988).

β -Thromboglobulin

Bei einer Hyperaktivität der Thrombozyten, die zum Beispiel durch Kontakt mit künstlichen Oberflächen ausgelöst werden kann, kommt es zur Ausschüttung von β -Thromboglobulin. Das thrombozyten-spezifische Eiweißmolekül wird aus den alpha-Granula der Blutplättchen freigesetzt und daher kann die β -TG-Konzentration im Blutplasma als Indikator für die Plättchenaktivierung herangezogen werden. Die Thrombozytenaktivierung kann zudem unter anderem auch durch Adenosindiphosphat und Thrombin ausgelöst werden (Begg et al., 1978; Zahavi & Kakkar, 1980; Aytemiz et al., 2014; Chandrasekar & Tanguay, 2000).

Eine Studie aus dem Jahr 2013 (Aytemiz et al., 2014) in der verschiedene

Gefäßprothesen in einem Chandler-Flussmodell, mit dem Blut von drei Spendern, untereinander verglichen wurden, lieferte β -Thromboglobulinwerte zwischen 600-1000 IU/ml. Der gemessene Wertebereich ist somit vergleichbar mit dem unserer Studie. Die Inkubation in dem unterschiedlich aufgebauten Inkubationsmodell (Rocking vs. Chandler) betrug im Gegensatz zu unserem Versuch jedoch nur 60 Min.

Bei der Testung der Beschichtung von 15 Membran-Oxygenatoren in einem Herz-Lungen-Maschinen-Modell (Zimmermann et al., 2004) kam es bei den unbeschichteten Oxygenatoren nach 90-minütiger Zirkulation zu einem 4000 %igen Anstieg der β -Thromboglobulin Konzentration im Vergleich zur Ausgangsposition. Bei den beschichteten Oxygenatoren betrug der Anstieg knapp 2000 %. Bei beiden Oxygenatoren ist jedoch die im Unterschied zur Versuchsanordnung dieser Arbeit andere Relation von Oberfläche zu Blutvolumen zu beachten.

In einer weiteren Studie (Wendel et al., 2002) wurden zunächst beschichtete (Heparin/Silikon) sowie nicht beschichtete Polycarbonat-Konnektoren in einem Chandler-Modell für 120 Min. inkubiert. Dabei lagen die β -TG-Werte bei den beschichteten Konnektoren zwischen 900-1200 ng/ml und bei den unbeschichteten bei circa 1500 ng/ml. Nach Reinigung der Konnektoren in physiologischer Kochsalzlösung wurden diese mit dem Blut derselben Spender aus dem Chandler-Versuch für 60 Min. auf einer Rocking Platform inkubiert. Anschließend wurden die β -Thromboglobulinwerte erneut bestimmt. Die beschichteten Konnektoren wiesen nach 60 Min. Inkubation mit 500-700 ng/ml niedrigere Werte auf als die beschichteten mit 1500 ng/ml.

Bei der Versuchsreihe eines Blutspenders der hier vorliegenden Arbeit kam es bei allen getesteten Stopfenmaterialien zu einem deutlich höheren β -TG-Wert als bei den anderen Spendern. Der interindividuelle Unterschied wurde bei der Bestimmung der β -TG-Konzentration der Probe MQ 2 besonders deutlich. Die Konzentration bei diesem Spender war hier circa 4-mal höher als bei den anderen Spendern.

In anderen Studien werden je nach getestetem Material, Inkubationszeit und Zirkulationsmodellmethode aber auch Werte zwischen 1000-6000 IU/ml erreicht (Zimmermann et al., 2007; Zhou et al., 2010; Hoffmann et al., 2006; Tepe et al., 2006).

SC5b-9

Durch den Kontakt mit Fremdoberflächen kann es zur Aktivierung des kaskadenartigen Komplementsystems kommen (Janatova, 1988; Tang, Wu & Timmons, 1998).

Die Aktivierung erfolgt dabei über den klassischen Weg, den Lektin-Weg, oder den sogenannten alternativen Weg. Die Aktivierung des Komplementsystems führt letztlich zur Bildung eines aus den Komplementfaktoren C5-C9 bestehenden Terminalen Komplementkomplexes (TCC). Über den Membran-Attack-Komplex, der eine Form des terminalen Komplementkomplexes darstellt, kommt es durch eine selektive Veränderung der Permeabilität der Zellmembran auf indirektem Wege zum Untergang der Zielzelle (Müller-Eberhard, 1984; Lachmann & Thompson, 1970; Götze & Müller-Eberhard, 1970; Kolb et al., 1972; Ward et al., 1985).

Des Weiteren kann der TCC neben Thrombozytenaktivierung auch eine Leukzytenadhäsion bewirken (Hsu, 1997; Kottke-Marchant et al., 1987).

Die Bestimmung der Konzentration des TCC im Rahmen der Hämokompatibilitätsuntersuchungen der Stopfenmaterialien diene somit als Indikator für das Maß der Komplementaktivierung und wurde schon in zahlreichen anderen Blutverträglichkeitsprüfungen unterschiedlicher Materialien verwendet.

In einer Arbeit zur Hämokompatibilität von Biomaterialien wurden von Ecker (2002) die Auswirkungen auf die Komplementaktivierung im menschlichen Plasma nach dem Kontakt mit Fremdmaterial untersucht. Dazu wurden mit unterschiedlichen Materialien (u.a. Titan, PVC, Titan-Teflon, Remanium) beschichtete Wellplatten mit dem Blut von humanen Spendern für 2 h auf einer Rocking Platform inkubiert. Im Anschluss wurde die SC5b-9-Konzentration im Probenblut bestimmt. Die Werte nach 120-minütiger Inkubation bewegten sich im Bereich zwischen 1500 und 2000 $\mu\text{g/l}$. Interessanterweise kam es dabei zwischen den gemessenen Werten nach 60 Min. (450 bis 750 $\mu\text{g/l}$) und 120 Min. zu einem starken Anstieg (Ecker, 2002).

Bei einer anderen Arbeit aus dem Jahr 2003 wurden in einem Chandler-Modell nicht beschichtetes und Heparin-beschichtetes PVC 120 Min. inkubiert um Aufschlüsse über dessen Hämokompatibilität zu erhalten. Dabei stieg die

Konzentration der Probe des mit Heparin beschichteten PVCs auf $882,94 \pm 224,28$ ng/l und die des nicht beschichteten auf $1495,5 \pm 555,19$ ng/l (Hauser, 2003).

Aus der bereits erwähnten (siehe β -TG) Studie aus dem Jahr 2014, in der verschiedene Gefäßprothesen in einem Chandler-Modell 60 Min. inkubiert wurden, konnten hinsichtlich der SC5b-9 Konzentration Werte zwischen 450-800 ng/ml entnommen werden (Aytemiz et al., 2014).

In einer weiteren Studie wurden mit six-armed star-shaped poly(ethylene glycol-stat-propylene glycol)molecules (Star PEG) rotationbeschichtete Glasscheibchen unterschiedlicher Dicke, in Wellplatten, für 1 Stunde auf einer Rocking Platform inkubiert. Die anschließende Bestimmung der SC5b-9 Konzentration lieferte auch hier Werte weit über 1000 ng/ml (Hoffmann et al., 2006).

Somit liegen die Werte der SC5b-9-Konzentrationen aus den Hämokompatibilitätstestungen der Stopfenmaterialien im Vergleich zu den anderen Studien eher im unteren bis mittleren Bereich.

PMN-Elastase:

Bei der PMN-ELASTASE handelt es sich um eine in den azurophilen Granula der PMN (Polymorphkernigen Granulozyten) lokalisierte lysosomale Proteinase (Butler, Rucker & Westaby, 1993; Dewald et al., 1975; Ohlsson & Olsson, 1974).

Diese und andere Proteinase werden von den neutrophilen Granulozyten zur Verdauung von untergegangenen Gewebe und körperfremdem Material beim Abfließen einer Entzündungsreaktion verwendet.

Gewöhnlicherweise ist die Wirkung der Proteinase dabei auf den Intrazellulärraum des Phago lysosoms beschränkt. Je nach Ausmaß der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Granulozytenstimulation kann es im Rahmen der Phagozytose und dem Zerfall von PMN aber auch zu einer partiellen Sezernierung der Proteinase in den Extrazellulärraum kommen, welche dann durch einen α 1-Proteinase-Hemmer inhibiert wird. Kommt es jedoch zu einer überschießenden Ausschüttung der Elastase in den extrazellulären Raum, reicht die Konzentration des α 1-Proteinase-Hemmers nicht mehr aus um die Aktivität der Proteinase zu regulieren. In diesem Fall kann es durch die PMN-Elastase zur Schädigung von Gewebe kommen (Petersen, 2010; Schmidt-Rhode, Sturm & Schulz, 1990).

In dieser und anderen Arbeiten wurde die PMN-Elastase daher als Indikator für die

durch das Fremdmaterial hervorgerufene Aktivierung von Granulozyten herangezogen (Hind et al., 1988).

Die PMN-Elastase-Werte der Spender lagen vor der Inkubation in dem von der Literatur genannten Wertebereich (50-120 ng/l) eines normalen Patientenkollektivs (Duswald, 1983; Dudenhausen, Langner & Sönmez, 1987; Schmidt-Rhode, Sturm & Schulz, 1990).

Der nach 90-minütiger Inkubation mit $432,47 \pm 186,64 \mu\text{g/l}$ relativ hohe Leerwert weist abermals auf eine modellinduzierte Backgroundaktivierung hin, die aber auch in anderen ähnlichen Versuchsaufbauten in dieser Größenordnung aufgetreten ist (Ecker, 2002).

REM (Rasterelektronenmikroskop)

Die im Elektronenmikroskop teilweise festgestellten geringgradigen fokalen und lokal-diffusen Anlagerungen von Erythrozyten, Thrombozyten, Fibrinfäden und Leukozyten auf der Stopfenoberfläche wurde in allen untersuchten Materialgruppen beobachtet. Die Auswertung der einzelnen REM-Bilder zeigte jedoch keine nennenswerte materialspezifische Abhängigkeit der zellulären Besiedelung, sondern vielmehr eine spenderabhängige Adhäsion der Blutzellen.

Stopfendesign und Flügelanzahl

Für den Tierversuch dieser Arbeit wurde ein Verschlussstopfen mit fünf Flügeln und einer 85° Winkelung des Grundkörpers ausgewählt. Die 85° Winkelung zeigte in den In-vitro-Prüfungen die besten Dichtigkeitseigenschaften. Die Ausstattung des Verschlussstopfens mit fünf Flügeln resultierte ebenfalls aus den Erfahrungen der Stopfendesigntests und den Testungen zur Flügelanzahl. Denn sowohl beim Verschlussstopfen mit sechs Flügeln, als auch beim Verschlussstopfen mit vier Flügeln kam es während der In-vitro-Versuche zu Komplikationen. Beim 6-flügeligen Verschlussstopfen kam es zum Abbruch eines der Flügel und bei den 4-flügeligen Stopfen wurden ein oder mehrere Flügel im Punktionskanal aufgefunden.

2. In-vivo-Testungen

Im Rahmen der vorliegenden Machbarkeitsstudie wurde für die erste In-vivo-Testung eines neuartigen Verschlusssystems aus einem hochelastischen bioresorbierbaren Spezialpolymer auf das Tiermodell Schaf zurückgegriffen.

Das Schaf gilt einerseits aufgrund seiner vergleichbaren Größenverhältnisse zum Gefäßsystem des Menschen andererseits auch wegen seines ähnlichen Gerinnungssystems (ähnlicher als Hund und Schwein) als geeignetes Modell zu Untersuchungen und Testungen, die das kardiovaskuläre System betreffen (Narayanaswamy, Wright & Kandarpa, 2000; McMillen, 2001). Aufgrund der im Vergleich zu anderen Spezies relativ hohen Thrombozytenanzahl und einem weniger stark ausgeprägten fibrinolytischen System wird jedoch beim Schaf von einer Tendenz zur Hyperkoagulabilität ausgegangen (Byrom et al., 2010).

Eine Studie aus dem Jahr 2009 bescheinigte diesem Tiermodell die Eignung für die Testung von vaskulären Verschlusssystemen (Ni et al., 2009).

Durch die 25 (von 29) im In-vivo-Versuch technisch erfolgreichen Anwendungen des neuen Verschlusssystems konnte erstmals dessen grundsätzliche Anwendbarkeit am lebenden Organismus unter Beweis gestellt werden.

Da 84 % der 25 Verschlussvorgänge in unter 90 s gelangen, konnte auch die Fähigkeit des Verschlusssystems einen schnellen äußerlich sichtbaren Blutungsstopp zu erreichen im Rahmen dieses Versuchs gezeigt werden. Dies entspricht in etwa dem Ergebnis aus der ersten Tierstudie (an Aorta/A. iliaca beim Schwein) des Marktführers für vaskuläre Verschlusssysteme, Angio-Seal® (Kansey et al., 1991). Dennoch fällt ein Vergleich der „Zeit bis zu Hämostase“ mit den anderen auf dem Markt verfügbaren Systemen schwer, da diese häufig entweder unterschiedliche Definitionen für diese Zeitspanne oder verschiedene Methoden für ihre Feststellung verwenden (Gargiulo et al., 2007; Lochow & Silber, 2004; Sanborn et al., 1993; Wong et al., 2009). Beispielsweise wird in einer weiteren Studie (A. femoralis Hundemodell), in der Angio-Seal® mit einem anderen System verglichen wird, allein dessen reine Anwendungsdauer mit 39 ± 7 Min. beziffert und somit die veröffentlichte Dauer aus der oben genannten Tierstudie relativiert (Gargiulo et al., 2007). Nichtsdestotrotz sind laut Literatur mittlerweile aber auch mehrere andere Systeme verfügbar, die unmittelbar nach ihrer Anwendung (< 1 Min.) für eine vollständige Hämostase sorgen (Kamusella,

Wissgott & Andresen, 2012; Schulz-Schüpke et al., 2014).

Lediglich in einem von vier Fällen, in dem ein Verschluss der Punktionsstelle in der hier vorliegenden Studie nicht möglich war, konnte dies auf das Verschlusssystem oder dessen fehlerhafte Anwendung zurückgeführt werden. In den drei anderen Fällen gelang es aufgrund eines erhöhten Gewebewiderstandes nicht, nach erfolgter Punktion über Seldingertechnik, eine Gefäßzugangsschleuse zu legen. Da der in dieser Studie getestete Verschlussstopfen im Gegensatz zu anderen Systemen aber über eine bereits für einen vorangegangenen Eingriff gelegte handelsübliche Gefäßzugangsschleuse in das Gefäßlumen vorgebracht werden soll, kann die fehlerhafte Schleusenlegung hier nicht auf einen Mangel bzw. Fehler des Verschlusssystems zurückgeführt werden.

Durch eine operative Verlagerung der A. carotis in ein subkutanes Level, wie in einer Studie aus dem Jahr 2011 (Gouvêa et al., 2011) beschrieben, würde bei der Punktion bzw. Schleusenlegung ein geringerer Gewebewiderstand vorherrschen und der Gefäßzugang wäre dadurch erheblich erleichtert.

Die bei zwei Tieren jeweils einen Tag nach einer an ihnen durchgeführten Punktion palpatorisch festgestellte Verdickung im Halsbereich ist mit einer hohen Wahrscheinlichkeit durch eine Fehlpunktion im Rahmen der Schleusenlegung verursacht worden. In dieser Studie konnten keine sonstigen mit dem getesteten Verschlusssystem in Verbindung zu bringenden klinischen Auffälligkeiten an den Versuchstieren festgestellt werden.

Die während einer der Stopfenlegungen aufgetretene Pansentympanie bei einem der Versuchstiere wurde vermutlich durch eine ruminale Atonie hervorgerufen, welche wiederum durch eine narkosebedingte Hemmung eines zerebralen Reflexzentrums verursacht worden ist (Leek, 1983).

Zum Abgasen des betroffenen Versuchstieres wurde eine oro-ruminale Sonde verwendet. Auf eine prophylaktische Sondenlegung während den Stopfenapplikationen wurde aber aufgrund des dadurch möglichen verstärkten gastro-ösophagealen Reflux verzichtet (Hossain et al., 1988).

Histologische Beurteilung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur eine geringe Anzahl an Studien, die sich mit den histologischen Ereignissen an der Verschluss- bzw. Punktionsstelle nach dem Gebrauch eines arteriellen Verschlusssystems beschäftigen.

In dieser Arbeit wurde erstmalig auf histologischer Ebene eine kontinuierliche Beurteilung der vaskulären Verschlussstelle in einem Zeitraum zwischen 0 und 30 Tagen durchgeführt.

Bei den bisher durchgeführten histologischen Studien wurden die Schnitte entweder sofort (Hofmann et al., 2003), 7 Tage (Sanghi et al., 2008), 28 Tage (Hofmann et al., 2003; Gargiulo et al., 2007), 30 Tage (Sanghi et al., 2008; Silver, 2003), 60 Tage (Sanghi et al., 2008) oder 90 Tage (Leppäniemi et al., 1997) nach der Stopfenapplikation angefertigt.

Dabei wurde sowohl bei Silver (2003) als auch bei Hofmann et al. (2003), wie in dieser hier vorliegenden Arbeit eine 8F Zugangsschleuse verwendet, wohingegen Sanghi et al. (2008) und Gargiulo et al. (2007) auf 6F Zugangsschleusen zurückgegriffen haben.

In einer Studie aus dem Jahr 2007 konnte unmittelbar nach der Anwendung zweier Verschlusssysteme eine Verkleinerung des Gefäßdiameters festgestellt werden, die jedoch beim nahtbasierten Perclose-System im Gegensatz zum Angio-Seal-System nach 28 Tagen nicht mehr sichtbar war (Gargiulo et al., 2007).

Wenngleich bei einigen der in dieser Arbeit angefertigten Schnitten ein verringerter Gefäßdurchmesser subjektiv, nicht quantitativ, angenommen werden könnte, handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um explantations- bzw. schnittbedingte Artefakte. Zur diesbezüglichen Beurteilung wäre eine Angiographie, während der Implantation und nach Ablauf der jeweiligen Beobachtungszeit hilfreich gewesen.

Eine Verkleinerung des Gefäßdurchmessers könnte einer der Gründe für das in einigen Präparaten beobachtete intraluminale Abbrechen eines Stopfenflügels und seine Dislokation sein. Andererseits könnte dies jedoch auch auf Manipulationen des Gefäßes während der Explantation zurückzuführen sein. Außerdem ist natürlich auch ein materialbedingtes Abbrechen der Stopfenflügel aufgrund einer zu frühen Degradation bei einem noch nicht eingewachsenen (reendothelialisierten) Stopfen

denkbar.

Auch bei bereits zugelassenen Verschlusssystemen wurde über Dislokationen der Verschlusseinheiten berichtet. Beispielsweise wird in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1998 ein Fall beschrieben, bei dem ein Angio-Seal®-System nicht nur mit seinem Polymeranker, sondern auch mit seinem extravasalen Anteil, einem Kollagenpfropf, vollständig intravasal zu liegen kam und zu einem akzidentiellen Verschluss der A. femoralis communis des Patienten führt (Silber et al., 1998).

Nach dem Ziehen einer arteriellen Zugangsschleuse kommt es beim Verschluss der Punktionsläsion sowohl bei den Verschlusssystemen als auch bei der manuellen Kompression zumindest für kurze Zeit zu unterschiedlich stark ausgeprägten perivaskulären Blutungen aus der Punktionsstelle.

Nach einer Schleusenextraktion kommt es in Abhängigkeit von dem Antikoagulationsstatus des Patienten innerhalb von Minuten zur Ausbildung eines Thrombus. Durch den Kontakt mit Kollagen, das durch die Verletzung der Arterienwand freiliegt, kommt es zu einer Thrombozyten-Adhäsion und zur Anlockung von Erythrozyten. Die Aggregation sowie die Aktivierung der Thrombozyten führt dann über die Freisetzung humoraler Faktoren zur Förderung einer Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in den Thrombus. Durch die Infiltration des Thrombus mit inflammatorischen Zellen kommt es wiederum zu einer Abräumung der Erythrozyten, Thrombozyten und des Fibrins. Die Produktion von extrazellulärer Matrix durch die glatten Muskelzellen führt zur Wiederherstellung der Gefäßwand (Hoffer & Bloch, 2003; Jorgensen et al., 1967; Clowes, 1989).

Die durch die Schädigung des Gefäßendothels oder aber auch durch den direkten Kontakt zwischen der Fremdoberfläche eines Implantats mit dem Blutstrom mögliche Formation eines Thrombus stellt eine gefürchtete Komplikation an der Implantationsstelle dar. Durch die Thrombenformation kann es unter Umständen zu einem Gefäßverschluss oder einer Thrombembolie kommen (Sigler, Paul & Grabitz, 2005; van Kampen & Gibbons, 1979; Krumsdorf et al., 2004).

Eine Studie aus dem Jahr 2010, bei der in einem Schafmodell die Thrombusbildung nach Kathetereingriffen und anschließender manueller Kompression untersucht wurde, konnte jedoch zeigen, dass histologisch 30 Min. nach der Explantation in 32 von 38 Fällen ein intraluminaler Thrombus festgestellt werden konnte. Darunter

waren 9 polypoide intraluminale Gerinnsel, die zwischen 3-4 mm groß waren (siehe Abbildung 52) (Kim et al., 2010).

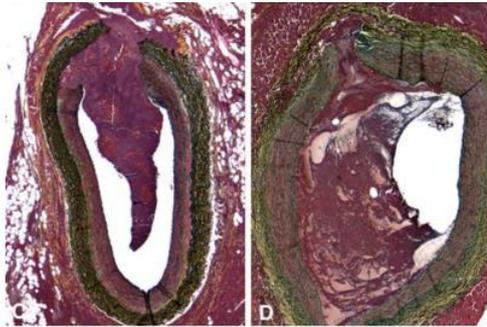


Abbildung 52: (c) und (d) Polypoide Thromben nach manueller Kompression; (aus Kim et al. (2010)).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten in einem großen Teil der Präparate intraluminale Thromben beobachtet werden. Die Thromben waren vor allem im Randbereich und unter den Verschlussstopfen, aber auch den Verschlussstopfen aufsitzend vorzufinden. Dennoch gilt es festzuhalten, dass die vorgefundenen Thromben nicht prominent intraluminal lagen und somit zu keiner wesentlichen Gefäßverengung führten. Einzige Ausnahme war das in Abbildung 43 sichtbare Präparat: Der im Schnitt zu sehende Thrombus dürfte jedoch auf eine Verletzung der dem Stopfen gegenüberliegenden Gefäßwand zurückzuführen sein. Zu dieser Verletzung ist es wahrscheinlich während des Legens der Zugangsschleuse gekommen. In der Studie von Kim und Kollegen (Kim et al., 2010) wurden des Weiteren auch Dissektionen der Gefäßwand beobachtet. Die Autoren der Studie gehen davon aus, dass die Dissektionsverletzungen auf die verwendete 8F Zugangsschleuse zurückzuführen ist. Auch in der hier vorliegenden Studie, bei der eine arterielle Zugangsschleuse gleicher Größe verwendet wurde, kam es bei einem der Präparate (siehe Abbildung 32) zu einer Dissektion der Gefäßwand, welche wohl durch eine durch die Schleusenlegung von der Perforationsstelle ausgehende Wühlblutung verursacht worden ist.

Aufgrund der antithrombotischen Eigenschaften von Endothelzellen ist es wünschenswert, dass es nach der intravasalen Implantation eines Biomaterials zu einer raschen Reendothelialisierung kommt (Sigler, Paul & Grabitz, 2005; Radomski, Palmer & Moncada, 1987).

Bei der histologischen Beurteilung der Verschlussstopfen aus der hier vorliegenden Studie konnte bei einem neun Tage alten Präparat der Beginn einer

Neointimabildung und bei den älter als 23 Tage alten Präparaten eine Reendothelialisierung gezeigt werden.

Die Zusammensetzung einer „normalen Fremdkörperreaktion“ im Rahmen der Wundheilungsreaktion nach der Implantation eines Biomaterials ist abhängig von der Beschaffenheit und dem Material des Implantats. Granulationsgewebe, sowie Fremdkörperriesenzellen sind daran in unterschiedlichen Anteilen beteiligt (Anderson, 2013).

Bei der histopathologischen Beurteilung der HE-Schnitte der Akutpräparate (0-3 Tage alt) konnten im perivasalen Bereich frische punktionsbedingte Blutungen, die bei den älteren Präparaten (3-30 Tage) in granulierend fibrosierende Entzündungen übergegangen waren, festgestellt werden.

In dieser Studie konnte bei nahezu allen ab zwei Tage alten Präparaten eine lokale Ausbildung eines Granulationsgewebes im Rahmen einer Wundheilungsreaktion gezeigt werden. Fremdkörperriesenzellen konnten hingegen nur bei einem 16 Tage alten Präparat (siehe Abbildung 46), bei dem es zu einer Dislokation eines Flügelanteils gekommen ist und bei einem 23 Tage alten Präparat (siehe Abbildung 49), mit einem im Gewebe zum Liegen gekommenen Verschlussstopfen, gesehen werden. Die in einigen Präparaten vorzufindenden neutrophilen Granulozyten sind entweder im Rahmen der durch die Punktionsläsion entstehenden Blutung angeschwemmt worden und oder waren an einer Abräumreaktion (resorptiven Entzündung) beteiligt. Eine ausgeprägte eitrige Entzündung konnte jedoch nicht festgestellt werden.

3. Limitationen und Schlussfolgerungen

Trotz der Tatsache, dass eine Extrapolation der Ergebnisse eines Tiermodells auf den Menschen niemals vollständig möglich ist, zeigte diese Studie die grundsätzliche Anwendbarkeit und Funktionalität des neu entwickelten Verschlusssystems an einem lebenden Organismus. Es muss jedoch erwähnt werden, dass Patienten, die sich kardiovaskulären Eingriffen unterziehen, häufig unter zusätzlichen Komorbiditäten, wie z. B. Diabetes oder Bluthochdruck leiden, welche bei den Versuchstieren so nicht vorgelegen haben. Des Weiteren waren die Arterien der Versuchstiere im Gegensatz zu vielen Patienten, bei denen eine

Gefäßzugangsschleuse angewendet wird, frei von arteriosklerotischen Veränderungen, was sich letztlich positiv auf den Heilungsprozess nach einer Schleusenlegung auswirken kann. Dem ist jedoch entgegenzuhalten, dass der Gefäßdurchmesser der A. carotis des Schafes etwas kleiner als der einer menschlichen Femoralarterie ist (Byrom et al., 2010), was sich möglicherweise wiederum aufgrund der auf eine humane Femoralarterie abgestimmten Größenverhältnisse des angewendeten Verschlusssystems negativ auf den Heilungsprozess beim Versuchstier auswirken kann.

Außerdem gilt es festzuhalten, dass die Anwendung bildgebender Verfahren (Angiographie) während der Versuche hilfreich gewesen wäre, um die Prozedur der Schleusenlegung und der Stopfenapplikation zu erleichtern. Möglicherweise wären dadurch weniger Manipulationen der Gefäße und des umliegenden Gewebes hervorgerufen worden. Zusätzlich hätte dadurch die Lage der Verschlussstopfen *intra vitam* während des Versuchszeitraums in Follow-up-Untersuchungen dargestellt werden können.

Dennoch reichte die limitierte Anzahl von sechs Versuchstieren dieser Pilotstudie aus um aufzuzeigen, dass mit dem neu entwickelten Verschlusssystem grundsätzlich ein effektiver, sicherer Verschluss einer arteriellen Punktionsläsion nach einer Schleusenlegung möglich ist. Das System hat die Fähigkeit, eingeführt über eine bereits liegende Schleuse, unter 90 s für eine vollständige äußerlich sichtbare Blutstillung zu sorgen. Im 30 Tage alten Schnittpräparat wurde zudem ein von Neoendothel überzogener in die Gefäßwand eingewachsener Verschlussstopfen vorgefunden. Darüber hinaus waren keine durch die Stopfenapplikation bedingten Veränderungen des Allgemeinbefindens der Tiere feststellbar.

Dennoch wäre es wünschenswert, dass in weiteren Studien die Verlässlichkeit und die Sicherheit des Systems genauer eruiert und validiert wird.

Durch den für die Materialauswahl des In-vivo-Versuchs durchgeführten In-vitro-Teil dieser Studie kann aufgrund der darin enthaltenen Hämokompatibilitätsuntersuchungen davon ausgegangen werden, dass von dem eingesetzten Stopfenmaterial für den intravasalen Einsatz bezüglich der Blutverträglichkeit nur geringe Risiken auszugehen scheinen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung, Evaluierung und Validierung einer Vorrichtung zum Schnellverschluss von Gefäßpunktionen nach perkutanen transluminalen, kardiologischen und radiologischen Eingriffen

In dieser präklinischen Machbarkeitsstudie wurden zunächst zahlreiche In-vitro-Tests durchgeführt, in denen die Materialauswahl, das Design, die Hämkompatibilität und auch die Handhabbarkeit mehrerer, in Zusammenarbeit zwischen dem UKT (Universitätsklinikum Tübingen) und dem ITV (Institut für Textil- und Verfahrenstechnik) in Denkendorf (Projektpartner) entwickelter Varianten eines neuartigen arteriellen Verschlusssystems überprüft wurden. Im Anschluss wurde vom ITV auf der Grundlage der Erkenntnisse der In-vitro-Tests ein Verschlusssystem-Prototyp des Applikators mit Verschlussstopfen (bestehend aus einem hochelastischen und resorbierbaren Spezialpolymer) hergestellt. Dieser Verschlusssystem-Prototyp wurde anschließend erstmalig im Rahmen dieser Pilotstudie in vivo in einem Schafmodell eingesetzt. Dadurch sollten sowohl die Praktikabilität als auch die biokompatiblen Eigenschaften des Devices gezeigt werden und erste Hinweise auf die Sicherheit und die Effektivität des neu entwickelten Devices gewonnen werden. Im Zuge der In-vitro-Tests wurde zunächst das Spann- und Rückstellverhalten von zehn sich in ihrer Materialzusammensetzung unterscheidenden Verschlussstopfen beim Einzug in einen Testapplikator bewertet. Sechs der zehn Materialien wurden anschließend aufgrund ihrer geeigneten Spann- und Rückstellkraft für weitere In-vitro-Tests herangezogen. In einem weiteren In-vitro-Versuch wurden sechs verschiedene Stopfen aus unterschiedlichen Materialien in einem Schweineaorten-Flussmodell implantiert und hinsichtlich ihrer Verankerung in der Gefäßwand bewertet. Dabei zeigte nur der Stopfen mit dem Material MEUV 12 eine unzureichende Verankerung. Aufgrund der Ergebnisse der ersten beiden Tests wurde eine Vorauswahl getroffen und mit je drei Stopfen von sechs unterschiedlichen Materialien (MEUV 7, MEUV 11, MQ 3, MQ 2, MQ 3 violett, MQ 2 violett) eine Hämkompatibilitätsprüfung durchgeführt. Zunächst wurden dazu die Verschlussstopfen 90 Min. bei 37° Celsius in leicht heparinisiertem (1 IU pro ml Blut) humanen Vollblut auf einer Rocking Platform inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen der Hämkompatibilitätsparameter im Probenblut. Dabei diente der Thrombin-anti-Thrombin-Komplex (TAT) als

Marker für die Koagulation, der terminale Komplementkomplex (SC5b-9) als Marker für die Aktivierung des Komplementsystems, die PMN-Elastase als Hinweisgeber für eine Aktivierung von Leukozyten und β -Thromboglobulin als Marker für die Aktivierung von Thrombozyten. Darüber hinaus wurden auch die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen bestimmt. Dabei konnte bei keinem der Verschlussstopfen nach 90-minütiger Inkubation eine signifikante Differenz zur Kontrollgruppe (Blut ohne Stopfen) festgestellt werden. Die dennoch feststellbaren Differenzen zwischen den Baseline-Werten (Probenblut nicht inkubiert) und den Werten nach den Inkubationen waren auf modellinduzierte Backgroundaktivierungen zurückzuführen. Diese Ergebnisse deckten sich auch mit der nach der Inkubation durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der Verschlussstopfen, an denen meist nur eine lokale Adhäsion von Thrombozyten, Erythrozyten, Fibrinfäden und Leukozyten festgestellt werden konnte. Außerdem wurden in weiteren Versuchen mit Schweineaorten-Modellen sich in der Anzahl ihrer Flügel oder in der Winkelung ihrer Grundkörper unterscheidende Verschlussstopfen getestet. Dabei kam es während der Testung bei einem der 6-flügligen Stopfen zum Abbruch eines Flügels. Bei der Testung der Stopfenwinkelung ergaben sich bezüglich der Dichtigkeit nur geringfügige Unterschiede. Mit dem aus den Erkenntnissen der Vorversuche vom ITV hergestellten Verschlussstopfen-Prototyp (Material MQ 2, ein kurz resorbierbares hochelastisches Spezialpolymer, ausgestattet mit fünf Flügeln und einer 85° Winkelung des Grundkörpers) wurde letztlich eine In-vivo-Machbarkeitsstudie an sechs Merinoschafen durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 29 Versuche unternommen eine Gefäßzugangsschleuse über Seldingertechnik in eine der beiden Carotiden der Versuchsschafe einzubringen, das Verschlussystem über die liegende Schleuse vorzuschieben und nach der Entfernung der Zugangsschleuse nur den Verschlussstopfen in der Gefäßwand zurückzulassen. Dabei waren 25 der 29 Stopfenapplikationen technisch erfolgreich. Bei 21 der technisch erfolgreichen Stopfenapplikationen gelangen das Einführen des Verschlussystems und der anschließende Verschluss der Punktionsstelle mit dem zurückgelassenen Verschlussstopfen in einer Zeit unter 90 s. In nur drei Fällen dauerte der Applikations- und Verschlussvorgang zwischen 90 und 180 s und lediglich in einem Fall über 180 s. Innerhalb des Versuchszeitraums (30 Tage pro Schaf) wurden die Implantationen der Verschlussstopfen bei den einzelnen Schafen in unterschiedlichen Zeitabständen vorgenommen. Ein Schaf verstarb einen Tag nach

der dritten Stopfenlegung, die komplikationslos verlaufen war, höchstwahrscheinlich an einer Pansentympnie. Die anderen Schafe waren bis auf die an zwei Versuchstieren festgestellten, kleineren (< 2 cm) Verdickungen im Halsbereich während des Versuchszeitraums klinisch unauffällig. Bei der Explantation der Carotiden konnten 16 (64 %) der 25 technisch erfolgreichen Stopfenapplikationen in der Gefäßwand, fünf (20 %) im umliegenden Gewebe und vier (16 %) gar nicht aufgefunden werden. Durch die Herstellung von Dünnschliff- und Paraffinpräparaten und deren anschließender Färbung (HE- und Masson-Trichrom-Färbung) konnte erstmalig eine kontinuierliche histologische Beurteilung der Verschlussstopfen in der Gefäßwand im Zeitraum zwischen 0-30 Tagen vorgenommen werden. Eine beginnende Neointimabildung konnte das erste Mal an einem neun Tage alten Präparat gesehen werden und ab den 23 Tage alten Präparaten konnte eine Reendothelialisierung der Verschlussstopfen beobachtet werden. Bei den Akut-Präparaten (0-2 Tage) konnten frische punktionsbedingte Blutungen, in den älteren Präparaten in einen granulierend-fibrosierenden Zustand übergegangene Entzündungen festgestellt werden. In einigen Präparaten konnten kleinere intraluminale dem Verschlussstopfen aufsitzende Thromben gefunden werden. Ein Präparat wies eine vermutlich bei der Schleusenlegung verursachte Dissektionsverletzung der Gefäßwand auf. Des Weiteren konnte in wenigen Präparaten eine Dislokation bzw. ein Abbrechen eines Verschlussstopfens beobachtet werden.

Überschießende Fremdkörperreaktionen sowie ausgeprägte eitrige Entzündungen konnten in keinem der Präparate festgestellt werden. Fremdkörperriesenzellen konnten lediglich bei einem der im Gewebe zum Liegen gekommenen Präparate und bei einem der Schnitte mit disloziertem Flügelanteil aufgefunden werden.

Bis auf die in einigen Fällen schwierige Schleusenlegung und den etwas kleineren Gefäßdurchmesser der A. carotis des Schafes im Vergleich zu der A. femoralis des Menschen erwies sich das Schaf als geeignetes Modell zur Testung eines arteriellen Verschlusssystems.

Aufgrund der geringen Stichprobe dieser Machbarkeitsstudie wären jedoch vor dem klinischen Einsatz weitere In-vivo-Testungen mit einem noch ausgereifteren, auf die Gefäßgröße besser angepassten Verschlusssystem wünschenswert.

VII. SUMMARY

Development, evaluation and validation of a quick-acting closure-device for vascular punctures after percutaneous transluminal cardiological and radiological surgical procedures

Initially in this preclinical feasibility study numerous in vitro tests were performed, where choice of material, design, hemocompatibility and operability of several variants of an innovative arterial closure device were examined. These devices had been developed by UKT (University Hospital Tübingen) in collaboration with ITV (Institute of Textile Technology and Process Engineering Denkendorf). Based on the results of the in vitro tests ITV manufactured a closure device prototype of the applicator with sealing plug (consisting of a highly elastic and resorbable specialized polymer) which afterwards was used for the first time in vivo in a sheep model within this pilot study. Hereby practicability as well as biocompatibility of the device should be proofed. Furthermore initial safety and efficacy hints of the newly developed device had to be obtained.

In the course of the in vitro tests at first the tensioning and resilience performance of ten closure devices differing in the composition of their materials were evaluated during the retraction in a test applicator. Six of the initially tested ten materials were later used for further tests because of their suitable tensioning and resilience qualities.

In another in vitro test six distinct plugs consisting of different materials were implanted in a porcine aorta model and evaluated in regard to their fixation in the vessel wall. Thereby only the plug consisting of the MEUV 12 material was insufficiently fixed. Because of the results of the first two tests a preselection was made, so that a hemocompatibility test with plugs consisting of six different materials (MEUV 7, MEUV 11, MQ 3, MQ 2, MQ 3 violet, MQ 2 violet), three plugs each, could be performed. To start with, the closure-plugs were incubated for 90 minutes at 37° C in slightly heparinized human whole blood (1 IU per ml blood) on a Rocking platform. Thereafter the concentrations of the parameters of hemocompatibility in the blood samples were determined. In the process the thrombin-anti-thrombin complex (TAT) served as a marker of coagulation, the terminal complement complex (SC5b-9) served as a marker for the activation of the complement system, PMN elastase served as whistleblower for an activation of

leukocytes, and β -thromboglobulin served as a marker for platelet activation. In addition, the erythrocyte, leukocyte and platelet counts were determined. After 90 minutes of incubation none of the sealing-plugs showed a significant difference to the control group (blood without plug). The still detectable differences between the baseline values (blood samples not incubated) and the values after the incubations were due to model induced background activations. These results were consistent with the scanning electron microscopic examination of the sealing plug performed after incubation, where mostly only a local adhesion of platelets, erythrocytes, fibrin and leukocytes was found. In addition, in further experiments with porcine aorta models sealing plugs that differed in the number of their wings or in the angulation of their basic twill were tested. During the test one wing of one of the six-winged plugs was broken. When tested the plug angulation arose with respect to the tightness only minor differences. The findings of these preliminary tests enabled the ITV to produce a closure device prototype (MQ2 material, a short-resorbable highly elastic special polymer, equipped with five wings, 85° angulation of the body) which then was used for our in vivo feasibility study on six merino sheep. Here, 29 attempts have been made to introduce a vascular access port via Seldinger technique in one of the two carotid arteries of the experimental sheep, to advance the closure system over the already defined lock and, after removal of the access lock, to leave only the closure plug in the vessel wall. 25 of the 29 plug applications were technically successful. In 21 of the technically successful applications plug insertion of the closure system and the subsequent closure of the puncture site with the abandoned plugs succeeded in a time under 90 seconds. In only three cases the application and closing process took between 90 and 180 seconds and only in one case more than 180 seconds. Within the trial period (30 days per sheep) the implantations of the closure plugs have been made at different intervals at each sheep. One sheep died one day after the third surgery (that had been performed without complications) most likely due to a ruminal tympany.

The other sheep were clinically silent during the trial period except smaller (< 2 cm) thickening in the neck recorded on two animals.

In the explantation of the carotides 16 (64%) of the 25 technically successful plug applications were found in the vessel wall, five (20%) were found in the surrounding tissue, and four (16%) were not found at all. Through the production of the thin section and paraffin preparations and their subsequent staining (HE and

Masson's trichrome staining) for the first time a continuous histological evaluation of the sealing plugs in the vessel wall in the period between 0 and 30 days could be made. An incipient neointimal formation was the first time to be seen on a nine-day-old specimen, and from the 23-day-old and older specimens a re-endothelialization of the closure plugs could be observed. In the acute preparations (0-2 days) fresh puncture-induced bleedings were to be detected, in the older specimens in granulating-fibrotic conditions devolved inflammations were ascertained. In some preparations minor intraluminal thrombi, located on the plug, were found. A preparation had a dissection-injury of the vessel wall, probably caused during the initial surgical procedure (introduction of the vascular access port). Furthermore, a dislocation or breaking off of the plug could be observed in a few preparations.

Excessive foreign body reactions and pronounced purulent inflammations were observed in any of the preparations. Foreign body giant cells were found in one preparation where the plug was situated in the tissue and in one section with a displaced part of a wing.

Except for the sometimes difficult introduction of the vascular access port and the slightly smaller vessel diameter of the carotid artery of sheep compared to the human femoral artery, the sheep proved an appropriate model for testing an arterial closure system.

Due to the small sample of this feasibility study, however, further in vivo testing with a more mature and better to the vessel size adapted closing system would be desirable prior to clinical use.

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Phasen der Wirtsreaktion bei Fremdkörperkontakt und die dabei beteiligten Zellen nach Implantation eines Biomaterials; (aus Anderson, Rodriguez & Chang, (2008)).</i>	38
<i>Abbildung 2: Übersicht über die durchgeführten Testungen.</i>	40
<i>Abbildung 3: Verschlussstopfen beim Einzug in den Testapplikator.</i>	41
<i>Abbildung 4: Schemazeichnung des Flussmodells.</i>	42
<i>Abbildung 5: Schweineaorten-Flussmodell.</i>	43
<i>Abbildung 6: Einschub des Verschlussstopfens in die Zugangsschleuse.</i>	51
<i>Abbildung 7: Winkelungen der getesteten Stopfengrundkörper.</i>	52
<i>Abbildung 8: Schemazeichnung der Dichtigkeits/Designstudie.</i>	52
<i>Abbildung 9: Schweineaortenmodell vor der Stopfenapplikation.</i>	53
<i>Abbildung 10: Schweineaortenmodell nach Applikation der Stopfen.</i>	54
<i>Abbildung 11: Ventrale Ansicht des Gefäßes, bei jetzt vernähter Inzisionstelle. Auf dem Bild sind die Sicherungsfäden der Verschlussstopfen zu erkennen.</i>	54
<i>Abbildung 12: Das ursprünglich entwickelte Verschlussystem.</i>	58
<i>Abbildung 13: In den In-vivo-Versuchen verwendetes Verschlussystem</i>	59
<i>Abbildung 14: Ergebnisübersicht der Spann- und Rückstelltestungen.</i>	65
<i>Abbildung 15: Mittelwerte der Erythrozytenzahl \pm SD (n=3) [10^6 /μl] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	68
<i>Abbildung 16: Mittelwerte der Leukozytenzahl \pm SD (n=3) [10^3 /μl] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	69
<i>Abbildung 17: Mittelwerte der Thrombozytenzahl \pm SD (n=3) [10^3 /μl] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	70
<i>Abbildung 18: Mittelwerte der β-TG-Konzentrationen \pm SD (n=3) [IU/ml] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	71
<i>Abbildung 19: Mittelwerte der TAT-Konzentrationen \pm SD (n=3) [μg/l.] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	72
<i>Abbildung 20: Mittelwerte der SC5b-9-Konzentrationen \pm SD (n=3) [ng/ml] nach</i>	

<i>90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	73
<i>Abbildung 21: Mittelwerte der PMN-Elastase-Konzentrationen \pm SD (n=3) [μg/l] nach 90-minütiger Inkubation unterschiedlicher Materialien auf einer Rocking Platform in humanem Vollblut.</i>	74
<i>Abbildung 22: Punktuelle Besiedlung der Stopfenoberfläche (MQ 2 violett, inkubiert mit Blut von Spender 1) mit Erythrozyten (500x Vergrößerung).</i>	78
<i>Abbildung 23: Erythrozyten und Fibrinfäden auf MEUV 11-Stopfen (Spender 1) (2000x Vergrößerung).</i>	78
<i>Abbildung 24: Erythrozyten und Fibrinfäden auf MEUV 11-Stopfen (Spender 1) (5000x Vergrößerung).</i>	79
<i>Abbildung 25: Lage von Verschlussstopfen mit unterschiedlicher Flügelanzahl.</i>	79
<i>Abbildung 26: Blutaustritt beim Dichtigkeitstest mit unterschiedlichen Winkelungen der Stopfenbasis (Ansicht von oben).</i>	80
<i>Abbildung 27: Lage der Stopfen nach dem ersten Dichtigkeitstest (Ansicht der Gefäßinnenseite).</i>	80
<i>Abbildung 28: Blutaustritt beim zweiten Dichtigkeitstest.</i>	81
<i>Abbildung 29: Lage der Stopfen nach dem zweiten Dichtigkeitstest</i>	82
<i>Abbildung 30: 0 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 2) (a) Nativ-Dünnschliffpräparat (b) & (c) HE-Dünnschliffpräparat.</i>	87
<i>Abbildung 31: 2 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 3) HE-Paraffinpräparat.</i>	88
<i>Abbildung 32: 2 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 3) M.tr-Paraffinpräparat.</i>	89
<i>Abbildung 33: 3 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) (a) Nativ-Dünnschliffpräparat (b) HE-Dünnschliffpräparat.</i>	89
<i>Abbildung 34: 7 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) (a) Nativpräparat (b) HE-Dünnschliffpräparat.</i>	90
<i>Abbildung 35: 7 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 2) (a) Nativpräparat (b) HE-Dünnschliffpräparat.</i>	90
<i>Abbildung 36: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) HE-Paraffinpräparat.</i>	91
<i>Abbildung 37: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) M.tr-Paraffinpräparat.</i>	91
<i>Abbildung 38: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) (andere Schnittebene) M.tr-Paraffinpräparat.</i>	92
<i>Abbildung 39: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) HE-Paraffinpräparat.</i>	92
<i>Abbildung 40: 9 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) M.tr-Paraffinpräparat.</i>	93
<i>Abbildung 41: 9 Tage alter im Gewebe liegender Stopfen (Schaf Nr. 4) HE-</i>	

<i>Paraffinpräparat</i>	93
<u>Abbildung 42</u> : 10 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) HE-Dünnschliffpräparat.	94
<u>Abbildung 43</u> : 13 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 2) (a) HE-Dünnschliffpräparat (b) Nativ-Dünnschliffpräparat.....	94
<u>Abbildung 44</u> : 14 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) HE-Dünnschliffpräparat.	95
<u>Abbildung 45</u> : 14 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 1) HE-Dünnschliffpräparat (andere Schnittebene).....	95
<u>Abbildung 46</u> : 16 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) (a) HE- und (b) M.tr-Paraffinpräparat.	96
<u>Abbildung 47</u> : 23 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 5) HE-Paraffinpräparat.	96
<u>Abbildung 48</u> : 23 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) HE-Paraffinpräparat.	97
<u>Abbildung 49</u> : 23 Tage alter im Gewebe liegender Stopfen (Schaf Nr. 3) HE-Paraffinpräparat.	97
<u>Abbildung 50</u> : 30 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 4) (a) HE- (b) M.tr-Paraffinpräparat.	98
<u>Abbildung 51</u> : 30 Tage alter Stopfen (Schaf Nr. 6) (a) (c) (d) HE- (b) M.tr- (e-f) EvG-Paraffinpräparat.....	99
<u>Abbildung 52</u> : (c) und (d) Polypoide Thromben nach manueller Kompression; (aus Kim et al., (2010)).	115

IX. TABELLENVERZEICHNIS

<u>Table 1: Bewertungsschema Spannverhalten (Einzugsverhalten in den Testapplikator).</u>	41
<u>Table 2: Bewertungsschema Rückstellkraft (Rückverformbarkeit der Stopfenflügel nach Ausschub des gespannten Verschlussstopfens aus dem Testapplikator).</u>	41
<u>Table 3: Übersichtstabelle zur Aufbereitung des Probenblutes.</u>	44
<u>Table 4: Übersichtstabelle über die Lagerung des Probenblutes.</u>	45
<u>Table 5: Prüfparameter und Testverfahren der Hämokompatibilitätstests.</u>	49
<u>Table 6: Schema für die Dichtigkeitsbewertung.</u>	55
<u>Table 7: Kriterien zur Lagebewertung der Stopfen.</u>	55
<u>Table 8: Versuchstiere für die Applikation der Verschlussstopfen.</u>	56
<u>Table 9: Geplante zeitliche Versuchsabfolge (Schafe Nr. 1-2).</u>	57
<u>Table 10: Geplante zeitliche Versuchsabfolge (Schafe Nr. 3-6).</u>	57
<u>Table 11: Zusammenstellung der Ergebnisse des Flussmodell-Versuchs.</u>	66
<u>Table 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Verschlussstopfen nach 90-minütiger Inkubation mit Spenderblut (Ansicht von ventral; 40x Vergrößerung).</u>	75
<u>Table 13: REM-Aufnahmen der Verschlussstopfen nach Inkubation (90 Min.) mit Spenderblut (Ansicht von dorsal; 40x Vergrößerung).</u>	76
<u>Table 14: REM-Aufnahmen der nicht mit Spenderblut inkubierten Negativkontrollen (Ansicht von ventral; 40x Vergrößerung).</u>	77
<u>Table 15: Ergebnistabelle des ersten Dichtigkeitstest.</u>	80
<u>Table 16: Ergebnisse der Lagebewertung nach dem ersten Dichtigkeitstest.</u> ...	81
<u>Table 17: Beobachtungen Versuchstier Nr. 1 (Schaf 1).</u>	83
<u>Table 18: Beobachtungen Versuchstier Nr. 2 (Schaf 2).</u>	84
<u>Table 19: Beobachtungen Versuchstier Nr. 3 (Schaf 3).</u>	84
<u>Table 20: Beobachtungen Versuchstier Nr. 4 (Schaf 4).</u>	84
<u>Table 21: Beobachtungen Versuchstier Nr. 5 (Schaf 5).</u>	85
<u>Table 22: Beobachtungen Versuchstier Nr. 6 (Schaf 6).</u>	85
<u>Table 23: Übersichtstabelle über verfügbares histologisches Material.</u>	87

X. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott-Vascular (2012). STARCLOSE SE® Vascular Closure System Instructions for Use. Redwood City 2012.
- Aescht, E., Büchl-Zimmermann, S., Burmester, A., Dänhardt-Pfeiffer, S., Desel, C., Hamers, C., Jach, G., Kässens, M., Makovitzky, J., Mulisch, M., Nixdorf-Bergweiler, B., Pütz, D., Riedelsheimer, B., van den Boom, F., Wegerhoff, R. & Welsch, U. (2010). Romeis Mikroskopische Technik., 18 Heidelberg 2010.
- Alain Carré, K. L. M. (2011). Surface and Interfacial Aspects of Cell Adhesion. Boca Raton, USA 2011.
- Anderson, G. H., Hellums, J. D., Moake, J. L. & Alfrey, C. P. (1978). Platelet lysis and aggregation in shear fields. *Blood cells*, 3 (4), S. 499–511.
- Anderson, J. M. (2001). BIOLOGICAL RESPONSES TO MATERIALS. *Annual Review of Materials Research*, 1 (31), S. 81–110.
- Anderson, J. M. (2013). Inflammation, Wound Healing, and the Foreign-Body Response. in: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Third Edit 2013, S. 503–512.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 2 (20), S. 86–100.
- Applegate, R. J., Grabarczyk, M. a, Little, W. C., Craven, T., Walkup, M., Kahl, F. R., Braden, G. a, Rankin, K. M. & Kutcher, M. a (2002). Vascular closure devices in patients treated with anticoagulation and iib/iiia receptor inhibitors during percutaneous revascularization. *Journal of the American College of Cardiology*, 1 (40), S. 78–83.
- Applegate, R. J., Sacrinty, M. T., Kutcher, M. a, Baki, T. T., Gandhi, S. K., Santos, R. M. & Little, W. C. (2006). Propensity score analysis of vascular complications after diagnostic cardiac catheterization and percutaneous coronary intervention 1998-2003. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 4 (67), S. 556–562.
- Arora, N., Matheny, M. E., Sepke, C. & Resnic, F. S. (2007). A propensity analysis of the risk of vascular complications after cardiac catheterization procedures with the use of vascular closure devices. 2007.
- Arshady, R. (2003). Polymetric biomaterials: chemistry, concepts, criteria. in: Introduction to Polymeric Biomaterials, hrsg. v. R. Arshady, London 2003, S. 1–62.

- Aytemiz, D., Suzuki, Y., Shindo, T., Saotome, T., Tanaka, R. & Asakura, T. (2014). In vitro and in vivo Evaluation of Hemocompatibility of Silk Fibroin Based Artificial Vascular Grafts. *International Journal of Chemistry*, 2 (6), S. 1–14.
- Azmoon, S., Pucillo, A. L., Aronow, W. S., Ebrahimi, R., Vozzolo, J., Rajdev, A., Kalapatapu, K., Ro, J. H. & Hjemdahl-Monsen, C. (2010). Vascular complications after percutaneous coronary intervention following hemostasis with the Mynx vascular closure device versus the AngioSeal vascular closure device. *The Journal of invasive cardiology*, 4 (22), S. 175–178.
- Baier, R. E. & Dutton, R. C. (1969). Initial events in interactions of blood with a foreign surface. *Journal of biomedical materials research*, 1 (3), S. 191–206.
- Bailey, S. R. (2008). Histopathologic observations of femoral closure devices: understanding the differences. *Reviews in cardiovascular medicine*, 1 (9), S. 21–28.
- Balzer, J. O., Scheinert, D., Diebold, T., Haufe, M., Vogl, T. J. & Biamino, G. (2001). Postinterventional transcatheter suture of femoral artery access sites in patients with peripheral arterial occlusive disease: a study of 930 patients. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 2 (53), S. 174–181.
- Bangalore, S. & Bhatt, D. L. (2011). Femoral arterial access and closure. *Circulation*, 5 (124), S. e147–156.
- Bavry, A. A., Raymond, R. E., Bhatt, D. L., Chambers, C. E., DeNardo, A. J., Hermiller, J. B., Myers, P. R., Pitts, D. E., Scott, J. A., Savader, S. J. & Steinhubl, S. (2008). Efficacy of a novel procedure sheath and closure device during diagnostic catheterization: the multicenter randomized clinical trial of the FISH device. *The Journal of invasive cardiology*, 4 (20), S. 152–156.
- Bechara, C. F., Annambhotla, S. & Lin, P. H. (2010). Access site management with vascular closure devices for percutaneous transarterial procedures. *Journal of vascular surgery*, 6 (52), S. 1682–1696.
- Begg, G. S., Pepper, D. S., Chesterman, C. N. & Morgan, F. J. (1978). Complete covalent structure of human beta-thromboglobulin. *Biochemistry*, 9 (17), S. 1739–1744.
- Bekeredjian, R. (2013). Der transfemorale Zugang. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, 1 (27), S. 17–18.
- Biancari, F., D'Andrea, V., Di Marco, C., Savino, G., Tiozzo, V. & Catania, A. (2010). Meta-analysis of randomized trials on the efficacy of vascular closure devices after diagnostic angiography and angioplasty. *American heart journal*, 4 (159), S. 518–531.
- Bonzel, T., Erbel, R., Hamm, C. W., Levenson, B., Neumann, F.-J., Rupprecht, H.-J. & Zahn, R. (2008). [Percutaneous coronary interventions (PCI)].

Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society, 8 (97), S. 513–547.

- Boschewitz, J. M., Andersson, M., Naehle, C. P., Schild, H. H., Wilhelm, K. & Meyer, C. (2013). Retrospective evaluation of safety and effectiveness of the EXOSEAL vascular closure device for single vascular closure and closure after repeat puncture in diagnostic and interventional radiology: single-center experience. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 5 (24), S. 698–702.
- Bücheler, E., Lackner, K.-J. & Thelen, M. (2005). Einführung in die Radiologie Diagnostik und Interventionen., 11 Stuttgart 2005.
- Butler, J., Rocker, G. M. & Westaby, S. (1993). Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*, 2 (55), S. 552–559.
- Van Buuren, F. (2010). 25. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland. *Der Kardiologe*, 6 (4), S. 502–508.
- Byrne, R. a, Cassese, S., Linhardt, M. & Kastrati, A. (2013). Vascular access and closure in coronary angiography and percutaneous intervention. 2013.
- Byrom, M. J., Bannon, P. G., White, G. H. & Ng, M. K. C. (2010). Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *Journal of vascular surgery*, 1 (52), S. 176–195.
- Caputo, R. P. (2012). Currently Approved Vascular Closure Devices. *Cardiac Interventions Today*, S. 70–76.
- Chandrasekar, B. & Tanguay, J. F. (2000). Platelets and restenosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 3 (35), S. 555–562.
- Chevalier, B., Lancelin, B., Koning, R., Henry, M., Gommeaux, A., Pilliere, R., Elbaz, M., Lefevre, T., Boughalem, K., Marco, J. & Dupouy, P. (2003). Effect of a closure device on complication rates in high-local-risk patients: results of a randomized multicenter trial. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 3 (58), S. 285–291.
- Chiu, A. H. Y., Coles, S. R., Tibballs, J. & Nadkarni, S. (2010). The StarClose vascular closure device in antegrade and retrograde punctures: a single-center experience. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 1 (17), S. 46–50.
- Clowes, A. W. (1989). Arterial wall response to injury and healing. *Journal of Vascular Surgery*, 2 (9), S. 373–375.
- Cremonesi, A., Castriota, F., Tarantino, F., Troiani, E., Ricci, E., El Jamal B, Grattoni, C. & Noera, G. (1998). Femoral Arterial Hemostasis using the Angio-Seal^a System after Coronary and Vascular Percutaneous Angioplasty and Stenting. *The Journal of invasive cardiology*, 8 (10), S. 464–469.

- Dauerman, H. L., Applegate, R. J. & Cohen, D. J. (2007). Vascular closure devices: the second decade. *Journal of the American College of Cardiology*, 17 (50), S. 1617–1626.
- Deuling, J. H. H., Vermeulen, R. P., Anthonio, R. a, van den Heuvel, a F. M., Jaarsma, T., Jessurun, G., de Smet, B. J. G. L., Tan, E. S. & Zijlstra, F. (2008). Closure of the femoral artery after cardiac catheterization: a comparison of Angio-Seal, StarClose, and manual compression. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 4 (71), S. 518–523.
- Dewald, B., Rindler-Ludwig, R., Bretz, U. & Baggiolini, M. (1975). Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine*, 4 (141), S. 709–723.
- Dickerhof, R., Böll, B., Herling, M. & Klein, F. (2013). Physiologie der Blutstillung. in: Basislehrbuch innere Medizin, München 2013, S. 304–308.
- Doyle, B. J., Godfrey, M. J., Lennon, R. J., Ryan, J. L., Bresnahan, J. F., Rihal, C. S. & Ting, H. H. (2007). Initial experience with the Cardiva Boomerang vascular closure device in diagnostic catheterization. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 2 (69), S. 203–208.
- Dudenhause, J. W., Langner, K. & Sönmez, M. (1987). [Elastase of polymorphonuclear granulocytes. Determination in plasma in pregnancy and following premature rupture of the membranes]. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 9 (47), S. 597–600.
- Duswald, K. H. (1983). Zur Pathobiochemie der Leukozyten-Elastase und ausgewählter Plasmaproteine nach abdominalchirurgischen Eingriffen. Darmstadt 1983.
- Ecker, S. M. (2002). Untersuchungen zur Hämkompatibilität von Biomaterialien. 2002.
- Eggebrecht, H., Haude, M., Baumgart, D., Oldenburg, O., Herrmann, J., Bruch, C., Hunold, P., Neurohr, C., von Birgelen, C., Welge, D., Katz, M.-A. & Erbel, R. (1999). Hämostatischer Verschluss der arteriellen Punktionsstelle mittels Angio-Seal™ nach diagnostischer Herzkatheteruntersuchung oder Koronarintervention. *Herz*, 8 (24), S. 607–613.
- Erbel, R., Pfligt, B., Kahlert, P. & Konorza, T. (2012). Herzkatheter-Manual. 2012.
- Ernst, S. M. P. G., Tjonjoegin, R. M., Schröder, R., Kaltenbach, M., Sigwart, U., Sanborn, T. A. & Plokker, H. W. T. (1993). Immediate sealing of arterial puncture sites after cardiac catheterization and coronary angioplasty using a biodegradable collagen plug: Results of an international registry. *Journal of the American College of Cardiology*, 4 (21), S. 851–855.

- Fields, J. D., Liu, K. C., Lee, D. S., Gonda, S. J., Dogan, a, Gultekin, S. H., Nesbit, G. M., Petersen, B. D. & Barnwell, S. L. (2010). Femoral artery complications associated with the Mynx closure device. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 9 (31), S. 1737–1740.
- Gargiulo, N. J., Veith, F. J., Ohki, T., Scher, L. a., Berdejo, G. L., Lipsitz, E. C., Menegus, M. & Greenberg, M. (2007). Histologic and duplex comparison of the perclose and angio-seal percutaneous closure devices. *Vascular*, 1 (15), S. 24–29.
- Gemmell, C. H. (2001). Activation of platelets by in vitro whole blood contact with materials: increases in microparticle, procoagulant activity, and soluble P-selectin blood levels. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 8 (12), S. 933–943.
- Gerckens, U., Cattelaens, N. & Müller, R. (1998). Perkutaner Nahtverschluß von Femoralarterienzugängen nach diagnostischen Herzkatheterisierungen oder Koronarinterventionen. *Herz*, 1 (34), S. 27–34.
- Gershony, G., Brock, J. M. & Powell, J. S. (1998). Novel vascular sealing device for closure of percutaneous vascular access sites. *Catheterization and cardiovascular diagnosis*, 1 (45), S. 82–8; discussion 90–91.
- Golenhofen, K. (2006). Blutstillung und Blutgerinnung. in: Basislehrbuch Physiologie, München, 4 2006, S. 138–144.
- Gonze, M. D., Sternbergh, W. C., Salartash, K. & Money, S. R. (1999). Complications associated with percutaneous closure devices. *The American Journal of Surgery*, 3 (178), S. 209–211.
- Goodman, P. D., Barlow, E. T., Crapo, P. M., Mohammad, S. F. & Solen, K. A. (2005). Computational model of device-induced thrombosis and thromboembolism. *Annals of biomedical engineering*, 6 (33), S. 780–797.
- Gorbet, M. B. & Sefton, M. V (2004). Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 26 (25), S. 5681–5703.
- Götze, O. & Müller-Eberhard, H. J. (1970). Lysis of erythrocytes by complement in the absence of antibody. *The Journal of experimental medicine*, 5 (132), S. 898–915.
- Gouvêa, L. V, Novais, E. P. F., Leite, C. R., Ximenes, F. H. B., Almeida, R. M., Molás, R. B., Palermo, J. G. C., Silva, C. E. V, Borges, J. R. J., Lima, E. M. M. & Godoy, R. F. (2011). Surgical Preparation of a Permanent Carotid Transposition in Sheep. , September (2011), S. 402–405.
- Gray, B. H., Miller, R., Langan, E. M., Joels, C. S., Yasin, Y. & Kalbaugh, C. a (2009). The utility of the StarClose arterial closure device in patients with peripheral arterial disease. *Annals of vascular surgery*, 3 (23), S. 341–344.
- Grech, E. D. (2004). ABC of Interventional Cardiology. London 2004.

- Greten, H., Rinninger, F. & Greten, T. (2010). Innere Medizin., 13 Stuttgart 2010.
- Grüntzig, A. & Kumpe, D. A. (1979). Technique of percutaneous transluminal angioplasty with the Grüntzig ballon catheter. *AJR. American journal of roentgenology*, 4 (132), S. 547–552.
- Grüntzig, A. R., Senning, A. & Siegenthaler, W. E. (1979). Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *The New England journal of medicine*, 2 (301), S. 61–68.
- Gulba, D. C., Barthels, M., Reil, G. H. & Lichtlen, P. R. (1988). Thrombin/antithrombin-III complex level as early predictor of reocclusion after successful thrombolysis. *Lancet*, 8602 (2), S. 97.
- Haas, P. C., Krajcer, Z. & Diethrich, E. B. (1999). Closure of large percutaneous access sites using the Prostar XL Percutaneous Vascular Surgery device. *Journal of endovascular surgery : the official journal of the International Society for Endovascular Surgery*, 2 (6), S. 168–170.
- Hamel, W. J. (2009). Femoral artery closure after cardiac catheterization. *Critical care nurse*, 1 (29), S. 39–46; quiz 47.
- Hamm, C. W., Albrecht, A., Bonzel, T., Kelm, M., Lange, H., Schächinger, V., Terres, W. & Voelker, W. (2008). [Diagnostic heart catheterization]. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 8 (97), S. 475–512.
- Hanson, S. R. & Tucker, E. I. T. (2012). Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions. in: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, hrsgg. v. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & Jacke E. Lemons, 3 2012, S. 551–557.
- Harrison, P. (2000). Progress in the assessment of platelet function. *British journal of haematology*, 3 (111), S. 733–744.
- Hauser, N. (2003). Untersuchungen zur Biokompatibilität von in der Herzchirurgie relevanten Polymerkunststoffen. 2003.
- Heintzen, M. P. & Strauer, B. E. (1998). Periphere arterielle Komplikationen nach Herzkatheteruntersuchung. *Herz*, 1 (23), S. 4–20.
- Henson, P. M. (1971). The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 6 (107), S. 1547–1557.
- Henson, P. M. (1980). Mechanisms of exocytosis in phagocytic inflammatory cells. Parke-Davis Award Lecture. *The American journal of pathology*, 3 (101), S. 494–511.

- Hepp, W. & Kogel, H. (Hrsg) (2006). Interventionelle Maßnahmen. in: Gefäßchirurgie, hrsgg. v. W. Hepp & H. Kogel, München, 2 2006, S. 111–117.
- Hermiller, J. B., Simonton, C., Hinohara, T., Lee, D., Cannon, L., Mooney, M., O’Shaughnessy, C., Carlson, H., Fortuna, R., Zapien, M., Fletcher, D. R., DiDonato, K. & Chou, T. M. (2006). The StarClose Vascular Closure System: interventional results from the CLIP study. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 5 (68), S. 677–683.
- Hick, C. & Hick, A. (2013). mediscript Kurzlehrbuch Physiologie. München 2013.
- Hind, C. R., Griffin, J. F., Pack, S., Latchman, Y. E., Drake, H. F., Jones, H. M., Brostoff, J., Dormandy, T. L. & Treasures, T. (1988). Effect of cardiopulmonary bypass on circulating concentrations of leucocyte elastase and free radical activity. *Cardiovascular research*, 1 (22), S. 37–41.
- Hoffer, E. K. & Bloch, R. D. (2003). Percutaneous Arterial Closure Devices. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 7 (14), S. 865–885.
- Hoffmann, J., Groll, J., Heuts, J., Rong, H., Klee, D., Ziemer, G., Moeller, M. & Wendel, H. P. (2006). Blood cell and plasma protein repellent properties of Star-PEG-modified surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9 (17), S. 985–996.
- Hofmann, L. V., Sood, S., Liddell, R. P., Gupta, A., Arepally, A., Rodriguez, E. R. & Eng, J. (2003). Arteriographic and pathologic evaluation of two suture-mediated arterial closure devices in a porcine model. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 6 (14), S. 755–761.
- Hon, L. Q., Ganeshan, a, Thomas, S. M., Warakaulle, D., Jagdish, J. & Uberoi, R. (2010). An overview of vascular closure devices: what every radiologist should know. *European journal of radiology*, 1 (73), S. 181–190.
- Hossain, M. A., Cottrell, D. F., Camburn, M. A. & Campbell, J. R. (1988). Gastro-oesophageal reflux in halothane anaesthetized sheep. The effects of feeding and positioning. *Veterinary research communications*, 2-3 (12), S. 227–232.
- Hsu, L. C. (1997). Biocompatibility in cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 3 (11), S. 376–382.
- Huppelsberg, J. & Walter, K. (2013). Kurzlehrbuch Physiologie., 4 Stuttgart 2013.
- Imam, A., Carter, R. M. S., Phillips-Hughes, J., Boardman, P. & Uberoi, R. (2007). StarClose vascular closure device: prospective study on 222 deployments in an interventional radiology practice. *Cardiovascular and interventional radiology*, 4 (30), S. 738–742.

- Isfort, P., Tanaka, T., Penzkofer, T., Bruners, P., Tolba, R., Kuhl, C. K. & Mahnken, a H. (2014). Vascular closure devices after endovascular procedures in swine: a reliable method? *TheScientificWorldJournal* (2014), Article ID 514942
- ISO 19993 Biological evaluation of medical devices., URL:
<http://www.iso.org/iso/search.htm?qt=10993&searchSubmit=Search&sort=rel&type=simple&published=true>.
- Janatova, J. (1988). C3, C5 components and C3a, C4a, and C5a fragments of the complement system. *Methods in enzymology* (162), S. 579–625.
- Jelkmann, T. (2010). Blutstillung und -gerinnung. in: *Physiologie des Menschen*, Heidelberg, 31 2010, S. 492–498.
- Johnston, R. B. (1988). Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *The New England journal of medicine*, 12 (318), S. 747–752.
- Jorgensen, L., Rowsell, H. C., Hovig, T. & Mustard, J. F. (1967). Resolution and organization of platelet-rich mural thrombi in carotid arteries of swine. *The American journal of pathology*, 5 (51), S. 681–719.
- St. Jude Medical (2007). INSTRUCTIONS FOR USE (Angio-Seal vascular closure device Vip). Minnetonka, MN 2007.
- Jung, F., Braune, S. & Lendlein, a (2013). Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 1-2 (53), S. 97–115.
- Kaiser, E., Markant, M., Birkemeyer, R. & Twisselmann, T. (2013). Komplikationsmanagement im Herzkatheterlabor. Berlin, Heidelberg 2013.
- Van Kampen, C. L. & Gibbons, D. F. (1979). Effect of implant surface chemistry upon arterial thrombosis. *Journal of biomedical materials research*, 4 (13), S. 517–541.
- Kamusella, P., Wissgott, C. & Andresen, R. (2012). [Use of a percutaneous suture-mediated closure system after 6 - 8F transfemoral approaches: results for 2200 patients]. *RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*, 4 (184), S. 311–315.
- Kansey, K. R., Evans, D. G., McGill, L. D. & Nash, J. C. (1991). In vivo feasibility testing of a bioresorbable hemostatic puncture closure device. *Journal of the American College of Cardiology*, 2 (17), S. A263.
- Kaspers, B. & Göbel, T. (2005). Hämostase. in: *Physiologie der Haustiere*, hrsgg. v. W. von Engelhardt & G. Breves, Stuttgart, 2 2005, S. 207–212.
- Keller, K. H. (1981). The dynamics of the interaction of cells with surfaces. in: *Interaction of the Blood With Natural and Artificial Surfaces*, hrsg. v. E. W. Salzman, Dekker, USA 1981, S. 119–138.

- Kern, M. J. (2012). *The Interventional Cardiac Catheterization Handbook.*, 3 2012.
- Kiemeneij, F., Laarman, G. J., Odekerken, D., Slagboom, T. & van der Wieken, R. (1997). A Randomized Comparison of Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty by the Radial, Brachial and Femoral Approaches: The Access Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 6 (29), S. 1269–1275.
- Kiesz, R. S., Wiernek, B. K., Wiernek, S. L., Merritt, C., Ybarra, T., Iwanski, A., Buszman, P. P., Szymanski, R., Martin, J. L. & Buszman, P. E. (2011). Cardiva Catalyst II vascular access management device in percutaneous diagnostic and interventional procedures with same-day discharge (Catalyst II trial). *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 1 (18), S. 46–53.
- Kim, Y. H., Pavcnik, D., Kakizawa, H., Uchida, B. T., Burke, A., Loriaux, M., Keller, F. S. & Rosch, J. (2010). Thrombus formation after percutaneous catheterization and manual compression of the femoral artery in heparinized sheep. *Cardiovascular and interventional radiology*, 2 (33), S. 321–329.
- Knapp, S. & Stroszczyński, C. (2008). [Accessing arteries in interventional radiology]. *Der Radiologe*, 4 (48), S. 375–379.
- Kolb, W. P., Haxby, J. A., Arroyave, C. M. & Müller-Eberhard, H. J. (1972). Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. *The Journal of experimental medicine*, 3 (135), S. 549–566.
- Koreny, M., Riedmüller, E., Nikfardjam, M., Siostrzonek, P. & Müllner, M. (2004). Arterial puncture closing devices compared with standard manual compression after cardiac catheterization: systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 3 (291), S. 350–357.
- Kottke-Marchant, K., Anderson, J. M., Miller, K. M., Marchant, R. E. & Lazarus, H. (1987). Vascular graft-associated complement activation and leukocyte adhesion in an artificial circulation. *Journal of biomedical materials research*, 3 (21), S. 379–397.
- Kranokpiraksa, P., Pavcnik, D., Kakizawa, H., Uchida, B. T., Jeromel, M., Keller, F. S. & Rösch, J. (2010). Hemostatic efficacy of chitosan-based bandage for closure of percutaneous arterial access sites: An experimental study in heparinized sheep model. *Radiology and oncology*, 2 (44), S. 86–91.
- Krumsdorf, U., Ostermayer, S., Billinger, K., Trepels, T., Zadan, E., Horvath, K. & Sievert, H. (2004). Incidence and clinical course of thrombus formation on atrial septal defect and patient foramen ovale closure devices in 1,000 consecutive patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 2 (43), S. 302–309.
- Kumar, V., Abbas, A. K. & Fausto, N. (2005). *Robbins and Cotran PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE.*, 7, 2005.

- Lachmann, P. J. & Thompson, R. A. (1970). Reactive lysis: the complement-mediated lysis of unsensitized cells. II. The characterization of activated reactor as C56 and the participation of C8 and C9. *The Journal of experimental medicine*, 4 (131), S. 643–657.
- Lam, J. Y., Chesebro, J. H., Steele, P. M., Badimon, L. & Fuster, V. (1987). Is vasospasm related to platelet deposition? Relationship in a porcine preparation of arterial injury in vivo. *Circulation*, 1 (75), S. 243–248.
- Lapp, H. & Krakau, I. (2013). Das Herzkatheterbuch Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken., 4 Stuttgart 2013.
- Leek, B. F. (1983). Clinical diseases of the rumen: a physiologist's view. *The Veterinary record*, 1 (113), S. 10–14.
- Leppäniemi, A., Wherry, D., Pikoulis, E., Hufnagel, H., Waasdorp, C., Fishback, N. & Rich, N. (1997). Arterial and venous repair with vascular clips: comparison with suture closure. *Journal of vascular surgery*, 1 (26), S. 24–28.
- Linke, W. (2015). Hämostase. in: Taschenatlas Physiologie, München, 2 2015, S. 186–188.
- Lochow, P. & Silber, S. (2004). Immediate hemostasis of the femoral artery after heart catheterization: the present situation of closure systems. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 33 (129), S. 1753–1758.
- Madlener, K. & Pöttsch, B. (2013). Hämostaseologie. in: Klinische Chemie und Hämatologie, Stuttgart, 8 2013, S. 349–384.
- Martin, J. L., Pratsos, A., Magargee, E., Mayhew, K., Pensyl, C., Nunn, M., Day, F. & Shapiro, T. (2008). A randomized trial comparing compression, Perclose Proglide and Angio-Seal VIP for arterial closure following percutaneous coronary intervention: the CAP trial. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 1 (71), S. 1–5.
- McMillen, C. (2001). The sheep - an ideal model for biomedical research? *ANZCCART NEWS*, 2 (14), S. 1–4.
- Morais, J. M., Papadimitrakopoulos, F. & Burgess, D. J. (2010). Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS journal*, 2 (12), S. 188–196.
- Müller-Eberhard, H. J. (1984). The membrane attack complex. *Springer seminars in immunopathology*, 2-3 (7), S. 93–141.
- Narayanaswamy, M., Wright, K. C. & Kandarpa, K. (2000). Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 1 (11), S. 5–17.

- Ni, R.-F., Kranokpiraksa, P., Pavcnik, D., Kakizawa, H., Uchida, B. T., Keller, F. S. & Rösch, J. (2009). Testing percutaneous arterial closure devices: an animal model. *Cardiovascular and interventional radiology*, 2 (32), S. 313–316.
- Nikolsky, E., Mehran, R., Halkin, A., Aymong, E. D., Mintz, G. S., Lasic, Z., Negoita, M., Fahy, M., Krieger, S., Moussa, I., Moses, J. W., Stone, G. W., Leon, M. B., Pocock, S. J. & Dangas, G. (2004). Vascular complications associated with arteriotomy closure devices in patients undergoing percutaneous coronary procedures: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 6 (44), S. 1200–1209.
- Van Oeveren, W. (2013). Obstacles in Haemocompatibility Testing. *Scientifica* (2013), S. 1–14.
- Ohlsson, K. & Olsson, I. (1974). The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. *European journal of biochemistry / FEBS*, 2 (42), S. 519–527.
- Öhrlein, R., Schilling, M. K. & Kreissler-Haag, D. (2006). Chirurgische Komplikationen durch arterielle Punktionsverschlusssysteme. *Gefässchirurgie*, 2 (11), S. 108–112.
- Patel, M. R., Jneid, H., Derdeyn, C. P., Klein, L. W., Levine, G. N., Lookstein, R. A., White, C. J., Yeghiazarians, Y. & Rosenfield, K. (2010). Arteriotomy closure devices for cardiovascular procedures: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 18 (122), S. 1882–1893.
- Pelzer, H., Schwarz, A. & Heimbürger, N. (1988). Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thrombosis and haemostasis*, 1 (59), S. 101–106.
- Petersen, E.-E. (2010). Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart 2010.
- Prabhu, S. J., Padia, S. a, Valji, K., McNeeley, M. F., Vaidya, S. & Vo, N. J. (2013). Arterial closure device to achieve hemostasis in children following percutaneous femoral arterial puncture. *Pediatric radiology*, 6 (43), S. 703–708.
- Pries, A. ., Wenger, R. H. & Zakrzewicz, A. (2013). Blutstillung, Blutgerinnung. in: Physiologie, München, 6 2013, S. 321–330.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. & Moncada, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British journal of pharmacology*, 3 (92), S. 639–646.
- Rashid, M. & Bailey, S. (2007). Percutaneous femoral access and vascular closure devices. *Science Innovation Synergy Yearbook 2007*, S. 3–9.

- Ratner, B. D. (2004). Some background concepts. in: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, hrsgg. v. B. D. Ratner, F. Schoen, J. Lemons & A. S. Hoffmann, San Diego, 2 2004, S. 237.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. & Lemons, J. (2004). *Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor*. in: *Biomaterials Science*, hrsgg. v. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. Lemons, San Diego, 2 2004, S. 1–10.
- Reithoffer, M. & Grillenberger, A. (2009). *Angiographie in Theorie und Praxis*., 1., Aufl. 2009.
- Resnic, F. S., Wang, T. Y., Arora, N., Vidi, V., Dai, D., Ou, F.-S. & Matheny, M. E. (2012). Quantifying the learning curve in the use of a novel vascular closure device: an analysis of the NCDR (National Cardiovascular Data Registry) CathPCI registry. *JACC. Cardiovascular interventions*, 1 (5), S. 82–89.
- Rosenko, A. (2012). *Prospektive Untersuchung zum Wert des arteriellen Verschlusssystems (Starclose ®) beim antegraden Gefäßzugang an der Femoralarterie (Inaugural-Dissertation)*. 2012.
- Sanak, M., Jakiela, B. & Węgrzyn, W. (2010). Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests. , 2 (58), S. 317–322.
- Sanborn, T. A., Gibbs, H. H., Brinker, J. A., Knopf, W. D., Kosinski, E. J. & Roubin, G. S. (1993). A multicenter randomized trial comparing a percutaneous collagen hemostasis device with conventional manual compression after diagnostic angiography and angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology*, 5 (22), S. 1273–1279.
- Sanghi, P., Virmani, R., Do, D., Erikson, J., Elliott, J., Cilingiroglu, M., Matthews, H., Kazi, M., Ricker, R. & Bailey, S. R. (2008). A comparative evaluation of arterial blood flow and the healing response after femoral artery closure using angio-seal STS Plus and StarClose in a porcine model. *Journal of interventional cardiology*, 4 (21), S. 329–336.
- Scheinert, D., Sievert, H., Turco, M. a, Schmidt, a, Hauptmann, K. E., Mueller, R., Dadourian, D., Krankenberg, H. & Grube, E. (2007). The safety and efficacy of an extravascular, water-soluble sealant for vascular closure: initial clinical results for Mynx. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 5 (70), S. 627–633.
- Schleicher, M., Hansmann, J., Elkin, B., Kluger, P. J., Liebscher, S., Huber, A. J. T., Fritze, O., Schille, C., Müller, M., Schenke-Layland, K., Seifert, M., Walles, H., Wendel, H.-P. & Stock, U. a (2012). Oligonucleotide and Parylene Surface Coating of Polystyrene and ePTFE for Improved Endothelial Cell Attachment and Hemocompatibility. *International Journal of Biomaterials* (2012), S. 1–14.

- Schmidt-Rhode, P., Sturm, G. & Schulz, K.-D. (1990). Labordiagnostik bei Genitalinfektionen in der Schwangerschaft. in: *Genitale Infektionen: Probleme in Gynäkologie und Geburtshilfe*, hrsgg. v. A. Bolte & H. W. Eibach, Darmstadt 1990, S. 179–194.
- Schoen, F. J. (2004). Host response to biomaterials and their evaluation. in: *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, San Diego, 2 2004, S. 293–296.
- Schulz-Schüpke, S., Helde, S., Gewalt, S., Ibrahim, T., Linhardt, M., Haas, K., Hoppe, K., Böttiger, C., Groha, P., Bradaric, C., Schmidt, R., Bott-Flügel, L., Ott, I., Goedel, J., Byrne, R. A., Schneider, S., Burgdorf, C., Morath, T., Kufner, S., Joner, M., Cassese, S., Hoppmann, P., Hengstenberg, C., Pache, J., Fusaro, M., Massberg, S., Mehilli, J., Schunkert, H., Laugwitz, K.-L. & Kastrati, A. (2014). Comparison of vascular closure devices vs manual compression after femoral artery puncture: the ISAR-CLOSURE randomized clinical trial. *JAMA*, 19 (312), S. 1981–1987.
- Schwartz, B. G., Burstein, S., Economides, C., Kloner, R. A., Shavelle, D. M. & Mayeda, G. S. (2010). Review of vascular closure devices. *The Journal of invasive cardiology*, 12 (22), S. 599–607.
- Seitz, R., Blanke, H., Prätorius, G., Strauer, B. E. & Egbring, R. (1988). Increased thrombin activity during thrombolysis. *Thrombosis and haemostasis*, 3 (59), S. 541–542.
- Seldinger, S. I. (1953). Catheter Replacement of the Needle in Percutaneous Arteriography: A new technique. *Acta Radiologica [Old Series]*, 5 (39), S. 368–376.
- Seyfert, U. T. & Jung, F. (2000). Criteria and Principles of in vitro Hemocompatibility Testing according to the ISO 10993(4). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 6 (27), S. 317–322.
- Shenkman, B., Savion, N., Dardik, R., Tamarin, I. & Varon, D. (2000). Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the cone and plate(let) analyzer: role of platelet activation, fibrinogen and von Willebrand factor. *Thrombosis research*, 4 (99), S. 353–361.
- Sheth, R. a, Walker, T. G., Saad, W. E., Dariushnia, S. R., Ganguli, S., Hogan, M. J., Hohenwalter, E. J., Kalva, S. P., Rajan, D. K., Stokes, L. S., Zuckerman, D. a & Nikolic, B. (2014). Quality improvement guidelines for vascular access and closure device use. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 1 (25), S. 73–84.
- Sigler, M., Paul, T. & Grabitz, R. G. (2005). Biocompatibility screening in cardiovascular implants. *Zeitschrift für Kardiologie*, 6 (94), S. 383–391.
- Silber, S., Gershony, G., Schön, B., Schön, N., Jensen, T. & Schramm, W. (1999). A novel vascular sealing device for closure of percutaneous arterial access sites. *The American journal of cardiology*, 8 (83), S. 1248–1252.

- Silber, S., Schön, N., Seidel, N. & Heiß-Bogner, J. (1998). Akzidenteller Verschuß einer A. femoralis communis nach Angio-Seal TM -Applikation. *Zeitschrift für Kardiologie*, 1 (87), S. 51–55.
- Silbernagl, S. & Despopoulos, A. (2012). Taschenatlas Physiologie., 8 Stuttgart 2012.
- Silver, F. H. (2003). Comparison of the Histological Responses Observed at the Arterial Puncture Site After Employing Manual Compression. *CathLab Digest*, 9 (11).
- Sinn, S., Eichler, M., Müller, L., Bünger, D., Groll, J., Ziemer, G., Rupp, F., Northoff, H., Geis-Gerstorfer, J., Gehring, F. K. & Wendel, H. P. (2011). NCO-sP(EO-stat-PO) coatings on gold sensors--a QCM study of hemocompatibility. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 5 (11), S. 5253–5269.
- Srinivasan, S. & Babensee, J. E. (2014). Host Response to Biomaterials. in: Scaffolds for Tissue Engineering, hrsgg. v. C. Migliaresi & A. Motta 2014, S. 115–173.
- Swindle, M., Smith, A. & Helke, K. (2013). Recommendations for Medical Device Implantation in Swine. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 1 (68), S. 3–11.
- Tang, L., Wu, Y. & Timmons, R. B. (1998). Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 1 (42), S. 156–163.
- Tavris, D. R., Gallauresi, B. A., Lin, B., Rich, S. E., Shaw, R. E., Weintraub, W. S., Brindis, R. G. & Hewitt, K. (2004). Risk of local adverse events following cardiac catheterization by hemostasis device use and gender. *The Journal of invasive cardiology*, 9 (16), S. 459–464.
- Tavris, D. R., Wang, Y., Jacobs, S., Gallauresi, B., Curtis, J., Messenger, J., Resnic, F. S. & Fitzgerald, S. (2012). Bleeding and vascular complications at the femoral access site following percutaneous coronary intervention (PCI): an evaluation of hemostasis strategies. *The Journal of invasive cardiology*, 7 (24), S. 328–334.
- Tepe, G., Schmehl, J., Wendel, H. P., Schaffner, S., Heller, S., Gianotti, M., Claussen, C. D. & Duda, S. H. (2006). Reduced thrombogenicity of nitinol stents--in vitro evaluation of different surface modifications and coatings. *Biomaterials*, 4 (27), S. 643–650.
- Thomas, C., Steger, V., Heller, S., Heuschmid, M., Ketelsen, D., Claussen, C. D. & Brechtel, K. (2013). Safety and Efficacy of the Prostar XL Vascular Closing Device for Percutaneous Closure of Large Arterial Access Sites. *Radiology research and practice* (2013), Article ID 875484.
- Treitl, M., Eberhardt, K. M., Maxien, D., Behrends, B. & Reiser, M. F. (2013). [Arterial closure devices. What device for which clinical situation?]. *Der Radiologe*, 3 (53), S. 230–245.

- Turi, Z. G. (2010). Overview of Vascular Closure. *Endovascular today*, May, S. 65–74.
- Turi, Z. G., Wortham, D. C., Sampognaro, G. C., Kresock, F. D., Held, J. S., Smith, R. D., Veerina, K. K., Hinohara, T. & Kaki, A. (2013). Use of a novel access technology for femoral artery catheterization: results of the RECITAL trial. *The Journal of invasive cardiology* (25), S. 13–18.
- Vaitkus, P. T. (2004). A meta-analysis of percutaneous vascular closure devices after diagnostic catheterization and percutaneous coronary intervention. *The Journal of invasive cardiology*, 5 (16), S. 243–246.
- Walzog, B. & Fandrey, J. (2014). Blutstillung, Blutgerinnung und Wundheilung. in: Physiologie, hrsgg. v. H.-C. Pape, A. Kurtz & S. Silbernagl, Stuttgart, 7 2014, S. 292–300.
- Ward, P. A., Till, G. O., Hatherill, J. R., Annesley, T. M. & Kunkel, R. G. (1985). Systemic complement activation, lung injury, and products of lipid peroxidation. *The Journal of clinical investigation*, 2 (76), S. 517–27.
- Warren, B. S., Warren, S. G. & Miller, S. D. (1999). Predictors of complications and learning curve using the Angio-Seal closure device following interventional and diagnostic catheterization. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 2 (48), S. 162–166.
- Weber, F., Schneider, H., Weber, B. & Nienaber, C. A. (2007). [Strategy and results of pneumatic compression following transfemoral catheterization]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 12 (132), S. 607–611.
- Wendel, H. P., Hauser, N., Francois, B. & Ziemer, G. (2002). Hemocompatibility of Medical Connectors with Biopassive or Bioactive Surface Coatings. *JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS* (17), S. 5–17.
- Wielpütz, M. O. & Radeleff, B. (2013). Angiofibel Interventionelle angiographische Diagnostik und Therapie. Berlin, Heidelberg 2013.
- Williams, D. F. (1999). The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool 1999.
- Williams, G. T. & Williams, W. J. (1983). Granulomatous inflammation--a review. *Journal of clinical pathology*, 7 (36), S. 723–733.
- Williams, R. E. T., Angel, C. Y., Bourkaib, R., Brenot, P., Commeau, P., Fisher, R. K., Jackson, R., Kay, C. H., Le Dref, O., Riou, J.-Y., Rose, J. & Macdonald, S. (2007). Multicenter safety and efficacy analysis of assisted closure after antegrade arterial punctures using the StarClose device. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 4 (14), S. 498–505.
- Wintermantel, E., Shah-Derler, B., Bruinink, A., Petitmermet, M., Blum, J. & Ha, S.-W. (2009). Biokompatibilität. in: Medizintechnik Life Science

- Engineering, hrsgg. v. E. Wintermantel & S.-W. Ha, Heidelberg 2009, S. 67–104.
- Wong, S. C., Bachinsky, W., Cambier, P., Stoler, R., Aji, J., Rogers, J. H., Hermiller, J., Nair, R., Hutman, H. & Wang, H. (2009). A randomized comparison of a novel bioabsorbable vascular closure device versus manual compression in the achievement of hemostasis after percutaneous femoral procedures: the ECLIPSE (Ensure's Vascular Closure Device Speeds Hemostasis Trial). *JACC. Cardiovascular interventions*, 8 (2), S. 785–793.
- Yoganathan, A. P. Y. (1995). Cardiac valve prostheses. in: *The Biomedical Engineering Handbook*, hrsg. v. J. Bronzino, Boca Raton 1995, S. 1847–1870.
- Zahavi, J. & Kakkar, V. V (1980). beta-Thromboglobulin--a specific marker of in-vivo platelet release reaction. *Thrombosis and haemostasis*, 1 (44), S. 23–29.
- Zhou, J., Fritze, O., Schleicher, M., Wendel, H., Schenke-Layland, K., Harasztosi, C., Hu, S. & Stock, U. A. (2010). Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*, 9 (31), S. 2549–2554.
- Zimmermann, A. K., Aebert, H., Reiz, A., Freitag, M., Husseini, M., Ziemer, G. & Wendel, H. P. (2004). Hemocompatibility of PMEA Coated Oxygenators Used for Extracorporeal Circulation Procedures. *ASAIO Journal*, 3 (50), S. 193–199.
- Zimmermann, A. K., Weber, N., Aebert, H., Ziemer, G. & Wendel, H. P. (2007). Effect of biopassive and bioactive surface-coatings on the hemocompatibility of membrane oxygenators. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 2 (80), S. 433–439.

XI. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Wendel für die Überlassung des interessanten Themas und für die freundliche und exzellente Betreuung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich Frau Prof. Knubben-Schweizer für die Übernahme und die Einreichung der Dissertation herzlich danken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des klinischen Forschungslabors (namentlich vor allem Bernd Neumann, Ilka Degenkolbe und Dr. Stefanie Krajewski) danke ich sehr für die geduldige Unterstützung bei zahlreichen Fragen und Problemen während der Erstellung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an das gesamte Team des Tier-OPs (Tim Greiner, Angelika Stolz und Christine Fahrner), die mich ebenfalls immer geduldig und ausdauernd unterstützt haben.

Ferner möchte ich mich bei PD Dr. Ulrich Vogel vom pathologischen Institut für die Beratung und Unterstützung bei der Beurteilung und Anfertigung der histologischen Präparate bedanken.

Darüber hinaus danke ich Adelheid Munz und Cornelia Füger von der Zahnklinik Tübingen für die Bereitstellung der Gerätschaften zum Anfertigen und Digitalisieren der histologischen Präparate.

Danken möchte ich auch dem Team der Kleintierpraxis Petra Biesinger für die hilfreiche Unterstützung, Verena Mißler im Besonderen für anregende Hinweise und Gespräche.

Elfrun Rebstock danke ich für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern. Ohne die durch sie ermöglichten Freiheiten wären die schöne Studienzeit und die Doktorarbeit so nicht möglich gewesen. Vielen Dank euch und meiner Schwester Nicki, dass ihr mich bei allem, was ich bis jetzt gemacht habe, immer großzügigst unterstützt habt.