

Aus der
Klinik für Neurochirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Oertel
Betreuung: PD Dr. med. Sebastian Senger

**Entwicklung eines artefaktfreien
Hirnaneurysmaclips aus
carbonfaserverstärktem PEEK –
Bioverträglichkeit und praktische
Anwendbarkeit des Prototyps**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2024

vorgelegt von Jan René Reisel
geboren am 12.09.1994 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 14. Mai 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Oertel

Prof. Dr. Hashim Abdul-Khaliq

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Entwicklung eines artefaktfreien Hirnaneurysmaclips aus carbonfaserverstärktem PEEK – Bioverträglichkeit und praktische Anwendbarkeit des Prototyps	1
2 Summary	2
2.1 Development of an MRI artifact free aneurysm clip out of carbon fiber-reinforced PEEK – biocompatibility and practical use.....	2
3 Einleitung	3
3.1 Das Intrakranielle Aneurysma	3
3.2 Behandlungsoptionen des Hirnarterienaneurysmas.....	5
3.2.1 Coiling	6
3.2.2 Clipping	7
3.3 Entwicklung des Clipping-Verfahrens	7
3.3.1 Historie	7
3.3.2 Mechanische Eigenschaften des Titan Clips.....	9
3.3.3 Bestehende Herausforderungen	11
3.4 Ein Prototyp aus CF-PEEK	12
3.4.1 Was ist PEEK?	12
3.4.2 PEEK als etabliertes Implantatmaterial in der Medizin	13
3.4.3 Neue Entwicklungen in der Verarbeitung von Kunststoffen.....	13
3.5 Immunreaktionen im ZNS	14
3.5.1 Das Immunprivileg des ZNS.....	14
3.5.2 wichtige an der Immunabwehr beteiligte Gliazellen	14
3.5.3 Ablauf der Fremdkörperreaktion.....	15
4 Fragestellung der Arbeit	17

5 Material und Methodik.....	18
5.1 Anfertigung des Prototyps aus CF-PEEK.....	18
5.2 Versuchstiere & -haltung	18
5.3 Perioperatives Procedere	19
Teil 1: Darstellung des Prototyps im MRT	20
5.4 Artefaktausdehnung im MRT (Phantom)	20
5.5 Gefäßbeurteilbarkeit im Tiermodell.....	20
5.5.1 MRT-Protokoll	21
Teil 2: Biokompatibilität von CF-PEEK bei Kontakt zum Gehirn	22
5.6 Zellbiologische Versuche	22
5.6.1 Wachstum von HA-Zellen.....	23
5.6.2 Neuritenwachstum von PC12-Zellen.....	24
5.7 Tierversuche	25
5.7.1 Tierexperimentelles Protokoll (Überblick).....	25
5.7.2 Ablauf des operativen Eingriffs.....	26
5.7.3 Nachbeobachtungen	28
5.7.4 <i>Beam-Walk</i> Test.....	28
5.7.5 Entnahme & Konservierung der Proben.....	29
5.8 Histologie und Immunhistochemie	30
5.8.1 allgemeine Prozeduren	33
5.8.2 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Mayer.....	33
5.8.3 Immunhistochemie	34
5.9 Statistische Auswertung.....	37
6 Ergebnisse	38
Teil 1: Darstellung des Prototyps im MRT	38
6.1 Untersuchung des Prototyps im Mikro-CT.....	38
6.1.2 Artefaktausdehnung im MRT (Phantom)	38
6.1.3 Gefäßbeurteilbarkeit im Tiermodell	39
Teil 2: Biokompatibilität von CF-PEEK bei Kontakt zum Gehirn	41
6.2 Zellbiologische Versuche	41
6.2.1 HA-Zellen	41
6.2.2 PC12-Zellen	42

6.3 Biokompatibilität im Tiermodell	44
6.3.1 Ergebnisse der Nachbeobachtungen	44
6.3.2 Ergebnisse der <i>beam-walk</i> Tests	45
6.3.3 Qualitative morphologische Auswertung	48
6.3.4 Immunhistochemie: GFAP	50
6.3.5 Immunhistochemie: Iba1	52
6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	54
7 Diskussion	56
7.1 Allgemeines zur Versuchsmethodik	56
Teil 1	57
7.2 Design des Prototyps.....	57
7.3 Bildgebung.....	57
Teil 2	59
7.4 Bisherige Forschung zur Biokompatibilität von PEEK	59
7.5 Zellkulturversuche.....	60
7.6 Rahmenbedingungen des Tiermodells.....	61
7.7 Ergebnisse der Nachbeobachtungen	62
7.8 Immunhistochemie und Fremdkörperreaktion	63
7.9 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	66
8 Quellenverzeichnis	67
9 Publikationen	77
9.1 Publikationen	77
9.2 Kongressbeiträge	77
10 Danksagung.....	78
11 Lebenslauf.....	80

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Gefäßbeurteilbarkeit MRT – Gruppeneinteilung der Versuchstiere.....	21
<u>Tabelle 2:</u> Zellkultur – verwendete Geräte und Materialien.....	22
<u>Tabelle 3:</u> Zellkultur – verwendete Substanzen und Chemikalien.....	22
<u>Tabelle 4:</u> Gruppeneinteilung HA-Kulturen	23
<u>Tabelle 5:</u> Tier-OP – verwendete Geräte und Materialien.....	25
<u>Tabelle 6:</u> Tier-OP – verwendete Substanzen und Chemikalien.....	25
<u>Tabelle 7:</u> Biokompatibilität – Gruppeneinteilung der Versuchstiere	26
<u>Tabelle 8:</u> Immunhistochemie – verwendete Geräte und Materialien	30
<u>Tabelle 9:</u> Immunhistochemie – verwendete Substanzen und Chemikalien	31
<u>Tabelle 10:</u> Astrogliose Scoring – Kriterien	37
<u>Tabelle 11:</u> Astrogliose Scoring – Ergebnisse	51

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> <i>Circulus arteriosus cerebri</i> mit Aneurysmalokalisationen.....	4
<u>Abbildung 2:</u> verbreitete Aneurysmaclip-Designs	9
<u>Abbildung 3:</u> Beispiele für diverse spezialisierte Clipformen.....	9
<u>Abbildung 4:</u> Strukturformel eines PEEK-Monomers	12
<u>Abbildung 5:</u> Zusammensetzung des Clip-Prototyps aus CF-PEEK.....	18
<u>Abbildung 6:</u> Gefäßclipping der <i>Vena renalis</i> im Rattenmodell.....	21
<u>Abbildung 7:</u> Visualisierung der Position des chirurgischen Zugangs.....	27
<u>Abbildung 8:</u> subdurale Implantation im Rattenmodell.....	27
<u>Abbildung 9:</u> Versuchsaufbau des <i>beam-walk</i> Tests	29
<u>Abbildung 10:</u> Mikro-CT-Aufnahmen des Clip-Prototyps aus CF-PEEK.....	38
<u>Abbildung 11:</u> Artefaktbildung im Phantomkörper (MRT-Aufnahmen)	38
<u>Abbildung 12:</u> Artefaktbildung im Rattenmodell (MRT-Aufnahmen)	39
<u>Abbildung 13:</u> Artefaktbildung im Rattenmodell (quantitative Auswertung).....	39
<u>Abbildung 14:</u> Gefäßbeurteilbarkeit im Rattenmodell (MRT-Aufnahmen).....	40
<u>Abbildung 15:</u> Gefäßbeurteilbarkeit im Rattenmodell (quantitative Auswertung)	40
<u>Abbildung 16:</u> Wachstumsverlauf der HA-Zellkulturen.....	41
<u>Abbildung 17:</u> Wachstumsverlauf der HA-Zellkulturen (quantitative Auswertung) ..	42
<u>Abbildung 18:</u> Neuritenlänge PC12-Zellen d7.....	43
<u>Abbildung 19:</u> Neuritenlänge PC12-Zellen d7 (quantitative Auswertung)	43
<u>Abbildung 20:</u> postoperativer Gewichtsverlauf.....	44
<u>Abbildung 21:</u> <i>beam-walk</i> Zeit an verschiedenen Messtagen.....	46
<u>Abbildung 22:</u> <i>beam-walk</i> – <i>foot-slips</i> pro Durchlauf.....	47
<u>Abbildung 23:</u> Rattenhirn nach Entnahme <i>in toto</i>	48
<u>Abbildung 24:</u> Beispielbilder Histomorphologie.....	49
<u>Abbildung 25:</u> quantitative Darstellung der GFAP+ Fläche.....	50
<u>Abbildung 26:</u> Beispielbilder GFAP-Färbung	51
<u>Abbildung 27:</u> quantitative Darstellung der Anzahl Iba1+ Zellen	52
<u>Abbildung 28:</u> Beispielbilder Iba1-Färbung	53

Abkürzungsverzeichnis

A.:	<i>Arteria</i>
ABC:	<i>Avidin-Biotin-Complex</i> (= Avidin-Biotin-Komplex)
AIF1:	<i>allograft inflammatory factor 1</i> (= Iba1)
ANOVA:	<i>analysis of variance</i> (= Varianzanalyse)
BHS:	Blut-Hirn-Schranke
CD:	<i>cluster of differentiation</i> (= "Unterscheidungsgruppen"); charakteristische immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen
CF:	<i>carbon fiber(s)</i> (= Carbonfaser[n])
CF-PEEK:	carbonfaserverstärktes Polyetheretherketon
CFR:	<i>carbon fiber-reinforced</i> (= carbonfaserverstärkt)
CO₂:	Kohlenstoffdioxid
CT:	Computertomographie bzw. Computertomograph
CTA:	CT-Angiographie
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin
DSA:	digitale Subtraktionsangiographie/ <i>digital subtraction angiography</i>
DWI:	<i>diffusion weighted imaging</i> (= diffusionsgewichtete Bildgebung)
ELISA:	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FOV:	<i>field of view</i> (= Gesichtsfeld)
GDC:	<i>Guglielmi Detachable Coil</i>
GFAP:	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (= saures Gliafaserprotein)
HA:	humane Astrozyten
HE:	Hämatoxylin-Eosin
Iba1:	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> (= AIF1)
IL:	Interleukin
KG:	Körpergewicht
kgKG:	Kilogramm Körpergewicht
KM:	Kontrastmittel

MRA:	MR-Angiographie
MRI:	<i>magnetic resonance imaging</i> (= MRT)
MRT:	Magnetresonanztomographie bzw. Magnetresonanztomograph
MW:	Mittelwert
NaCl:	Natriumchlorid
NGF:	<i>nerve growth factor</i> (=Nervenwachstumsfaktor)
NS:	Normalserum
OP:	Operation
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> (= phosphatgepufferte Salzlösung)
PEEK:	Polyetheretherketon
SAH:	<i>subarachnoid hemorrhage</i> (= SAB)
SAB:	Subarachnoidalblutung
SEM:	standard error of the mean (= Standardabweichung des Mittelwerts)
TE:	Echozeit
TGF:	<i>transforming growth factor</i> (= transformierender Wachstumsfaktor)
TNF:	Tumornekrosefaktor
TOF:	<i>time of flight (MRA)</i> ; Technik zur Gefäßdarstellung ohne KM
TR:	Repetitionszeit
ZCHL:	Zentrales Chemikalienlager
ZNS:	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

1.1 Entwicklung eines artefaktfreien Hirnaneurysmaclips aus carbonfaserverstärktem PEEK – Bioverträglichkeit und praktische Anwendbarkeit des Prototyps

Intrakranielle Aneurysmen sind eine häufige und unbehandelt potentiell tödliche Erkrankung. Um eine Ruptur und infolgedessen eine lebensbedrohliche Subarachnoidalblutung zu verhindern, gibt es zwei wesentliche Therapieoptionen: endovaskuläres *Coiling* und mikrochirurgisches *Clipping*. Der Goldstandard in der Nachsorge von Patienten, bei denen ein oder mehrere intrakranielle Aneurysmen mit einem Clip versorgt wurden, ist die digitale Subtraktionsangiographie. Wesentliche Nachteile dieser wiederholt angewendeten Technik sind ihre Invasivität sowie die akkumulierende Belastung des Körpers mit Röntgenstrahlung und Kontrastmittel. Eine vielversprechende Alternative könnte die MR-Angiographie darstellen. Allerdings verursachen hier die verwendeten Metallclips störende Artefakte um das geclippte Gefäß und behindern so die klinische Beurteilung. Metallfreie Aneurysmaclips könnten dazu beitragen, dieses Problem zu überwinden, und kürzliche Fortschritte bei der Verarbeitung faserverstärkter Kunststoffe machten es nun möglich, einen Prototyp eines solchen Clips zu entwickeln und herzustellen.

Besagter Prototyp wurde in einem bereits klinisch etablierten Clipdesign gefertigt und besteht komplett aus carbonfaserverstärktem Polyetheretherketon (CF-PEEK). Er wurde zunächst im Phantom mittels 3 Tesla-MRT und Mikro-CT sowie in anschließenden *in vivo* Studien untersucht. Diese umfassten den Verschluss der linken Nierenarterie von Sprague-Dawley-Ratten via Ligatur mit chirurgischem Faden oder *Clipping* mittels regulärem Titanclip bzw. dem neuen Prototyp aus CF-PEEK. *Sham*-operierte Tiere dienten als Kontrollgruppe. Anschließend wurden Standard-MRT-Sequenzen sowie eine MR-Angiographie durchgeführt und die Größe der Artefakte sowie die Beurteilbarkeit der relevanten Blutgefäße analysiert.

Zusätzlich wurden *in vitro* und *in vivo* Studien zur Biokompatibilität von CF-PEEK im zentralen Nervensystem im Vergleich zu normalem PEEK und Titan durchgeführt. Diese bestanden aus Astrozyten- und PC12-Zellkulturen, denen Proben der zuvor erwähnten Materialien beigefügt wurden, sowie der subduralen Implantation der Materialien auf die Cortexoberfläche von Sprague-Dawley-Ratten. Nach vier Wochen der Beobachtung und Analyse etwaiger Einschränkungen der Motorik mittels wiederholter *beam-walk* Tests wurden immunhistochemisch gefärbte Gewebsschnitte angefertigt, um die Fremdkörperreaktion des Hirngewebes gegenüber der Implantate tiefergehend zu untersuchen.

Die MRT Phantomstudien zeigten keine Zeichen von Artefaktbildung. Die *in vivo* Studien zeigten einen eindeutigen Unterschied der Artefaktgröße des Prototyps im Vergleich zum

Titanclip ($0.07 \pm 0.0 \times 0.06 \pm 0.06$ cm vs. $2.8 \pm 0.16 \times 1.09 \pm 0.1$ cm). In der MR-Angiographie waren der erfolgreiche Verschluss der Nierenarterie sowie die umgebenden Gefäße in der Ligatur-Gruppe und der CF-PEEK-Clip-Gruppe in allen Fällen eindeutig zu erkennen. Im Gegensatz dazu war dies in der Titanclip-Gruppe in keinem Fall möglich. Die CF-PEEK Proben zeigten im Vergleich zum Titan keine Anzeichen einer schlechteren Biokompatibilität. Die Auswertung der Zellkulturen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Tiere zeigten keine relevanten Anzeichen eingeschränkter Motorik in den *beam-walk* Tests. Die Ergebnisse der *in vivo* Studien zeigten eine größere Zellschädigung bei den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe, zum Teil statistisch signifikant. Keine signifikanten Unterschiede wurden dagegen zwischen den PEEK/CF-PEEK-Gruppen und der Titan-Gruppe festgestellt. Vorherige Studien ergaben aber eine deutlich reduzierte Schließkraft des Prototyps im Vergleich zum standardmäßig verwendeten Titanclip.

Frühere Ansätze der Entwicklung von im MRT artefaktfreien Aneurysmaclips waren nicht gänzlich metallfrei und/oder erfüllten nicht die Kriterien bereits etablierter Clipdesigns. Anhand der in der vorliegenden Arbeit diskutierten Ergebnisse konnten wir die Praktikabilität unseres neuartigen Aneurysmaclips auf Basis von CF-PEEK nachweisen. Wie vorgesehen und gefordert verhält er sich im MRT gänzlich artefaktfrei und zeigt keine Anzeichen von geringerer Biokompatibilität als Titan. Ergänzende Studien zur Biokompatibilität könnten notwendig sein. Weitere Entwicklungen im Bereich der Herstellungstechniken sollten das Problem der zu geringen Schließkraft in naher Zukunft überwinden können. Insgesamt sind wir zuversichtlich, dass diese neue Art von Clip wesentlich dazu beitragen wird, die notwendige Menge durchgeführter digitaler Subtraktionsangiographien in der Nachsorge von mit Clipping behandelten Aneurysmapatienten zu reduzieren.

2 Summary

2.1 Development of an MRI artifact free aneurysm clip out of carbon fiber-reinforced PEEK – biocompatibility and practical use

Intracranial aneurysms are a common and potentially lethal disorder, if left untreated. There are two relevant treatment options to prevent rupturing and subsequent life-threatening subarachnoid hemorrhage: endovascular coiling and microsurgical clipping. The gold standard in the follow-up diagnostics after aneurysm clipping is the digital subtraction angiography. The main drawbacks of this recurrent method are its invasiveness and accumulating X-ray and contrast agent exposure. A promising alternative could be MRI angiography. However, the metal clips used in the procedure cause artifacts around the clipped blood vessels and thus impair the clinical assessment. Metal-free aneurysm clips could contribute to overcoming this hindrance. Recent advances in the manufacturing of fiber-reinforced plastics made it possible to develop and produce such a prototype clip.

Said prototype was formed entirely out of carbon fiber-reinforced Polyetheretherketone (CF-PEEK) in accordance with an already established clip design. The prototype was first tested in a phantom in a 3-Tesla MRI scanner and in a microtomography scanner followed by *in vivo* experiments. These experiments consisted of the closure of the left renal artery of Sprague Dawley rats via ligation with a suture, clipping with a regular titanium clip or clipping with the new CF-PEEK prototype respectively. *Sham* operated animals served as a control group. Afterwards, the animals underwent standard MRI sequences and MRI angiography. The size of artifacts as well as the assessability of the relevant blood vessels were analyzed. Additionally, *in vitro* and *in vivo* studies concerning the central nervous system biocompatibility of CF-PEEK in comparison to regular PEEK and titanium were performed. These studies consisted of astrocyte and PC12 cell cultures exposed to one of each of the aforementioned materials as well as the subdural implantation of the materials onto the brain surface of Sprague Dawley rats. After 4 weeks of observation and the assessment of potentially impaired motor function with repeated beam walk tests, immunohistochemistry was performed to further analyze the brain tissue's foreign body response towards the implants.

The results of the MRI phantom studies showed no signs of artifacts. The *in vivo* studies showed a clear difference in artifact size of the prototype compared to the titanium clip ($0.07\pm 0.0 \times 0.06\pm 0.06$ cm vs. $2.8\pm 0.16 \times 1.09\pm 0.1$ cm). In the MRI angiography, the successful closure of the renal artery as well as all adjacent vessels were clearly identifiable in the suture group and the CF-PEEK clip group in all cases. Contrary, this turned out to be impossible in the titanium clip group in all cases.

The samples of CF-PEEK did not show signs of lesser biocompatibility compared to the titanium samples. The cell culture studies did not result in significant differences between any of the groups. The animals did not show relevant signs of impaired motor function in the beam walk tests. The results of the *in vivo* studies showed greater cellular damage in the test groups than the *sham* operated animals, in some cases significantly so. No significant difference was observed between the PEEK/CF-PEEK groups and the titanium group whatsoever. Previous studies showed a markedly reduced clamping force of the prototype compared to the standard titanium clip.

Former attempts at developing MRI artifact-free aneurysm clips were not entirely metal-free and/or did not meet the criteria of established standard clip designs. In this study, the practicability of this new aneurysm clip based on CF-PEEK has been proven. As intended and required, it turned out to be artifact-free and showed no signs of lesser biocompatibility compared to titanium clips. Complementary studies concerning the biocompatibility may be required. Further development in fabrication techniques should be able to overcome the problem of reduced clamping force in the near future. All in all we are confident that this new type of clip will be able to help reducing the amount of digital subtraction angiographies necessary for the follow-up of patients treated for intracranial aneurysms.

3 Einleitung

3.1 Das Intrakranielle Aneurysma

Bei intrakraniellen Aneurysmen handelt es sich um erworbene (oder selten angeborene) Aussackungen der Gefäßwand von im Schädel befindlichen Arterien. Diese sind auf Grund hämodynamischer Besonderheiten am häufigsten an fast rechtwinkligen und daher ungünstig verlaufenden Abzweigungsstellen größerer subarachnoidaler Arterien der Hirnbasis lokalisiert (Schievink., 1997^[113]), die den sogenannten *Circulus arteriosus cerebri* bzw. *Circulus arteriosus Willisii* bilden (**Abb. 1**). Sie sind in aller Regel sakkulär konfiguriert (Yaşargil, 1984^[143] zitiert nach Spendel, 2008^[119]) und lassen sich morphologisch in Dom (der ballonartige Körper des Aneurysmas) und Hals unterscheiden (Weir, 2003^[133]).

Der überwiegende Teil der intrakraniellen Aneurysmen ist im vorderen Stromgebiet des zentralen Nervensystems (ZNS) lokalisiert, d. h. im Stromgebiet der *Arteria (A.) carotis interna* - am häufigsten an der Abzweigung der *A. communicans anterior* von der *A. cerebri anterior* (ca. 30 %), am Ursprung der *A. communicans posterior* aus der *A. carotis interna* (ca. 25 %) oder an der ersten größeren Bifurkation der *A. cerebri media* (ca. 20 %). Aneurysmen des hinteren Stromgebiets finden sich hauptsächlich am Basilariskopf (ca. 7 %). (Brisman *et al.*, 2006^[14]; Schievink, 1997^[113]) (**Abb. 1**) Auch multiple Aneurysmen sind mit einer Häufigkeit von etwa 25-30 % der Fälle nicht selten zu finden (Krex *et al.*, 2001^[62]).

Die Prävalenz intrakranieller Aneurysmen in der Bevölkerung wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben und zusammenfassend von Komotar *et al.* als bei unter 1 % (beim jungen erwachsenen Patienten) bis zu etwa 4 % (bei älteren Patienten) liegend genannt (Komotar *et al.*, 2008^[56]). Aus einer europäischen Populationsstudie ergab sich zum Beispiel eine Prävalenz inzidenteller intrakranieller Aneurysmen von etwa 1,8 % der erwachsenen Bevölkerung (Vernooij *et al.*, 2007^[130]), eine große Meta-Analyse errechnete dagegen eine Prävalenz von 3,2 % bezogen auf eine Population mit einem Durchschnittsalter von 50 Jahren, äquivalenter Geschlechterverteilung und ohne relevante Vorerkrankungen (Vlak *et al.*, 2011^[131]).

Neben dem Alter ist der zweite bedeutende Risikofaktor für die Bildung intrakranieller Aneurysmen das weibliche Geschlecht – Frauen sind mit einem Verhältnis von 2:1 bis 3:1 deutlich häufiger betroffen (Turan *et al.*, 2016^[127]; Vlak *et al.*, 2011^[131]).

Auch Rauchen, eine arterielle Hypertonie sowie eine familiäre Disposition werden als der Bildung von Aneurysmen förderlich angesehen (Schievink., 1997^[113]).

Intrakranielle Aneurysmen bergen ein ernstzunehmendes Risiko der Aneurysmaruptur, was lebensgefährliche Subarachnoidalblutungen (SAB) mit einer Mortalität von etwa 35 % (Petridis *et al.*; 2017^[100]) und häufig schlechtem neurologischen Outcome (Macdonald und Schweizer, 2017^[75]) zur Folge haben kann.

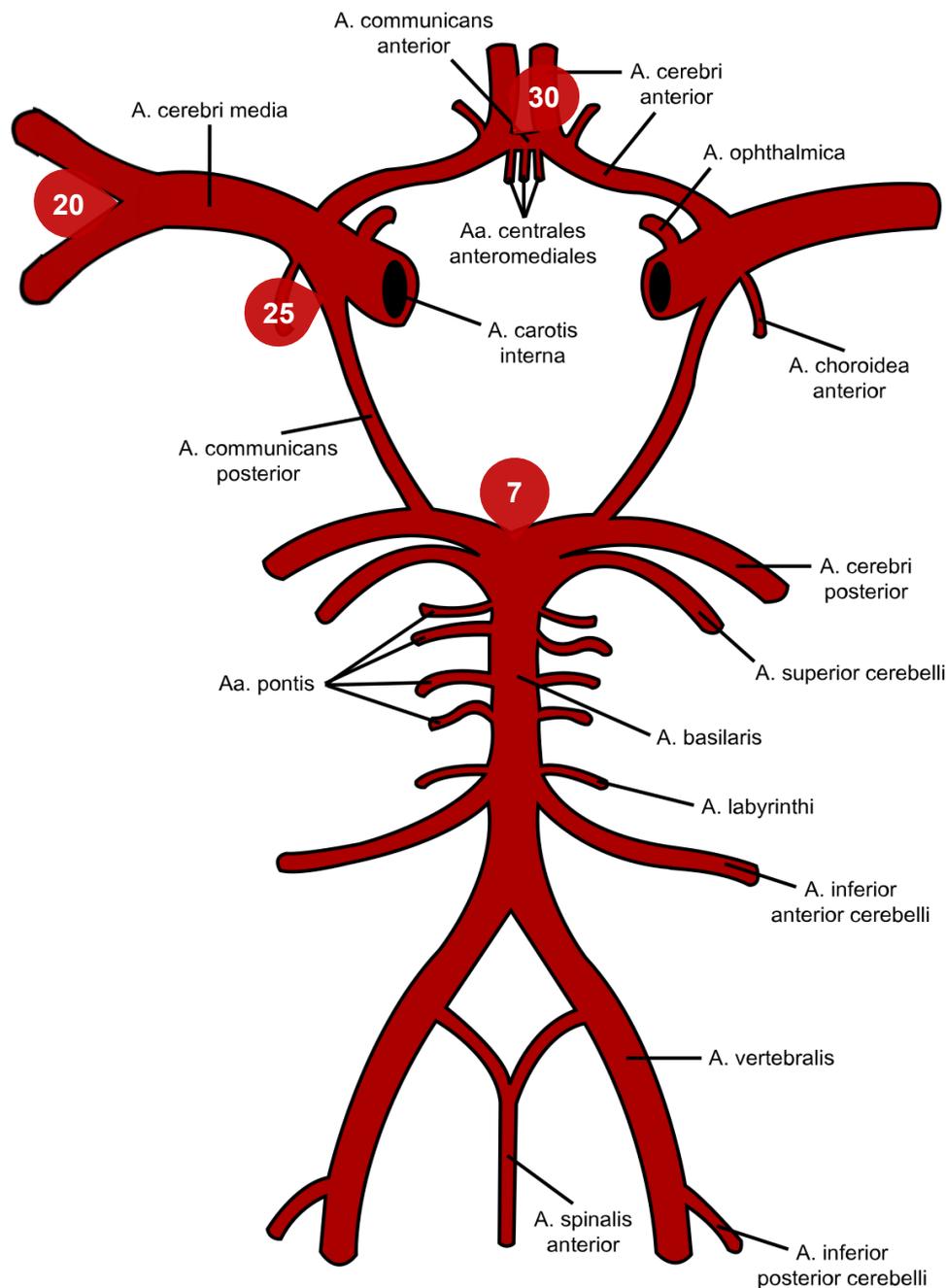


Abbildung 1: *Circulus arteriosus cerebri* mit häufigsten Lokalisationen für intrakranielle Aneurysmen (Häufigkeitsangaben in % aller intrakraniellen Aneurysmen^[14]) (Wikimedia Commons, 2007^[138])

Ungefähr die Hälfte aller intrakraniellen Aneurysmen wird sogar erst nach stattgehabter Blutung diagnostiziert (Brown und Broderick, 2014^[15]). Nichtrupturierte Aneurysmen können darüber hinaus bei Erreichen einer entsprechenden Größe durch Kompression umgebender Strukturen des ZNS symptomatisch werden und so je nach Lokalisation unter anderem Kopfschmerzen, Krampfanfälle, Okulomotoriusparesen, Hirnstammkompressionssyndrome, *Sinus cavernosus* Syndrom und Hypothalamus-Hypophysen-Dysfunktionen verursachen (Schievink, 1997^[113]), jedoch stellen sie sich nicht selten als reiner Zufallsbefund bei bildgebenden Untersuchungen aus anderen Gründen dar (Kaftanov *et al.*, 2016^[51]).

Bei weiterhin stetig steigender Lebenserwartung der deutschen Bevölkerung (Statistisches Bundesamt [Destatis], 2022^[120]) und gleichzeitig frühzeitigerer Diagnosestellung auf Grund des weitläufigeren Einsatzes von stets besser werdenden bildgebenden Verfahren, insbesondere Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT), wird der Behandlung nichtrupturierter intrakranieller Aneurysmen auch in Zukunft ein bedeutender Stellenwert neurochirurgischen und neuroradiologischen Handelns zuteil werden.

3.2 Behandlungsoptionen des Hirnarterienaneurysmas

Wird bei einem Patienten ein intrazerebrales Aneurysma diagnostiziert, so ist ihm – sofern dessen körperlicher Zustand dies ermöglicht – zu einer interventionellen Therapie zu raten um das Risiko einer Ruptur und daraus resultierender SAB mit ihrer hohen Mortalität und häufigen schwerwiegenden Komplikationen (Spendel, 2008^[119]) zu minimieren.

Als gute Prädiktoren einer erhöhten Vulnerabilität für eine Ruptur haben sich die Größe des Aneurysmas, dessen Lokalisation, eine stattgehabte Aneurysmaruptur in der Vergangenheit, ein Patientenalter > 70 Jahren, Bluthochdruck sowie eine Herkunft aus Finnland oder Japan erwiesen, die im sog. *PHASES-Score* zusammengefasst werden (Greving *et al.*, 2014^[41]). Daneben wurden eine *size ratio* (= Quotient aus Aneurysmadurchmesser und Durchmesser des Ursprungsgefäßes) von > 3 (Kashiwazaki und Kuroda, 2013^[53]; Mocco *et al.*, 2018^[84]) sowie in manchen Studien eine *aspect ratio* (= Quotient aus den Weiten von Dom und Hals) von > 1,5 als rupturbegünstigend beschrieben (Ryu *et al.*, 2011^[110]; Weir *et al.*, 2003^[133]).

Das weibliche Geschlecht scheint – im Gegensatz zur Aneurysma**formation** – kein erhöhtes Risiko für die **Ruptur** eines bestehenden Aneurysmas darzustellen (Turan *et al.*, 2016^[127]), wobei ein protektiver Effekt weiblicher Sexualhormone und damit ein erhöhtes Rupturrisiko in der Postmenopause diskutiert wird (Turan *et al.*, 2016^[127]; Vlak *et al.*, 2011^[131]).

Auch nach überstandenerm Blutungsereignis ist ein frühzeitiger – d. h. innerhalb von 48-72 h erfolgreicher (Beck *et al.*, 2006^[7]) – Eingriff zu empfehlen, da ein ernstzunehmendes Risiko einer erneuten Ruptur besteht. Innerhalb der ersten zwei Wochen beträgt das kumulative Risiko dafür unbehandelt ca. 15-20 % (Rosenørn *et al.*, 1987^[108]; Spendel, 2008^[119]), innerhalb der ersten sechs Monate sogar 50 % (Steiner *et al.*, 2013^[121]). Zudem ist der klinische Zustand der Patienten in diesen Fällen bereits schlechter als beim Initialereignis, was mitursächlich für die noch einmal deutlich erhöhte Mortalität bei der Reruptur eines Aneurysmas ist (Petridis *et al.*, 2017^[100]; Zimmer und Reith, 2011^[147]).

Die Therapie sowohl des rupturierten als auch des nichtrupturierten intrakraniellen Aneurysmas besteht prinzipiell darin, die Aussackung vom regulären Blutstrom abzugrenzen um dessen Thrombosierung zu induzieren und eine (ggf. erneute) Ruptur des Gefäßes mit folgender arterieller Blutung zu verhindern. Dabei ist es essentiell das Aneurysma komplett

von der Blutversorgung auszuschließen ohne dabei die Integrität anderer Gefäße bzw. die Durchblutung der distalen Gefäßabschnitte zu beeinträchtigen.

Dafür stehen heutzutage im Wesentlichen zwei gleichwertige, sich durch verschiedene Vor- und Nachteile ergänzende (Mohammad *et al.*, 2020^[85]), interventionelle Therapiemethoden zur Verfügung: Das endovaskuläre *Coiling* und das mikrochirurgische *Clipping*.

Beide Verfahren sind grundsätzlich einem konservativen Vorgehen mit Beobachtung des Patienten gegenüberzustellen und hinsichtlich bestehender Risiken, insbesondere Alter, Gesundheitszustand, Lebenserwartung und Gefäßstatus, zu evaluieren.

Bei der Wahl des Verfahrens stellen unter anderem Größe, Form und Lokalisation des Aneurysmas sowie die Krankengeschichte des Patienten entscheidende Faktoren dar.

Für jeden Fall ist – insbesondere auch unter Berücksichtigung des Patientenwunsches – immer ein individuelles Therapiekonzept zu erarbeiten.

3.2.1 Coiling

Das *Coiling* ist eine endovaskuläre, kathetergestützte Technik bei der mittels kleiner Platinspiralen (sog. "*Coils*") das auszuschaltende Aneurysma von innen verschlossen wird.

Die endovaskuläre Okklusion intrakranieller Aneurysmen mittels Platinspiralen, nach ihrem Erstanwender auch *Guglielmi Detachable Coils* (GDC) genannt, wird seit den 90er Jahren des vergangenen Jahrtausends angewandt und ist somit eine vergleichsweise neue Technik (Guglielmi *et al.*, 1992^[43]). Seitdem wird dieses Verfahren stetig weiterentwickelt und ist heutzutage eine vollwertige Alternative zur bis dahin gängigen Methode des *Clippings*.

Der Zugangsweg erfolgt hier in der Regel über die *A. femoralis* in der Leiste. In diese wird unter Vollnarkose über einen Führungsdraht ein vergleichsweise großlumiger Katheter eingebracht, bis zur betreffenden Hirnversorgenden Arterie vorgeschoben und dort extrakraniell platziert.

Nach Darstellung des Gefäßabschnittes mittels digitaler Subtraktionsangiographie (DSA) wird ein Mikrokatheter, an dessen Spitze sich die Platinspirale befindet, über das betroffene Gefäß in das Aneurysma eingebracht und der *Coil* dort platziert.

Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis das Aneurysma vollständig von *Coils* ausgefüllt ist und in der DSA keine Kontrastierung mehr aufweist. Im weiteren Verlauf führt die Thrombenbildung innerhalb des gecoilten Aneurysmas zu dessen Ausschaltung. Im Idealfall bildet sich eine neue *Intima*, die sogenannte *Neointima*, am Hals des Aneurysmas (Marbacher *et al.*, 2019^[76]). Bei breitbasigen oder komplexen Konfigurationen kann das Verfahren auch durch das Einbringen eines Stents ergänzt werden.

3.2.2 Clipping

Das *Clipping* ist ein neurochirurgischer Eingriff, bei dem der Hals des auszuschaltenden Aneurysmas mittels kleiner Gefäßclips von außen komprimiert und dieses so vom Blutfluss abgeschnitten wird. Der Zugangsweg wird je nach Lokalisation des Aneurysmas gewählt und erfolgt mittels (Mini-)Kraniotomie und anschließender schonender mikrochirurgischer Präparation des betreffenden Gefäßabschnitts entlang der Hirnoberfläche. Abhängig von Größe und Form der Gefäßaussackung sowie Konfiguration der benachbarten Strukturen wird nun mit einem oder mehreren Titanclips der Hals bzw. die Basis des Aneurysmas komprimiert und selbiges somit vom Blutstrom abgetrennt. Der komplette Verschluss des Aneurysmas sowie die Durchgängigkeit der Gefäße im OP-Gebiet werden intraoperativ kontrolliert; z. B. mittels mikrovaskulärer Doppler-Sonographie oder mikroskop- bzw. endoskopintegrierter Nahinfrarot-Indocyaningrün-Videoangiographie. (s. u.) Die Deckung der Kraniotomie im Anschluss erfolgt i. d. R. durch Reimplantation und Fixierung des zuvor entfernten Knochendeckels.

3.3 Entwicklung des Clipping-Verfahrens

3.3.1 Historie

Während die rudimentäre operative Versorgung von Aneurysmen distaler Gefäße bereits in der griechischen Antike zum Beispiel durch *Antyllos* (2. Jhd. n. Chr.) durchgeführt wurde (Sachs, 2000^[111]) gelang dies in der Moderne erst wieder mit dem Übergang vom 18. ins 19. Jahrhundert (Larena-Avellaneda, 2012^[66]). Das nach dem schottischen Chirurgen John Hunter (1728-1793) in der Literatur als "*Hunterian principle*" oder "*Hunter's operation*" bezeichnete Verfahren zur Behandlung **extrakranieller** Aneurysmen – insb. des Popliteaneurysmas – beschreibt die proximale Ligatur der zuführenden Arterie um eine Thrombosierung des Aneurysmas zu erreichen (Ellis, 2017^[25]; Lai und O'Neill, 2017^[65]). Erst mit Beginn des 20. Jahrhunderts unternahmen die ersten Chirurgen – unter Anwendung und Weiterentwicklung des Hunter'schen Prinzips – Therapieversuche **intrakranieller** Aneurysmen durch (zum Teil schrittweise) Ligatur der *A. carotis externa*, später auch durch *Wrapping* (= Umlegung) oder *Trapping* (= Ausschluss) des Aneurysmas mit anschließender Exzision (Lai und O'Neill, 2017^[65]). Die erste erfolgreiche Versorgung eines intrakraniellen Aneurysmas mittels Clip wurde 1937 vom US-amerikanischen Neurochirurgen Walter E. Dandy (1886-1946), damals noch mit einem V-förmigen Clip aus Silber, in Baltimore durchgeführt (Dandy, 1938^[21]; Lai und O'Neill, 2017^[65]). Bis in die frühen 1960er Jahre hinein waren die Ergebnisse direkter chirurgischer Versorgung intrakranieller Aneurysmen allerdings noch schlechter als bei der indirekten proximalen Gefäßligatur (McKissock *et al.*, 1965^[81] zitiert nach Lai und O'Neill, 2017^[65]). Erst durch die Einführung und konsequente

Verbreitung des Operationsmikroskops ab den 1960er Jahren und die damit verbundene Verbesserung der Operationsergebnisse (Krayenbühl *et al.*, 1972^[61] zitiert nach Maurice-Williams und Lafuente, 2003^[77]) avancierte das mikrochirurgische Clipping zur Standardtherapie intrakranieller Aneurysmen (Lai und O'Neill, 2017^[65]).

In den letzten Jahrzehnten gelang dank innovativer Forschung und Weiterentwicklung eine stetige Verbesserung dieses Therapieverfahrens. So wurden unter anderem diverse neue operative Zugangswege zur Schädelbasis etabliert (Bowles *et al.*, 1995^[10]; Kawase *et al.*, 1985^[54]; Pritz und Chandler, 1994^[102]; van Lindert *et al.*, 1998^[129]), die für verbesserte Bedingungen während des Eingriffs sorgten – darunter der pterionale Zugang (Yaşargil und Fox, 1975^[142]), der schnell zum Standard für alle Aneurysmen der vorderen Zirkulation wurde (Lai und O'Neill, 2017^[65]). Die notwendigen Kraniotomien wurden im Laufe der Zeit stetig verkleinert um die Größe der freigelegten Hirnoberfläche zu verringern, so dass heute wann immer möglich sogenannte Minikraniotomien durchgeführt werden (Fischer *et al.*, 2011^[30]; Yagmurlu *et al.*, 2017^[140]). Weitere Innovationen der letzten Jahre umfassen unter anderem endoskopisch assistierte Eingriffe, die einen verbesserten Überblick des OP-Situs ermöglichen (Fischer *et al.*, 2012^[31]), die routinemäßige Verwendung intraoperativer mikrovaskulärer Doppler-Sonographie (Fischer *et al.*, 2010^[29]; Siasios *et al.*, 2012^[118]) sowie die mikroskop- bzw. endoskopintegrierte Nahinfrarot-Indocyaningrün-Videoangiographie (Fischer *et al.*, 2010^[29]; Fischer *et al.* 2019^[32]).

Auch im Hinblick auf das Design der verwendeten Clips wurden bedeutende Fortschritte gemacht. So waren bereits seit den 1950er Jahren nicht mehr ausschließlich Clips aus Silber verfügbar, stattdessen wurde vermehrt auf nichtkorrosive nichtferromagnetische Metalllegierungen gesetzt – i. d. R. handelte es sich um rostfreien Stahl (Fox, 1976^[34]; Mayfield und Kees, 1971^[79]). Die zwischenzeitlich weiträumig verwendeten Aneurysmaclips aus kobaltbasierten Legierungen (Lai und O'Neill, 2017^[65]; Lawton *et al.*, 1996^[67]) wurden ab etwa der Jahrtausendwende zunehmend durch Titan als standardmäßig verwendetes Material abgelöst (Aso *et al.*, 2018^[3]; Lawton *et al.*, 1996^[68]; Louw *et al.*, 2003^[73]).

Für die Form der Clips gab es im Laufe der Zeit viele Ansätze um sie gleichzeitig stabil, kräftig schließend und bei den beengten Platzverhältnissen im OP-Situs gut handhabbar zu gestalten. Eines der bis heute am weitesten verbreiteten Designs wurde 1968 vom türkischen Neurochirurgen Mahmut Gazi Yaşargil (*1925) eingeführt (Yaşargil, 1968^[141]) und seitdem stetig weiterentwickelt. (**Abb. 2 A**) Weitere moderne Ansätze stellen z. B. die L-Clip® und D-Clip® Reihe der Firma Lazic (Peter Lazic GmbH, Tuttlingen, Deutschland) dar (He *et al.*, 2016^[45]; Teping *et al.*, 2019^[124]). (**Abb. 2 B, C**)



Abbildung 2: verbreitete Aneurysmaclip-Designs

A: Yaşargil-Clip^[97], **B:** Lazic L-Clip^[98], **C:** Lazic D-Clip^[99]

Darüber hinaus stehen dem Neurochirurgen heute zahlreiche Variationen dieser Designs zur Verfügung, die auf verschiedenste mögliche Begebenheiten während der OP abgestimmt sind. Neben den regulären **geraden** Clips gibt es etwa **gewinkelte**, **gekrümmte** und **bajonettförmige** Clips (**Abb. 3 A-C**) die eine bessere Platzierung des Clips und ideale Verschlusslinie gemäß der anatomischen Verhältnisse ermöglichen (Kashimura, 2007^[52]; Louw *et al.*, 2003^[73]), **fenestrierte** Clips (**Abb. 3 D**) um von einer Seite eines Gefäßes das auf der gegenüberliegenden Seite liegende Aneurysma zu verschließen ohne das Gefäß dabei zu beeinträchtigen (Zada *et al.*, 2009^[144]) und **T-förmige** Clips (**Abb. 3 E**) die sich besonders für den Verschluss fusiformer Aneurysmen eignen (Başkaya und Uluç, 2012^[6]). In seiner langen Historie ergab sich für das *Clipping*-Verfahren durch mutige neue Ansätze, individuelle Ideen und weiläufige Forschung somit ein erstaunliches Repertoire an Möglichkeiten um den Herausforderungen dieses Eingriffs entgegenzutreten.

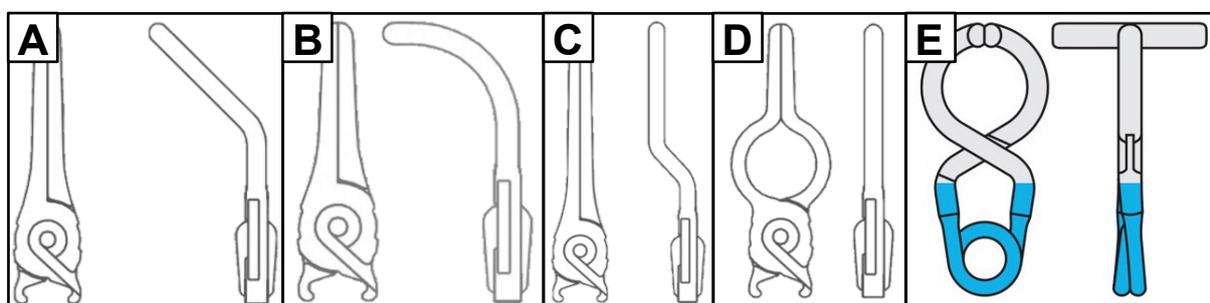


Abbildung 3: Beispiele für diverse spezialisierte Clipformen^{[2], [98]}

Gewinkelter (**A**), gekrümmter (**B**), bajonettförmiger (**C**), fenestrierter (**D**) und T-förmiger (**E**) Aneurysmaclip; Ansicht von seitlich und oben

3.3.2 Mechanische Eigenschaften des Titan Clips

Die meisten heutzutage verwendeten Clips zur Behandlung intrakranieller Aneurysmen bestehen aus Titan bzw. dessen Legierungen (Aso *et al.*, 2018^[3]; McFadden, 2012^[80]). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird "Titan" nachfolgend stellvertretend für "Titan und titanbasierte Legierungen" verwendet, da diese sich in Bezug auf die aufgeführten Eigenschaften im Wesentlichen gleichen (Geetha *et al.*, 2009^[36]). Dieses Material erwies sich in der Vergangenheit in vielen medizinischen Fachbereichen für die Anwendung als bleibendes Implantat besonders geeignet (ebd.).

Wichtige Eigenschaften des Titans, die auch als Voraussetzung für eine solche medizinische Anwendung anzusehen sind, umfassen unter anderem eine gute mechanische Widerstandsfähigkeit – d. h. insbesondere eine hohe Bruchzähigkeit (= *fracture toughness*) (Chen und Thouas, 2015^[17]), hohe Streckgrenze (= *yield strength*) und hohe Zugfestigkeit (= *tensile strength*) (Leventhal, 1951^[69]) – bei vergleichsweise geringem Elastizitätsmodul (= *Young's modulus*) (Long und Rack, 1998^[72]).

Darüber hinaus zeigt Titan eine ausgezeichnete Biokompatibilität und verhält sich (weitgehend) bioinert (Leventhal, 1951^[69]). Der Begriff "Biokompatibilität" umfasst hier auch eine hohe Korrosionsbeständigkeit sowie nicht vorhandene Gewebstoxizität durch evtl. freigesetzte Metallionen (Geetha *et al.*, 2009^[36]). Zudem handelt es sich bei Titan um ein nicht ferromagnetisches Metall und eignet sich daher prinzipiell für die MRT, da es nicht zu Wärmeentwicklung oder einem Wandern des Clips kommt. Allerdings entstehen in dessen direkter Umgebung auf Grund seiner magnetischen Suszeptibilität Artefakte, die die Beurteilung erschweren (Wichmann *et al.*, 1997^[136]). Auch bei der Computertomographie entstehen um das Titan zum Teil störende Auslöschungsartefakte. Titan lässt sich außerdem gut in die jeweils benötigten Formen verarbeiten und behält dabei seine wünschenswerten Eigenschaften bei (Leventhal, 1951^[69]), was einen weiteren der Gründe für seine Verwendung bei der Herstellung von Hirnaneurysmaclips darstellt.

Wichtige Aspekte abseits der reinen Materialeigenschaften die ein solcher Clip nach aktuellem Stand der Technik aufweisen sollte umfassen die Möglichkeit problemlos mehrmals geschlossen und wieder geöffnet zu werden, ohne dabei merklich an Schließkraft zu verlieren (Ooka *et al.*, 1997^[93]; Papadopoulos *et al.*, 2004^[96]) sowie atraumatische Maulflächen mit Oberflächenstrukturen, wie sie von verschiedenen Herstellern angeboten werden (Peter Lazic GmbH, Tuttlingen, Deutschland; Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland; Dewimed Medizintechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland). So sollen Gefäßverletzungen verhindert und durch Oberflächenvergrößerung ein Abrutschen (= *slippage*) oder das sogenannte "Scissoring" des Clips vermieden werden (Krammer und Lumenta, 2010^[59]; Nitta *et al.*, 2015^[90]).

Diese Eigenschaften stellen den Maßstab dar, an dem sich neu entwickelte Clips messen lassen müssen.

3.3.3 Bestehende Herausforderungen

Bei der Nachkontrolle eines mittels *Clipping* versorgten intrakraniellen Aneurysmas stellt die DSA weiterhin den Goldstandard dar (Dundar *et al.*, 2019^[23]; Teksam *et al.*, 2004^[123]). Diese wird angewendet um sicherzustellen, dass ein kompletter Verschluss des Aneurysmas gelungen ist, da es auch bei kleinen (1-2 mm) Residuen zu einem erneuten Wachstum bzw. einer erneuten Ruptur kommen kann (Lin *et al.*, 1989^[70]). Darüber hinaus muss ein unbeabsichtigter Verschluss eines Mutter- oder Nachbargefäßes ausgeschlossen werden, da dieses mit einem erhöhten Risiko eines neurologischen Defizits bis hin zum Schlaganfall verbunden ist (Macdonald *et al.*, 1993^[74]).

Jede durchgeführte DSA stellt dabei eine – kumuliert teils erhebliche – Strahlenbelastung für den Organismus des Patienten dar (Miller *et al.*, 2003^[82]). Außerdem ist das dabei verwendete Kontrastmittel (KM) stark iodhaltig, weshalb bei Schilddrüsenerkrankungen und ausgeprägten Nierenfunktionseinschränkungen auf Alternativen zurückgegriffen werden muss. Die gängigsten solcher Alternativen bestehen in Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Gadolinium, allerdings sollte CO₂ auf Grund der Gefahr einer zerebralen Luftembolie für Angiographien oberhalb des Zwerchfells nicht verwendet werden und Gadolinium steht im Verdacht bei ausgeprägter chronischer Nierenerkrankung eine Nephrogene Systemische Fibrose zu verursachen (Nadolski und Stavropoulos, 2013^[86]). Weitere Risiken der DSA umfassen das Auftreten (meist temporärer) neurologischer Defizite (Bakker *et al.*, 2014^[5]) sowie lokale Komplikationen an der Zugangsstelle in der Leistenarterie (*A. femoralis*) – wie z. B. Hämatome, schwer kontrollierbare Blutungen, Gefäßdissektionen, Thrombembolien, arteriovenöse Fisteln oder *Aneurysmata spuria* (Tsetis, 2010^[126]).

Als nichtinvasive Alternativen werden in der Literatur u. a. die CT- und die MR-Angiographie diskutiert (Gölitz *et al.*, 2014^[37]; Nishikawa *et al.*, 2021^[89]). Die CT-Angiographie (CTA) bietet vergleichbare Ergebnisse zur DSA bei etwas geringerer Strahlenbelastung, allerdings wird auch hier stark iodhaltiges Kontrastmittel verwendet (Gölitz *et al.*, 2014^[37]). Bei der MR-Angiographie (MRA) kommt es nicht zu einer Belastung des Körpers durch ionisierende Strahlung und es wird i. d. R. gadoliniumhaltiges KM verwendet, das keine Auswirkungen auf die Schilddrüse hat und zumindest noch bei mäßiggradiger Nierenschädigung gut verträglich ist (Schieda *et al.*, 2018^[112]). Allerdings verursachen die gängigen Aneurysmaclips aus Kobalt oder Titan in der MRA Artefakte, die die Beurteilung der umliegenden Strukturen deutlich erschweren (Nishikawa *et al.*, 2021^[89]).

Als Lösungsansätze für dieses Problem wurden bereits u.a. neue MRT-Sequenzen und Software-Algorithmen entwickelt, die nach *Clipping* und *Coiling* die Bildqualität verbessern, die Artefaktgröße reduzieren und die Gefäßbeurteilung erleichtern sollen (Friedrich *et al.*, 2016^[35]; Nishikawa *et al.*, 2021^[89]; Shang *et al.*, 2017^[117]). Diese Fortschritte sind bisher allerdings nicht ausreichend um Artefakte komplett vermeiden und Strukturen unterhalb einer

gewissen Größe sicher erkennen zu können; außerdem verlängern diese Methoden die Untersuchungsdauer teils erheblich (Friedrich *et al.*, 2016^[35]; Nishikawa *et al.*, 2021^[89]).

Andere Ansätze zielen auf die Entwicklung komplett oder größtenteils metallfreier Aneurysmaclips ab, damit störende Artefakte erst gar nicht entstehen. Neuartige Prototypen aus Zirkoniumdioxid mit Federn aus Titan oder Polyurethan zeigten zwar signifikant reduzierte Suszeptibilitätsartefakte (Cho *et al.*, 2018^[19]; Sutherland *et al.*, 2008^[122]), konnten sich aber in der klinischen Anwendung bisher nicht durchsetzen. Auch ein Ansatz mit einer Legierung aus einem Gold-Platin-Gemisch zeigte vielversprechende Resultate in Phantomuntersuchungen (Kodama *et al.*, 2017^[55]; Nakai *et al.*, 2022^[88]), es bleibt aber noch abzuwarten ob sich dieses für die Herstellung von und praktische Anwendung als Hirnaneurysmaclip eignet.

Fortschritte in der Herstellung faserverstärkter Kunststoffe machten nun die Fertigung eines vielversprechenden Prototyps möglich, dessen Branchen und Feder aus dem mit Carbonfasern verstärkten Kunststoff PEEK (= CF-PEEK bzw. CFR-PEEK; s. u.) gefertigt wurden. Dieser Clip lässt sich problemlos in den bisher etablierten Designs anfertigen und erfordert somit keine Veränderung des Clip-Applikators oder des intraoperativen Handlings durch den Chirurgen. Seine mechanischen Eigenschaften entsprechen bereits weitgehend denen von Clips aus Titan- oder Kobaltlegierungen (Brack *et al.*, 2016^[11]).

Die Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit dieses Prototyps ist Hauptbestandteil der vorliegenden Dissertation.

3.4 Ein Prototyp aus CF-PEEK

3.4.1 Was ist PEEK?

Polyetheretherketon (PEEK) ist ein synthetischer polymerer Kunststoff aus der Gruppe der Polyaryletherketone (PAEK) mit der Halbstrukturformel $(-C_6H_4-O-C_6H_4-O-C_6H_4-CO-)_n$ (Strukturformel siehe **Abb. 4**).

Es handelt sich um einen teilkristallinen Thermoplast, der sich durch hohe Wärmestabilität und ausgeprägte Resistenz gegenüber chemischen und strahlenbedingten Beschädigungen auszeichnet (Rigby, 1985^[106] zitiert nach Kurtz und Devine, 2007^[64]) und eine ausgezeichnete Biokompatibilität aufweist

(Williams *et al.*, 1987^[139]). Darüber hinaus lässt es sich gut mit verstärkenden Materialien (wie z. B. Carbonfasern) verbinden und weist mit einer Kombination aus hoher Steifigkeit, Festigkeit und Zähigkeit eine ideale Kombination zur Verwendung als Implantatmaterial auf (Fan *et al.*, 2004^[27]; Wang und Cheng, 2003^[132]).

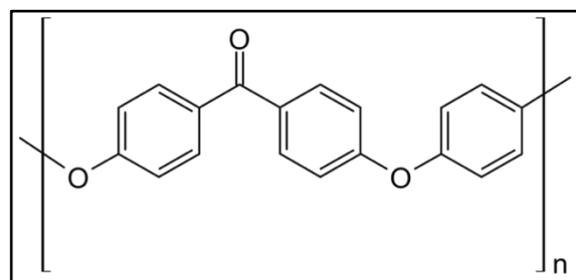


Abbildung 4: Monomer von PEEK^[137]

Darstellung als Strukturformel

3.4.2 PEEK als etabliertes Implantatmaterial in der Medizin

Nach seiner Verbreitung in der Industrie in den 1980er Jahren wurde PEEK als neuartiges Implantatmaterial erprobt und findet heute Anwendung in diversen medizinischen Fachbereichen (Kurtz und Devine, 2007^[64]).

Neben der orthopädischen und unfallchirurgischen Chirurgie wird PEEK auch häufig in der Wirbelsäulen Chirurgie für sogenannte *Cages* verwendet (Panayotov *et al.*, 2016^[95]). Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass selbst große Mengen feinen Partikelabriebs von PEEK (mit entsprechend großer Oberfläche) auch bei engem Kontakt zum Duralsack keine signifikanten Reaktionen hervorruft und den herkömmlichen Materialien, bezogen auf seine Bioverträglichkeit, zumindest gleichzustellen ist (Cunningham *et al.*, 2013^[20]).

Ein weiterer – relativ neuer – Anwendungsbereich für PEEK liegt in der kranialen Neurochirurgie. Neben autogenem Knochenmaterial oder Titannetzen werden hier insbesondere größere Kranioplastien häufig mit individuell angepassten Deckeln aus PEEK durchgeführt (Thien *et al.*, 2015^[125]). Bei verletzter *Dura mater* kann das Implantat aus PEEK in direktem Kontakt zur Hirnoberfläche stehen. Da keine anderslautenden Berichte bekannt sind ist anzunehmen, dass sich die Biokompatibilität dieses Materials auch auf das ZNS erstreckt, allerdings wurde dies in Studien bisher nicht untersucht. Ein Aspekt der vorliegenden Dissertation ist es dies zu untersuchen.

Zur Verbesserung seiner mechanischen Eigenschaften wurde bereits erfolgreich die Kombination von PEEK mit u. a. Titan oder Carbonfasern erprobt (Jung *et al.*, 2016^[50]; Panayotov *et al.*, 2016^[95]).

3.4.3 Neue Entwicklungen in der Verarbeitung von Kunststoffen

Durch das sogenannte Pultrusionsverfahren ist es möglich Drähte aus faserverstärktem Kunststoff herzustellen, bei denen das Matrixmaterial unidirektional durch entlang ihrer Längsachse verlaufende Komponenten (wie z. B. Carbonfasern) verstärkt wird. Dadurch wird insbesondere die Biegesteifigkeit erhöht, weshalb sich ein so hergestellter Faserverbundkunststoff gut für die Verwendung als Feder für einen Aneurysmaclip eignet. Neueste Entwicklungen machen es nun möglich, dieses Verfahren auch für Durchmesser von nur 200 µm (= Mikropultrusion) anzuwenden, wie sie bei der Fertigung intrakraniell verwendeter Aneurysmaclips notwendig sind. (Brack *et al.*, 2016^[11]; Brecher *et al.*, 2014^[13])

War die Pultrusion lange nur für Duroplaste (= *thermosets*) möglich, also Polymere die irreversibel aushärten und anschließend nicht erneut geschmolzen und verformt werden können, gelingt dies nun mit entsprechendem Aufwand auch bei Thermoplasten wie z. B. PEEK. Dies ist bisher allerdings nicht weit verbreitet. (Minchenkov *et al.*, 2021^[83])

Diese Fortschritte bei den Fertigungsmöglichkeiten von Kunststoffen machten es nun möglich, carbonfaserverstärktes PEEK zur Herstellung eines Prototyps für artefaktfreie Hirnaneurysmaclips (siehe 5.1) zu verwenden (Brack *et al.*, 2016^[11]).

3.5 Immunreaktionen im ZNS

3.5.1 Das Immunprivileg des ZNS

Das ZNS ist ein immunprivilegiertes Organ, das heißt das Immunsystem wird hier streng reguliert und in seiner Wirkung begrenzt um die empfindlichen und nicht bzw. kaum ersetzbaren Nervenzellen vor Schäden durch überschießende Entzündungskaskaden zu bewahren. Wichtige Aspekte dieser Kontrolle sind u. a. die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die den Übertritt von Immunzellen in das ZNS reguliert, das weitgehende fehlen antigenpräsentierender Zellen sowie antiinflammatorisch wirkende Zytokine. Einzelne Zellen des Immunsystems finden nach Übertritt in das ZNS dort ein für sie ungewöhnliches und unvorteilhaftes Milieu vor das nicht zuletzt durch von Zellen des ZNS exprimierte Oberflächenproteine (u. a. sogenannte Todesliganden) erzeugt wird. (Ullrich, 2005^[128])

Die Aufgaben des Immunsystems werden stattdessen hauptsächlich von residenten Immunzellen übernommen, allen voran den Mikrogliazellen – einer für das ZNS spezifischen Makrophagen-Subpopulation. Demzufolge muss das ZNS gesondert betrachtet werden, da sich von immunologischen Prozessen in anderen Bereichen des Organismus nicht automatisch auf jene im ZNS schließen lässt.

3.5.2 wichtige an der Immunabwehr beteiligte Gliazellen

Die wesentlichen an der Reaktion des Gehirns auf Verletzungen beteiligten Zellen sind Mikrogliazellen und Astrozyten.

Als **Mikrogliazellen** oder auch Hortega-Zellen werden die gewebsständigen Makrophagen des Gehirns bezeichnet. Sie machen 5-10 % der Gliazellen im Gehirn aus (Ling, 1981^[71] zitiert nach Polikov *et al.*, 2005^[101]) und erfüllen in erster Linie Funktionen als zytotoxische Zellen gegen pathogene Organismen sowie als Phagozyten bei der Beseitigung von Zelldetritus und geschädigter Matrix (Polikov *et al.*, 2005^[101]). Mikrogliazellen liegen normalerweise in einer hoch verzweigten Ruheform vor. Nach Aktivierung, z. B. bei Gewebstrauma, verdickt sich der Zellkörper und die Fortsätze nehmen in Zahl und Größe ab bis die Zelle eine amöboide Form annimmt. (Polikov *et al.*, 2005^[101]) In diesem aktivierten Zustand ist die Zelle in der Lage Fremdmaterial durch lytische Enzyme zu zersetzen und dieses zu phagozytieren (Ling, 1981^[71] zitiert nach Polikov *et al.*, 2005^[101]). In Folge der Aktivierung exprimiert die Mikrogliazelle vermehrt bestimmte charakteristische Proteine wie z. B. **Iba1** (auch bekannt als AIF1) oder CD68, die als spezifische Zielstrukturen bei der immunhistochemischen Detektion aktivierter Mikrogliazellen herangezogen werden können (Kovacs, 2017^[57]).

Des Weiteren ist (aktivierte) Mikroglia in der Lage eine Vielzahl von Botenstoffen auszuschütten die verschiedenste Signalwege beeinflussen, weshalb ihre genaue Rolle schwierig zu erfassen ist. Diese Botenstoffe umfassen u. a. proinflammatorische Zytokine wie z. B. TNF- α , IL-1 und IL-6 sowie zyto- bzw. neurotoxische Faktoren wie z. B. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und Glutamat aber auch antiinflammatorische und neuroprotektive Substanzen wie z. B. NGF, IL-10 und TGF- β . (Chen und Trapp, 2016^[18]; Polikov *et al.*, 2005^[101]; Ullrich, 2005^[128])

Mikrogliazellen sind also essentiell für die Aufrechterhaltung eines gesunden Milieus im Gehirn, allerdings können bei gesteigerter Aktivität und dysregulierten Inflammationskaskaden die schädigenden Wirkungen überwiegen.

Astrozyten bzw. Astroglia bilden den häufigsten Zelltyp im ZNS und stellen sich als sternförmige Zellen mit vielen Fortsätzen dar. Sie werden morphologisch in protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten unterteilt, die jeweils gehäuft in der grauen bzw. weißen Substanz zu finden sind (Kuchelmeister, 2012^[63]).

Wurden Astrozyten anfangs noch als reine Stützzellen abgetan – immerhin umfasst ihr Gesamtvolumen etwa 50 % des Gehirns – so werden ihnen heute einige weitere Aufgaben zugeschrieben. Zu diesen Aufgaben zählen unter Anderem die Regulierung des Wasserhaushalts im ZNS, Kontrollfunktionen des Extrazellulärmilieus im Hinblick auf die Konzentrationen von Ionen und Neurotransmittern (insb. Glutamat), Beitragung zur Ernährung der Neuronen und Modulation der Funktion von Synapsen. (ebd.)

Darüber hinaus tragen Astrozyten mit ihren perivaskulären Fortsätzen zur Bildung der BHS bei und reagieren bei Läsionen des Gehirns mit der als Glianarbe bezeichneten reaktiven Astroglie (ebd.). Auch sie verändern sich in diesem Fall in eine aktivierte Form, die sich durch Hypertrophie, vermehrte Proliferation und Migration sowie hochreguliertem saurem Gliafaserprotein (GFAP) auszeichnet (Polikov *et al.*, 2005^[101]). Polymerisiertes **GFAP** ist der Hauptbestandteil astrozytärer Intermediärfilamente und wird als spezifischer Zellmarker für Astrozyten angesehen (Eng und DeArmond, 1982^[26]).

3.5.3 Ablauf der Fremdkörperreaktion

Das Einbringen eines Aneurysmaclips in das Gehirn ruft – wie jeder Fremdkörper – eine inflammatorische Gewebereaktion in dessen Umgebung hervor. Diese Fremdkörperreaktion ist ein hochkomplexes Zusammenspiel diverser zellulärer und molekularer Prozesse.

Auf Grund der zellichten und stark vaskularisierten Struktur des ZNS kommt es bei der Implantation unweigerlich zu zellulären und vaskulären Schädigungen (Bjornsson *et al.*, 2006^[9]). Bei einem für längere Zeit im Körper verbleibenden Implantat kommt es durch den persistenten Gewebstress zusätzlich zu weiteren chronischen Entzündungsprozessen, die sich in Abhängigkeit von Oberflächenbeschaffenheit und -material des Fremdkörpers sowie

dem initialen Gewebstrauma teils erheblich unterscheiden können (Ferguson *et al.*, 2020^[28]). Das Ziel bei jedwedem Implantat sollte daher sein, ein möglichst geringes Ausmaß der Gewebsreaktion anzustreben.

Die wesentlichen Abläufe dieser Fremdkörperreaktion werden im folgenden Abschnitt aufgeführt und näher erläutert; Zeitangaben beziehen sich dabei auf tierexperimentell erworbene Daten bei Nagetieren.

Das mechanische Trauma bei der Implantation initiiert den Wundheilungsprozess des ZNS. Durch beschädigte Blutgefäße dringen Erythrozyten, Thrombozyten, Gerinnungsfaktoren und Makrophagen ein und lösen Prozesse aus die zu Wundheilung und Gewebsumbau beitragen. (Polikov *et al.*, 2005^[101]) Überschüssige Flüssigkeit aus den Gefäßen und zerstörtem Gewebe erzeugt ein Ödem und führt zu lokal erhöhtem Druck an der Implantationsstelle (ebd.). Ab etwa 24 h nach Implantation treten diverse fortgeschrittene Effekte in Kraft. Aktivierte Mikroglia migriert zur Implantationsstelle, sammelt sich an der Oberfläche des Implantats und setzt dort verschiedene proinflammatorische Zytokine frei. Diese führen zu weiterer Zellmigration und unterhalten die Störung der BHS. (Prodanov und Delbeke, 2016^[103]) Nach 6-8 Tagen nehmen Hämatom und Ödem durch Resorptions- und Phagozytosevorgänge deutlich ab (Polikov *et al.*, 2005^[101]), geschädigte Nervenzellen gehen i. d. R. zugrunde und werden ebenfalls phagozytiert. Diese Entzündungsvorgänge können über das initiale Gewebstrauma hinaus im Verlauf durch Mikrobewegungen des Implantats aufrechterhalten und gesunde Zellen in direkter Umgebung durch das proinflammatorische Milieu geschädigt werden. (Prodanov und Delbeke, 2016^[103])

Innerhalb der ersten Woche erfolgt zudem die Aktivierung umliegender Astrozyten. Diese bilden nach 2-3 Wochen eine dichte Schicht um den Kern aus Implantat und angelagerten Mikrogliazellen die als Glianarbe oder Gliose bezeichnet wird. (Kozai *et al.*, 2015^[58]; Prodanov und Delbeke, 2016^[103]) Diese unterstützt die Restitution der BHS und schützt vor weiterem neuronalen Schaden sowie sich ausbreitender Inflammation; allerdings kann eine ungebremste Gliose durch Verstärkung der Entzündungsreaktion auch den gegenteiligen Effekt bewirken. (Prodanov und Delbeke, 2016^[103])

Ab 4 Wochen nach Implantation beginnen Gewebsumbauprozesse und chronische Entzündung zu dominieren (ebd.). Prozesse die durch das initiale Trauma ausgelöst wurden sind nun abgeschlossen und weitere Reaktionen sind nun deutlich stärker vom im Gewebe verbleibenden Implantat abhängig. (Ferguson *et al.*, 2020^[28])

In der Regel pendelt sich nach einiger Zeit ein stabiler, kontrollierter Zustand ein, bei dem die Entzündung bei einem geringen Ausmaß verbleibt und der Fremdkörper, d. h. in diesem Fall das Implantat, durch eine feste Kapsel aus Gliazellen vom restlichen Hirnparenchym abgegrenzt wird.

4 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der weiteren Untersuchung der Fragestellung, ob sich ein Aneurysmaclip aus carbonfaserverstärktem PEEK – wie der oben beschriebene Prototyp – für die praktische Anwendung eignet.

Im Speziellen werden zwei wesentliche Teilaspekte betrachtet:

Zum einen soll die Frage geklärt werden, ob sich durch das Material im Vergleich zur herkömmlich verwendeten Titanlegierung Vorteile in der magnetresonanztomographischen Bildgebung ergeben – insbesondere im Hinblick auf die Artefaktbildung und Beurteilbarkeit der geclippten und der benachbarten Gefäße.

Waren vorangegangene Studien noch vorwiegend auf Phantomuntersuchungen und Kadaverstudien begrenzt, so stellt die hiesige Arbeit dahingehend ein Novum dar, dass die MRT-Untersuchungen *in vivo* am Tiermodell erfolgten und somit Faktoren wie Gefäßpulsation, Atmung und Flusseigenschaften des Blutes beinhaltet.

Zum anderen wird die Biokompatibilität des neuen Clipmaterials – sowohl alleine, als auch mit Carbonfasern kombiniert – in Zellkulturen sowie erstmals bei der subduralen Implantation am Gehirn im Tiermodell untersucht mit der von Titan verglichen.

Hier steht die zentrale Frage im Fokus, ob sich die im Gehirn verursachte Fremdkörperreaktion von CF-PEEK und Titan wesentlich unterscheiden, da für eine zukünftige Anwendung in der Praxis der Anspruch gelten muss, dass CF-PEEK zumindest keine schwerwiegenderen Gewebsreaktionen verursacht als das bereits verwendete Titan.

5 Material und Methodik

5.1 Anfertigung des Prototyps aus CF-PEEK

Für die in dieser Dissertation beschriebenen Versuche wurde der bereits erwähnte Prototyp eines komplett metallfreien Aneurysmaclips aus carbonfaserverstärktem PEEK verwendet. Er wurde in Zusammenarbeit der Universität des Saarlandes (UdS) mit Partnern aus Industrie und Forschung entwickelt und unter Anwendung des vom Fraunhofer Institut (Fraunhofer Institut für Produktionstechnologie IPT, Aachen, Deutschland) zur Verfügung gestellten Mikropultrusionsverfahrens angefertigt. Für die Form des Clips wurde das bereits in **Abb. 2 B** gezeigte etablierte Design von Lazic (Peter Lazic GmbH, Tuttlingen, Deutschland) gewählt, da es Vorteile bei der Fertigung sowie der intraoperativen Anwendung bietet. Dieses Design erlaubt z. B. unterschiedliche Herstellungsprozesse für die Branchen und die Feder sowie eine gesteigerte intraoperative Übersicht.

Die Clipbranchen von 12 mm Länge bestanden aus kurzcarbonfaserverstärktem PEEK und wurden im Spritzgussverfahren hergestellt. Für das Federelement wurde durch Mikropultrusion endloscarbonfaserverstärktes PEEK mit einem Durchmesser von 1,1 mm verwendet, das zu einer Schenkelfeder mit 1,5 Windungen und einem Innendurchmesser von 1,8 mm umgeformt wurde. Die Komponenten wurden anschließend durch Kunststoffschweißen miteinander verbunden.

Zusätzlich wurden für die Untersuchung der Biokompatibilität mehrere 2 x 2 mm große Testplättchen aus *medical grade* Titan, PEEK & CF-PEEK hergestellt.

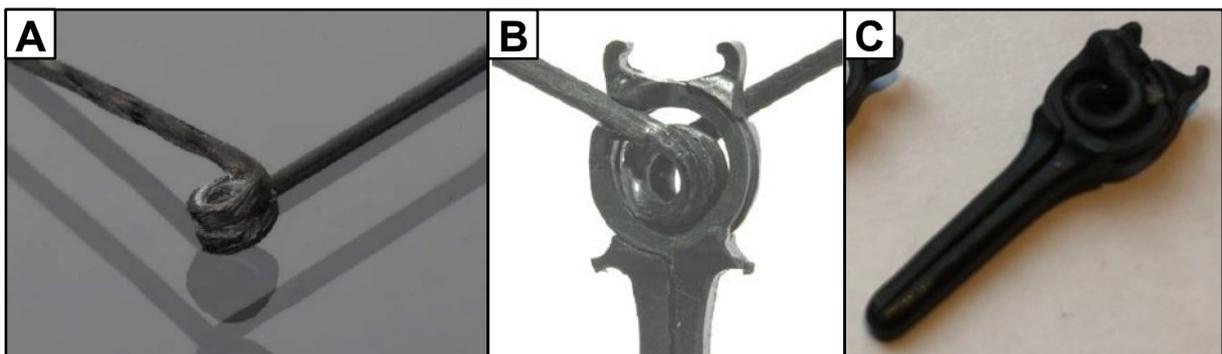


Abbildung 5: Zusammensetzung des Clip-Prototyps aus CF-PEEK

Aufnahmen des isolierten Federelements (A), der Clip-Branchen mit eingesetztem Federelement (B) sowie des kompletten Prototyps (C)

5.2 Versuchstiere & -haltung

Die Tierversuche wurden unter den Versuchsnummern 63/2013 & 11/2016 genehmigt vom saarländischen Landesministerium für Umwelt und Verbraucherschutz, Abteilung C „Arbeitsschutz, Verbraucherschutz, Tierschutz“, Referat C/2 „Lebensmittelüberwachung, Umwelthygiene, Tierschutz, Veterinärwesen“. Sie erfolgten unter Einhaltung der geltenden

Vorschriften des Tierschutzgesetzes und unter Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes. Dem Verfasser dieser Arbeit wurde nach Qualifikation durch entsprechende Kurse und Fortbildungen von der Tierschutzbeauftragten eine Ausnahmegenehmigung zur selbstständigen Durchführung der operativen Versuche erteilt.

Verwendet wurden bei Erwerb ca. 11 Wochen alte, weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Mindestgewicht von 250 g, die in Gruppen zu je fünf Tieren pro Käfig gehalten wurden. Nach durchgeführten Eingriffen wurden die Tiere für einige Tage vorübergehend in Einzelkäfigen untergebracht.

Die Versuchstiere wurden im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie untergebracht und versorgt; in der Tierhaltung herrschten Temperaturen von 22-24 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-65 % und ein 12 h Tag/Nacht-Zyklus bei freier Verfügbarkeit von Trinkwasser und Standard-Labornahrung (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Allgemeinzustand, Körpergewicht sowie Spontan-, Schlaf- & Fressverhalten der Versuchstiere wurden regelmäßig überprüft.

5.3 Perioperatives Procedere

Die Anästhesie für alle operativen Eingriffe bestand aus einer initialen Inhalationsnarkose mit Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) gefolgt von einer intraperitonealen Injektion eines Gemischs aus 90 mg/kgKG Ketaminhydrochlorid (Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 8 mg/kgKG Xylazinhydrochlorid (Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) zum Erreichen der nötigen Narkosetiefe. Dies ermöglicht eine tiefe Narkose über einen Zeitraum von 30-45 Minuten; bei Bedarf wurden adaptierte Injektionen zur Aufrechterhaltung der Anästhesie vorgenommen.

Die Eingriffe erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Während der OP wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf einer Heizmatte platziert; nach der OP wurden sie bis zum Aufwachen mit einer Infrarotlampe gewärmt. Um das Austrocknen der Augen durch den narkosebedingt fehlenden Lidschluss zu verhindern wurde eine Augensalbe aufgetragen (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Bayer [s. o.]).

Im Anschluss an den Eingriff erhielten die Tiere als Analgesie eine subkutane Gabe von 5 mg/kgKG Carprofen (Rimadyl[®], Zoetis Deutschland GmbH, Berlin Deutschland) sowie 0,5 mg/ml Tramadol (Tramal[®] Tropfen, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) im Trinkwasser für die nächsten drei Tage.

Alle implantierten Objekte wurden nach Explantation von Verunreinigungen befreit und gemäß Herstellerangaben mit einem Autoklav für mindestens 20 Minuten sterilisiert. Die verwendeten Instrumente wurden vor jedem Eingriff in einem Ultraschallbad erhitzt und gereinigt sowie mit 70%iger Ethanollösung desinfiziert.

Teil 1: Darstellung des Prototyps im MRT

5.4 Artefaktausdehnung im MRT (Phantom)

Die ersten magnetresonanztomographischen Untersuchungen wurden an einem Phantomkörper durchgeführt, um mit einfachen Mitteln eine Umgebung mit hohem Wasseranteil – wie Blutgefäße und Gehirn eines Säugetieres – zu simulieren. Hierfür wurde der Prototyp mit einem in Größe und Aufbau identischen Clip aus Titan (#45.760, Peter Lazic GmbH, Tuttlingen, Deutschland) verglichen. Die Clips wurden an einem Stück chirurgischen Nahtmaterials befestigt und in ein mit Wasser gefülltes verschließbares zylindrisches Plastikgefäß (Höhe: 7 cm; Durchmesser: 4,3 cm) gehängt.

Es wurden Standard-MRT-Sequenzen (MRT-Protokoll siehe **5.5.1**) mit einem 3 Tesla-MRT (Magnetom Skyra, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt und die Größe (Länge & Breite) der entstehenden Suszeptibilitätsartefakte miteinander verglichen.

Der Prototyp wurde darüber hinaus (ohne Phantom) in einem hochauflösenden Mikro-CT (Skyscan 1172, Bruker microCT N.V., Kontich, Belgien) untersucht.

5.5 Gefäßbeurteilbarkeit im Tiermodell

Die wie in Abschnitt **5.3** beschriebenen narkotisierten Tiere wurden nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe und Ausfalls der Schutzreflexe in Rückenlage auf einer Heizmatte platziert. Nach Rasur und Desinfektion (Octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) der Bauchhaut wurde eine Medianlaparotomie durchgeführt und die *Aorta abdominalis* freigelegt. Der Ursprung der linken Nierenarterie wurde identifiziert und die Arterie mikrochirurgisch von der korrespondierenden Vene getrennt.

Die Tiere wurden randomisiert in vier Gruppen (mit jeweils 6 Tieren) eingeteilt (siehe **Tabelle 1**). Die erste Gruppe diente als operative Kontrollgruppe; hier erfolgte lediglich eine Spülung des Operationsfeldes mittels Natriumchloridlösung (NaCl) und ein Wundverschluss. Bei der zweiten Gruppe wurde die linke Nierenarterie am Gefäßursprung mit einem Faden ligiert. Gruppe 3 erhielt ein Clipping der Arterie mit einem gängigen Aneurysmaclip aus Titan (#45.760, Peter Lazic GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Bei Gruppe 4 wurde für das Clipping der neue Prototyp verwendet. Bei allen Gruppen wurde anschließend das Abdomen mit NaCl-Lösung gespült um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden. Danach wurden Bauchwand und Haut mit je einer fortlaufenden Naht verschlossen.

In der Schwanzvene wurde ein Katheter zur Applikation von KM (Gadovist®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) platziert. Die Tiere wurden noch unter Anästhesie in den MRT transportiert; dort wurden verschiedene Standardsequenzen nach dem unten aufgeführten Protokoll durchgeführt. Nach der Untersuchung wurden die Tiere durch eine intraperitoneal

applizierte Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcofen®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

Die Aufnahmen wurden verblindet durch einen Facharzt für Radiologie mit Schwerpunkt Neuroradiologie aus der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie am Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) beurteilt. Es erfolgte die Quantitative Auswertung der Artefaktgröße; hierfür wurde die radiologische Diagnosesoftware OsiriX (Pixmeo Sàrl, Bernex, Schweiz) verwendet. Qualitativ wurden die Aspekte „erfolgreicher Verschluss der *Arteria renalis*“ sowie „Beurteilbarkeit des Gefäßverlaufs angrenzender Gefäße“ bewertet.

Gruppennummer	1	2	3	4
Versuchsgruppe	<i>sham</i> -OP	Ligatur	Titan	CF-PEEK

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere; n=6

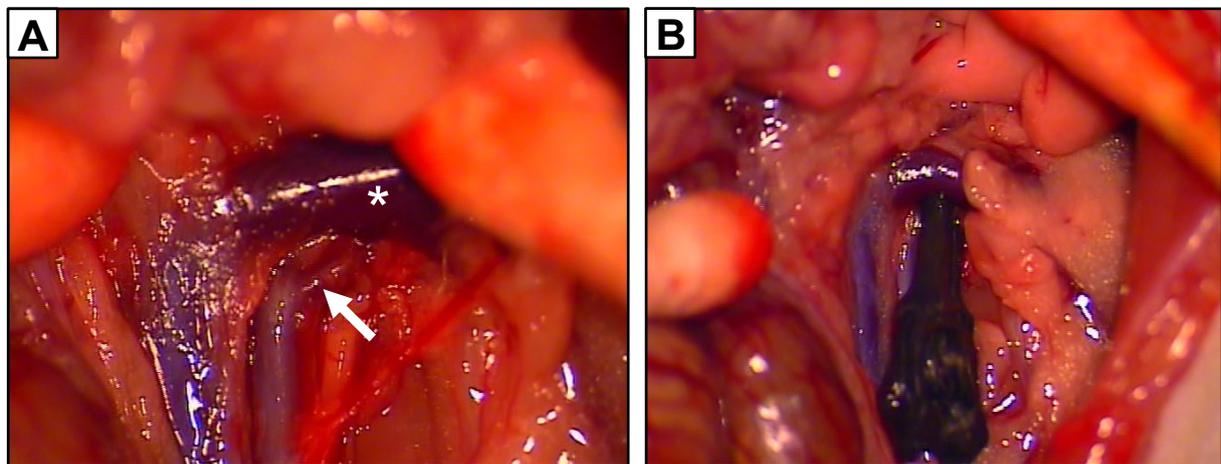


Abbildung 6: Gefäßclipping der *Vena renalis* im Rattenmodell

Aufnahmen des OP-Situs bei Blick durch das Operationsmikroskop nach Medianlaparotomie und Präparation der relevanten Gefäße; **A:** *Vena renalis* (Stern), darunter *Aorta abdominalis* und der Abgang der zu verschließenden *A. renalis* (Pfeil); **B:** platzierter CF-PEEK-Clip auf der *A. renalis* direkt am Abgang (Senger *et al.*, 2023^[116])

5.5.1 MRT-Protokoll

Folgende Sequenzen wurden bei der Untersuchung der Versuchstiere durchgeführt:

T1 3D-Space, coronal, fatsat, voxel 0.7 mm x 0.7 mm x 0.7 mm

DWI, transversal and coronal, b=0 s/mm² and b=600 s/mm², slice 2 mm, pixel 0.5 mm x 0.5 mm

T2 transversal, TR 7300 ms, TE 88 ms, voxel 0.4 mm x 0.4 mm x 2 mm

T2 coronal, TR 8600 ms, TE 90 ms, voxel 0.3 mm x 0.3 mm x 1.5 mm

MR-Angiography, 3D, sagittal, voxel 0.6 mm x 0.6 mm x 0.6 mm, scantime 2.07 s

TOF 3D, transversal, voxel 0.3 mm x 0.3 mm x 0.3 mm

Teil 2: Biokompatibilität von CF-PEEK bei Kontakt zum Gehirn

5.6 Zellbiologische Versuche

Tabelle 2: verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Details	Hersteller	Produktnr.
Zentrifuge	Rotina 35	Hettich, Tuttlingen, Deutschland	1705
Zellkulturflasche (Wachstumsfläche: 25 cm ² ; Volumen: 50 ml)	Zellkulturflasche Falcon steril mit Gasaustauschkappe	BD Biosciences, San Jose, CA, USA	353108
Inkubator/ CO ₂ -Begasungsbrutschrank	BB 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland	-
Multiwellplatte (24 Wells)	Nunc 24-Well Plate, Round	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	142475
Mikroskop	Invers-Mikroskop; PrimoVert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	491206
Mikroskopkamera	Axiocam [®] ERc 5s	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	426540

Tabelle 3: verwendete Substanzen und Chemikalien

Bezeichnung	Details	Hersteller	Produktnr.
Flüssigstickstoff	<i>liquid nitrogen</i> ; verflüssigtes N ₂	ZCHL UdS, Saarbrücken, Deutschland	-
<i>fetal bovine serum</i>	fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Gibco, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	11550356
<i>horse serum</i>	Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Gibco, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	10368902
L-Glutamin	-	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	G8540
Penicillin-Streptomycin	10.000 U/ml	Gibco, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	11548876
poly-L-Lysin-Lösung	0,01 % (= 0,1 mg/ml);	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	P4707
PBS-Puffer	phosphatgepufferte Salzlösung; pH 7,4	-	-
Aqua dest. (= destilliertes Wasser)	Milli-Q [®] Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	-
NGF	Nervenzwachstumsfaktor	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	2513

5.6.1 Wachstum von HA-Zellen

In einem *in vitro* Versuch wurde der Einfluss der Clipmaterialien auf das Wachstumsverhalten von humanen Astrozyten (HA) untersucht. Hierfür wurden HA-Zelllinien von ScienCell verwendet (ScienCell, #1800-5, Provitro AG, Berlin, Deutschland). Für die Anzucht der Zellkulturen wurde unter anderem ein spezielles Wachstumsmedium (ScienCell, #1801, Provitro AG, Berlin, Deutschland) verwendet, das sich aus Astrozyten-Basalmedium, 2 % *fetal bovine serum*, 1 % *astrocyte growth supplement*, 100 IE/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin zusammensetzt.

Die Kulturen wurden folgendermaßen angesetzt:

Die in Flüssigstickstoff bei -196 °C gelagerten Zellen wurden in 10 ml Medium aufgetaut, resuspendiert und anschließend bei 1200 U/min für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen und die Zellen mit 1 ml frischem Medium erneut resuspendiert. Die so erzeugte Suspension wurde tropfenweise auf die mit 2 ml HA-Medium vorbereiteten Zellkulturflaschen verteilt, diese geschwenkt um die Zellen zu verteilen und anschließend bei 37 °C in feuchter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 95 % Raumluft im Inkubator bebrütet.

Die Zellkulturen wurden in vier Gruppen eingeteilt (siehe **Tabelle 4**) die jeweils 5 Kulturen umfassten. Bei den Gruppen 2, 3 und 4 wurde jeweils ein kleines Plättchen aus PEEK, CF-PEEK bzw. Titan in die Flaschen hinzugegeben; Gruppe 1 diente als Kontrolle ohne zusätzliches Material in der Zellkulturflasche. Zur Auswertung des Zellwachstums, insb. am Rand der Testplättchen, wurden an den Tagen 2, 3, 6 und 7 pro Kultur mit der Mikroskopkamera eine Aufnahme in 200-facher Vergrößerung angefertigt (20x-Objektiv). Im Anschluss wurde die Zellzahl pro Aufnahme bestimmt; hierfür wurde das Programm *ImageJ*^[14] (Version 1.53, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) verwendet. Der vom Testplättchen eingenommene Anteil des Bildes wurde (mit demselben Programm) ausgemessen, auf die nächsten 5 % gerundet und die bestimmte Zellzahl um den entsprechenden Wert nach oben korrigiert um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die gewonnenen Daten wurden als durchschnittliche Zellzahl (MW) pro FOV ± SEM angegeben.

Gruppennummer	1	2	3	4
Versuchsgruppe	Kontrolle	PEEK	CF-PEEK	Titan

Tabelle 4: Gruppeneinteilung HA-Kulturen; n=5

5.6.2 Neuritenwachstum von PC12-Zellen

Als PC12-Zellen wird eine klonale Zelllinie bezeichnet, die erstmals 1976 aus den Zellen eines Phäochromozytoms von *New England Deaconess Hospital* Ratten gewonnen wurde (Greene und Tischler, 1976^[40]). Diese Zellen verändern nach Hinzugabe von Nervenwachstumsfaktor (NGF) ihren Phänotypen und bilden zahlreiche als Neuriten bezeichnete Fortsätze aus (Rao *et al.*, 2012^[105]). Da sie in diesem Punkt Neuronen ähneln werden PC12-Zellen in der Forschung unter anderen als Modell für den Effekt verschiedener Prozesse und Substanzen auf das Wachstum und Überleben von Nervenzellen verwendet (Wiatrak *et al.*, 2020^[135]).

In einem zweiten *in vitro* Versuch wurde der Einfluss der Clipmaterialien auf das Neuritenwachstum eben solcher mit NGF versorgten PC12-Zellen untersucht. Die erworbenen PC12-Zelllinien (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #88022401, München, Deutschland) wurden in RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #R6504, München, Deutschland) herangezüchtet, dem folgende Komponenten zugesetzt wurden: 5 % *fetal bovine serum*, 10 % *horse serum*, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte bei 37 °C in feuchter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 95 % Raumluft im Inkubator.

Analog zu **5.6.1** (siehe **Tabelle 4**) wurden die Zellen in vier Gruppen eingeteilt die jeweils 5 Kulturen umfassten. Bei den Gruppen 2, 3 und 4 wurde jeweils ein Probestück aus PEEK, CF-PEEK bzw. Titan am Boden der 24-Well-Platte befestigt. Alle Probestücke wurden zuvor für mindestens 6 h bei 37 °C mit 0,1 mg/ml poly-L-Lysin überzogen, mit Aqua dest. und anschließend mit 0,01 mol/l PBS-Pufferlösung gespült. Auch die Wells wurden zuvor für 2 h mit poly-L-Lysin beschichtet. PC12-Zellen wurden dann mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well in die Zellkulturplatte gegeben. Nach 6-stündigem Serumentzug wurden die Zellen in Medium, dem 50 ng/ml NGF zugesetzt wurden, weiter bebrütet.

Um das Neuritenwachstum auswerten zu können wurden nach 7 Tagen der Inkubation mit der Mikroskopkamera von jeder Kultur 10 Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung (20x-Objektiv) direkt an den Kanten des Probestücks angefertigt. Die Messung der Neuritenlänge erfolgte mit Hilfe des Programms ZEN (Blue Edition, Version 2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Analog zu **5.6.1** wurde auch hier der vom Testplättchen eingenommene Anteil des Bildes ausgemessen, auf die nächsten 5 % gerundet und die bestimmte Neuritenlänge um diesen Wert nach oben korrigiert. Die gewonnenen Daten wurden als durchschnittliche Neuritenlänge (MW) pro FOV \pm SEM angegeben.

5.7 Tierversuche

Tabelle 5: verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Details	Hersteller	Produktnr.
Operationsmikroskop	Leica M651	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland	-
Waage	Siena plus	Soehnle, Leifheit AG, Nassau, Deutschland	-

Tabelle 6: verwendete Substanzen und Chemikalien:

Bezeichnung	Details	Hersteller	Produktnr.
Haarentfernungscreme	asid®-med Creme	ASID BONZ, Herrenberg, Deutschland	-
Augensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland	-
Hautdesinfektionsmittel	Octenisept®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland	-
0,9% NaCl-Lösung	Natriumchlorid; isotone/physiologische Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland	-
Fibrinkleber	Histoacryl® Gewebekleber; n-Butyl-2-Cyanoacrylat	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland	-
4% Formaldehyd-Lösung	Roti® Histofix; pH 7, phosphatgepuffert;	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	P087.5

5.7.1 Tierexperimentelles Protokoll (Überblick)

Ziel dieses Versuchs war es zu untersuchen, ob die Reaktion des Hirngewebes auf ein Implantat aus PEEK bzw. CF-PEEK sich in signifikanter Weise von der Reaktion auf ein Implantat aus Titan unterscheidet. Den Versuchstieren wurden hierfür die unter **5.1** bereits erwähnten Testplättchen subdural auf die freigelegte Hirnoberfläche gelegt. Einmal vor und viermal nach der Operation wurden Nachkontrollen durchgeführt. Darunter fielen u.a. auch Verhaltenstests um grobe neurologische Auffälligkeiten festzustellen und die Tiere falls notwendig frühzeitig zu euthanasieren. 30 Tage nach dem Eingriff wurden die Tiere euthanasiert, das Gehirn entnommen und Gewebsschnitte angefertigt. Nach histologischer bzw. immunhistochemischer Aufarbeitung wurden diese Schnitte hinsichtlich der durch den Fremdkörper ausgelösten Gewebsreaktion ausgewertet.

5.7.2 Ablauf des operativen Eingriffs

Die wie in Abschnitt 5.3 beschriebenen narkotisierten Tiere wurden in Bauchlage auf einer Heizmatte unter dem Operationsmikroskop platziert und der Kopf in einem stereotaktischen Rahmen mit lateralen Metallstiften im *Meatus acusticus externus* fixiert. Nach Entfernung der Haare im Operationsgebiet mittels einer Haarentfernungscreme, der Entfernung etwaiger Cremereste mit Wasser, Applikation der Augensalbe und Hautdesinfektion wurde ein medianer Kopfhautschnitt (**Abb. 7**) durchgeführt. Die *Galea aponeurotica* wurde teils stumpf teils scharf abgetragen und dadurch die darunter liegende Schädelkalotte freigelegt. Die Kraniotomie durch das linke *Os parietale* (**Abb. 7**) erfolgte mit Hilfe eines Diamantbohrers – der Orientierung dienten hier Lambdanaht (*Sutura lambdoidea*) und Pfeilnaht (*Sutura sagittalis*). Nach Durchführung der Kraniotomie mit einem Durchmesser von ca. 5-6 mm und Beiseitelegen des Knochendeckels zur späteren Reimplantation wurde die *Dura mater* vorsichtig mit mikrochirurgischen Instrumenten eröffnet.

Die Versuchstiere waren zuvor zufällig 4 Gruppen mit jeweils 5 Tieren zugewiesen worden, nach denen sich das weitere Vorgehen richtete. (siehe **Tabelle 7**) Bei den Tieren in den Gruppen 2, 3 und 4 wurde anschließend eines der unter 5.1 erwähnten 2 x 2 mm großen Probestücke auf die freigelegte Hirnoberfläche gelegt. In Gruppe 1 wurde lediglich eine *sham-OP* ohne Implantation durchgeführt. Das OP-Gebiet wurde anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung gespült bis alle Blutungen gestillt waren. Der Knochendeckel wurde wieder eingesetzt und der Defekt mit Fibrinkleber versiegelt. Die Haut wurde durch chirurgische Naht mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen und die Tiere wie unter 5.3 beschrieben bis zum Erwachen in einem Käfig unter der Wärmelampe platziert, beobachtet und anschließend zur weiteren Erholung zurück in die Tierhaltung gebracht.

Gruppennummer	1	2	3	4
Versuchsgruppe	<i>sham-OP</i>	PEEK	CF-PEEK	Titan

Tabelle 7: Gruppeneinteilung der Versuchstiere; n=5

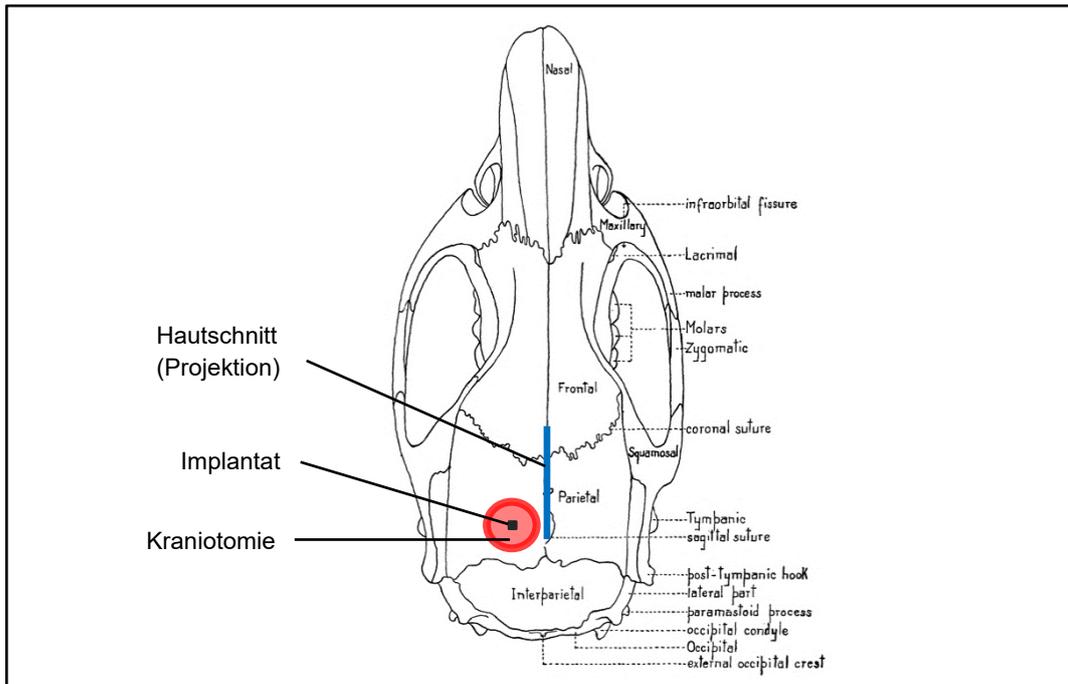


Abbildung 7: chirurgischer Zugang – anatomische Position

Position des Hautschnitts in Projektion (**blau**), der Kraniotomie (**rot**) und des Implantats (**schwarz**); Rattenschädel von dorsal (*Anatomy of the rat*, Eunice Greene, 1935^[39])

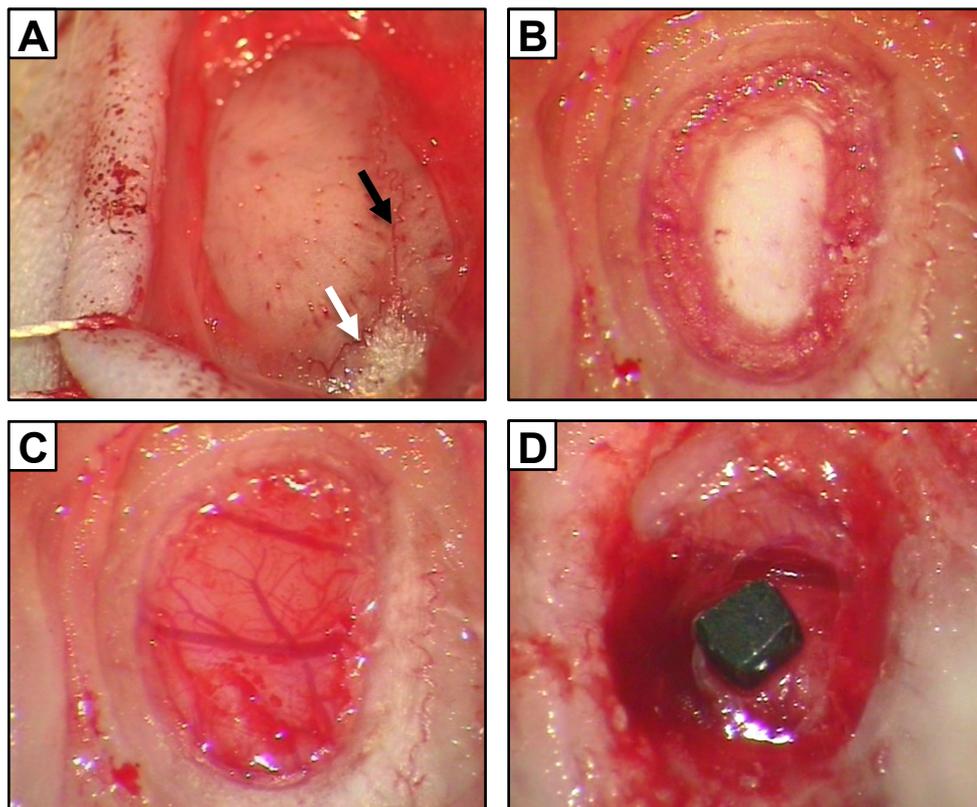


Abbildung 8: subdurale Implantation im Rattenmodell

wesentliche Arbeitsschritte während der Implantation; Aufnahmen über Mikroskopkamera; **A:** medianer Kopfhautschnitt, Aufspannen der Kopfschwarte, Präparation der Schädelkalotte, Orientierung an *Sutura sagittalis* (schwarzer Pfeil) und *Sutura lambdoidea* (weißer Pfeil); **B:** Minikraniotomie mittels Diamantbohrer; OP-Situs vor Entfernung des Knochendeckels; **C:** OP-Situs nach Entfernung des Knochendeckels; **D:** OP-Situs nach Eröffnung der *Dura mater* und Implantation des CF-PEEK Testplättchens

5.7.3 Nachbeobachtungen

Alle Tiere wurden unmittelbar vor der Operation gewogen um einen Ausgangswert des Körpergewichts zum späteren Vergleich zu erhalten. Weiterhin wurden alle Versuchstiere im Anschluss an die Operation für 28 Tage in zunehmenden Abständen untersucht um die Auswirkungen des Eingriffs auf die Tiere einschätzen zu können und etwaige Abbruchkriterien zu erkennen. Diese Nachkontrollen umfassten Bestimmungen des Körpergewichts, Bewertung des Allgemeinzustands (insb. Fell, Augen, Körperhaltung), des Spontanverhaltens und der Wundheilung sowie anhand dieser Parameter Rückschlüsse auf das Belastungs- und Schmerzniveau der Tiere. Sie wurden an den Tagen 1, 3, 7, 10, 14, 21 und 28 post OP durchgeführt.

Darüber hinaus wurde an bestimmten Tagen der sogenannte *beam-walk* Test (s. u.) zur genaueren Untersuchung von Balance und motorischer Koordination der Tiere durchgeführt.

5.7.4 Beam-Walk Test

Der *beam-walk* Test ist ein verbreiteter Versuchsaufbau um die Motorkoordination von Versuchstieren, insbesondere nach Verletzung des Cortex oder Rückenmarks, apoplektischem Insult, bei neurodegenerativen Erkrankungen, etc., genauer zu beleuchten (Au *et al.*, 2016^[4]; Dixon *et al.*, 1987^[22]).

Der Versuch wird je nach Forschungsgruppe und -thema in leichten Abwandlungen und mit verschiedenen Scoring-Systemen angewandt, beinhaltet prinzipiell aber immer einen Balken zwischen zwei Plattformen den die Versuchstiere überqueren müssen.

Im vorliegenden Fall bestand der Versuchsaufbau aus folgenden Elementen:

Eine um etwa 20 cm erhöhte Startplattform von 35 x 25 cm Größe, eine ebenso große Zielplattform in gleicher Höhe auf der sich ein Rückzugsort für das Tier befand sowie ein 1 m langer und 2 cm breiter Steg dazwischen. (**Abb. 9**) Alle Elemente bestanden aus unbearbeitetem Holz.

Drei Tage vor dem operativen Eingriff, unmittelbar vor dem Eingriff sowie an den Tagen 3, 10, 21 und 28 post OP wurde der *beam-walk* Test wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Die Durchführung 3 Tage vor dem Eingriff diente hierbei dazu die Versuchstiere an den Testaufbau zu gewöhnen und ein gewisses Training zu erreichen.

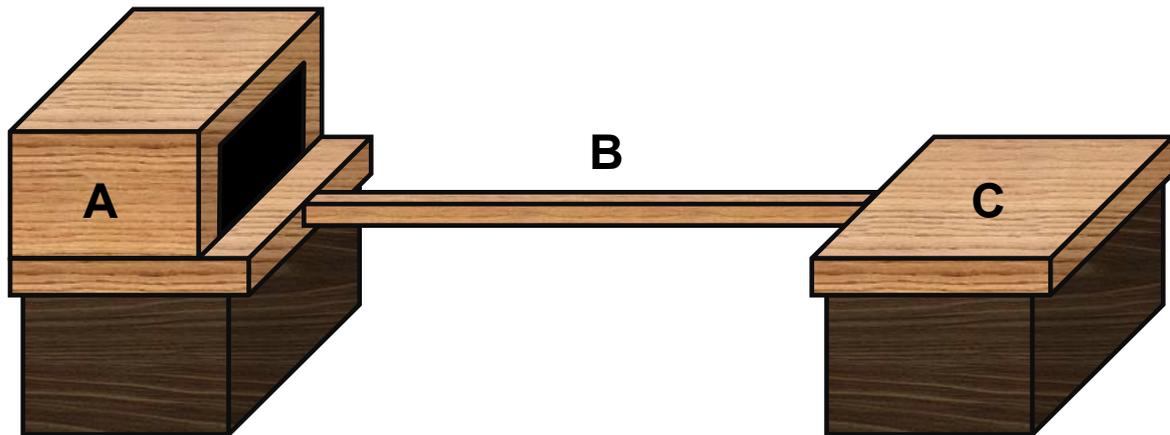


Abbildung 9: Versuchsaufbau des *beam-walk* Tests

Zielplattform mit Rückzugsort (A; 35 x 25 cm), zu überquerender Steg (B; 100 x 2 x 1 cm), Startplattform (C; 35 x 25 cm)

Das Versuchstier wurde aus seinem Käfig heraus auf der Startplattform platziert und ihm wurde ein Moment der Orientierung und Akklimatisierung an die neue Umgebung gewährt. Da die Tiere von sich aus i. d. R. auf der Plattform verharren und diese erkunden wurden sie anschließend durch sanfte Berührungen mit den Fingern zur Überquerung des Steges animiert. Die vom Versuchstier für die vollständige Überquerung benötigte Zeit wurde vom Versuchsleiter gestoppt, hierbei diente die erste Berührung des Steges durch einen der Vorderläufe als Start- sowie die erste Berührung der Zielplattform durch einen der Vorderläufe als Endpunkt. Darüber hinaus wurden sog. *foot-slips*, d. h. Fehltritte bei der Überquerung notiert. Unterschieden wurde hierbei zwischen „geringen“ Fehlritten (kurzes Abrutschen einer Gliedmaße vom Steg ohne merkliche Reduzierung der Geschwindigkeit) und „schweren“ Fehlritten (Tier gerät ins Straucheln, muss abbremsen oder stoppen, gleichzeitiges Abrutschen mehrerer Gliedmaßen oder dergleichen). Wenn das Tier umkehrte oder ohne erkennbaren Grund auf dem Steg anhielt wurde der Durchlauf für ungültig erklärt und wiederholt. Pro Versuchstier und -tag wurden 5 gültige Durchläufe durchgeführt. Für die weitere statistische Aufarbeitung wurden folgende Daten ermittelt: Überquerungszeit, *foot-slips* (gesamt sowie schwere Fehlritte), Gewicht sowie Gewichtsveränderung im Vergleich zu vor dem Eingriff. Alle Daten wurden als Mittelwert (MW) \pm SEM angegeben.

5.7.5 Entnahme & Konservierung der Proben

Im Anschluss an die letzte Nachkontrolle 28 Tage postoperativ wurden die Tiere in der unter 5.3 aufgeführten Weise zum Erreichen einer chirurgischen Anästhesietiefe sediert und in Rückenlage platziert sowie an allen vier Gliedmaßen fixiert. Nachdem alle Reaktionen auf Schmerzreize ausblieben erfolgte eine Medianlaparotomie mit anschließender Durchtrennung des *Diaphragma* zur Erzeugung eines beidseitigen Pneumothorax. Darauf

folgend wurde das rechte *Atrium* eröffnet und der Organismus durch Injektion von ausreichend 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung in den linken Ventrikel perfundiert. Nach möglichst vollständigem Entbluten, u. a. zu erkennen am Ablassen der Leber, erfolgte eine transkardiale Perfusion mit 4%iger phosphatgepufferter Formaldehyd-Lösung zur Vorfixierung des Hirngewebes. Nach Abschluss dieses Vorganges wurden zunächst Nackenmuskulatur und Wirbelsäule durchtrennt, dann der Schädel großflächig eröffnet und schließlich das Gehirn vorsichtig *in toto* freipräpariert und herausgenommen. Die eingebrachten Implantate wurden vorsichtig von der Hirnoberfläche entfernt und im Anschluss autoklaviert; das Hirngewebe bis zur weiteren Aufarbeitung in Gefäßen mit 4%iger-Formaldehyd-Lösung konserviert.

5.8 Histologie und Immunhistochemie

Vor der weiteren Aufarbeitung wurden von den in Formaldehyd fixierten Proben zunächst mit einem Skalpell der Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) am Rostralpol sowie Kleinhirn (*Cerebellum*), Verlängertes Mark (*Medulla oblongata*) und Brücke (*Pons*) am Occipitalpol abgetrennt. Die Hirne wurden über einen Zeitraum von 72 h vollautomatisiert entwässert und paraffiniert; anschließend wurden Paraffinblöcke gegossen und vollständig erkalten gelassen. Per Mikrotom wurden von den Paraffinblöcken zunächst Probeschnitte angefertigt um die für die folgenden Untersuchungen interessante Region zu identifizieren und anschließend innerhalb dieser Region einige coronare Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt, auf dem warmen Wasserbad geglättet und auf reguläre sowie Adhäsionsobjekträger übertragen. Die Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend lichtmikroskopisch gesichtet.

Für jedes Versuchstier wurden Schnitte für Übersichtsfärbungen sowie zwei Mal fünf Schnitte aus der Region des Implantates für die Immunhistochemie ausgewählt und mit ihnen wie im Folgenden beschrieben weiter verfahren.

Tabelle 8: verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Details	Hersteller	Produktnr.
automatisches Probenvorbereitungsgesät	Tissue-Tek® VIP 5 jr.; Vakuuminfiltrationsprozessor	Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, Deutschland	-
Gewebeeinbettstation	Shandon Histocentre 2	ThermoFisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	-
Rotations-Mikrotom	SLEE CUT 5062	SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland	-
Wasserbad	rund; CellPath	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland	-

Objektträger	76 x 26 x 1 mm; Kanten 90° geschliffen, vorgereinigt	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda- Königshofen, Deutschland	1000612
Adhäsionsobjektträger	75 x 25 x 1 mm; SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser; vorgereinigt	ThermoFisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	10149870
Trockenschrank	Dry-Line® DR 53	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	-
Deckglas	24 x 32 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda- Königshofen, Deutschland	0101172
Dampfgarer	FS 20	Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Deutschland	-
Pap-Pen	ImmEdge Hydrophobic Barrier Pap Pen	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA	H-4000
Mikrowelle	Koenic KMW 2221 B; 700 Watt	KOENIC; Imtron GmbH, Ingolstadt, Deutschland	-
Mikroskop	Lichtmikroskop; Olympus BX43	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland	-
Mikroskopkamera	Olympus XC30	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland	-
Analysesoftware	Olympus cellSens	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland	-

Tabelle 9: verwendete Substanzen und Chemikalien:

Bezeichnung	Details	Hersteller	Produktnr.
Paraffin	Schmelzpunkt 54/56 °C; Pelletform	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland	17932A
Xylol	C ₈ H ₁₀ ; >98 % rein; Isomerenmischung	ZCHL UdS, Saarbrücken, Deutschland	-
Ethanol	C ₂ H ₅ OH; vergällt mit 1 % MEK (Methylethylketon)	ZCHL UdS, Saarbrücken, Deutschland	-
Aqua dest. (= destilliertes Wasser)	Milli-Q® Wasseraufbereitungs- system	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	-
Einschlussmittel	Roti® Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	6638.2
Mayers Häkalaun	Häkalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T865.2

Eosin	Eosin G-Lösung 0,5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	X883.2
Essigsäure	CH ₃ COOH; 100 %; Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O; Salz der Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	106448
Tris-Säure	TRIZMA [®] HCl; Tris- (hydroxymethyl)amino- methanhydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	T3253
Tris-Base	TRIZMA [®] Base; Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	T1503
Tween [®] 20	Polysorbat 20; Detergens zur Verhinderung unspezifischer Bindung	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	
Methanol	CH ₃ OH	ZCHL UdS, Saarbrücken, Deutschland	-
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	107209
ABC-Kit	Vectastain [®] Elite (Rabbit IgG); enthält: NS <i>goat</i> , biotinylierter Antikörper <i>goat anti-rabbit</i> IgG, Reagenz A, Reagenz B	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA	PK-6101
Avidin/Biotin Blocking-Kit	enthält: Avidin D, Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA	SP-2001
anti-GFAP Antikörper	Primärantikörper; <i>rabbit polyclonal</i>	Abcam plc, Cambridge, UK	ab16997
VIP Peroxidase-Kit	Vector [®] VIP Substrate Kit; enthält: Reagenz 1-4	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA	SK-4600
anti-Iba1 Antikörper	Primärantikörper; <i>rabbit polyclonal</i>	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan	019-19741
DAB-Kit	enthält: Puffer-Stammlsg., DAB-Stammlsg., Nickel-Lsg., H ₂ O ₂ -Lsg.	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA	SK-4100

5.8.1 allgemeine Prozeduren

Zur Vorbereitung auf die unter **5.8.2** und **5.8.3** aufgeführten Färbeverfahren wurden die Schnitte immer durch die folgenden Schritte entparaffiniert und rehydriert:

- Abschmelzen im Trockenschrank bei 60 °C (30 min)
- Entparaffinieren in Xylol (3x für 5 min)
- Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe
 - 100 % Ethanol (2x für 5 min)
 - 96 % Ethanol (1x für 5 min)
 - 70 % Ethanol (1x für 3 min)
- Spülen in Aqua dest. (1x für 5 min)

Im Anschluss an die unter **5.8.2** und **5.8.3** aufgeführten Färbeverfahren wurden die Schnitte immer durch die folgenden Schritte wieder entwässert und unter einem Deckglas fixiert:

- Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
 - 70 % Ethanol (2 min)
 - 96 % Ethanol (2 min)
 - 100 % Ethanol (2x für 2 min)
- Spülen in Xylol (2x für 2 min)
- Eindecken mit einem Tropfen Einschlussmittel und Deckglas

5.8.2 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Mayer

Als eine Standardfärbung der Gewebsschnitte wurde die HE-Färbung nach Mayer gewählt (basierend auf Paul Mayer, 1891-1893^[78]). Sie diente in erster Linie als Übersichtsfärbung, z. B. zur besseren anatomischen Orientierung und Beurteilung der Morphologie.

Hämatoxylin (ohne Eosin) wurde darüber hinaus als Gegenfärbung für die Immunhistochemie (siehe **5.8.3**) verwendet. Bei der HE-Färbung werden die basophilen Zellkerne durch Hämatoxylin – bzw. eigentlich durch dessen Oxidationsprodukt, das Hämatein – blau angefärbt und das eosinophile Zytoplasma durch das Eosin rot.

Das Verfahren wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- (Entparaffinieren & Rehydrieren wie unter **5.8.1**)
- Färben in Mayers Hämalaun (15 min)
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser (10 min)
- kurz spülen in Aqua dest.
- gegenfärben mit 0,5 % Eosin + 1 Tropfen Essigsäure
- kurz spülen in Aqua dest.
- (Dehydrieren & Eindecken wie unter **5.8.1**)

5.8.3 Immunhistochemie

Für die Identifikation und gezielte Darstellung **aktivierter Astrozyten (a)** und **aktivierter Mikroglia (b)** wurde ein in unserem Institut etabliertes und regelmäßig verwendetes Färbeprotokoll angewendet. Es basiert auf einem indirekten immunhistochemischen Verfahren, das die Zielstrukturen über sogenannte Avidin-Biotin-Komplexe (ABC) darstellbar macht und daher ABC-Methode genannt wird. Nach Demaskierung des zu detektierenden Antigens bindet der hochspezifische Primärantikörper an die Zielstruktur. Im Anschluss wird zunächst ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt, der an den Primärantikörper bindet und dann ein Komplex aus Avidin und Meerrettichperoxidase, der durch die hohe Bindungsaffinität von Biotin zu Avidin stabil an den Sekundärantikörper bindet. Die Markierung der Zielstruktur gelingt schließlich durch die enzymatische Umsetzung eines Peroxidase-Substrats wie z. B. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem farbigen Produkt. (Guesdon *et al.*, 1979^[42]; Hsu *et al.*, 1981^[47]) Zuletzt erfolgte jeweils noch eine Kernfärbung mittels Hämatoxylin wie unter **5.8.2** beschrieben.

Als Zielstrukturen wurden **GFAP (a)** bzw. **Iba1 (b)** gewählt.

Zuvor wurden folgende Lösungen separat angesetzt:

Citratpuffer (pH 6):

Stammlösung:

- 29,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 900 ml Aqua dest. lösen
- pH mit Natriumhydroxid (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) auf 6,0 einstellen
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Gebrauchslösung:

- Stammlösung mit Aqua dest. 1:10 verdünnen

Tris-Puffer (pH 7,5):

Stammlösung:

- 63,5 g Tris-Säure + 11,8 g Tris-Base in 1 l Aqua dest. auflösen

Gebrauchslösung:

- 15 g NaCl in 100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua dest. auflösen
 - für Antikörperverdünnung einige Milliliter separat abfüllen
 - für Spüllösung zusätzlich 1 ml Tween® 20 hinzugeben

(a) GFAP-Färbung:

Protokoll für 10 Objektträger

- (Entparaffinieren & Rehydrieren wie unter **5.8.1**)
- Antigendemaskierung im Dampfgarer
 - 200 ml Citratpuffer
 - Küvette mit Puffer & Objektträgern für 20 min im Wasserdampf lassen
 - 20 min abkühlen lassen
- Spülen in Tris-Puffer (5 min)
- Blockade der endogenen Peroxidase (20 min)
 - 198 ml Methanol + 2 ml Wasserstoffperoxid
- Spülen in Tris-Puffer (2x für 5 min)
- Schnitte vorsichtig abtrocknen und Präparat mit Pap-Pen umfahren
- Objektträger in feuchte Kammer mit Aqua dest. legen
- Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit NS-*goat* für 30 min bei Raumtemperatur
 - 25 µl NS-*goat* + 500 µl Tris-Puffer + 2 Tropfen Avidin
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- NS-*goat* ablaufen lassen, nicht spülen
- anti-GFAP Primärantikörper (*rabbit*) über Nacht bei 4 °C
 - 5 µl anti-GFAP + 500 µl Tris + 2 Tropfen Biotin
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- Spülen in Tris-Puffer (2x für 5 min)
- Sekundärantikörper (*goat anti-rabbit*) für 1 h bei Raumtemperatur
 - 2,5 µl Antikörper + 25 µl NS-*goat* + 500 µl Tris
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- Detektion mit ABC-Reagenz für 20 min
 - Lösung 30 min zuvor ansetzen: 10 µl Reag. A + 10 µl Reag. B + 500 µl Tris
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- Markierung mit VIP Peroxidase-Kit (20 min bei Raumtemperatur)
 - 1,7 ml Tris + je 1 Tropfen der Reagenzen 1-4
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- kurz spülen in Aqua dest.
- Kernfärbung mit Hämatoxylin (2 min)
- mit Leitungswasser bläuen (5-10 min)
- kurz spülen in Aqua dest.
- (Dehydrieren & Eindecken wie unter **5.8.1**)

(b) Iba1-Färbung:

Für die Iba1-Färbung wurde das unter (a) beschriebene Protokoll mit einigen Anpassungen verwendet, die in diversen Probedurchläufen im Vorfeld ermittelt wurden. Diese sind nachfolgend aufgeführt:

Protokoll für 10 Objektträger

- (...)
- Erhitzen des Citratpuffers auf ca. 95 °C in einer handelsüblichen Mikrowelle
 - 3 min auf Stufe „high“
- anschließend Antigendemaskierung im Dampfgarer wie oben beschrieben
- (...)
- Verzicht auf die Zugabe von Avidin bei „Blockade unspezifischer Bindungsstellen“
- anti-Iba1 Primärantikörper (*rabbit*) über Nacht bei 4 °C
 - 1 µl anti-Iba1 + 500 µl Tris
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- (...)
- Markierung mit DAB-Kit (5 min bei Raumtemperatur)
 - 2,5 ml Aqua dest. + 2 Tropfen DAB-Stammlösung + 1 Tropfen H₂O₂-Lösung
 - davon je 50 µl pro Objektträger
- (...)

Auswertung:

Nachdem die gefärbten und eingedeckten Schnitte mindestens über Nacht trocknen konnten wurden sie lichtmikroskopisch betrachtet. Über eine am Mikroskop angebrachte Kamera und das Computerprogramm *cellSens* (Version 1.17, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) konnten digitale Aufnahmen der mikroskopierten Präparate angefertigt und gespeichert werden.

Es erfolgte eine qualitative Evaluation der Morphologie bei allen Präparaten hinsichtlich der Gewebsreaktion auf OP-Trauma und Implantat; insb. an der Implantat-Gewebe-Grenze.

Von den **GFAP**-Präparaten wurden mit dem 20x-Objektiv 1-3 Aufnahmen gemacht um die gesamte Läsion abbilden zu können. Mit dem Programm *ImageJ* (Version 1.53, siehe **5.6.1**) wurde die angefärbte Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche des Gewebspräparates bestimmt – das heißt, die Fläche von Bildanteilen die kein Gewebe enthielten wurde zuvor abgezogen. Zudem wurde jedem Präparat ein Score von 0 bis 4 (siehe **Tabelle 10**) zugewiesen, der das Ausmaß der Astrogliose bemisst.

Bei den **Iba1**-Präparaten wurden auf der operierten Seite 1-3 Bilder sowie auf der Gegenseite ebenfalls ein Bild mit dem 10x-Objektiv aufgenommen. Mit *ImageJ* wurden die angefärbten Zellen gezählt sowie die Gesamtfläche des Gewebes im Bildausschnitt

ausgemessen um so einen Wert für angefärbte Mikrogliazellen pro mm² Gewebsfläche zu erhalten. Der Wert der operierten Seite wurden immer mit der kontralateralen Seite verglichen um einen aussagekräftigen Wert für die vermehrte Aktivierung und Rekrutierung der Mikroglia zu erhalten.

Die Auswertung der Präparate erfolgte verblindet, da den Versuchstieren und daraus resultierend auch den Gewebsschnitten fortlaufende Versuchsnummern zugewiesen wurden die keine Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit ermöglichten.

Score	Definition
0	keine/nur sehr vereinzelt GFAP+ Zellen oder Fortsätze; nur schwach angefärbt
1	vereinzelt GFAP+ Zellen oder Fortsätze; deutlich angefärbt; keine Überlappung
2	vermehrt deutlich angefärbte sich teils überlappende GFAP+ Zellen und Fortsätze; schmale Glianarbe (< 33 µm)
3	wie 2; deutlichere Glianarbe (33 µm < X < 67 µm)
4	Wie 2; starke Glianarbe (> 67 µm)

Tabelle 10: Scoring-Kriterien zur Einteilung der Gliose in den GFAP-Präparaten; modifiziert nach Brandis *et al.* (1998)^[12]; Oertel *et al.* (2004)^[91]

5.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit dem Programm *SigmaPlot* (Version 11.0; Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Es wurden stets Mittelwert (MW) ± SEM angegeben. Die Gruppen wurden einer Prüfung auf Normalverteilung sowie Homogenität der Varianz unterzogen. Im Anschluss erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA) um Unterschiede zwischen den Gruppen zu bestimmen. Für den direkten Gruppenvergleich wurde ein entsprechender post-hoc-Test (Bonferroni-Test) mit Korrektur des α -Fehlers durchgeführt. Sollten die Daten die geforderten Kriterien, wie z. B. Normalverteilung oder ein metrischen Skalenniveau, nicht erfüllen so wurde auf andere geeignete statistische Tests, wie z. B. Rangsummentests, zurückgegriffen.

Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 0,05$ festgelegt, somit wurde bei $p < 0,05$ eine statistische Signifikanz angenommen.

6 Ergebnisse

Teil 1: Darstellung des Prototyps im MRT

6.1 Untersuchung des Prototyps im Mikro-CT

Die Darstellung des Aneurysmaclips aus CF-PEEK im Mikro-CT mit einer Auflösung von circa 6 μm Pixelgröße verlief gänzlich artefaktfrei. Die Auswertung der Bildgebung bestätigte den Eindruck aus vorangegangenen Versuchen, dass bei einer Windungszahl des Federelements von 1,5 einzelne Faserbrüche und eine erhöhte Oberflächenrauheit zu finden sind. Die Clipbranchen selbst zeigten eine gute Oberflächenbeschaffenheit.

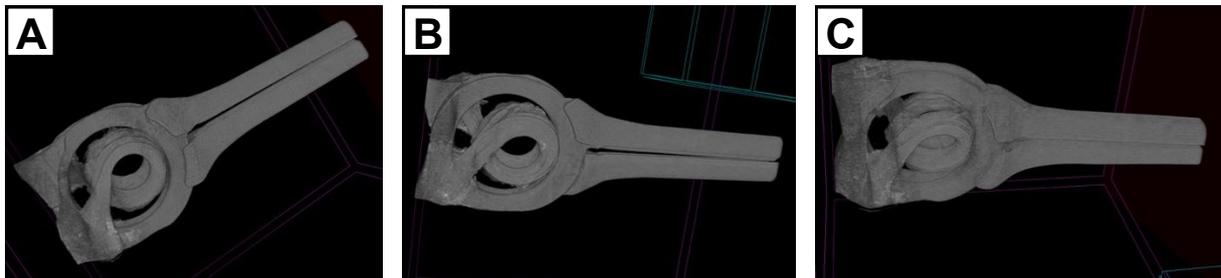


Abbildung 10: Mikro-CT-Aufnahmen des Clip-Prototyps aus CF-PEEK

Mehrere Perspektiven; Ansicht von rechts (A), von links (B), von schräg links oben (C)

6.1.2 Artefaktausdehnung im MRT (Phantom)

Auch in der MRT ließ sich der CF-PEEK-Clip in allen angewendeten Sequenzen vollständig artefaktfrei darstellen. Details wie die Windungen des Federanteils oder kleinste Lufteinschlüsse an der Oberfläche waren problemlos erkennbar. Beim Titanclip hingegen kam es erwartungsgemäß zur Bildung deutlicher Suszeptibilitätsartefakte, die es unmöglich machten Details am und um den Clip herum zu erkennen. Dies stellt eine statistisch signifikante Verringerung der Suszeptibilitätsartefakte im Vergleich des neuartigen zum konventionellen Clip aus Titan dar.

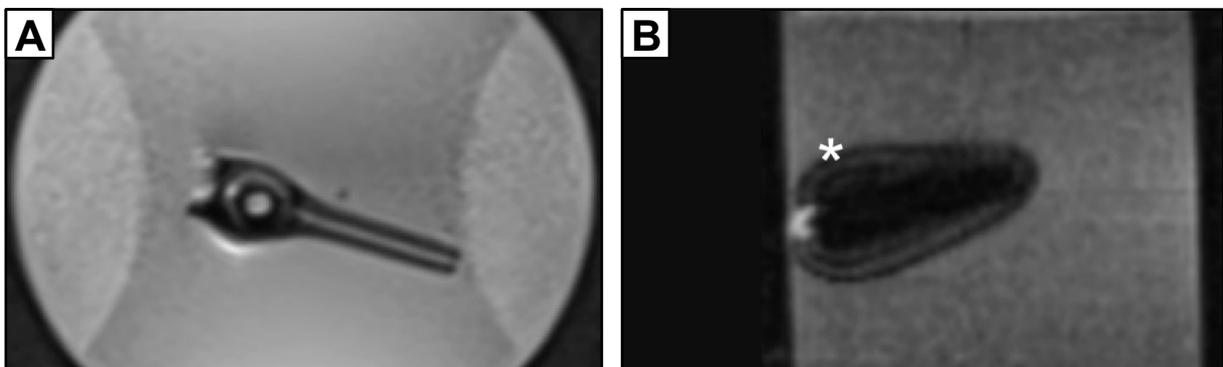


Abbildung 11: Artefaktbildung im Phantomkörper (MRT-Aufnahmen)

MRT-Aufnahmen des Clip-Prototyps aus CF-PEEK (A) sowie eines herkömmlichen Titanclips (B); signifikant größere Suszeptibilitätsartefakte beim Titanclip; * = $p < 0,05$ (Senger *et al.*, 2023^[116])

6.1.3 Gefäßbeurteilbarkeit im Tiermodell

Bei der quantitativen Auswertung der Artefaktausbreitung des Titanclips *in vivo* zeigte sich eine mittlere Artefaktlänge von $2,8 \pm 0,16$ cm und -breite von $1,09 \pm 0,10$ cm. Bei dem verwendeten CF-PEEK-Clip war nur in einem Fall ein geringfügiges Artefakt (Länge: 0,07 cm, Breite: 0,06 cm) feststellbar; dieses war am ehesten auf Lufteingüsse oder intraoperative Oberflächenverunreinigungen zurückzuführen. Die Kontrollgruppen (Ligatur und *sham*-OP) wiesen keine messbaren Artefakte auf.

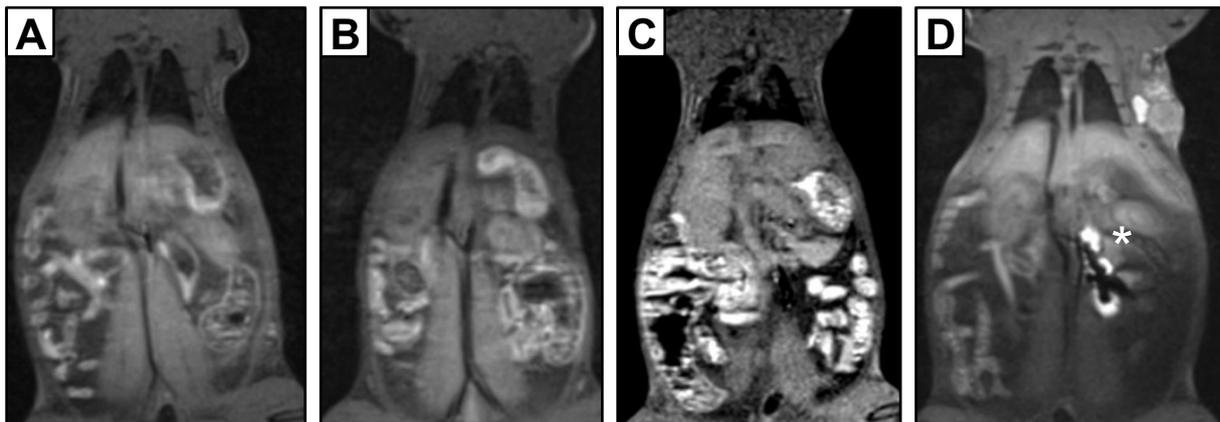


Abbildung 12: Artefaktbildung im Rattenmodell (MRT-Aufnahmen)

Coronare T1 3D SPACE MRT-Bilder nach Verschluss der linken *A. renalis* am Abgang von der Aorta; *sham*-OP (A), Verschluss mit Ligatur (B), CF-PEEK-Clip (C) bzw. Titanclip (D); signifikant größere Suszeptibilitätsartefakte beim Titanclip; * = $p < 0,05$ (Senger *et al.*, 2023^[116])

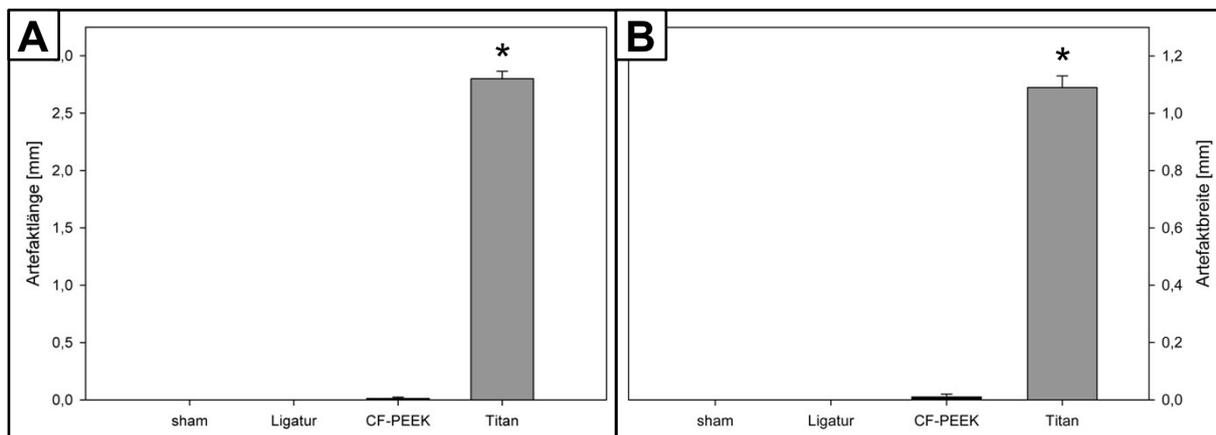


Abbildung 13: Artefaktbildung im Rattenmodell (quantitative Auswertung)

Quantitative Darstellung der Artefaktlänge (A) und -breite (B) bei Untersuchung in der MRT nach Verschluss der linken *A. renalis* am Abgang der Aorta; *sham*-OP, Verschluss mit Ligatur, CF-PEEK-Clip (schwarzer Balken) bzw. Titanclip (dunkelgrauer Balken); MW \pm SEM; signifikant größere Suszeptibilitätsartefakte beim Titanclip; * = $p < 0,05$; $n = 6$ (Senger *et al.*, 2023^[116])

Die qualitative Auswertung der Gefäßbeurteilbarkeit ergab in beiden Kontrollgruppen sowie beim CF-PEEK-Clip in 100 % der Fälle eine gute Beurteilbarkeit sowohl des Gefäßverschlusses der Nierenarterie als auch des Gefäßverlaufs der Bauchaorta. Beim konventionellen Clip aus Titan war dies dagegen artefaktbedingt bei keinem der sechs Tiere möglich. Der neuartige metallfreie Clip erzielte hier somit ein signifikant besseres Ergebnis.

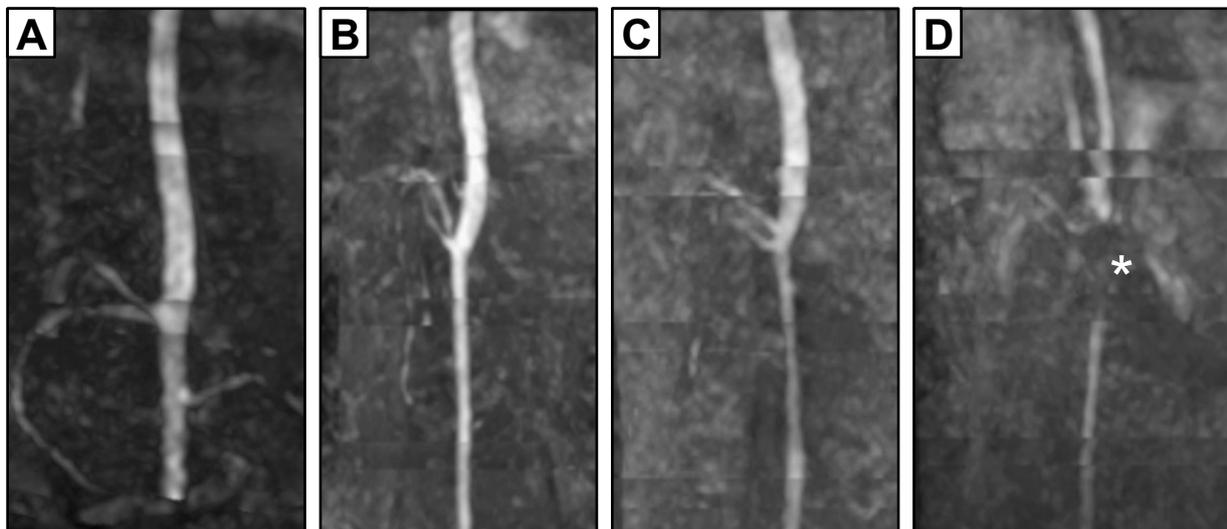


Abbildung 14: Gefäßbeurteilbarkeit im Rattenmodell (MRT-Aufnahmen)

TOF-MRA Darstellung der arteriellen Bauchgefäße nach Verschluss der linken *A. renalis* am Abgang von der Aorta; sham-OP (A), Verschluss mit Ligatur (B), CF-PEEK-Clip (C) bzw. Titanclip (D); * = Auslöschung durch Suszeptibilitätsartefakte (Senger *et al.*, 2023^[116])

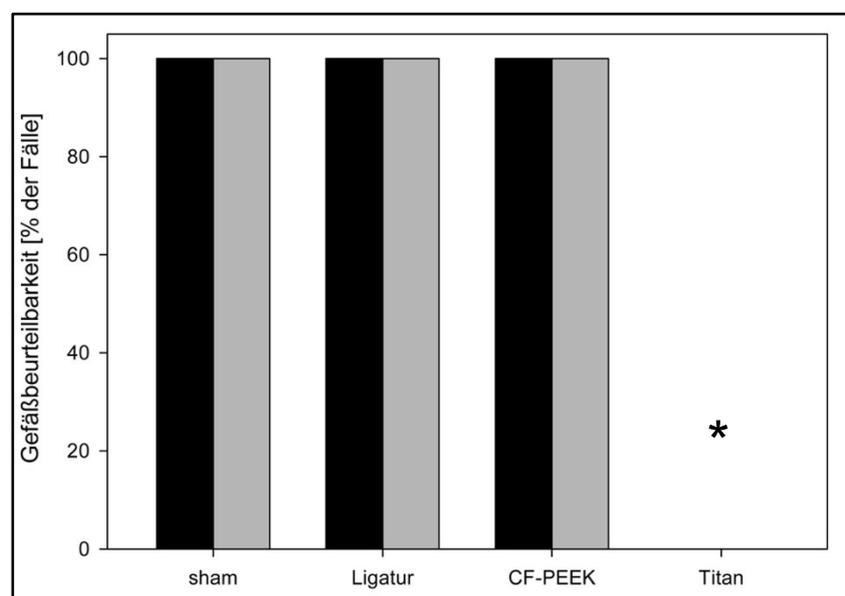


Abbildung 15: Gefäßbeurteilbarkeit im Rattenmodell (quantitative Auswertung)

Beurteilbarkeit (qualitativ; ja/nein) des erfolgreichen Verschlusses der linken *A. renalis* am Abgang von der Aorta (schwarzer Balken) und des angrenzenden Gefäßverlaufes der *Aorta abdominalis* (grauer Balken) in der MR-Angiographie; sham-OP, Verschluss mit Ligatur, CF-PEEK-Clip bzw. Titanclip; ausgezeichnete Beurteilbarkeit in den Kontrollgruppen sowie beim CF-PEEK-Clip; signifikant schlechtere Beurteilbarkeit beim Titanclip; * = $p < 0,05$; $n = 6$ (Senger *et al.*, 2023^[116])

Teil 2: Biokompatibilität von CF-PEEK bei Kontakt zum Gehirn

6.2 Zellbiologische Versuche

6.2.1 HA-Zellen

Bei der Auswertung der Zellproliferation der Astrozytenkulturen in der unmittelbaren Peripherie der verschiedenen Werkstoffe war gruppenübergreifend ein ungebremses exponentielles Zellwachstum ersichtlich. An Tag 7 fand sich in allen Gruppen ein dichter Zellrasen. In 13/20 Kulturen (4/5 [Kontrolle], 3/5 [PEEK, CF-PEEK, Titan]) konnten auf Grund der Zelldichte und Zellüberlappungen im FOV der ausgewerteten Digitalaufnahme die Zellen nicht genau ausgezählt werden, weshalb hier zur besseren Vergleichbarkeit ein Wert von 150 Zellen pro FOV angenommen wurde. Beim Vergleich der Mittelwerte \pm SEM ($145,2 \pm 4,8$ vs. $138,02 \pm 7,67$ vs. $140,43 \pm 5,46$ vs. $134,26 \pm 10,11$) lag dieser in der Kontrollgruppe am höchsten und in der Titan-Gruppe am niedrigsten, jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Insgesamt fanden sich auch an den vorangegangenen Tagen keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl. Die Variabilität innerhalb der Gruppen stellte sich ausgeprägter dar als die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Gruppen.

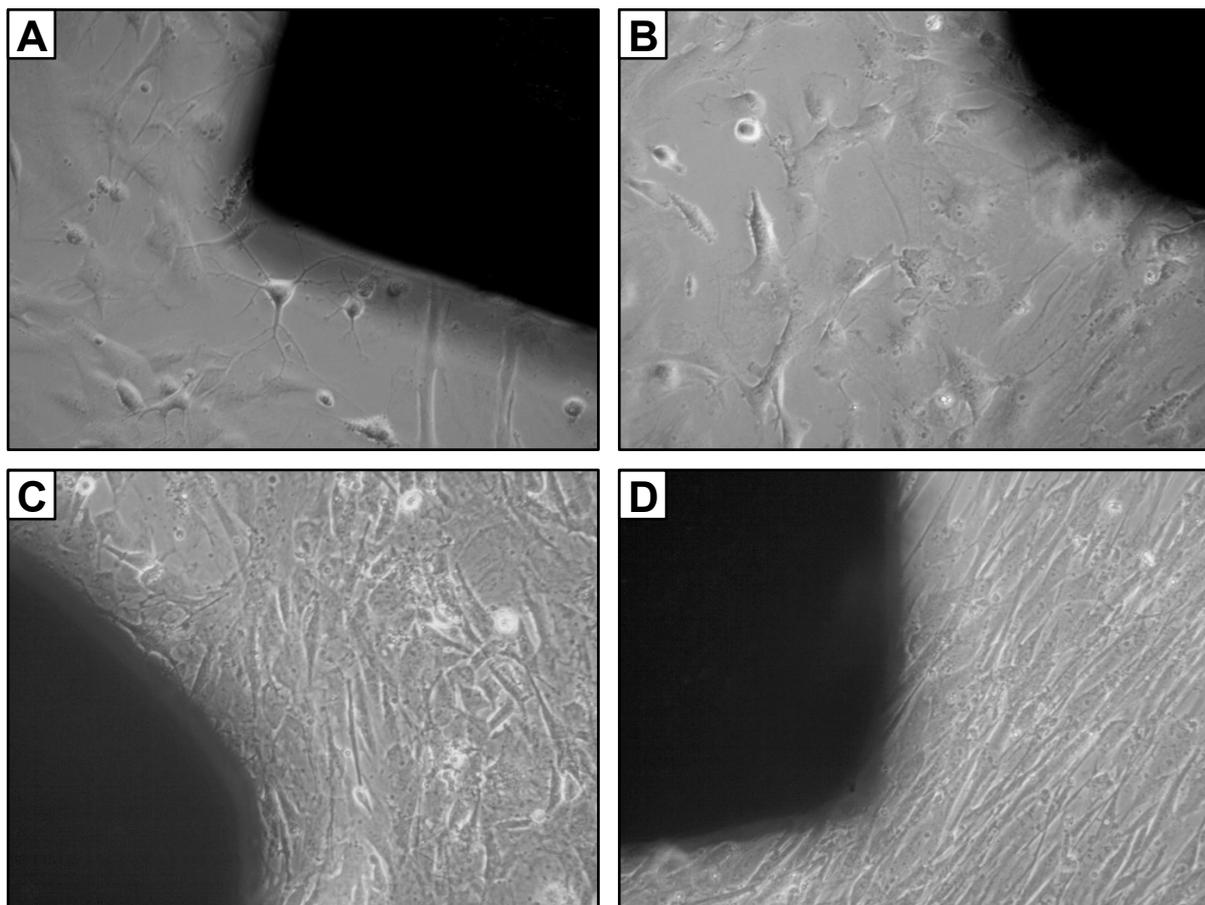


Abbildung 16: Wachstumsverlauf der HA-Zellkulturen

Repräsentative Beispielbilder von Zellkulturen humaner Astrozyten (HA) in Anwesenheit eines Testplättchens; Beobachtung nach 2 (A), 3 (B), 6 (C) bzw. 7 (D) Tagen; dichter Zellrasen nach 7 Tagen; Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung (Senger *et al.*, 2023^[116])

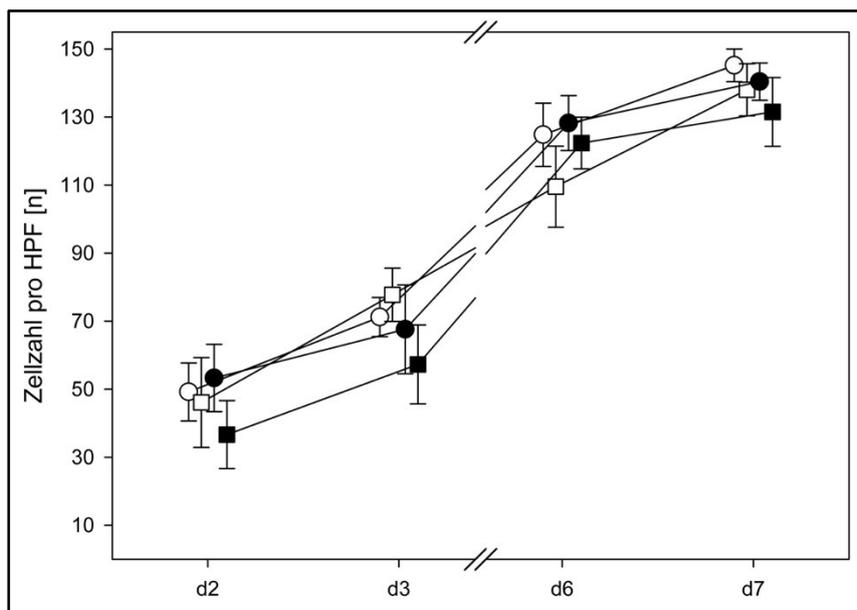


Abbildung 17: Wachstumsverlauf der HA-Zellkulturen (quantitative Auswertung)

Quantitative Darstellung der durchschnittlichen Zellzahl pro FOV in der Peripherie eines in der Kulturflasche platzierten Testplättchens im zeitlichen Verlauf; Kontrollgruppe (weißer Kreis), Testplättchen aus PEEK (weißes Quadrat), CF-PEEK (schwarzer Kreis) bzw. Titan (schwarzes Quadrat); MW \pm SEM; keine statistisch signifikanten Unterschiede (Senger *et al.*, 2023^[116])

6.2.2 PC12-Zellen

Bei der Auswertung des Neuritenwachstums in den PC12-Zellkulturen in der unmittelbaren Peripherie der verschiedenen Werkstoffe nach 7 Tagen war in der überwiegenden Mehrheit der Aufnahmen (91 %) zumindest ein geringes Neuritenwachstum festzustellen.

Es fanden sich in aller Regel Trauben vieler Zellen, von denen – sofern es überhaupt dazu gekommen ist – nur die äußeren Zellen Neuriten ausgebildet hatten. In vielen Kulturen bestand auch direkter Kontakt von Zellen und/oder Neuriten zum Testplättchen in der Kultur.

Die durchschnittliche Neuritenlänge pro FOV (MW \pm SEM in μm) an Tag 7 lag bei $147,75 \pm 16,06$ vs. $169,98 \pm 24,50$ vs. $191,16 \pm 27,29$ vs. $165,79 \pm 41,68$. Insbesondere beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der CF-PEEK-Gruppe konnte hierbei ein deutlicher Unterschied festgestellt werden; dieser erwies sich mit $p = 0,859$ in der ANOVA (Vergleich aller Gruppen) und $p = 0,361$ beim Vergleich der beiden Gruppen mittels t-Test jedoch nicht als statistisch signifikant. Insgesamt lag also in keiner der Gruppen eine signifikant höhere bzw. geringere Ausprägung der Neuriten im Vergleich zu den anderen vor.

Auch hier erwies sich die Variabilität innerhalb der Gruppen als ausgeprägter als die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Gruppen.

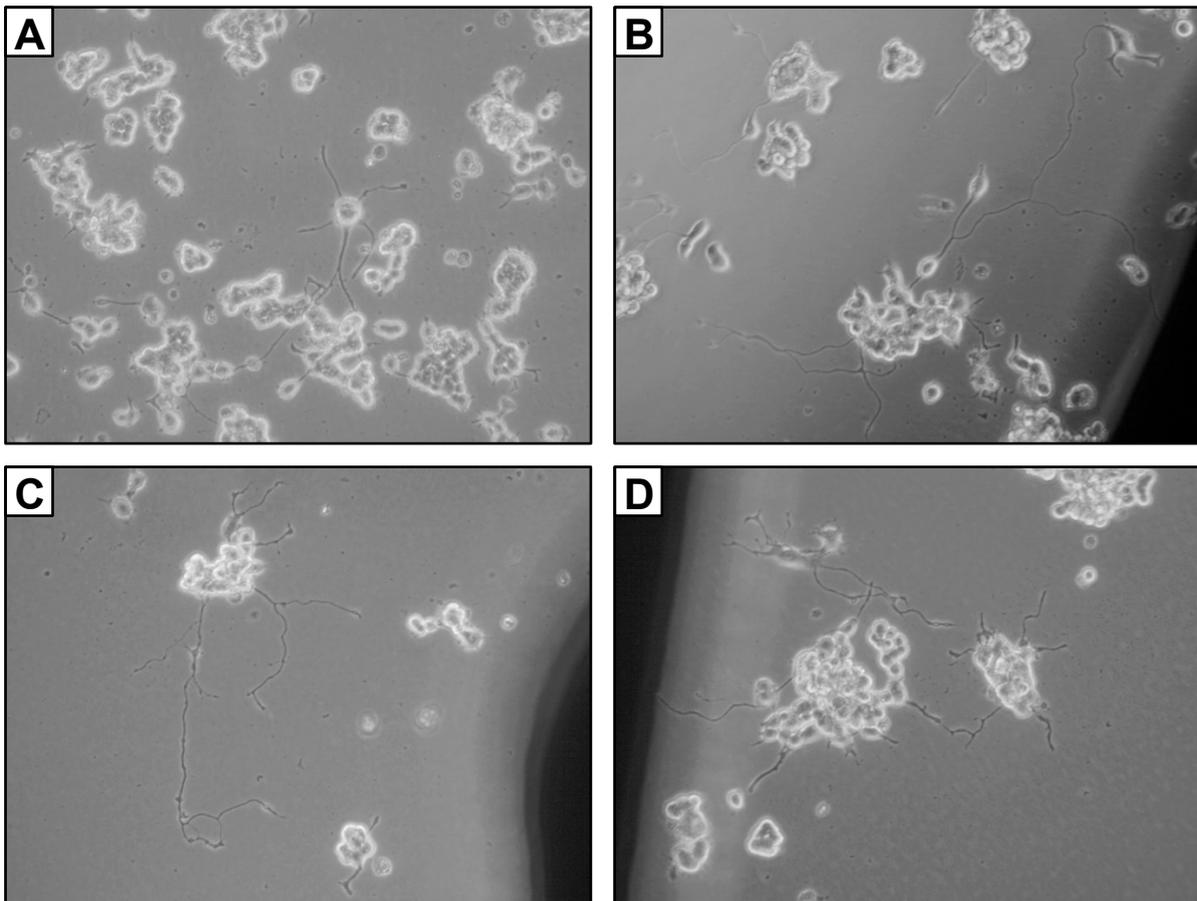


Abbildung 18: Neuritenlänge PC12-Zellen d7

Beispielbilder von ausgeprägtem Neuritenwachstum der PC12-Zellen an Tag 7; Kontrollgruppe (A), Testplättchen aus PEEK (B), CF-PEEK (C) bzw. Titan (D); Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung (Senger *et al.*, 2023^[116])

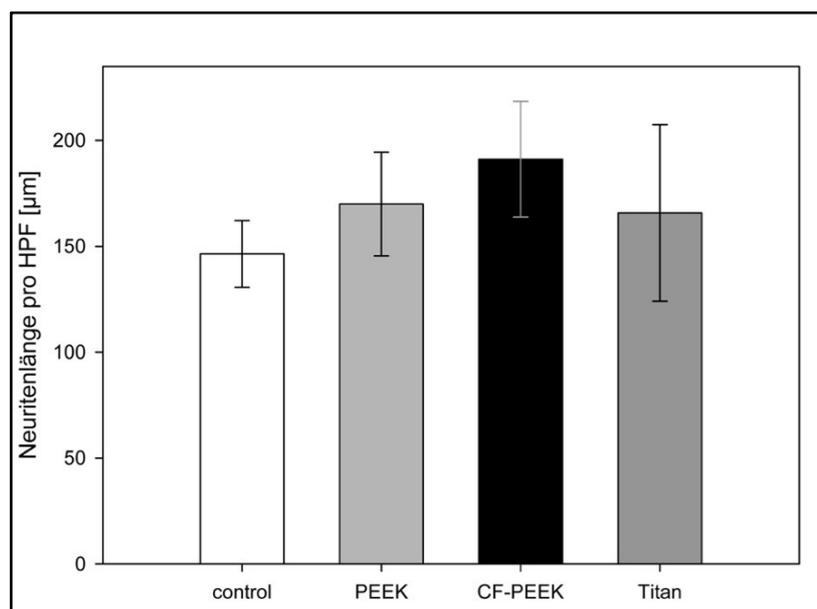


Abbildung 19: Neuritenlänge PC12-Zellen d7 (quantitative Auswertung)

Quantitative Darstellung der durchschnittlichen Neuritenlänge pro FOV in der Peripherie eines in der Kulturflasche platzierten Testplättchens nach 7 Tagen; Kontrollgruppe (weißer Balken), Testplättchen aus PEEK (hellgrauer Balken), CF-PEEK (schwarzer Balken) bzw. Titan (dunkelgrauer Balken); MW ± SEM; keine statistisch signifikanten Unterschiede

6.3 Biokompatibilität im Tiermodell

6.3.1 Ergebnisse der Nachbeobachtungen

Alle Versuchstiere überlebten den vollen Versuchszeitraum (28 Tage post OP) und zeigten in dieser Zeit keine Anzeichen von Schmerzen oder Stress die eine vorzeitige Euthanasierung notwendig gemacht hätten. Somit konnten Daten aller 20 Versuchstiere in die nachfolgenden Ausführungen und Berechnungen miteinbezogen werden.

Die Veränderung des Körpergewichts über den Beobachtungszeitraum stellte sich in allen Gruppen ähnlich dar. Zum Zeitpunkt der 1. Messung, die drei Tage nach der Kraniotomie und Implantation des jeweiligen Werkstoffs stattfand, wiesen alle Versuchstiere ein geringeres Körpergewicht als vor dem Eingriff auf. Dieser Gewichtsverlust egalisierte sich bei der überwiegenden Zahl der Tiere (17/20) spätestens bis zur Messung an Tag 21; ebenso war dies im Mittel in allen Gruppen der Fall (MW \pm SEM prozentuale Gewichtszunahme an d21 im Vergleich zu d0: $3,57 \pm 1,78$ vs. $2,74 \pm 1,54$ vs. $2,58 \pm 1,40$ vs. $5,88 \pm 1,19$). Die Gewichtsabnahme überschritt bei keinem Tier einen Wert von 7 % des Ausgangsgewichts, stellte sich aber im gepaarten t-Test in allen Gruppen als statistisch signifikant dar. Beim Vergleich der Gruppen untereinander zeigte sich an keinem Untersuchungstag ein signifikanter Unterschied des Körpergewichts bzw. der Gewichtsveränderung. Die anschließende Gewichtszunahme nach d3 war in allen Gruppen stetig, am Ende des Beobachtungszeitraums lag das durchschnittliche Körpergewicht in allen Gruppen sogar deutlich über dem Ausgangsgewicht. Die Differenzen zwischen d10, d21 & d28 und d0 oder d3 wurden nicht auf ihre statistische Signifikanz überprüft.

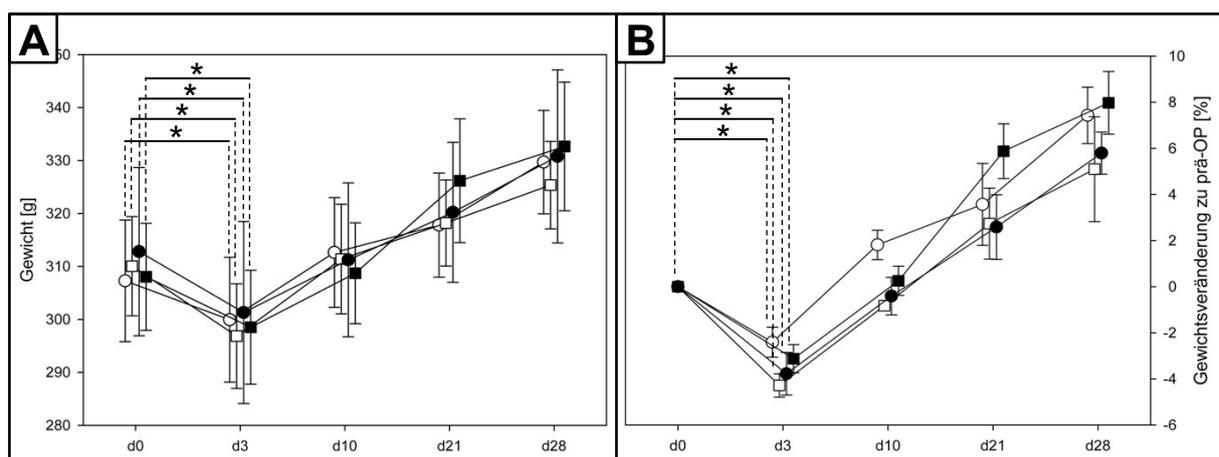


Abbildung 20: postoperativer Gewichtsverlauf

Quantitative Darstellung des durchschnittlichen KG der Versuchstiere (**A**) sowie der prozentualen Veränderung des KG (**B**) im zeitlichen Verlauf; Kontrollgruppe (weißer Kreis), Testplättchen aus PEEK (weißes Quadrat), CF-PEEK (schwarzer Kreis) bzw. Titan (schwarzes Quadrat); MW \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. d0 (Senger *et al.*, 2023^[116])

6.3.2 Ergebnisse der *beam-walk* Tests

Bereits während der Durchführung der *beam-walk* Tests war ein gewisser Gewöhnungs- bzw. Trainingseffekt festzustellen. Das heißt, die Tiere ließen sich bei späteren Durchläufen schneller zur Überquerung des Balkens animieren oder überquerten ihn spontan, was bei früheren Durchläufen eher nicht der Fall gewesen war. Auch stoppten sie seltener auf dem Balken und schafften – zumindest augenscheinlich – insgesamt schnellere Zeiten.

Dieser Eindruck bestätigte sich in der statistischen Ausarbeitung: Alle Gruppen wiesen an d10, d21 und d28 schnellere Durchschnittszeiten auf als an d0 und d3. Diese Differenz war in der Kontrollgruppe zwar nur sehr gering (d10 vs. d0: -0,03 s; d21 vs. d0: -0,34 s; d28 vs. d0: -0,23 s), allerdings wies die Kontrollgruppe an d0 von allen Gruppen auch die schnellste Zeit auf. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich aber lediglich in allen Interventionsgruppen, und zwar beim Vergleich d0 vs. d28; in der Titan-Gruppe sogar bei den Vergleichen d0 vs. d10/d21/d28 und d3 vs. d10/d21/d28.

Bei den Messungen drei Tage nach der OP (d3) zeigten sich im Vergleich zu unmittelbar vor der OP (d0) folgende Unterschiede zwischen den Gruppen: Die durchschnittlichen Zeiten der Kontrollgruppe sowie der Titan-Gruppe waren höher als zuvor, die der PEEK- und CF-PEEK-Gruppe dagegen niedriger. Diese Unterschiede erwiesen sich allerdings nicht als statistisch signifikant. Die Durchschnittszeit der Titan-Gruppe zeigte darüber hinaus von d3 zu d10 eine deutliche Verbesserung, diese erwies sich als einzige der Vergleiche dieser beiden Untersuchungstage auch als statistisch signifikant ($p = 0,018$).

Die ANOVA konnte für keinen Messtag signifikante Unterschiede der Gruppen zueinander bestätigen.

Insgesamt lagen die Mittelwerte aller Gruppen an allen Untersuchungstagen mit Werten zwischen 1,92 s und 2,98 s recht eng beieinander. Die Zeiten der Einzelmessungen hingegen schwankten zum Teil erheblich: Die schnellste Einzelmessung lag bei 1,13 s (Titan-Gruppe, d21) die langsamste betrug 7,4 s (Titan-Gruppe, d3).

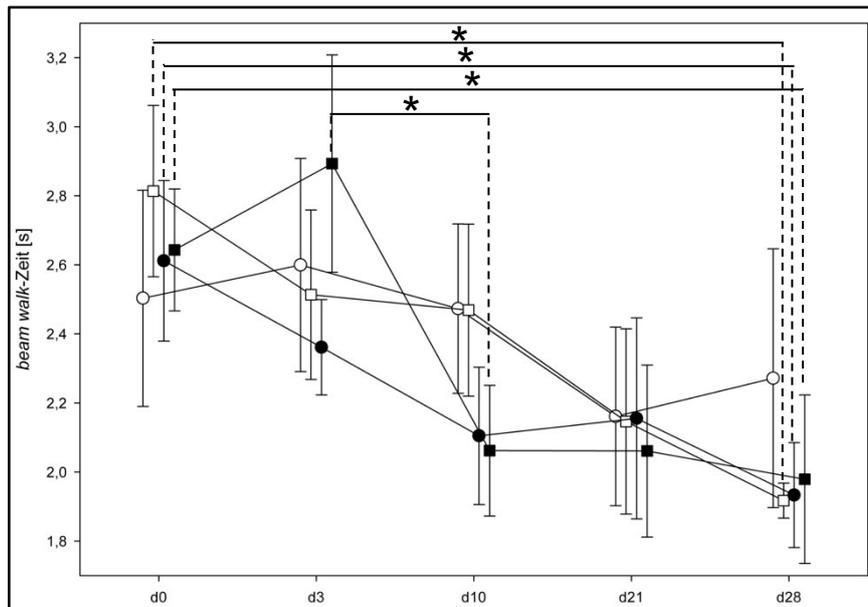


Abbildung 21: beam-walk Zeit an verschiedenen Messtagen

Quantitative Darstellung der durchschnittlichen Zeit der Versuchstiere für die Überquerung des *beam-walk*; Kontrollgruppe (weißer Kreis), implantiertes Testplättchen aus PEEK (weißes Quadrat), CF-PEEK (schwarzer Kreis) bzw. Titan (schwarzes Quadrat); MW \pm SEM; * = $p < 0,05$; zusätzlich (nicht eingezeichnet) $p < 0,05$ in Titan-Gruppe bei d0 vs. d10/d21, d3 vs. d10/d21/d28 (tabellarisch in Senger *et al.*, 2023^[116])

In **Abbildung 22** sind quantitativ die Anzahl der *foot slips* (**A**) bzw. schweren *foot slips* (**B**) graphisch dargestellt, die durchschnittlich pro Durchlauf auftraten. Ein Wert von 0,2 bedeutet also beispielsweise, dass rechnerisch bei jeder fünften Überquerung des Holzbalkens ein solcher Fehltritt auftrat. Die Durchschnittswerte eines Messtages der einzelnen Tiere lagen zwischen 0 und 0,6 *foot slips* pro Durchlauf, die Durchschnittswerte (MW \pm SEM) der Gruppen bei $0,04 \pm 0,04$ bis $0,32 \pm 0,05$. Schwere *foot slips* traten erwartungsgemäß seltener auf, hier lagen die Durchschnittswerte bei 0 bis 0,4 pro Versuchstier und -tag bzw. zwischen 0 und $0,16 \pm 0,07$ pro Gruppe und Versuchstag.

Am dritten Tag nach der OP wiesen alle Gruppen die größten Häufigkeiten auf (MW \pm SEM: $0,2 \pm 0,06$ vs. $0,24 \pm 0,04$ vs. $0,16 \pm 0,04$ vs. $0,32 \pm 0,05$), allerdings waren diese Werte bei zwei Gruppen (PEEK & CF-PEEK) identisch mit anderen Messtagen. Auch ergab lediglich der Vergleich von Titan d3 mit Titan d28 eine statistisch signifikante Differenz ($p = 0,042$).

Schwere *foot slips* scheinen vor der OP sogar häufiger aufzutreten als danach, allerdings zeigen die gewonnenen Daten hier generell eine eher ungeordnete und zufällige Verteilung. So traten z. B. in der PEEK-Gruppe an d3, d10 und d21 gar keine schweren *foot slips* auf, dafür an d28 am häufigsten sowohl innerhalb der PEEK-Gruppe als auch von allen Gruppen an diesem Tag. Insgesamt zeigten sich bei dieser Betrachtung auch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

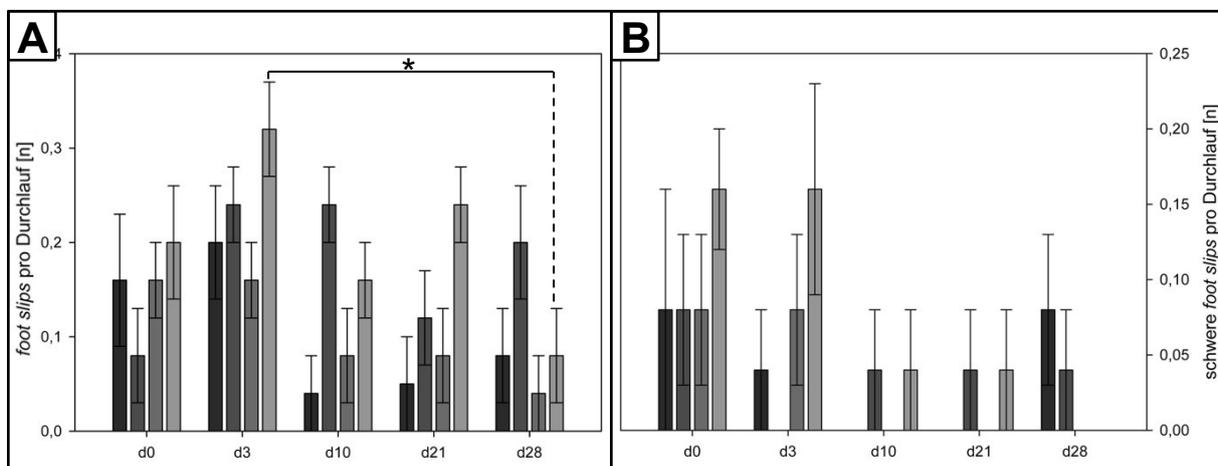


Abbildung 22: *foot slips* pro Durchlauf

Quantitative Darstellung der durchschnittlichen *foot slips* (**A**) bzw. schweren *foot slips* (**B**) beim Überqueren des *beam-walk*; Kontrollgruppe (sehr dunkler Balken), implantiertes Testplättchen aus PEEK (dunkelgrauer Balken), CF-PEEK (grauer Balken) bzw. Titan (hellgrauer Balken); MW \pm SEM; * = $p < 0,05$ (tabellarisch in Senger *et al.*, 2023^[116])

6.3.3 Qualitative morphologische Auswertung

Bei der Entnahme des Gehirns wurde die *Dura mater* nicht erhalten, daher ist sie in den Präparaten nicht vorhanden und konnte nicht mitbeurteilt werden. In der Regel befand sich das implantierte Probestück nach Entnahme des Gehirns noch *in situ* (**Abb. 23 A**), in wenigen Fällen war es allerdings fest mit der Schädelkalotte verbunden und verblieb bei Eröffnung des Schädels und Entfernung des Knochens an selbigem.

Nach Entnahme des Gehirns *in toto* wurde die Cortexoberfläche zunächst makroskopisch begutachtet. Hierbei zeigten sich keine Rötungen oder andere Zeichen einer möglichen Entzündung. Auch eine Atrophie oder eine Gewebeschädigung über die Impression durch das Probestück hinaus war nicht erkennbar. (**Abb. 23 B**)

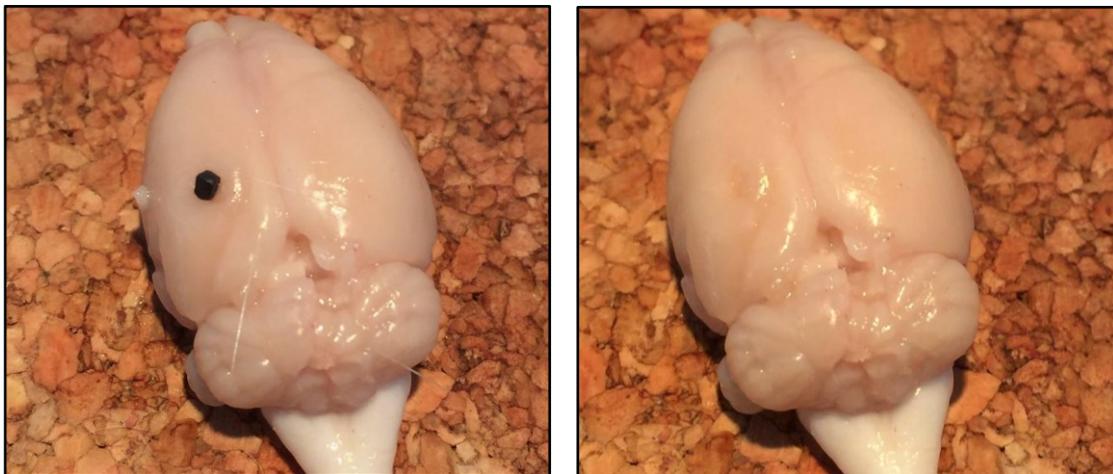


Abbildung 23: Rattenhirn nach Entnahme *in toto*

Riechkolben, Groß-, Mittel- & Kleinhirn, *Pons*, *Medulla oblongata* sowie kraniale Anteile des Rückenmarks; **A**: Probestück aus PEEK *in situ*; **B**: Zustand nach Entfernung des Probestücks; keine Zeichen einer Inflammation

In den mikroskopisch untersuchten Gewebsschnitten war in den Versuchsgruppen die Impression der *Leptomeninges* (bestehend aus *Arachnoidea mater* und *Pia mater*) und des darunter liegenden Cortexgewebes durch das Probestück deutlich zu erkennen. Zum Teil zeigte sich auch eine darüber hinausgehende geringe Schädigung des superfiziellen Cortexgewebes, am wahrscheinlichsten verursacht bei der Implantation. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass diese Läsionen auch bei der Präparation des Gehirns oder der Entfernung des Probestücks verursacht worden sein könnten. Die in den Präparaten zu erkennenden Anteile der *Arachnoidea* zeigte sich in einigen Fällen etwas verdickt. Das an das Implantat angrenzende Cortexgewebe war geringgradig ödematös aufgelockert. In der Immunhistochemie zeigte sich hier auch ein teils mehr teils weniger stark ausgeprägter Bereich aus aktivierten Astrozyten, der sich augenscheinlich proportional zum Ausmaß der Gewebeschädigung verhielt. Die Nervenzellen erschienen insgesamt nicht geschädigt, es fand sich allenfalls eine nur gering ausgeprägte perineurale Vakuolisierung.

Auffällige Demyelinisierung oder Neuroapoptose war nicht festzustellen. (Abb. 24 A-D)

In den Präparaten der Kontrollgruppe fanden sich lediglich diskrete äußerst superfiziell im Cortex lokalisierte Bereiche aktivierter Astrozyten sowie in wenigen Fällen Anteile verdickter *Arachnoidea*. (Abb. 24 E-F)

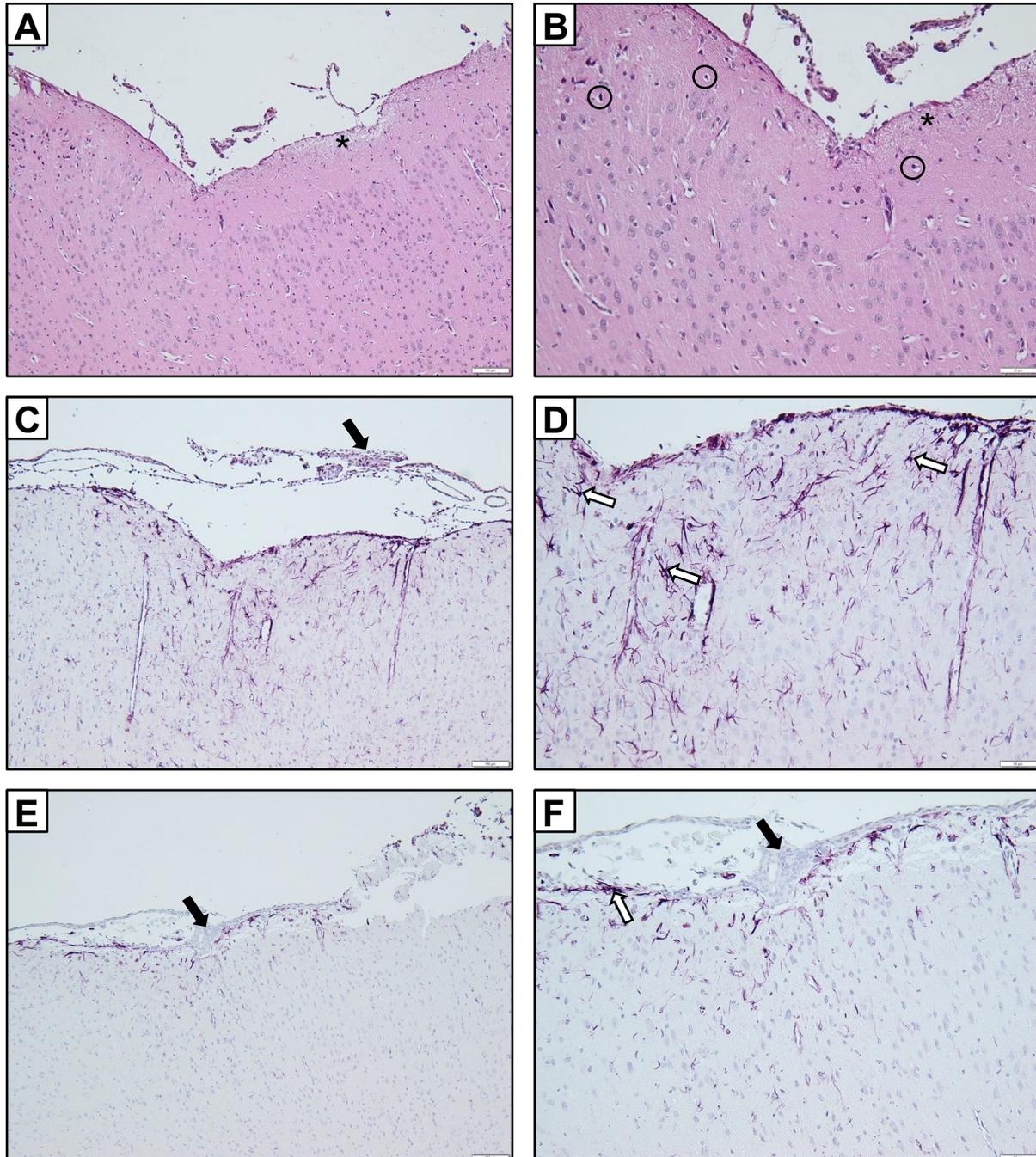


Abbildung 24: Beispielbilder Histomorphologie

Rattencortex Transversalschnitte; 100x- (A,C,E) bzw. 200x-Vergrößerung (B,D,F); A,B: HE-Färbung, Versuchsgruppe; C,D: GFAP-Immunhistochemie, Versuchsgruppe; E,F: GFAP-Immunhistochemie, Kontrollgruppe; ödematöses Gewebe (Stern), minimale perineurale Vakuolisierung (Kreis), aktivierte Astrozyten (weiße Pfeile), verdickte *Arachnoidea* (schwarze Pfeile)

Die beschriebenen Veränderungen fanden sich ausschließlich in der ipsilateralen Hemisphäre und waren auch dort auf die Umgebung der Implantatstelle begrenzt.

Während der Ausarbeitung der in den folgenden Abschnitten näher erläuterten Ergebnisse zeigte sich, dass es bei einem Tier aus der PEEK-Gruppe zu einem nicht unerheblich größeren Trauma bei der Implantation des Werkstoffs kam, wodurch die Gesamtergebnisse dieser Gruppe bei der mikroskopischen Auswertung verfälscht würden. Aus diesem Grund wurde entschieden dieses Tier bei der Präsentation der Daten und statistischen Auswertung nicht weiter zu berücksichtigen.

6.3.4 Immunhistochemie: GFAP

Bei Betrachtung der GFAP-Expression zeigte sich, dass die immunhistochemisch angefärbte Fläche in allen Versuchsgruppen größer ausfiel als in der Kontrollgruppe (MW \pm SEM [in %]: 4,91 \pm 0,74; 3,74 \pm 0,63; 3,82 \pm 0,79 vs. 2,27 \pm 0,45). Diese Differenz erwies sich in der ANOVA allerdings als nicht statistisch signifikant ($p = 0,090$). Auch zwischen den Versuchsgruppen untereinander bestanden keine relevanten Unterschiede.

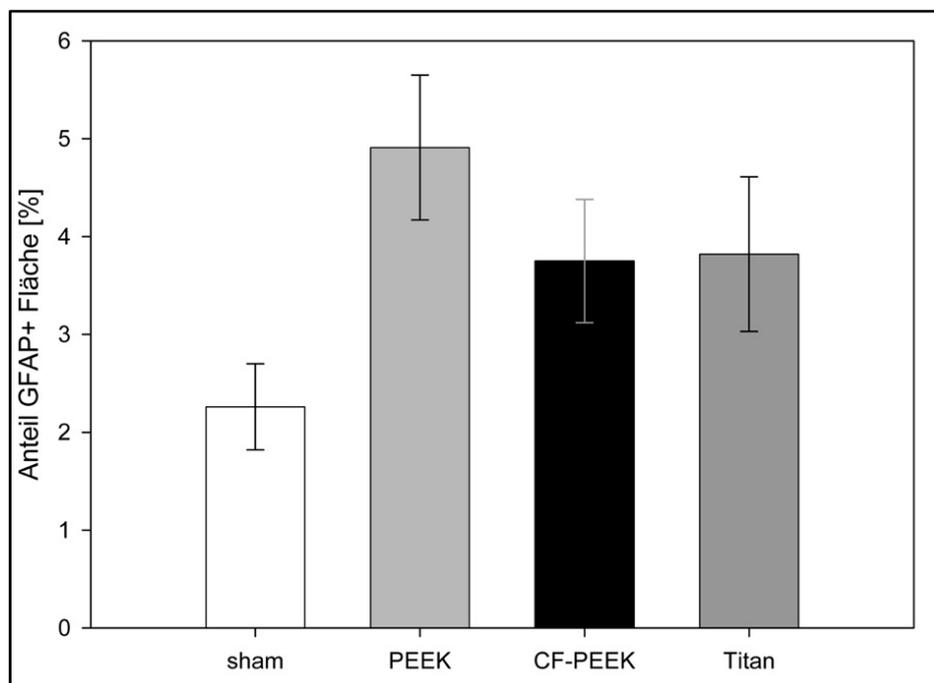


Abbildung 25: GFAP+ Fläche

Quantitative Darstellung des Anteils der immunhistochemisch angefärbten GFAP-positiven Fläche an der Gesamtfläche im FOV in Prozent; Kontrollgruppe (weißer Balken), PEEK-Gruppe (hellgrauer Balken), CF-PEEK-Gruppe (schwarzer Balken), Titan-Gruppe (dunkelgrauer Balken); MW \pm SEM; keine statistisch signifikanten Unterschiede (Senger *et al.*, 2023^[16])

Die den jeweiligen Präparaten zugeordneten Scores sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Der Eindruck, dass die Scores in den Versuchsgruppen höher ausfielen als in der Kontrollgruppe, konnte durch den Kruskal-Wallis-Test (ein der ANOVA ähnlicher statistischer Test für nicht normalverteilte mindestens ordinalskalierte Daten) bestätigt werden: Für die Vergleiche aller Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe war $p \leq 0,001$.

Gruppe	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
sham	28 % (7/25)	60 % (15/25)	12 % (3/25)	0 % (0/25)	0 % (0/25)
PEEK	0 % (0/20)	30 % (6/20)	30 % (6/20)	30 % (6/20)	10 % (2/20)
CF-PEEK	0 % (0/25)	48 % (12/25)	36 % (9/25)	12 % (3/25)	4 % (1/25)
Titan	8 % (2/25)	40 % (10/25)	28 % (7/25)	16 % (4/25)	8 % (2/25)

Tabelle 11: Score-Ergebnisse der GFAP-Präparate

Astrogliose (durch Score repräsentiert) in allen Testgruppen signifikant stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe; jeweils $p \leq 0,001$

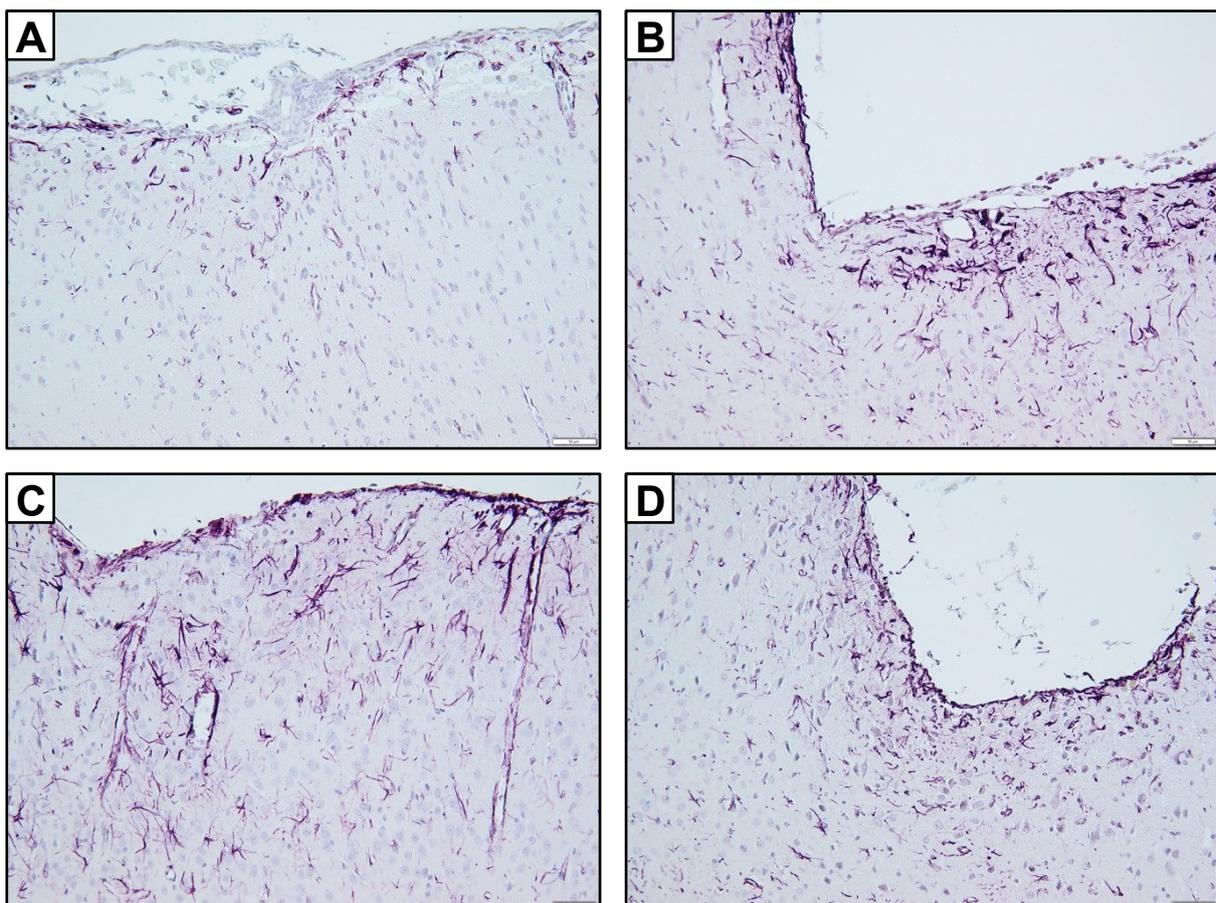


Abbildung 26: Beispielbilder GFAP-Färbung

Repräsentative Beispielbilder der GFAP-Immunhistochemie; 200fache-Vergrößerung; Rattencortex Transversalschnitte; Kontrollgruppe (A), PEEK-Gruppe (B), CF-PEEK-Gruppe (C), Titan-Gruppe (D)

6.3.5 Immunhistochemie: Iba1

Nach durchgeführter Immunhistochemie zeigten sich in den Präparaten unter dem Mikroskop deutlich angefärbte Mikrogliazellen mit verdicktem Soma und sternförmig verzweigten Fortsätzen. Diese fanden sich zahlreich in beiden Hirnhemisphären, allerdings in Anzahl, Dichte und Ausprägung auf der ipsilateralen, operierten Seite tendenziell vermehrt.

Bei Betrachtung der Anzahl der durch Bindung an Iba1 immunhistochemisch gefärbten Immunzellen zeigte sich, dass in allen Gruppen die durchschnittliche Zellzahl auf der ipsilateralen Seite in der direkten Peripherie der Läsion höher war als im selben Areal der kontralateralen Hemisphäre. In den Versuchsgruppen war dies in allen ausgewerteten Präparaten der Fall, in der Kontrollgruppe dagegen nur bei 74 % der Präparate.

Beim Vergleich der Mittelwerte (MW \pm SEM [in %]: 118,89 \pm 8,01 vs. 190,24 \pm 13,91 vs. 187,00 \pm 15,51 vs. 167,46 \pm 8,55) erwies sich der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der PEEK- sowie CF-PEEK-Gruppe mit $p = 0,005$ als statistisch signifikant. Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Titan-Gruppe wurde das geforderte Signifikanzniveau mit $p = 0,055$ knapp nicht erreicht. Die Mittelwerte der drei Versuchsgruppen unterschieden sich untereinander kaum, hier zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz.

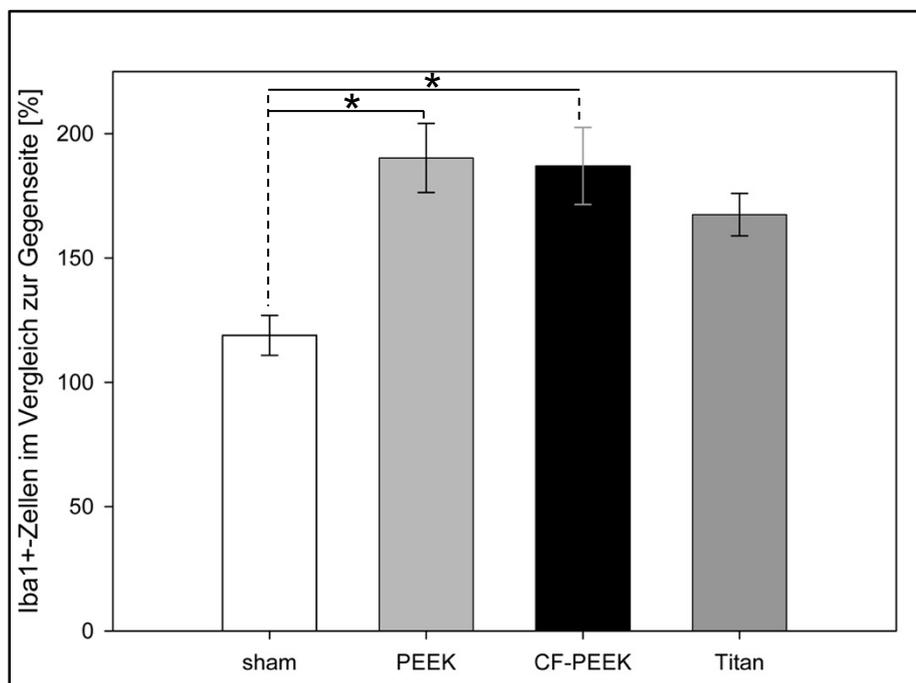


Abbildung 27: Iba1+ Zellzahl

Quantitative Darstellung der Anzahl der immunhistochemisch angefärbten Iba1-positiven Zellen verglichen mit der kontralateralen Hemisphäre in Prozent; Kontrollgruppe (weißer Balken), PEEK-Gruppe (hellgrauer Balken), CF-PEEK-Gruppe (schwarzer Balken), Titan-Gruppe (dunkelgrauer Balken); MW \pm SEM; * = $p < 0,05$

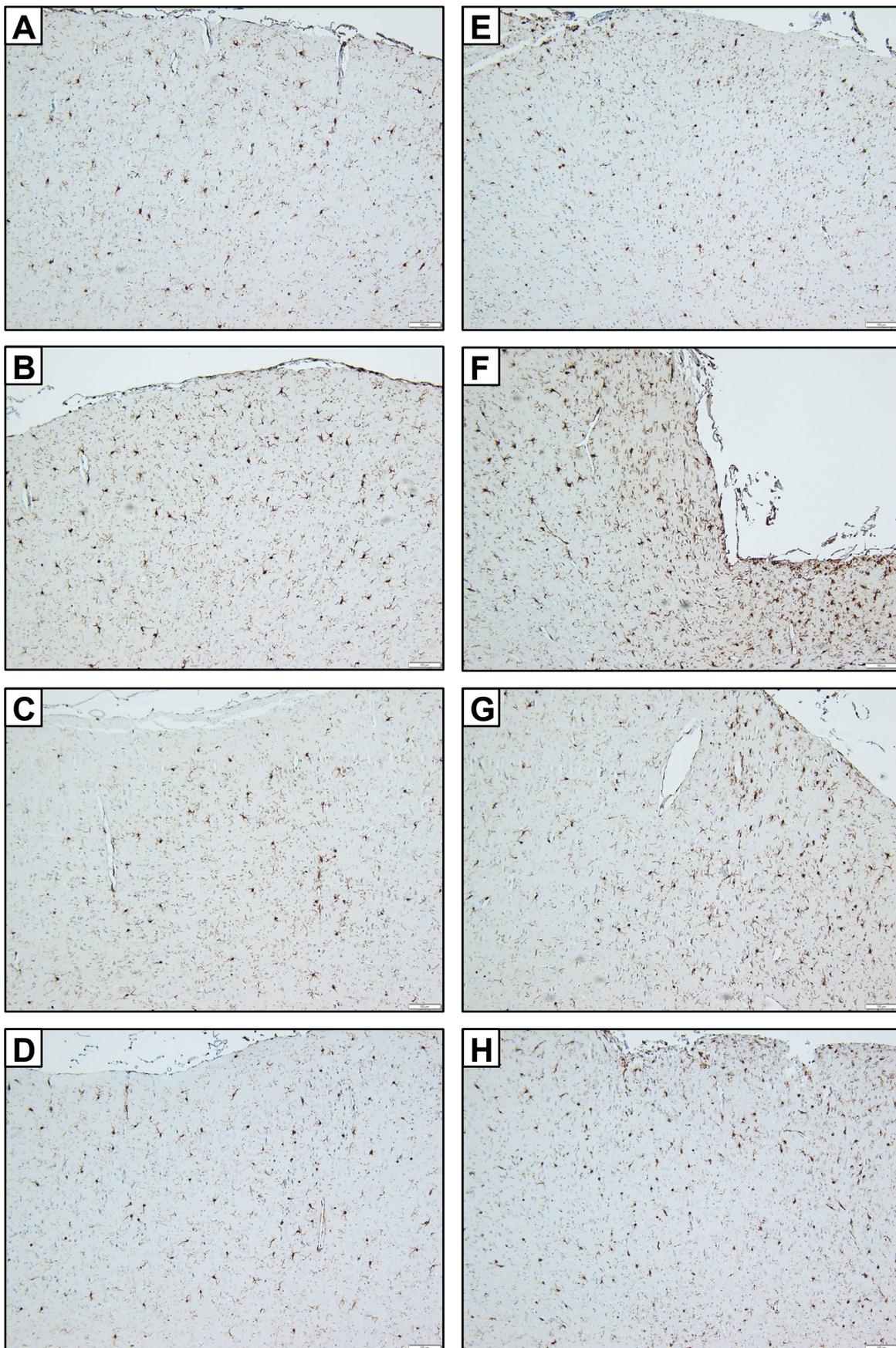


Abbildung 28: Beispielfotografien der Iba1-Färbung

Repräsentative Beispielfotografien der Iba1-Immunhistochemie; 100fache-Vergrößerung; Rattencortex Transversalschnitte; **A-D**: kontralaterale Seite; **E-H**: ipsilaterale Seite; Kontrollgruppe (**A,E**), PEEK-Gruppe (**B,F**), CF-PEEK-Gruppe (**C,G**), Titan-Gruppe (**D,H**)

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Teil 1

Der neuartige Clip-Prototyp aus CF-PEEK ließ sich sowohl im Phantom als auch *in vivo* im Rattenmodell in der MRT und MRA vollständig artefaktfrei darstellen. Dadurch erwies sich die Beurteilbarkeit sowohl des geclippten Gefäßes als auch der umgebenden Strukturen als ausgezeichnet. Diese Ergebnisse stellen eine deutliche Verbesserung zum konventionellen Clip aus Titan dar, dessen Verwendung mit deutlicher Artefaktbildung und daher eingeschränkter Beurteilbarkeit einhergeht.

Teil 2

In den Zellkulturversuchen mit humanen Astrozyten zeigte sich in allen untersuchten Gruppen ein unbeeinträchtigt Zellwachstum; die Anwesenheit von CF-PEEK scheint keinen negativen Einfluss auf die Proliferation humaner Astrozyten auszuüben.

Auch bei den Versuchen mit PC12-Zellen als Modell von Neuronen ließen sich keine Hinweise auf negative Einflüsse durch CF-PEEK auf die Ausbildung der Neuriten feststellen. Tendenziell war das Wachstum in den PEEK- & CF-PEEK-Gruppen sogar ausgeprägter als in der Titan- und der Kontrollgruppe, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Alle Versuchstiere überlebten den operativen Eingriff und den 28 Tage andauernden posoperativen Beobachtungszeitraum ohne Zeichen von ausgeprägten Einschränkungen, Schmerzen oder Stress. Die postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere zeigte in allen Gruppen einen unauffälligen Verlauf mit einem signifikanten Gewichtsverlust in den ersten Tagen nach der OP und einer darauffolgenden stetigen Erholung und sogar Steigerung des Körpergewichts über den Ausgangswert hinaus.

Die Auswertung der *beam-walk* Zeiten zeigte lediglich, dass die Überquerung des Holzstegs den Versuchstieren an fortgeschrittenen Untersuchungstagen (insb. d28) im Durchschnitt schneller gelang als zu Beginn der Versuchsreihe (insb. d0), am ehesten auf Grund des Gewöhnungs- bzw. Lerneffektes auf die Aufgabe. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen fanden sich keine. Die Betrachtung der *foot slips* lieferte nur das tendenzielle Ergebnis, dass die Überquerung für die Versuchstiere an späteren Versuchstagen unproblematischer, d. h. mit weniger Fehlern verbunden, war als zu Beginn der Versuchsreihe und insb. unmittelbar post OP. Die Unterschiede zwischen den Versuchstagen und auch zwischen den Versuchsgruppen erwiesen sich aber auch hier als nicht statistisch signifikant.

Nach Entnahme des Gehirns zeigten sich makroskopisch keine Auffälligkeiten, die auf Inflammation oder weitreichende Gewebsschädigung hindeuten würden.

Mikroskopisch zeigten sich leichte lokale Gewebsschädigungen durch Eröffnung der Dura und Einsetzen des Implantats sowie zelluläre Fremdkörperreaktionen; in den Versuchsgruppen stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, aber ohne merkliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die Expression von GFAP war in den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar gesteigert, allerdings nicht statistisch signifikant. Die Bewertung der Astrogliose anhand eines histomorphologischen Scores zeigte hingegen signifikant höhere Scores in allen Versuchsgruppen – auch hier zeigte sich aber kein relevanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Anfärbung der Mikrogliazellen über Iba1 ergab in der PEEK- und CF-PEEK-Gruppe eine signifikant stärkere Ausprägung im Vergleich zur Kontrollgruppe, für die Titan-Gruppe konnte eine solche statistische Signifikanz nicht erreicht werden. Der Vergleich der Versuchsgruppen untereinander zeigte auch hier keinen signifikanten Unterschied.

Bei der Zusammenschau aller Ergebnisse von **Teil 2** waren insgesamt keine nennenswerten Unterschiede der Versuchsgruppen zu erkennen, insb. beim Vergleich der Ergebnisse von CF-PEEK und Titan.

7 Diskussion

7.1 Allgemeines zur Versuchsmethodik

Die Kombination aus Ketamin und Xylazin ist ein bei Tierversuchen in einer Vielzahl von Studien auch am Standort Homburg gut etabliertes Narkoseverfahren. Das Erreichen und die Erhaltung der Narkosetiefe ist durch bedarfsmäßige Bolusapplikationen gut steuerbar ohne dabei zusätzliches spezialisiertes Equipment zu erfordern wie es z. B. bei reiner Gasnarkose mit Isofluran notwendig wäre. Festgestellt wurde die ausreichende Sedierungstiefe durch das Ausfallen des Zwischenzehenreflexes (= Fußrückziehreflex). Negative Auswirkungen durch die Narkose konnten nicht festgestellt werden.

Die postoperative Analgesie durch parenterale Applikation eines Analgetikums während der Narkoseausleitung sowie peroraler Applikation über das Trinkwasser während der nächsten Tage sollte für das Tier eine möglichst stressfreie Schmerztherapie darstellen, da keine weiteren Injektionen oder sonstiges unnötiges Handling notwendig waren.

Um mögliche störende Einflussfaktoren zu vermeiden wurden alle Versuchstiere zum selben Zeitpunkt vom selben Händler erworben. Die Tiere wurden anschließend randomisiert den einzelnen Gruppen zugeordnet und ihnen eine Nummer zugewiesen die alleine keinen Rückschluss auf die Zugehörigkeit zur Gruppe zuließ um auch hier bei den nachfolgenden Untersuchungen keine Verzerrung durch den Untersucher zuzulassen. Somit konnten die Verhaltenstests sowie im Anschluss die Histologie verblindet durchgeführt werden.

Bei den Zellkulturen wurde ähnlich verfahren, auch ihnen wurde eine zufällige Nummer zugeordnet um später eine verblindete Auswertung zu ermöglichen.

Teil 1

7.2 Design des Prototyps

Während andere vergleichbare Arbeiten meist komplett neuartige Designs (Becker und Gurka, 2016^[8]; Cho *et al.*, 2018^[19]) entwickelten oder bei den herkömmlichen Clips ähnlichen Designentwürfen ein Federelement aus Metall verwendet wurde (Sutherland *et al.*, 2008^[122]), verkörpert unser Prototyp mit Branchen und einem Federelement aus CF-PEEK zum ersten mal einen komplett metallfreien Aneurysmaclip der ohne Probleme im Design etablierter Clips produziert werden kann. Dies war möglich durch das innovative Mikropultrusionsverfahren zur Herstellung verstärkter Faserverbundkunststoffe, das bei unserem Federelement Verwendung fand (Brack *et al.*, 2016^[11]). Daraus ergeben sich neben der Herstellung schließlich Vorteile in der praktischen Anwendung, da keine neuartigen Instrumente oder Verfahren entwickelt werden müssen und sich für den Chirurgen keine Umgewöhnung im Handling des Clips ergibt.

Die Mikro-CT-Aufnahmen zeigten eine insgesamt gute Verarbeitung des Prototyps. Festgestellte einzelne Faserbrüche und erhöhte Oberflächenrauheit des Federelements könnten zwar noch verbessert werden, liegen aber im Mikrometerbereich und sollten in der Praxis voraussichtlich keinen relevanten Effekt haben. In diesen Röntgenuntersuchungen traten darüber hinaus keinerlei Artefakte im Bereich des Clips auf. Die Oberflächenstruktur erwies sich als atraumatisch, wodurch das Risiko perioperativer Verletzungen durch den implantierten Clip an benachbarten Strukturen reduziert wird.

7.3 Bildgebung

Die MRT-Aufnahmen des Clip-Prototyps im Phantomkörper sollten einen ersten Eindruck liefern und die Ergebnisse später als Vergleichsmöglichkeit zum *in vivo* Versuch dienen. Das wassergefüllte Plastikgefäß simulierte hier mit einfachen Mitteln das Hirngewebe mit seinem hohen Wassergehalt.

Bei dieser Untersuchung konnten im Gegensatz zum Titanclip beim CF-PEEK-Clip keine Suszeptibilitätsartefakte festgestellt werden, was auf Grund der vollständigen Metallfreiheit auch den Erwartungen entsprach. Diese Beobachtungen decken sich u.a. auch mit einer Studie von Krätzig *et al.*, bei der die Artefaktbildung von Pedikelschrauben aus Titan- bzw. CF-PEEK in einem Agarosegelmmodell gemessen wurde (Krätzig *et al.*, 2021^[60]).

Den logischen nächsten Schritt stellte die Untersuchung *in vivo* im Tierversuch dar um Blutfluss im Gefäß, Atembewegungsartefakte und echtes Umgebungsgewebe als mögliche Störvariablen zu inkludieren. Als das zu clippende Blutgefäß wurde hierfür die linke Nierenarterie (*A. renalis*) der Ratte gewählt, da sie sich intraoperativ leicht identifizieren und gut präparieren lässt. Auch lässt sich das Gefäß gut mit dem vergleichsweise großen Clip

erreichen und bietet für die nachfolgende MR-Angiographie den Vorteil, dass sich weitere ähnlich große Gefäße (*Aorta abdominalis* & *Vena renalis*) in direkter Nähe befinden. Die Anatomie dieser Gefäße simuliert darüber hinaus gut den oftmals nahezu rechtwinkligen Abgang der von Aneurysmen betroffenen intrakraniellen Arterien.

Das positive Ergebnis der Phantom-Untersuchung ließ sich bestätigen: Auch *in vivo* waren beim CF-PEEK-Clip keine Suszeptibilitätsartefakte feststellbar. Der Clip war bildmorphologisch *in situ* eindeutig zu identifizieren und auch die Beurteilbarkeit des verschlossenen sowie der umliegenden Gefäße war exzellent – beim Titanclip war dies in unseren Versuchen dagegen unmöglich. Auch in einer ähnlichen Studie von Osterhoff *et al.* zeigten sich beim direkten Vergleich Implantate aus CF-PEEK jenen aus Titan hinsichtlich ihrer Darstellung in der MRT klar überlegen; es wurden jedoch lediglich Tierkadaver verwendet, weshalb Bewegungsartefakte und Gefäßpulsation als zusätzliche wichtige Faktoren in der klinischen Bildgebung dort fehlten (Osterhoff *et al.*, 2021^[94]). Die in der klinischen Praxis bereits regelmäßig erfolgende Anwendung von PEEK- und CF-PEEK-Implantaten z. B. in der orthopädischen und Wirbelsäurechirurgie sowie zahlreiche Studien zu diesem Thema können die exzellenten radiologischen Eigenschaften dieses Implantatmaterials ebenfalls bestätigen (Fleege *et al.*, 2020^[33]; Jung *et al.*, 2016^[50]; Ringel *et al.*, 2017^[107]; Zimel *et al.*, 2015^[146]). Insgesamt sind diese Beobachtungen auch logisch nachvollziehbar: Wenngleich Titan nicht ferromagnetisch ist, so besitzt es doch eine vergleichsweise hohe magnetische Suszeptibilität ($\chi > 0$), wodurch es im Magnetfeld des MRT zu lokalen Inhomogenitäten kommen kann, was in der Folge die beschriebenen Artefakte verursacht (Wichmann *et al.*, 1997^[136]). Kunststoffe wie CF-PEEK weisen dagegen – wie das umgebende Hirngewebe auch – eine magnetische Suszeptibilität von < 0 auf und verhalten sich daher im Magnetfeld des MRT anders und verursachen insbesondere keine bildverzerrenden Artefakte.

Vom Aspekt der magnetresonanztomographischen Bildgebung erwies sich der Prototyp aus CF-PEEK somit als ideal. Andere aktuelle Forschungsansätze wie z. B. Keramikclips, bei denen das Federelement allerdings aus Titan (Sutherland *et al.*, 2008^[122]) oder Polyurethan (Cho *et al.*, 2018^[19]) besteht oder Clips aus einer Legierung von Gold und Platin, das dem Hirngewebe sehr ähnliche Suszeptibilitätseigenschaften aufweist (Kodama *et al.*, 2017^[55]; Nakai *et al.*, 2022^[88]), konnten die Artefaktbildung zwar zum Teil deutlich reduzieren – ein so weit fortgeschrittener Ansatz eines komplett metall- und auch artefaktfreien Clips wie der in dieser Arbeit untersuchte ist uns aber bislang nicht bekannt.

Teil 2

7.4 Bisherige Forschung zur Biokompatibilität von PEEK

Bereits 1987 beschrieben Williams *et al.* die vielversprechenden Eigenschaften von PEEK für Anwendungen in der Medizin. Ihre ersten Experimente zur Biokompatibilität ergaben, dass in Muskelgewebe implantiertes PEEK nur eine minimale, wenn auch leicht prolongierte, Fremdkörperreaktion verursacht (Williams *et al.*, 1987^[139]). Heutzutage werden PEEK und CF-PEEK gemeinhin als bioinert betrachtet und gleichrangig neben Materialien wie Titan, Kobalt oder Zirkondioxid für diverse Implantate verwendet, meistens in Verbindung mit Knochen (Chen und Thouas, 2015^[17]; Geetha *et al.*, 2009^[36]; Najeeb *et al.*, 2016^[87]). Bioinert bedeutet hier, dass quasi kein Anwachsen von Zellen/keine Zelladhäsion stattfindet allerdings gleichsam keine Toxizität oder Behinderung des Zellwachstums im Umgebungsgewebe festzustellen ist. Während die im Vergleich zu Titan und anderen Metallen deutlich geringere Zelladhäsion an PEEK (Jung *et al.*, 2016^[50]) bei Implantaten mit Kontakt zum Knochen als erheblicher Nachteil gewertet werden kann, so hat dies auf die Eignung des Materials als Aneurysmaclip keine negativen Auswirkungen, da in diesem Fall ein besonders stabiles Anwachsen an das umliegende Gewebe nicht notwendig ist.

Bislang finden Implantate aus PEEK und CF-PEEK innerhalb des ZNS keine Verwendung. Auch waren uns vor Beginn dieses Projektes keine Studien bekannt, die die Biokompatibilität in diesem Zusammenhang näher untersuchten. Lediglich bei Kranioplastien sowie Wirbelsäulenoperationen und dadurch mit **äußerlichem** Kontakt zur *Dura Mater* wird PEEK regelmäßig mit Erfolg angewendet (Seaman *et al.*, 2017^[115]; Zhang *et al.*, 2019^[145]).

Experimentelle Studien zur epiduralen Anwendung zeigten chronische aseptische histiozytäre Entzündungen und moderate epidurale Fibrose bei großen Mengen PEEK oder CF-PEEK in Partikelform ohne schädlichen Einfluss auf das umliegende Binde- und Rückenmarksgewebe (Cunningham *et al.*, 2013^[20]; Hallab *et al.*, 2013^[44]). Die geschilderten Veränderungen waren mit der Zeit rückläufig aber nach 6 Monaten noch nachweisbar (ebd.). Der Anstieg der Makrophagen- und Zytokinaktivität fiel dabei in Cunninghams Studie in den nicht-metallischen Testgruppen – darunter PEEK – signifikant geringer aus als in den metallischen – darunter Titan (Cunningham *et al.*, 2013^[20]). Diese Applikation größerer Mengen mikropartikulären Pulvers bedeutet allerdings durch die sehr große Oberfläche eine erhebliche Reizung des Gewebes und entspricht in keiner Weise der zu erwartenden Realität beim Clipping. Daher entschieden wir uns dazu in unseren Versuchen die zu testenden Materialien als jeweils einen kompakten Körper zu verwenden.

Es ist uns darüber hinaus ein Fallreport aus China bekannt, bei dem es nach Kranioplastie mittels PEEK-Implantat bei einem siebenjährigen Kind zu einer abakteriellen, vermutlich allergischen epiduralen Ergussbildung kam (Qiu *et al.*, 2019^[104]); jedoch scheint es sich dabei nach aktueller Datenlage um einen seltenen Einzelfall zu handeln.

7.5 Zellkulturversuche

Zellkulturmodelle sind ein in der experimentellen Forschung lange und häufig genutztes Verfahren und liefern mitunter wichtige Erkenntnisse über die Einflüsse verschiedenster Stoffe und Prozesse auf die Zellen des ZNS (Abdulla und Campbell, 1993^[1]; Goshi *et al.*, 2020^[38]; Wiatrak *et al.*, 2020^[135]). Um zu untersuchen ob PEEK oder CF-PEEK einen schädigenden oder wachstumsmindernden Effekt auf Zellen in der Umgebung ausüben und das betroffene Gewebe dabei möglichst realitätsgetreu zu repräsentieren wurden Zellkulturen humaner Astrozyten als häufigster Zelltyp des ZNS (Kuchelmeister, 2012^[63]) sowie PC12-Zellen als Modell für Neuronen, die man auf Grund ihrer Funktion als wichtigsten Zelltyp des ZNS bezeichnen kann (Wiatrak *et al.*, 2020^[135]), ausgewählt. Die Messung der Neuritenausbildung stellte hierbei eine gute Methode zur Bewertung der Zellgesundheit durch einen komplexen physiologischen Prozess dar (Abdulla und Campbell, 1993^[1]), erwies sich aber bei der Auswertung als arbeitsintensiv und potentiell fehleranfällig, da manuell durchgeführt. Zu diskutieren wäre bei zukünftigen ähnlichen Experimenten die Wahl eines indirekten Messverfahrens, wie z. B. die Quantifizierung neuritenspezifischer Proteine durch ein ELISA (ebd.).

In Vorversuchen konnten mit den letztlich verwendeten Protokollen gute Wachstumsergebnisse erzielt werden. Auch in Anwesenheit der getesteten Materialien zeigten sich die Zellen in ihrer Proliferation und der Ausdifferenzierung von Neuriten nicht gehemmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied des Einflusses der Materialien untereinander und auch nicht zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Insbesondere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Titan- und der PEEK- bzw. CF-PEEK-Gruppe. Dies bekräftigt die vorherrschende Meinung zur hervorragenden Biokompatibilität all dieser Stoffe (Lawton *et al.*, 1996^[67]; Panayotov *et al.*, 2016^[95]), selbst bei direktem Kontakt zu Zellen des ZNS über einen längeren Zeitraum. Ein direkter Vergleich mit ähnlichen älteren Studien gestaltete sich schwierig, da zur Untersuchung der Biokompatibilität von Titan und PEEK selten Zellkulturen sondern vermehrt tierexperimentelle Modelle an Kaninchen und Ratten verwendet wurden (s. u.).

Die Ergebnisse dieses Versuchsteils liefern natürlich lediglich Teilaspekte zur Bewertung der cerebralen Biokompatibilität von PEEK und CF-PEEK und können durch weiterführende Studien ergänzt werden. Hierbei könnten z. B. komplexere Kulturen aus mehreren Zelltypen Verwendung finden um das Hirngewebe noch besser zu simulieren und insbesondere die Interaktionen der einzelnen Zelltypen untereinander in den Versuch zu inkludieren, da diese eine wichtige Rolle bei der Neuroinflammation spielen (Goshi *et al.*, 2020^[38]).

7.6 Rahmenbedingungen des Tiermodells

Zellkulturversuche alleine sind in ihrer Aussagekraft limitiert und können nur erste Eindrücke der Auswirkungen eines implantierten Stoffes auf das Gewebe liefern. Die gewonnenen Erkenntnisse müssen nach Möglichkeit auch am lebenden Gesamtorganismus überprüft werden. Hierfür werden in der medizinischen Forschung in der Regel Nagetiermodelle verwendet – häufig Mäuse, allerdings in den Neurowissenschaften auf Grund diverser Vorteile vermehrt Ratten (Ellenbroek und Youn, 2016^[24]). Auch wir entschieden uns in diesem Fall für ein Rattenmodell, da so durch die größere Körpergröße im Vergleich zur Maus eine bessere Durchführbarkeit des operativen Eingriffs mit geringerem Risiko und vergleichsweise geringerer Belastung für das Tier ermöglicht wurde. Darüber hinaus war so das initiale OP-Trauma und dessen zu erwartender Einfluss auf das spätere histomorphologische Ergebnis wahrscheinlich geringer, was eine bessere Beurteilbarkeit des eigentlichen Einflusses der Implantatmaterialien auf die Gewebsreaktion ermöglichen sollte. Auch im Hinblick auf die durchgeführten Verhaltenstests boten das leichtere Handling und die geringere Scheu vor dem Menschen entscheidende Vorteile.

Die Anzahl der Versuchstiere wurde mit 5 Tieren pro Gruppe in Einklang mit dem von Russel und Burch 1959 erstmals publizierten und seitdem zunehmend beachteten „3R-Prinzip“ zur Verringerung des verursachten Leids bei Tierversuchen (Russel und Burch, 1959^[109]) bewusst niedrig gehalten. Eine niedrige Versuchstieranzahl geht unglücklicherweise häufig mit einer geringeren statistischen Trennschärfe (= *statistical power*) einher. Um diesem Effekt teilweise entgegenzuwirken wurden in jedem Versuchsteil von jedem Versuchstier mehrere Messungen genommen und diese vor der weiteren statistischen Auswertung gemittelt. Da dies die erste derartige Studie an unserem Institut darstellte konnte zur Verbesserung der Trennschärfe leider nicht auf bereits vorhandene Kontrollgruppen zurückgegriffen werden.

Wie bereits unter **7.4** beschrieben verwendeten wir kleine Festkörper als Implantate um einen möglichst realitätsnahen Reiz für das Hirngewebe wie beim Clipping eines Aneurysmas zu simulieren.

7.7 Ergebnisse der Nachbeobachtungen

In Folge der Kraniotomie zeigte sich bei allen Tieren eine statistisch signifikante Abnahme des Körpergewichts – unabhängig von der Versuchsgruppe. Dieser Gewichtsverlust blieb aber mit maximal 7 % des Ausgangsgewichtes deutlich unterhalb zuvor festgelegter Kriterien, die auf eine moderate ($\geq 10\%$) oder gar schwere ($\geq 20\%$) Beeinträchtigung des Tieres schließen ließen. Im weiteren Verlauf war ohnehin – ebenso in allen Gruppen – ein stetiger Anstieg des Körpergewichts zu beobachten. Auch wiesen die Gruppen untereinander bezüglich der Gewichtsveränderungen keine signifikanten Unterschiede auf. Darüber hinaus zeigten die Tiere auch keine anderen Merkmale oder Verhaltensweisen die auf wesentlich erhöhten Stress oder vermehrtes Leid infolge des Eingriffs hingedeutet hätten. Insgesamt entsprechen diese Beobachtungen dem normalen Verlauf wie er nach einem neurochirurgischen Eingriff zu erwarten ist. Unsere Beobachtungen sprechen also dafür, dass keines der verwendeten Implantatmaterialien – bspw. durch Auslösung übermäßiger Entzündungsreaktionen – einen nennenswerten Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts nach der OP ausübt.

Bei Betrachtung sowohl der *beam-walk* Zeiten als auch der *foot-slips* zeichnete sich insgesamt kein kohärentes Bild. Zwar waren die Überquerungszeiten an späteren Messtagen tendenziell kürzer, allerdings nicht bzw. nur bei der spätesten Messung in signifikanter Weise. Dies spricht für die Erholung vom operativen Eingriff sowie einen Lerneffekt bzgl. des *beam-walk* Tests. Insbesondere beim Vergleich der Gruppen untereinander waren die Differenzen der Mittelwerte sehr gering – deutlich geringer als z. B. die Differenzen mehrerer Zeiten desselben Tieres an einem einzelnen Messtag.

Die Anzahl der beobachteten *foot-slips* und schweren *foot-slips* wirkte insgesamt eher zufällig. Tendenziell traten auch diese vor dem Eingriff und an Tag 3 nach dem Eingriff häufiger auf als im späteren Verlauf, jedoch war dies lediglich in der Titan-Gruppe beim Vergleich d3 mit d28 statistisch signifikant. Dies scheint ebenso durch die Erholung vom Eingriff sowie die Gewöhnung an den Test bedingt zu sein. Insgesamt scheinen durch die Implantation keine über das eigentliche OP-Trauma hinausgehenden Einschränkungen für das Tier entstanden zu sein; zumindest aber keine grobmotorischen Einschränkungen die stark genug gewesen wären um im *beam-walk* Test aufzufallen. Insgesamt zeigten sich die Versuchstiere im postoperativen Verlauf nur wenig bis gar nicht eingeschränkt.

Der *beam-walk* Test ist eine einfache, günstige und reproduzierbare Methode um grobmotorische Defizite bei Mäusen und Ratten zu identifizieren die schnell und von nur einer Person durchführbar ist (Au *et al.*, 2016^[4]; Carter *et al.*, 2001^[16]). Er sollte in unserem Fall als Verlaufskontrolle dienen und frühzeitig Hinweise auf schwere Verläufe liefern, die durch überschießende oder generalisierte Entzündungsreaktionen oder ein ungewöhnlich

großes OP-Trauma entstanden sein könnten. Darüber hinaus lieferte er unkompliziert ergänzende Daten zur späteren Immunhistochemie. Wir entschieden uns für eine eher grundlegende und daher einfache und schnelle Durchführung des *beam-walk* Tests mit nur einem Typ von Holzsteg, der dafür aber mit 2 cm Breite für Ratten vergleichsweise schmal war (Carter *et al.*, 2001^[16]). Da die Versuchstiere und dadurch auch der *beam-walk* Test sehr anfällig für Störvariablen vieler Art sind (ebd.) wurde darauf geachtet die Rahmenbedingungen sehr konsistent zu halten. Insbesondere wurde der Test immer im selben Raum, vom selben Untersucher, mit demselben Ablauf und möglichst zur selben Tageszeit durchgeführt. Allerdings ist fraglich, ob die Auswirkungen so geringer Cortexläsionen wie sie durch das subdurale Auflegen der Testplättchen und die Fremdkörperreaktion entstehen, überhaupt von solchen Verhaltenstests zuverlässig detektiert werden können oder sie lediglich einen Unterschied der Implantatgruppen zur *sham*-Gruppe aufzeigen können.

Zusammenfassend liefern die durchgeführten Verhaltenstests keine Anhaltspunkte, die auf eine starke bzw. stärker als bei Titan ausgeprägte Fremdkörperreaktion bei der subduralen Implantation von PEEK und CF-PEEK sprechen würden.

7.8 Immunhistochemie und Fremdkörperreaktion

Die beiden von uns mittels Immunhistochemie angefärbten Zelltypen haben besondere Relevanz bei der Antwort des Gehirns auf Fremdkörper: Aktivierte Mikroglia und rekrutierte Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der persistierenden Inflammation an der biotisch-abiotisch Grenze; hypertrophe Astrozyten bilden eine dichte narbenähnliche Schicht die das gesunde Gewebe vom Fremdkörper und dem Gebiet der Inflammation abgrenzen soll (Jorfi *et al.*, 2015^[49]). Eine hohe Zahl bzw. Dichte dieser Zellen sowie eine starke immunhistochemische Anfärbung über die unten aufgeführten Markerproteine sprechen daher für eine ausgeprägte Inflammation. Für die Visualisierung der **Astrozyten** wurde als Zielstruktur **GFAP** gewählt, da dieses spezifisch in Astrozyten (und Ependymzellen) ausgebildet wird und aktivierte Astrozyten es in stark gesteigertem Ausmaß ausprägen (Prodanov und Delbeke, 2016^[103]). Zum Nachweis der aktivierten **Mikrogliazellen** wurde **Iba1** (synonym: AIF-1) verwendet, da es im ZNS hochspezifisch für Mikroglia (und vereinzelt eingewanderte Makrophagen) ist und ebenfalls im aktivierten Zustand verstärkt ausgeprägt wird (Imai *et al.*, 1996^[48]; Ohsawa *et al.*, 2004^[92]). Gleichwertig hätten hier auch z. B. CD68 oder HLA-DR als Zielstrukturen verwendet werden können (Hendrickx *et al.*, 2017^[46]; Kovacs, 2017^[57]).

Bei der Auswertung der GFAP-Färbung zeigten sich deutliche Unterschiede aller Testgruppen zur Kontrollgruppe, allerdings erwiesen sich diese knapp nicht als statistisch signifikant. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass leicht andere Einstellungen der *ImageJ* Software bei der automatisierten Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Fläche hier einen statistisch signifikanten Unterschied ergeben hätten. Die den Präparaten zugewiesenen Astrogliose-Scores ergaben hingegen mit $p \leq 0,001$ eindeutig statistisch signifikant höhere Scores der Testgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Hierzu sei noch zu erwähnen, dass die in **Tabelle 10** aufgeführten Grenzen für die Dicke der Glianarbe bei der Auswertung eher als Richtwerte denn als bindendes Kriterium verstanden wurden. Ein größerer Stellenwert wurde dem gesamthistomorphologischen Bild zugemessen, selbst wenn bei der gemessenen Dicke die Grenze zum nächstniedrigeren bzw. -höheren Score knapp unter- bzw. überschritten wurde.

Ähnliche Ergebnisse wie bei der GFAP-Färbung lagen auch bei der Färbung der Mikroglia vor: In den beiden PEEK-Gruppen war die Dichte an Iba1-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher, bei der Titan-Gruppe war dies mit $p = 0,055$ nicht der Fall. Unabhängig davon entsprechen die festgestellten Unterschiede zur *sham*-OP den Erwartungen, da bei der Implantation offenbar superfizielle Cortexverletzungen entstehen und der persistierende Reiz durch das Testplättchen eine anhaltende Inflammation begünstigt, was in der gesteigerten Aktivierung und Rekrutierung von Astrozyten und Mikrogliazellen resultiert.

In keiner der durchgeführten Untersuchungen lagen signifikante oder annähernd signifikante Differenzen der Mittelwerte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vor. Daraus schließend wurden insgesamt keine Anhaltspunkte festgestellt, die auf eine schlechtere Biokompatibilität von PEEK bzw. CF-PEEK im Vergleich zu Titan hindeuten würden.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste uns bekannte Studie die die Biokompatibilität von PEEK bei **subduraler** Applikation und damit direktem Kontakt zu Gewebe des ZNS untersucht und mit der von Titan vergleicht. Daher ist kein direkter Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen oder vorheriger Studien unserer Arbeitsgruppe möglich. Zieht man aber ähnlich geartete *in vitro* Versuche mit Zellen außerhalb des ZNS sowie tierexperimentelle Studien mit **epiduraler** Applikation hinzu, so findet man Ausführungen die unsere Ergebnisse stützen.

So führten Wenz *et al.* beispielsweise bereits 1990 die ersten Untersuchungen zur *in vitro* Biokompatibilität von PEEK an Mäusefibroblasten durch und stellten keinerlei zytotoxische Wirkung fest (Wenz *et al.*, 1990^[134]). Vor seiner Zulassung als medizinisches Implantatmaterial bestätigten zahlreiche weitere tierexperimentelle – wie die unter **7.4** erwähnte Studie von Williams *et al.* (Williams *et al.*, 1997^[139]) – und *in vitro* Studien dessen

ausgezeichnete Biokompatibilität und nach über zwei Jahrzehnten im Einsatz wird es gemeinhin als bioinert angesehen (zusammengefasst aus Kurtz und Devine, 2007^[64]). Aber auch noch in jüngerer Vergangenheit wurden diesbezüglich Studien durchgeführt – so untersuchten Jung *et al.* beispielsweise den Einfluss von Ti-PEEK auf Prä-Osteoblasten-Zellkulturen und stellten ebenso wie wir keine Anzeichen von Zytotoxizität und lediglich ein schlechteres Anhaften der Zellen an den PEEK-Anteilen als an den Titananteilen des Kompositmaterials fest (Jung *et al.*, 2016^[50]).

Die Versuche von Cunningham *et al.* und Hallab *et al.* können in diesem Zusammenhang als eine Art Extremtest angesehen werden. Sie applizierten verschiedene Materialien, darunter auch PEEK und Titan, in Partikelform direkt auf die freigelegte spinale *Dura mater* von Kaninchen (Cunningham *et al.*, 2013^[20]; Hallab *et al.*, 2013^[44]). Durch die vergleichsweise große Menge und auf Grund der Partikelform sehr große Oberfläche der Materialien wurde so quasi der „worst case“ simuliert. Trotz dessen fanden sich am Rückenmark keine Läsionen oder histopathologischen Reaktionen auf Grund der Zytokinerhöhung und insgesamt blieb es bei einer lokal begrenzten, moderaten Immunantwort auf die Fremdkörperpartikel (ebd.). Die Polymergruppen schnitten hier insgesamt sogar etwas besser ab und wiesen insbesondere keine intrathekale Dissemination phagozytierter Partikel auf (Cunningham *et al.*, 2013^[20]).

In der Gesamtschau dieses Forschungsstandes und unserer Ergebnisse kamen wir bezüglich der lokalen histopathologischen Reaktion des Gewebes somit zu zwei wesentlichen Ergebnissen: Auch bei direktem Kontakt zu Zellen des ZNS und selbst in höherer Konzentration als es bei der Verwendung als Clipmaterial zu erwarten wäre lösen PEEK und CF-PEEK *in vivo* lediglich eine moderate lokal begrenzte Immunantwort aus und zeigen auch keine Anzeichen von Zytotoxizität. Insbesondere weisen diese Materialien keine schlechtere Biokompatibilität auf als das bereits standardmäßig verwendete Titan.

Die Fremdkörperreaktion im ZNS ist ein äußerst komplexer Prozess mit vielfältigen Interaktionen, daher sind die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche lediglich als Anhaltspunkte für die Beurteilung der ZNS-Biokompatibilität von PEEK zu werten. Bis zu einer möglichen klinischen Erprobung sind sicherlich Folgestudien sinnvoll, die unsere Daten durch zum Beispiel längere Laufzeit, detailliertere zellmorphologische Parameter oder die Messung von IL-1 & IL-6 (Prodanov und Delbeke, 2016^[103]) ergänzen können.

7.9 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Bezogen auf die eingangs formulierte Fragestellung können wir folgende Aussagen treffen:

Der von uns entwickelte Clip-Prototyp aus carbonfaserverstärktem PEEK (CF-PEEK) zeichnete sich in allen durchgeführten Untersuchungen durch seine vollständige Artefaktfreiheit aus und verursacht somit signifikant weniger Suszeptibilitätsartefakte im MRT als das herkömmlich für Clips verwendete Titan. Die Beurteilung sowohl des Verschlusses des geclippten Gefäßes als auch sämtlicher Strukturen in der Umgebung des Clips waren problemlos möglich. Hinsichtlich der Artefaktproblematik bei den notwendigen Kontrolluntersuchungen erwies sich CF-PEEK somit als ideales Material für die Herstellung von Clips zur Versorgung von Hirnaneurysmen.

Bezüglich der Biokompatibilität fanden wir keine Anzeichen die darauf hindeuteten, dass sich CF-PEEK weniger gut als Implantatmaterial im ZNS eignet als dies bei Titan der Fall ist. Das Wachstum der Zellkulturen wurde nicht gehemmt, die Verhaltenstests gaben keine Hinweise auf eine stärkere Beeinträchtigung der Tiere und auch die Auswertung der Gewebsschnitte ergab keine signifikant stärkere Fremdkörperreaktion auf CF-PEEK.

Alles in allem erachten wir die Biokompatibilität von CF-PEEK auf demselben ausgezeichneten Niveau wie die von Titan.

Diese Ergebnisse erwiesen sich insgesamt als vielversprechend und lassen darauf schließen, dass eine zukünftige Etablierung unseres Prototyps (bzw. seiner Nachfolger) in der klinischen Praxis realistisch möglich erscheint. Bis dahin sind allerdings noch weitere Studien notwendig, die die in der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse erweitern und unterstützen. Darüber hinaus gilt es ebenso die eingangs erwähnte Hürde der zum aktuellen Zeitpunkt etwas zu geringen Schließkraft zu überwinden um den neuen Clip auch in allen mechanischen Gesichtspunkten mindestens auf den bisherigen Goldstandard zu heben. Sollte dies der Fall sein, so sehen wir in der Verwendung von CF-PEEK für die Herstellung von Hirnaneurysmaclips eine sehr gute Möglichkeit die Anzahl der benötigten DSAs zu verringern und dadurch die Strahlen- und Kontrastmittelbelastung von Patienten nach erfolgtem *Clipping* in Zukunft deutlich zu reduzieren.

8 Quellenverzeichnis

1. Abdulla EMF, Campbell IC (1993) In vitro tests of neurotoxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 29:69–75
2. Aesculap Inc. (2018) Product leaflet: YASARGIL Aneurysm Clip System.
URL: [https://www.aesculapusa.com/content/dam/aesculap-us/us/website/aesculap-inc/healthcareprofessionals/or-solutions/pdfs/DOC697-YASARGIL Aneurysm Clip System Brochure-Rev H.pdf](https://www.aesculapusa.com/content/dam/aesculap-us/us/website/aesculap-inc/healthcareprofessionals/or-solutions/pdfs/DOC697-YASARGIL_Aneurysm_Clip_System_Brochure-Rev_H.pdf) (Stand: 16.03.2022)
3. Aso K, Kashimura H, Matsumoto Y, Saura H (2018) Microsurgical clipping for anterior communicating artery aneurysm associated with the accessory anterior cerebral artery via the pterional approach. *Surg Neurol Int* 9:120–123
4. Au JL, Weishaupt N, Nell HJ, Whitehead SN, Cechetto DF (2016) Motor and hippocampal dependent spatial learning and reference memory assessment in a transgenic rat model of Alzheimer's disease with stroke. *J Vis Exp* 2016:1–11
5. Bakker NA, Groen RJM, Foumani M, Uyttenboogaart M, Eshghi OS, Metzemaekers JDM, Lammers N, Luijckx GJ, Van Dijk JMC (2014) Repeat digital subtraction angiography after a negative baseline assessment in nonperimesencephalic subarachnoid hemorrhage: A pooled data meta-analysis. A systematic review. *J Neurosurg* 120:99–103
6. Başkaya MK, Uluç K (2012) Application of a new fenestrated clip (Yaşargil T-bar clip) for the treatment of fusiform M1 aneurysm: case illustration and technical report. *Neurosurgery* 70:339–342
7. Beck J, Raabe A, Szelenyi A, Berkefeld J, Gerlach R, Setzer M, Seifert V (2006) Sentinel headache and the risk of rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 37:2733–2737
8. Becker T, Gurka M (2016) Röntgentransparenter Aneurysmen-Clip macht Titan Konkurrenz. *Carbon Compos Mag* 51
9. Bjornsson CS, Oh SJ, Al-Kofahi YA, Lim YJ, Smith KL, Turner JN, De S, Roysam B, Shain W, Kim SJ (2006) Effects of insertion conditions on tissue strain and vascular damage during neuroprosthetic device insertion. *J Neural Eng* 3:196–207
10. Bowles AP, Kinjo T, Al-Mefty O (1995) Skull base approaches for posterior circulation aneurysms. *Skull Base Surg* 5:251–260
11. Brack A, Senger S, Fischer G, Janssen H, Oertel J, Brecher C (2016) Development of an artifact-free aneurysm clip. *Curr Dir Biomed Eng* 2:543–546
12. Brandis A, Kuder H, Knappe U, Jödicke A, Schönmayr R, Samii M, Walter GF, Nikkhah G (1998) Time-dependent expression of donor- and host-specific major histocompatibility complex class I and II antigens in allogeneic dopamine-rich macro- and micrografts: Comparison of two different grafting protocols. *Acta Neuropathol* 95:85–97
13. Brecher C, Emonts M, Brack A, Wasiak C, Schütte A, Krämer N, Bruhn R (2014) New concepts and materials for the manufacturing of MR-compatible guide wires. *Biomed Tech* 59:147–151
14. Brisman JL, Song JK, Newell DW (2006) Cerebral aneurysms. *N Engl J Med* 355:928–939

15. Brown RD, Broderick JP (2014) Unruptured intracranial aneurysms: Epidemiology, natural history, management options, and familial screening. *Lancet Neurol* 13:393–404
16. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB (2001) Motor Coordination and Balance in Rodents. *Curr Protoc Neurosci* 15:1–14
17. Chen Q, Thouas GA (2015) Metallic implant biomaterials. *Mater Sci Eng R Reports* 87:1–57
18. Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 136:10–17
19. Cho WS, Cho K il, Kim JE, Jang TS, Ha EJ, Kang HS, Son YJ, Choi SH, Lee S, Kim CC, Sun JY, Kim HE (2018) Zirconia-Polyurethane Aneurysm Clip. *World Neurosurg* 115:14–23
20. Cunningham BW, Hallab NJ, Hu N, Mcafee PC (2013) Epidural application of spinal instrumentation particulate wear debris: A comprehensive evaluation of neurotoxicity using an in vivo animal model Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine* 19:336–350
21. Dandy WE (1938) INTRACRANIAL ANEURYSM OF THE INTERNAL CAROTID ARTERY CURED BY OPERATION. *Ann Surg* 107:654–659
22. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67:110–119
23. Dundar TT, Aralasmak A, Kitiş S, Yılmaz FT, Abdallah A (2019) Comparison of Subtracted Computed Tomography from Computed Tomography Perfusion and Digital Subtraction Angiography in Residue Evaluation of Treated Intracranial Aneurysms. *World Neurosurg* 132:746–751
24. Ellenbroek B, Youn J (2016) Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? *DMM Dis Model Mech* 9:1079–1087
25. Ellis H (2017) John Hunter's operation for popliteal aneurysm. *J Perioper Pract* 27:144
26. Eng LF, Dearmond SJ (1982) Immunocytochemical Studies of Astrocytes in Normal Development and Disease. *Adv Cell Neurobiol* 3:145–171
27. Fan JP, Tsui CP, Tang CY, Chow CL (2004) Influence of interphase layer on the overall elasto-plastic behaviors of HA/PEEK biocomposite. *Biomaterials* 25:5363–5373
28. Ferguson M, Sharma D, Ross D, Zhao F (2020) A Critical Review of Microelectrode Arrays and Strategies for Improving the Neural Interface. 8:1–28
29. Fischer G, Stadie A, Oertel JMK (2010) Near-infrared indocyanine green videoangiography versus microvascular Doppler sonography in aneurysm surgery. *Acta Neurochir (Wien)* 152:1519–1525
30. Fischer G, Stadie A, Reisch R, Hopf NJ, Fries G, Böcher-Schwarz H, Van Lindert E, Ungersböck K, Knosp E, Oertel J, Perneczky A (2011) The keyhole concept in aneurysm surgery: Results of the past 20 years. *Neurosurgery* 68:45–51
31. Fischer G, Oertel J, Perneczky A (2012) Endoscopy in aneurysm surgery. *Neurosurgery* 70:184–191

32. Fischer G, Rediker J, Oertel J (2019) Endoscope- versus microscope-integrated near-infrared indocyanine green videoangiography in aneurysm surgery. *J Neurosurg* 131:1413–1422
33. Fleege C, Makowski M, Rauschmann M, Fraunhofer KL, Fennema P, Arabmotlagh M, Rickert M (2020) Carbon fiber-reinforced pedicle screws reduce artifacts in magnetic resonance imaging of patients with lumbar spondylodesis. *Sci Rep* 10:1–6
34. Fox JL (1976) Vascular clips for the microsurgical treatment of stroke. *Stroke* 7:489–500
35. Friedrich B, Wostrack M, Ringel F, Ryang YM, Förschler A, Waldt S, Zimmer C, Nittka M, Preibisch C (2016) Novel Metal Artifact Reduction Techniques with Use of Slice-Encoding Metal Artifact Correction and View-Angle Tilting MR Imaging for Improved Visualization of Brain Tissue near Intracranial Aneurysm Clips. *Clin Neuroradiol* 26:31–37
36. Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK (2009) Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Prog Mater Sci* 54:397–425
37. Göllitz P, Struffert T, Ganslandt O, Lang S, Knossalla F, Doerfler A (2014) Contrast-enhanced angiographic computed tomography for detection of aneurysm remnants after clipping: A comparison with digital subtraction angiography in 112 clipped aneurysms. *Neurosurgery* 74:606–613
38. Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, Seker E (2020) A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 17:1–16
39. Greene EC (1935) Anatomy of the Rat. *Trans Am Philos Soc* 27:ii
40. Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424–2428
41. Greving JP, Wermer MJH, Brown RD, Morita A, Juvela S, Yonekura M, Ishibashi T, Torner JC, Nakayama T, Rinkel GJE, Algra A (2014) Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: A pooled analysis of six prospective cohort studies. *Lancet Neurol* 13:59–66
42. Guesdon J-L, Ternynck T, Avrameas S (1979) The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoencymatic Techniques. *J Histochem Cytochem* 27:1131–1139
43. Guglielmi G, Vinuela F, Duckwiler G, Dion J, Lylyk P, Berenstein A, Strother C, Graves V, Halbach V, Nichols D, Hopkins N, Ferguson R, Sepetka I (1992) Endovascular treatment of posterior circulation aneurysms by electrothrombosis using electrically detachable coils. *J Neurosurg* 77:515–524
44. Hallab NJ, Bao Q Bin, Brown T (2013) Assessment of epidural versus intradiscal biocompatibility of PEEK implant debris: An in vivo rabbit model. *Eur Spine J* 22:2740–2751
45. He L, Griessenauer CJ, Fusco MR, Chua MH, Stapleton CJ, Guidal BT, Thomas AJ, Ogilvy CS (2016) Lasic Aneurysm Clip System for Microsurgical Clipping of Cerebral Aneurysms: Transition to a New Aneurysm Clip System in an Established Cerebrovascular Practice. *World Neurosurg* 96:454–459

46. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I (2017) Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol* 309:12–22
47. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577–580
48. Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996) A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:855–862
49. Jorfi M, Skousen JL, Weder C, Capadona JR (2015) Progress towards biocompatible intracortical microelectrodes for neural interfacing applications. *J Neural Eng* 12:
50. Jung H Do, Park HS, Kang MH, Li Y, Kim HE, Koh YH, Estrin Y (2016) Reinforcement of polyetheretherketone polymer with titanium for improved mechanical properties and in vitro biocompatibility. *J Biomed Mater Res - Part B* 104B:141–148
51. KAFTANOV AN, KHEYREDDIN AS, YAKOVLEV SB (2016) Unruptured cerebral aneurysms. *Probl Neurosurg named after NN Burdenko* 5:102–108
52. Kashimura H, Ogasawara K, Kubo Y, Ogawa A (2007) Complete neck clipping of internal carotid-posterior communicating artery aneurysms using bayonet-shaped aneurysm clips - Technical note. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 47:282–284
53. Kashiwazaki D, Kuroda S (2013) Size ratio can highly predict rupture risk in intracranial small (<5 mm) aneurysms. *Stroke* 44:2169–2173
54. Kawase T, Toya S, Shiobara R, Mine T (1985) Transpetrosal approach for aneurysms of the lower basilar artery. *J Neurosurg* 63:857–861
55. Kodama T, Nakai R, Goto K, Shima K, Iwata H (2017) Preparation of an Au-Pt alloy free from artifacts in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 44:38–45
56. Komotar RJ, Mocco J, Solomon RA (2008) GUIDELINES FOR THE SURGICAL TREATMENT OF UNRUPTURED INTRACRANIAL ANEURYSMS. *Neurosurgery* 62:183–194
57. Kovacs GG (2017) Cellular reactions of the central nervous system. *Handb Clin Neurol* 145:13–23
58. Kozai TDY, Jaquins-Gerstl AS, Vazquez AL, Michael AC, Cui XT (2015) Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies. *ACS Chem Neurosci* 6:48–67
59. Krammer MJ, Lumenta CB (2010) The new aneurysm clip system for particularly complex aneurysm surgery: technical note. *Neurosurgery* 66:336–338
60. Krätzig T, Mende KC, Mohme M, Kniep H, Dreimann M, Stangenberg M, Westphal M, Gauer T, Eicker SO (2021) Carbon fiber–reinforced PEEK versus titanium implants: an in vitro comparison of susceptibility artifacts in CT and MR imaging. *Neurosurg Rev* 44:2163–2170
61. Krayenbühl HA, Yaşargil MG, Flamm ES, Tew JM (1972) Microsurgical treatment of intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg* 37:678–686

62. Krex D, Schackert HK, Schackert G (2001) Genesis of cerebral aneurysms - An update. *Acta Neurochir (Wien)* 143:429–449
63. Kuchelmeister K (2012) *Zellen des Zentralnervensystems und ihre Reaktionsformen*. Springer Berlin Heidelberg
64. Kurtz SM, Devine JN (2007) PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials* 28:4845–4869
65. Lai LT, O'Neill AH (2017) History, Evolution, and Continuing Innovations of Intracranial Aneurysm Surgery. *World Neurosurg* 102:673–681
66. Larena-Avellaneda A (2012) *Entwicklung der arteriellen Gefäßchirurgie*. Springer, Berlin, Heidelberg
67. Lawton MT, Ho JC, Bichard WD, Coons SW, Zabramski JM, Spetzler RF (1996) Titanium aneurysm clips: Part I - Mechanical, radiological, and biocompatibility testing. *Neurosurgery* 38:1158–1164
68. Lawton MT, Heiserman JE, Prendergast VC, Zabramski JM, Spetzler RF (1996) Titanium aneurysm clips: Part III--Clinical application in 16 patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 38:1170–1175
69. Leventhal GS (1951) Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am* 33:473–474
70. Lin T, Fox AJ, Drake CG (1989) Regrowth of aneurysm sacs from residual neck following aneurysm clipping. *J Neurosurg* 70:556–560
71. Ling E-A (1981) The Origin and Nature of Microglia. *Adv Cell Neurobiol* 2:33–82
72. Long M, Rack HJ (1998) Titanium alloys in total joint replacement - A materials science perspective. *Biomaterials* 19:1621–1639
73. Louw DF, Kaibara T, Sutherland GR (2003) Aneurysm clips. *J Neurosurg* 98:638–641
74. Macdonald RL, Wallace MC, Kestle JRW (1993) Role of angiography following aneurysm surgery. *J Neurosurg* 79:826–832
75. Macdonald RL, Schweizer TA (2017) Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 389:655–666
76. Marbacher S, Niemelä M, Hernesniemi J, Frösén J (2019) Recurrence of endovascularly and microsurgically treated intracranial aneurysms—review of the putative role of aneurysm wall biology. *Neurosurg Rev* 42:49–58
77. Maurice-Williams RS, Lafuente J (2003) Intracranial aneurysm surgery and its future. *J R Soc Med* 96:540–543
78. Mayer P Über das Färben mit Hämatoxylin. *Mitth aus der Zool Stn zu Neapel* 10:170–186
79. Mayfield FH, Kees G (1971) A brief history of the development of the Mayfield clip. Technical note. *J Neurosurg* 35:97–100
80. McFadden JT (2012) Magnetic resonance imaging and aneurysm clips: A review. *J Neurosurg* 117:1–11

81. Mckissock W, Richardson A, Walsh L (1965) ANTERIOR COMMUNICATING ANEURYSMS: A TRIAL OF CONSERVATIVE AND SURGICAL TREATMENT. *Lancet* 285:873–876
82. Miller DL, Balter S, Cole PE, Lu HT, Schueler BA, Geisinger M, Berenstein A, Albert R, Georgia JD, Noonan PT, Cardella JF, St. George J, Russell EJ, Malisch TW, Vogelzang RL, Miller GL, Anderson J (2003) Radiation doses in interventional radiology procedures: The RAD-IR study part I: Overall measures of dose. *J Vasc Interv Radiol* 14:711–727
83. Minchenkov K, Vedernikov A, Safonov A, Akhatov I (2021) Thermoplastic pultrusion: A review. *Polymers (Basel)* 13:1–36
84. Mocco J, Brown RD, Torner JC, Capuano AW, Fargen KM, Raghavan ML, Piepgras DG, Meissner I, Huston J (2018) Aneurysm morphology and prediction of rupture: An international study of unruptured intracranial aneurysms analysis. *Clin Neurosurg* 82:491–495
85. Mohammad F, Horiguchi T, Mizutani K, Yoshida K (2020) Clipping versus coiling in unruptured anterior cerebral circulation aneurysms. *Surg Neurol Int* 11:1–9
86. Nadolski GJ, Stavropoulos SW (2013) Contrast alternatives for iodinated contrast allergy and renal dysfunction: Options and limitations. *J Vasc Surg* 57:593–598
87. Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Siddiqui F (2016) Applications of polyetheretherketone (PEEK) in oral implantology and prosthodontics. *J Prosthodont Res* 60:12–19
88. Nakai R, Goto K, Shima K, Kodama T, Iwata H (2022) Dual-phase Au-Pt alloys free from magnetic susceptibility artifacts in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 85:19–27
89. Nishikawa A, Kakizawa Y, Wada N, Yamamoto Y, Katsuki M, Uchiyama T (2021) Usefulness of Pointwise Encoding Time Reduction with Radial Acquisition and Subtraction-Based Magnetic Resonance Angiography after Cerebral Aneurysm Clipping. *World Neurosurg X* 9:100096
90. Nitta I, Tsukiyama Y, Nomura S, Takatsu N (2016) Frictional characteristics of clamp surfaces of aneurysm clips finished by laser processing. *J Adv Mech Des Syst Manuf* 10:1–12
91. Oertel J, Samii M, Walter GF (2004) Fetal allogeneic dopaminergic cell suspension grafts in the ventricular system of the rat: Characterization of transplant morphology and graft-host interactions. *Acta Neuropathol* 107:421–427
92. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88:844–856
93. Ooka K, Shibuya M, Suzuki Y (1997) A Comparative Study of Intracranial Aneurysm Clips: Closing and Opening Forces and Physical Endurance. *Neurosurgery* 40:318–323
94. Osterhoff G, Huber FA, Graf LC, Erdlen F, Pape HC, Sprengel K, Guggenberger R (2021) Comparison of metal artifact reduction techniques in magnetic resonance imaging of carbon-reinforced PEEK and titanium spinal implants. *Acta radiol* 0:1–9

95. Panayotov IV, Orti V, Cuisinier F, Yachouh J (2016) Polyetheretherketone (PEEK) for medical applications. *J Mater Sci Mater Med* 27:118
96. Papadopoulos MC, Apok V, Mitchell FT, Turner DP, Gooding A, Norris J (2004) Endurance of Aneurysm Clips: Mechanical Endurance of Yasargil and Spetzler Titanium Aneurysm Clips. *Neurosurgery* 54:966–972
97. Peter Lazic GmbH (2017) Produktkatalog: Yasargil Aneurysmen-Clip System. URL: <https://www.lazic.de/produkte/yasargil-katalog/> (Stand: 16.03.2022)
98. Peter Lazic GmbH (2017) Produktkatalog: L-Aneurysmen-Clip. URL: <https://www.lazic.de/produkte/l-aneurysmen-clip-r/> (Stand: 16.03.2022)
99. Peter Lazic GmbH (2020) Produktkatalog: D-Clip. URL: <https://www.lazic.de/produkte/d-clip/#c563> (Stand: 16.03.2022)
100. Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, Steiger HJ (2017) Aneurysmal subarachnoid hemorrhage-diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 114:226–235
101. Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM (2005) Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods* 148:1–18
102. Pritz MB, Chandler WF (1994) The transsylvian approach to middle cerebral artery bifurcation/trifurcation aneurysms. *Surg Neurol* 41:217–220
103. Prodanov D, Delbeke J (2016) Mechanical and biological interactions of implants with the brain and their impact on implant design. *Front Neurosci* 10:11
104. Qiu S, You W, Wang H, Zhou X, Yang X (2019) Allergic epidural effusion following polyetheretherketone cranioplasty. *J Craniofac Surg* 30:241–243
105. Rao L, Zhou H, Li T, Li C, Duan YY (2012) Polyethylene glycol-containing polyurethane hydrogel coatings for improving the biocompatibility of neural electrodes. *Acta Biomater* 8:2233–2242
106. Rigby R (1985) Polyetheretherketone. CRC Press, New York
107. Ringel F, Ryang YM, Kirschke JS, Müller BS, Wilkens JJ, Brodard J, Combs SE, Meyer B (2017) Radiolucent Carbon Fiber–Reinforced Pedicle Screws for Treatment of Spinal Tumors: Advantages for Radiation Planning and Follow-Up Imaging. *World Neurosurg* 105:294–301
108. Rosenorn J, Eskesen V, Schmidt K, Ronde F (1987) The risk of rebleeding from ruptured intracranial aneurysms. *J Neurosurg* 67:329–332
109. Russel WMS, Burch RL (1959) The Sources, Incidence, and Removal of Inhumanity. Methuen & Co. Ltd, London
110. Ryu CW, Kwon OK, Koh JS, Kim EJ (2011) Analysis of aneurysm rupture in relation to the geometric indices: Aspect ratio, volume, and volume-to-neck ratio. *Neuroradiology* 53:883–889
111. Sachs M (ed) (2000) Geschichte der Operativen Chirurgie - Band 1. Blutstillung in Wunden. Kaden, Heidelberg. pp 1-7

112. Schieda N, Blaichman JI, Costa AF, Glikstein R, Hurrell C, James M, Jabehtar Maralani P, Shabana W, Tang A, Tsampalieros A, van der Pol CB, Hiremath S (2018) Gadolinium-Based Contrast Agents in Kidney Disease: A Comprehensive Review and Clinical Practice Guideline Issued by the Canadian Association of Radiologists. *Can J Kidney Heal Dis* 5:1–17
113. Schievink WI (1997) Intracranial aneurysms. *N Engl J Med* 336:28–40
114. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
115. Seaman S, Kerezoudis P, Bydon M, Torner JC, Hitchon PW (2017) Titanium vs. polyetheretherketone (PEEK) interbody fusion: Meta-analysis and review of the literature. *J Clin Neurosci* 44:23–29
116. Senger S, Fischer G, Mühl-Benninghaus R, Backens M, Reisel JR, Fritz T, Brack A, Reith W, Oertel J (2023) Development and Evaluation of an MRI Artifact-Free Aneurysm Clip. *Oper Neurosurg*
117. Shang S, Ye J, Luo X, Qu J, Zhen Y, Wu J (2017) Follow-up assessment of coiled intracranial aneurysms using zTE MRA as compared with TOF MRA: a preliminary image quality study. *Eur Radiol* 27:4271–4280
118. Siasios I, Kapsalaki EZ, Fountas KN (2012) The role of intraoperative micro-Doppler ultrasound in verifying proper clip placement in intracranial aneurysm surgery. *Neuroradiology* 54:1109–1118
119. Spindel MC (2008) Die aneurysmatische Subarachnoidalblutung: Epidemiologie, Ätiologie, Klinik und Komplikationen. *J für Neurol Neurochir und Psychiatr* 9:20–30
120. Statistisches Bundesamt (Destatis) (2022) Lebenserwartung und Sterblichkeit. [URL: https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Demografischer-Wandel/Aspekte/demografie-lebenserwartung.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Demografischer-Wandel/Aspekte/demografie-lebenserwartung.html) (Stand: 11.05.2022)
121. Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G (2013) European stroke organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 35:93–112
122. Sutherland GR, Kelly JJP, Boehm DW, Klassen JB (2008) Ceramic aneurysm clips. *Neurosurgery* 62:400–406
123. Teksam M, McKinney A, Cakir B, Truwit CL (2004) Multi-slice computed tomography angiography in the detection of residual or recurrent cerebral aneurysms after surgical clipping. *Acta radiol* 45:571–576
124. Teping F, Fischer G, Huelser M, Sippl C, Linsler S, Knosp E, Wadiura L, Oertel J (2019) A New Clip Generation for Microsurgical Treatment of Intracranial Aneurysms—The First Case Series. *World Neurosurg* 130:160–165
125. Thien A, King NKK, Ang BT, Wang E, Ng I (2015) Comparison of polyetheretherketone and titanium cranioplasty after decompressive craniectomy. *World Neurosurg* 83:176–180
126. Tsetis D (2010) Endovascular treatment of complications of femoral arterial access. *Cardiovasc Intervent Radiol* 33:457–468

127. Turan N, Heider RAJ, Zaharieva D, Ahmad FU, Barrow DL, Pradilla G (2016) Sex Differences in the Formation of Intracranial Aneurysms and Incidence and Outcome of Subarachnoid Hemorrhage: Review of Experimental and Human Studies. *Transl Stroke Res* 7:12–19
128. Ullrich O (2005) Das Immunsystem des ZNS - Molekulare Mechanismen der Balance zwischen Schutz und Schädigung. *Magdeburg Wissenschaftsjournal* 1–2:3–12
129. Van Lindert E, Pernecky A, Fries G, Pierangeli E (1998) The supraorbital keyhole approach to supratentorial aneurysms: Concept and technique. *Surg Neurol* 49:481–490
130. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJPE, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MMB, van der Lugt A (2007) Incidental Findings on Brain MRI in the General Population. *N Engl J Med* 357:1821–1828
131. Vlak MHM, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJE (2011) Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 10:626–636
132. Wang C, Ma J, Cheng W (2003) Formation of polyetheretherketone polymer coating by electrophoretic deposition method. *Surf Coatings Technol* 173:271–275
133. Weir B, Amidei C, Kongable G, Findlay JM, Kassell NF, Kelly J, Dai L, Karrison TG (2003) The aspect ratio (dome/neck) of ruptured and unruptured aneurysms. *J Neurosurg* 99:447–451
134. Wenz LM, Merritt K, Brown SA, Moet A, Steffee AD (1990) In vitro biocompatibility of polyetheretherketone and polysulfone composites. *J Biomed Mater Res* 24:207–215
135. Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E (2020) PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells* 9:958
136. Wichmann W, Von Ammon K, Fink U, Weik T, Yaşargil GM (1997) Aneurysm clips made of titanium: Magnetic characteristics and artifacts in MR. *Am J Neuroradiol* 18:939–944
137. Wikimedia Commons Strukturformel eines PEEK-Monomers.
URL: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/ff/f2/Polyetherketon.svg>
(Stand: 16.03.2022)
Ersteller: Wikipedia-Nutzer „Roland1952“ (Roland Mattern; 01.11.2010)
138. Wikimedia Commons (2007) Schematic representation of the circle of Willis, arteries of the brain and brain stem (version in Latin).
URL: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e5/Circle_of_Willis_la.svg
(Stand: 16.03.2022)
Ersteller: Wikipedia-Nutzer „Rhcastilhos“ (24.01.2007); erstellt nach einer Vorlage aus *The Anatomy of the Human Body* (Henry Gray, 20. Auflage, 1918)
139. Williams DF, McNamara A, Turner RM (1987) Potential of polyetheretherketone (PEEK) and carbon-fibre-reinforced PEEK in medical applications. *J Mater Sci Lett* 6:188–190
140. Yagmurlu K, Safavi-Abbasi S, Belykh E, Kalani MYS, Nakaji P, Rhoton AL, Spetzler RF, Preul MC (2017) Quantitative anatomical analysis and clinical experience with mini-pterional and mini-orbitozygomatic approaches for intracranial aneurysm surgery. *J Neurosurg* 127:646–659

141. Yasargil MG (1969) Die Bedeutung der Mikrochirurgie in der Hirnchirurgie. Dtsch Medizinische Wochenschrift 94:1496–1497
142. Yasargil MG, Fox JL (1975) The microsurgical approach to intracranial aneurysms. Surg Neurol 3:7–14
143. Yasargil MG (1984) Microneurosurgery, Volume 1. 1. edition. Thieme Medical Publishers, New York
144. Zada G, Christian E, Liu CY, Giannotta SL (2009) Fenestrated aneurysm clips in the surgical management of anterior communicating artery aneurysms: operative techniques and strategy. Clinical article. Neurosurg Focus 26:E7
145. Zhang J, Tian W, Chen J, Yu J, Zhang J, Chen J (2019) The application of polyetheretherketone (PEEK) implants in cranioplasty. Brain Res Bull 153:143–149
146. Zimel MN, Hwang S, Riedel ER, Healey JH (2015) Carbon fiber intramedullary nails reduce artifact in postoperative advanced imaging. Skeletal Radiol 44:1317–1325
147. Zimmer A, Reith W (2011) Sekundärkomplikationen der akuten Subarachnoidalblutung. Radiologe 51:120–125

9 Publikationen

9.1 Publikationen

Development and Evaluation of an MRI Artifact-Free Aneurysm Clip

Sebastian Senger, Gerrit Fischer, Ruben Mühl-Benninghaus, Martin Backens, **Jan René Reisel**, Tobias Fritz, Alexander Brack, Wolfgang Reith, Joachim Oertel

(*Operative Neurosurgery*, online veröffentlicht am 19.12.2023, zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation nur online verfügbar)

9.2 Kongressbeiträge

Jahrestagung der Sektion Vaskuläre Neurochirurgie der DGNC, 2019, Mannheim
sowie

71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 2020, online:
„Development and evaluation of an MRI artifact free aneurysm clip“

(Sebastian Senger, Gerrit Fischer, Ruben Mühl-Bennunghaus, Steffi Urbschat, **Jan René Reisel**, Wolfgang Reith, Joachim Oertel)

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben:

Zuallererst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel. Zum Einen, weil er durch das Überlassen des Themas sowie der Unterstützung bei dessen Bearbeitung diese Arbeit erst ermöglichte. Zum Anderen danke ich ihm für das Vermitteln wichtiger Denk- und Verhaltensweisen des wissenschaftlichen Arbeitens.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Sebastian Senger, möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen. Seine fortwährende Anleitung, Unterstützung und Hilfestellung trugen große Stücke zur Vollendung dieser Arbeit bei und seine freundliche Ermutigung und Motivation halfen mir über so manche Zweifel hinweg. Es war mir eine große Freude mit ihm zusammenzuarbeiten und ich schätze mich glücklich, dass er meine Forschung betreute.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Reith für die gute Zusammenarbeit mit der Klinik für diagnostische und interventionelle Neuroradiologie bei der Durchführung der Versuche zur Bildgebung.

Gleichermaßen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Menger für die Möglichkeit den tierexperimentellen Teil meiner Arbeit im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie durchzuführen. Durch diese Kooperation standen mir nicht nur alle benötigten Geräte und Arbeitsmaterialien in unmittelbarer Nähe zur Tierhaltung zur Verfügung, ich fand in den Mitarbeitern des Instituts auch stets freundliche Ansprechpartner und unkomplizierte Hilfe. Auch ihnen gebührt mein Dank.

Ich möchte auch Frau Prof. Dr. Steffi Urbschat meinen Dank aussprechen. Neben der ausgezeichneten Organisation des Labors und diverser Forschungsprojekte hatte sie stets noch ein offenes Ohr für mich und wusste bei Fragen und Sorgen aller Art weiterzuhelfen und Lösungen zu finden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ruben Mühl-Benninghaus, ehemals tätig in der Klinik für Neuroradiologie, für seine Unterstützung bei der Durchführung und insbesondere für die fachkundige Auswertung der Bildgebung. Sein Beitrag stellt einen zentralen Aspekt dieser Arbeit dar.

Ich danke Frau Sigrid Welsch für die geduldige Einführung in die Laborarbeit im Allgemeinen und die Anleitung bei den verschiedenen Methoden dieser Arbeit im Speziellen sowie die tatkräftige Unterstützung während der gesamten Laborversuche.

Auch Herrn Dr. Arne Wrede vom Institut für Neuropathologie möchte ich an dieser Stelle für seinen kompetenten Rat danken, der im entscheidenden Moment bei der Lösung eines Problems mit der Immunhistochemie eine wichtige Hilfe war.

Ich möchte all jenen, die an der Entwicklung des Clip-Prototyps beteiligt waren, für ihre Arbeit danken, auf die meine Studien letztlich aufbauen konnten.

Ich danke meinen Freundinnen und Freunden, die mir bereits während des Studiums und auch während der Forschungszeit immer zur Seite standen und mich in den richtigen Momenten motivierten, moralisch unterstützten, aufheiterten oder auf andere Gedanken brachten. Sie gaben mir häufig die Kraft, die ich brauchte.

In ganz besonderem Maße möchte ich schließlich meinen Eltern Angelika und Peter Reisel danken. Ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg machte mir all das erst möglich. Ihr Rat und Rückhalt trug wesentlich zum erfolgreichen Abschluss meines Studiums sowie der Vollendung dieser Doktorarbeit bei. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

11 Lebenslauf

**Aus datenschutzrechtlichen Gründen
wird der Lebenslauf in der
elektronischen Fassung der Dissertation
nicht veröffentlicht.**