

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Univ.-Prof Dr. med. Dr. med. dent. Martin Gosau

Polyphosphat beschichtete Seidenmembran als Hämostyptikum in der Oralchirurgie – eine *in vitro* Studie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Zohal Popal
aus Hamburg

Hamburg 2024

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.06.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Katharina Holstein

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ralf Smeets

An die beiden Menschen, die mir diesen Weg ermöglicht haben.
Meine geliebten Eltern, Mashuda und Dawud.

Inhaltsverzeichnis


Publikation	1
Zusammenfassende Darstellung der Publikation	9
1. Einleitung	9
1.1. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Herstellung wässriger Seidenlösungen	13
2.2. Blutentnahmen	14
2.3. Thrombingenerierungs Assay	14
2.4. Polyphosphat-beschichtete Seidenmembran und die Thrombingenerierung	14
2.5. Rasterelektronenmikroskopie	15
2.6. Statistik	15
3. Ergebnisse	15
3.1. Beschichtung von Seidenmembranen mit Polyphosphat	15
3.2. Thrombingenerierung mit Polyphosphat – eine Positivkontrolle	16
3.3. Thrombingenerierung mit unbeschichteter Seidenmembran	18
– eine Negativkontrolle	
3.4. Thrombingenerierung mit Polyphosphat-beschichteter Seidenmembran	18
4. Diskussion	20
4.1. Limitationen der Studie	24
4.2. Schlussfolgerung	26
5. Zusammenfassung (deutsch/englisch)	27
6. Abkürzungsverzeichnis	29
7. Literaturverzeichnis	30
8. Anhang	
8.1. Erklärung Eigenanteil	33
8.2. Danksagung	34
8.3. Lebenslauf	35
8.4. Publikationsverzeichnis	36
8.5. Eidesstaatliche Erklärung	37

RESEARCH

Open Access



Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study

Zohal Popal¹ , Katrin F. Nickel², Michael Wöltje³, Dilbar Aibibu³, Christian Knipfer⁴, Ralf Smeets^{4,5*} and Thomas Renne^{2,6,7}

Abstract

Purpose Post-interventional hemorrhage can result in serious complications, especially in patients with hemostatic disorders. Identification of safe and efficient local hemostatic agents is important, particularly in the context of an ageing society and the emergence of new oral anticoagulants. The aim of this in vitro study was to investigate the potential of silk fibroin membranes coated with the inorganic polymer polyphosphate (polyP) as a novel hemostatic device in oral surgery.

Methods Cocoons of the silkworm *Bombyx mori* were degummed and dissolved. Varying amounts of long-chain polyP (2–2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) were adsorbed to the surface of silk fibroin membranes. Analysis of the procoagulant effect of polyP-coated silk membranes was performed using real-time thrombin generation assays in human plasma. Increasing concentrations of polyP (0.15–500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) served as a positive control, while uncoated silk fibroin membranes were used as negative control.

Results PolyP-coated silk fibroin membranes triggered coagulation when compared to plasma samples and pure silk fibroin membranes. A polyP-dose-dependent effect of thrombin generation could be found with a maximum (ETP = 1525.7 nM·min, peak thrombin = 310.1 nM, time to peak = 9.8 min, lag time = 7.6 min.) at 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ of polymer loading on the silk fibroin membrane surface.

Conclusions In this study, it was demonstrated that silk fibroin membranes coated with polyP have the potential to act as a promising novel hemostatic device.

Keywords Anticoagulants, Fibroin, Hemorrhage, Hemostatic, Oral surgery, Polyphosphate, Silk, Thrombin

*Correspondence:

Ralf Smeets

r.smeets@uke.de

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Graphical Abstract

Key Question

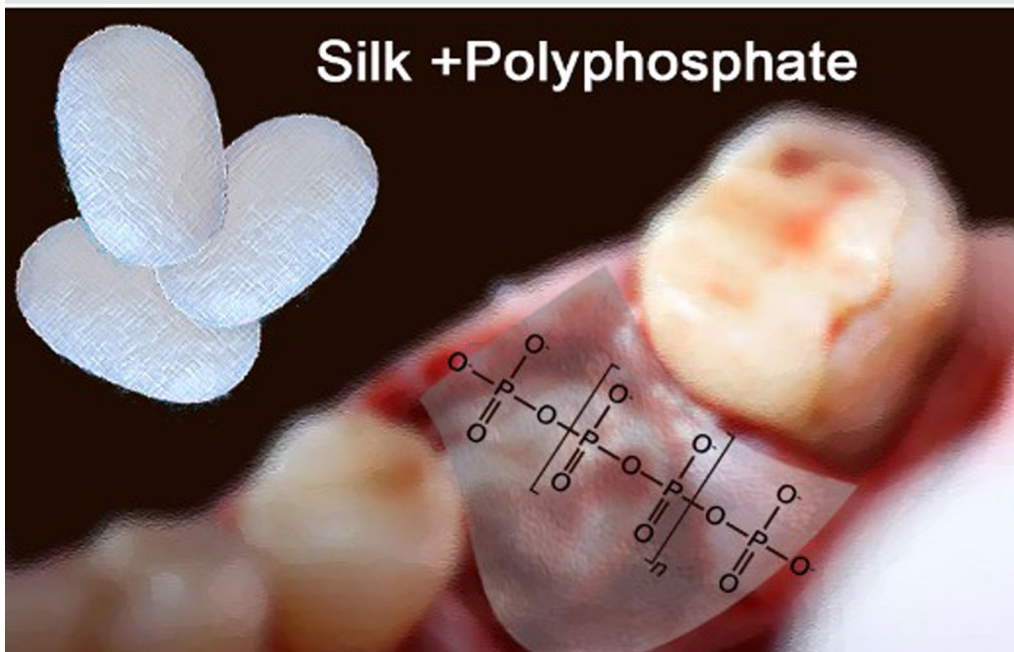
The aim of this *in vitro* study was to investigate the potential of silk fibroin membranes coated with the inorganic polymer polyphosphate (polyP) as a novel hemostatic device in oral surgery.

Key Finding

PolyP-coated silk fibroin membranes triggered coagulation when compared to plasma samples and pure silk fibroin membranes. A polyP-dose-dependent effect of thrombin generation could be found with a maximum (ETP=1525.7 nM·min, peak thrombin=310.1 nM, time to peak=9.8 min., lag time=7.6 min.) at 200 µg/mm² of polymer loading on the silk fibroin membrane surface.

Take Home Message

In this study, it was demonstrated that silk fibroin membranes coated with polyP have the potential to act as a promising novel hemostatic device.



Introduction

Hemostasis is a complex physiological response to prevent blood loss from injured vessels. Initially, platelets adhere to the vascular injury, become activated, and form a platelet plug that seals the injury (primary hemostasis). Fibrin produced by the blood coagulation systems stabilizes the clot (secondary hemostasis). The hemostatic machinery, which includes both pathways that interact simultaneously in the process of primary and secondary hemostasis, stops bleeding from minor wounds and contributes to wound healing [1]. However, severe trauma associated with major vascular injury can result in life-threatening blood loss [2]. In particular, patients

with hereditary or acquired hemostatic disorders are at increased risk of bleeding and require immediate and specific treatment. Similarly, patients on anticoagulant medications have impaired hemostatic capacity and are prone to persistent local bleeding [3]. In recent years, new types of anticoagulants have been introduced. However, their impact on spontaneous and post-operative bleeding has not been fully elucidated. Therefore, in an ageing society where both the number of surgical interventions and the number of patients being treated with oral anticoagulants are increasing, efficient strategies for local support of hemostasis are needed. The rapid and efficient administration of potent topical medications

for hemostasis is hence becoming increasingly important for surgical patients, especially during anticoagulant therapy [3]. Post-interventional bleeding is frequently observed as an adverse complication in oral surgery [4]. Oral wounds are particularly susceptible to bleeding due to dense blood supply, mechanical stress from chewing, breathing and articulation. In addition, they are exposed to fluids such as saliva and the physiological oral microbiome. Furthermore, the tissue of the upper gastrointestinal tract has a high fibrinolytic activity and thus an increased capability to dissolve already formed blood clots during hemostasis [5]. Overall, the specific oral environment has a strong influence on hemostasis and wound healing. The recently published guideline of the German Society for Dental, Oral and Maxillofacial Medicine (DGZMK) emphasizes the advantages of local topical hemostasis in oral surgery, especially for patients taking anticoagulant drugs [6]. In contrast, intervention with systemic hemostasis by administration of pro-coagulant or anti-fibrinolytic drugs remains under debate [6]. Treatment strategies for oral bleedings include bypass agents, such as recombinant factor VIIa (rFVIIa), activated prothrombin complex concentrates (aPCC, e.g., Factor VIII Inhibitor Bypassing Activity [FEIBA]), or fibrin sealants (fibrin glue). The latter reproduce the final stage of the coagulation cascade and subsequently the formation of a fibrin clot [7]. While these agents have potent hemostatic capacity and interfere with bleeding, the administration of current topical hemostatic medications is associated with an array of adverse side effects, including compromised local wound healing [8, 9], local inflammation [8–11], anaphylactic reactions [8, 11, 12], formation of heat that can lead to burn injuries [13], risk of disease transmission [14] and high costs [8, 9]. Overall, post-operative local hemostasis remains a challenge in patients undergoing oral surgery, especially while receiving anticoagulation therapy or when hemostatic abnormalities are present. To date, none of the currently available topical hemostatic agents meet the criteria for a low-risk, effective, and safe local hemostasis. Polyphosphate (polyP) is an inorganic, negatively charged polymer composed of orthophosphate residues linked by phosphoanhydride bonds. PolyP is abundant in nature, regulated by phosphate-homeostasis [15], non-immunogenic, degraded in plasma by endogenous phosphatases with a half-life of about 90 min, is inexpensive, and is easy to store and apply. Recently, the polymer has gained interest with regard to local hemostasis. PolyP is a procoagulant by several fibrin-forming mechanisms. In vivo, polyP contact-activates factor XII (FXII) to activated FXII (FXIIa) which in turn triggers the “intrinsic” pathway of blood coagulation [16–18]. Animal studies and experiments with human plasma have shown that

the pharmacological inhibition of FXIIa and its activator polyP is associated with thromboprotection without increased clinical bleeding [19–22]. Moreover, in vitro studies suggest that polyP contributes to fibrin formation by accelerating thrombin-dependent activation of factor XI and factor V, as well as von Willebrand factor binding. It also decreases fibrinolysis and stabilizes the fibrin clot [23]. PolyP is produced in bulk form as a powder. For utilization as a local hemostatic agent in routine clinical practice, an improved method for defined application is required, e.g., a carrier material must be coated with polyP. In recent years, silk fibroin has gained importance in regenerative medicine research and is currently being investigated in various forms such as sponges, hydrogels, electrospun fibers, tubes or membranes [24]. Due to its mechanical versatility and high cytocompatibility [25–27] silk appears to be a suitable carrier for hemostatic agents. The aim of this feasibility study is to evaluate the potential of silk membranes coated with polyP for local hemostasis in vitro.

Materials and methods

Preparation of aqueous silk solution

Silk fibroin was isolated from cocoons of the larvae of the silk moth *Bombyx mori*. Silk cocoons were cut into small pieces and boiled for 30 min in 0.02 M Na₂CO₃. This process removes sericin from the silk fibroin fibers [24]. Then, silk fibroin fibers were dissolved in Ajisawa's reagent at 60 °C for 4 h [28]. After complete dissolution of the silk fibroin fibers, the silk solution was dialyzed using a cellulose semi-permeable membrane (molecular weight cutoff: 10 kDa). The silk fibroin solution was dialyzed using a stepwise protocol published by Zheng et al. (2016) in which the dialysis tube was placed in 100 parts of 4 M urea solution for 3 h with slow stirring, followed by changing the solution to 100 parts of 2, 1 M urea and finally water for 3 h, respectively [29].

Fabrication of the polyP-coated silk membranes

Varying amounts of long-chain polyP with an average chain length of >1000 Pi (Phoskudent M, BK Giulini GmbH, Ladenburg, Germany) were homogeneously coated on the surface of 6-well culture plates (surface area: 9.6 cm²). Then, 1.8 ml of aqueous silk fibroin solution (9% weight by volume) was added to each well and during incubation for 48 h at room temperature in a safety cabinet, the water evaporated, leaving a membrane that physically tethered the polyP to the membrane surface.

Blood collection

Peripheral venous blood was obtained from members of the study group and stored in 3.2% trisodium citrate

(9:1 blood-to-citrate ratio). The tubes were centrifuged at 3000×g for 10 min twice at room temperature before platelet-poor plasma (PPP) was drawn off the upper portion using a pipette. The PPP was stored frozen at -20°C and thawed at 37°C before use.

Real-time thrombin formation

Thrombin formation in real-time was analyzed using the Calibrated Automated Thrombin Generation Assay (CAT) in a Fluoroscan Ascent fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a dispenser (Thromboscope BV, Maastricht, The Netherlands) as described [30]. The CAT method, developed by Hemker et al., uses a fluorogenic thrombin substrate, which allows real-time thrombin detection in platelet-poor and platelet-rich plasma samples [31]. The experiments were measured in a 96-well plate fluorometer. The Thrombin Calibrator (TC), dispensed into the first two wells together with plasma, was used as a reference for the Thromboscope to calculate the molar concentration of thrombin in our test wells against the calibrator. Thrombin formation was quantified using the Thromboscope software package (Version 3.0.0.29). After the measurement, the program expresses the results of thrombin activity. The area under the curve, i.e., the endogenous thrombin potential (ETP) indicates the total thrombin-forming capacity in nanomolar (nM) versus time, while the peak thrombin value indicates the maximum thrombin concentration reached. Time to peak (ttPeak) is defined as the minute the thrombin generation reaches peak height. Furthermore, the lag time defines the time until 1/6 of the peak height is reached and thus represents the initiation phase of coagulation. All data were collected from two independent experiments in duplicates and expressed as a mean value \pm standard deviation (SD), unless otherwise indicated.

PolyP membrane-driven thrombin generation

Silk fibroin membranes coated with polyP were cut into 3×3 mm pieces with a scalpel. 80 μl PPP, 10 μl MP Reagent (Thromboscope BV, 4 μM final phospholipid concentration) and 10 μl PBS with pieces of silk membranes coated with increasing polyP concentrations (2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 6 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 20 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 60 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 600 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ and 2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) were added into each well. After addition of 20 μl FluCa (containing 2.5 nM fluorogenic substrate and 100 mM calcium chloride), a solution automatically dispensed by the machine, which initiates the coagulation reaction, the final volume amounted to 120 μl in each well. Uncoated silk fibroin membranes functioned as negative controls. For positive control we used 80 μl PPP together with 10 μl phospholipids and stimulated it with 10 μl polyP (Phoskudent M)

in solution, leading to final concentrations of 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Scanning electron microscopy (SEM)

PolyP distribution and silk fibroin membrane structure were evaluated using a Quanta™ 250 FEG ESEM scanning electron microscope (FEI Company, USA).

Results

The distribution of polyP within the silk fibroin membrane was investigated by scanning electron microscopy (SEM). As shown in Fig. 1, there is a polyP phase with a smooth surface on the upper side of the functionalized membrane. The lower part of the membrane consists of pure silk fibroin protein. The polyP particles are physically bound to the membrane by the silk fibroin protein solution after the aqueous part is evaporated. In this way, a two-phase membrane is formed, consisting of a polyP layer on one side and a pure silk layer on the other side.

To analyze the procoagulant activity of polyP-coated silk fibroin membranes, we performed real-time thrombin generation assays in human plasma in the absence or presence of pure polyP and silk fibroin membranes coated with increasing concentrations of polyP. First, we stimulated plasma with pure polyP in increasing concentrations. Concentrations of 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyP potently initiated thrombin generation leading to an ETP of 1544.3 nM·min, peak thrombin of 382.9 nM, t_{peak} of 8 min and lag time of 6.3 min. In contrast, polyP with the lowest concentration tested (0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) generated an ETP of 980.6 nM·min, peak thrombin of 107 nM, time to peak of 21.7 min and lag time of 17 min (Fig. 2, Table 1). PolyP-coated silk fibroin membranes with a polyP surface-amount of 6–600 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ were procoagulant compared to pure silk fibroin membranes (Fig. 3). Higher quantities of polyP (2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) did not lead

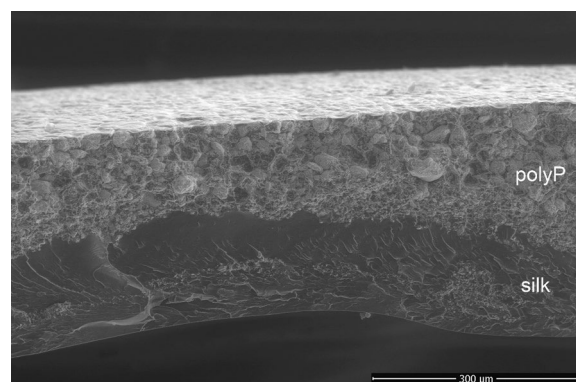


Fig. 1 Cross-section of a polyP-functionalized silk fibroin membrane (polyP: 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$)

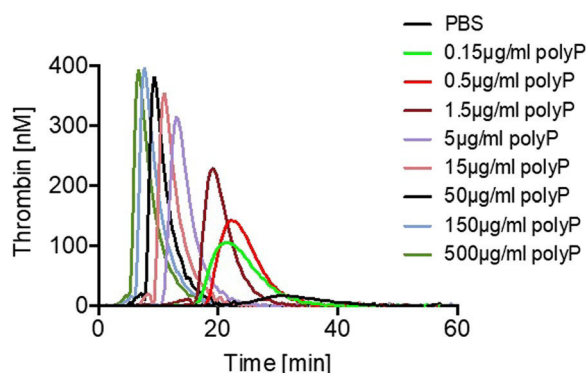


Fig. 2 Real-time thrombin generation initiated by pure polyP increasing concentrations in human plasma. (n = 1 in duplicates)

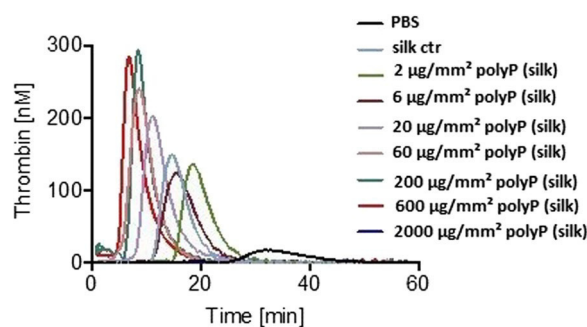


Fig. 3 Thrombin generation in real time triggered by polyP-functionalized silk fibroin membranes (n = 2, in duplicates)

to a stronger procoagulant effect in vitro. The procoagulant activity even decreased with higher polyP amounts on the membrane surface, most likely through complex formation with calcium ions, which effectively interrupts thrombin production. The thrombin generation triggered by polyP-coated silk fibroin membranes reached its maximum at a polyP amount of 200 µg/mm² (ETP of 1525.7 nM·min), before it decreases with 600 µg/mm² (ETP of 1339.3 nM·min). Figure 3 demonstrates thrombin generation in silk fibroin membrane-induced plasma under increasing polyP amounts on silk fibroin membrane surfaces.

Thrombin generation was increased in plasma samples with polyP-coated silk fibroin membranes compared to buffer-treated normal plasma (Table 2). Functionalized silk fibroin membranes with a polyP amount of 200 µg/mm² initiated the highest amount of thrombin reaching an ETP of 1525.7 nM·min and peak thrombin of 310.1 nM (Fig. 3). Consistently, lag time (7.6 min in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs 23.3 min in buffer-treated PPP) was shortened by 67% while time to peak (9.8 min in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs. 28.8 min in PPP) was shortened by 66%. Accordingly, peak thrombin (310.1 nM in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs. 52.3 nM in PPP) was significantly increased by 5.96-fold

and total thrombin, i.e., ETP (1525.7 nM·min in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs. 519.2 nM·min in PPP) was also increased by 2.94-fold, in samples compared to plasma controls (Table 2).

For negative control, plasma was stimulated with uncoated silk fibroin membranes. The results of pure silk fibroin membranes compared to 200 µg/mm² silk + polyP were as follows: respectively, lag time (7.6 min in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs 12.8 min in silk fibroin controls) was shortened by 41% and time to peak (9.8 min in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs. 15.3 min in silk fibroin controls) was shortened by 36%. Accordingly, peak thrombin (310.1 nM in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs. 198.4 nM in silk controls) was increased by 1.57-fold and total thrombin, i.e., ETP (1525.7 nM·min in 200 µg/mm² polyP-coated membranes vs. 955.5 nM·min in silk fibroin controls) was also increased by 1.6-fold, in samples compared to uncoated silk fibroin membranes (Table 2). Both uncoated silk fibroin and buffer-treated normal plasma showed lower total (endogenous thrombin potential) and maximum (peak) thrombin formation, and extended time to peak and lag time, compared to polyP-coated silk fibroin membranes (Table 2, Fig. 3). In turn, uncoated silk fibroin alone shows a low procoagulant activity, compared to buffer-treated plasma samples (Table 2, Fig. 3).

Table 1 PolyP-driven thrombin generation of polyP control

	0.15	0.5	1.5	5	15	50	150	500
	µg/ml polyP							
ETP (nM·min)	980.6±201	1108.9±75	1246.8±79	1398.5±76	1398.9±44	1453.9±23	1544.3±55	1522.4±3.1
Peak thrombin (nM)	107±31	143±14	236.6±48	316.4±17	351.7±11	367.6±10	382.9±18	374.6±5.3
Time to peak (min)	21.7±2.3	22.5±0.5	19.5±1.2	13.2±1.5	11±1	9.7±0	8±0.3	7.2±0.2
Lag time (min)	17±2	18.7±0.7	16.7±1.7	11±1.3	9.2±1.2	8±0	6.3±0.3	5.5±0.2

Comparison of thrombin formation in plasma stimulated by increasing concentrations of pure polyP
 Values are expressed as mean ± SD, n = 1 in duplicates

Table 2 PolyP-driven thrombin generation of functionalized silk fibroin membranes

	Plasma with buffer (PPP)	Silk control	$\mu\text{g}/\text{mm}^2$ silk + polyP						
			2	6	20	60	200	600	2000
ETP (nM·min)	519.2 ± 413	955.5 ± 119	970.6 ± 170	1098 ± 310	1279.9 ± 183	1391.2 ± 160	1525.7 ± 227	1339.3 ± 9	-1
Peak thrombin (nM)	52.3 ± 50	198.4 ± 70	175.9 ± 53	207.8 ± 119	246.2 ± 51	267.3 ± 38	310.1 ± 27	243.4 ± 56	-1
Time to peak (min)	28.8 ± 7	15.3 ± 1.4	17.1 ± 5	13.1 ± 6	11.8 ± 1.8	10.2 ± 0.5	9.8 ± 0.7	8.9 ± 0.6	-1
Lag time (min)	23.3 ± 6	12.8 ± 0.7	14 ± 4	10 ± 4	9.1 ± 1.5	7.4 ± 0.1	7.6 ± 0.6	6.8 ± 0.4	-1

Comparison of thrombin formation in normal platelet-poor plasma, silk fibroin membrane-induced plasma and polyP-coated silk fibroin membrane-induced plasma
 PPP, platelet-poor plasma; silk + polyP, 3 × 3 mm silk fibroin membranes coated with polyP
 Values are expressed as mean ± SD, n = 2 in duplicates

Discussion

The FXII activator polyP is biocompatible, inexpensive, non-immunogenic, and degradable by endogenous phosphatases. [32]. PolyP initiates fibrin formation in plasma treated with anticoagulants [33] and normalizes defective fibrin formation in plasma samples from patients with inherited platelet disorders [16], suggesting that the polymer could be used as a hemostatic agent. Indeed, the addition of synthetic polyP with a chain length of 75 phosphate subunits has been shown to reduce clotting times in plasma samples from hemophilia A and B patients [33] and in PRP from individuals with Hermansky–Pudlak syndrome, suggesting that the polymer may restore defective coagulation ability in these disorders. Several in vivo and in vitro experiments have demonstrated the critical role of the polyP/FXII-mediated coagulation in thromboembolic disorders [22, 34–36]. In addition to polyP, multiple other FXII contact activators have been identified such as RNA, collagen, and neutrophil cellular traps (NETs) [32]. Conversely, polyP contributes to the procoagulant activity of NETs [37]. However, the specific mechanisms of FXII contact activation are still unclear. Deletion mutants have recently shown that polyP activates FXII by binding to its proline-rich domain (PR-III) [32]. Although the PR-III region is essential for surface-induced activation of FXII, its absence still allows protease-mediated FXII activation in solution. Additionally, the transmembrane protein XPR1 (xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1) has been shown to function as a major phosphate exporter in platelets and thus plays a significant role in the regulation mechanisms of phosphate hemostasis and thrombosis formation [15].

In vitro experiments have shown that the ability to activate FXII increases with the chain length of synthetic polyP [38], however, in vivo polyP forms Ca²⁺-rich nanoparticles that are insoluble [18], and upon release remain retained on the plasma membrane surface of platelets, platelet-derived microparticles and cancer-released extracellular vesicles. These natural Ca²⁺/polyP aggregates initiate the procoagulant and proinflammatory

FXII-driven contact system independently of the chain length of the individual polyP polymer packed into nanoparticles. Supporting the hypothesis that polyP functions via activation of FXII, an array of polyP inhibitors interfere with thrombosis while sparing hemostasis thereby mimicking the effect of FXII neutralizing agents, recently reviewed in [39].

In order to apply and localize polyP to wounds without the risk of being washed out by wound secretions and blood, a support device is required to keep the polyP at the wound site. The results of the experiments presented support the hypothesis that a silk fibroin matrix is a promising candidate for such a support device.

Results from a mouse injury model showed that silk fibroin can activate the “intrinsic” coagulation pathway and thus reduce bleeding time [40]. Consistent with these results, silk fibroin as a control without polyP is already a mild procoagulant (Fig. 3). The prospects of silk fibroin scaffolds in combination with oxidized cellulose have been investigated with respect to their wound healing promoting properties [41]. Both properties provide an essential basis for the present approach. Evaluation of the procoagulant activity of silk fibroin membranes functionalized with polyP in vitro is a key factor in assessing further perspectives in this field. In the present pilot study, silk fibroin membranes were coated with increasing amounts of polyP and their procoagulant potential was investigated in vitro. The results of the study suggest that the procoagulant effect depends on the amount of polyP used as a coating for the silk fibroin carrier. PolyP-coated silk fibroin membranes show an increase in thrombin generation with increasing amounts of polyP. The dose-dependent thrombin generation with polyP-coated silk fibroin membranes reached its maximum at a polyP amount of 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. However, higher polyP quantities do not necessarily imply a higher procoagulant activity. The results of pure polyP compared to the silk fibroin samples showed that polyP-coated silk fibroin membranes with an amount of 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ polyP generate

similar amounts of thrombin (ETP 1525.7 nM·min, peak 310.1 nM) and thus, have a procoagulant effect similar to 150 µg/ml pure polyP (ETP 1544.3 nM·min, peak 382.9 nM) (Tables 1 and 2). The preliminary results of the current study cannot quantify the exact amount of polyP presented on the surface of the silk fibroin carrier membrane, and thus no information can be obtained about the active polyP molecules in the coating that lead to thrombin generation. Practically, this study cannot quantify the effective amount of the active polyP molecules attached to the silk fibroin membrane surface. Nevertheless, the proposed method allows a homogeneous distribution of polyP in silk fibroin up to 600 µg/mm², while higher amounts lead to an inhomogeneous distribution. Recent studies have demonstrated the presence of polyP on the surface of activated platelets, stored together with Ca²⁺-ions, showing release mechanisms and deposition of polyP [18]. Thus, only small amounts of the poorly soluble calcium-polyP complexes are released from the platelet plasma membrane, while the majority remains attached [18, 42]. Further dose-finding studies are needed to quantify the optimal amount for homogeneous and efficient polyP coating of the silk fibroin carrier membrane.

In conclusion, we have demonstrated the prospect of polyP-functionalized silk fibroin membranes as a promising straightforward approach for local hemostasis *in vitro*. By coating silk fibroin membranes with polyP, the potential for an innovative local wound dressing for hemostasis *in situ* has been explored and offers good prospects for further investigation.

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

Conceptualization: MW, RS and TR; investigation, ZP, KFN, MW; data analysis and validation, ZP, MW, RS, D.A., C.K.; writing—original draft preparation, ZP, CK; writing—review and editing, ZP, MW, KFN, CK, R.S., TR; Figures and Tables, ZP, KFN, MW. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript. The scientific integrity of all data shown is in the sole responsibility of the corresponding author RS.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. T.R. acknowledges the German Research Foundation (Grants A11/SFB877 and P6/KFO 306) for funding of his experimental part. M.W. and R.S. received no external funding.

Availability of data and materials

Z.P. and R.S. declare that all data supporting the findings of this study are available within the article and from R.S. upon request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The human plasma used in our studies was obtained by K.F.N. from Z.P. after verbal consent. The Local ethics committee, medical association of Hamburg, considers the project presented to be ethically unobjectionable (case number: 2023-300354-WF).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Anesthesiology, Center of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ²Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ³Institute of Textile Machinery and High-Performance Material Technology, TUD Dresden University of Technology, Dresden, Germany. ⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁵Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Regenerative Orofacial Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁶Center for Thrombosis and Hemostasis (CTH), Johannes Gutenberg University Medical Center, Mainz, Germany. ⁷Irish Centre for Vascular Biology, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland.

Received: 16 April 2023 Accepted: 4 October 2023

Published online: 17 November 2023

References

- O'Donnell JS, O'Sullivan JM, Preston RJS. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br J Haematol*. 2019;186:24–36. <https://doi.org/10.1111/bjh.15872>.
- Simmons JW, Pittet JF, Pierce B. Trauma-induced coagulopathy. *Curr Anesthesiol Rep*. 2014;4:189–99. <https://doi.org/10.1007/s40140-014-0063-8>.
- Franchini M, Mengoli C, Cruciani M, Bonfanti C, Mannucci PM. Effects on bleeding complications of pharmacogenetic testing for initial dosing of vitamin K antagonists: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2014;12:1480–7. <https://doi.org/10.1111/jth.12647>.
- Kamoh A, Swantek J. Hemostasis in oral surgery. *Dent Clin North Am*. 2012;56:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2011.06.004>.
- Cox HT, Poller L, Thomson JM. Evidence for the release of gastric fibrinolytic activity into peripheral blood. *Gut*. 1969;10:404–7. <https://doi.org/10.1136/gut.10.5.404>.
- Kämmerer P, A.-N.B. S3-Leitlinie - Zahnärztliche Chirurgie unter oraler Antikoagulation/Thrombozytenaggregationshemmung. AWMF-Registernummer: 083–018. 2018.
- Mooney E, Loh C, Pu LLQ. The use of fibrin glue in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124:989–92. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181b039a3>.
- Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *J Artif Organs*. 2005;8:137–42. <https://doi.org/10.1007/s10047-005-0296-x>.
- Achneck HE, Sileshi B, Jamiolkowski RM, Albala DM, Shapiro ML, Lawson JH. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. *Ann Surg*. 2010;251:217–28. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181c3bcca>.
- Samudrala S. Topical hemostatic agents in surgery: a surgeon's perspective. *Aorn J*. 2008;88:S2–11. [https://doi.org/10.1016/s0001-2092\(08\)00586-3](https://doi.org/10.1016/s0001-2092(08)00586-3).
- Beierlein W, Scheule AM, Antoniadis G, Braun C, Schosser R. An immediate, allergic skin reaction to aprotinin after reexposure to fibrin sealant. *Transfusion*. 2000;40:302–5. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.4003032.x>.
- Oswald AM, Joly LM, Gury C, Disdet M, Leduc V, Kanny G. Fatal intraoperative anaphylaxis related to aprotinin after local application of fibrin glue. *Anesthesiology*. 2003;99:762–3. <https://doi.org/10.1097/00000542-200309000-00053>.
- Wright JK, Kalns J, Wolf EA, Traweek F, Schwarz S, Loeffler CK, Snyder W, Yantis LD Jr, Eggers J. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. *J Trauma*. 2004;57:224–30. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000105916.30158.06>.

14. Hino M, Ishiko O, Honda KI, Yamane T, Ohta K, Takubo T, Tatsumi N. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. *Br J Haematol*. 2000;108:194–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2414.2999.01818.x>.
15. Mailer RK, Allende M, Heestermans M, Schweizer M, Deppermann C, Frye M, Pula G, Odeberg J, Gelderblom M, Rose-John S, et al. Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 regulates procoagulant platelet polyphosphate. *Blood*. 2021;137:1392–405. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004617>.
16. Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renne T. Platelet polyphosphates are pro-inflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 2009;139:1143–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.001>.
17. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:903–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507195103>.
18. Verhoef JJ, Barendrecht AD, Nickel KF, Dijkxhoorn K, Kenne E, Labberton L, McCarty OJ, Schiffelers R, Heijnen HF, Hendrickx AP, et al. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*. 2017;129:1707–17. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-734988>.
19. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renne T. Factor XII contact activation. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43:814–26. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1598003>.
20. Bickmann JK, Baglin T, Meijers JCM, Renne T. Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk. *Curr Opin Hematol*. 2017;24:419–26. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000367>.
21. Wheeler AP, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation as a target for antithrombotic therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30:1099–114. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.05.007>.
22. Labberton L, Kenne E, Long AT, Nickel KF, Di Gennaro A, Rigg RA, Hernandez JS, Butler L, Maas C, Stavrou EX, et al. Neutralizing blood-borne polyphosphate in vivo provides safe thromboprotection. *Nat Commun*. 2016;7:12616. <https://doi.org/10.1038/ncomms12616>.
23. Baker CJS, Stephanie A, Morrissey JH. Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation. *Res Pract Thromb and Haemos*. 2019. <https://doi.org/10.1038/ncomms12616>.
24. Rockwood DN, Preda RC, Yucel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat Protoc*. 2011;6:1612–31. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>.
25. Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, Kim TI, Park YJ, Seol YJ, Lee YM, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol*. 2005;120:327–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.033>.
26. Smeets R, Knabe C, Kolk A, Rheinneckner M, Grobe A, Heiland M, Zehbe R, Sachse M, Grosse-Siestrup C, Woltje M, et al. Novel silk protein barrier membranes for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105:2603–11. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33795>.
27. Chen L, Liu HL, Gu Y, Feng Y, Yang HL. Lumbar interbody fusion with porous biphasic calcium phosphate enhanced by recombinant bone morphogenetic protein-2/silk fibroin sustained-released microsphere: an experimental study on sheep model. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26:126. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5463-x>.
28. Ajisawa A. Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution. *J Seric Sci Jpn*. 1998;67:91–4. <https://doi.org/10.11416/kontyushigen1930.67.91>.
29. Zheng Z, Guo S, Liu Y, Wu J, Li G, Liu M, Wang X, Kaplan D. Lithium-free processing of silk fibroin. *J Biomater Appl*. 2016;31:450–63. <https://doi.org/10.1177/0885328216653259>.
30. Nickel KF, Ronquist G, Langer F, Labberton L, Fuchs TA, Bokemeyer C, Sauter G, Graefen M, Mackman N, Stavrou EX, et al. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood*. 2015;126:1379–89. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-622811>.
31. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:4–15. <https://doi.org/10.1159/000071636>.
32. Heestermans M, Naudin C, Mailer RK, Konrath S, Klaetschke K, Jamsa A, Frye M, Deppermann C, Pula G, Kuta P, et al. Identification of the factor XII contact activation site enables sensitive coagulation diagnostics. *Nat Commun*. 2021;12:5596. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25888-7>.
33. Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate as a general procoagulant agent. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1750–6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03104.x>.
34. Smith SA, Choi SH, Collins JN, Travers RJ, Cooley BC, Morrissey JH. Inhibition of polyphosphate as a novel strategy for preventing thrombosis and inflammation. *Blood*. 2012;120:5103–10. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-444935>.
35. Matafonov A, Leung PY, Gailani AE, Grach SL, Puy C, Cheng Q, Sun MF, McCarty OJ, Tucker EI, Kataoka H, et al. Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood*. 2014;123:1739–46. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-499111>.
36. Travers RJ, Shenoi RA, Kalathottukaren MT, Kizhakkedathu JN, Morrissey JH. Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. *Blood*. 2014;124:3183–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-577932>.
37. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SH, Weitz JI, Liaw PC. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1977–84. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.114.304114>.
38. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Reinstra CM, Morrissey JH. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*. 2010;116:4353–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-266791>.
39. Huang WC, Mailer RK, Renné T. In-vivo functions and regulation of polyphosphate in the vascular system. *Curr Opin Hematol*. 2023. <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000771>.
40. Lei C, Zhu H, Li J, Feng X, Chen J. Preparation and hemostatic property of low molecular weight silk fibroin. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27:403–18. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1136918>.
41. Shefa AA, Amirian J, Kang HJ, Bae SH, Jung HI, Choi HJ, Lee SY, Lee BT. In vitro and in vivo evaluation of effectiveness of a novel TEMPO-oxidized cellulose nanofiber-silk fibroin scaffold in wound healing. *Carbohydr Polym*. 2017;177:284–96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.130>.
42. Wijeyewickrema LC, Lameignere E, Hor L, Duncan RC, Shiba T, Travers RJ, Kapopara PR, Lei V, Smith SA, Kim H, et al. Polyphosphate is a novel cofactor for regulation of complement by a serpin, C1 inhibitor. *Blood*. 2016;128:1766–76. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-699561>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

Zusammenfassende Darstellung der Publikation

Die vorliegende Dissertation beruht auf den Ergebnissen der durchgeführten experimentellen Arbeit im Labor der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Dresden. Die Ergebnisse wurden in dem international anerkannten peer-reviewed Journal *International Journal of Implant Dentistry* veröffentlicht, in welchem vor allem grundlagenwissenschaftliche Thematiken mit klinischem Fokus publiziert werden. Der Titel der Originalarbeit ist *Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study* (doi: 10.1186/s40729-023-00503-0).

1. Einleitung

In Deutschland werden jährlich über 15,9 Millionen operative Eingriffe bei stationären Patienten und Patientinnen durchgeführt (Radtko, 2024). Von diesen erhält ein Großteil eine orale Antikoagulation oder Thrombozytenaggregationshemmer. In der Gesamtbevölkerung in Deutschland wurden demnach für das Jahr 2020 2.5 Millionen Patienten und Patientinnen mit einer oralen Antikoagulation (OAK) und 500.000 mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelt (Aulinger et al., 2022). Folglich ist das Thema der postoperativen Blutung von hoher klinischer Relevanz, da diese zum einen chirurgisch bedingt zum anderen durch Patienten und Patientinnen spezifische Risikofaktoren verursacht sein können. Dies spiegelt sich beispielsweise in der S3-Leitlinie zur zahnärztlichen Chirurgie unter oralen Antikoagulation/Thrombozytenaggregationshemmung wider, die unter zahnärztlichen Eingriffen die Fortführung einer Monotherapie empfehlen. Bei dualer Thrombozytenaggregationshemmung oder *Triple Therapie* sollte Rücksprache mit dem behandelnden Hausarzt oder Gerinnungsspezialisten gehalten werden oder die Versorgung mit erweiterten Nachsorgemöglichkeiten bzw. unter stationären Kautelen durchgeführt werden (Kämmerer and Al-Nawas, 2017)

Die Indikationen für die Therapie mit OAK ist häufig Bestandteil der Behandlung vital gefährdender Erkrankungen wie zum Beispiel des Herzinfarkts oder Schlaganfalls. Um möglichst nicht in dieses Therapieregime und die komplexen postoperativen gerinnungsphysiologischen Prozesse einzugreifen, erscheinen Maßnahmen zur sicheren und lokalen Blutstillung in besonderem Maße relevant. Diese Maßnahmen sollen die körpereigene Reaktion auf eine Gefäßläsion unterstützen. Diese besteht aus der primären und sekundären Hämostase. Bei der primären Hämostase haften Thrombozyten an der

Gefäßläsion an, werden dabei aktiviert und führen zu einer ersten Koagelbildung. Diese Blutkoagel werden nachfolgend durch Fibrin stabilisiert, welches als sekundäre Hämostase bezeichnet wird. Diese Mechanismen können bei Patienten und Patientinnen mit angeborenen Gerinnungsstörungen, wie zum Beispiel der Hämophilie A und B, sowie mit erworbenen Gerinnungsstörungen wie zum Beispiel den oben erwähnten Patienten und Patientinnen mit OAK oder Thrombozytenaggregationshemmern, zu vermehrten und andauernden postoperativen Blutungen führen (Franchini et al., 2014). Neben diesen angeborenen und erworbenen Störungen bringt die Oralchirurgie selbst Risiken mit sich (Kamoh and Swantek, 2012). Wunden im Oropharynx sind besonders blutungsgefährdet, da dort eine hohe Dichte an Blutgefäßen besteht, sowie ein hoher mechanischer Stress durch die Kaubewegungen, die Atmung und den Sprechakt entsteht. Darüber hinaus sind diese Wunden einem enzymreichen Speichel und dem physiologischen oralem Mikrobiom ausgesetzt. Des Weiteren kommt hinzu, dass das Gewebe des oberen Gastrointestinaltraktes eine hohe fibrinolytische Aktivität und damit auch eine hohe Kapazität aufweist, Blutgerinnsel wieder aufzulösen (Cox et al., 1969). Daher betont die bereits erwähnte S3-Leitlinie den Einsatz lokaler, topischer, gerinnungshemmender Maßnahmen in der oralen Chirurgie. Eine häufig verwendete Maßnahme zur lokalen Blutstillung ist die Verwendung von Fibrinkleber zur Unterstützung der sekundären Hämostase und damit der Klotbildung und Stabilisierung (Mooney et al., 2009). Maßnahmen zur lokalen Blutstillung umfassen das Einbringen von gerinnungsaktivem Fremdmaterial wie beispielsweise Schwämmen auf Kollagen- oder Gelatine-Basis oder gerinnungsaktiven Substanzen wie Antifibrinolytika (Tranexamsäure, Aprotinin). Die bisher klinisch angewendeten Maßnahmen zur lokalen Blutstillung sind jedoch nicht frei von Nebenwirkungen. Diese können unter anderem eine gestörte Wundheilung (Tomizawa, 2005, Achneck et al., 2010), lokale Entzündungsreaktionen (Tomizawa, 2005, Achneck et al., 2010, Samudrala, 2008, Beierlein et al., 2000) oder allergische Reaktionen sein (Tomizawa, 2005, Beierlein et al., 2000, Oswald et al., 2003), sowie Hitzeentwicklung, die zu Verbrennungen führen kann (Wright et al., 2004). Ferner sind die Maßnahmen häufig mit hohen Kosten vergesellschaftet (Tomizawa, 2005, Achneck et al., 2010).

Somit erfüllt keine der bislang eingesetzten lokalen Blutstillungsmaßnahmen die Kriterien einer idealen lokalen Blutstillung, welche effektiv, risikoarm, sicher und kostengünstig sein sollte.

Polyphosphat (polyP) ist ein anorganisches, negativ geladenes Polymer, welches aus Orthophosphat-Anteilen besteht, die über Phosphoanhydrid-Bindungen verbunden sind. Es kommt in der Natur ubiquitär vor und wird im Plasma durch endogene Phosphatasen abgebaut, so dass eine Halbwertszeit von 90 Minuten besteht (Mailer et al., 2021, Hino et

al., 2000). Im Plasma ist das polyP gerinnungsaktiv, nicht jedoch immunaktiv. PolyP ist über verschiedene Mechanismen, bei denen es zu einer Interaktion mit Fibrin kommt, prokoagulativ. *In vivo* führt der Kontakt von Faktor XII (FXII) mit polyP zu seiner Aktivierung (Faktor XIIa), welches wiederum in einer Stimulation der *intrinsischen* Gerinnungskaskade resultiert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass polyP auch die Fibrinbildung unterstützt, in dem es die thrombinabhängige Aktivierung der Faktoren XI (FXI) und V (FV) sowie des Von-Willebrand-Faktors (vWF) beschleunigt. Darüber hinaus reduziert es die Fibrinolyse und stabilisiert so das Fibringerinnsel (Baker et al., 2019). Trotz seiner vielfältigen prokoagulativen Wirkungsweisen scheint polyP nicht zu lokaler Embolisierung zu führen. Eine pharmakologische Inhibition von FXIIa und seines Aktivators polyP führte laut *in vivo* Studien zu einer Thrombozytenprotektion ohne erhöhtes Blutungsrisiko (Naudin et al., 2017, Bickmann et al., 2017, Wheeler and Gailani, 2016, Labberton et al., 2016). PolyP ist somit für die lokale Blutstillung eine attraktive und zugleich kostengünstige Substanz.

Für die klinische Anwendbarkeit ist zu überlegen, ob diese Substanz als Lösung oder mit einem Träger in die Wunde eingebracht wird. Als möglicher Träger für polyP könnte Seide verwendet werden, welche in den letzten Jahren in der regenerativen Medizin vielfach untersucht und als Alternative zu Schwämmen, Hydrogelen und anderen Trägern diskutiert wird (Rockwood et al., 2011). Aufgrund seiner guten mechano-elastischen Eigenschaften und hohen Biokompatibilität (Kim et al., 2005, Smeets et al., 2017, Chen et al., 2015) erscheint Seide als idealer Träger für polyP.

1.1. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der *in vitro* Studie war es die Auswirkungen von polyP und polyP-beschichteten Seidenmembranen auf die Thrombin Bildung und damit sein Potential als lokales Hämostyptikum zu bewerten. Hierbei sollten nachfolgende Hypothesen untersucht werden:

- Seidenmembranen lassen sich mit polyP funktionalisieren.
- polyP und Seidenmembranen aus Seidenfibroin sind gerinnungsaktiv.
- polyP-beschichtete Seidenmembranen haben einen gerinnungsaktivierenden Effekt, der dem unbeschichteter Seidenmembranen überlegen ist.

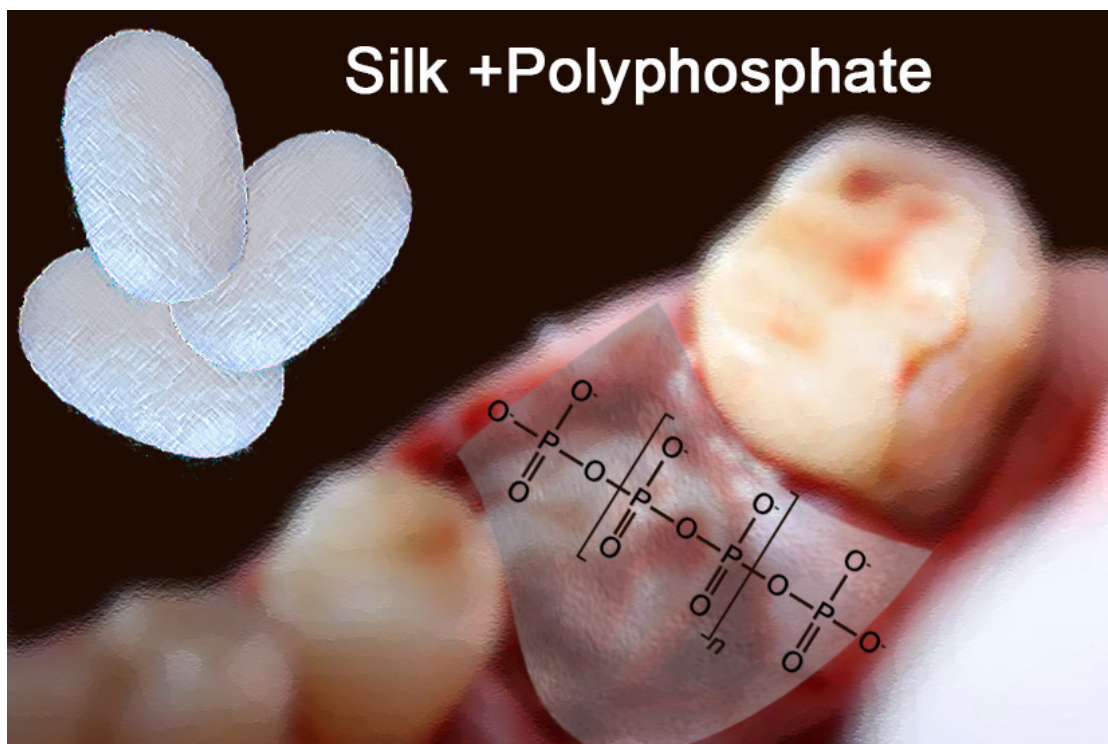


Abb. 1: Zusammenfassende Darstellung der Publikation

(Quelle: Popal, Z. et al. 2023, Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study. *Int J Implant Dent*, 9, 44.)

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung wässriger Seidenlösungen

Die Seidenfäden des Kokons der Larven des Seidenspinners *Bombyx mori* bestehen aus dem Strukturprotein Fibroin und aus einem Protein, dem Sericin, das die Fäden zusammenhält (Abbildung 2). Um in einem ersten Schritt das Sericin von den Seidenfäden zu entfernen, wurden Kokons in kleine Teile geschnitten und für 30 Minuten in 0.02 M Na₂CO₃ gekocht (Rockwood et al., 2011). Nachfolgend wurden die Seidenfäden bei 60°C für 4h in Ajisawa Reagenz (Ajisawa, 1998) aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung der Seidenfäden folgte die Dialyse der Seidenlösung mit einer semipermeablen Membran aus Cellulose (Molekulares Gewicht Cut-Off-Wert: 10 kDa). Bei diesem Prozess wurde einem schrittweisen Protokoll gefolgt, welches durch Zheng et. al. 2016 publiziert wurde. Hierbei wurde das Dialysatröhrchen zu 100 Teilen in eine 4 molare Harnstofflösung für 3h unter ständigem und langsamem Rühren gegeben. Im Anschluss wurde dieses Vorgehen durch Änderung der Lösung auf 100 Teile auf 2 Mol, 1 Mol Harnstoff wiederholt, bevor es schlussendlich jeweils für 3h in Wasser gegeben wurde (Zheng et al., 2016).



Abb. 2: Seidenkokons

(Quelle: Wöltje, M. & Böbel, M. 2017. Natural biodegradable medical polymers. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*, 351-176.)

2.2. Blutentnahmen

Die Entnahme von Blutproben erfolgte an gesunden Studienmitgliedern in herkömmliche Citrat-Probenröhren (9:1 Blut-Citrat-Verhältnis). Es erfolgte die zweifache Zentrifugation der Proben bei jeweils 3.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur, bevor plättchenarmes Plasma (PPP) mit einer 18G Nadel aus der obersten Schicht der Proben entnommen werden konnte. Die Plasma Proben wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch bei 37°C aufgetaut.

2.3. Thrombingenerierungs Assay

Die Messungen zur Thrombingenerierung wurden mit dem von Hemker et al. entwickelten *Calibrated Automated Thrombin Generation Assay* (CAT) durchgeführt (Hemker et al., 2003, Hemker et al., 1986). Diese Methode verwendet fluorogene statt chromogene Substrate und erlaubt dadurch eine Detektion der Thrombingenerierung in plättchenarmen und plättchenreichen Plasmaproben. Des Weiteren wurde ein *Fluoroskan Ascent Fluorometer* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet, welches mit einem *Dispenser* (Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands) ausgestattet ist. Die Versuche wurden in 96-Well Platten Fluorometer durchgeführt.

Der *Thrombin Calibrator* (TC) dient als Referenzwert für das *Thrombinoscope* zur Berechnung der molaren Konzentration von Thrombin in unseren Proben. TC wurde gemeinsam mit dem Plasma in die ersten beiden Wells hinzugefügt. Die dosisabhängige Quantifizierung der polyP-beschichteten Seidenmembranen hinsichtlich ihrer Potenz bei der Gerinnungsaktivierung wurde mit dem *Thrombinoscope software package* (Version 3.0.0.29) durchgeführt. Nach der Messung berechnet das Programm spezifische Werte, wovon einige näher erläutert werden sollen. Den wesentlichen Messwert stellt dabei die Thrombingenerierung dar, welches in nanomolar (*nM*) pro Zeit angegeben wird. Die *area under the curve*, oder auch *endogenous thrombin potential* (*ETP*) stellt die totale Menge der enzymatischen Aktivität der Thrombingenerierung dar. Der *peak* repräsentiert die maximal erreichte Thrombinkonzentration, wobei *time to peak* (*ttPeak*) die Zeit in Minuten angibt, in der diese Konzentration erreicht wird. Einen weiteren Parameter stellt die *lag time* dar. Diese wird ebenfalls in Minuten angegeben und ist definiert als die Zeit, bis 1/6 des Spitzenwertes erreicht ist. Die *lag time* stellt somit die Initiationsphase der Koagulation dar.

2.4. Polyphosphat-beschichtete Seidenmembran und die Thrombingenerierung

Zunächst wurden polyP-beschichtete Seidenmembranen mit einem Skalpell in 3x3 mm große Stücke geteilt. In jedes Well wurden 80 µl PPP mit 10 µl MP Reagenz

(*Thrombinoscope BV*, 4 μM finale Konzentration) hinzugefügt, wobei zweitgenanntes eine aus Phospholipiden bestehende Trigger-Substanz darstellt, welche die Thrombingenerierung initiiert. Um die Wirkung der polyP-beschichteten Seidenmembranen auf die Thrombingenerierung zu untersuchen, wurde dem Gemisch aus Plasma und Phospholipid je 10 μl Pufferlösung (PBS) mit darin enthaltenen Seidenmembranen, beschichtet mit steigenden langkettigen polyP Mengen (2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 6 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 20 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 60 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, 600 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ und 2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) hinzugefügt. Nach der Zugabe von 20 μl *FluCa*, (enthält 2,5 nM flourogenes Substrat und 100 mM Calciumchlorid), einer Lösung wodurch die Gerinnungskaskade aktiviert wird, betrug das finale Volumen pro Well 120 μl . Unbeschichtete Seidenmembranen dienten hierbei als Negativkontrolle. Für die Positivkontrolle wurden 80 μl PPP und 10 μl MP Reagenz mit jeweils 10 μl Polyphosphat (*Phoskadent M*) in Lösung mit steigenden Konzentrationen von 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet.

2.5. Rasterelektronenmikroskopie

Die Verteilung des Polyphosphats auf der Oberfläche der Seidenmembranen sowie die Seidenmembranstruktur wurden mit einem *Quanta™ 250 FEG ESEM* Rasterelektronenmikroskop (*FEI Company, USA*) untersucht und dargestellt.

2.6. Statistik

Diese Untersuchung war *a priori* als hypothesengenerierende Pilot-Untersuchung geplant. Insofern beschränkt sich die statistische Analyse auf eine rein deskriptive Statistik, welche mit Hilfe von *Excel* (Version 16.0) durchgeführt wurde. Alle Daten wurden aus zwei unabhängigen Versuchen in zweifacher Ausführung entnommen und, wenn nicht anders angegeben als Mittelwert +/- Standardabweichung (*SD*) dargestellt. Auf eine Berechnung signifikanter Unterschiede wurde angesichts der geringen Fallzahl verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1. Beschichtung von Seidenmembranen mit Polyphosphat

In einem ersten Schritt konnte die Morphologie der beschichteten Seidenmembranen erfolgreich unter dem Rasterelektronenmikroskop dargestellt werden. Wie in Abbildung 3 dargestellt ist, führt die Beschichtung der Membran zu einer dichten polyP Schicht auf der Oberfläche. Der untere Anteil der Membran besteht aus reinem Fibroin, über das polyP an die Membran physikalisch gebunden wurde. Dies erfolgte in unserer Versuchsanordnung durch Verdampfen des Wassers. Somit wurde das erste Ziel die Entwicklung einer

zweischichtigen Membran, mit polyP auf der einen und reiner Seide auf der anderen Seite, erreicht.

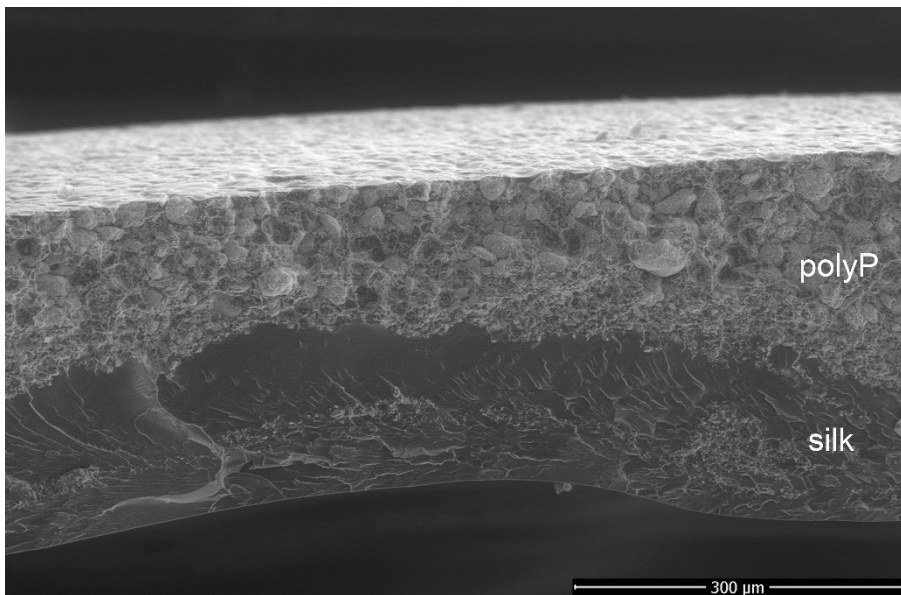


Abb. 3: Querschnitt einer polyP-beschichteten Seidenmembran im Rasterelektronenmikroskop (polyP: 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$).

(Quelle: Popal, Z. et al. 2023. Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study. *Int J Implant Dent*, 9, 44.)

3.2. Thrombingenerierung mit Polyphosphat – eine Positivkontrolle

Ausgehend von der erfolgreichen Entwicklung der polyP-beschichteten Seidenmembran konnte in einem zweiten Schritt deren prokoagulativen Eigenschaften untersucht werden. Hierfür wurde in Echtzeit mit dem oben beschriebenen Assay die Thrombingenerierung aus humanem Plasma mit und ohne reinem polyP sowie für beschichtete Seidenmembranen gemessen. Die Versuchsreihe mit reinem polyP galt als Positivkontrolle. Die Ergebnisse für die Thrombingenerierung in Abhängigkeit von der polyP Konzentration sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass es bei einer Steigerung der polyP Konzentration ausgehend von 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis hin zu 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem stetigen Anstieg des endogenen Thrombinpotentials und des Spitzenwertes kommt. Das endogene Thrombinpotential stieg um ca. 50% von 980,6 nM·min auf 1544,3 nM·min, und der Spitzenwert um mehr als 250% von 107 nM auf 382,9 nM bei der genannten Konzentrationssteigerung. Erwartungsgemäß nahm mit steigender polyP Konzentration die Zeit bis zum Erreichen des Spitzenwertes von 21,7 min bei 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf 8,0 min bei 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ab. Ähnlich verhält es sich für die sogenannte *lag time* (17 min für 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 6,3 min für 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Eine Steigerung der polyP Konzentration auf 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führte zu keiner weiteren Zunahme der genannten Werte. In

der Abbildung 4 ist dieses Ergebnis noch einmal graphisch dargestellt: mit Steigerung der polyP Konzentration kommt es zu einer Zunahme der Thrombingenerierung (y-Achse) und zu einer Verkürzung der Zeit bis zum Erreichen des Spitzenwertes (x-Achse).

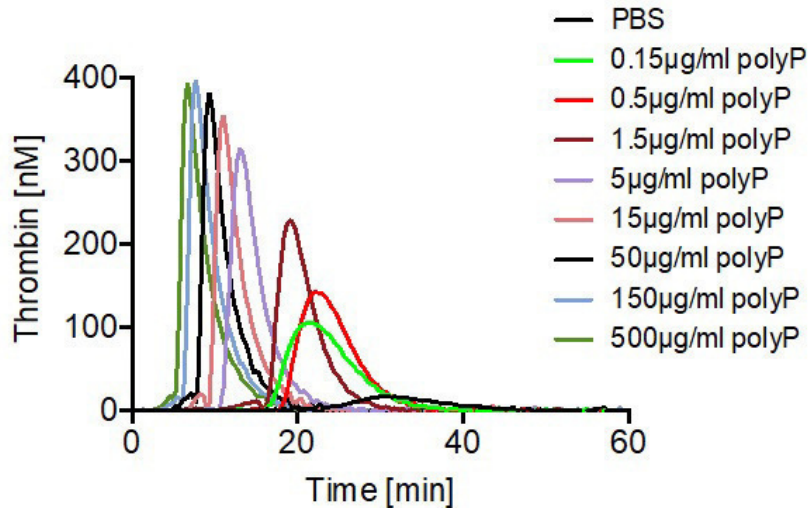


Abb. 4: Thrombingenerierung in humanem Plasma initiiert durch polyP in steigenden Konzentrationen (n=1 in Duplikaten)
y-Achse: *peak thrombin* in nM, x-Achse: *time to peak* in Minuten

(Quelle: Popal, Z. et al. 2023. Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study. *Int J Implant Dent*, 9, 44.)

Tab. 1: Thrombingenerierung – Polyphosphat Kontrolle

	0.15	0.5	1.5	5	15	50	150	500
	µg/ml polyP							
ETP (nM·min)	980.6 ± 201	1108.9 ± 75	1246.8 ± 79	1398.5 ± 76	1398.9 ± 44	1453.9 ± 23	1544.3 ± 55	1522.4 ± 3.1
Peak thrombin (nM)	107 ± 31	143 ± 14	236.6 ± 48	316.4 ± 17	351.7 ± 11	367.6 ± 10	382.9 ± 18	374.6 ± 5.3
Time to peak (min)	21.7 ± 2.3	22.5 ± 0.5	19.5 ± 1.2	13.2 ± 1.5	11 ± 1	9.7 ± 0	8 ± 0.3	7.2 ± 0.2
Lag time (min)	17 ± 2	18.7 ± 0.7	16.7 ± 1.7	11 ± 1.3	9.2 ± 1.2	8 ± 0	6.3 ± 0.3	5.5 ± 0.2

Vergleich der Thrombingenerierung in Plasma initiiert durch polyP in steigenden Konzentrationen. Die Werte sind als Mittelwert ± SD ausgedrückt, n = 1 in Duplikaten

3.3. Thrombingenerierung mit unbeschichteten Seidenmembranen – eine Negativkontrolle

In einem weiteren Schritt wurde der prokoagulative Effekt reiner Seidenmembranen untersucht. Diese Versuchsreihe galt als Negativkontrolle. Für unbeschichtete Seidenmembranen, die in Kontakt mit humanem Plasma kamen, konnte eine diskrete prokoagulative Wirkung gezeigt werden. Diese war vergleichbar der Wirkung der mit $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ beschichteten Seidenmembranen, lag bei weiterer Steigerung der Dichte wie auch das reine humane Plasma jedoch unter der Wirkung der polyP-beschichteten Seidenmembranen. Folgende Ergebnisse zeigten sich für reine Seidenmembranen im Vergleich zu beschichteten Seidenmembran mit einer polyP Dichte von $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$: die *lag time* war um 5 min und 12 s (12,8 min für die unbeschichtete Seide versus 7,6 min bei $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) und die Zeit bis zum Erreichen des Spitzenwertes um 5 min und 30 s kürzer (15,3 min für die unbeschichtete Seide versus 9,8 min für $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$). Gleichzeitig lag beim genannten Vergleich der Spitzenwert der Thrombingenerierung um das 1,57-fache ($310,1 \text{ nM}$ für $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ versus $198,4 \text{ nM}$ für unbeschichtete Seide) und das endogene Thrombinpotential um das 1,6-fache ($1525,7 \text{ nM}\cdot\text{min}$ für $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ versus $955,5 \text{ nM}\cdot\text{min}$ für unbeschichtete Seide) über dem Wert der reinen Seidenmembran (Tabelle 2). Sowohl gepufferte Plasmakontrollen als auch unbeschichtete Seidenmembranen zeigten demnach geringere totale (*ETP*) als auch maximale (*peak*) Thrombingenerierung sowie eine verlängerte *lag time* und *time to peak* im Vergleich zu beschichteten Seidenmembranen. Unbeschichtete Seide allein zeigte wiederum einen geringen, jedoch höheren prokoagulativen Effekt im Vergleich zu gepuffertem humanem Plasma.

3.4. Thrombingenerierung mit Polyphosphat-beschichteter Seidenmembran

In einem letzten Schritt wurde der prokoagulative Effekt der Beschichtung einer Seidenmembran mit polyP in unterschiedlichen Mengen untersucht und mit gepuffertem humanem Plasma verglichen (Tabelle 2). Hierbei zeigte sich zunächst, dass die unterschiedliche prokoagulative Wirkung der Seidenmembranen auf die Beschichtung mit polyP zurückzuführen ist. Denn im Vergleich zu einer unbeschichteten, reinen Seidenmembran führte eine Beschichtung der Membran mit einer Menge von 6-600 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ zu stärkeren Effekten auf die Thrombingenerierung. Hier kam es zu einer Art Ceiling-Effekt und es konnte bei einer Steigerung auf 600 beziehungsweise 2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ keine weitere Zunahme der Thrombingenerierung *in vitro* beobachtet werden. Das Maximum der Thrombingenerierung und somit die aus gerinnungsphysiologischer Sicht effektivste Beschichtung einer Seidenmembran mit polyP lag bei $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, wobei die prokoagulative Wirkung mit Steigerung der Menge abnahm. Diese Beobachtung ist vermutlich unter anderem auf eine Komplexbildung mit Calciumionen zurückzuführen,

wodurch die Thrombinproduktion effektiv gestört wurde. Auf diesen Aspekt wird in der Diskussion detaillierter eingegangen. In dieser Versuchsreihe erreichte die Thrombingenerierung, welche durch polyP beschichtete Seidenmembranen ausgelöst wurde, demnach ihr Maximum bei einer Dichte von $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (ETP $1525,7 \text{ nM}\cdot\text{min}$) und nahm ab einer Dichte von $600 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ab (ETP $1339,3 \text{ nM}\cdot\text{min}$). Abbildung 5 zeigt eine graphische Darstellung der Thrombingenerierung in humanem Plasma mit unterschiedlichen polyP-Mengen auf den Seidenmembranoberflächen. Ferner wurde gezeigt, dass die Thrombingenerierung in polyP-beschichteten Seidenmembranenproben höher ist als in gepufferten Plasmaproben. Wie oben beschrieben wurde für eine Dichte von $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ zum einen Höchstwerte für das endogene Thrombinpotential und den Spitzenwert, zum anderen die kürzesten Zeiten für die Zeit bis zum Erreichen des Spitzenwertes und die *lag time* erreicht.

Das endogene Thrombinpotential lag mit $1525,7 \text{ nM}\cdot\text{min}$ für $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ um das 2,94-fache über dem des gepufferten Plasmas, welcher bei $519,2 \text{ nM}\cdot\text{min}$ lag. Der Spitzenwert war mit $310,1 \text{ nM}$ für $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ sogar um das 5,96-fache dem gepufferten Plasma gegenüber ($52,3 \text{ nM}$ in PPP) erhöht. Dementsprechend waren die genannten Zeiten in Anwesenheit der beschichteten Membranen beispielsweise um 67% für die *lag time* ($7,6 \text{ min}$ in $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ versus $23,3 \text{ min}$ in PPP) und 66% für die Zeit bis zum Erreichen des Spitzenwertes ($9,8 \text{ min}$ in $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ versus $28,8 \text{ min}$ in PPP) reduziert.

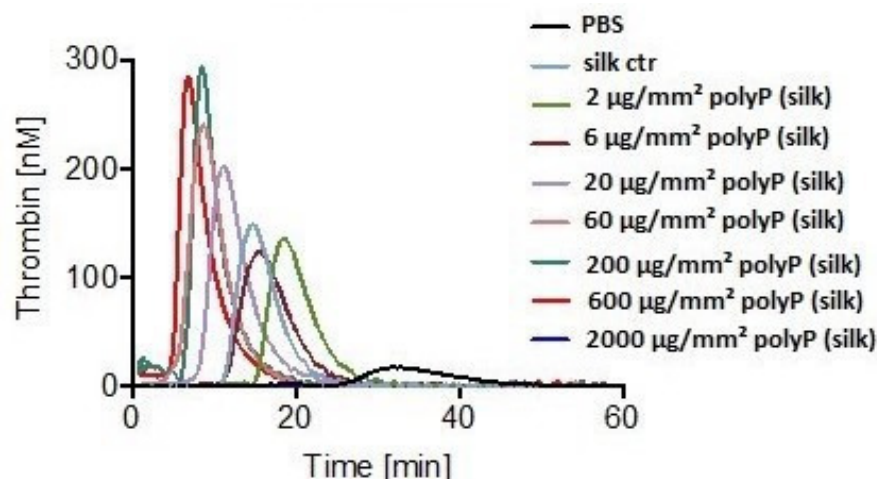


Abb. 5: Thrombingenerierung in humanem Plasma initiiert durch polyP-beschichtete Seidenmembranen und unbeschichtete Seide (n=2, in Duplikaten)
y-Achse: *peak thrombin* in nM, x-Achse: *time to peak* in Minuten

(Quelle: Popal, Z. et al. 2023. Polyphosphate-loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study. *Int J Implant Dent*, 9, 44.)

Tab. 2: Thrombingenerierung – polyP-beschichtete Seidenmembran und Seidenmembran Kontrolle

	Plasma with buffer (PPP)	Silk control	2	6	µg/mm ² silk+ polyP				
					20	60	200	600	2000
ETP (nM·min)	519.2 ± 413	955.5 ± 119	970.6 ± 170	1098 ± 310	1279.9 ± 183	1391.2 ± 160	1525.7 ± 227	1339.3 ± 9	-1
Peak thrombin (nM)	52.3 ± 50	198.4 ± 70	175.9 ± 53	207.8 ± 119	246.2 ± 51	267.3 ± 38	310.1 ± 27	243.4 ± 56	-1
Time to peak (min)	28.8 ± 7	15.3 ± 1.4	17.1 ± 5	13.1 ± 6	11.8 ± 1.8	10.2 ± 0.5	9.8 ± 0.7	8.9 ± 0.6	-1
Lag time (min)	23.3 ± 6	12.8 ± 0.7	14 ± 4	10 ± 4	9.1 ± 1.5	7.4 ± 0.1	7.6 ± 0.6	6.8 ± 0.4	-1

Vergleich der Thrombingenerierung in humanem Plasma, Seidenmembran induziertem Plasma und polyP-beschichtete Seidenmembran induziertem Plasma. PPP = plättchenarmes Plasma, silk+polyP= 3x3 mm polyP-beschichtete Seidenmembran
Die Werte sind als Mittelwert ± SD ausgedrückt, n = 2 in Duplikaten

4. Diskussion

In dieser Pilotstudie wurde die prokoagulative Wirkung von polyP-beschichteter Seidenmembranen im Vergleich zu gelöstem polyP und reiner Seide untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass polyP physikalisch auf der Seide gebunden werden kann und eine gegenüber der unbeschichteten Seide verbesserte prokoagulative Wirkung besitzt. Ebenso zeigte sich, dass die polyP-beschichtete Seide auch zusätzlich zu der alleinigen Zugabe von polyP die Thrombingenerierung verbessert. Ab einer Dichte von 200 µg/mm² polyP auf der Seide konnte keine weitere Steigerung der gerinnungsaktivierenden Wirkung beobachtet werden.

Seide ist ein vielfältiger Träger für pharmakologisch und physiologisch aktive Substanzen. Vielfach untersucht ist die Seide zur Applikation von antineoplastischen Pharmazeutika, wie beispielsweise dem Paclitaxel. Chen et. al. konnten zeigen, dass mit Paclitaxel beladene Seidenmembranen eine langwirksame, lokale Freisetzung des Wirkstoffes erreicht werden kann. Bei einer maximalen Kapazität von 6,9% wurde der Wirkstoff in einem Zeitraum von sechs Tagen freigesetzt (Chen et al., 2012). Eine ähnliche Studie wurde mit dem hydrophilen Floxuridin durchgeführt. In dieser Untersuchung lag die maximale Beladungskapazität für Floxuridin bei 6,8% und einer verkürzten Freisetzungszeit von zwei Tagen (Yu et al., 2014).

In der hier vorgestellten Untersuchung konnte erstmals gezeigt werden, dass auch gerinnungsaktive Substanzen, die *per se* nicht als Pharmaka einsetzbar sind, auf

Seidenmembranen gebunden und zu einem gerinnungsphysiologischen Effekt führen können. In der hier gewählten Versuchsreihe kam es zu einer homogenen Beschichtung der Seidenmembranen mit polyP bis zu einer Dichte von $600 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Eine weitere Steigerung der polyP Menge führte zu einer inhomogenen Verteilung auf der Oberfläche der Seidenmembranen. Ob dies dafür verantwortlich ist, dass für polyP-beschichtete Seidenmembran das endogene Thrombinpotential und der Spitzenwert bei $200 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ihr Maximum erreichten und bei $600 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ wieder diskret abnahmen, kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Ferner kann in der gewählten Versuchsreihe leider nicht unterschieden werden, welchen Effekt eine Freisetzung von polyP aus der Membran im Vergleich zu membrangebundenem polyP hat.

Auch wenn hierüber keine Aussage getroffen werden konnte, so zeigte diese Studie dennoch, dass die Seidenmembran nicht nur mit Pharmazeutika, sondern auch mit ubiquitär vorkommendem Polyphosphat beschichtet werden kann. Dies war in der oben beschriebenen und diskutierten Versuchsanordnung reproduzierbar möglich und gibt daher berechtigte Hoffnung, dass neben den Beschreibungen zur Beschichtung der Seide mit Emodin (Cheema et al., 2007), Doxorubicin (Tian et al., 2014), Teophylline (Bayraktar et al., 2005), Propanololhydrochlorid (Wenk et al., 2008) auch eine Funktionalisierung mit Polyphosphat möglich ist. Inwieweit dies von klinischem Nutzen sein kann, ist noch zu untersuchen.

Polyphosphat ist ein anorganisches Polymer, welches nicht immunaktivierend ist (Heestermans et al., 2021), dafür aber in Kombination mit FXII die Thrombingenerierung stimuliert. In Plasma, welches mit Antikoagulantien vorbehandelt war, initiierte polyP die Fibrinbildung (Smith and Morrissey, 2008). In Patienten mit einer angeborenen Thrombozytenaggregationsstörung konnte mit polyP die Fibrinbildung in humanen Plasma Proben sogar normalisiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass polyP die Interaktion von Fibrin und Thrombozyten entweder gelöst oder an Thrombozyten gebunden fördert. Auch in unseren Versuchen mit humanem Plasma führte polyP zu einer Steigerung des endogenen Thrombinpotentials. Hier ist die Kettenlänge des polyP zu diskutieren. In der Arbeit von Smith et al. (Smith and Morrissey, 2008) konnte bereits mit einer Länge von 75 Phosphatuntereinheiten der positive Effekt bei Patienten mit einer Thrombozytenaggregationsstörung (Hämophilie A und B) gezeigt werden. In unserer Versuchsreihe wurde der gerinnungsphysiologische Effekt bei der Verwendung von langkettigen polyP mit >1000 Untereinheiten beobachtet. Welches die optimale Kettenlänge ist, lässt sich anhand der vorgestellten Studie nicht sagen und erfordert weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen polyP-Formulierungen mit definierten

Kettenlängen. Erschwerend kommt außerdem hinzu, dass dies für freigesetztes und membrangebundenes polyP separat beurteilt werden muss (s.o.).

Im Rahmen von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von polyP und FXII bei thrombembolischen Ereignissen entscheidend ist. PolyP kommt endogen auf der Thrombozytenoberfläche vor. Das Transmembranprotein XPR1 (xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1) fungiert als Phosphatexporter in Thrombozyten und hat somit eine entscheidende Bedeutung in der phosphatinduzierten Aggregation von Thrombozyten (Mailer et al., 2021). Der lösliche FXII kann zusätzlich durch polyP aktiviert werden, wie auch durch RNA, Kollagen und *neutrophil extracellular traps* (NETs) (Heestermans et al., 2021). PolyP seinerseits kann die prokoagulative Wirkung der NETs und damit seine eigene Interaktion mit FXII fördern (Gould et al., 2014). Hier besteht jedoch noch weiterer Forschungsbedarf, da die Domänen, an denen der FXII aktiviert wird, noch nicht vollständig geklärt sind. Die prolinreiche Domäne (PR-III) scheint hier jedoch eine besondere Rolle zu spielen (Heestermans et al., 2021).

In unserer Versuchsreihe wurde Plasma von gesunden Studienteilnehmern verwendet. Bei unauffälliger Allgemein-, und Gerinnungsanamnese ist davon auszugehen, dass in unserem verwendeten Plasma eine normale thrombozytäre Funktion sowie Konzentration von FXII und Calcium vorlag. *In vivo* zeigte sich, dass polyP zusammen mit Calcium nicht lösliche Nanopartikel bildet (Verhoef et al., 2017), die an der Plasmamembranoberfläche der Thrombozyten verbleiben. Diese membranständigen Calcium-polyP-Komplexe initiieren die oben beschriebene FXII-Aktivität. Insofern scheint in diesem Prozess auch der Plasma-Calciumspiegel von entscheidender Bedeutung zu sein. Bei gleichbleibendem Calciumspiegel wurde eine Zunahme der prokoagulativen Wirkung von polyP bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml beobachtet, die auch bei einer weiteren Steigerung auf 500 µg/ml nicht weiter zunahm. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Anteil der Calcium-polyP-Komplexe gelöst und der größere Anteil an der Plasmamembranoberfläche der Thrombozyten gebunden bleibt (Verhoef et al., 2017, Wijeyewickrema et al., 2016). Insofern ist es denkbar, dass der von uns beobachtete prokoagulative Effekt durch die Erhöhung der Konzentration von gelösten Calcium-PolyP-Komplexen beobachtet wurde, der Anteil der vorbestehenden membrangebundenen Calcium-polyP-Komplexe sich jedoch nicht wesentlich geändert hat. Ob exogen zugefügtes polyP, so wie in unserer Versuchsreihe beschrieben (Tabelle 1, Abbildung 4), mit Calcium Komplexe eingehen kann, um danach auf Thrombozyten binden zu können, ist bisher unklar.

Seide ist ein in der operativen Medizin vielfach eingesetztes Material, allseits bekannt als Nahtmaterial (Moy et al., 1991). Es bietet für den klinischen Einsatz zahlreiche Vorteile,

birgt allerdings auch einige Nachteile (Altman et al., 2003, Wani and Veerabhadrapa, 2018). Diese sind in Abbildung 6 dargestellt. Darüber hinaus können sogenannte *SER/ Surgical Scaffolds*, welche aus Seidenfibroin bestehen, hergestellt werden (Wöltje and Böbel, 2017). Seiden Protein führt im Gegensatz zu dem in der Seide natürlich vorkommendem Protein Sericin (Bhattacharjee et al., 2013) zu keinen relevanten immunologischen Reaktionen (Wöltje and Böbel, 2017). Das Seidenfibroin, aus denen auch die in der Versuchsreihe verwendeten Seidenmembranen hergestellt wurden, unterstützt über den Signalweg NF-Kappa-B, die Wundheilung (Park et al., 2018). Neben dem positiven Effekt auf die Wundheilung wird auch die Gerinnung aktiviert. In einer Untersuchung an Mäusen konnte dies anhand einer reduzierten Blutungszeit gezeigt werden (Lei et al., 2016). Dies erklärt, weshalb auch in unserer Versuchsreihe, der Kontakt von humanem Plasma mit der unbeschichteten Seidenmembran (Negativkontrolle) bereits eine prokoagulative Wirkung (Zunahme von *ETP* und *peak*) zeigt. Der gerinnungsaktive Effekt der unbeschichteten Seidenmembran war für das endogene Thrombinpotential 2-fach sowie für den Spitzenwert nahezu 4-fach höher, im Vergleich zur gepufferten Plasma Probe.

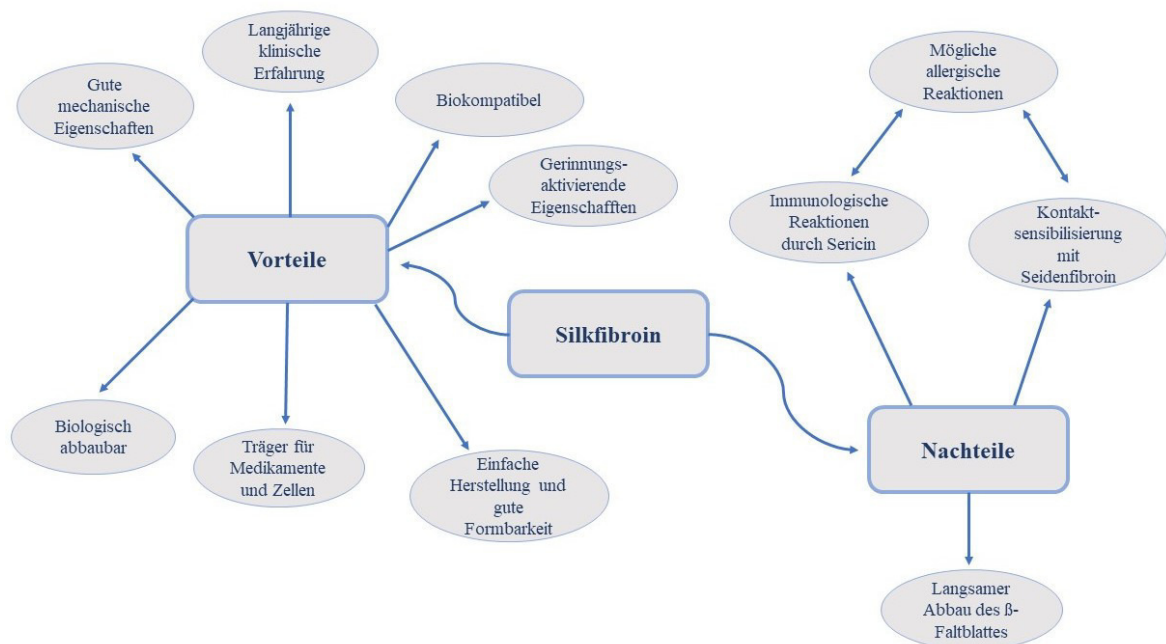


Abb. 6: Vor – und Nachteile für die klinische Anwendung von Seidenfibroin
Eigene Darstellung, modifiziert nach Altmann et al. und Din Wani & Veerabhadrapa

(Quellen: Altman, G. H. et. al 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24, 401-16.
Din Wani, S.U. & Veerabhadrapa, G. H. 2017. Silk Fibroin based Drug Delivery Applications: Promises and Challenges. *Curr Drug Targets*, 19(10), 1177-1190.)

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl polyP als auch die Seidenmembranen einen prokoagulativen Effekt *in vitro* aufweisen. Inwieweit diese Effekte sich gegenseitig verstärken, wurde in dieser Pilot-Studie erstmalig untersucht. Die polyP-beschichtete Seidenmembran wies gegenüber der unbeschichteten Seide höhere Werte für das endogene Thrombinpotential sowie den Spitzenwert auf (um das 1,6-fache). Nicht jedoch gegenüber der Lösung mit polyP allein. Hier liegen die Werte für eine mit polyP beschichteten Seidenmembran der Dichte 200 µg/mm² (ETP 1525,7) und der Lösung mit polyP mit der Konzentration 150 µg/ml (ETP 1544,3) sehr eng beieinander. Für das in unserer Versuchsreihe verwendete Seidenfibroin konnte gezeigt werden, dass der prokoagulative Effekt des Polyphosphats von der Auftragsdichte abhängt und mit einem maximalen Effekt bei eben dieser Dichte von 200 µg/mm² liegt. Leider kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch der Anteil des Polyphosphats ist, der bei der genannten Auftragsdichte freigesetzt wird beziehungsweise auf der Seidenmembran verbleibt.

Für eine spätere klinische Anwendung würde die polyP-beschichtete Seidenmembran allerdings den Vorteil bieten, dass das an die Membran gebundene polyP anders als frei lösliches polyP nicht leicht aus dem Wundbereich gespült würde, gerade bei stärkeren Blutungen. Dies ist in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie von besonderer Bedeutung, da neben Blutungen auch die Speichelsekretion sowie eine hohe mechanische Belastung durch Kauen, Sprechen und Atmung auf den Verbleib gerinnungsaktiver Substanzen an der Wundoberfläche Einfluss nehmen. Hinzu kommt eine erhöhte Konzentration fibrinolytisch wirksamer Substanzen im Oropharynx (Cox et al., 1969) die zu einem vorzeitigen Auflösen eines Gerinnsels führen können. Hier erscheint das zusätzliche Einbringen von exogenem polyP, zur Unterstützung der polyP-FXII-induzierten Thrombozyten-Fibrin-Interaktion vielversprechend. Ein Halten der Substanz polyP durch Bindung an eine Seidenmembran lässt zusätzliche benefizielle Effekte erwarten. Bedenkt man, dass Seidenmembranen auch als Zellträger verwendet werden können, wie beispielsweise für Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten (Unger et al., 2004), so liegt der Versuch nahe, Seidenmembranen, außer mit polyP auch mit Thrombozyten zu beschichten. Somit lassen sich aus dieser Pilot-Studie weitere Hypothesen generieren.

4.1. Limitationen der Studie

Diese Studie wurde *a priori* als hypothesengenerierende Studie geplant und als solche durchgeführt. Ein Nachweis der Machbarkeit, das heißt das Beschichten der Seide mit polyP und eine Evaluation der gerinnungsgaktivierenden Wirkung dieser ist auch mit der gewählten niedrigen Versuchsanzahl möglich, jedoch ohne eine weitreichende statistische Analyse. Insofern beschränkt sich die Arbeit auf eine Beschreibung des Effektes auf vier

häufig verwendete Gerinnungsparameter im Rahmen eines Thrombingenerierungs Assays (*ETP, peak, time to peak und lag time*) sowie auf eine deskriptive Analyse.

Bei dem für diese Versuchsreihe verwendetem Plasma wurde davon ausgegangen, dass die Gerinnungsfaktoren in physiologischer Konzentration vorliegen. Hier wurde sich allein auf die unauffällige Gerinnungsanamnese verlassen, bzw. wurden die Thrombozytenzahl und die Calcium-Konzentration im Plasma kontrolliert und lagen im Normbereich.

Veränderungen der Calcium- und Faktorenkonzentration im Plasma würden auf die Wirkung von polyP und polyP-beschichteter Seidenmembranen Einfluss nehmen. In weiterführenden Untersuchungen sollten daher Modifikationen dieser beiden Faktoren sowie des pH-Wertes vorgenommen werden, da diese Informationen vor einem klinischen Einsatz vorliegen müssen.

Das verwendete Messverfahren, der Thrombingenerierungs Assay nach Hemker et al. ist ein langjährig etabliertes Verfahren zur Messung der Thrombinaktivität. Insofern ist davon auszugehen, dass die Gerinnungsparameter mit einer hohen Validität und Reliabilität bestimmt wurden. Mit der gewählten Methode ließ sich jedoch nicht unterscheiden, wieviel des polyP nach Beschichtung der Seide an dieser gebunden bleibt und welche genauere Menge polyP ins Plasma übertritt. Zur Beantwortung dieser Frage hätten die beschichteten Membranen im Anschluss an die Versuchsreihen nochmals auf ihre Dichte an polyP untersucht werden müssen. Da nur schwierig zu messen ist, ob nach Entfernen der Seide aus dem Plasma sowie nach ihrer Aufbewahrung möglicherweise weiteres polyP verloren geht, wurde hierauf verzichtet.

Die Ergebnisse dieser Studie sind vorbehaltlich der geringen Versuchszahl zu bewerten. Sie geben jedoch Anlass, sie in einer größeren Studie auf der einen Seite zu validieren und die oben beschriebenen Einflussfaktoren (Calcium, FXII, pH, Thrombozyten) separat zu evaluieren. Ausgehend von einer bestätigenden größeren *in vitro* Untersuchung wäre der Transfer in ein *in vivo* Modell durchzuführen, wie es beispielsweise bereits in Mäusen untersucht wurde (Lei et al., 2016). Welche Bedeutung unsere Ergebnisse für eine zukünftige klinische Praxis haben könnten, also im Sinne eines Transfers von *bench-to-bed-side*, ist heute selbstverständlich nicht beurteilbar. Wir hoffen, mit unseren Ergebnissen einen Impuls zu weiteren *in vitro* und *in vivo* Versuchen sowie schlussendlich Untersuchungen in der klinisch-praktischen Anwendung gegeben zu haben.

4.2. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Seidenmembranen bestehend aus Fibroin mit polyP beschichtet werden können und die so beschichteten Membranen einen positiven Effekt auf die Prokoagulation *in vitro* haben. Die vielversprechenden Ergebnisse regen zu weiteren experimentellen Untersuchungen an, bei denen auch Einflussfaktoren für die polyP-FXII und Thrombozyten-Fibrin -Interaktion berücksichtigt werden sollten. Die polyP-beschichteten Seidenmembranen könnten in ferner Zukunft ein innovativer Einsatz zur lokalen Blutstillung in der oralen Chirurgie sein.

5. Zusammenfassung/Summary

Zusammenfassung

Post operative Hämorrhagien können in schwerwiegenden Komplikationen resultieren. Besonders Patienten und Patientinnen mit angeborenen Gerinnungsstörungen sowie unter der Einnahme von oralen Antikoagulantien oder Thrombozytenaggregationshemmern, sind einem erhöhten Risiko ausgesetzt. In der oralen Chirurgie stellen chirurgisch bedingte Risikofaktoren eine weitere Gefahr für Hämorrhagie bedingte Komplikationen dar, da Wunden im Oropharynx eine hohe Dichte an Blutgefäßen aufweisen, sowie ein hoher mechanischer Stress durch die Kaubewegungen, die Atmung sowie den Sprechakt entstehen. In diesem Kontext ist es besonders wichtig, ein sicheres und effizientes lokales Hämostyptikum zu etablieren. Polyphosphat ist ein anorganisches Polymer, welches für seine prokoagulativen Fähigkeiten durch Faktor XII Aktivierung im Plasma sowie weiteren Interaktionen in der Gerinnungskaskade bekannt ist.

Das Ziel dieser *in vitro* Studie war es, das Potential von polyP-beschichteten Seidenmembranen als lokales Hämostyptikum in der oralen Chirurgie zu untersuchen.

Zur Herstellung eines Trägers für das polyP wurde in einem ersten Schritt Seidenfibroin aus Kokons von Seidenraupen der Gattung *Bombyx mori* gewonnen und aufgelöst. Daraufhin wurden unterschiedliche Mengen von langkettigem polyP (2-2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) an die Oberfläche der Seidenmembranen gebunden. Daraufhin wurde in Echtzeit mit dem Thrombingenerierungs Assay der prokoagulative Effekt der polyP-beschichteten Seidenmembranen in humanem Plasma analysiert. Als Positivkontrolle wurden zunehmende Konzentrationen von polyP (0,15-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Plasma untersucht und unbeschichtete Seidenmembranen dienten als Negativkontrolle.

Seidenfibroin Membranen konnten erfolgreich mit polyP beschichtet werden und die Gerinnung in humanem Plasma stimulieren. Der prokoagulative Effekt war den unbeschichteten Seidenmembranen überlegen. Ein polyP-dosisabhängiger Effekt der Thrombingenerierung konnte bei einem Maximum von 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ (*ETP*: 1525,7 nM·min, *peak thrombin*: 310,1 nM, *time to peak*: 9,8 min, *lag time*: 7,6 min) erreicht werden. Bei dieser Dichte war die Thrombingenerierung der polyP-beschichteten Seidenmembranen ähnlich wie die von purem polyP bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In dieser Studie zeigten Seidenmembranen, welche erfolgreich mit polyP beschichtet wurden, einen deutlichen Effekt auf die Thrombingenerierung *in vitro*. Daraus lässt sich folgern, dass polyP-beschichtete Seidenmembranen im Rahmen von lokalen Blutungen eingesetzt werden könnten, wobei ihr Potential für den klinischen Einsatz in weiteren *in vivo* Studien untersucht werden muss.

Summary

Post interventional hemorrhage can result in serious complications. Especially patients with hemostatic disorders and patients under oral anticoagulative or antiplatelet therapy are at higher risk. In oral surgery there is an additional risk due to surgery-specific risk factors such as high density of blood vessels in the oropharyngeal region or mechanical exposure of the wound in consequence of chewing, breathing, or speaking. In this context identification of save and efficient local hemostatic agents is important. Polyphosphate, an inorganic polymer, is known for its procoagulant ability in plasma through factor XII activation and interaction in the coagulation cascade. The aim of this *in vitro* study was to investigate the potential of silk fibroin membranes coated with polyphosphate as a hemostatic device in oral surgery.

To manufacture a carrier substance for polyphosphate, cocoons of the silkworm *Bombyx mori* were degummed and dissolved in a first step. Afterwards varying amounts of long-chain polyP (2-2000 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) were adsorbed to the silk fibroin membrane surface. In the following, analysis of the procoagulant effect of polyP-coated silk membranes was performed using real-time thrombin generation assays in human plasma. As a positive control, increasing concentrations of polyP (0.15-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in human plasma were analyzed. Uncoated silk fibroin membranes served as a negative control.

Silk fibroin membranes could be coated successfully with polyP and were found to trigger coagulation in human plasma. Their procoagulative effect was superior to those of pure silk fibroin membranes. A polyP-dose-dependent effect of thrombin generation could be found with a maximum (*ETP*: 1525.7 nM·min, *peak thrombin*: 310.1 nM, *time to peak*: 9.8 min, *lag time*: 7.6 min.) at 200 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$. At this dose the thrombin generation of the coated silk membranes was similar to polyP alone at a concentration of 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In this study, silk fibroin membranes, which were successfully coated with polyP, showed clear effect on thrombin generation *in vitro*. Thus, polyP coated silk membranes have the potential to manage local bleeding and deserve further investigations *in vivo*.

Abkürzungsverzeichnis

CAT	Calibrated Automated Thrombin Generation Assay
ETP	endogenous thrombin potential
FV	Faktor V
FXI	Faktor XI
FXII	Factor XII
FXIIa	activated Factor XII
NETs	neutrophil extracellular traps
OAK	orale Antikoagulation
PBS	phosphate-buffered saline
polyP	Polyphosphat
PPP	plättchenarmes Plasma
PR-III	prolinreiche Domäne
rFVIIa	recombinant factor VIIa
SD	standard deviation
SEM	scanning electron microscopy
TC	thrombin calibrator
ttPeak	time to peak
vWF	von-Willebrand-Faktor
XPR1	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1

Literaturverzeichnis

- ACHNECK, H. E., SILESHI, B., JAMIOLKOWSKI, R. M., ALBALA, D. M., SHAPIRO, M. L. & LAWSON, J. H. 2010. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. *Ann Surg*, 251, 217-28.
- AJISAWA, A. 1998. Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67, 91-94.
- ALTMAN, G. H., DIAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R. L., CHEN, J., LU, H., RICHMOND, J. & KAPLAN, D. L. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24, 401-16.
- AULINGER, B. A., SANER, F. H., STARK, K., MAYERLE, J. & LANGE, C. M. 2022. Platelet Aggregation Inhibitors and Anticoagulants in Gastroenterological and Visceral Surgical Procedures. *Dtsch Arztebl Int*, 119, 851-860.
- BAKER, C. J., SMITH, S. A. & MORRISSEY, J. H. 2019. Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation. *Res Pract Thromb Haemost*, 3, 18-25.
- BAYRAKTAR, O., MALAY, O., OZGARIP, Y. & BATIGÜN, A. 2005. Silk fibroin as a novel coating material for controlled release of theophylline. *Eur J Pharm Biopharm*, 60, 373-81.
- BEIERLEIN, W., SCHEULE, A. M., ANTONIADIS, G., BRAUN, C. & SCHOSSER, R. 2000. An immediate, allergic skin reaction to aprotinin after reexposure to fibrin sealant. *Transfusion*, 40, 302-5.
- BHATTACHARJEE, M., SCHULTZ-THATER, E., TRELLA, E., MIOT, S., DAS, S., LOPARIC, M., RAY, A. R., MARTIN, I., SPAGNOLI, G. C. & GHOSH, S. 2013. The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 34, 8161-71.
- BICKMANN, J. K., BAGLIN, T., MEIJERS, J. C. M. & RENNE, T. 2017. Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk. *Curr Opin Hematol*, 24, 419-426.
- CHEEMA, S. K., GOBIN, A. S., RHEA, R., LOPEZ-BERESTEIN, G., NEWMAN, R. A. & MATHUR, A. B. 2007. Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. *Int J Pharm*, 341, 221-9.
- CHEN, L., LIU, H. L., GU, Y., FENG, Y. & YANG, H. L. 2015. Lumbar interbody fusion with porous biphasic calcium phosphate enhanced by recombinant bone morphogenetic protein-2/silk fibroin sustained-released microsphere: an experimental study on sheep model. *J Mater Sci Mater Med*, 26, 126.
- CHEN, M., SHAO, Z. & CHEN, X. 2012. Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *J Biomed Mater Res A*, 100, 203-10.
- COX, H. T., POLLER, L. & THOMSON, J. M. 1969. Evidence for the release of gastric fibrinolytic activity into peripheral blood. *Gut*, 10, 404-7.
- FRANCHINI, M., MENGOLI, C., CRUCIANI, M., BONFANTI, C. & MANNUCCI, P. M. 2014. Effects on bleeding complications of pharmacogenetic testing for initial dosing of vitamin K antagonists: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*, 12, 1480-7.
- GOULD, T. J., VU, T. T., SWYSTUN, L. L., DWIVEDI, D. J., MAI, S. H., WEITZ, J. I. & LIAW, P. C. 2014. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 1977-84.
- HEESTERMANS, M., NAUDIN, C., MAILER, R. K., KONRATH, S., KLAETSCHKE, K., JAMSA, A., FRYE, M., DEPPERMAN, C., PULA, G., KUTA, P., FRIESE, M. A., GELDERBLUM, M., SICKMANN, A., PRESTON, R. J. S., NOFER, J. R., ROSE-JOHN, S., BUTLER, L. M., SALOMON, O., STAVROU, E. X. & RENNE,

- T. 2021. Identification of the factor XII contact activation site enables sensitive coagulation diagnostics. *Nat Commun*, 12, 5596.
- HEMKER, H. C., GIESEN, P., AL DIERI, R., REGNAULT, V., DE SMEDT, E., WAGENVOORD, R., LECOMPTE, T. & BEGUIN, S. 2003. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33, 4-15.
- HEMKER, H. C., WILLEMS, G. M. & BÉGUIN, S. 1986. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost*, 56, 9-17.
- HINO, M., ISHIKO, O., HONDA, K. I., YAMANE, T., OHTA, K., TAKUBO, T. & TATSUMI, N. 2000. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. *Br J Haematol*, 108, 194-5.
- KÄMMERER, P. W. & AL-NAWAS, B. 2017 *S3-Leitlinie Zahnärztliche Chirurgie unter oraler Antikoagulation/ Thrombozytenaggregationshemmung; AWMF-Registernummer: 083-018* [Online]. AWMF online. Available: <https://www.dgzmk.de/documents/10165/1373255/antikoaglang.pdf/88dbcb4e-f865-4b9d-ab30-04e418b73159> [Accessed 31 January 2024, 14:00].
- KAMOH, A. & SWANTEK, J. 2012. Hemostasis in oral surgery. *Dent Clin North Am*, 56, 17-23, vii.
- KIM, K. H., JEONG, L., PARK, H. N., SHIN, S. Y., PARK, W. H., LEE, S. C., KIM, T. I., PARK, Y. J., SEOL, Y. J., LEE, Y. M., KU, Y., RHYU, I. C., HAN, S. B. & CHUNG, C. P. 2005. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol*, 120, 327-39.
- LABBERTON, L., KENNE, E., LONG, A. T., NICKEL, K. F., DI GENNARO, A., RIGG, R. A., HERNANDEZ, J. S., BUTLER, L., MAAS, C., STAVROU, E. X. & RENNE, T. 2016. Neutralizing blood-borne polyphosphate in vivo provides safe thromboprotection. *Nat Commun*, 7, 12616.
- LEI, C., ZHU, H., LI, J., FENG, X. & CHEN, J. 2016. Preparation and hemostatic property of low molecular weight silk fibroin. *J Biomater Sci Polym Ed*, 27, 403-18.
- MAILER, R. K., ALLENDE, M., HEESTERMANS, M., SCHWEIZER, M., DEPPERMAN, C., FRYE, M., PULA, G., ODEBERG, J., GELDERBLOM, M., ROSE-JOHN, S., SICKMANN, A., BLANKENBERG, S., HUBER, T. B., KUBISCH, C., MAAS, C., GAMBARYAN, S., FIRSOV, D., STAVROU, E. X., BUTLER, L. M. & RENNE, T. 2021. Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 regulates procoagulant platelet polyphosphate. *Blood*, 137, 1392-1405.
- MOONEY, E., LOH, C. & PU, L. L. Q. 2009. The use of fibrin glue in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 124, 989-992.
- MOY, R. L., LEE, A. & ZALKA, A. 1991. Commonly used suture materials in skin surgery. *Am Fam Physician*, 44, 2123-8.
- NAUDIN, C., BURILLO, E., BLANKENBERG, S., BUTLER, L. & RENNE, T. 2017. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost*, 43, 814-826.
- OSWALD, A. M., JOLY, L. M., GURY, C., DISDET, M., LEDUC, V. & KANNY, G. 2003. Fatal intraoperative anaphylaxis related to aprotinin after local application of fibrin glue. *Anesthesiology*, 99, 762-3.
- PARK, Y. R., SULTAN, M. T., PARK, H. J., LEE, J. M., JU, H. W., LEE, O. J., LEE, D. J., KAPLAN, D. L. & PARK, C. H. 2018. NF- κ B signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta Biomater*, 67, 183-195.
- RADTKE, R. 2024. *Vollstationäre Operationen und Behandlungsmaßnahmen in Krankenhäusern in Deutschland im Zeitraum 2005 bis 2022* [Online]. Statista. Available: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/76889/umfrage/operationen-und-behandlungsmassnahmen-in-deutschen->

- krankenhaeusern/#:~:text=Die%20Statistik%20gibt%20Auskunft%20%C3%BCber,15%2C92%20Millionen%20Operationen%20durchgef%C3%BChrt. [Accessed 14 January 2024, 10:00].
- ROCKWOOD, D. N., PREDA, R. C., YUCEL, T., WANG, X., LOVETT, M. L. & KAPLAN, D. L. 2011. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat Protoc*, 6, 1612-31.
- SAMUDRALA, S. 2008. Topical hemostatic agents in surgery: a surgeon's perspective. *Aorn j*, 88, S2-11.
- SMEETS, R., KNABE, C., KOLK, A., RHEINNECKER, M., GROBE, A., HEILAND, M., ZEHBE, R., SACHSE, M., GROSSE-SIESTRUP, C., WOLTJE, M. & HANKEN, H. 2017. Novel silk protein barrier membranes for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105, 2603-2611.
- SMITH, S. A. & MORRISSEY, J. H. 2008. Polyphosphate as a general procoagulant agent. *J Thromb Haemost*, 6, 1750-6.
- TIAN, Y., JIANG, X., CHEN, X., SHAO, Z. & YANG, W. 2014. Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer. *Adv Mater*, 26, 7393-8.
- TOMIZAWA, Y. 2005. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *J Artif Organs*, 8, 137-42.
- UNGER, R. E., WOLF, M., PETERS, K., MOTTA, A., MIGLIARESI, C. & JAMES KIRKPATRICK, C. 2004. Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 1069-1075.
- VERHOEF, J. J., BARENDRECHT, A. D., NICKEL, K. F., DIJKXHOORN, K., KENNE, E., LABBERTON, L., MCCARTY, O. J., SCHIFFELERS, R., HEIJNEN, H. F., HENDRICKX, A. P., SCHELLEKENS, H., FENS, M. H., DE MAAT, S., RENNE, T. & MAAS, C. 2017. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*, 129, 1707-1717.
- WANI, S. U. D. & VEERABHADRAPPA, G. H. 2018. Silk Fibroin Based Drug Delivery Applications: Promises and Challenges. *Curr Drug Targets*, 19, 1177-1190.
- WENK, E., WANDREY, A. J., MERKLE, H. P. & MEINEL, L. 2008. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *J Control Release*, 132, 26-34.
- WHEELER, A. P. & GAILANI, D. 2016. The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 30, 1099-114.
- WIJEYEWICKREMA, L. C., LAMEIGNERE, E., HOR, L., DUNCAN, R. C., SHIBA, T., TRAVERS, R. J., KAPOPARA, P. R., LEI, V., SMITH, S. A., KIM, H., MORRISSEY, J. H., PIKE, R. N. & CONWAY, E. M. 2016. Polyphosphate is a novel cofactor for regulation of complement by a serpin, C1 inhibitor. *Blood*, 128, 1766-76.
- WÖLTJE, M. & BÖBEL, M. 2017. Natural biodegradable medical polymers. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*, 351-376.
- WRIGHT, J. K., KALNS, J., WOLF, E. A., TRAWEEK, F., SCHWARZ, S., LOEFFLER, C. K., SNYDER, W., YANTIS, L. D., JR. & EGGERS, J. 2004. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. *J Trauma*, 57, 224-30.
- YU, S., YANG, W., CHEN, S., CHEN, M., LIU, Y., SHAO, Z. & CHEN, X. 2014. Floxuridine-loaded silk fibroin nanospheres. *RSC Advances*, 4, 18171-18177.
- ZHENG, Z., GUO, S., LIU, Y., WU, J., LI, G., LIU, M., WANG, X. & KAPLAN, D. 2016. Lithium-free processing of silk fibroin. *J Biomater Appl*, 31, 450-63.

Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Mein Anteil an der Publikationsdissertation ergibt sich gemäß der Autorenreihenfolge der Publikation. Es wurden von mir im Labor der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf die Experimente, wie sie in der Methodik beschrieben sind, durchgeführt. In meiner Verantwortung lag unter anderem die Datenaufzeichnung und statistische Auswertung der Ergebnisse sowie die Erstellung der Tabellen und Abbildungen. Im Anschluss wurde von mir mit Unterstützung der genannten Co-Autoren das Manuskript, welches der Publikation zu Grunde liegt, erstellt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Ralf Smeets. Für die Überlassung des Themas sowie die besondere Unterstützung und Betreuung auf meinem Weg zur Promotion. Mit Ratschlägen und einem offenen Ohr hat er mich die letzten Jahre wissenschaftlich und klinisch begleitet. Vielen Dank, Ralf.

Ebenfalls großer Dank geht an Michael Wöltje und das Institut für Textilmaschinen und Textile Hochleistungswerkstofftechnik der TU Dresden. Ihm danke ich nicht nur für die Fertigstellung der funktionalisierten Seidenmembranen und somit einem wesentlichen Beitrag zu unserem Projekt. Mit seinen produktiven Anregungen und Ratschlägen hat er meine Dissertation wesentlich geprägt und vorangebracht.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Renné und dem Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bedanken. Für die Zusammenarbeit am Projekt, das zur Verfügung stellen seines Labors für die Durchführung der Experimente sowie die Anregungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Katrin Nickel für die herzliche Einarbeitung und Unterstützung der Experimente im Labor. Mit Geduld stand sie mir während der Durchführung der Versuche stets zur Seite und prägte somit meine ersten Erfahrungen mit experimenteller Arbeit positiv.

Für die freundliche Betreuung und Durchsicht des Manuskripts möchte ich mich herzlichst bei Christian Knipfer bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meiner Familie meinen Dank aussprechen. Für die Geduld und Ermutigungen während meines Studiums und darüber hinaus. Ohne euren Halt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gilt dir, Jens. Danke, dass du immer an mich glaubst und mich stetig motivierst voranzukommen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Zohal Popal
Geburtsdatum 21.07.1993
Geburtsort Hamburg, Deutschland

Akademischer Werdegang

10/2013 – 11/2019 Universität Hamburg
Staatsexamen in Humanmedizin
Approbation: 05. Dezember 2019
Seit 08/2017 Promotion in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets

Schulbildung

2012 Allgemeine Hochschulreife
Numerus clausus: 1,2
2000 – 2012 Eliteschule des Sports, Alter Teichweg, Hamburg
1999 – 2000 Heinrich-Hertz-Schule, Hamburg

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2020 Weiterbildungsassistentin
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Praktika

07/2019 – 10/2019 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
▪ Praktisches Jahr: Anästhesie
03/2019 – 06/2019 Universitätsspital Zürich, Schweiz
▪ Praktisches Jahr: Innere Medizin
01/2019 – 03/2019 Westmead Hospital Sydney, Australien
▪ Praktisches Jahr: Herzchirurgie
11/2018 – 01/2019 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
▪ Praktisches Jahr: Allgemein Chirurgie
08/2016 Stipendiatin bei *Mediziner Nachwuchs*

- 2023 **Glidescope Video Laryngoscopy in Patients with Severely Restricted Mouth Opening – A pilot Study**
Popal, Z., Dankert, A., Hilz, P., Wunsch, V. A., Grensemann, J., Plümer, L., Nawrath, L., Krause, L., Zöllner, C., & Petzoldt, M. (2023). *Journal of clinical medicine*, 12(15), 5096. doi:10.3390/jcm12155096

Eigenanteil: Konzeptualisierung der Studie, Rekrutierung der Patientinnen und Patienten, Datenerhebung, statistische Auswertung der Ergebnisse, Literaturrecherche und Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts

- Polyphosphate loaded silk fibroin membrane as hemostatic agent in oral surgery: a pilot study**
Popal, Z., Nickel, K. F., Wöltje, M., Aibibu, D., Knipfer, C., Smeets, R., & Renné, T. (2023). *International journal of implant dentistry*, 9(1), 44. doi:10.1186/s40729-023-00503-0

Eigenanteil: Durchführung der Experimente und Datenerhebung im Labor, statistische Auswertung der Ergebnisse, Erstellung der Tabellen und Abbildungen, Literaturrecherche und Erstellung des Manuskripts

- 2022 **Elective Tracheal Intubation with the VieScope – A Prospective Randomized Non-Inferiority Pilot Study (VieScOP–Trial)**
Petzoldt, M., Engels, Y., Popal, Z., Tariparast, P. A., Sasu, P. B., Brockmann, A., Punke, M. A., & Grensemann, J. (2022). *Frontiers in medicine*, 9, 820847. doi:10.3389/fmed.2022.820847

Eigenanteil: Unterstützung bei der Durchführung der Studie sowie Revision des Manuskripts

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: