

Universität Rostock
Medizinische Fakultät
Institut für Biomedizinische Technik
(Direktor: Prof. Dr.-Ing. habil. K.-P. Schmitz)

**Funktionalisierte, degradierbare Polymerbeschichtungen zur
lokalen Freisetzung von Wirkstoffen –
Entwicklung und Charakterisierung von Drug-Eluting Stents für
verschiedene medizinische Indikationen**

Habilitationsschrift

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur habitata (Dr.-Ing. habil.)
der Fakultät für Maschinenbau und Schiffstechnik
der Universität Rostock

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Katrin Sternberg
geb. am 08.08.1969 in Warnemünde

Rostock, 08.01.2008

- Dekan: Prof. Dr.-Ing. habil. Alfred Leder
1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Klaus-Peter Schmitz
Universität Rostock
Institut für Biomedizinische Technik
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing. E. h. mult. Dr. med. h. c. Heinz Haferkamp
Leibniz Universität Hannover
Zentrum für Biomedizintechnik
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Heyo K. Kroemer
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Pharmakologie
4. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Gerd Hasenfuß
Georg-August-Universität
Herzzentrum Göttingen

Datum der Verteidigung: 12.06.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Biomaterialien und funktionalisierte Implantatoberflächen.....	3
2.1	Biomaterialien als Implantatwerkstoffe	3
2.1.1	Biostabile Polymere	5
2.1.2	Biodegradierbare Polymere.....	7
2.2	Chemische Modifizierung von Implantatoberflächen zur lokalen Wirkstoff- freisetzung	14
2.3	Beschichtung von Implantatoberflächen mit Polymeren zur lokalen Wirkstoff- freisetzung	16
3.	Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Anwendungen.....	19
3.1	Ausgewählte Drug-Eluting Stent-Indikationen	19
3.1.1	Koronare Herzkrankheit (KHK).....	20
3.1.2	Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK).....	24
3.1.3	Maligne Prostataneoplasie (MPN).....	25
3.2	Drug-Eluting Stents als funktionalisierte Implantate	27
3.2.1	Biostabile und biodegradierbare Polymermatrizes für Drug-Eluting Stents	28
3.2.2	Spezifische Wirkstoffe für Drug-Eluting Stents	29
3.2.3	Wirkungsnachweis von Drug-Eluting Stents in klinischen Studien.....	31
3.2.4	Drug-Eluting Stent-Konzepte unter materialwissenschaftlichen Gesichts- punkten	33
4.	Methodische Grundlagen der Drug-Eluting Stent-Entwicklung und -Charakterisierung.....	36
4.1	Modifizierung von Polymeren durch nasschemische Oberflächenreaktionen zur Ankopplung von Acetylsalicylsäure als Modellwirkstoff	36
4.1.1	Nasschemische Reaktionen zur Polymeroberflächenmodifizierung.....	37
4.1.2	Qualitativer und quantitativer Nachweis der Oberflächenreaktionen.....	40
4.1.3	In vitro Elution von Acetylsalicylsäure.....	50
4.1.4	In vitro Biokompatibilität der modifizierten Polymeroberflächen.....	53

4.2	Verfahrenstechnische Grundlagen zur Herstellung von Drug-Eluting Stent-Beschichtungen	57
4.2.1	Allgemeine Anforderungen an Stentbeschichtungsverfahren	57
4.2.2	Untersuchung eines Tauch- und eines Sprühverfahrens hinsichtlich ihrer Eignung für die Beschichtung von Stents in Abhängigkeit von relevanten Prozessparametern.....	59
4.2.3	Trocknungsverfahren für Drug-Eluting Stents und Untersuchung des Lösungsmittelrestgehaltes.....	68
4.3	Mikroskopische Verfahren zur Beurteilung der Oberflächen- und Volumenmorphologie des Polymer-Wirkstoff-Komposits und Schichtverbundes	71
4.3.1	Oberflächenmorphologie des Polymer-Wirkstoff-Komposits.....	72
4.3.2	Volumenmorphologie des Polymer-Wirkstoff-Komposits	77
4.3.3	Volumenmorphologie des Schichtverbundes.....	78
4.4	In vitro Elutionsverhalten von Drug-Eluting Stents.....	80
4.4.1	Theoretische Grundlagen zur diffusionsgesteuerten Wirkstoffelution	81
4.4.2	In vitro Wirkstoffelution in Abhängigkeit vom DES-Design.....	86
4.4.3	Räumliches Wirkstoffverteilungsmuster in einem in vitro Imprägnierungsmodell	96
4.5	In vitro Degradationsverhalten der polymeren Beschichtungsmatrizes.....	98
4.5.1	Nachweis des durch Hydrolyse bedingten Molmasseabbaus	99
4.5.2	Nachweis des Masseverlustes infolge Polymerfragmentation	105
4.6	Ermittlung klinisch relevanter Funktionalitätsparameter.....	107
4.6.1	Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren auf Drug-Eluting Stent-Beschichtungen	107
4.6.2	Systemintegrität zwischen Drug-Eluting Stent und Ballonkatheter.....	110
4.6.3	Schichtintegrität nach „Delivery“ im in vitro Gefäßmodell.....	112
5.	Entwicklung von Drug-Eluting Stents für die Kardiologie	114
5.1	In vitro Biokompatibilität polymerer Beschichtungsmatrizes	116
5.2	Untersuchung ausgewählter wirkstoffbedingter Effekte auf zellulärer Ebene.....	118
5.3	In vitro Wirkstoffelution koronarer Drug-Eluting Stents	128
5.4	Beurteilung der Stent-Gewebe-Interaktion im kultivierten Blutgefäßabschnitt.....	130

5.5	Beurteilung der Biokompatibilität koronarer Drug-Eluting Stents im Tiermodell Kaninchen.....	136
6.	Entwicklung von Drug-Eluting Stents für die Gefäßchirurgie	141
6.1	Untersuchung des ausgewählten Wirkstoffes hinsichtlich seiner Effekte auf Gefäßwandzellen	142
6.2	In vitro Wirkstoffelution polymerer, peripherer Drug-Eluting Stents	146
6.3	Beurteilung der Biokompatibilität polymerer, peripherer Drug-Eluting Stents im Tiermodell Schwein.....	147
7.	Entwicklung von Drug-Eluting Stents für die Urologie	151
7.1	In vitro Biokompatibilität des verwendeten Polymers.....	152
7.2	Untersuchung des ausgewählten Wirkstoffes hinsichtlich seiner Effekte auf Karzinomzellen	155
7.3	In vitro Wirkstoffelution polymerer, wirkstoffbeladener Urethrostents	156
8.	Diskussion.....	158
9.	Zusammenfassung	164
	Abkürzungsverzeichnis	168
	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	171
	Abbildungen	171
	Tabellen	178
	Literaturverzeichnis	179
	Thesen	I
	Wissenschaftliche Leistungen	V
	Selbstständigkeitserklärung.....	XII
	Danksagung.....	XIII

1. Einleitung

Die großen Fortschritte in der Biomaterialforschung und Implantattechnologie in den vergangenen Jahren eröffnen neue Möglichkeiten zur Entwicklung innovativer Implantate und somit zur Therapie bisher nicht ausreichend behandelbarer Krankheitsbilder. Neben allen damit verbundenen technologischen Herausforderungen ist die gezielte Gestaltung der Zelle-Implantat-Interaktion von entscheidender Bedeutung. Dabei kann das Implantat aus Polymeren, Metallen, Keramiken oder Kompositen bestehen (Abb. 1). Es können zur Förderung der Geweberegeneration biodegradierbare Polymere als Implantatwerkstoffe Verwendung finden. Zur Verbesserung der Adhäsion und des Einwachsens von Zellen kann es sich auch um mikroporöse Scaffolds handeln. Zur Beeinflussung von Zelldifferenzierung und Gewebenaufbau sind Form-Gedächtnis-Werkstoffe denkbar. Wirkstofffreisetzende Beschichtungen sowie chemisch modifizierte Implantatoberflächen auch in Kombination mit der Nanotechnologie steuern darüber hinaus als *Local Drug Delivery (LDD)*-Systeme [1-3] das Zellwachstum und andere Zellfunktionen. Die Begriffe Wirkstoff und Drug werden hier synonym verwendet.

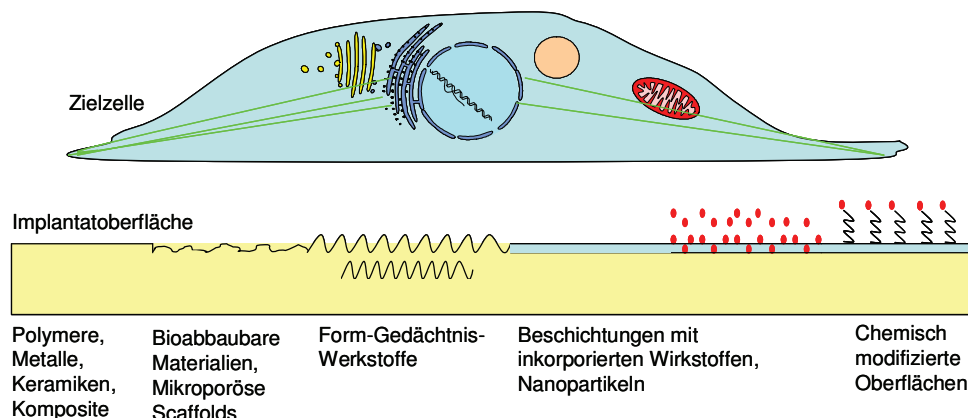


Abb. 1: Möglichkeiten der Implantatmodifizierung zur gezielten Steuerung der Zelle-Implantat-Interaktion (schematisch)

In diesem Zusammenhang erscheinen Wirkstoffträger auf der Basis von Polymerwerkstoffen besonders geeignet, da sie durch einfache Verfahren mit den Wirkstoffen beladen werden können. Außerdem ist von Vorteil, dass die Funktion des Polymers als Implantatmaterial gleichzeitig mit der als lokaler Wirkstoffträger verbunden werden kann. Die polymeren Implantatwerkstoffe sollten dabei den Wirkstoff effektiv gegenüber metabolischen Einflüssen des Organismus abschirmen, zugleich aber eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung im Organismus über einen möglichst definierten Zeitraum gewährleisten.

Um diese Strategie erfolgreich umsetzen zu können, müssen die physikochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Trägermaterialien mit chemischen und physikalischen

Methoden gezielt optimiert werden. Dabei spielen die Größe, die Oberflächenladung, die Hydrophilie und die Hydrophobie der Grenzfläche sowie die Morphologie der Oberfläche eine bedeutende Rolle. Außerdem hängt die Wahl des geeigneten Trägersystems stark vom Applikationsort ab. Um ein maximales therapeutisches Ergebnis zu erzielen, erfordert die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen demzufolge eine Vielzahl unterschiedlicher Trägersysteme. Von Vorteil ist in diesem Zusammenhang der Einsatz biodegradierbarer, bioresorbierbarer Trägersysteme, da diese nach erfolgter lokaler Wirkstoffabgabe vollständig degradieren. Die Wirkstofffreisetzungskinetik wird in diesem Fall zusätzlich durch den Degradationsprozess des polymeren Trägers bestimmt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt unter dem Gesichtspunkt der Implantatentwicklung die chemische Oberflächenmodifizierung von Polymerwerkstoffen und die Beschichtung der Implantatoberflächen, im Speziellen von Stentoberflächen, mit Polymeren zur lokalen Wirkstofffreisetzung (Kap. 2). Es werden verschiedene Strategien zur Entwicklung derartiger wirkstofffreisetzender Stents, so genannter *Drug-Eluting Stents* (DES), für verschiedene medizinische Anwendungen vorgestellt, deren Vorteile vor allem in der vollständigen Biodegradierbarkeit und der exzellenten Biokompatibilität der polymeren Wirkstoffträger sowie in der dosisabhängigen Zellspezifität der verwendeten Wirkstoffe begründet sind (Kap. 3). Die wesentlichen Zielsetzungen sind neben dem Aufbau methodischer Grundlagen zur DES-Entwicklung die in vitro Charakterisierung der entwickelten DES-Systeme unter den Gesichtspunkten der Wirkstofffreisetzung, der Polymerdegradation, der Biokompatibilität der polymeren Trägermatrizes und der biologischen Aktivität der ausgewählten Wirkstoffe auf zellulärer Ebene sowie die Prüfung der Prozessierbarkeit der DES-Prototypen, d. h. der Funktionalität der DES nach deren Montage auf Ballonkatheter sowie nach deren Sterilisation und Aufweitung (Dilatation) (Kap. 4 bis 6). Darüber hinaus wird die Biokompatibilität ausgewählter DES-Prototypen in Tiermodellen untersucht (Kap. 5 und 6).

Die Grundlage für die DES-Entwicklung bildet der Aufbau eines geeigneten Herstellungsverfahrens. In diesem Zusammenhang werden die nasschemische Oberflächenankopplung des Modellwirkstoffs Acetylsalicylsäure an biodegradierbare Polymere, die als Matrizes für die Generierung des Stentgrundkörpers (Polymerstent) und der Beschichtungsmatrix zur Anwendung kommen können, und die Beschichtung der Stentoberflächen mit Polymer-Wirkstoff-Kompositen unter Verwendung eines Tauch- und eines Sprühverfahrens vorgestellt und diskutiert. Die nasschemischen Oberflächenreaktionen werden mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie, durch die Bestimmung des Kontaktwinkels und den Nachweis der nasschemisch generierten endständigen Aminogruppen mit Ninhydrin sowie die Freisetzung der ionisch gebundenen Acetylsalicylsäure mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie ausgewertet. Die Eignung der das Eigenschaftsbild der DES maß-

geblich bestimmenden Beschichtungstechnologie wird durch verschiedene mikroskopische Verfahren zur Beurteilung der Oberflächen- und Volumenmorphologie der Polymer-Wirkstoff-Komposite und des Schichtverbundes mit dem Stentgrundkörper nachgewiesen.

Einen weiteren wesentlichen Schwerpunkt bildet die Untersuchung des Wirkstofffreisetzungsverhaltens der DES-Prototypen in Abhängigkeit von der Art der polymeren Beschichtungsmatrix und des inkorporierten Wirkstoffes sowie vom DES-Design, d. h. von der Schichtdicke und vom Schichtaufbau. Die hierzu erforderliche Evaluierung einer die in vivo Situation möglichst getreu nachahmenden in vitro Versuchsdurchführung umfasst daher beispielsweise bei der Prüfung koronarer DES sowohl die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung in isotonischer Natriumchlorid-Lösung bzw. Phosphatpuffer als auch die in porcinem Blutplasma, für die im Rahmen der Arbeit verschiedene Aufbereitungsverfahren und Chromatografiemethoden entwickelt werden.

Da zur Minimierung von späten Fremdkörperreaktionen biodegradierbare und bioresorbierbare Polymere sowohl als Beschichtungsmatrix als auch als Stentgrundkörpermaterial Verwendung finden sollen, ist es darüber hinaus notwendig, für ausgewählte Polymere aus der Gruppe der Polyhydroxycarbonsäuren das durch Hydrolyse bedingte in vitro Degradationsverhalten zu untersuchen und den Molmasseabbau mit Hilfe der Gelpermeationschromatografie zu detektieren. Diese Arbeit soll somit einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung und systematischen Charakterisierung von DES leisten sowie das Potenzial von DES für verschiedene Anwendungen in der Medizin beleuchten, indem drei ausgewählte DES-Indikationen in der Kardiologie, Gefäßchirurgie und Urologie untersucht werden.

2. Biomaterialien und funktionalisierte Implantatoberflächen

2.1 Biomaterialien als Implantatwerkstoffe

Als Biomaterial werden im Allgemeinen natürliche oder synthetische nichtlebende Materialien oder Werkstoffe bezeichnet, die in der Medizin für therapeutische oder diagnostische Zwecke eingesetzt werden und im unmittelbaren Kontakt mit dem Gewebe des Organismus stehen [4]. Diese Materialien treten dabei in Wechselwirkung mit dem entsprechenden biologischen System. Im engeren Sinne bezeichnet der Begriff Materialien, die als Implantate längerfristig im Organismusinneren verbleiben. Die meisten Menschen sind bereits selbst mit

Biomaterialien in Kontakt gekommen, sei es in Form von Verbandsmaterial, Zahnfüllungen, Kontaktlinsen, künstlichen Gelenken oder Gefäßprothesen.

Die Geschichte der Biomaterialien geht wahrscheinlich auf einige hunderte Jahre nach Beginn der Zeitrechnung zurück, da Funde eine gezielte Anwendung von körperfremden Materialien als therapeutische Implantate belegen. Nachweislich wurden beispielsweise Biomaterialien in der Antike verwendet, indem in Gummi getränktes Leinen als Wundverschluss eingesetzt wurde [5]. Aus der Zeit der Azteken wurden Schädel gefunden, die Zahnfüllungen aus Gold enthielten. Von den Römern sind Beschreibungen über urologische Katheter der Nachwelt erhalten geblieben. Die ersten Studien zur Anwendbarkeit von Kunststoffen als Biomaterial waren die Untersuchung von Zellglas (Cellophan) zur Umhüllung von Blutgefäßen im Jahre 1939 und die Untersuchung eines Nylonfadens als chirurgisches Nahtmaterial im Jahre 1941. Die moderne Geschichte der Biomaterialien begann jedoch erst ab etwa 1950 mit der Entwicklung künstlicher Gewebe und Organe. So wurde beispielsweise 1952 die erste Gefäßprothese im Menschen mit Erfolg eingesetzt. Der Ersatz einer Mitralklappe durch ein künstliches Implantat gelang erstmalig im Jahre 1960. Seit den 1960er Jahren wurde darüber hinaus damit begonnen, das Forschungsgebiet der Biomaterialentwicklung und -modifizierung zu etablieren, um entsprechend den medizinischen Erfordernissen, die funktionellen Eigenschaften und die Biokompatibilität der Materialien gezielt beeinflussen zu können. Heute werden Biomaterialien in Form von Implantaten in vielfältiger Weise in der Medizin eingesetzt. Sie dienen dabei beispielsweise als Endoprothesen dem Ersatz von Gelenkstrukturen, die durch chronische Erkrankungen oder langjährige Belastung abgenutzt sind (Abb. 2).

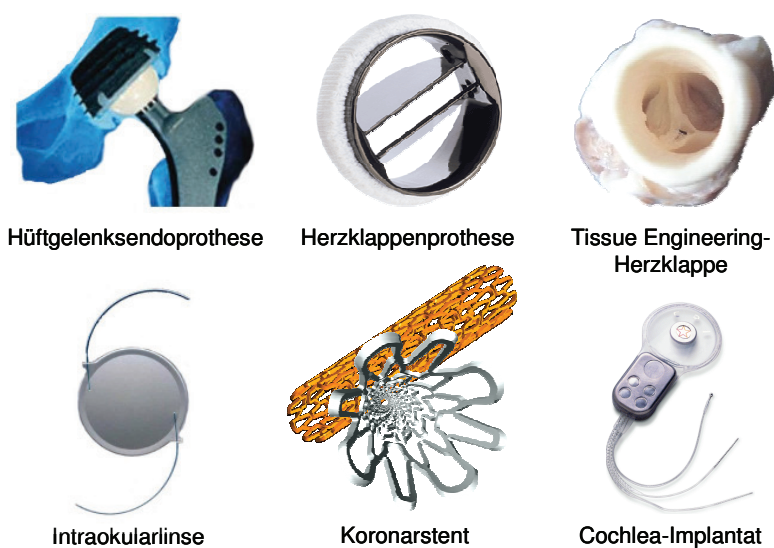


Abb. 2: Ausgewählte Beispiele für die Verwendung von Biomaterialien in Form von Implantaten

Beispiele für den Ersatz von Organen bzw. Organteilen sind mechanische und biologische Herzklappenprothesen zur Behandlung von irreparablen Herzklappendefekten und Intraokularlinsen zur Therapie des Katarakts. Stents dienen der Kontinuitätserhaltung von Lumina, beispielsweise der Blutgefäße, der harnableitenden Wege, der Gallengänge, der Luftröhre und der Speiseröhre. Den Hörnerv elektrisch stimulierende Cochlea-Implantate werden als Hörprothesen zur Routineversorgung tauber Patienten eingesetzt.

Um Biomaterialien als Implantatmaterialien verwenden zu können, müssen diese folgende wesentliche Anforderungen erfüllen:

- Technische Funktionsfähigkeit durch auf das jeweilige Implantat abgestimmte mechanische Eigenschaften
- Ausreichende Stabilität gegenüber physiologischen Medien
- Rückstandsfreie Metabolisierung bei abbaubaren Biomaterialien
- Hohe Biokompatibilität
- Leichte Verarbeitbarkeit
- Ausreichende Lagerfähigkeit
- Sterilisierbarkeit

Als Biomaterialien kommen Materialien aus verschiedenen Werkstoffklassen zum Einsatz. Zu den ältesten als Biomaterial verwendeten Werkstoffen zählen Metalle, insbesondere Edelmetalle wie Platin, Gold oder Titan. Aber auch metallische Legierungen, Keramiken, Gläser oder Verbundwerkstoffe (Komposite) finden als Materialien Berücksichtigung. Weit verbreitet als Biomaterialien sind darüber hinaus natürliche Polymere, wie Kollagen, Alginat und Chitosan sowie synthetische Polymere, wie Polyethylen, Polyethylenterephthalat und Polytetrafluorethylen. Hinsichtlich ihres Einsatzes als permanente bzw. temporäre Implantatmaterialien wird außerdem in biostabile bzw. biodegradierbare Polymere unterschieden.

2.1.1 Biostabile Polymere

Für den permanenten Einsatz von Implantaten werden biostabile Materialien benötigt. Da sich die vorliegende Arbeit mit Polymeren für die Implantatentwicklung beschäftigt, soll im Folgenden schwerpunktmäßig auf biostabile Polymere eingegangen werden.

Biostabile Polymere sind weitestgehend inert. Die Bezeichnung der Biostabilität ist jedoch mit Einschränkungen zu versehen, da die meisten als biostabil bezeichneten Polymere aufgrund des „aggressiven“ physiologischen Milieus im menschlichen Organismus langfristig zumindest teilweise abgebaut werden. So können physikalische Abbauprozesse durch Quellung bzw. durch Versprödung infolge des Verlustes („Auswaschung“) von Weichmachern stattfinden. Aber auch chemische Abbauprozesse durch allmähliche Oxydation,

beispielsweise von Polyethersegmenten in Polyurethanen in α -Position zum Ether-Sauerstoff [6], oder durch langfristige Hydrolyse, beispielsweise von Polyamiden [7] oder Polyethylenterephthalat [7, 8], sind bekannt. Diese über einen langen Zeitraum sich vollziehenden Abbaureaktionen können somit bei Dauerimplantaten der Langzeithaltbarkeit entgegenwirken, indem sie eine allmähliche Materialermüdung (Alterung) verursachen.

Biostabile Polymere müssen für die permanente Verwendung als Implantatmaterialien Materialeigenschaften aufweisen, die für die Erfüllung der Funktion im Gewebe erforderlich sind. So sollten sie beispielsweise als Gelenkersatzmaterialien eine ausreichende Abriebfestigkeit, als Materialien für den Herzklappenersatz eine hohe Dauerwechselbelastbarkeit sowie als Knochenersatzmaterialien eine ausreichende Festigkeit und Elastizität haben. Da aufgrund der zu erfüllenden Funktion des Implantats die technischen Anforderungen an das Implantatmaterial sehr verschieden sind, sind diese nur durch eine breite Auswahl an geeigneten Polymerwerkstoffen zu realisieren. Ausgewählte biostabile Polymere, die für permanente Implantate Verwendung finden, sind:

- Polyethylen (PE)
Ultrahochmolekulares PE ist seit seiner Einführung durch J. Charnley im Jahre 1962 der am häufigsten angewendete polymere Gleitwerkstoff in der Hüft- und Kniegelenksendoprothetik.
- Poly(ethylenterephthalat) (PET)
PET wird als Dacron oder Terylene zu Nahtmaterialien und künstlichen Blutgefäßprothesen verarbeitet. Außerdem wird es als Stentmaterial erprobt.
- Poly(tetrafluorethylen) (PTFE)
Die hohe chemische Beständigkeit von PTFE, das auch als Teflon oder Gore-Tex bezeichnet wird, garantiert eine lange Lebensdauer und eine gute Verträglichkeit des Implantats. Es wird bevorzugt für Gefäßimplantate und als orthopädisches Bandersatzmaterial genutzt.
- Poly(vinylchlorid) (PVC)
PVC ist ein sehr hartes und sprödes Material, das erst durch die Zugabe von Weichmachern für Implantatanwendungen geeignet ist. Die notwendigen Zusätze sind jedoch häufig toxisch, so dass es vor allem für Kurzzeitapplikationen als Kathetermaterial Verwendung findet.
- Poly(methylmethacrylat) (PMMA)
PMMA ist ein hartes Material mit hoher Festigkeit. Es wird als Material für Intraokularlinsen und künstliche Herzklappen verwendet. Außerdem wird es als Knochenzement in der Hüftprothetik angewandt.
- Polyamide (PA)
Aufgrund der thermoplastischen Eigenschaften werden aus aromatischen PA, wie Nomex oder Kevlar, künstliche Sehnen und Bänder hergestellt. Aliphatische PA dienen als Nahtmaterial.

- Polyurethane (PUR)

PUR, speziell Polyetherurethane, werden aufgrund ihrer antithrombogenen Eigenschaften bevorzugt als Materialien für Implantate im Blutkontakt, wie künstliche Herzklappen, Gefäßprothesen, Herzschrittmacher und Ballonkatheter, eingesetzt.
- Silikone

Silikone weisen eine gute Biokompatibilität auf. Sie besitzen eine hohe Resistenz im Körpermilieu. Silikone sind leicht formbar und werden unter anderem für den Weichteilersatz in der plastischen Chirurgie, für Intraokularlinsen und für künstliche Gelenke genutzt.

2.1.2 Biodegradierbare Polymere

Biodegradierbare Biomaterialien enthalten chemische Bindungen, die unter den Bedingungen im Organismus spaltbar sind. Häufig werden deshalb Polymere verwendet, die hydrolytisch spaltbare Bindungen enthalten. Diese Bindungen werden aufgrund des hohen Wasseranteils im menschlichen Körper unabhängig vom Implantationsort abgebaut. Darüber hinaus gibt es aber auch chemische Bindungen, die selektiv durch Enzyme angegriffen werden. Da die Enzymkonzentration im Organismus jedoch sehr unterschiedlich ist, sind solche chemischen Bindungen bevorzugt in polymeren Biomaterialien vorhanden, die lokale Effekte, beispielsweise beim organspezifischen Wirkstofftransport (drug targeting), erzielen sollen. Synthetische, biodegradierbare Polymere werden im Allgemeinen nicht-enzymatisch durch Hydrolyse abgebaut (Tab. 1), indem das im umliegenden Gewebe vorhandene Wasser die Polymerkette zuerst zu Oligomeren und im weiteren Verlauf zu Monomeren spaltet [5].

Tab. 1: Überblick über einige wichtige Vertreter synthetischer, biodegradierbarer Polymere, deren Abbaumechanismus in erster Linie die nicht-enzymatische Hydrolyse darstellt [9]

Polymerklassen	Vertreter
Aliphatische Polyester	Poly(α -hydroxycarbonsäuren): Polyglycolid (PGA) Polylactid (PLA) Poly(ω -hydroxycarbonsäuren): Poly(ϵ -caprolacton) (PCL)
Polyanhydride	Polysebacinsäureanhydrid
Polycarbonate	Polytrimethylencarbonat (PTMC)
Polyorthoester	Poly(2,2-diethoxytetrahydrofuran-co-1,6-hexandiol)
Anorganische Polymere	Polyphosphazene

In der Tabelle 2 sind dagegen Polymere zusammengefasst, die vor allem enzymatisch abgebaut werden. Dies sind hauptsächlich durch Proteasen abbauende Polypeptide sowie Polysaccharide, wie Dextran und Amylose, die beispielsweise durch Amylase degradiert werden. Aber auch die Gruppe der Biopolyester, deren Abbau durch Esterasen katalysiert wird, ist in diesem Zusammenhang zu nennen.

Der Vorteil bei der Verwendung biodegradierbarer, bioresorbierbarer Implantatmaterialien gegenüber permanenten liegt darin, dass durch die vollständige Auflösung des Implantats im menschlichen Organismus meist notwendige Zweitoperationen zur Implantatentfernung entfallen. Außerdem werden Langzeitfremdkörperreaktionen vermieden. Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist, dass die Wachstumsprozesse im kindlichen Organismus ungehindert erfolgen können.

Tab. 2: Überblick über einige wichtige Vertreter biodegradierbarer Polymere, die durch Enzyme abgebaut werden [9]

Polymerklassen	Vertreter
Natürliche Polypeptide	Kollagen Kasein
Synthetische Polypeptide	Poly-L-lysin
Polysaccharide	Amylose Dextran Stärke Zellulose
Biopolyester	Poly(β -hydroxycarbonsäuren): Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) Poly(γ -hydroxycarbonsäuren): Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB))

Eine Gruppe von biodegradierbaren, bioresorbierbaren Biomaterialien stellen die Polyhydroxycarbonsäuren dar. Diese werden im Allgemeinen synthetisch durch ringöffnende Polymerisation (ROP) von Lactonen oder cyclischen Diestern erhalten, da die direkte Synthese aus den entsprechenden Hydroxycarbonsäuren unter Wasserabspaltung nur zu oligomeren Produkten führt. Die ROP erfolgt anionisch, kationisch oder in Anwesenheit von Koordinationskatalysatoren. Als Koordinationskatalysatoren für die Bulkpolymerisation kommen wegen ihrer hohen Effektivität hinsichtlich Ausbeute und Molmasse Zinn(II)-Verbindungen [10], wie Sn(II)-chlorid, Sn(II)-laurat oder Sn(II)-2-ethylhexanoat, zum Einsatz. Für die biomedizinische Anwendung werden alternativ besser biokompatible Zinkverbindungen [10], wie Zn(II)-2-ethylhexanoat oder Zn-Pulver, verwendet.

Polyactid (PLA)

Der bekannteste Vertreter der Poly(α -hydroxycarbonsäuren) ist das Polyactid (PLA) (Tab. 1). Es wird durch ROP aus dem Lactid hergestellt (Abb. 3). Da die Milchsäure ein Chiralitätszentrum enthält, existieren vom Lactid drei verschiedene Stereoisomere: die Enantiomere L,L-Lactid und D,D-Lactid sowie das Diastereomere meso-D,L-Lactid. Außerdem kommt das Racemat aus L,L- und D,D-Lactid vor.

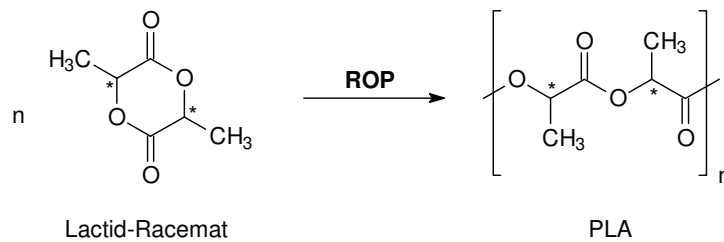


Abb. 3: Reaktionsschema zur Synthese von Polyactid (PLA) aus dem cyclischen Dimer Lactid durch ringöffnende Polymerisation (ROP)

Sofern bei der Polymerisation keine Epimerisierung erfolgt, werden die Eigenschaften von PLA durch die Stereosequenz der Monomere bestimmt. Poly(L-lactid) (PLLA) ist mit einer Kristallinität von etwa 37 % semikristallin. Es hat einen Schmelzpunkt (T_m) von 170-180 °C und eine Glasübergangstemperatur (T_g) von 50-60 °C [11]. Poly(D-lactid) (PDLA) mit $T_m = 180$ °C und $T_g = 67$ °C weist ebenfalls eine teilkristalline Struktur auf [8]. Poly(D,L-lactid) (PDLLA) ist mit $T_g = 57$ °C amorph [12].

PLLA und PDLA werden aufgrund ihres teilkristallinen Charakters hydrolytisch langsamer abgebaut als das amorphe PDLLA. Zur Variation der Abbauphase werden statt der Homopolymere meist Copolymere aus Lactid und Glycolid verwendet. Durch derartige Copolymerisationen entstehen Materialien, die aufgrund ihres geringen Kristallisationsgrades bzw. ihres amorphen Charakters ein beschleunigtes Degradationsverhalten gegenüber den Homopolymeren PLLA und PDLA aufweisen [12].

Diese biokompatiblen, thermoplastischen Materialien finden in der Medizin und Pharmazie Anwendung, beispielsweise als Implantatmaterial zur Fixierung von Knochenfrakturen [13], als chirurgisches Nahtmaterial [14] und für Local Drug Delivery-Systeme [15, 16]. In der Literatur wird PLLA nach verschiedenen in vitro und in vivo Untersuchungen hinsichtlich der Biokompatibilität als das am besten geeignete bioresorbierbare Polymer für Koronarstents angesehen [17]. In diesem Zusammenhang hat eine japanische Arbeitsgruppe Ergebnisse zu selbstexpandierbaren Koronarstents aus PLLA [18, 19] veröffentlicht, die bei 15 Patienten erfolgreich eingesetzt wurden [20].

Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB))

Als ein Vertreter der Poly(β -hydroxycarbonsäuren) lässt sich auch Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) durch ROP aus β -Butyrolacton (β -BL) herstellen (Tab. 2, Abb. 4). P(3HB) wird jedoch vor allem als natürlicher, optisch aktiver Polyester der D-3-Hydroxybuttersäure von verschiedenen Bakterien in Form von Granula gebildet [21-23]. Die Synthese und Speicherung von P(3HB) erfolgt in den Bakterien durch die Begrenzung eines essentiellen Nährstoffs bei gleichzeitigem Überschuss einer verwertbaren Kohlenstoffquelle. Auf dieser Grundlage wurden großtechnische Verfahren entwickelt, die basierend auf der bakteriellen Synthese nach der Gewinnung und Aufreinigung zu Endprodukten mit reproduzierbaren Eigenschaften führen [24].

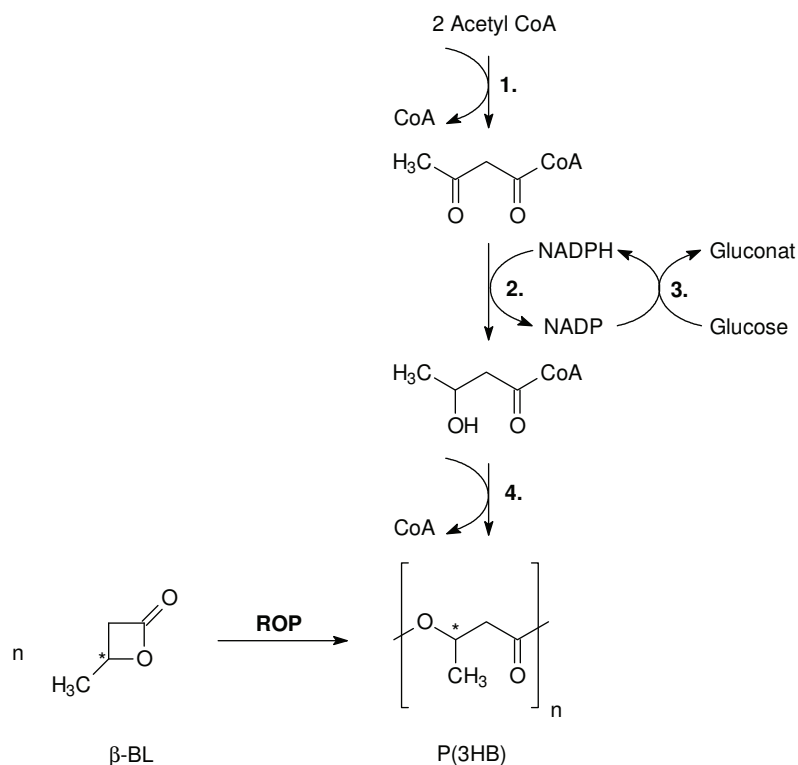


Abb. 4: Reaktionsschema zur chemischen Synthese von Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) aus β -Butyrolacton (β -BL) durch ringöffnende Polymerisation (ROP) und Biosynthese von P(3HB) in *Ralstonia eutropha* unter Beteiligung folgender Enzyme: 1. β -Ketothiolase, 2. NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase, 3. Glucose-Dehydrogenase, 4. PHA-Synthase [25].

In dem Bakterium *Ralstonia eutropha* beispielsweise erfolgt die P(3HB)-Synthese ausgehend von Acetyl-CoA in drei Biosyntheseschritten, für die drei unterschiedliche Enzyme benötigt werden, die β -Ketothiolase, die NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase sowie die PHA-Synthase (Abb. 4). Diese Enzyme werden durch drei Gene kodiert, die inzwischen erfolgreich kloniert worden sind [26]. Damit wurde die Grundlage für die Etablierung des PHA-Stoffwechsels in Pflanzen geschaffen. Pflanzen stellen eine vielversprechende Alternative für

die PHA-Produktion gegenüber der nicht wirtschaftlichen PHA-Produktion in Bakterien dar, da sie die notwendige Energie durch Photosynthese selbst erzeugen. Pflanzen fehlen jedoch die Enzyme für den PHA-Abbau und damit für deren energetische Nutzung. Es ist gelungen, die Gene für die P(3HB)-Synthese mittels Gentransfer in die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu übertragen, die danach bis zu 40 mg/g Frischgewicht P(3HB) erzeugte [26].

Die natürliche P(3HB) hat aufgrund der Isotaktizität eine kompakte, helicale, kristalline Struktur mit hochschmelzenden thermoplastischen Eigenschaften ($T_m = 180\text{ °C}$), die vergleichbar sind mit denen des hochisotaktischen Polypropylens [27, 28] und mit denen des PLA [29]. Von Nachteil ist die hohe Sprödigkeit und geringe Reißfestigkeit der natürlichen P(3HB). Durch Additive, wie Weichmacher und Blendpartner, können die mechanischen Eigenschaften von P(3HB) den speziellen Anforderungen an ein Implantatmaterial angepasst werden. So wurden beispielsweise Glycerolderivate [30, 31] und Zitronensäureester [32, 33] als Weichmacher untersucht. Blends aus natürlicher, isotaktischer, teilkristalliner und synthetischer, ataktischer, amorpher P(3HB) führten zu Materialien mit höherer Flexibilität und Reißfestigkeit [34].

P(3HB) wird bedingt durch deren Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit von zahlreichen Forschergruppen hinsichtlich ihres Potenzials für den Einsatz als Implantatwerkstoff untersucht [35]. Darüber hinaus hat P(3HB) im Vergleich zu den synthetisch hergestellten biodegradierbaren Polyestern den Vorteil, dass das Polymer als hochreiner Stoff ohne Katalysator- oder Syntheserückstände vorliegt. Weiterhin ist für die Entwicklung von Medizinprodukten vorteilhaft, dass sich P(3HB) in herkömmlicher Weise ohne besondere Aufwendungen verarbeiten lässt. So wurden beispielsweise poröse Patches für den Einsatz in der Kardiologie zur Perikardsubstitution [36, 37] und zum Verschluss von Vorhofseptumdefekten [38] entwickelt. Außerdem wurden Schienungshülsen aus P(3HB) für Gefäße und Hohlorgane zur Unterstützung der Gewebs- und Organheilung untersucht [39]. Darüber hinaus konnte von *Heimerl et al.* (1989) [39] nachgewiesen werden, dass sich Trennfolien aus P(3HB) als mechanische Barriere zum Schutz von Organen, Nervenbahnen und Sehnen gegen sich neu bildendes Narbengewebe eignen [39]. Die Anwendung von P(3HB) für die Nervenregeneration [40] ergibt sich aus ihren piezoelektrischen Eigenschaften, da das Wachstum von Nervengewebe durch elektrische Ladung stimuliert wird [41]. Auch bei der Anwendung von P(3HB) als Knochenersatzmaterial können die piezoelektrischen Eigenschaften von Vorteil sein. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass P(3HB)-Komposite das Knochenwachstum und die Knochenheilung stimulieren [42]. Weiterhin wurde P(3HB) als potentielles Material für Koronarstents [18, 43-46] untersucht. Nach Implantation von Tantalstents, die mit Copolymeren aus 3-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyvaleriansäure überzogen waren, in porcine Koronararterien, wurde eine mit synthetischen Polyestern

vergleichbare gute Biokompatibilität festgestellt [44], während in anderen tierexperimentellen Studien auch über Entzündungsreaktionen berichtet wurde [17, 46].

Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB))

Ein Vertreter der Poly(γ -hydroxycarbonsäuren) ist die Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) (Tab. 2). Auch P(4HB) lässt sich durch ROP aus γ -Butyrolacton (γ -BL) synthetisieren, jedoch hochmolekulare P(4HB) ist wie P(3HB) nur aus Mikroorganismen im Fermentationsprozess gewinnbar (Abb. 111) [47].

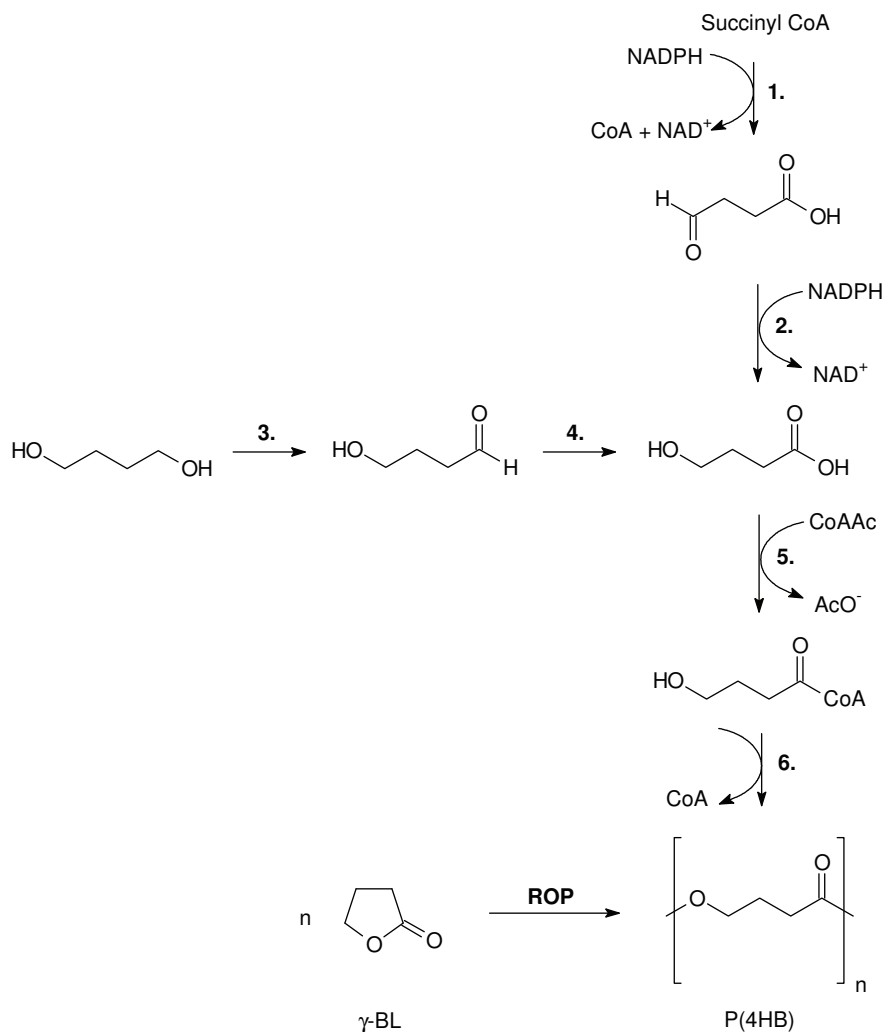


Abb. 5: Reaktionsschema zur chemischen Synthese von Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) aus γ -Butyrolacton (γ -BL) durch ringöffnende Polymerisation (ROP) und Biosynthese von P(4HB) in *Escherichia coli* K12 unter Beteiligung folgender Enzyme: 1. Succinsemialdehyd-Dehydrogenase, 2. 4-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase, 3. Diol-Oxidoreduktase, 4. Aldehyd-Dehydrogenase, 5. Coenzym A-Transferase und 6. PHA-Synthase [47].

Für die P(4HB)-Biosynthese wird das in der biopharmazeutischen Industrie fest etablierte Bakterium *Escherichia coli* K12 verwendet, das darüber hinaus den Vorteil bietet, hocheffizient in der Synthese von P(4HB) zu sein. Die P(4HB)-Synthese erfolgt ausgehend von Suc-

ceryl-CoA in den in Abbildung 5 dargestellten Biosyntheseschritten, für die wie bei P(3HB) wiederum verschiedene Enzyme benötigt werden.

P(4HB) ist ein thermoplastischer Werkstoff, der sich einfach aus der Lösung im Tauch- und Sprühverfahren sowie aus der Schmelze durch Extrusion verarbeiten lässt. Sie hat einen T_m von 60 °C und eine T_g von -51 °C [29]. Durch die Copolymerisation von 4-Hydroxybuttersäure mit anderen Hydroxycarbonsäuren, z. B. 3-Hydroxybuttersäure, lassen sich Polymermaterialien mit einer hohen Variabilität der mechanischen Eigenschaften generieren [47]. Betragen die Anteile von 4-HB im Copolymer mit 3-HB etwa 20-35 %, so ist das resultierende Copolymer fest, aber zugleich sehr flexibel. Bei niedrigeren 4-HB-Anteilen wird dagegen von eher harten und steifen Materialien ausgegangen, deren mechanische Eigenschaften mit denen von P(3HB) vergleichbar sind. P(4HB) weist eine hohe Zugfestigkeit auf, die der des hochmolekularen Polyethylens ähnlich ist. Eine Reißdehnung von 1000 % verdeutlicht die hohe Verformungsfähigkeit von P(4HB) [47].

Aufgrund ihrer interessanten mechanischen Eigenschaften und ihrer in zahlreichen Studien nachgewiesenen guten Biokompatibilität hat P(4HB) ein großes Potenzial für verschiedenste medizinische Anwendungen. P(4HB) wurde bereits als Scaffold für das Tissue Engineering von Herzklappen [48, 49] und vaskulären Patches [50], als Nahtmaterial [51, 52], für orthopädische Implantate [51, 52], für Stents [51-53] und für Local Drug Delivery-Systeme [47, 52] untersucht.

Vergleich von PLLA, P(3HB) und P(4HB)

In der Tabelle 3 sind abschließend ausgewählte mechanische Kennwerte der Polyhydroxycarbonsäuren PLLA, P(3HB) und P(4HB) sowie die Degradationszeit, die für einen vollständigen Abbau der Polymere benötigt wird, zusammengefasst.

Tab. 3: Überblick über ausgewählte Eigenschaften von Polyhydroxycarbonsäuren [47]

Polymere	Zugfestigkeit [MPa]	E-Modul [MPa]	Reißdehnung [%]	Degradationszeit
PLLA	28-50	1200-2700	6	1,5-5 Jahre
P(3HB)	36	2500	3	2 Jahre
P(4HB)	50	70	1000	8-52 Wochen

2.2 Chemische Modifizierung von Implantatoberflächen zur lokalen Wirkstofffreisetzung

Für die Oberflächenfixierung von Wirkstoffen auf entsprechenden Trägermaterialien ist eine gerichtete Anbindung unter vollständiger Aufrechterhaltung der biomolekularen Funktionen notwendig. Dabei hängt die Wahl der Fixierungsmethode stark von der Anwendung sowie vom verwendeten Trägermaterial ab. Rein adsorptive Wirkstoffbeschichtungen weisen einen sehr geringen Stabilitätsgrad auf, werden aber aufgrund ihrer Einfachheit dennoch häufig eingesetzt [54, 55]. Die kovalente Anbindung von Wirkstoffen an Materialoberflächen ist dagegen sehr stabil und die Molekülausrichtung ist über eine geeignete Syntheseplanung gezielt steuerbar [56, 57]. Die zur kovalenten Kopplung herangezogenen chemischen Bindungen sollten dabei jedoch so ausgewählt werden, dass sie unter physiologischen Bedingungen spaltbar sind und eine lokale Freisetzung des Wirkstoffes erlauben. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es durch die kovalente Bindung zu einer Beeinträchtigung der biologischen Aktivität des Wirkstoffes kommen kann, wenn funktionelle Gruppen in die Bindung mit einbezogen werden, die maßgeblich die biologische Wirksamkeit der Substanz bestimmen. Eine Alternative mittlerer Stabilität bietet die Anbindung von Wirkstoffen über Affinitätsreaktionen [58].

Für die Implantatanwendung, insbesondere wenn strukturierte, dreidimensionale Oberflächen, z. B. Matrixstrukturen für das *Tissue Engineering* mit mikrofluidischen Kanälen zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Zellen, benötigt werden, stellen Polymere ein geeignetes Trägermaterial dar, da sie durch verschiedene, leicht handhabbare Verarbeitungsverfahren in die gewünschte Form gebracht werden können. Zudem lassen sich die chemischen, physikalischen und optischen Eigenschaften von polymeren Trägermaterialien durch die Art des Polymers sowie durch Additive steuern. Viele Polymere haben allerdings den Nachteil, dass sie in chemischer Hinsicht vergleichsweise inert sind, da sie lediglich ein aliphatisches CH-Grundgerüst ohne reaktive funktionelle Gruppen aufweisen. Zu dieser Gruppe der Polymere gehören auch die bereits im Kapitel 1 vorgestellten Polyhydroxycarbonsäuren. Die Wirkstofffixierung kann hier zwar durch Adsorption, hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen, an die Implantatoberfläche erfolgen, jedoch ist für dreidimensionale, komplexe Oberflächenstrukturen die definierte und stabile kovalente Anbindung der Wirkstoffe notwendig. Diese chemische Funktionalisierung von Polymeroberflächen ist nach dem heutigen Stand der Technik beispielsweise durch nasschemische Oberflächenreaktionen [59-61], durch plasmachemische Prozesse [50, 62, 63] und durch photochemische Methoden über photoaktivierbare Crosslinker [64, 65] möglich.

Nasschemische Oberflächenmodifizierung

Bei der nasschemischen Modifizierung von festen Polymerwerkstoffen sind nur die funktionellen Gruppen der Oberfläche zugänglich, da es sich um einen heterogenen Prozess handelt. Die nasschemischen Oberflächenreaktionen sind stark von den gewählten Reaktionsbedingungen, wie der Temperatur, dem Lösungsmittel und den Aufbereitungsverfahren, abhängig. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse garantieren zu können, müssen Lösungsmittel gewählt werden, in denen das Polymer nicht quillt, da sonst beispielsweise die angreifbare Oberfläche stark vergrößert ist und eine tiefergehende Modifizierung stattfindet. Von Vorteil ist die einfache Handhabbarkeit der nasschemischen Methode. Ein Nachteil nasschemischer Oberflächenreaktionen an Festkörpern kann sein, dass die Reaktionen häufig nicht zu einer 100 %igen Umsetzung führen und somit ein Gemisch modifizierter und nicht modifizierter funktioneller Gruppen vorliegt.

Da bei den hochmolekularen Polyhydroxycarbonsäuren für die direkte Wirkstoffankopplung nur die vergleichsweise wenigen freien Hydroxyl- (-OH) und Carboxyl-Gruppen (-COOH) an den Enden der Polymerketten zur Verfügung stehen, sind hier zusätzliche Oberflächenaktivierungsreaktionen erforderlich. So kann beispielsweise durch die nasschemische säurekatalysierte bzw. basische Spaltung von Esterbindungen die Anzahl an diesen reaktiven Gruppen an der Polymeroberfläche erhöht werden [66-68]. Nach der Oberflächenaktivierung ist es möglich, in Folgeschritten Spacermoleküle und die gewünschten Wirkstoffmoleküle anzukoppeln.

Plasmachemische Oberflächenmodifizierung

Eine alternative Methode zur Oberflächenaktivierung von Polymerwerkstoffen, wie Polyhydroxycarbonsäuren, stellt die Plasmabehandlung mit thermisch gering belastendem Niederdruckplasma dar. Durch eine entsprechende Auswahl der Prozessgase lassen sich polare und funktionelle Gruppen auf der Polymeroberfläche mit spezifischen Eigenschaften erzeugen. So reagiert beispielsweise Gasplasma, das aus reaktivem Sauerstoff besteht, mit dem Wasserstoff und dem Kohlenstoff aus der Oberfläche der Polyhydroxycarbonsäuren unter Bildung der typischen Reaktionsprodukte Kohlendioxid und Wasser, die unter den gegebenen Vakuumbedingungen als leicht flüchtige Gase entfernt werden können [68, 69]. An der Polymeroberfläche bilden sich durch diese plasmachemischen Reaktionen des atomaren Sauerstoffs neue sauerstoffhaltige funktionelle Carbonyl- (-C=O), Carboxyl- (-COOH) oder Hydroxyl-Gruppen (-OH), die für eine Ankopplung von Wirkstoffen über Spacer zur Verfügung stehen. Die Anlagerung der polaren, gegebenenfalls reaktiven funktionellen Gruppen an der Polymeroberfläche ist relativ stabil, da die polaren Gruppen über σ -Bindungen an die

Polymerkette gebunden sind. Der Vorteil der Plasmabehandlung besteht darin, dass nahezu jedes Polymer großflächig und einheitlich modifiziert werden kann. Von Nachteil ist der große apparative Aufwand.

Photochemische Oberflächenmodifizierung

Eine weitere Möglichkeit zur chemischen Modifizierung von Polymeroberflächen stellt deren photochemische Veränderung durch die Einwirkung von Photonen dar. Die photochemischen Reaktionen sind dabei von polymerbedingten Parametern, wie der Polarität, der Kristallinität, der Viskosität und der Glasübergangstemperatur, abhängig. Die für die Wirkstoffankopplung notwendigen funktionellen Gruppen können durch UV-Lampen, Excimerlampen und UV-Laser erzeugt werden. Die direkte Ankopplung von Wirkstoffmolekülen kann über photoaktivierbare Gruppen, beispielsweise von Benzophenon-Derivaten, erfolgen [70, 71]. Darüber hinaus wurden photoinduzierte Polymerisationen, wie die Copolymerisation von PLLA-Oberflächen mit Methacrylsäure, beschrieben, die eine Immobilisierung von Kollagen mit Carbodiimiden erlaubte [72].

2.3 Beschichtung von Implantatoberflächen mit Polymeren zur lokalen Wirkstofffreisetzung

Wirkstofffreisetzende Polymerbeschichtungen für Implantate gewinnen an Bedeutung, wenn durch die chemische Ankopplung der Wirksubstanzen an die Implantatoberfläche und die resultierende lokale Wirkstofffreisetzung keine ausreichende pharmakologische Wirkung am Implantationsort erzielt wird. Dies kann der Fall sein, wenn lokal sehr hohe Wirkstoffdosen erforderlich sind und wenn die Wirkstofffreisetzung über lange Zeiträume erfolgen muss. Hier stößt die Wirkstoffapplikation über chemische Modifizierungsreaktionen an Grenzen, da kein ausreichendes Wirkstoffdepot zur Verfügung gestellt werden kann. Darüber hinaus ist es möglich, durch einen Mehrschichtaufbau und eine zeitlich programmierbare Freisetzung verschiedener Wirksubstanzen eine Optimierung der Zelle-Implantat-Interaktion in verschiedenen Phasen des Einheilungsprozesses des Implantats vorzunehmen. Dieses Konzept der sogenannten aktiven Implantatbeschichtungen baute auf dem der passiven Implantatbeschichtungen auf, die entwickelt worden waren, um die Biokompatibilität des Implantats zu erhöhen.

Für *passive Implantatbeschichtungen* kommen bevorzugt anorganische Verbindungen zur Anwendung. Bei Implantaten im Blutkontakt haben sich aufgrund ihrer hervorragenden Hä-

mokompatibilität [73-75] diamantartige Kohlenstoff-Schichten (Diamond-like carbon, DLC) [76] und amorphe Siliziumkarbid (α -SiC:H)-Beschichtungen [76] durchgesetzt, die überwiegend durch plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PECVD) hergestellt werden. Für Implantate im Knochenkontakt werden zur Verbesserung der Osseointegration beispielsweise Beschichtungen auf der Basis von Hydroxylapatit [77] verwendet.

Die auf der Grundlage der Plattformen der passiven Beschichtungen entwickelten *aktiven Implantatbeschichtungen* zeichnen sich für ihre Anwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin dadurch aus, dass sie die Einheilung der Implantate durch die lokale Freisetzung von beispielsweise antiphlogistischen, antibiotischen und wachstumssteuernden Wirksubstanzen verbessern. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang unter anderem die Beschichtung von osteosynthetischen Implantaten mit Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Frakturheilung [78], von dentalen Endodontie-Titanimplantaten mit antiphlogistischen und antibiotischen Wirkstoffen zur Verbesserung der Kontaktflächenkompatibilität zwischen periimplantärer Gingiva und Implantathals [79], von Cochlea-Implantatelektrodenträgern mit das Wachstum von Fibroblasten hemmenden und das Wachstum von Spiralganglienzellen fördernden Wirkstoffen zur Verhinderung der Bindegewebsneubildung und zur Regeneration des Hörnervs [80], von Intraokularlinsen mit antiproliferativen Substanzen zur Verhinderung des Nachstars [81] und von Stents mit antiphlogistischen und antiproliferativen Wirkstoffen zur Vermeidung der Wiederverengung des Stentlumens [82].

Auf dem Gebiet der Drug-Eluting Stents (DES), die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, beschäftigen sich viele Forschergruppen weltweit mit der Entwicklung von polymerbasierten Beschichtungen für die lokale Wirkstofffreisetzung (Abb. 6). Die Begriffe Wirkstofffreisetzung und Wirkstoffelution werden hier synonym verwendet.

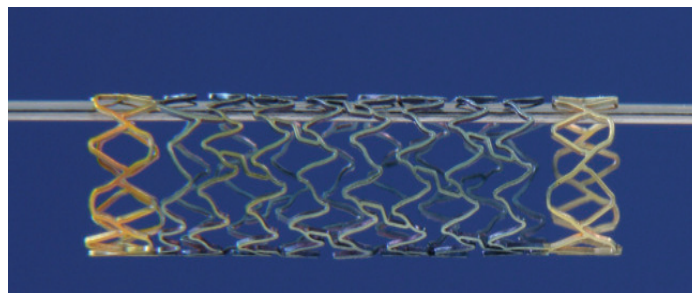


Abb. 6: Koronarstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm, Goldröntgenmarker an den Stentenden) mit wirkstoffhaltiger PLLA-Beschichtung (Sternberg et al. (2007) [83])

Ein Stent ist ein röhrenförmiges, meist gitterartiges Implantat, das zur Abstützung der Wände von Hohlorganen und somit zum Offenhalten der Lumina dient. Es wird spekuliert, dass die Bezeichnung auf den Zahnarzt *C. T. Stent* (1845-1901) zurückzuführen ist, der

Stützmaterialien für medizinische Anwendungen entwickelte. Heute existiert eine große Vielfalt von Metallstents, die am häufigsten aus Edelstahl (316L), Kobalt-Chrom (CoCr)-Legierungen oder Nickel-Titan (NiTi, Nitinol)-Legierungen hergestellt werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen selbstexpandierenden (z. B. Maschenstent: Magic Wallstent [84]) und ballonexpandierbaren Stents (z. B. Spiralstent: GRII-Stent [84], Röhrenstent: Palmaz-Schatz-Stent [84], Ringstent: Micro Stent II [84], Multidesign-Stent: Navius ZRI [84]).

Andere Entwicklungen in der Stenttechnologie zielen darauf ab, dass sich der Stent nach seiner eigentlichen Funktionszeit von etwa 6 Monaten auflöst. Für solche abbaubaren Stents stehen heute zwei Werkstoffgruppen zur Verfügung: die biodegradierbaren Polymere, wie PLA und Copolymere [18-20], und die korrodierbaren Metalle, wie Magnesium [85, 86] und Eisen [87, 88]. Vorteile der ersten Gruppe sind die vorliegenden Erfahrungen in anderen klinischen Anwendungen und die nachgewiesene Biokompatibilität dieser Polymerwerkstoffe. Für die zweite Gruppe sprechen die besseren mechanischen Eigenschaften und die Tatsache, dass gängige Stentdesigns übernommen werden können.

Da Stents hoch beanspruchte Implantate sind, deren Grundprinzip auf der Plastizierung der Stentstrukturen während des Aufweitungprozesses beruht, müssen an Polymerbeschichtungen zusätzliche Anforderungen gestellt werden. Neben einer hohen Biokompatibilität, leichten Verarbeitbarkeit, ausreichenden Lagerfähigkeit und Sterilisierbarkeit sollten polymere Stentbeschichtungen eine ausreichende Haftfestigkeit aufweisen. Die Haftfestigkeit der Polymere kann durch haftvermittelnde Schichten erhöht werden.

Im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen werden deshalb Koronarstents aus einer CoCr-Legierung verwendet, die zur Erhöhung der Haftfestigkeit der Polymer-Wirkstoff-Beschichtungen mit einer (α -SiC:H)-Beschichtung versehen sind. Neben der Erhöhung der Haftfestigkeit der Polymerbeschichtungen ist bei der Verwendung biodegradierbarer Polymere die hervorragende Biokompatibilität der (α -SiC:H)-Beschichtung von Vorteil, da diese nach vollständiger Fragmentation der Polymerschicht mit dem umliegenden Gewebe interagiert.

3. Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Anwendungen

3.1 Ausgewählte Drug-Eluting Stent-Indikationen

Drug-Eluting Stents (DES), die die örtlich begrenzte und zeitlich gesteuerte Abgabe von Wirkstoffen ermöglichen, sind aufgrund ihres modularen Konzeptes sehr vielseitig anwendbar und besitzen ein großes Potenzial für zahlreiche medizinische Anwendungen. Das Prinzip der DES besteht darin, dass die Stents nicht mehr nur als Stütze zur Kontinuitätserhaltung von Lumina, sondern auch als Träger zur lokalen Applikation biologisch aktiver Substanzen dienen.

Das Wirkprinzip eines DES unter lokaler Freisetzung von Wirkstoffen in das umliegende Gewebe zur Adressierung einer gewünschten biologischen Reaktion ist in der Abbildung 7 schematisch dargestellt.

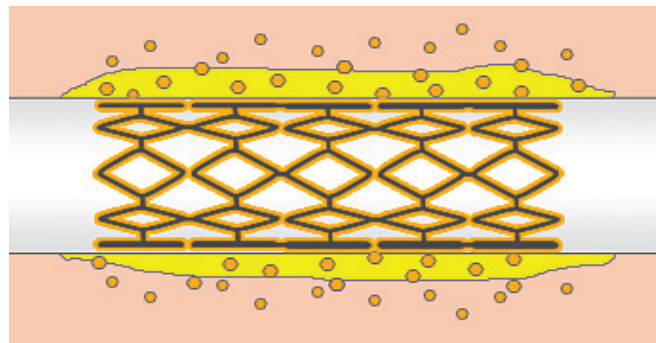


Abb. 7: Schematische Darstellung des Wirkprinzips eines Drug-Eluting Stents (DES): Lokale Wirkstofffreisetzung von der beschichteten Stentoberfläche (orange) ausgehend in das umliegende Gewebe (gelb) zur Adressierung einer gewünschten biologischen Reaktion

Dabei ist das Ergebnis nach DES-Implantation maßgeblich von der Auswahl für die DES-Indikation geeigneter Wirkstoffe, von der Auswahl biokompatibler Polymere und von der Wirkstofffreisetzung, d. h. von der erreichten lokalen Wirkstoffdosis über die Zeit und somit von der Art, wie der Wirkstoff bzw. die -kombination auf der Stentoberfläche fixiert wurde, abhängig (Kap. 3.2.4).

In den folgenden Kapiteln werden ausgewählte Beispiele für DES-Indikationen in verschiedenen Teilgebieten der Medizin vorgestellt, die Gegenstand dieser Arbeit sind.

3.1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

Eine wichtige Indikation für die Anwendung von DES ist die Verengung von Koronararterien im Rahmen der koronaren Herzkrankheit (KHK), die durch die Arteriosklerose verursacht wird.

Die Arteriosklerose ist eine Volkskrankheit. Sie wird durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgendermaßen definiert: „Die Arteriosklerose ist eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“ [89].

Der Schlaganfall und der Herzinfarkt sind oft tödliche Folgen der durch die Arteriosklerose resultierenden Arterienverengungen und -verschlüsse mit entsprechender arterieller Minderversorgung des distalen Gewebes. Über Jahrzehnte standen zur Behandlung der Arteriosklerose operative Therapieansätze im Vordergrund, bei denen der betroffene Gefäßabschnitt durch einen operativen Zugang via Hautschnitt erreicht und ausgeschält (Atherektomie) bzw. der unzureichend durchblutete Gewebebereich mittels einer Gefäßumleitung (Bypass) versorgt wurde. Die Wiederherstellung eines ausreichend weiten Gefäßlumens ist aber auch über einen endovaskulären Zugang möglich, indem das stenosierte Gefäß über Punktion der A. femoralis oder A. brachialis unter Röntgenkontrolle von innen mittels eines Ballonkatheters aufgeweitet wird. Diese Technik der Aufweitung verengter, stenosierter Arterienabschnitte wird als Perkutane Transluminale Angioplastie (*Percutaneous Transluminal Angioplasty, PTA*) bzw. Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (*Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, PTCA*) bezeichnet. Um der elastischen Rückstellkraft des Blutgefäßes nach Deflation des Ballonkatheters entgegenzuwirken und das Ergebnis der Ballonaufweitung dauerhaft aufrechterhalten zu können [90-92], werden darüber hinaus Stents implantiert (Abb. 8).

Eine Indikation für die Stentimplantation stellen hämodynamisch wirksame Koronarstenosen dar. Nach morphologischem Status werden als ideal kurzstreckige, konzentrische, nicht verkalkte und proximal in einer geraden Strecke lokalisierte Stenosen (Typ A) angesehen. Durch die zunehmende Verbesserung der Ballonkatheter- und Stentsysteme hat sich das Indikationsspektrum erweitert, indem auch in morphologisch komplexe Stenosen, wie stark kalzifizierte, langstreckige und exzentrische Stenosen (Typ B) sowie Stenosen bzw. Verschlüsse in stark gewundenen Gefäßen (Typ C), Stents implantiert werden können.

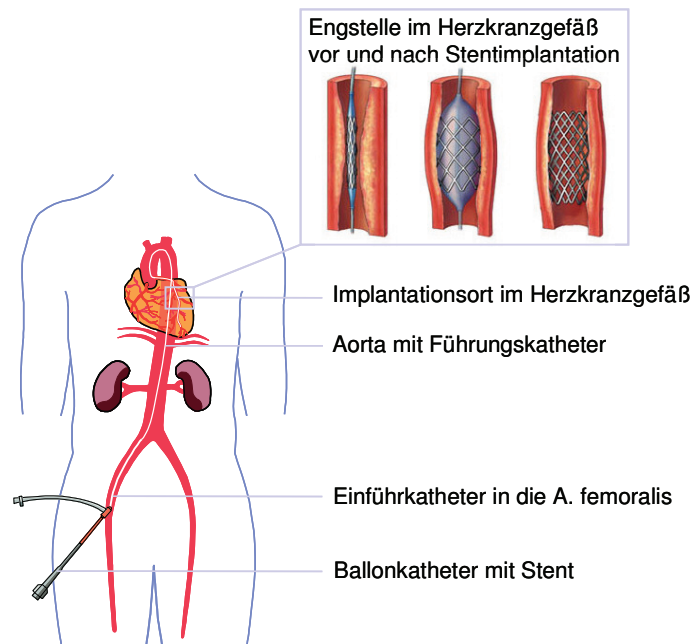


Abb. 8: Aufweitung verengter, stenosierter Arterienabschnitte durch die Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (PTCA) in Kombination mit der Stentimplantation

Trotz der genannten Vorteile, die die Stentimplantation bietet, ist auch diese mit Nachteilen behaftet. Die Stentdilataion kann zum Einriss der Intima mit nachfolgender Einblutung zwischen Intima und Media (Dissektion) sowie zur mechanischen Läsion und zum Abtrag des Endothels (Denudation) führen [93], da schon geringe Drücke (≥ 3 bar) eine völlige Zerstörung des Endothels verursachen [94]. So ist die Stentimplantation ein traumatischer Eingriff, der in einem multifaktoriellen Prozess zu einer Wiederverengung bzw. einem Wiederverschluss des Gefäßlumens, der so genannten *In-Stent-Restenose*, führen kann, die ihrerseits durch reaktive komplexe zelluläre Mechanismen eingeleitet und unterhalten wird [95-97].

Die Entwicklung der In-Stent-Restenose wird in drei wesentliche Phasen unterteilt [98]: 1. die Inflammation, 2. die Granulation und 3. das Remodeling (Tab. 4).

Tab. 4: Phasen der Restenoseentwicklung [98]

Phase	Zeitraum	Vorgänge
Inflammation	< 5 Tage	Verletzung, Denudation
Granulation	5-10 Tage	Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen Produktion extrazellulärer Matrix Beginn der Reendothelialisierung
Remodeling	10-120 Tage	Abschluss der Reendothelialisierung Reduktion der Restenose

Wenige Minuten nach der durch den Stent hervorgerufenen Endotheldenudation kommt es in der ersten Phase zur Anlagerung von Thrombozyten an der gegenüber dem Blutstrom exponierten geschädigten Gefäßwand sowie zur Einwanderung segmentkerniger Granulozyten und anderer Entzündungszellen unter Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF) und β -*Transforming Growth Factor* (TGF- β) [99-101]. Außerdem werden Thrombine freigesetzt, die proliferationsfördernd auf glatte Muskelzellen wirken [102], die Expression von PDGF [103] und Adhäsionsmolekülen fördern [104] sowie eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten haben [105].

In der zweiten Phase wandern etwa 30 % der in der Media gelegenen und in ihrer Proliferation verstärkt angeregten glatten Muskelzellen aus dem Bereich der Media in die Intima ein [106], wo sie ihren Phänotyp vom kontraktilen zum sekretorischen Typ wechseln und zahlreiche Matrixproteine in das Lumen sezernieren [107-109]. Dabei hängt der Grad der Einwanderung und Proliferation der glatten Muskelzellen maßgeblich vom Grad der initialen Entzündungsreaktion ab [110]. Außerdem ist in der zweiten Phase eine beginnende Endothelialisierung des Stents (Reendothelialisierung) zu verzeichnen. Ist die Reendothelialisierung verzögert, kommt es zu einer Ansammlung phänotypisch modifizierter glatter Muskelzellen im Gefäßlumen. Dieser Vorgang scheint dann mit einer gesteigerten Intimahyperplasie einherzugehen [106].

In der dritten Phase findet die Endothelialisierung (Neoendothelialisierung) ihren Abschluss. Die Neointima erreicht ihre maximale Dicke maximal 4 Monate nach Intervention [111].

Im Prozess der In-Stent-Restenose spielt auch die Thrombogenese eine wichtige Rolle [112, 113], da der Stent als Fremdkörper ein gerinnungsförderndes Potenzial aufweist und die Gefäßwandverletzung durch das tiefe Eindringen der Stentstreben stärker ausgeprägt ist als bei der PTCA [90, 91]. Zur Verringerung des Thromboserisikos nach Stentimplantation hat sich in der klinischen Praxis die systemische Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern, wie Acetylsalicylsäure (z. B. Aspirin[®]) in Kombination mit Clopidogrel (z. B. Plavix[®]), und Heparin durchgesetzt [114, 115].

Darüber hinaus wurde die lokale Wirkung von antithrombogenen Beschichtungen auf der Basis von Heparin [116, 117] und Hirudin [118] erprobt. Die Heparin-Beschichtung für Stents wurde klinisch mit der Benestent II-Studie eingeführt [119, 120]. Diese passiven Beschichtungen waren nicht ausreichend, um die durch den Stent ausgelöste In-Stent-Restenose als komplexe Wundheilungsreaktion vollständig zu unterbinden. Deshalb wurde nach aktiven Mechanismen gesucht, die eine dauerhafte Reduktion der Restenoserate zur Folge haben.

Die Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Stenttechnologie waren notwendig, weil es bei 10 - 30 % der etwa 220.000 in Deutschland jährlich durchgeführten klassischen Koronarstent-Implantationen zur In-Stent-Restenose kommt [121, 122]. Zu deren Verhinderung wurden deshalb Stents mit Polymeren beschichtet, in die Wirkstoffe eingebettet sind [123-126] - die Geburtsstunde der DES.

Der Vorteil liegt auf der Hand: DES geben aus ihrer Beschichtung über mehrere Wochen hinweg definierte Mengen eines Wirkstoffs am Ort der Gefäßverletzung in das betroffene Gewebe ab. Dort verhindert der Wirkstoff das Wachstum der glatten Muskelzellen und unterstützt im Idealfall die Besiedelung des Stents mit Endothelzellen, so dass es bei Verhinderung der Intimahyperplasie zur Ausbildung einer dünnen Neointima kommt.

Exemplarische histologische Befunde nach Implantation eines klassischen, unbeschichteten, koronaren Metallstents unter Ausbildung einer In-Stent-Restenose und eines koronaren DES unter Vermeidung der Wiederverengung des Gefäßes bei gleichzeitiger Stentendothelialisierung verdeutlichen die Bedeutung der DES-Applikation anschaulich (Abb. 9). In einer Reihe von Patientenstudien konnte statistisch belegt werden, dass die Anwendung von DES bei koronaren Herzerkrankungen die In-Stent-Restenose auf unter 10 % der Fälle verringert [127, 128].

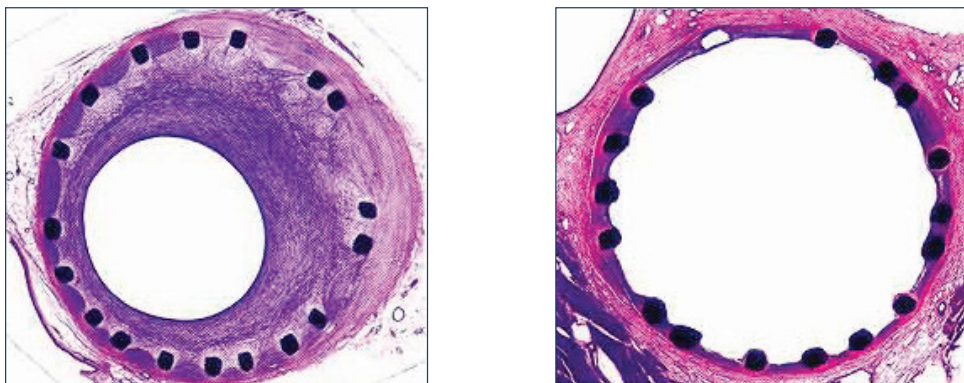


Abb. 9: Histologische Schnitte von Blutgefäßabschnitten nach Implantation eines klassischen unbeschichteten, koronaren Metallstents (links) und eines koronaren DES (rechts)

Die Kardiologie nimmt eine Vorreiterstellung auf dem Gebiet der Entwicklung und klinischen Erprobung von DES ein, da in allen Teilbereichen der Medizin, in denen Stents etabliert sind, DES einen erheblichen Fortschritt bei der lokalen Medikation darstellen können.

Ausgewählte Beispiele von im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten koronaren DES auf der Basis der Wirkstoffe Tetraethylthiuramdisulfid (Disulfiram) und Genistein sowie die Ergebnisse der in vitro und in vivo Charakterisierung werden im Kapitel 5 beschrieben.

3.1.2 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)

Die endovaskuläre Therapie nimmt inzwischen auch bei der Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) einen immer größeren Stellenwert ein [129, 130], da viele Gefäßerkrankungen primär endovaskulär versorgt und erst nach Versagen dieser Therapievariante einer Operation zugeführt werden. Obwohl die operative Therapie in vielen Fällen derzeit noch die besseren Langzeitresultate liefert, werden sich endovaskuläre Techniken aufgrund der geringeren Invasivität weiter durchsetzen.

Neben den primär endovaskulären Eingriffen werden zunehmend Patienten einer so genannten Hybridoperation unterzogen, bei der der operative Eingriff mit der endovaskulären Therapie kombiniert wird [131]. Als ein klassisches Beispiel sei hier die operative Ausschälung einer verschlossenen *A. femoralis communis* genannt, der sich die interventionelle Stentversorgung der stenosierten *A. iliaca communis* anschließt. Ein neues Therapiekonzept im Sinne des Hybrideingriffs stellt darüber hinaus das „Überstenten“ einer Prothesenbypass-Anastomose dar [132-136]. Diese Therapievariante ist notwendig, da auch im Anastomosengebiet Dissektionen entstehen können, die zur Restenose und somit zum Bypassverschluss führen. Weiterhin können ein Missverhältnis in der *Compliance* der Blutgefäße (Beitrag der elastischen, statischen Widerstände der Blutgefäße zum resultierenden Blutdruck) sowie Inkongruenzen vorliegen, die ebenfalls ein negatives Therapieergebnis im Sinne eines Bypassverschlusses bewirken [137-140]. Diese Komplikation kann durch die Harmonisierung der Stufe zwischen der Prothese und dem natürlichen Blutgefäß verhindert werden (Abb. 10).

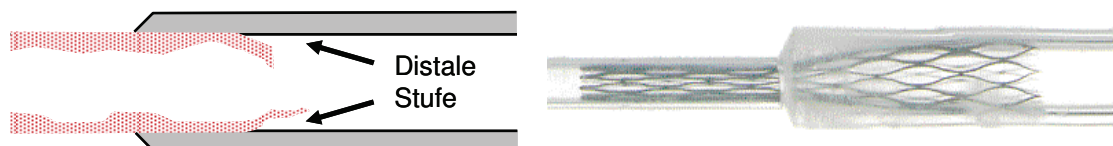


Abb. 10: Harmonisierung der Stufe zwischen dem Blutgefäß und der Prothese bei einer Prothesen-Gefäßanastomose (links) durch die Implantation eines Stents (rechts)

Da einerseits durch die Glättung der Stufe mit Hilfe eines implantierten Stents der initiale hämodynamische Nutzen mit einem erhöhten Risiko zur Ausbildung einer In-Stent-Restenose erkauft wird und andererseits die Stentfunktion nur bis zum Abschluss der Gefäßheilung etwa 6-12 Monate nach dem operativen Eingriff notwendig ist [141, 142], ist die Verwendung eines biodegradierbaren DES anzustreben. Außerdem eröffnet diese Therapievariante weitere Optionen für eine Nachbehandlung, da der Stent nicht als permanenter Fremdkörper im Implantationsbereich verbleibt.

Im Kapitel 6 werden eigene Untersuchungsergebnisse auf dem Gebiet der biodegradierbaren, peripheren DES, basierend auf dem Polymer PLLA und dem Wirkstoff Sirolimus, vorgestellt.

3.1.3 Maligne Prostataneoplasie (MPN)

Seit *Fabian et al.* (1980) [143] erstmals eine rostfreie Stahlspirale als Stent in der Therapie der subvesikalen Obstruktion der Harnröhre (Urethra) einsetzten, war der urologische Stent einem stetigen Wandel unterworfen. Als Alternative zum Langzeitkatheterismus sowie zu herkömmlichen operativen Therapien sollte so auch dem multimorbiden, inoperablen Patienten eine effektive, minimalinvasive Behandlungsform angeboten werden. Im Laufe der Zeit wurden durch die Verwendung unterschiedlicher Stentmaterialien und -designs diverse Harnröhrenstents für den temporären wie permanenten Einsatz konzipiert. Beispielhaft seien hier der Urocoil-Nickel-Titan-Stent [144], der Polyurethan-Stent nach Nissenkorn [145] und der ASI (Advanced Surgical Interventions)-Titanstent [146] erwähnt. Mittlerweile stehen auch für die Behandlung der prävesikalen Harntransportstörung in den Harnleitern (Ureter) selbst-expandierbare endoluminale Stents, wie der Wallstent[®] aus einer Kobalt-Chrom-Nickel-Molybdän-Eisen-Legierung [147] und der Memotherm[®]-Stent aus einer Nickel-Titan-Legierung [148], zur Verfügung. Dennoch stellt der urologische Stent immer noch eine therapeutische Seltenheit dar. Ursächlich hierfür sind die in Abhängigkeit vom eingesetzten Stenttyp auftretenden Komplikationen, wie Inkrustation, Fragmentation, Infektion, Korrosion und Stentdislokation. Infolge der Stent-Epithel-Interaktion kommt es darüber hinaus zur Induktion einer urothelialen Hyperplasie, die ihrerseits ein sekundäres Stentversagen durch Re-Okklusion [149] bedingen kann. Die Entfernung eines solchen Stents ist dann oft sehr schwierig bzw. unmöglich. Entscheidend für das Ausmaß der Komplikationen ist in diesem Zusammenhang, ob und in welcher Zeit der Stent epithelialisiert und wie er in die Ureter- oder Urethrawand integriert wird. Dem allgemeinen Trend in der Medizin folgend, versucht man deshalb, durch Verwendung biokompatibler, biodegradierbarer und bioresorbierbarer Polymere die Komplikationsrate zu minimieren und so die Stentzuverlässigkeit zu erhöhen. Wesentlich ist dabei, dass der Polymerstent für einen definierten Zeitraum, der beispielsweise für die Ausreifung von strikturiertem, fibrösem Gewebe notwendig ist, funktionell stabil bleibt, bevor er über den Stoffwechsel oder den Urin abgebaut wird.

Erstmals wurde im Jahre 1993 über die Entwicklung eines bioresorbierbaren Urethrastents zur Behandlung der Benigenen Prostatahyperplasie (BPH) in der Literatur berichtet [150]. Dieser spiralförmige Poly(L-lactid)-Stent (PLLA) war mit einer Schicht aus Poly(D,L-lactid) (PDLLA) überzogen. In zahlreichen nachfolgenden Arbeiten kamen fast ausschließlich

selbstexpandierbare Polymerstents zum Einsatz, die im Design dem Fabian-Metallstent [143] nachempfunden wurden. Zur klinischen Anwendung kamen Stents aus Poly(glycolid) (PGA) als adjuvante Maßnahme in der Therapie der BPH mittels thermischer Verfahren, wie VLAP (*Visual Laser Ablation of the Prostate*) [151, 152], TUMT (*Transurethral Microwave Thermotherapy*) [153] und ILC (*Interstitial Laser Coagulation*) [154]. Allerdings ergaben sich Komplikationen, die auf eine zu schnelle Degradation zurückgeführt wurden [155]. In nachfolgenden klinischen Untersuchungen wurde daher PLLA als langsam resorbierbares Polymer ausgewählt und zur Behandlung von rezidivierenden Strikturen [156] sowie der BPH [157] eingesetzt. In diesem Zusammenhang bestätigten auch tierexperimentelle Untersuchungen an Merino-Mix-Schafen von *Hözl et al.* [158] sowie an Kaninchen von *Isotalo et al.* [159] die hohe Biokompatibilität von PLLA-basierten urologischen Stents, die sowohl in einer Reduktion der urothelialen Hyperplasie als auch in der Förderung der Geweberegeneration ihren Ausdruck fand. Analoge Experimente wurden mit Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)-[160] und „self-reinforced“ (SR)-Poly(L/D-lactid) (96/4, PLA96)-Stents [161] durchgeführt. In vorklinischen Arbeiten wurden außerdem die Beladung (PGA, Poly(L/D-lactid) (96/4, PLA96) [162]) bzw. Beschichtung (PLLA [163, 164]) mit Antibiotika sowie der Einbau von Röntgenkontrastmitteln (SR-PLLA [176], PLA96 [165]) untersucht.

Wesentliche Vorteile degradierbarer Urethrastents sind die Vermeidung der durch die Epithelialisierung bedingten problematischen Extraktion sowie die Möglichkeit, die organbezogene Funktionalität wiederzuerlangen. Durch ein hohes Maß an Biokompatibilität ließe sich das Risiko einer Restenosierung infolge überschießender Hyperplasie deutlich senken. Degradierbare Urethrastents wären somit, auch wiederholt, bei den verschiedensten Formen der subvesikalen Obstruktion einsetzbar. Außerdem ergibt sich im Bereich der harnableitenden Wege eine wissenschaftliche Fragestellung mit hoher klinischer Relevanz bei der Behandlung von Karzinomen. Der gezielte Einsatz von zytostatikabeladenen, biodegradierbaren DES könnte hier eine attraktive Therapievariante darstellen. Im Falle tumorbedingter Stenosen bei beispielsweise maligner Prostataneoplasie (MPN) wäre neben dem mechanischen Effekt des zytostatikabeladenen Stents als Platzhalter auch eine lokale Chemotherapie mit adjuvanten als auch palliativem Ansatz denkbar.

Die Ergebnisse der eigenen DES-Entwicklung auf diesem Gebiet werden am Beispiel von mit dem Zytostatikum Methotrexat beladenen PLLA-Urethrastents im Kapitel 7 dargestellt.

3.2 Drug-Eluting Stents als funktionalisierte Implantate

Damit DES für die gewünschte Indikation das geeignete Wirkstoffreservoir bieten, ist ein hybrides Stentkonzept notwendig, das maßgeblich von den Eigenschaften des Stentgrundkörpers, der Auswahl der polymeren Trägermatrices zur Fixierung der Wirkstoffe auf der Stentoberfläche, der Auswahl der Wirkstoffe sowie vom gewählten DES-Konzept unter materialwissenschaftlichen Gesichtspunkten abhängig ist. Diese Einflussfaktoren bedingen das spätere Verhalten des Gesamtsystems DES, nämlich dessen mechanisches Eigenschaftsbild, dessen Biokompatibilität sowie das resultierende Wirkstofffreisetzungs- und Degradationsverhalten. Ein für die DES-Applikation zu verwendender Stentgrundkörper muss zur Realisierung einer hohen Wirkstoffbeladung und zur Abdeckung großer Läsionsbereiche eine große Stentoberfläche und geringe Abstände zwischen den Stentstegen (*Struts*) aufweisen. Darüber hinaus sollte die Strutdeformation möglichst gering sein und die Oberfläche des Stentgrundkörpers sollte eine ausreichende Haftung des Beschichtungsmaterials ermöglichen, um Ablösungen bzw. Abplatzungen der Stentbeschichtung während der Stentaufweitung (Dilatation) zu vermeiden. Nach Auswertung experimenteller und histologischer Befunde von 20 in Deutschland zugelassenen Metallstentsystemen [98] werden Stents als ideal angesehen, die eine durch das Material, die Form und die Beschaffenheit der Stentoberflächen determinierte geringe Thrombogenität aufweisen sowie mit einer elektrisch neutralen (klassische Metallstents) oder biologisch aktiven Beschichtung (DES) ausgestattet sind. Bei der Auswahl der Polymere für die Stentbeschichtung sollten deren mechanische Eigenschaften, aber auch Aspekte, wie die Biokompatibilität und die Beständigkeit gegenüber herkömmlichen industriellen Sterilisationsverfahren, im Vordergrund stehen. Bei biodegradierbaren Polymeren sind zusätzlich der Polymerabbau und die rückstandsfreie Metabolisierung von Bedeutung, die nicht mit unerwünschten entzündlichen Prozessen oder anderen Fremdkörperreaktionen einhergehen dürfen. Die Auswahl der Wirkstoffe wird durch die am Applikationsort zu erzielende biologische Wirkung bestimmt. Außerdem sollten im Kontext mit der polymeren Beschichtungsmatrix deren physiko-chemische Eigenschaften, die Polymer-Wirkstoff-Interaktion und die Sterilisierbarkeit Berücksichtigung finden. Die zu verwendende Beschichtungstechnologie sollte eine reproduzierbare Schichtzusammensetzung, -dicke und -morphologie sowie eine hohe Schichtqualität garantieren, da diese Parameter nach erfolgter Polymer- und Wirkstoffauswahl maßgeblich das Wirkstofffreisetzungsverhalten der DES bestimmen. Aus diesen Anforderungen leiten sich verschiedene zum Teil komplexe Untersuchungsschritte für die DES-Entwicklung ab, die in den folgenden Kapiteln der Arbeit vorgestellt und mit entsprechenden in vitro und in vivo Ergebnissen untermauert werden (Abb. 11).



Abb. 11: Schematische Darstellung relevanter Untersuchungsschritte der DES-Entwicklung bis hin zur Durchführung präklinischer Studien

3.2.1 Biostabile und biodegradierbare Polymermatrizes für Drug-Eluting Stents

Für Koronarstents wurden verschiedenste Polymere auf ihre Eignung als Polymermatrix geprüft (Abb. 12). Als nicht abbaubare Polymere wurden beispielsweise Polyurethane (PUR) [141, 166], Silikone [45, 167], Polymethacrylate (PMA) [168], Poly(ethylen-co-vinylacetat) (PEVA) [169], Poly(styren-*b*-isobutylen-*b*-styren) (SIBS) [170], Polyorganophosphazene [171, 172] und Polyethylenterephthalat (PET) [173] untersucht. Als biodegradierbare Polymermatrizes synthetischen oder natürlichen Ursprungs wurden unter anderem Polylactid (PLA) und Copolymere [83, 174, 175], Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) [45], Polyorthoester (POE) [45], Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) [45], Fibrin [141], Hyaluronsäure (HA) [116], Chitosan [176] und auf Poly(L-lysin)-basierende Polymere [177] verwendet. Zur Verhinderung von Thrombosen nach Stentimplantation wurden außerdem Stents mit Heparin [116, 117, 178], Hirudin [118, 179] und Phosphorylcholin-Polymeren [180] beschichtet.

Als äußerst biokompatible und somit zu bevorzugende Polymere für DES-Beschichtungen werden in der aktuellen Diskussion angesehen: PUR und PET als biostabile sowie PLA und Copolymere, vor allem PLGA, als biodegradierbare Polymermatrizes [181].

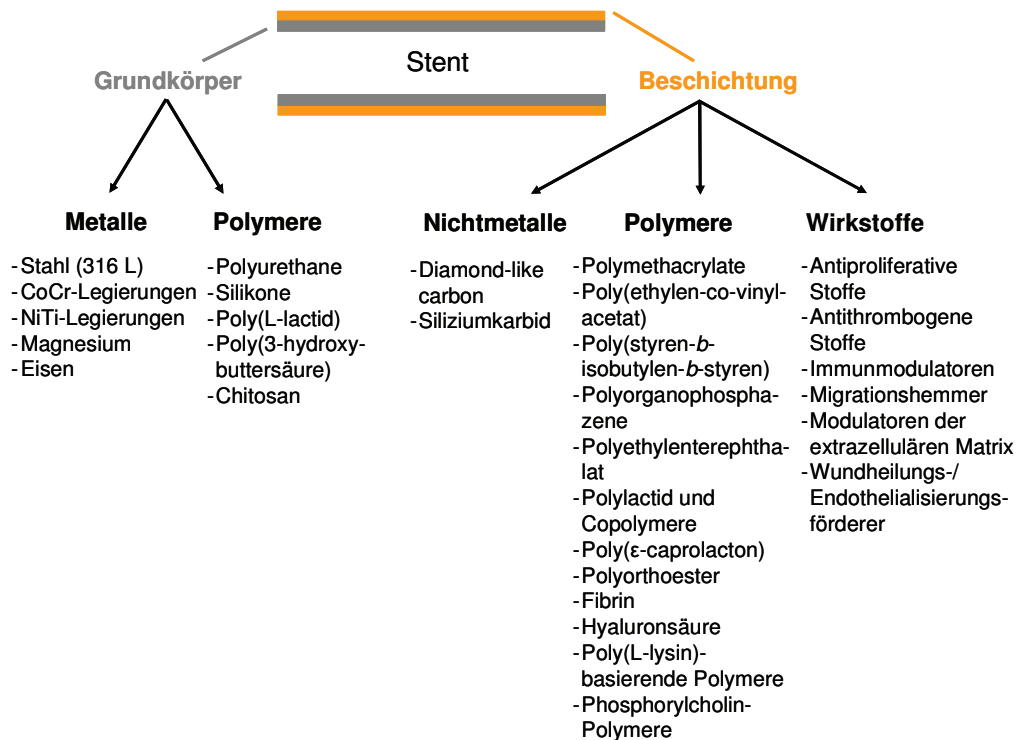


Abb. 12: Schematischer Aufbau eines Stents bestehend aus dem Stentgrundkörper und der Beschichtung und exemplarische Übersicht bereits verwendeter Stentmaterialien und Beschichtungsmatrizes nach dem derzeitigen Stand der Technik, modifiziert nach [181]

3.2.2 Spezifische Wirkstoffe für Drug-Eluting Stents

Es wurden in zahlreichen Studien unterschiedliche antiproliferative und antiinflammatorische Substanzen für koronare DES erprobt, die in Polymerträger unterschiedlicher chemischer und physikalischer Zusammensetzung eingebracht oder direkt auf die Stents aufgebracht wurden [19, 127, 171, 174, 178, 182-193] (Tab. 5). Mit dem Ziel der Verhinderung von Thrombosen kamen Thrombozytenaggregationshemmer zur Anwendung, die in die Polymermatrix inkorporiert wurden [118, 179, 194]. Darüber hinaus wurden zur Inhibition der In-Stent-Restenose Substanzen untersucht, die die Migration von glatten Muskelzellen in das Blutgefäßlumen hemmen und/oder die die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix (*Extracellular Matrix*, ECM) beeinflussen [195-201]. Zur Beschleunigung des Heilungsprozesses und der Stentendothelialisierung wurden Wirkstoffe getestet, die eine differenzielle Wirkung auf die Gefäßwandzellen ausüben, indem sie die glatten Muskelzellen in ihrer Proliferation und Migration hemmen, gleichzeitig aber eine Proliferationssteigerung der Endothelzellen bewirken [202-204]. Außerdem wurde zur Förderung der Endothelialisierung der humane, rekombinante vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) lokal in die Stentimplantationszone appliziert [205].

Tab. 5: Übersicht über ausgewählte Wirkstoffe für DES

Antiproliferative und/oder antiinflammatorische Stoffe	Antithrombogene Stoffe	Migrationshemmer/ ECM-Modulatoren	Wundheilungs-/ Endothelialisierungsförderer
Sirolimus [182] Tacrolimus [183] Everolimus [184] Biolimus A9 [185] Cyclosporin A [83] Mycophenolsäure [187] Corticosteroide [171, 174] Paclitaxel [188] Methotrexat [178] Actinomycin D [189] Tranilast [19] Mitomycin [127] QP-2 [190] Vincristin [127] Angiopeptin [191] C-myc Antisense-Technologie [192] ABT 578 [193] Pimecrolimus [206]	Hirudin [179] Iloprost [118, 179] Abciximab [194]	Probucol [195] Tretinoin [195] Halofuginon [198] Prolylhydroxylase-Inhibitoren [199] MMP-Inhibitoren [200] Batimastat [201]	17 β -Estradiol [202, 207] Statine [203] Tyrosinkinase-Inhibitoren [204] VEGF [205] EPC-Antikörper [208, 209] NO-Donatoren [210] Genistein [206]

Neben dem Konzept der klassischen DES werden weiterhin Ansätze zur Stimulierung der Endothelzellbesiedelung unter Bildung von Endothelzellmonolayern auf der Stentoberfläche verfolgt. In aktuellen Studien wird jedoch aufgrund der Instabilität der auf der Stentoberfläche generierten Zellschichten nicht mehr die Vorbesiedelung der Stentoberflächen mit Endothelzellen favorisiert [211], sondern die Beschichtung von Stents mit monoklonalen, spezifisch auf endotheliale Progenitorzellen (*Endothelial Progenitor Cells, EPC*) wirkenden Antikörpern, wie Anti-CD34, die die im Blut natürlich vorkommenden EPCs auf der Stentoberfläche binden sollen [208, 209]. Da die Endothelzerstörung infolge Stentimplantation zu einer Reduzierung der Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führt, wurden NO-Donatoren getestet [210]. Es kamen in diesem Zusammenhang auch gentherapeutische Verfahren zur Anwendung, bei denen durch das adenovirale Einbringen von mit eNOS transfizierten glatten Muskelzellen die e-NOS-Aktivität erfolgreich wiederhergestellt werden konnte, was zu einer reduzierten Neointimaprolieration führte [212, 213]. Außerdem wurden zur Förderung der Stentendothelialisierung und zur Verhinderung von späten Stentthrombosen Kombinationsansätze verfolgt, bei denen beispielsweise das auf die glatten Muskelzellen antiproliferativ wirkende Sirolimus mit dem die Endothelzellproliferation fördernden humanen Östrogen 17 β -Estradiol in einer Stentbeschichtung vereint wurde [207]. Ein weiteres Beispiel für ein kombiniertes DES-Konzept stellt der SymBioTM-Stent der Fa. Conor dar, auf dessen Oberfläche das vorwiegend antiphlogistisch wirkende Pimecrolimus und das antiproliferativ wirkende Paclitaxel in Wirkstoffdepots installiert wurde [206].

3.2.3 Wirkungsnachweis von Drug-Eluting Stents in klinischen Studien

Essentielle Voraussetzung für die klinische Akzeptanz von DES ist deren erfolgreiche Erprobung in prospektiven, randomisierten, kontrollierten klinischen Studien. Auf der Grundlage der heutigen verfügbaren Datenlage [127, 128, 214] ist feststellbar, dass von den vielen für die DES-Anwendung untersuchten Wirkstoffen bisher nur Paclitaxel, Sirolimus und Everolimus in randomisierten klinischen Studien einen Wirkungsnachweis erbracht haben. Die wesentlichen Studien und die Charakteristika der in diesen Studien verwendeten DES sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Tab. 6: Überblick über randomisierte klinische Studien Paclitaxel-freisetzender DES und Charakteristika der in diesen Studien verwendeten DES in Abhängigkeit von der Stenttechnologie und Dosisdichte [127]

Studie	ASPECT	ELUTES	DELIVER	TAXUS
Firma	Cook	Cook	Guidant/Cook	Boston Scientific
Substanz	Paclitaxel	Paclitaxel	Paclitaxel	Paclitaxel
Stentplattform	Supra G™	VflexPlus™	Multi-Link Penta™	NIR™ Express™
Polymerträger	nein	nein	nein	SIBS (Translute™)
Dosisdichte [µg/mm ²]	1.3/3.1	0.2/0.7, 1.4/2.7	3.0	1.0

Tab. 7: Überblick über randomisierte klinische Studien Sirolimus- bzw. Everolimus-freisetzender DES und Charakteristika der in diesen Studien verwendeten DES in Abhängigkeit von der Stenttechnologie und Dosisdichte [127]

Studie	RAVEL	SIRIUS	FUTURE
Firma	Cordis/J & J	Cordis/J & J	Guidant/Biosensors
Substanz	Sirolimus	Sirolimus	Everolimus
Stentplattform	Bx-Velocity	Bx-Velocity	S-Stent
Polymerträger	Parylen C (Primer-Schicht), PEVA/PBMA (als wirkstoffhaltige Grundsicht und wirkstofffreie Decksicht)	Parylen C (Primer-Schicht), PEVA/PBMA (als wirkstoffhaltige Grundsicht und wirkstofffreie Decksicht)	PLA
Dosisdichte [µg/mm ²]	1.4	1.4	197

Die Tatsache, dass nur für wenige Substanzen in randomisierten klinischen Studien deren Effektivität nachgewiesen werden konnte, bestätigt, dass die klinische Wirkung vieler Wirksubstanzen unzureichend war, obwohl sie zunächst vielversprechende experimentelle in vitro und in vivo Resultate gezeigt hatten.

Um diese fundierte und kritische Bewertung der Wirksubstanzen und der DES vornehmen zu können, war es notwendig zu definieren, wann ein DES als wirksam zu bezeichnen ist. Deshalb wurden Richtlinien für die Durchführung von präklinischen [123] und klinischen Studien [127] zur Erprobung von DES erarbeitet und primäre Endpunkte definiert, auf die in den folgenden Ausführungen näher eingegangen wird [214].

Zur Bestimmung der nicht-klinischen primären Endpunkte werden in der Regel die quantitative Koronarangiografie (*Quantitative Coronary Angiography, QCA*) und der intravaskuläre Ultraschall (*Intravascular Ultrasound, IVUS*) herangezogen. Bei der QCA werden folgende Parameter im untersuchten Stent- bzw. Segmentbereich bestimmt, die in eine Bewertung der DES einfließen [127]:

- Referenzgefäßdurchmesser (RVD, in mm)
- Stenosen- bzw. Läsionslänge (LL, in mm)
- Diameterstenose (DS, in %)
- Minimaler Lumendurchmesser (MLD, in mm)
- „binäre“ Restenoserate (RR, in %)
- Late lumen loss (LLL, in mm)
- Late lumen loss index (LLLI, in %)

IVUS wird in Studien meist dafür verwendet, um das Blutgefäßlumen, den Stent und die Intimahyperplasie zu vermessen.

Da es nicht das primäre Ziel nach Stentimplantation ist, angiografische Parameter zu verbessern, sondern den klinischen Genesungsverlauf des Patienten zu beeinflussen und klinische Ereignisse zu reduzieren, sollte die Wirksamkeit von DES bevorzugt nach klinischen primären Endpunkten beurteilt werden. Der klassische klinische Verlaufparameter ist in diesem Zusammenhang die MACE (*Major Adverse Cardiac Event*)-Rate, die sich aus der Summe an zahlreichen klinischen Einzelparametern, wie Tod oder Myokardinfarkt, ergibt. Weitere klinische Endpunkte stellen die Parameter TLR (*Target Lesion Revascularization*) und TVR (*Target Vessel Revascularization*) dar. Zusätzlich wird der zielgefäßbezogene Parameter TVF (*Target Vessel Failure*) bestimmt, der auch die koronaren Ereignisse von nicht nachangiografierten und nicht revascularisierten Patienten berücksichtigt.

3.2.4 Drug-Eluting Stent-Konzepte unter materialwissenschaftlichen Gesichtspunkten

Entsprechend dem Design des Hybridsystems aus Stentgrundkörper, polymerer Trägermatrix und Wirkstoff lassen sich verschiedene DES-Konzepte entwickeln. Die in der Abbildung 13 schematisch dargestellten DES-Konzepte resultieren aus der Variabilität des Stentgrundkörpers (permanent - abbaubar) und aus der Art des Wirkstoffdepots (polymerfrei - polymerbasiert, Beschichtung - Stentreservoir).

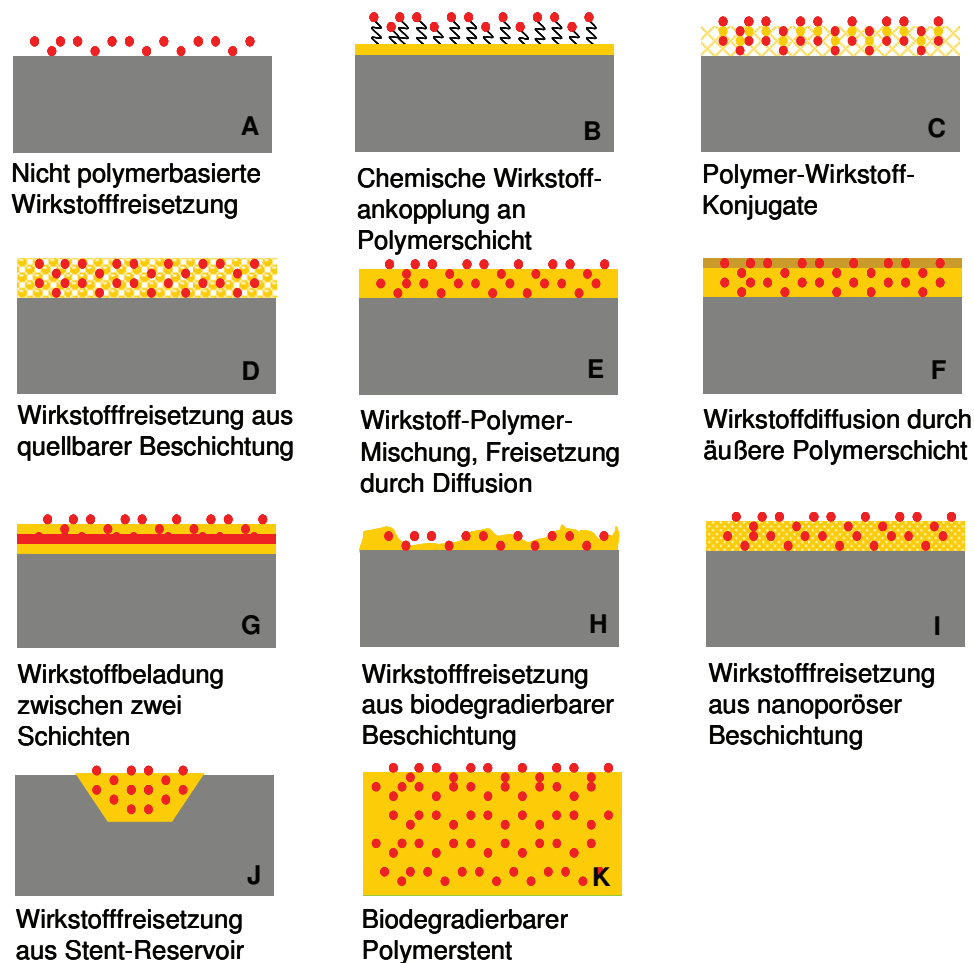


Abb. 13: DES-Konzepte, die aus der Variabilität des Stentgrundkörpers und aus der Art des Wirkstoffdepots resultieren [215, 216]

Die polymerfreie Variante besteht darin, dass die Wirkstoffe durch chemische Bindung direkt auf dem metallischen Stentgrundkörper fixiert werden (*Variante A*). Aber auch die Wirkstoffanbindung an polymere Träger als direkte Oberflächenankopplung des Wirkstoffes an die Polymerbeschichtung (*Variante B*) [216] oder in Form von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten (*Variante C*) ist möglich. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt durch Dissoziation der ionischen

Bindungen zwischen Polymer und Wirkstoff bzw. durch hydrolytische oder enzymatische Spaltung der kovalenten Bindungen.

Die lokale, über mehrere Monate in ausreichenden Dosen zu realisierende Wirkstofffreisetzung wird bei den im klinischen Alltag befindlichen DES [123-125] vorwiegend durch Polymerbeschichtungen garantiert. Der Wirkstoff wird in diesem Falle als Polymer-Wirkstoff-Gemisch auf die Stentoberfläche aufgetragen. Durch die Art des Polymers wird mit hydrophilen Polymeren eine schnelle Freisetzung (*Variante D*) und mit hydrophoben Polymeren eine langsame Freisetzung (*Variante E*) erreicht. Außerdem kann der Stent zusätzlich mit einer wirkstofffreien polymeren Deckschicht (*Topcoat*) versehen werden, um durch die Diffusionsbarriere eine Retardation der Wirkstofffreisetzung zu erzielen (*Variante F*) [126].

Ist der Wirkstoff mit dem Polymer schlecht mischbar, wird die Einbettung der Substanz zwischen den Polymerschichten im *Sandwich*-Aufbau favorisiert (*Variante G*). Die lokale Wirkstoffabgabe ist darüber hinaus durch Fragmentation der Polymerbeschichtung infolge Degradation (*Variante H*) [217] und durch nanoporöse Beschichtungen möglich (*Variante I*) [218]. Neben den klassischen Polymerbeschichtungen werden aber auch Ansätze zur Wirkstoffbeladung in Stentreservoirs, so genannten Kavitäten, verfolgt (*Variante J*) [219]. Mit Hinblick auf neueste Trends in der Stenttechnologie können auch biodegradierbare Stents mit Wirkstoffbeschichtungen ausgestattet werden. Bei Polymerstents besteht zusätzlich die Möglichkeit der Wirkstoffinkorporation in das Bulkmaterial (*Variante K*) [19, 186].

Entsprechend der medizinischen Fragestellung kann ein Wirkstoff mit der gewünschten biologischen Wirkung in die Stentbeschichtung inkorporiert werden (*Variante L*) (Abb. 14). Sollen verschiedene pharmakologische Wirkungen in der Stentumgebung ausgelöst werden, können auch mehrere Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, wie beispielsweise eine auf einen gewünschten Zelltyp antiproliferativ wirkende Substanz und ein Antiphlogistikum, Verwendung finden (*Variante M*). Entsprechend den chemischen Eigenschaften der Stoffe werden diese mit unterschiedlicher Kinetik aus der Beschichtung freigesetzt. Um eine einheitliche Freisetzungskinetik aus dem Polymer zu erzielen, ist auch die Synthese so genannter *Codrug-Systeme* sinnvoll, bei denen verschiedene Wirkstoffe durch eine oder mehrere chemische Bindungen verknüpft werden. Nach Freisetzung aus der Stentbeschichtung zerfällt das Codrug-System infolge Hydrolyse dieser Bindungen in die Einzelkomponenten (*Variante N*). Mit dem Voranschreiten der Nanotechnologie ist die *Variante O* verbunden, bei der an den Stent verankerte Nanopartikel die bioaktiven Substanzen freisetzen [218, 220].

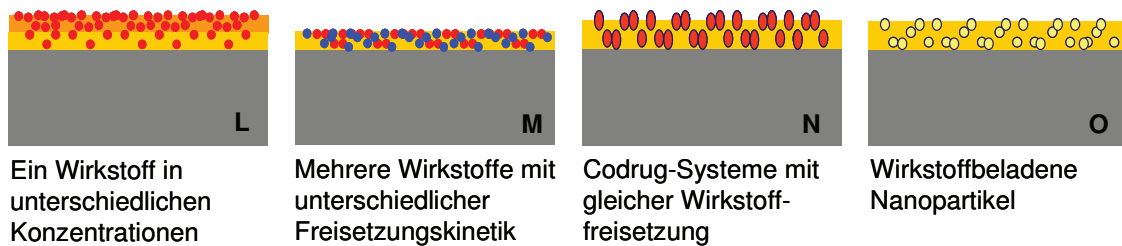


Abb. 14: DES-Konzepte, die aus verschiedenen Modifizierungsvarianten des Wirkstoffs resultieren

Hinsichtlich der Schichtverteilung auf der Stentoberfläche werden weiterhin DES-Konzepte verfolgt, die bevorzugt eine Wirkstofffreisetzung zur abluminalen Seite gewährleisten, indem die Beschichtung nur auf der Stentaußenseite aufgetragen wird (Abb. 15, *Variante P*). Außerdem wird untersucht, ob die Freisetzung verschiedener Wirkstoffe in die luminalen Richtung durch eine Beschichtung der Stentinnenseite und in die abluminale Richtung durch eine Beschichtung der Stentaußenseite eine spezifische Gewebereaktion induzieren kann, die das Wachstum eines Zelltyps stimuliert und somit das zur Verhinderung von Fremdkörperreaktionen erwünschte Einwachsen des Stents garantiert bei gleichzeitiger Inhibition der unerwünschten Vermehrung eines anderen Zelltyps, der sich im Kontakt mit der Stentaußenseite befindet (*Variante Q*).

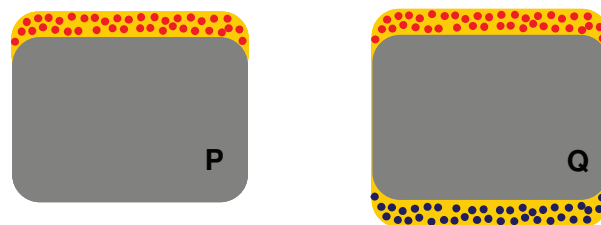


Abb. 15: Schematische Darstellung eines Stentstegs mit Beschichtung der Stentaußenseite (*Variante P*) sowie der -außenseite und -innenseite (*Variante Q*)

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten DES-Beschichtungen beruhen hauptsächlich auf Polymer-Wirkstoff-Kompositen, die durch einen Tauch- bzw. Sprühprozess aus der Lösung auf der Stentoberfläche erhalten wurden. Darüber hinaus wird die Möglichkeit aufgezeigt, den Polymer-Wirkstoff-Verbund durch nasschemische Reaktionen an der Oberfläche der polymeren Beschichtungsmatrix zu erzeugen.

4. Methodische Grundlagen der Drug-Eluting Stent-Entwicklung und -Charakterisierung

4.1 Modifizierung von Polymeren durch nasschemische Oberflächenreaktionen zur Ankopplung von Acetylsalicylsäure als Modellwirkstoff

Wünschenswert sind Biomaterialien bzw. Implantate, die durch die gezielte Oberflächengestaltung, zum Beispiel durch die Ausrüstung mit bioaktiven Substanzen, eine spezifische biologische Antwort auslösen. Diese Gestaltung der Oberfläche ist jedoch bei Polymeren erschwert, die lediglich ein aliphatisches CH-Grundgerüst ohne reaktive funktionelle Gruppen aufweisen. Im Zusammenhang mit der Entwicklung biodegradierbarer, wirkstoffbeladener Implantatoberflächen wurde deshalb untersucht, ob bei derartigen vergleichsweise inerten Polymeren, wie Poly(L-lactid) (PLLA, Resomer[®] L214, $M_w = 650000$ g/mol, Boehringer-Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland), Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB), $M_w = 640000$ g/mol, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ, Halle-Leipzig, Deutschland) und Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB), $M_w = 450000$ g/mol, Tepha Inc., Boston, USA), durch nasschemische Oberflächendegradationsreaktionen die Anzahl an reaktiven Hydroxyl (-OH)- und Carboxyl (-COOH)-Gruppen so erhöht werden kann, dass die nachfolgende Ankopplung und Freisetzung des Modellwirkstoffs Acetylsalicylsäure (ASS) zu Wirkstofffreisetzungprofilen über 1-3 Monate führt, die für eine Inhibierung des In-Stent-Restenoseprozesses (s. Kap. 3.1.1) notwendig sind. Als Vergleich diente ein Polyetherurethan (PUR, Pellethane[®], Dow Chemical Co., Midland, USA), das ein für die Oberflächenreaktionen zugängliches reaktives Urethan-NH-Proton im Monomergrundbaustein aufweist und somit durch Substitution des Urethan-NH-Protons nasschemischen Oberflächenmodifizierungen leichter zugänglich ist. Für die DES-Entwicklung ist von grundlegender Bedeutung, dass die nasschemischen Oberflächenreaktionen zur Ankopplung von Wirkstoffen in wenigen Modifizierungsschritten praktikabel umsetzbar sind und eine einfache Überführung auf polymere Stentbeschichtungsmatrizes erlauben. Außerdem muss garantiert werden, dass bei der chemischen Ankopplung des Wirkstoffes an die Stentoberfläche die biologische Aktivität des Wirkstoffes erhalten bleibt. Deshalb wird im folgenden Abschnitt exemplarisch die chemische Wirkstoffan Kopplung an Polymeroberflächen demonstriert (*DES-Variante B*, Kap. 3.2.4), die eine alternative bzw. ergänzende Strategie zu polymeren Stentbeschichtungen, bei denen die Wirkstoffbeladung durch Inkorporation in den Polymerbulk realisiert wird (*DES-Variante E*, Kap. 3.2.4), darstellt.

4.1.1 Nasschemische Reaktionen zur Polymeroberflächenmodifizierung

Für PUR, PLLA, P(3HB) und P(4HB) wurden reproduzierbar durchzuführende Reaktionen zur Oberflächenanbindung von sauren Wirkstoffen entwickelt.

Oberflächenmodifizierung von PUR

PUR wurde mit 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI) zur Reaktion gebracht unter Bildung eines N-substituierten Harnstoffderivates (Allophanat) (Abb. 16). Durch anschließende Einwirkung von wässriger Ammoniak (NH_3)-Lösung wurde die endständige Isocyanatgruppe unter Abspaltung von Kohlendioxid in eine primäre Aminogruppe überführt. Mit dem Ziel einer lokalen Wirkstofffreisetzung wurde in weiteren Syntheseschritten exemplarisch das Antiplogistikum ASS ionisch an die basische PUR-Oberfläche unter Bildung eines Arylammoniumacetylsalicylats fixiert.

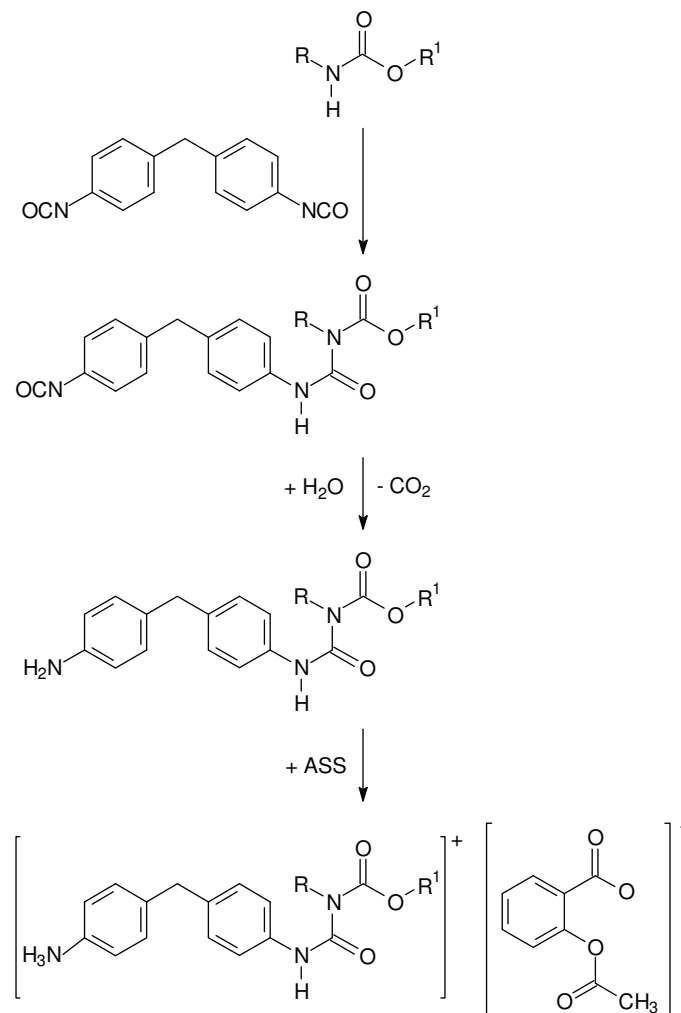


Abb. 16: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von Polyurethanen (PUR, Pellethane®): 1. Reaktion mit 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI), 2. Reaktion mit Wasser unter Abspaltung von Kohlendioxid, 3. Ionische Ankopplung von Acetylsalicylsäure (ASS)

Oberflächenmodifizierung von PLLA, P(3HB) und P(4HB)

Um die Anzahl an reaktiven funktionellen Gruppen an der Oberfläche der Polyester PLLA, P(3HB) und P(4HB) zu erhöhen, wurden diese zunächst in einer heterogenen Oberflächenreaktion einer basischen Hydrolyse (Verseifung) mit Natronlauge (NaOH) bzw. einer Aminolyse mit Ethylendiamin-Lösung (EDA) unterzogen. Die stöchiometrische Verseifung von Carbonsäureestern mit Basen wurde gegenüber der säurekatalysierten Hydrolyse bevorzugt angewendet, da diese schneller verläuft aufgrund der größeren Nucleophilie der Hydroxidionen im Vergleich zu der der Wassermoleküle. Bei der Aminolyse von Carbonsäureestern mit primären Aminen, wie EDA, entstehen die entsprechenden sekundären Carbonsäureamide und die Alkohole. Die Reaktionsmöglichkeiten zur Spaltung von Esterbindungen unter Verseifung und Aminolyse sind am Beispiel der P(3HB) in der Abbildung 17 verdeutlicht. In den durchgeführten nasschemischen Oberflächenreaktionen ist von einer statistischen Esterspaltung innerhalb der Polymerkette auszugehen. Zur besseren Übersichtlichkeit wird die Spaltung der Esterbindung in der Abbildung 17 am Kettenende unter Abspaltung von 3-HB demonstriert. Die alternative Verwendung von EDA anstatt NaOH war bei der Oberflächenmodifizierung von PLLA notwendig, da dieser Polyester im Gegensatz zu P(3HB) und P(4HB) in der NaOH-Lösung unbeständig war.

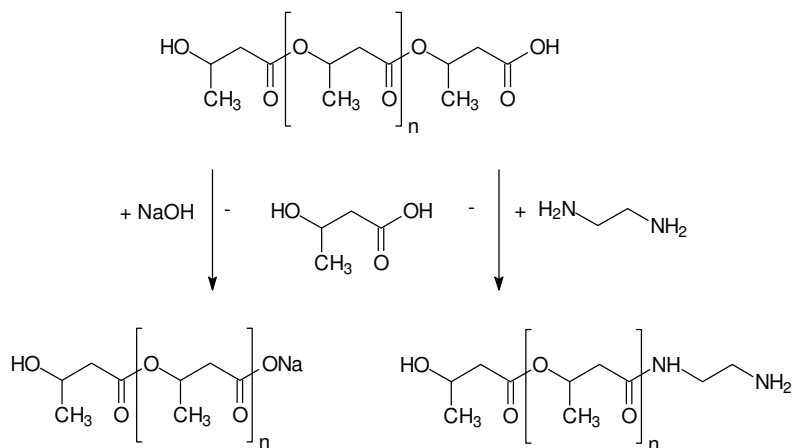


Abb. 17: Reaktionsschema zur Oberflächendegradation von Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) unter Spaltung von Esterbindungen durch Hydrolyse (Verseifung) mit Natronlauge (NaOH) bzw. durch Aminolyse mit Ethylendiamin (EDA)

Danach wurden die Polymeroberflächen mit dem Diisocyanat MDI zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsbedingungen für die nasschemischen Oberflächenreaktionen mussten in diesem Zusammenhang dahingehend optimiert werden, dass zum einen Lösungsmittel gewählt wurden, in denen die Polymere nicht quellen, um eine Vergrößerung der Oberfläche und eine tiefere Modifizierung im Bulk zu verhindern. Zum anderen wurde angestrebt, die nasschemischen Reaktionen hinsichtlich Reaktionszeit und -temperatur so einzustellen, dass

eine nahezu 100 %ige Umsetzung der reaktiven Gruppen an der Polymeroberfläche erreicht wird, die mittels Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie (Kapitel 4.1.2) in den einzelnen Modifizierungszwischenstufen nachgewiesen werden sollte. In der Abbildung 18 ist die exemplarische Reaktion der endständigen Hydroxyl (-OH)-Gruppe von P(3HB) mit MDI unter Bildung einer Urethanbindung dargestellt. Die anschließenden Reaktionen mit wässriger NH_3 -Lösung und ASS-Lösung führten wiederum zur Bildung eines Arylammoniumacetylsalicylats an der P(3HB)-Oberfläche. Bei PLLA wurde die NH_3 -Lösung durch EDA-Lösung ersetzt, da PLLA auch in dieser Lösung nicht beständig war.

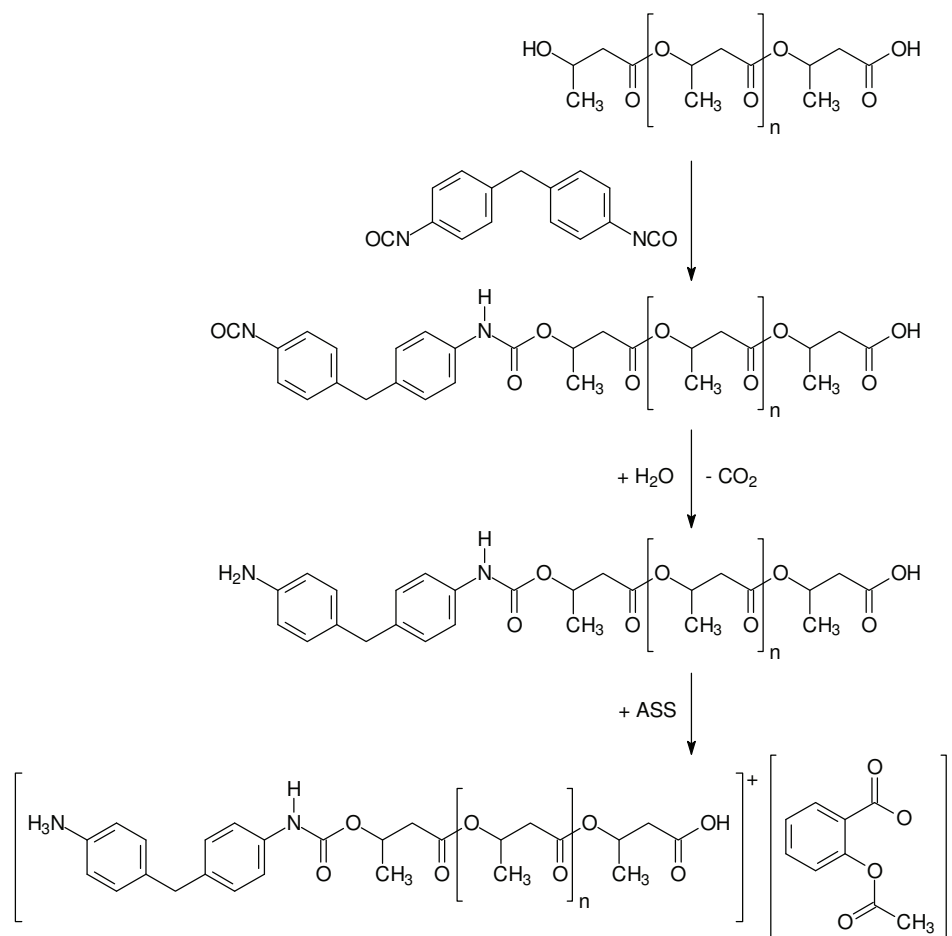


Abb. 18: Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)): 1. Reaktion mit 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI), 2. Reaktion mit Wasser unter Abspaltung von Kohlendioxid, 3. Ionische Ankopplung von Acetylsalicylsäure (ASS)

Eine Übersicht über die für PUR, PLLA, P(3HB) und P(4HB) ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen an 100 μm dicken Polymerfolien mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Gesamtoberfläche von 56.5 mm^2 (entspricht annähernd der Gesamtoberfläche eines später zu modifizierenden koronaren Stents) gibt die Tabelle 8.

Tab. 8: Übersicht über die Reaktionsbedingungen der nasschemischen Oberflächenmodifizierungen von PUR, PLLA, P(3HB) und P(4HB)

Polymere	1. Basische Oberflächen-degradation	2. Reaktion zur endständigen -NCO	3. Reaktion zur endständigen -NH ₂	4. Reaktion mit ASS
PUR Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur:	- - -	12 h 1.0x10 ⁻³ M MDI/ Toluol 50 °C	30 min 25 %iger NH ₃ / H ₂ O RT	72 h 1x10 ⁻¹ M ASS/ CH ₃ CN/H ₂ O 50 °C
PLLA Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur:	20 h 3 M EDA/ H ₂ O 50 °C	15 h 1.5x10 ⁻³ M MDI/ n-Heptan 50 °C	30 min 2 M EDA/ H ₂ O RT	48 h 1x10 ⁻¹ M ASS/ CH ₃ CN/H ₂ O 50 °C
P(3HB) Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur:	2 h 2 M NaOH/ H ₂ O 50 °C	10 h 1.5x10 ⁻³ M MDI/ n-Heptan 50 °C	30 min 25 %iger NH ₃ / H ₂ O RT	48 h 1x10 ⁻¹ M ASS/ CH ₃ CN/H ₂ O 50 °C
P(4HB) Reaktionszeit: Reagenz/ Lösungsmittel: Temperatur:	4 h 2 M NaOH/ H ₂ O 40 °C	10 h 1.5x10 ⁻³ M MDI/ n-Heptan 40 °C	30 min 25 %iger NH ₃ / H ₂ O RT	48 h 1x10 ⁻¹ M ASS/ H ₂ O 40 °C

4.1.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis der Oberflächenreaktionen

Die nasschemischen Oberflächenreaktionen wurden unter Verwendung folgender Methoden qualitativ bzw. quantitativ beurteilt:

Qualitativer Nachweis

- Bestimmung und Auswertung der Lage der Absorptionsbanden von relevanten Molekülgruppen mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

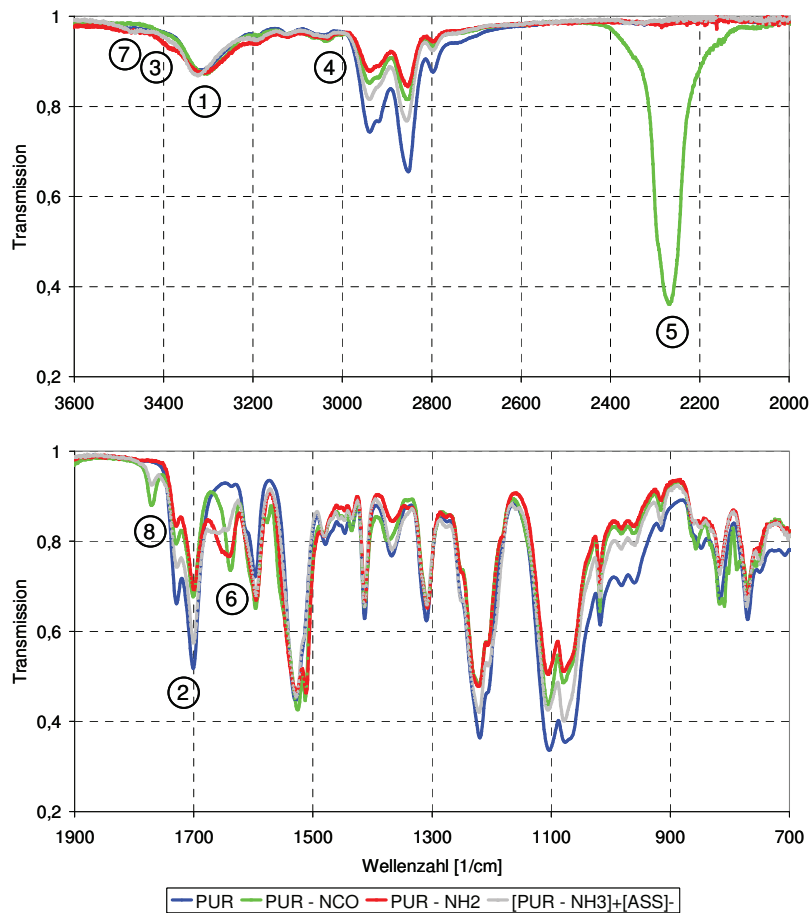
Quantitativer Nachweis

- Bestimmung des Kontaktwinkels, den ein Wassertropfen auf der Oberfläche der modifizierten Polymere zu dieser Oberfläche bildet und der ein Maß für bestimmte Oberflächeneigenschaften, wie die Benetzbarkeit darstellt, mit Hilfe der Sessile Drop-Methode
- Nachweis der im Rahmen der Modifizierung erzeugten endständigen Aminogruppen mit dem Ninhydrin-Test
- Untersuchung der ASS-Freisetzung von der Polymeroberfläche mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie (HPLC, s. Kap. 4.1.3)

FTIR-Spektroskopie zum Nachweis der Oberflächenreaktionen

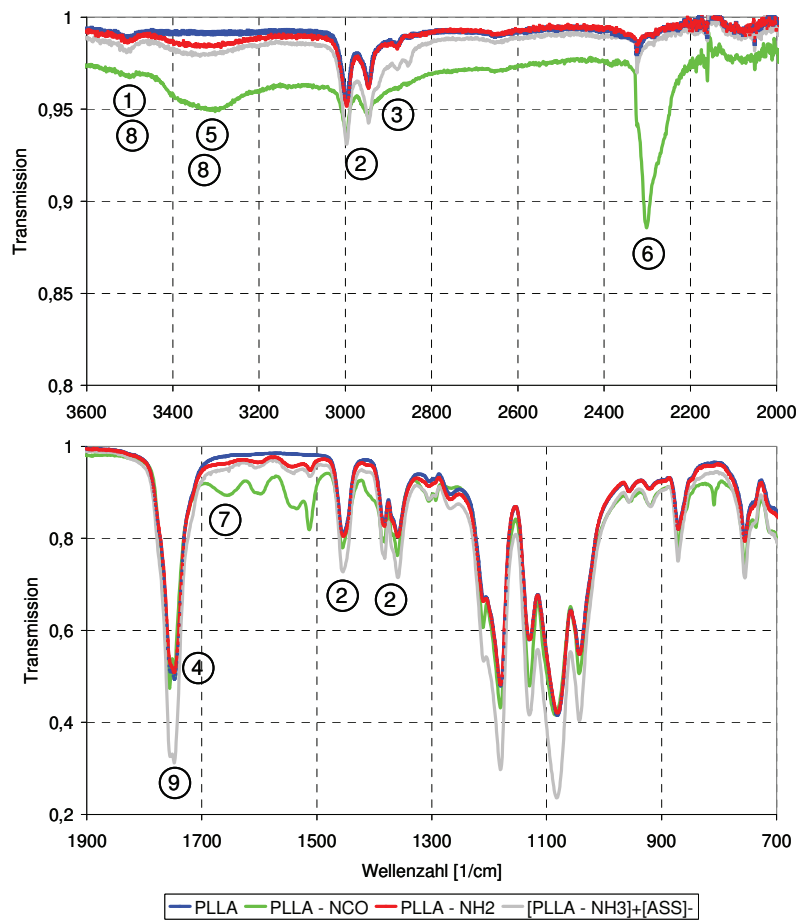
Eine geeignete Methode zum qualitativen Nachweis der Oberflächenreaktionen stellt die Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie dar, da viele funktionelle Gruppen von organischen Molekülen charakteristische Schwingungen und somit Absorptionsbanden in definierten Bereichen des IR-Spektrums zeigen. Für die Untersuchungen wurde ein FTIR-Spektrometer (Equinox 55, Fa. Bruker Optik GmbH, Leipzig, Deutschland) verwendet, dessen ATR-Einheit (*attenuated total reflection* = Abgeschwächte Totalreflexion) eine zerstörungsfreie Analyse der modifizierten Polymeroberflächen ermöglicht. Bei der ATR-Technik wird die Probe auf einen Kristall mit hohem Brechungsindex (z. B. Diamant) aufgebracht. Die den Kristall unter ein- oder mehrmaliger Totalreflexion passierende IR-Strahlung wird an der Grenzfläche Kristall-Probe reflektiert. Ein Teil der Strahlung wird jedoch von der Probe absorbiert und fehlt im reflektierten Strahl. Diese Intensitätsänderung des einfach bzw. mehrfach reflektierten Strahls in Abhängigkeit von der Wellenlänge bzw. Wellenzahl wird als Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Weiterhin hängt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Intensität der Absorptionsbanden von der Anzahl der absorbierenden Bindungen bzw. von der Konzentration der absorbierenden Substanz ab [221].

Die Substitution des Urethan-NH-Protons über den Einbau einer endständigen Isocyanatgruppe und die anschließende Anbindung von ASS an die basische PUR-Oberfläche wurden durch die FTIR-ATR-Spektroskopie nachgewiesen (Abb. 19). Die ermittelten Wellenzahlen und die aus der Literatur [222] zugänglichen Absorptionsbereiche wesentlicher chemischer Bindungen des unmodifizierten PUR und der einzelnen Modifizierungsstufen sind in der Tabelle der Abbildung 19 zusammengefasst. Die nachgewiesenen Bindungsverhältnisse korrelieren mit den in der Abbildung 16 dargestellten Strukturformeln der einzelnen Modifizierungsschritte. Die charakteristischen FTIR-Spektren der Oberflächenreaktionen von PLLA, P(3HB) und P(4HB) in einzelnen Stufen der Modifikation sind in den Abbildungen 20-22 dargestellt. Die Tabellen in den Abbildungen geben einen Überblick über die ermittelten Wellenzahlen und die in der Literatur angegebenen Absorptionsbereiche [222] wesentlicher chemischer Bindungen der unmodifizierten Polyester PLLA, P(3HB) und P(4HB) und der einzelnen Modifizierungsstufen. Im Rahmen der Spektrenauswertung wurde eine vollständige Identifizierung aller Peaks vorgenommen. Zugunsten einer besseren Darstellbarkeit wurde sich jedoch auf die Zuordnung der für den Modifizierungsschritt relevanten Bindungen beschränkt. Durch die Reaktion der endständigen OH-Gruppen von PLLA, P(3HB) und P(4HB) mit MDI werden NCO- und OH-Gruppen verbraucht, während Urethangruppen gebildet werden. Nebenreaktionen, wie eine Dimerbildung des Isocyanats zu Uretidiongruppen (1780 cm^{-1}), Trimerbildung zu Isocyanoratgruppen (1690 cm^{-1}) oder die Bildung eines Allophanats durch die Reaktion des Isocyanats mit der gebildeten Urethangruppe, wurden nicht detektiert.



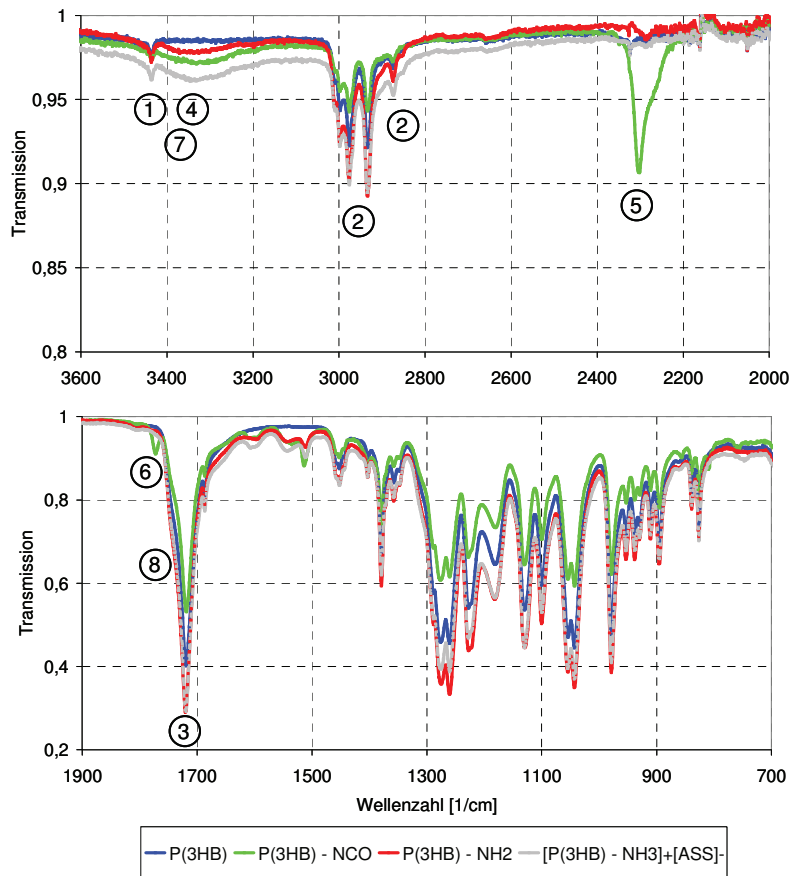
Peak-nummer	Wellenzahl ν [cm^{-1}]	Absorptionsbereich ν [cm^{-1}] ([222])	Absorbierende Bindung
PUR			
1	3319	3500 - 3100	NH (Urethan)
2	1728, 1700	1740 - 1690	C=O (Urethan)
Reaktion zur endständigen -NCO			
3	3413	3460 - 3400 (m), 3100 - 3070 (m)	<i>HN</i> -C=O
4	3032	3100 - 3000	CH (Aryl)
5	2265	2270 - 2100	N=C=O
6	1636	1660	<i>HN</i> -C=O
Reaktion zur endständigen -NH₂			
7	3485, 3384	3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w)	Ar-NH ₂
Reaktion mit ASS			
8	1767	1750 - 1735, 1700 - 1725	CH ₃ -C=O O-C=O

Abb. 19: FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten PUR-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Probe (Pellethane®) sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten PUR-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)



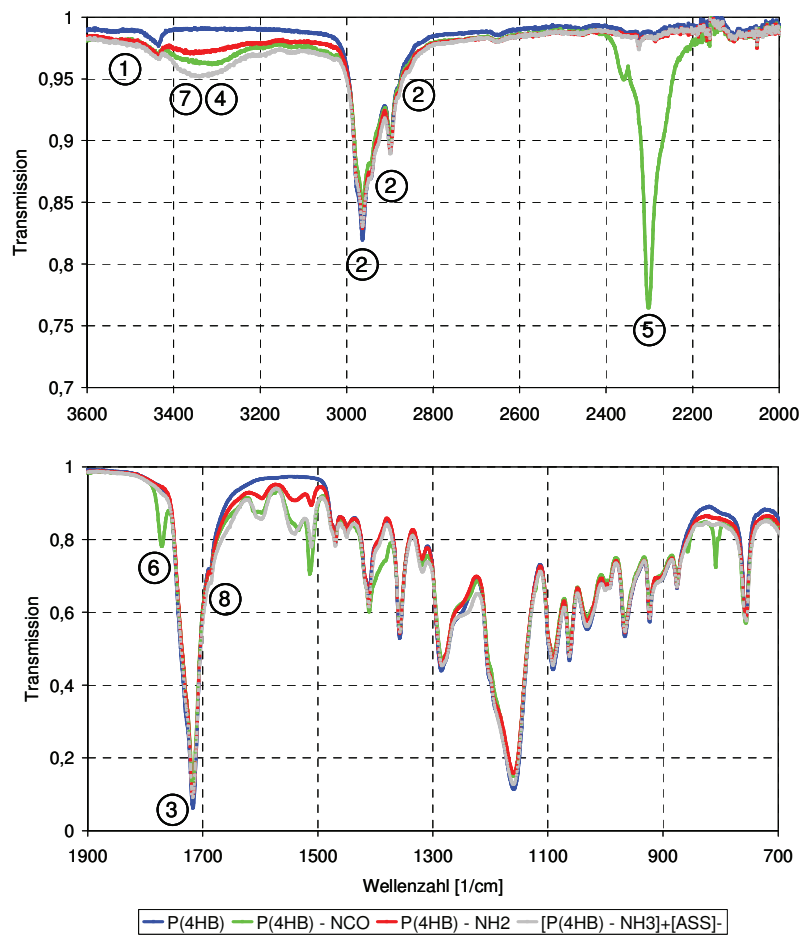
Peak-nummer	Wellenzahl ν [cm^{-1}]	Absorptionsbereich ν [cm^{-1}] ([222])	Absorbierende Bindung
PLLA			
1	3506	3650 - 3590 (v), 1150 - 1040 (s)	OH (C-OH)
2	2996, 2941, 1450, 1357, 1381	2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 1390 - 1370 (m)	CH-CH ₃
3	2876	2890 - 2880 (w), 1400	CH-CH ₃
4	1748	1725 - 1700	C=O
Reaktion zur endständigen -NCO			
5	3316	3500 - 3100	NH (Urethan)
6	2299	2270 - 2100	N=C=O
7	1653	1740 - 1690	C=O (Urethan)
Reaktion zur endständigen -NH₂			
8	3495, 3330	3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w)	Ar-NH ₂
Reaktion mit ASS			
9	1715	1750 - 1735, 1700 - 1725	CH ₃ -C=O O-C=O

Abb. 20: FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten PLLA-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten PLLA-Probe sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten PLLA-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)



Peak-nummer	Wellenzahl ν [cm^{-1}]	Absorptionsbereich ν [cm^{-1}] ([222])	Absorbierende Bindung
P(3HB)			
1	3435	3650 - 3590 (v), 1150 - 1040 (s)	OH (C-OH)
2	3004, 2995, 2975, 2931, 2870	2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 720 (w) 2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 1390 - 1370 (m) 2890 - 2880 (w), 1400	C-H (CH_2) CH- CH_3 CH- CH_3
3	1724	1725 - 1700	C=O
Reaktion zur endständigen -NCO			
4	3323	3500 - 3100	NH (Urethan)
5	2300	2270 - 2100	N=C=O
6	1769	1740 - 1690	C=O (Urethan)
Reaktion zur endständigen -NH₂			
7	3333	3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w)	Ar-NH ₂
Reaktion mit ASS			
8	1745	1750 - 1735, 1700 - 1725	CH ₃ -C=O O-C=O

Abb. 21: FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten P(3HB)-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten P(3HB)-Probe sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten P(3HB)-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)



Peak-nummer	Wellenzahl ν [cm^{-1}]	Absorptionsbereich ν [cm^{-1}] ([222])	Absorbierende Bindung
P(4HB)			
1	3535	3650 - 3590 (v), 1150 - 1040 (s)	OH (C-OH)
2	2974, 2962, 2942, 2898, 2878	2960 - 2850 (s), 1470 - 1430 (m), 720 (w)	C-H (CH_2)
3	1715	1725 - 1700	C=O
Reaktion zur endständigen -NCO			
4	3312	3500 - 3100	NH (Urethan)
5	2300	2270 - 2100	N=C=O
6	1769	1740 - 1690	C=O (Urethan)
Reaktion zur endständigen -NH₂			
7	3361	3509 - 3460 (as), 3416 - 3382 (s), 700 - 600 (w)	Ar-NH ₂
Reaktion mit ASS			
8	1685	1750 - 1735, 1700 - 1725	CH ₃ -C=O O-C=O

Abb. 22: FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten P(4HB)-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten P(4HB)-Probe sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten P(4HB)-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)

Bestimmung des Kontaktwinkels

Der Kontaktwinkel ist der Winkel, den eine Tangente an der Tropfenkontur im Drei-Phasen-Punkt zur Oberfläche des Festkörpers bildet. Er ist ein Maß für die Benetzbarkeit einer Oberfläche oder Grenzfläche durch eine Flüssigkeit und kann somit zur Untersuchung von Oberflächenveränderungen genutzt werden.

Die Messung des Kontaktwinkels erfolgte am Contact Angle System (OCA 20, Fa. Data-physics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland). Zur Anwendung kam die *Sessile Drop Methode*, bei der auf die ebene Fläche der zu untersuchenden Polymerfolien Tropfen dest. Wassers gegeben wurden (Abb. 23). Die Dosierung des Wassertropfens wurde elektronisch über ein Spritzenmodul gesteuert. Die Bestimmung des Kontaktwinkels erfolgte über die Young-Laplace-Methode. Der liegende Wassertropfen wurde mittels einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Danach wurde manuell am Bildschirm die Basislinie als Grenze zwischen Wassertropfen und Folie markiert sowie nach Ziehen der Kontur des Wassertropfens der Kontaktwinkel durch die Auswerte-Software (SCA 20) berechnet.

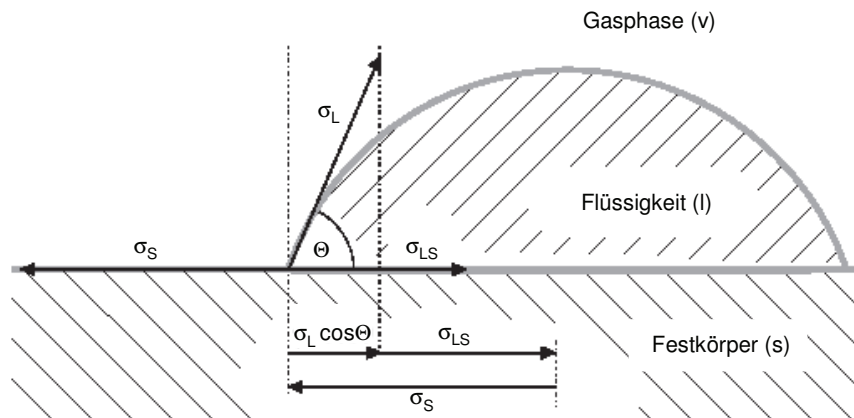


Abb. 23: Tropfen auf einer Festkörperoberfläche mit dem Kontaktwinkel Θ

Die Minimierung der freien Energie bei konstantem Volumen definiert die Form eines Tropfens. Einer Vergrößerung der Oberfläche wirkt die Oberflächenspannung der Flüssigkeit σ_L , die Grenzflächenspannung von Flüssigkeit und Gasphase der Flüssigkeit, entgegen. Ein Energiegewinn entsteht durch die Absenkung der Oberflächenenergie des Festkörpers $\sigma_S - \sigma_{LS}$ durch die Bedeckung mit der Flüssigkeit. Für den Kontaktwinkel Θ des liegenden Tropfens ergibt sich die so genannte Young-Gleichung (Gl. 4.1) [223]:

$$\cos \Theta = \frac{\sigma_S - \sigma_{LS}}{\sigma_L} \quad (4.1)$$

Je größer σ_L ist, desto höher werden die Kontaktwinkel, weil dann eine höhere Energie der Ausbreitung entgegenwirkt. σ_S ist die freie Oberflächenenergie des Festkörpers, während σ_{LS}

die Grenzflächenenergie zwischen Festkörper und Flüssigkeit ist. $\sigma_S - \sigma_{LS}$ ist ein Maß für die Stärke der Bindung der Flüssigkeit an den Festkörper. Je stärker die Bindung wird, umso kleiner werden die Kontaktwinkel. Ein Kontaktwinkel von 0 bedeutet ideale Benetzbarkeit. Die Bindung an den Festkörper ist dann stärker als die Wechselwirkung der Flüssigkeitsmoleküle untereinander.

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (Tab. 9) der modifizierten gegenüber den unmodifizierten Polymeroberflächen zeigen eine Erniedrigung der Kontaktwinkel des liegenden Wassertropfens nach basischer Oberflächendegradation von P(3HB) und P(4HB) mit NaOH infolge der Erhöhung der Hydrophilie der Oberfläche. Bei dem in NaOH unbeständigen PLLA war nach Umsetzung mit EDA keine nennenswerte Änderung des Kontaktwinkels zu verzeichnen.

Tab. 9: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen nach Oberflächenmodifizierung, Mittelwerte der gemessenen Kontaktwinkel von n=12 Polymerproben pro Modifizierungsstufe

Modifizierungsreaktion	Θ_{PUR} [°]	Θ_{PLLA} [°]	$\Theta_{P(3HB)}$ [°]	$\Theta_{P(4HB)}$ [°]
ohne Modifikation	83.1 ± 4.3	71.5 ± 2.9	69.3 ± 6.9	67.7 ± 4.0
Basische Oberflächen-degradation	-	72.0 ± 9.5	58.6 ± 6.2	36.2 ± 4.8
Reaktion zur endständigen -NCO	99.0 ± 9.4	80.6 ± 7.5	69.6 ± 8.0	71.7 ± 7.5
Reaktion zur endständigen -NH ₂	44.0 ± 6.2	89.1 ± 7.3	70.3 ± 6.0	67.9 ± 1.5
Reaktion mit ASS	53.0 ± 6.7	88.2 ± 6.5	67.1 ± 7.8	73.0 ± 8.4

Nach kovalenter Ankopplung von MDI ist eine Erhöhung der Kontaktwinkel zu beobachten, die mit der Einführung der phenylsubstituierten Alkylkette einhergeht. Die Hydrolyse der endständigen Isocyanatgruppe und die Ankopplung von ASS führt beim hydrophoben PUR zu einer starken Erniedrigung des Kontaktwinkels, während bei PLLA, P(3HB) und P(4HB) eine weniger starke Änderung des Kontaktwinkels zu beobachten ist.

Nachweis der Aminogruppenbeladung mit Ninhydrin

Der quantifizierende Nachweis der nach Reaktion der endständigen Isocyanatgruppen mit wässriger NH₃- bzw. EDA-Lösung auf den modifizierten Polymeroberflächen gebildeten Aminogruppen erfolgte mittels Fotometrie. Dazu wurde Ninhydrin genutzt, das mit den freien

Aminogruppen unter Wasserabspaltung zunächst zum Azomethin (Schiffschen Base) umgesetzt wird. Das von der modifizierten Polymeroberfläche abgespaltene Amino-Ninhydrin dimerisiert mit Ninhydrin zum Ruhemanns Purpur (Abb. 24) [224]. Die Intensität dieses gebildeten Farbstoffes, die durch Mesomerie unter Beteiligung einer Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des Systems konjugierter Doppelbindungen erklärt werden kann, ist dabei der Konzentration der zu bestimmenden Aminogruppen an der Polymeroberfläche proportional.

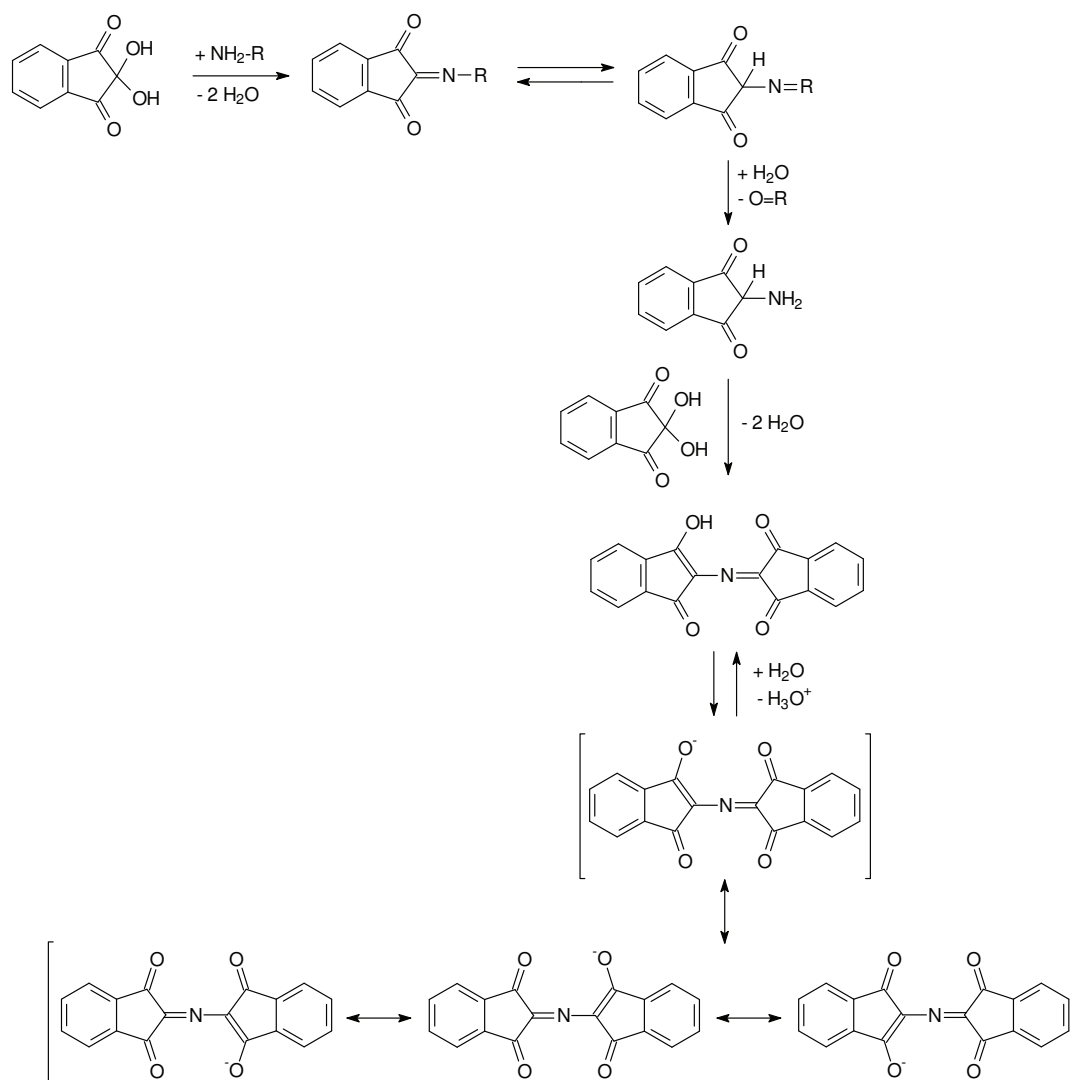


Abb. 24: Oberflächenreaktion der primären Aminogruppen der modifizierten Polymere mit Ninhydrin zum Ruhemanns Purpur [224]

Zur Quantifizierung der Aminogruppen auf den modifizierten Oberflächen wurde eine Eichgerade mit der α -Aminosäure Glycin erstellt. Danach wurden die oberflächenmodifizierten Polymerproben mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Gesamtoberfläche von 56.5 mm^2 gegen die Referenz dest. Wasser bei 570 nm im UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) vermessen. Die Kontrolle be-

inhalte die gleiche Anzahl an Polymerplättchen der MDI-Vorstufe. Die Ergebnisse des Aminogruppennachweises mit Ninhydrin sind in der Abbildung 25 dargestellt und werden für eine bessere Vergleichbarkeit der Polymerproben untereinander in $\mu\text{mol}/\text{mm}^2$ angegeben.

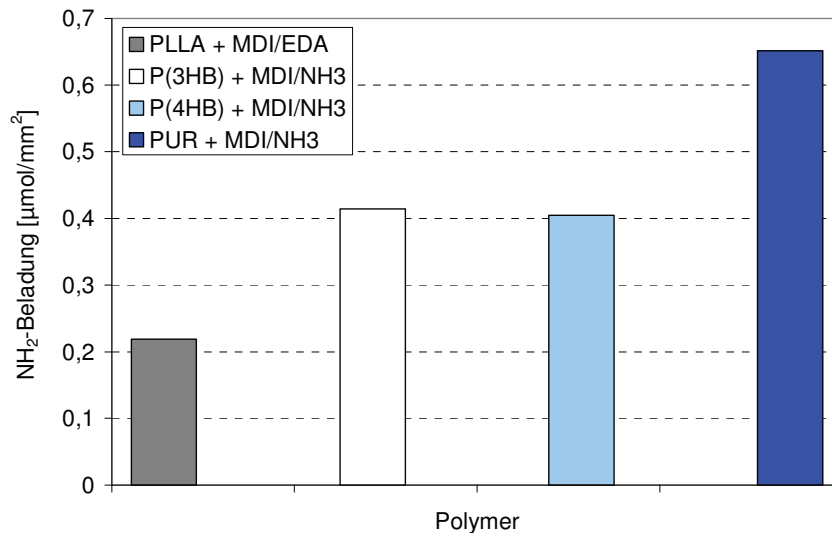


Abb. 25: Aminogruppenbeladung von PLLA, P(3HB) und P(4HB)-Folien nach Oberflächendegradation mit Natronlauge (NaOH) bzw. Ethylendiamin (EDA), Umsetzung mit 4,4'-Methylenbis(phenylisocyanat) (MDI) und anschließender Reaktion mit Ammoniak (NH₃) bzw. EDA; Vergleich mit PUR-Modifizierung nach Umsetzung mit MDI und anschließender Reaktion mit NH₃

Es ist festzustellen, dass die Aminogruppenbeladung auf der PUR-Oberfläche bei der Umsetzung mit MDI/EDA etwa 3-mal höher ist als beim ebenfalls mit diesen Reagenzien behandelten PLLA. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass an der PUR-Oberfläche das Urethan-NH-Proton des Monomerbausteins substituiert werden kann, während beim PLLA nur die nach Oberflächendegradation erhaltenen endständigen reaktiven Hydroxyl- und Aminogruppen für den Einbau der Isocyanat- und anschließend der Aminogruppe zur Verfügung stehen.

Bei den Polyestern weisen P(3HB) und P(4HB) nach Umsetzung mit MDI/NH₃ die höchsten Aminogruppenbeladungen auf. Die Anzahl an Aminogruppen, angegeben in $\mu\text{mol}/\text{mm}^2$, ist auf den modifizierten P(3HB)- und P(4HB)-Oberflächen etwa 2-mal höher als die auf der modifizierten PLLA-Oberfläche. Dies lässt darauf schließen, dass die Anzahl der reaktiven Gruppen nach der basischen Oberflächendegradation durch Aminolyse beim PLLA geringer war als durch Hydrolyse (Verseifung) bei P(3HB) und P(4HB).

Diese Annahme wird auch durch die geringe Änderung des Kontaktwinkels beim PLLA nach Umsetzung mit EDA im Vergleich zu P(3HB) und P(4HB) unterstützt (Tab. 9).

4.1.3 In vitro Elution von Acetylsalicylsäure

Das Freisetzungsverhalten von Acetylsalicylsäure (ASS) wurde in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie (HPLC) (Säule: Eurospher 100, C18, 5 µm, 250x4 mm ID; Laufmittel: Acetonitril/Wasser/85 %ige ortho-Phosphorsäure-Gemisch 40/60/0.2 v/v/v; isokratisch; Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; Säulentemperatur: 25 °C) bestimmt. Bei der PUR-Modifizierung wurde eine vollständige Freisetzung der ionisch gebundenen ASS innerhalb von 6 Tagen erreicht, wobei die höchste Freisetzungsgeschwindigkeit innerhalb der ersten 24 h beobachtet wurde.

Vergleicht man die im vorangegangenen Modifizierungsschritt erreichte Amingruppenbeladung auf der Oberfläche mit der in der Abbildung 26 in µmol/mm² angegebenen kumulativ freigesetzten ASS-Masse so ist festzustellen, dass bei der ionischen Ankopplung des Modellwirkstoffs an die PUR-Oberfläche eine Ausbeute von annähernd 37 % erreicht wurde.

Die Hydrolyse der freigesetzten ASS wurde berücksichtigt, indem im Elutionsmedium sowohl ASS als auch Salicylsäure (SS) chromatografisch erfasst und die Gehalte summiert wurden. Das Elutionsmittel mit einem Volumen von 4 ml wurde an jedem Probennahmezeitpunkt erneuert, um eine ungehinderte Wirkstofffreisetzung zu ermöglichen und eine Sättigung des Wirkstoffes im Medium zu verhindern.

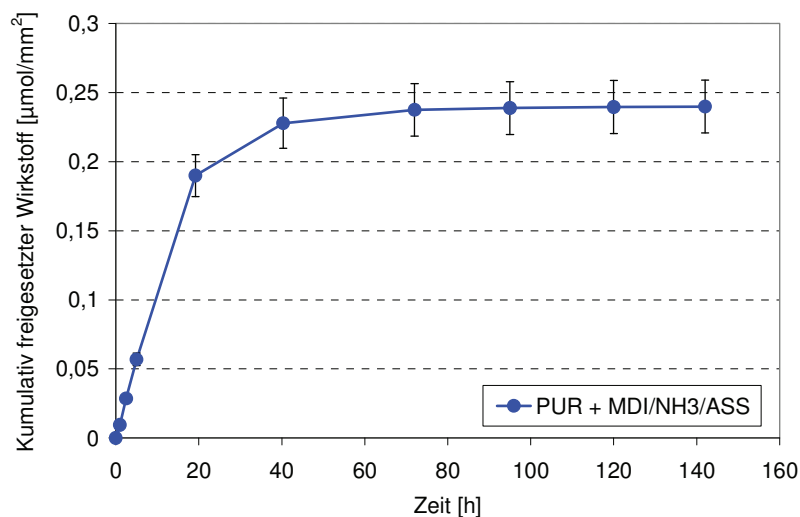


Abb. 26: Freisetzung der an die PUR-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C

Bei der Untersuchung der ASS-Freisetzung von der aktivierten PLLA-Oberfläche wurde festgestellt, dass deutlich geringere Mengen an ASS in das Elutionsmedium abgegeben wurden als beim oberflächenmodifizierten PUR (Abb. 27). Dies ist damit zu erklären, dass im vorangegangenen Modifizierungsschritt weniger Amingruppen auf dem hydrophoben PLLA

synthetisiert werden konnten und somit eine geringere Anzahl reaktiver Gruppen für die Folgereaktion mit ASS zur Verfügung stand.

Im Gegensatz zum oberflächenmodifizierten PUR war jedoch beim oberflächenmodifizierten PLLA die ASS-Freisetzung erst nach etwa 20 Tagen beendet, was auch auf eine zusätzliche Bulkmodifizierung hindeuten könnte. Darüber hinaus war nach der initialen Freisetzungsphase von etwa 24 h eine nahezu konstante Freisetzungsgeschwindigkeit zu beobachten, die sich im anschließenden linearen Kurvenverlauf manifestiert.

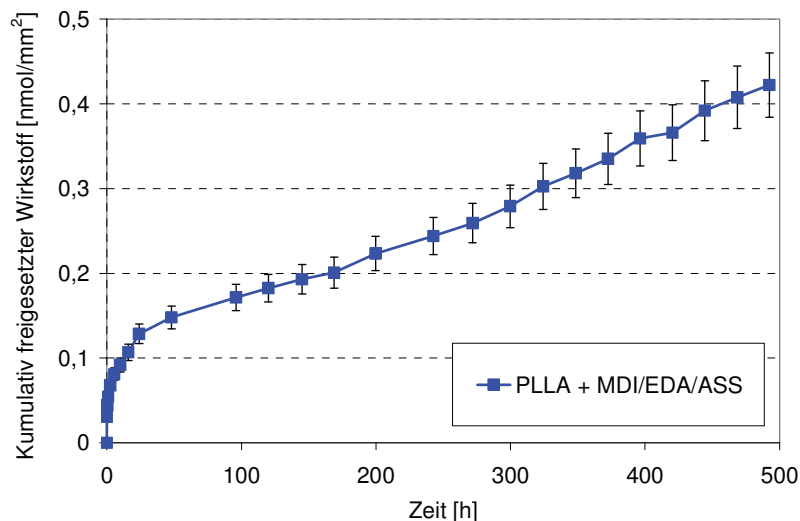


Abb. 27: Freisetzung der an die PLLA-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C

Diese beim PLLA beobachtete Freisetzungskinetik des Wirkstoffes ASS könnte sich als Vorteil für die DES-Applikation erweisen, da die Mechanismen des In-Stent-Restenoseprozesses eine entzündungshemmende Wirkung auch über die Inflammationsphase (s. Kap. 3.1.1) von 5 Tagen hinaus erfordern, sofern zusätzliche, beispielsweise durch den Abbau der polymeren Beschichtungsmatrix verursachte entzündliche Prozesse, nicht auszuschließen sind. Zu klären ist unter dem Gesichtspunkt der Dosis-Wirkungs-Zeit-Beziehung, ob und in welchem Zeitraum die freigesetzten ASS-Konzentrationen eine lokale Entzündungshemmung gewährleisten können. Die Ausbeute an gekoppelter und nach etwa 20 Tagen vollständig freigesetzter ASS betrug 0.2 % in Bezug zum vorangegangenen Modifizierungsschritt.

Bei der oberflächenmodifizierten P(3HB) wurde eine sehr schnelle ASS-Freisetzung innerhalb weniger Stunden beobachtet, die sich im Freisetzungsprofil der Abbildung 28 wieder spiegelt. Die ASS-Freisetzung war nach einer so genannten „burst release“-Phase von etwa 4 h nahezu vollständig, da bereits 90 % der auf der P(3HB)-Oberfläche fixierten ASS freigesetzt wurden. Nach einer Elutionsdauer von 7.5 Tagen wurde keine weitere Anreicherung

von ASS bzw. SS im Elutionsmedium detektiert. Bezogen auf die zur Reaktion angebotene Anzahl an Aminogruppen der vorangegangenen Modifizierungsstufe konnte eine Ausbeute an ionisch gebundener ASS von annähernd 4.5 % erzielt werden.

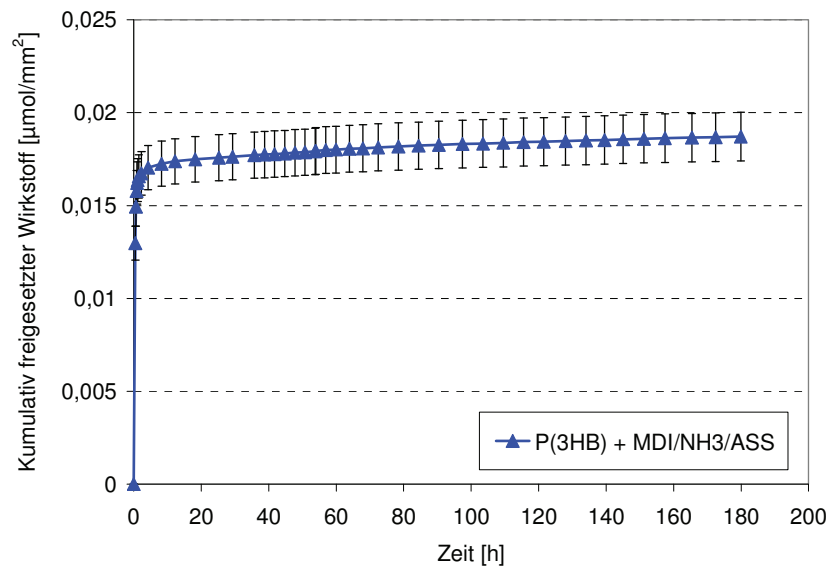


Abb. 28: Freisetzung der an die P(3HB)-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C

Auch bei der oberflächenmodifizierten P(4HB) wurde eine sehr schnelle ASS-Freisetzung beobachtet, da nach etwa 5 h 99 % des Wirkstoffes freigesetzt waren. Die noch auf der P(4HB)-Oberfläche verbliebene ASS wurde innerhalb der folgenden 6 Tage in sehr geringen Konzentrationen eluiert (Abb. 29).

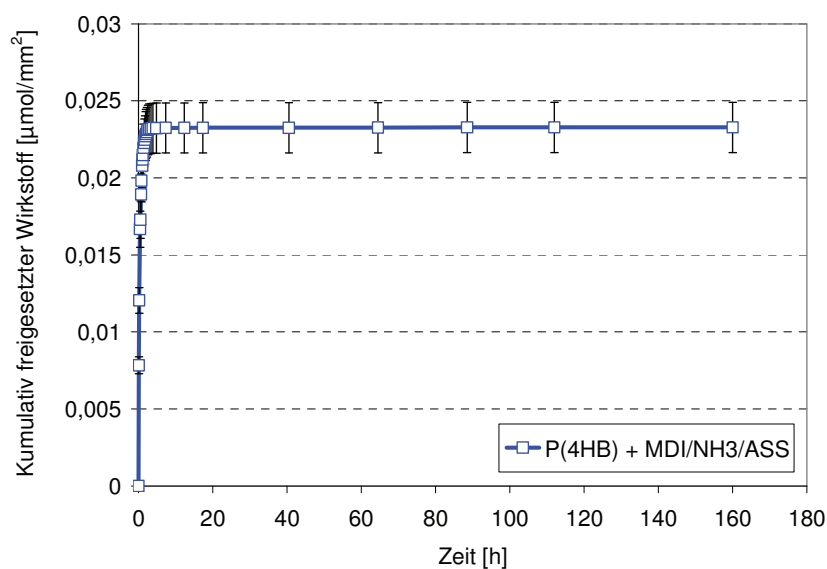


Abb. 29: Freisetzung der an die P(4HB)-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C

Die Ausbeute der Reaktion von ASS mit der oberflächenaktivierten P(4HB) betrug bezogen auf die zur Reaktion angebotene Anzahl an Aminogruppen der vorangegangenen Modifizierungsstufe 5.75 %.

4.1.4 In vitro Biokompatibilität der modifizierten Polymeroberflächen

Da aus den nasschemischen Oberflächenmodifizierungen eine Verminderung der Biokompatibilität der Polymerwerkstoffe resultieren kann, wurden in vitro Untersuchungen zur Beurteilung der Hämkompatibilität und der Zytotoxizität von oberflächenmodifizierten Folienprüfkörpern nach der Europäischen Norm zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (DIN EN ISO 10993-4, 2007 „Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut“, 10993-5, 1999 „Prüfungen auf in vitro-Zytotoxizität“) durchgeführt.

In vitro Untersuchungen zur Beurteilung der Hämkompatibilität

Der menschliche und tierische Organismus antwortet auf den drohenden Verlust der Integrität seiner Zellen und Gewebe mit einer Serie komplexer biochemischer und zellulärer Reaktionen, die in ihrer Gesamtheit entzündlicher Prozess genannt werden. Entzündungsreaktionen werden durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst.

Ein Auslösemechanismus ist die physikalische, chemische und/oder toxische Schädigung von Geweben durch bioinkompatible Werkstoffe. Von besonderer Bedeutung für Entzündungsreaktionen sind Leukozyten und Enzymsysteme, wie das Gerinnungssystem, das fibrinolytische System, das Kininsystem und das Komplementsystem. Neben den Leukozyten spielen bei der Unterhaltung des Entzündungsprozesses aber auch Thrombozyten, Endothelzellen und Fibroblasten eine wichtige Rolle. Die Entzündungszellen sezernieren eine erhebliche Anzahl von Mediatoren (u. a. Arachidonsäuremetabolite, Zytokine, Komplementkomponenten, reaktive Sauerstoffspezies und Enzyme), die sowohl der Bekämpfung der eingedrungenen Noxen als auch dem Signalaustausch zwischen den Zellen dienen und damit die Aktivierung oder Inaktivierung dieser Zellen steuern.

Eine Schlüsselrolle bei der Auslösung und Verstärkung von Entzündungen spielt das Komplementsystem. Es besteht aus mehr als 20 verschiedenen Plasmaproteinen, die über zwei Mechanismen, den klassischen und den alternativen Weg, aktiviert werden können. Der alternative Weg der Komplementaktivierung wird beschrieben, wenn die Proteine des Komplementsystems im Blut mit körperfremden Oberflächen in Berührung kommen. Der Grad der Aktivierung kann als ein Maß für die „Hämkompatibilität“ bzw. „Hämoinkompatibilität“ von Biomaterialien angesehen werden. Da diese Aktivierung auch in vitro in frischem Blutserum

stattfindet, ist somit eine geeignete in vitro Methode zur Hämokompatibilitätsprüfung von Biomaterialien gefunden. Wird in dem zu untersuchenden Testsystem Blutserum-Polymerwerkstoff eine erhöhte Konzentration an C3a festgestellt, so liegt eine Inkompatibilität des Biomaterials, in diesem Falle des oberflächenmodifizierten Polymers, vor. C3a ist sehr kurzlebig und wird im Blutserum rasch in das stabilere C3a-desArg unter Abspaltung des C-terminalen Arginins durch die Einwirkung von Carboxypeptidase B umgewandelt. C3a-desArg wird mit Hilfe eines Enzymimmunoassays bestimmt.

In den durchgeführten Hämokompatibilitätsstudien wurde geprüft, ob die oberflächenmodifizierten Folienprüfkörper, hier exemplarisch für die modifizierten PUR-Folien gezeigt, bei in vitro Kontakt mit humanem Blutserum das Komplementsystem aktivieren. Dabei wurde festgestellt, dass die mit endständigen Aminogruppen im 3. Modifizierungsschritt beladene PUR-Oberfläche im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Oberfläche keine Aktivierung der Komplementkaskade über den alternativen Weg verursacht (Abb. 30).

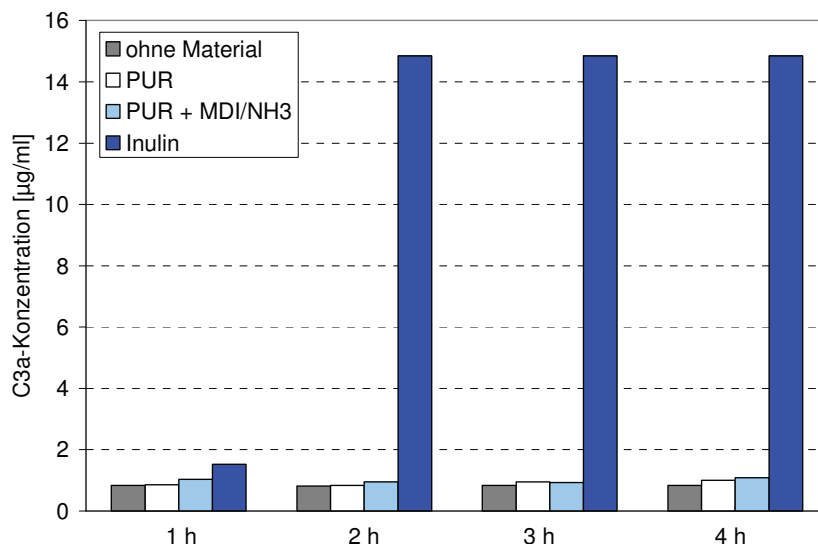


Abb. 30: C3a-desArg-Konzentrationen in humanem Blutserum nach Kontakt der mit endständigen Aminogruppen im 3. Modifizierungsschritt beladenen PUR-Oberfläche im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Oberfläche (jeweils 200 mm²) als Maß für deren Hämokompatibilität; Kontrollen: NC ohne Material, PC Inulin (2 mg/ml)

Zur Beurteilung der Hämokompatibilität der PUR-Materialien wurden die Werte der C3a-desArg-Konzentrationen im Blutserum ohne Material mit denen im Blutserum mit Testmaterial verglichen. Die um bis zu 10 % höheren Werte der C3a-desArg-Konzentrationen in den Seren mit PUR-Materialien wurden nicht durch die geprüften Werkstoffe verursacht, da auch mit zunehmender Inkubationsdauer der PUR-Materialien im Serum keine nennenswerte Konzentrationserhöhung des C3a-desArg infolge Aktivierung des Komplementsystems festgestellt wurde. Im Vergleich dazu wiesen die C3a-desArg-Konzentrationen in Serum, das

mit Inulin (Positivkontrolle PC) als sehr starkem Aktivator des Komplementsystems über den alternativen Weg behandelt wurde, mehrfach höhere Werte auf.

Auch die Untersuchungen zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung im humanen Heparinplasma zeigten nach einer Inkubationszeit von bis zu 1 h keine Verschlechterung der Hämokompatibilität der oberflächenmodifizierten PUR-Oberfläche im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Oberfläche (Abb. 31). Dieses Ergebnis ist hinsichtlich einer Beurteilung der Oberflächeneigenschaften nach erfolgter Wirkstofffreisetzung von Bedeutung.

Bei der plasmatischen Gerinnung entsteht über die Aktivierung verschiedener Gerinnungsfaktoren sowie mit Hilfe von Phospholipiden und Ca^{2+} -Ionen ein Komplex, an dem die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin abläuft. Bei der Spaltung des Prothrombins entsteht neben Thrombin das Prothrombin-Aktivierungsfragment F1+2, dessen Konzentration mit einem Enzymimmunoassay erfasst wird und das somit ein Maß für die durch die PUR-Oberflächen ausgelöste Aktivierung der plasmatischen Gerinnung ist. Thrombin leitet die Endphase der Gerinnung mit der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin ein. Bei dieser Umwandlung werden von der $\text{A}\alpha$ - und $\text{B}\beta$ -Kette des Fibrinogens die Fibrinopeptide A und B abgespalten und die Fibrinmonomere gebildet, die sich schließlich zum verfestigten und unlöslichen Fibrinnetz verbinden.

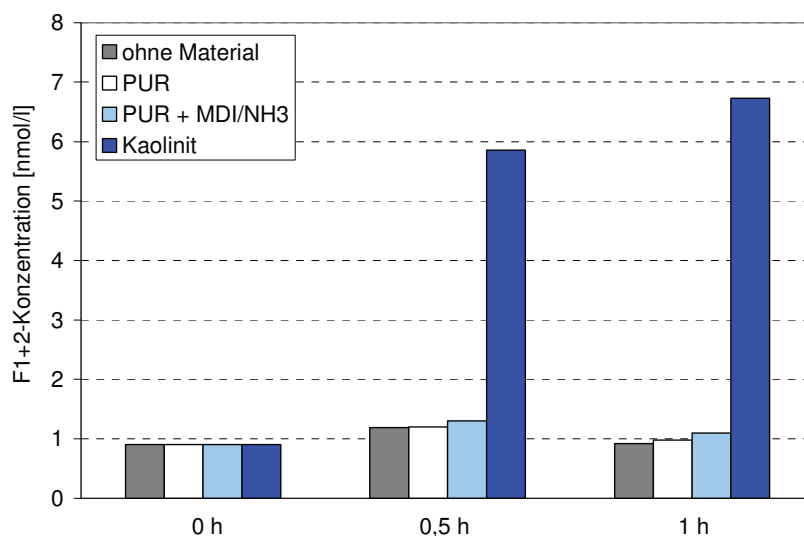


Abb. 31: F1+2-Konzentrationen in humanem Heparinplasma nach Kontakt der mit endständigen Aminogruppen im 3. Modifizierungsschritt beladenen PUR-Oberfläche im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Oberfläche (jeweils 200 mm^2) als Maß für deren Hämokompatibilität; Kontrollen: NC ohne Material, PC Kaolinit (5 mg/ml)

Nach Behandlung der Plasmaproben mit dem Aktivator Kaolinit als Positivkontrolle (PC) wurden etwa 5- bis 6-mal höhere Konzentrationen an F1+2 als bei den zu untersuchenden PUR-Folien gemessen, die auf die erfolgte Aktivierung der plasmatischen Gerinnung hinweisen und die Funktionsfähigkeit des Testsystems beweisen.

In vitro Untersuchungen zur Beurteilung der Zytotoxizität

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität der oberflächenmodifizierten Folienprüfkörper, exemplarisch an P(3HB) in den einzelnen Modifizierungsstufen dargestellt (Abb. 32), wurden mit Hilfe des MTS-Tests durchgeführt [225].

Der MTS-Test ist eine kolorimetrische Nachweismethode, bei dem das verwendete Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium durch zelluläre Dehydrogenasen in einen Formazanfarbstoff verstoffwechselt wird. Der daraus resultierende Farbumschlag wurde photometrisch (ELISA-Reader Anthos III, Anthos-Microsystems, Krefeld, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 492 nm, abzüglich der unspezifischen Absorptionen bei 690 nm, nachgewiesen und ist ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen. Diese wird direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen gesetzt und gibt somit Auskunft über die Zytotoxizität, d. h. die Fähigkeit der oberflächenmodifizierten Folienprüfkörper, Zellen zu schädigen.

Die L929-Mausfibroblasten zeigten eine Verringerung der Zellvitalität, wenn man diese in direkten Kontakt mit der mit endständigen Isocyanatgruppen beladenen P(3HB)-Oberfläche brachte. Im Gegensatz zur mit Isocyanatgruppen beladenen P(3HB)-Oberfläche, die zu einer Verringerung der relativen Zellvitalität (in %) gegenüber der Negativkontrolle Polystyrol (PS) auf annähernd 50 % nach 3 Tagen und 30 % nach 5 Tagen Inkubation führte, konnte mit der mit Aminogruppen beladenen P(3HB)-Oberfläche keine Beeinflussung der Vitalität der L929-Mausfibroblasten nachgewiesen werden.

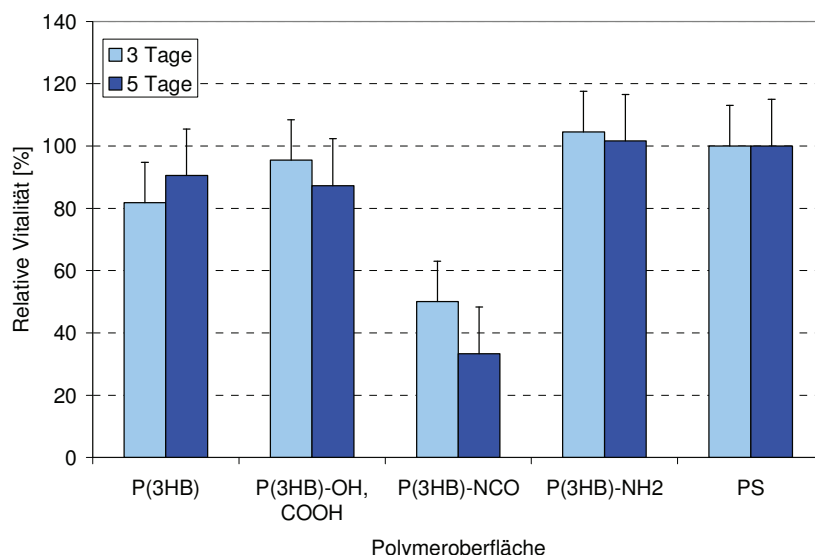


Abb. 32: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von L929-Mausfibroblasten im Direktkontakt mit verschiedenen P(3HB)-Oberflächen (jeweils 28 mm^2) im Vergleich zur Negativkontrolle Polystyrol (PS); P(3HB): unmodifizierte P(3HB), P(3HB)-OH, COOH: Basische Oberflächendegradation, P(3HB)-NCO: Reaktion zur endständigen -NCO, P(3HB)-NH₂: Reaktion zur endständigen -NH₂

Da nach vollständiger lokaler Freisetzung des Antiphlogistikums ASS die mit Aminogruppen beladene P(3HB)-Oberfläche in Interaktion mit den Zellen des Gewebeverbandes treten wird, kann somit von einer ausreichenden Biokompatibilität der oberflächenmodifizierten P(3HB) auch gegenüber der unmodifizierten P(3HB) ausgegangen werden. Die im späteren zeitlichen Verlauf einsetzenden Degradationsprozesse des biodegradierbaren Polymers P(3HB) unter Freisetzung saurer Degradationsprodukte und die sich daraus ergebenden möglichen Inkompatibilitäten des Polymers bleiben bei dieser Biokompatibilitätsprüfung unberücksichtigt.

4.2 Verfahrenstechnische Grundlagen zur Herstellung von Drug-Eluting Stent-Beschichtungen

Die zur Herstellung von DES verwendete Beschichtungstechnologie ist ein wesentlicher Einflussfaktor, da durch die mechanischen Charakteristika, die Oberflächenqualität der Stentbeschichtung und die Restgehalte an Lösungsmitteln, die nach dem Beschichtungsprozess in der Stentschicht verbleiben, die Biokompatibilität des DES-Systems bestimmt wird. Außerdem wird das Freisetzungsverhalten des Wirkstoffes durch die Oberflächen- und Volumengeometrie der Polymer-Wirkstoff-Beschichtung geprägt. Die in dieser Arbeit untersuchten Beschichtungsverfahren basieren auf Polymer-Wirkstoff-Kompositen, die ohne vorherige chemische Oberflächenmodifikation auf die Stentgrundkörper appliziert werden.

4.2.1 Allgemeine Anforderungen an Stentbeschichtungsverfahren

Aufgrund der filigranen Geometrie der handelsüblichen Koronarstents werden an für die Herstellung von DES zu verwendende Beschichtungsverfahren besondere Anforderungen gestellt. Vor allem verursacht durch die engen Stentradien (Abb. 33) kann es zur Ansammlung des Beschichtungskomposits bestehend aus Polymer und Wirkstoff im Bereich der Stentgelenke und -schlaufen kommen. Daraus resultierende Verklebungen der Stentstege können während der Stentdilataion zum Verlust der Schichtintegrität und zur Behinderung der gleichmäßigen Stentaufweitung führen.

Bei der Verwendung von Sprühverfahren zur Stentbeschichtung ist darüber hinaus auf ein äußerst feines und eng verteiltes Tröpfchenspektrum zu achten, das mit den verschiedensten Polymer-Wirkstoff-Kombinationen in Lösung realisierbar ist. Die mittlere Tröpfchengröße des Sprühnebels sollte kleiner als die Stegbreite und -dicke sein, die im Mittel im Bereich von 75.5-82.5 μm variieren, sowie sollte sich unterhalb des minimalen Stegabstandes von 77.5 μm bewegen, um eine Passage der Tröpfchen durch das Stentgitter zur lumenseitigen Beschichtung des Stents zu gewährleisten.

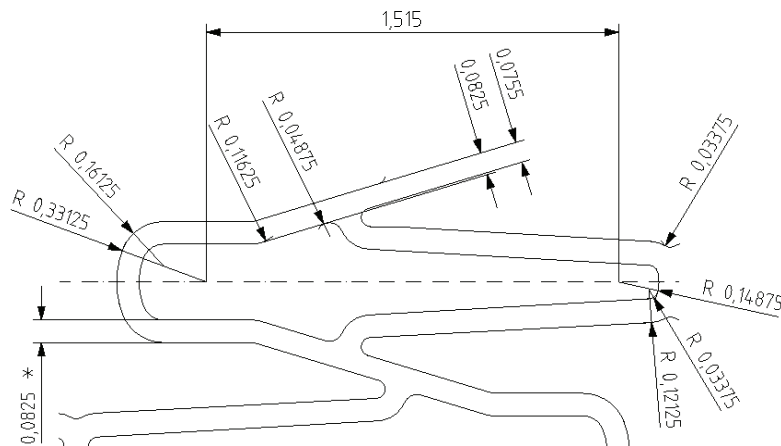


Abb. 33: Detailausschnitt eines Koronarstents der Fa. Biotronik GmbH & Co. KG, Maßangaben in Millimeter (mm) und Grad (°)

Die Beschichtung des Stentlumens wird notwendig, wenn keine chemische Bindung zwischen Beschichtungsmatrix und Oberfläche des Stentgrundkörpers durch chemische Aktivierungsreaktionen angestrebt wird und eine formschlüssige Stentbeschichtung tribologischen Beanspruchungen, beispielsweise beim Passieren des Stents durch Stenosen oder bei der Dilatation des Stents, entgegenwirken soll. Die allgemeinen Anforderungen an eine Stentbeschichtungstechnologie koronarer Stents können wie folgt zusammengefasst werden:

- Erzeugung homogener, qualitativ hochwertiger Stentbeschichtungen mit variablen Schichtdicken, die im Mittel 5 - 10 μm betragen
- Verarbeitbarkeit von Polymer-Wirkstoff-Lösungen mit variablen Wirkstoffkonzentrationen zur Erzeugung von Stentbeschichtungen mit gewünschtem Wirkstofffreisetzungsprofil
- Bei Verwendung eines Sprühprozesses Zerstäubung von Polymer-Wirkstoff-Lösungen mit einer Tröpfchengröße $< 70 \mu\text{m}$
- Realisierung einer formschlüssigen Beschichtung zur Gewährleistung der Schichtintegrität nach Stentprozessierung
- Herstellung von Stentbeschichtungen mit hoher Reproduzierbarkeit hinsichtlich Schichtqualität, -masse, -dicke, -verteilung, -zusammensetzung und hinsichtlich der Wirkstofffreisetzungsrates
- Möglichkeit der Herstellung ausreichend hoher Stückzahlen beschichteter Stents sowohl im Labormaßstab zur Bereitstellung von DES-Prototypen für deren in vitro- und in vivo-Erprobung als auch im industriellen Maßstab zur DES-Produktion.

Die Beschichtung der Stents aus der Schmelze der Beschichtungspolymere scheidet häufig von vornherein aus, da beispielsweise bei den biodegradierbaren Polymeren PLLA und P(3HB) Verarbeitungstemperaturen von mindestens 170-180 °C erforderlich sind, die zur Zersetzung der dem Polymer zugesetzten Wirkstoffe führen können.

4.2.2 Untersuchung eines Tauch- und eines Sprühverfahrens hinsichtlich ihrer Eignung für die Beschichtung von Stents in Abhängigkeit von relevanten Prozessparametern

Für die Herstellung von DES-Beschichtungen im Labormaßstab wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Tauch- und ein Sprühverfahren hinsichtlich ihrer Eignung geprüft.

Als Polymere wurden neben PLLA (Resomer® L214, $M_w = 650000$ g/mol, Boehringer-Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland) P(3HB) ($M_w = 640000$ g/mol, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ, Halle-Leipzig, Deutschland) und P(4HB) ($M_w = 450000$ g/mol, Tepha Inc., Boston, USA) verwendet, die in halogenierten organischen Lösungsmitteln, wie Dichlormethan (CH_2Cl_2) und Trichlormethan (Chloroform, CHCl_3), löslich sind.

Zur Herstellung der PLLA-Beschichtungslösungen wurde zuerst eine PLLA-Stammlösung erzeugt, bei der 1.68 g PLLA unter Rühren mit einem Magnetrührer in 147 g (100 ml) Chloroform eingetragen und im geschlossenen Gefäß ca. 4-5 h gerührt wurden bis eine klare Lösung entstanden war. Zu verwendende Wirkstoffe wurden in wenig Chloroform bzw. in einem Lösungsmittel, das mit Chloroform mischbar ist, wie Methanol oder Ethanol, vorgelöst und anschließend der Polymerlösung unter Rühren zugesetzt.

Als Modellwirkstoff wurde Tetraethylthiuramdisulfid (TETD, Disulfiram) verwendet, das als antiproliferative Substanz hinsichtlich seiner Wirksamkeit für die DES-Applikation in weiteren in vitro Studien untersucht werden sollte. TETD wurde als 0.01 M methanolische Lösung der PLLA-Lösung zugemischt, so dass im resultierenden PLLA/TETD-Komposit ein Masseverhältnis von 70/30 % vorlag.

Für das zu untersuchende Tauchverfahren wurde bevorzugt eine 1.1 %ige (w/w) PLLA-Stammlösung ohne eine weitere Verdünnung verwendet. Für die Validierung des Sprühverfahrens wurde die PLLA-Stammlösung mit Chloroform auf 0.1, 0.13 und 0.16 %ige (w/w) PLLA-Lösungen verdünnt. P(3HB) wurde im Sprühprozess als 0.24 %ige (w/w) Lösung verwendet. P(4HB) wurde durch Zusatz von Chloroform zu einer 0.17 %igen (w/w) Lösung verarbeitet. Die zum Lösen des Wirkstoffes erforderliche Lösungsmittelmenge (Masse in g) wurde von den für die Verdünnung der Stammlösung erforderlichen Gewichtsteilen Chloroform subtrahiert und wurde somit mit in die Verdünnung der Stammlösung einbezogen.

Die für die Beschichtung verwendeten Koronarstents (Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 15 mm, Oberfläche: 71 mm^2) aus medizinischem Edelstahl (316 L) mit einer amorphen Siliziumkarbidbeschichtung ($\alpha\text{-SiC:H}$, [75]) wurden von der Firma Biotronik GmbH & Co. KG bereitgestellt.

Tauchverfahren

Beim manuellen Tauchverfahren wurden die mit Isopropanol und Aceton im Ultraschallbad gereinigten, im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C getrockneten und mit Hilfe einer Analysenwaage (Typ: Kern 770, Ablesbarkeit $\pm 10 \mu\text{g}$) gewogenen Stents in die in einem Lösungsreservoir befindliche Polymer-Wirkstoff-Lösung für 2 s vollständig eingetaucht. Nach mehrmaliger Wiederholung des Tauchens sowie des Trocknens der Stents für 15 min an der Luft wurden die beschichteten Stents einer erneuten Wägung unterzogen. Die Endbestimmung der Schichtmassen erfolgte nach Lagerung der beschichteten Stents für 5 Tage im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C und wurde durch Differenzwägung ermittelt.

Bei Verwendung des Tauchverfahrens wurde festgestellt, dass der Massezuwachs an Beschichtungsmaterial, der sich durch Tauchen erreichen lässt, zu gering ist. Versuche, die Schichtmasse durch eine Erhöhung der Anzahl der Tauchvorgänge mit dazwischen geschalteten Trocknungsperioden zu steigern, hatten wenig Erfolg (Tab. 10). Es ist davon auszugehen, dass bei erneutem Tauchen die bereits vorhandene Schicht wieder angelöst und dadurch ein Massezuwachs teilweise verhindert wird. Folgende Schichtmassen wurden nach mehrmaligem Tauchen mit einer PLLA/TETD-Lösung auf jeweils 6 (a-SiC:H)-beschichteten Edelstahlstents erreicht:

Tab. 10: Schichtmassezuwachs nach Beschichtung von Koronarstents (jeweils $n=6$) mit einer chloroformhaltigen PLLA/TETD-Lösung (PLLA: 1.1 % w/w, TETD: 0.47 % w/w, PLLA/TETD 70/30 % w/w) im Tauchverfahren in Abhängigkeit von der Anzahl der Tauchgänge

Anzahl der Tauchgänge	Mittlere Schichtmasse [μg]
4	75 ± 15
8	130 ± 40
12	140 ± 45
16	145 ± 45

Eine weitere Steigerung der Anzahl der Tauchvorgänge auf 12 und 16 bewirkte kaum eine Erhöhung der Schichtmasse. Zudem verschlechterte sich die Oberflächenqualität (Kraterbildung) und es kam zu einem rapiden Anstieg der unerwünschten Verschlüsse der Stegzwischenräume (Abb. 34). Außerdem zeigte sich, dass das Tauchverfahren auf Stents mit einer maximalen Stentlänge von 15 mm begrenzt ist, da bei längeren Stentprototypen kein vollständiges Entfernen der Beschichtungslösung aus dem Stentlumen gewährleistet werden

konnte. Da die zum Lösen des TETD notwendige Menge des Lösungsmittels Methanol mit in die Verdünnung der PLLA-Stammlösung einbezogen wurde, resultierte aus dem Zusatz des niedermolekularen Wirkstoffes TETD keine Veränderung der Lösungsviskosität gegenüber der reinen PLLA-Lösung. Deshalb wurde bei der Einstellung des Prozessparameters „Lösungskonzentration“ auch nur die PLLA-Konzentration variiert. Eine Veränderung der PLLA-Konzentration in der Tauchlösung führte zu keiner Verbesserung des Beschichtungsergebnisses, da eine Erniedrigung der PLLA-Konzentration einen zu geringen Schichtaufbau bewirkte und eine Erhöhung der PLLA-Konzentration und somit der Lösungsviskosität die Ausbildung einer höheren Anzahl von Fehlstellen im Bereich der Stentgelenke und -schlaufen verursachte.

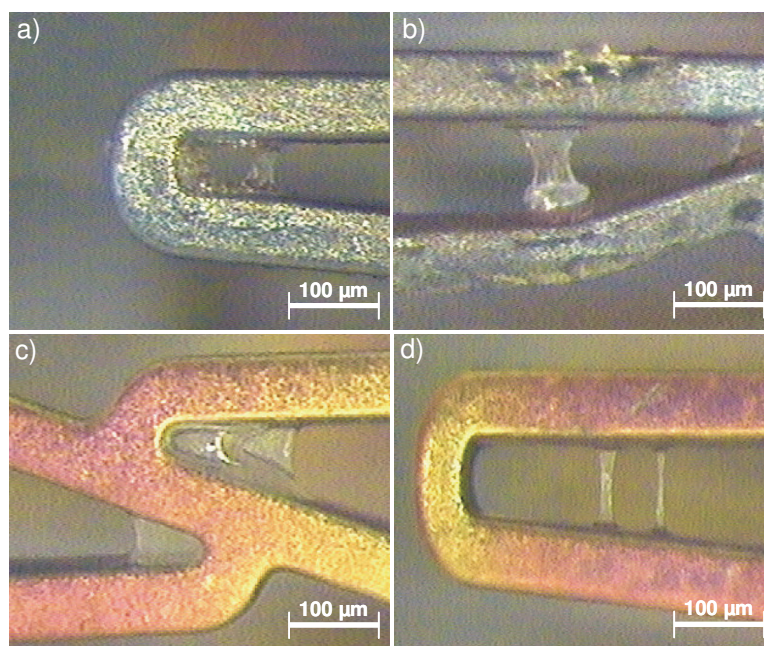


Abb. 34: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Beschichtungsfehlstellen, die im Tauchprozess mit einer chloroformhaltigen PLLA/TETD-Lösung (PLLA: 1.1 % w/w, TETD: 0.47 % w/w, PLLA/TETD 70/30 % w/w) mit Zunahme der Anzahl der Tauchgänge entstehen; Fehler-typen: a) Hautbildung in Stentschleufe, b) Hautbildung zwischen zwei Stentstegen, c) Hautbildung im Bereich des Stentgelenks, d) Fadenbildung

Eine längere Verweilzeit des Stents >2 s in der Beschichtungslösung hatte ebenfalls unerwünschte Resultate zur Folge, da die bereits auf dem Stent aufgetragene PLLA/TETD-Schicht zu stark angelöst wurde und erhebliche Polymeransammlungen im Bereich der Gelenke und Schlaufen resultierten. Somit war im manuellen Tauchprozess das Beschichtungsergebnis nur durch wenige Prozessparameter einstellbar. In der Tabelle 11 sind diese beim Tauchverfahren relevanten Prozessparameter und optimale Parametergrößen für die Beschichtung von Stents mit PLLA als Polymermatrix zusammengefasst:

Tab. 11: Überblick über die beim Tauchverfahren wesentlichen Prozessparameter und die optimalen Parametergrößen für eine Stentbeschichtung, die als polymeren Träger PLLA, gelöst in Chloroform, enthält

Parameter	Parametergrößen
Stentlänge	≤ 15 mm
Lösungskonzentration	1.1 % (w/w), d. h. 16.8 g/l
Verweilzeit des Stents in der Tauchlösung	≤ 2 s
Anzahl der Tauchvorgänge mit dazwischen geschalteten Trocknungsperioden	8

Sprühverfahren

Für die Beschichtung der Stents im Sprühverfahren wurde eine elektro-pneumatische Beschichtungsanlage verwendet, mit der in einem automatisierten Arbeitsgang Stenttypen verschiedenster Dimensionen mit Stentlängen ≤ 30 mm mit Polymer-Wirkstoff-Lösungen beschichtet werden können. Der Aufbau und das Funktionsprinzip der elektro-pneumatischen Beschichtungsanlage sind in der Abbildung 35 dargestellt.

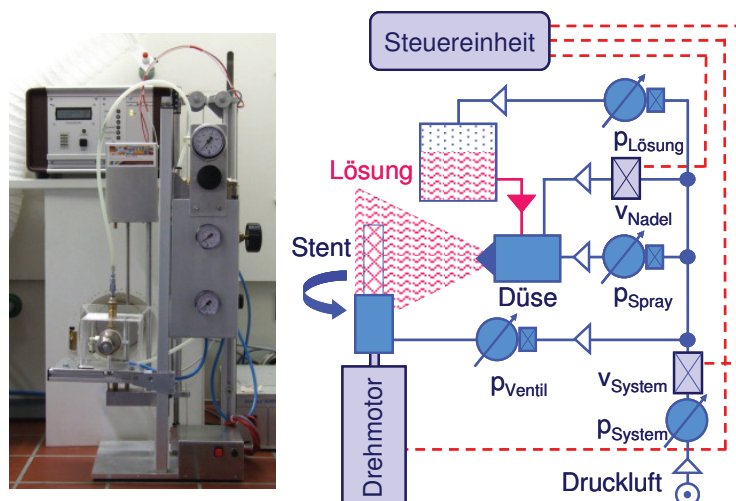


Abb. 35: Elektro-pneumatische Beschichtungsanlage (links) und deren Blockschema (rechts)

Das Funktionsprinzip dieses Sprühverfahrens beruht darauf, dass beim Vorbeiführen des Luftstroms an der Öffnung für die Lösungszufuhr ein Unterdruck über der Öffnung entsteht, welcher zur Förderung der Lösung aus dem Vorratsbehälter führt. Gelangt die Polymerlösung in den Luftstrom, wird der Lösungsstrom aufgrund der Geschwindigkeitsdifferenz

zwischen Luftstrom und Lösungsstrom in viele kleine Tröpfchen zerstäubt. Diese Tröpfchen werden vom Luftstrom auf die zu beschichtende Oberfläche geschleudert. Die Größe der erzeugten Tröpfchen sowie auch deren Verteilung sind für den Beschichtungsvorgang von Bedeutung. Tröpfchen geringer Größe sind notwendig, um Polymeransammlungen in den Steggelenken des Stents und Verklebungen der Stentstege untereinander zu verhindern sowie ein Passieren der Tröpfchen durch das Stentgitter auf die Stentinnenseite zu erlauben.

Die Vorgehensweise bei der Sprühbeschichtung von Stents untergliedert sich in folgende Teilschritte: 1) Einfüllen der Polymerlösung in das Lösungsreservoir, 2) Stentmontage in für deren Halterung vorgesehene Hülsen, 3) Einstellung der Prozessparameter und 4) Beschichtung des Stents. Daran schlossen sich die 15-minütige Trocknung der Stents bei Raumtemperatur und die mikroskopische Sichtkontrolle an. Nach der Lagerung der beschichteten Stents über 2 Tage im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C erfolgte wiederum die Wägung zur gravimetrischen Bestimmung der Schichtmasse. Der prinzipielle Ablauf des Fertigungsprozesses ist in der Abbildung 36 als Flusschema dargestellt.

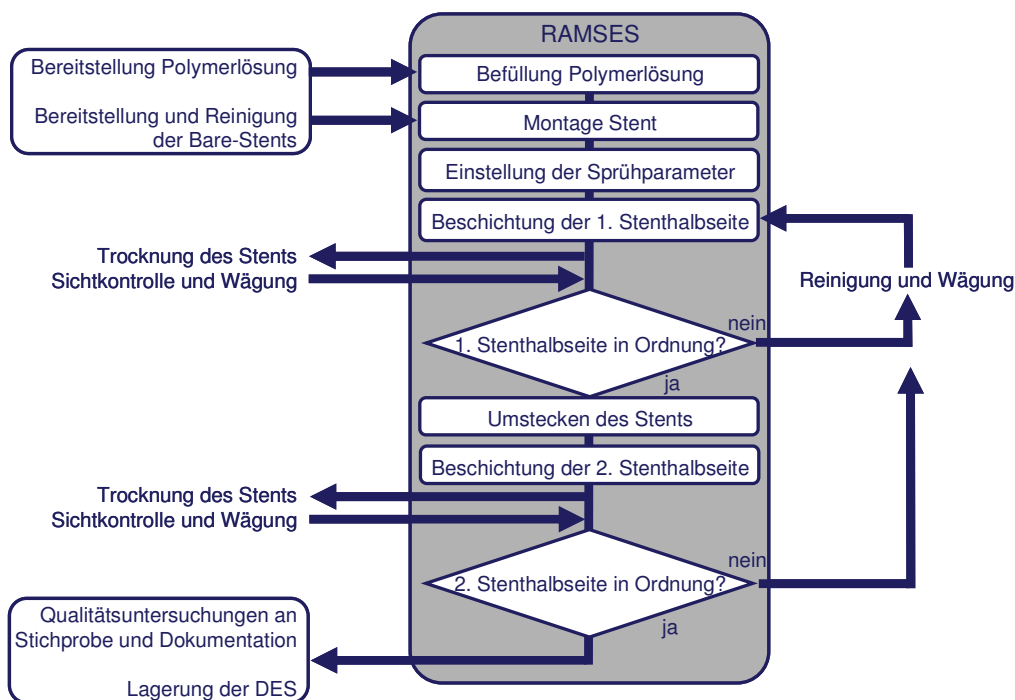


Abb. 36: Schematische Darstellung des Ablaufplanes des DES-Sprühbeschichtungsprozesses mit der RAMSES (*R*ostock *A*dvanced *M*anufacturing of *S*praycoated drug-*E*luting *S*tents)-Anlage

Das Sprühverfahren bietet gegenüber dem Tauchverfahren den Vorteil, dass unter Berücksichtigung des Stentdesigns, insbesondere der Stentlänge, der Stentoberfläche und der räumlichen Anordnung der Stentstege die Prozessparameter dieser Beschichtungstechnologie in einem großen Bereich variierbar sind. Dadurch gelingt es unter Erhalt einer hohen

Oberflächengüte, die für ein Wirkstoffdepot von 1-5 μg Wirkstoff/ mm^2 notwendigen Schichtmassen mit hoher Reproduzierbarkeit auf der Stentoberfläche zu installieren. Dafür wurden jeweils 6 Stents mit $240 \pm 24 \mu\text{g}$ (annähernd $1 \mu\text{g}$ TETD/ mm^2), $480 \pm 48 \mu\text{g}$ (annähernd $2 \mu\text{g}$ TETD/ mm^2), $720 \pm 50 \mu\text{g}$ (annähernd $3 \mu\text{g}$ TETD/ mm^2), $960 \pm 67 \mu\text{g}$ (annähernd $4 \mu\text{g}$ TETD/ mm^2) und $1200 \pm 84 \mu\text{g}$ (annähernd $5 \mu\text{g}$ TETD/ mm^2) PLLA/TETD-Lösung (PLLA/TETD 70/30 % w/w) beschichtet.

Die mit dem Sprühverfahren erreichten Schichtmassen wurden der mittleren Schichtmasse nach 8 Tauchgängen im Tauchverfahren gegenübergestellt und verdeutlichen, dass ein ausreichend großes Wirkstoffdepot auf den filigranen Koronarstentstrukturen nur im Sprühverfahren zu erzielen ist (Tab. 12). Aus der mittleren Schichtmasse \bar{m}_{Schicht} wurde über die Berechnung des mittleren Schichtvolumens \bar{V}_{Schicht} die mittlere Schichtdicke \bar{d}_{Schicht} entsprechend Gl. 4.2 kalkuliert:

$$\bar{d}_{\text{Schicht}} = \frac{\bar{V}_{\text{Schicht}}}{A_{\text{Stent}}}, \quad \text{mit } \bar{V}_{\text{Schicht}} = \frac{\bar{m}_{\text{Schicht}}}{\rho_{\text{Polymer}}} \quad (4.2)$$

- \bar{d}_{Schicht} - mittlere Schichtdicke [mm]
 \bar{V}_{Schicht} - mittleres Schichtvolumen [mm^3]
 A_{Stent} - Stentoberfläche [mm^2], $A_{\text{Stent}} = 71 \text{ mm}^2$
 \bar{m}_{Schicht} - mittlere Schichtmasse [μg]
 ρ_{Polymer} - Dichte des Polymers [$\mu\text{g mm}^{-3}$], $\rho_{\text{PLLA}} = 1200 \frac{\mu\text{g}}{\text{mm}^3}$

Tab. 12: Übersicht über wesentliche Schichtkenngrößen, die aus den im Tauch- bzw. Sprühprozess aufgetragenen mittleren Schichtmassen nach Beschichtung von Koronarstents (jeweils $n=6$, Länge: 15 mm, Masse: ca. 15 mg, Oberfläche: 71 mm^2) mit chloroformhaltiger PLLA/TETD-Lösung (70/30 % w/w) resultieren

	Tauchverfahren	Sprühverfahren
Masse der Beschichtung [μg]	130	240 – 1200
Volumen der Beschichtung [mm^3]	0.11	0.2 – 1
Dicke der Beschichtung [μm]	1.5	2.8 – 14
Masse der Schicht pro Fläche [$\mu\text{g}/\text{mm}^2$]	1.8	3.3 – 17
Wirkstoffbeladung pro Fläche bei PLLA/TETD-Komposit 70/30 % (w/w) [$\mu\text{g}/\text{mm}^2$]	0.5	1 – 5

Die gewünschten unterschiedlichen Schichtmassen wurden über eine gezielte Einstellung der Prozessparameter Sprühabstand und Sprühdruk unter Variation der Sprühzeit erreicht. Grundlage dafür war eine Sprühprozessvalidierung, bei der die resultierende Schichtmasse in Abhängigkeit von den genannten Einflussgrößen untersucht wurde. Die ermittelten mittleren *Schichtmassen in Abhängigkeit vom Sprühabstand* sind in der Abbildung 37 für die reine chloroformhaltige 0.1 %ige (w/w) PLLA-Lösung aufgetragen.

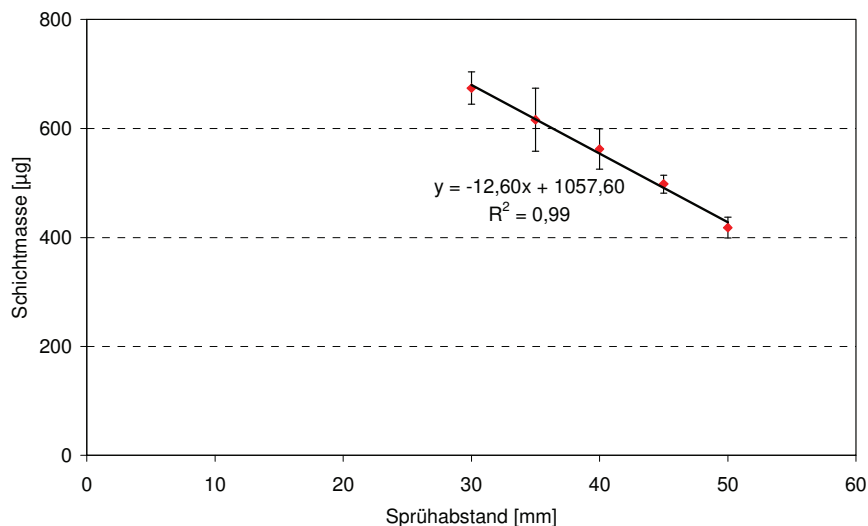


Abb. 37: Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer chloroformhaltigen 0.1 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit vom Sprühabstand und Gleichung der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühdruk 2 bar, Lösungsdruck 0.05 bar, Sprühdauer 60 s; n=5 Stents [226]

Eine Vergrößerung des Sprühabstandes auf > 30 mm führte zu einer Verringerung der Schichtmasse bei konstanter Sprühdauer von 60 s. Dabei war bei den untersuchten Sprühabständen im Bereich von 30-50 mm eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen der Schichtmasse und dem Sprühabstand zu verzeichnen. In Voruntersuchungen wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass eine Verringerung des Sprühabstandes auf < 30 mm eine Verschlechterung der Beschichtungsqualität zur Folge hat, da eine zunehmende Polymeransammlung in den Stentschlaufen zu beobachten war. Deshalb wurde bei der weiteren Prozessvalidierung als Optimum ein konstanter Sprühabstand von 30 mm eingestellt.

Da die Beschichtungslösung unter Druck durch die Zweistoffdüse gepresst und so zerstäubt wird, ist außerdem von Interesse, ob durch die Erhöhung bzw. Erniedrigung des Sprühdrukkes der Ausstoß der Beschichtungslösung reguliert und somit die Schichtmasse auf der Stentoberfläche gezielt eingestellt werden kann. In der Abbildung 38 sind die ermittelten mittleren *Schichtmassen in Abhängigkeit vom Sprühdruk*, der zwischen 1 und 3 bar variiert wurde, dargestellt. Es wurde festgestellt, dass mit den untersuchten Sprühdrukken hohe Schichtmassen auf die Stents aufgetragen werden können. Da eine hohe Reproduzierbarkeit

der zu erzielenden Schichtmasse im Beschichtungsprozess mit geringer Standardabweichung (in %) angestrebt wird, sollte der optimale Sprühdruk jedoch im Bereich von 2-2.5 bar liegen.

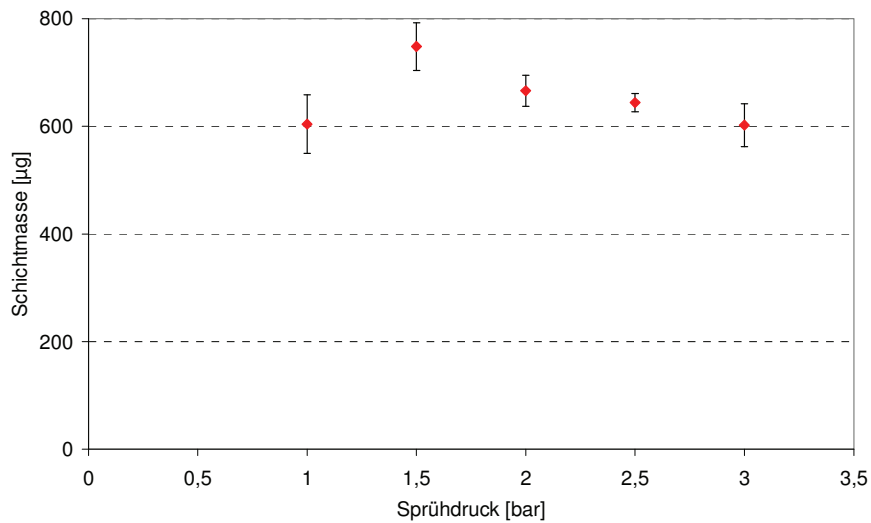


Abb. 38: Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer chloroformhaltigen 0.1 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit vom Sprühdruk bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühabstand 30 cm, Lösungsdruck 0.05 bar, Sprühdauer 60 s; n=5 Stents [226]

Um für DES relevante Wirkstoffbeladungen (s. Tab. 12) auf der Stentoberfläche installieren zu können, sind unter Annahme der in Abbildung 39 dargestellten linearen *Abhängigkeit zwischen der Sprühzeit und der Schichtmasse* für Schichtmassen von 240-1200 µg bei einem Sprühabstand von 30 cm und einem Sprühdruk von 2 bar Sprühzeiten von 35-170 s erforderlich.

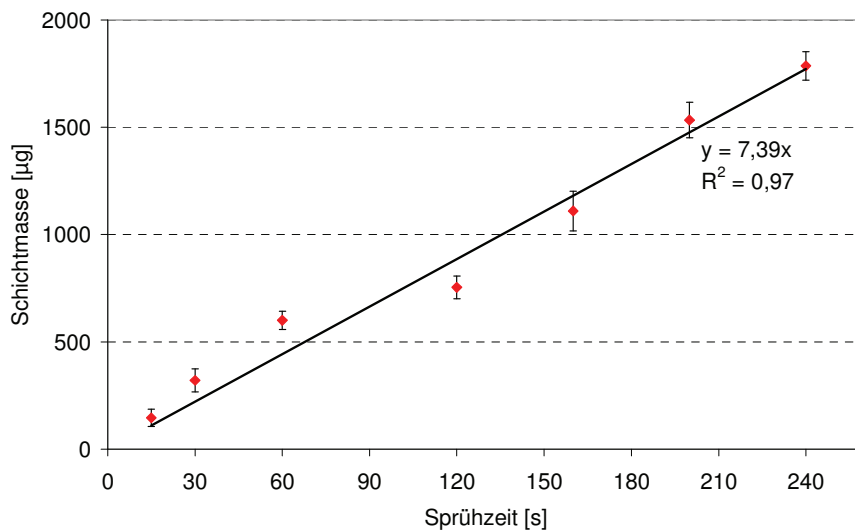


Abb. 39: Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer chloroformhaltigen 0.1 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit von der Sprühzeit und Gleichung der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühabstand 30 cm, Sprühdruk 2 bar, Lösungsdruck 0.05 bar; n=5 Stents [226]

Die Untersuchung des Beschichtungsergebnisses hinsichtlich der Schichtqualität in Abhängigkeit von der Lösungskonzentration zeigte, dass eine Erhöhung der PLLA-Konzentration auf 0.13 und 0.16 % (w/w) und somit der Lösungsviskosität zu einer Zunahme der Fehlstellen in Form von Hautbildungen in den Stentschlaufen und -gelenken führte. Die Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die für die PLLA-Beschichtung von Stents relevanten Prozessparameter und ihre nach Prozessvalidierung ermittelten optimalen Bereiche.

Tab. 13: Überblick über die beim Sprühverfahren wesentlichen Prozessparameter und die optimalen Parametergrößen für eine Stentbeschichtung, die als polymeren Träger PLLA enthält; Umgebungsbedingungen: Temperatur 23 °C, Luftfeuchtigkeit 48 %

Parameter	Parametergrößen
Stentlänge	≤ 30 mm
Zweistoffdüse, äußere Mischung	45 °, d = 0.02 "
Sprühabstand	30 mm
Sprühdruck	2 – 2.5 bar
Lösungsdruck	0.05 bar
Lösungskonzentration	0.1 % (w/w), d. h. 1.47 g/l
Sprühlösungsvolumenstrom	2.5 – 3 ml/min (< 0.2 l/h)
Luftvolumenstrom	10 – 30 l/min (< 2 m ³ /h)
Stentrotation	100 – 130 1/min
Sprühzeit	25 – 170 s

Darüber hinaus wurde im Rahmen der Parameterstudie Dichlormethan als alternatives Lösungsmittel für PLLA getestet. Vorteil des Dichlormethans gegenüber Chloroform ist der höhere Dampfdruck von 453 hPa gegenüber 211 hPa (20 °C) [226], der zur Beschleunigung des Trocknungsprozesses der DES führen sollte. Deshalb wurden auch für dichlormethanhaltige PLLA-Lösungen umfangreiche Parameterstudien durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass mit einer 0.16 % (w/w) dichlormethanhaltigen PLLA-Lösung unter Erhöhung des Sprühabstandes auf 35 cm und des Sprühdruckes auf 2.5 bar exzellente Schichtqualitäten erzielt werden können, die mit denen aus chloroformhaltigen PLLA-Lösungen erhaltenen Qualitäten vergleichbar sind. In der Abbildung 40 sind die ermittelten *Schichtmassen in Abhängigkeit von der Sprühzeit* dargestellt.

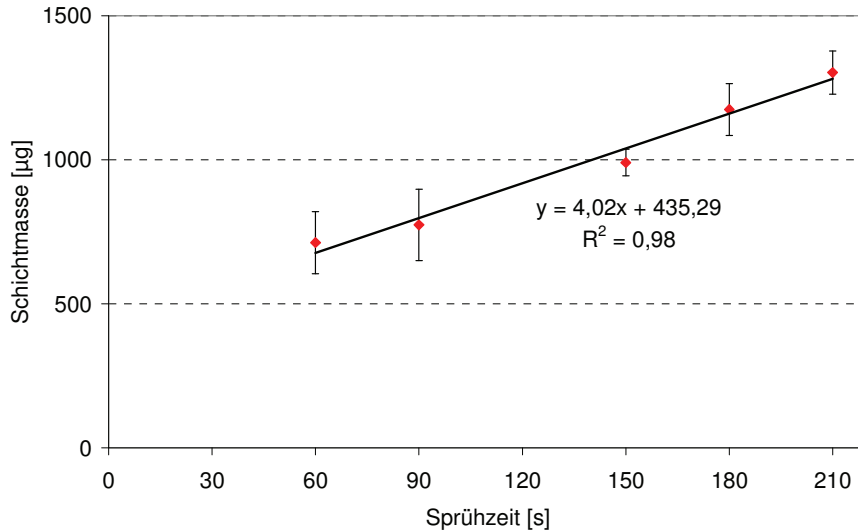


Abb. 40: Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer dichlormethanhaltigen 0.16 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit von der Sprühzeit und Gleichung der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühabstand 35 cm, Sprühdruk 2.5 bar, Lösungsdruck 0.05 bar; n=5 Stents [226]

Bei den untersuchten Sprühzeiten im Bereich von 60-210 s war eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen der Schichtmasse und der Sprühzeit zu verzeichnen, wobei jedoch nach ca. 210 s etwa 20 % weniger Schichtmasse aufgetragen werden konnten als bei der Verarbeitung der chloroformhaltigen PLLA-Lösung. Unter Annahme der in Abbildung 40 dargestellten Linearität im Bereich von 60-210 s verdeutlicht die hohe Verschiebungskonstante von +435.29, dass zu Beginn des Beschichtungsprozesses bei Sprühzeiten <60 s mit dichlormethanhaltigen PLLA-Lösungen keine lineare Abhängigkeit zwischen der Sprühzeit und der Schichtmasse zu erwarten ist.

4.2.3 Trocknungsverfahren für Drug-Eluting Stents und Untersuchung des Lösungsmittelrestgehaltes

Eine wesentliche Fragestellung bezüglich der Biokompatibilität des DES ist der durch den Herstellungsprozess bedingte Lösungsmittelrestgehalt in der Beschichtungsmatrix. Für die Risikoabschätzung von Lösungsmittelrestgehalten bei der DES-Fertigung unter Verwendung halogenierter Lösungsmittel, wie Trichlormethan (Chloroform, CHCl_3) und Dichlormethan (CH_2Cl_2), gibt derzeit nur die Sicherheitsrichtlinie der *International Conference on Harmonization (ICH) „Impurities: Guideline For Residual Solvents“* [227] für Arzneimittelformen eine Orientierung. Diese sieht, basierend auf der "permitted daily exposure" (PDE), Konzentrationslimits für Lösungsmittel vor, mit denen der Mensch bei einer täglichen Dosis von <10 g

der gesamten Arzneimittelform, d. h. einschließlich des Arzneistoffträgers und der Hilfsstoffe, in Kontakt kommen darf. Die nach dieser Richtlinie maximal zulässigen Konzentrationen von CHCl_3 und CH_2Cl_2 in Arzneimittelformen sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14: Entsprechend der ICH-Richtlinie vorgegebene Konzentrationslimits [$\mu\text{g/g}$] für den Gehalt an Chloroform (CHCl_3) und Dichlormethan (CH_2Cl_2) in Arzneimittelformen [227]

Lösungsmittel	PDE [mg/Tag]	Konzentrationslimit [$\mu\text{g/g}$]
CHCl_3	0.6	60
CH_2Cl_2	6.0	600

Da der Grenzwert für den Gehalt an CH_2Cl_2 um das Zehnfache höher liegt als der des CHCl_3 , war es sinnvoll, CH_2Cl_2 als alternatives Lösungsmittel für die Herstellung der Stentbeschichtungen auf der Basis von PLLA zu testen. Auf den Vorteil des schnelleren Abdampfens von CH_2Cl_2 gegenüber CHCl_3 wurde bereits hingewiesen (s. Kap. 4.2.2). Die Trocknungszeiten der Stentbeschichtungen könnten somit verkürzt werden unter Verwendung von Trocknungstemperaturen, die unterhalb des Bereichs der Glasübergangstemperatur T_g von 50-60 °C [11] für PLLA liegen. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Trocknungstemperaturen untersucht, die innerhalb einer im industriellen Fertigungsprozess realisierbaren Trocknungszeit von 2 Tagen zur Lösungsmittelfreiheit führen sollten, da neben der biologischen Inkompatibilität des DES-Systems mit einem in der Stentbeschichtung vorhandenen Lösungsmittelrestgehalt auch weitere Nachteile, wie die Nachkristallisation der Beschichtungskomponenten und somit die Veränderung der Wirkstofffreisetzungprofile im zeitlichen Verlauf der DES-Lagerung sowie die äußere Weichmachung der Polymermatrix durch das Lösungsmittel, verbunden sind.

Zur Quantifizierung der Lösungsmittelgehalte in PLLA-Stentbeschichtungen, die mit dem Immunsuppressivum/Antiphlogistikum Pimecrolimus beladen sind, wurden die Stentbeschichtungen vollständig in N,N-Dimethylformamid gelöst und das zu untersuchende Lösungsmittel CHCl_3 bzw. CH_2Cl_2 mit n-Hexan extrahiert. Die extrahierten Lösungsmittelgehalte wurden mittels GC-MS (Dr. Weßling Laboratorien GmbH, Berlin, Deutschland, Säule: DB-VRX, Innendurchmesser 0.25 mm, Länge 30-60 m, Schichtdicke 1 μm ; Trägergas Helium) bestimmt und sind in der Tabelle 15 als in μg ermittelte Absolutwerte pro Stentprobe sowie als Absolutwerte in μg bezogen auf 1 g Schichtmasse dargestellt.

Tab. 15: Gehalte an Chloroform (CHCl₃) und Dichlormethan (CH₂Cl₂) in PLLA/Pimecrolimus (55/45 % w/w)-Stentbeschichtungen nach Stentauslagerung unter verschiedenen Bedingungen (mit n = 2 Stents pro Auslagerungsbedingung)

Auslagerungsbedingung	Schichtmasse [µg]	Lösungsmittelgehalt [µg/Stent]	Lösungsmittelgehalt [µg/g Beschichtung]
CHCl₃			
RT/2 d	790	48.3	61139
RT/2 d	740	56.4	76216
RT/Vakuum/2 d	1120	66.7	59553
RT/Vakuum/2 d	1000	62.5	62500
40 °C/Vakuum/2 d	780	28	35897
40 °C/Vakuum/2 d	740	28.9	39054
80 °C/Vakuum/1 d [228]	1883	2.7	1434
80 °C/Vakuum/1 d [228]	1891	4.9	2591
80 °C/Vakuum/2 d [228]	1850	0	0
80 °C/Vakuum/2 d [228]	1925	0	0
CH₂Cl₂			
RT/Vakuum/1 d	1060	7.6	7170
RT/Vakuum/1 d	1140	8.6	7544
RT/Vakuum/2 d	1020	5.7	5612
RT/Vakuum/2 d	980	5.5	5612
40 °C /Vakuum/1 d	1090	4	3670
40 °C /Vakuum/1 d	1100	4.3	3909
40 °C /Vakuum/2 d	980	1.8	1837
40 °C /Vakuum/2 d	980	2	2041

Die Untersuchungen zur Bestimmung des Lösungsmittelgehaltes in den Stentbeschichtungen nach Trocknung der DES unter verschiedenen Auslagerungsbedingungen zeigten, dass es mit CHCl₃ nur bei einer Temperatur von 80 °C im Vakuum (6-8 mbar) gelingt, eine Lösungsmittelfreiheit der Stentbeschichtungen nach 2 Tagen zu erreichen. Die Verwendung des flüchtigeren CH₂Cl₂ führte nicht zum gewünschten Ergebnis, da nach 2 Tagen Trocknung bei 40 °C im Vakuum (6-8 mbar) nach der ICH-Richtlinie unzulässige CH₂Cl₂-Gehalte von > 600 µg/g nachweisbar waren.

Das Überschreiten der Trocknungstemperatur über die Glasübergangstemperatur T_g von PLLA bedeutet nicht nur eine Erhöhung der Kettenbeweglichkeit, d. h. der thermischen Bewegung von Kettensegmenten und Seitenketten (Mikrobrownsche Bewegung), sondern kann auch eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften, wie der Zugfestigkeit und des Elastizitätsmoduls, zur Folge haben.

Für das für die Stentbeschichtung verwendete teilkristalline PLLA mit einem Kristallisationsgrad q = 49 % [83] ist dies jedoch auszuschließen, da im Bereich T_g kein Einbruch des Speichermoduls E' als Referenzmaß für die mechanischen Eigenschaften in Abhängigkeit

von der Temperatur für PLA-Typen mit ähnlichem Kristallisationsgrad nachgewiesen wurde [229].

Im Zusammenhang mit einer Temperaturprozessführung oberhalb der Glasübergangstemperatur T_g ist zusätzlich der Einfluss der unterschiedlichen Längenausdehnungskoeffizienten α des metallischen Stentgrundkörpers (Edelstahl, CoCrMo-Legierung: $\alpha = 12 - 20 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, [230, 231]) und der PLLA-Beschichtungsmatrix ($\alpha = 80 - 250 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, [230, 231]) von Bedeutung, die Delaminationen der Stentbeschichtung begünstigen könnten.

Delaminationen der Beschichtung infolge Stenttrocknung bei 80 °C über 2 Tage wurden nach mikroskopischer Begutachtung der Oberflächenmorphologie der aufgeweiteten Stents nicht beobachtet (s. Kap. 4.3.1). Demzufolge ist eine Prozessführung bei 80 °C möglich, sofern der inkorporierte Wirkstoff bei dieser Temperatur stabil ist.

4.3 Mikroskopische Verfahren zur Beurteilung der Oberflächen- und Volumenmorphologie des Polymer-Wirkstoff-Komposits und Schichtverbundes

Für eine umfassende Charakterisierung von Werkstoffzuständen ist sowohl die Untersuchung der Oberflächen- als auch der Volumenmorphologie erforderlich. Ausgehend von der Metallografie, über Plasto- und Keramografie, wurde die übergreifende und allgemein akzeptierte Bezeichnung der Materialografie geprägt.

Die Gebrauchseigenschaften von Polymeren sind wesentlich durch ihre räumliche Makromolekülanordnung determiniert. Diese wird wiederum von der chemischen Struktur und der physikalischen Überstruktur der Polymere beeinflusst. In diesem Zusammenhang wird auch der Begriff der Struktur-Eigenschafts-Korrelation verwendet. Kenntnisse hinsichtlich der Größe und Verteilung von Phasen sowie deren Verträglichkeit sind unabdingbar, um Zusammenhänge zwischen der Funktionalität und den Verarbeitungsbedingungen darstellen und interpretieren zu können.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Oberflächen- und Volumenmorphologie der Polymer-Wirkstoff-Komposite wurden verschiedene mikroskopische Methoden herangezogen, die in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 vorgestellt werden. Auf die Volumenmorphologie des Schichtverbundes zwischen Stentgrundkörper und Beschichtung wird im Kapitel 4.3.3 näher eingegangen.

4.3.1 Oberflächenmorphologie des Polymer-Wirkstoff-Komposits

Lichtmikroskopie

Die Qualität und strukturelle Integrität der Polymerbeschichtung wurde mit der Lichtmikroskopie beurteilt. Dazu wurde das Auflichtmikroskop Axioskop (Fa. Carl Zeiss) verwendet. Digitalisiert und dokumentiert wurde mittels einer Videokamera (CF 15/4, Kappa, Framegrabber FG 32, Fa. Hasotek).

Die Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Polymer-Wirkstoff-Komposite, exemplarisch an einem PLLA/TETD-Komposit (PLLA/TETD 70/30 % w/w) gezeigt, die aus zwei unterschiedlichen Inkorporationsverfahren resultieren, sind in den lichtmikroskopischen Aufnahmen in der Abbildung 41 dargestellt. Die Aufnahme der Abb. 41a zeigt die Oberflächenmorphologie des PLLA/TETD-Komposits, wenn das im Lösungsmittel des PLLA unlösliche TETD ohne vorheriges Lösen als Feststoff mit unterschiedlicher Kristallgröße der PLLA-Lösung zugesetzt wird und ein Komposit mit inhomogener TETD-Verteilung resultiert.

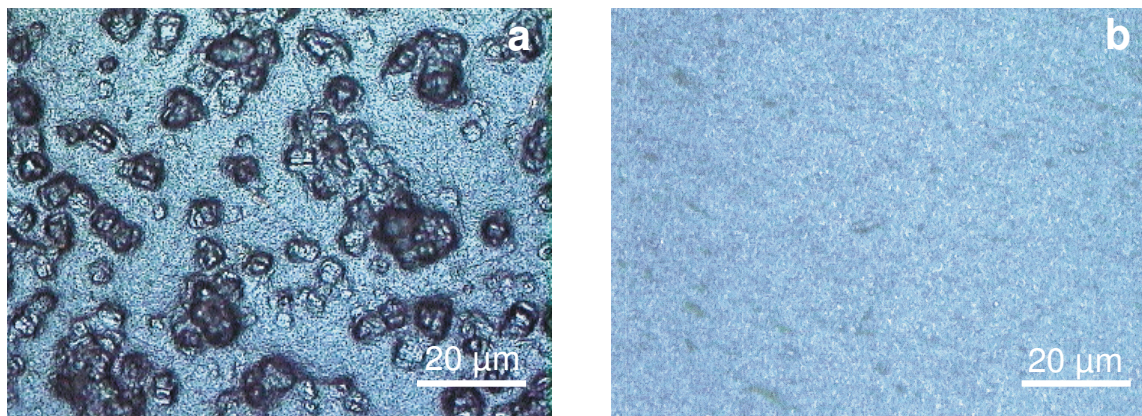


Abb. 41: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Auflicht) der Oberfläche zweier PLLA/TETD (70/30 % w/w)-Folien; Herstellung des Polymer-Wirkstoff-Komposits aus der Lösung ohne (a) und mit (b) Lösungsvermittlung

Eine homogene TETD-Verteilung in der PLLA-Matrix unter Ausbildung von TETD-Kristallen mit geringer Kristallgröße wird dagegen erreicht, wenn das mit Chloroform mischbare Methanol zum Lösen des TETD Verwendung findet und das in Methanol vorgelöste TETD der PLLA-Chloroform-Lösung unter Lösungsvermittlung zugesetzt wird (Abb. 41b, Kap. 4.2.2). Da nur eine homogene Wirkstoffverteilung in der polymeren Stentbeschichtungsmatrix zu reproduzierbaren Ergebnissen hinsichtlich der Schichtmorphologie, der Freisetzungskinetik des Wirkstoffes und des Degradationsverhaltens der biodegradierbaren Polymermatrix führen kann, wurden alle für die DES-Indikation zu untersuchenden Wirkstoffe der Polymermatrix unter Lösungsvermittlung zugesetzt, sofern sie nicht im Lösungsmittel des Polymers löslich waren.

Die Oberflächenmorphologie der Stentbeschichtungen wurde sowohl während des Beschichtungsprozesses stichprobenartig als auch nach der Fertigstellung der beschichteten Stents in lichtmikroskopischen Untersuchungen dokumentiert. Die im Sprühprozess hergestellten Stentbeschichtungen (Kap. 4.2.2) auf der Basis der untersuchten biodegradierbaren Polymere PLLA, P(3HB) und P(4HB) wiesen über die gesamte Stentlänge eine sehr hohe Oberflächenqualität ohne das Vorhandensein von Fehlstellen im Bereich der Stentgelenke und -schlaufen auf, die in den lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 42) anhand eines mit P(3HB) beschichteten Metallstents aus einer CoCr-Legierung am Stentende (Abb. 42 a) und in der Stentmitte (Abb. 42 b) veranschaulicht ist.

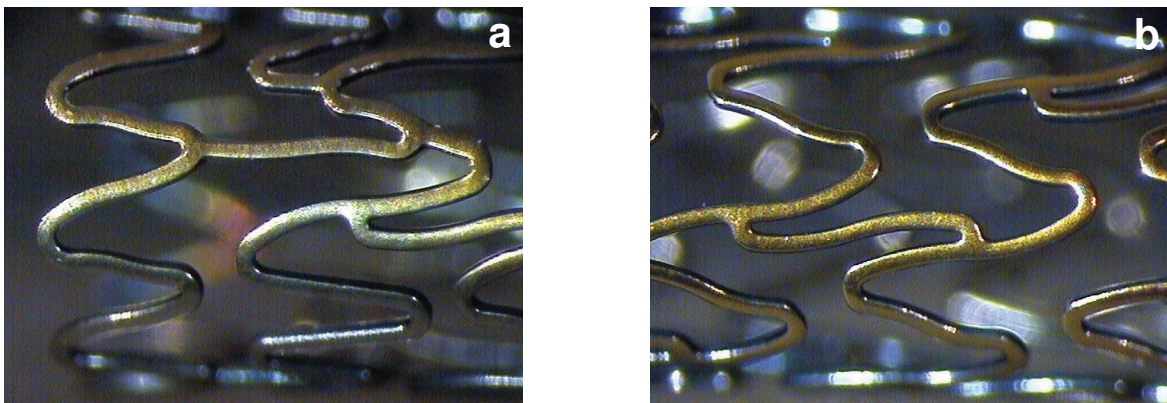


Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Auflicht, Strutbreite 90 μm) einer P(3HB)-Beschichtung auf einem undilatierten Metallstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm), Schichtmasse ca. 900 μg

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Stentoberflächen dienten darüber hinaus zur Vorselektion der Untersuchungsareale für die Rasterelektronenmikroskopie.

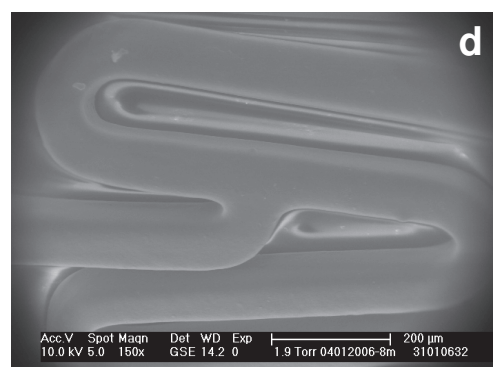
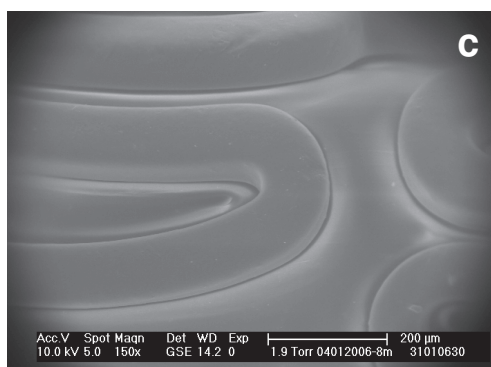
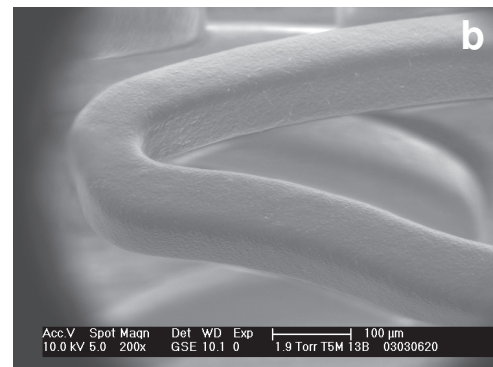
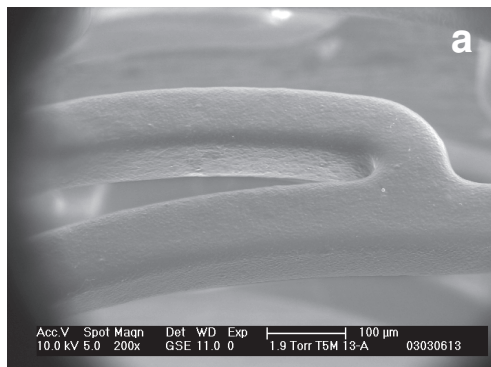
Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie (REM) erfordert wasserfreie Proben und bei elektrisch nicht leitenden Proben eine nachfolgende Sputterung, vorzugsweise mit Gold, bis zum Erhalt einer Schichtdicke von ca. 15 nm. Dem Vorteil der hohen Auflösung und sehr guten Abbildungsschärfe steht der Nachteil von Präparationsartefakten infolge der Trocknungsprozesse und des Sputterns gegenüber. Daher sollten oberflächenmorphologische REM-Untersuchungen immer mit weiteren mikroskopischen Untersuchungsmethoden, wie der Auflichtmikroskopie und der *Environmental Scanning Electron Microscopy* (ESEM), verifiziert werden. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Stentoberfläche und -strukturen wurden deshalb bevorzugt im ESEM-Modus (ESEM, Typ XL30, Fa. Philips, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. Als Untersuchungsparameter wurden verwendet: Hochspannung 10 kV, Probenabstand 10 mm, Spotsize 5 und Druck in der Probenkammer 1.9 mm Hg (GSE-Detektor). Für die ESEM-Untersuchung wurden die Stents auf Aluminium-

probenteller mit doppelseitigen Leit-Tabs fixiert. Die ESEM-Untersuchungen wurden auf nachfolgende Auffälligkeiten, sowohl auf der äußeren als auch der inneren Stentoberfläche, konzentriert:

- Vorhandensein/Nichtvorhandensein von Kantenbeschädigungen,
- Vorhandensein/Nichtvorhandensein von Rissen, Inhomogenitäten, Schichtablösungen und festhaftenden Auflagerungen sowie auffälligen Veränderungen bzgl. der Stegbreite und -dicke,
- Repräsentative Oberflächenmorphologie über die gesamte Stentlänge.

Die Abbildungen 43a-f zeigen repräsentativ die Oberflächenmorphologie von mit P(3HB)-beschichteten Metallstents aus einer CoCr-Legierung in verschiedenen Stadien der Stentprozessierung: 1) nach Herstellung und Trocknung (Abb. 43a-b), 2) nach maschineller Crimpung auf dem Ballonkatheter bei 70 °C und nach β -Sterilisation (Abb. 43c-d) und 3) nach Stentdilatation bei 37 °C in isotonischer NaCl-Lösung (Abb. 43e-f). Die ESEM-Parameter sowie die dazugehörigen Abbildungsmaßstäbe sind der Datenzeile der Abbildungen zu entnehmen. Die mit P(3HB) beschichteten Stentoberflächen wiesen weder nach der Trocknung noch nach der maschinellen Crimpung und Sterilisation sowie nach der Stentaufweitung Einrisse, partielle Delaminationen oder flächenhafte Ablösungen auf, was auf eine hohe strukturelle Integrität zwischen dem Stentgrundkörper und der Stentbeschichtung schließen lässt. Diese hohe Integrität wird dabei maßgeblich durch den Sprühprozess erreicht, der festgelegt durch die Größe der Tröpfchen im Sprühnebel eine Passage des Stentgitters erlaubt und somit einen vollständigen Formschluss um die Stentstege garantiert.



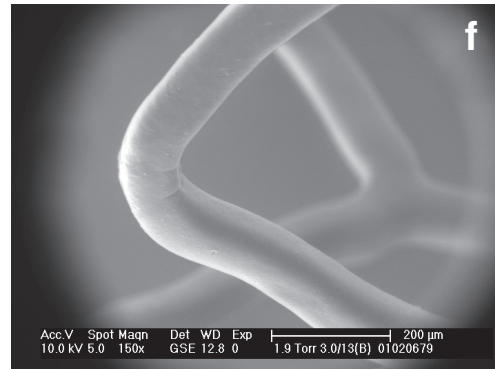
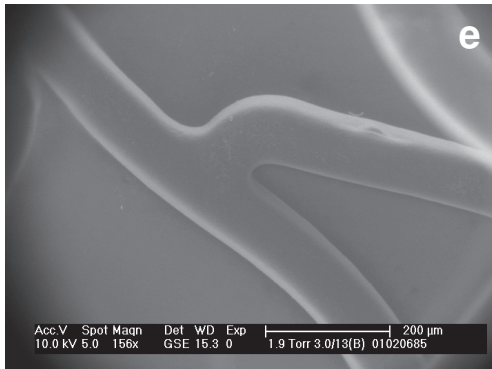


Abb. 43: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (ESEM) von P(3HB)-Beschichtungen (Schichtmasse ca. 900 µg) auf Metallstents (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm) nach unterschiedlichen Stentprozessierung: a-b: undilatiert, c-d: maschinell gecrimpt und β-sterilisiert, e-f: maschinell gecrimpt, β-sterilisiert und dilatiert

Auch durch die lösungsvermittelte Wirkstoffinkorporation in die polymere Beschichtungsmatrix wurde keine Verschlechterung der Schichtqualität beobachtet, wie es exemplarisch an einer PLLA-Beschichtung mit einer hohen Wirkstoffbeladung von 45 % in der Abbildung 44 gezeigt wird.

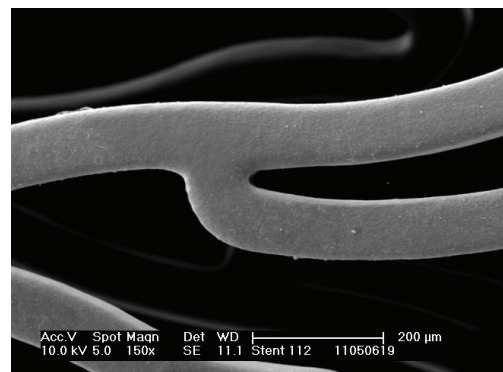
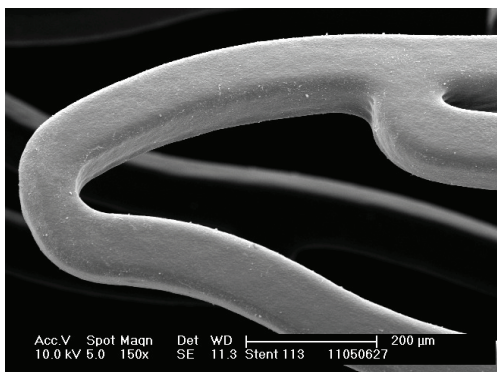


Abb. 44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM, 150x) einer PLLA/Pimecrolimus-Beschichtung (PLLA/Pimecrolimus 55/45 % w/w) auf einem gecrimpten und β-sterilisierten, undilatierten Metallstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 15 mm), Schichtmasse ca. 1500 µg

Somit ist davon auszugehen, dass die im Sprühprozess hergestellten Stentbeschichtungen bei einer wie in den Abbildungen 43-44 dargestellten Oberflächengüte für tierexperimentelle Studien verwendet werden können, vorbehaltlich der noch durchzuführenden in vitro Studien zur Freisetzung der Wirkstoffe, zur Degradation der polymeren Beschichtungsmatrix und zur Prüfung klinisch relevanter Funktionalitätsparameter, auf die in den Kapiteln 4.4 bis 4.6 detaillierter eingegangen wird.

Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM)

Die morphologischen Untersuchungen der DES-Oberflächen wurden darüber hinaus durch die Verwendung der Rasterkraftmikroskopie (NanoWizard® I, JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland) erweitert. Die Abbildung 45 zeigt exemplarisch die Oberfläche einer DES-Beschichtung, die bestehend aus der polymeren Trägermatrix PLLA und dem Wirkstoff TETD in einem Masseverhältnis von PLLA/TETD 70/30 % im Sprühprozess auf die Stentoberfläche aufgetragen wurde, im Vergleich zu einer im Gießverfahren hergestellten Folie aus dem gleichen PLLA/TETD-Komposit. Die Untersuchungen wurden an statistisch verteilten Arealen der PLLA/TETD-Folie bzw. der Außenseite der Stentstege im Contact-Modus durchgeführt.

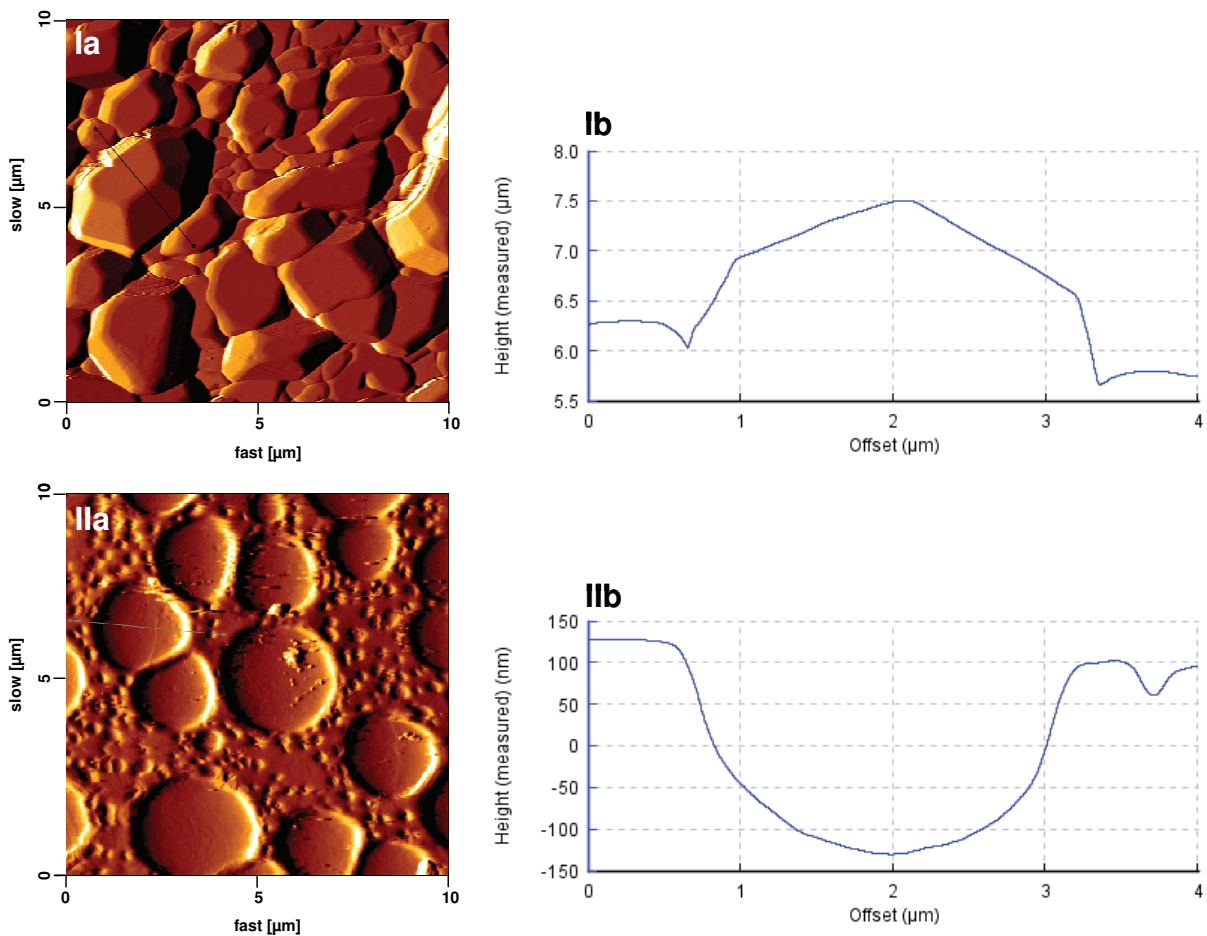


Abb. 45: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen einer PLLA/TETD (70/30 % w/w)-Folie (Ia) und eines im Sprühverfahren hergestellten PLLA/TETD (70/30 % w/w) DES (IIa) sowie Darstellung der charakteristischen Höhenprofile der Folie (Ib) und des DES (IIb) entlang der in Ia und IIa eingezeichneten Linien von jeweils 4 μm Offset (Gocke, Sternberg et al. [232])

Auf der PLLA/TETD-Folie treten regelmäßige Erhöhungen im Oberflächenrelief mit einer Ausdehnung von $< 5 \mu\text{m}$ auf (Abb. 45, Ia). Die Topografie der DES-Oberfläche zeigt neben Unebenheiten im Bereich von $< 1 \mu\text{m}$ nahezu kreisrunde, homogen verteilte Vertiefungen,

die einen Durchmesser $< 3 \mu\text{m}$ aufweisen (Abb. 45, Ib). Die Tiefe dieser konkaven Strukturen beträgt im Mittel 200-300 nm (Abb. 45, IIb). Da die Gesamtdicke der Stentbeschichtung annähernd $20 \mu\text{m}$ beträgt, ist die abgebildete Rauigkeit, die abgesehen vom Stegprofil deutlich unterhalb $1 \mu\text{m}$ auf einer Fläche von $100 \mu\text{m}^2$ liegt, ein Effekt der Oberflächenbildung während des Sprühprozesses (Abb. 45, IIa).

Darüber hinaus können herstellungsbedingte Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der PLLA/TETD-Komposite dargestellt werden, die aus einer schnellen Kristallisation des Wirkstoffes im Sprühprozess infolge schnellen Abdampfens des Lösungsmittels und einer vergleichsweise langsamen Kristallisation des Wirkstoffes bei der Folienherstellung und -trocknung resultieren.

Die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen erlauben somit eine detaillierte qualitative und quantitative Charakterisierung der Polymer-Wirkstoff-Kompositoberflächen unter Berücksichtigung der lateralen und vertikalen Ausdehnungen.

4.3.2 Volumenmorphologie des Polymer-Wirkstoff-Komposits

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Abbildung der Ultrastruktur der Polymer-Wirkstoff-Komposite wurde ein Hochleistungs-Transmissionselektronenmikroskop vom Typ Libra 120 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer maximalen Beschleunigungsspannung von 120 kV verwendet. Exemplarisch sind in der Abbildung 46 die Volumenmorphologien der Polymer-Wirkstoff-Komposite PLLA/TETD (70/30 % w/w) (Abb. 46 Ia, b) und PLLA/Cyclosporin A (CsA, 70/30 % w/w) (Abb. 46 IIa, b) dargestellt.

Dafür wurden im Gießverfahren hergestellte und in kalthärtendes Epoxidharz (EpoThin, Fa. Buehler GmbH, Düsseldorf, Deutschland) eingebettete Folienstücke aus PLLA/TETD und PLLA/CsA zu Ultradünnschnitten (60-90 nm) verarbeitet und im TEM untersucht.

Die TEM-Analyse der Volumenmorphologie des PLLA/TETD-Komposits zeigte eine homogene, feindisperse Wirkstoffverteilung in der Polymermatrix ohne die Ausbildung von Phasengrenzen. Außerdem waren vereinzelt Kumulationsbereiche höherer Wirkstoffkonzentration zu beobachten, die als dunkelgraue Areale in der Abbildung 46 Ib erkennbar sind. Die TEM-Aufnahmen des PLLA/CsA-Komposits zeigen separierte ca. 300-500 nm große Wirkstoffkristalle/-cluster mit deutlichen Phasengrenzen zur PLLA-Matrix (Abb. 46 IIb).

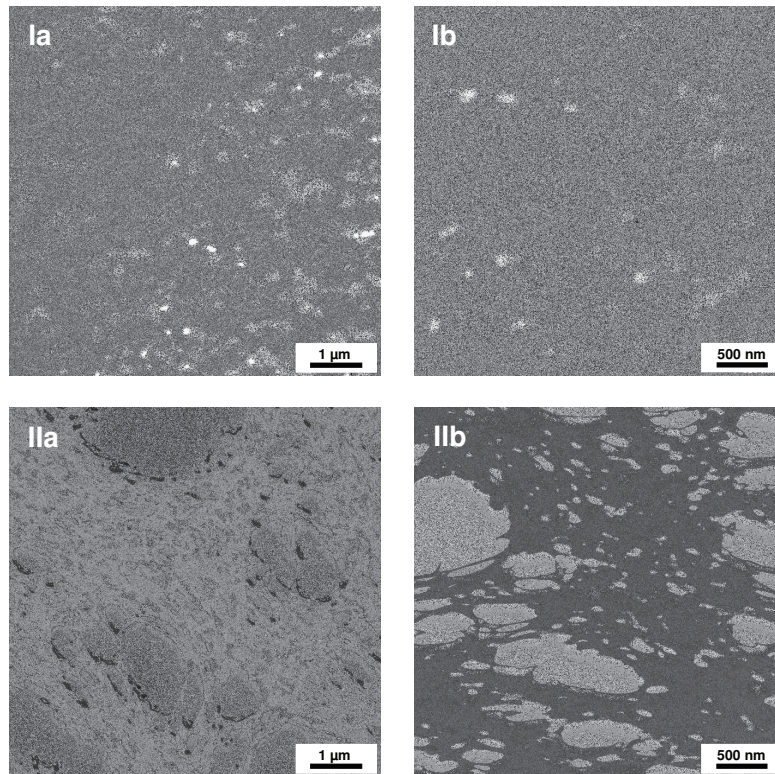


Abb. 46: TEM-Aufnahmen des PLLA/TETD-Komposits (70/30 % w/w, la,b) und des PLLA/CsA-Komposits (70/30 % w/w, Ila,b) in zwei unterschiedlichen Auflösungen: la, Ila – Übersichtsaufnahmen, lb, IIb – Wirkstoffverteilungen in der Polymermatrix mit vereinzelt Kumulationsbereichen höherer Wirkstoffkonzentration

Obwohl sowohl TETD als auch CsA unter Lösungsvermittlung als methanolische Lösungen der PLLA-Lösung zugesetzt wurden, unterscheidet sich die Volumenmorphologie beider Komposite deutlich voneinander.

Dies kann unter anderem auf die unterschiedlichen Molekülgrößen der Wirkstoffe zurückgeführt werden, da die homogenere Wirkstoffverteilung des TETD gegenüber dem CsA daraus resultieren könnte, dass sich das kleine TETD-Molekül ($M=296.5$ g/mol) weitaus besser zwischen die linearen Polymerkettensegmente des teilkristallinen PLLA einlagert als das deutlich größere cyclische CsA-Molekül ($M=1202.6$ g/mol).

4.3.3 Volumenmorphologie des Schichtverbundes

Auch für die Untersuchung der Volumenmorphologie des Verbundes zwischen Stentgrundkörper und -beschichtung sowie für die Bestimmung der Schichtdicke der Stentbeschichtung und ihrer örtlichen Verteilung wurde die Lichtmikroskopie in Kombination mit Bildanalyseverfahren eingesetzt.

Von der Präparation bis zur Auswertung der DES waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Einbettung des DES in kalthärtendes Epoxidharz,
- Sukzessive Präparation verschiedener Schnittebenen,
- Digitale lichtmikroskopische Dokumentation der Stentstegquerschnitte in drei Schnittebenen zur Untersuchung des Schichtverbundes und zur Ermittlung der Schichtdicke,
- Vermessung der Schichtdicke einzelner Stentstege sowie
- Statistische Auswertung der Schichtdicke.

Nach der lichtmikroskopischen Auswertung der präparierten Stentstegquerschnitte konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung des Sprühverfahrens haftfeste, formschlüssige Beschichtungen auf die metallische Stentoberfläche aufgetragen werden können (Abb. 47).

Aufgrund der gitterartigen Struktur des Stents und der dadurch erschwerten Passage der Tröpfchen des Sprühnebels in das Stentlumen hinein war ein höherer Materialauftrag auf der abluminalen Stentseite zu beobachten, was sich in einer deutlich höheren Schichtdicke auf dieser Seite manifestiert. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass, wie bereits im Kapitel 4.2.2 diskutiert, sehr dünne, wenig reproduzierbare Beschichtungen mit inhomogener Schichtverteilung über den Stegquerschnitt aus dem Tauchverfahren resultieren.

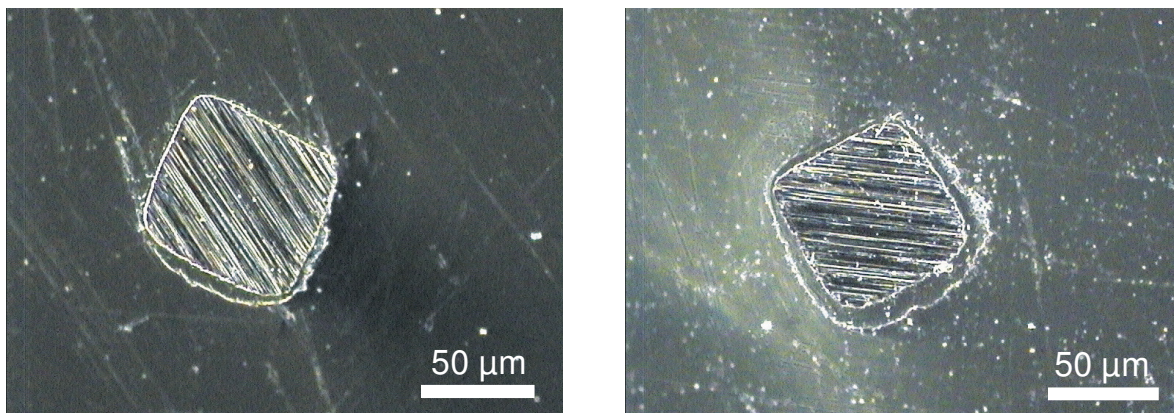


Abb. 47: Schichtdicke im Stegquerschnitt; links: Tauchverfahren, rechts: Sprühverfahren, Schliffanfertigung R. Rohde, LEBAO Hannover [83]

Die Auswertung der Schichtdickenverteilung über die Stentlänge zeigt, dass beim Sprühverfahren die Schichtdicke an den Stentenden im Mittel um 34 % höher ist als in der Stentmitte (Abb. 48). Die Schichtdickenunterschiede zwischen den linken und rechten Stegflächen sind dagegen weniger groß und betragen im Mittel 9 %. Die Schichtdicke auf der äußeren (abluminalen) Stegfläche ist im Mittel um 45 % höher als auf der inneren (luminalen) Stegfläche.

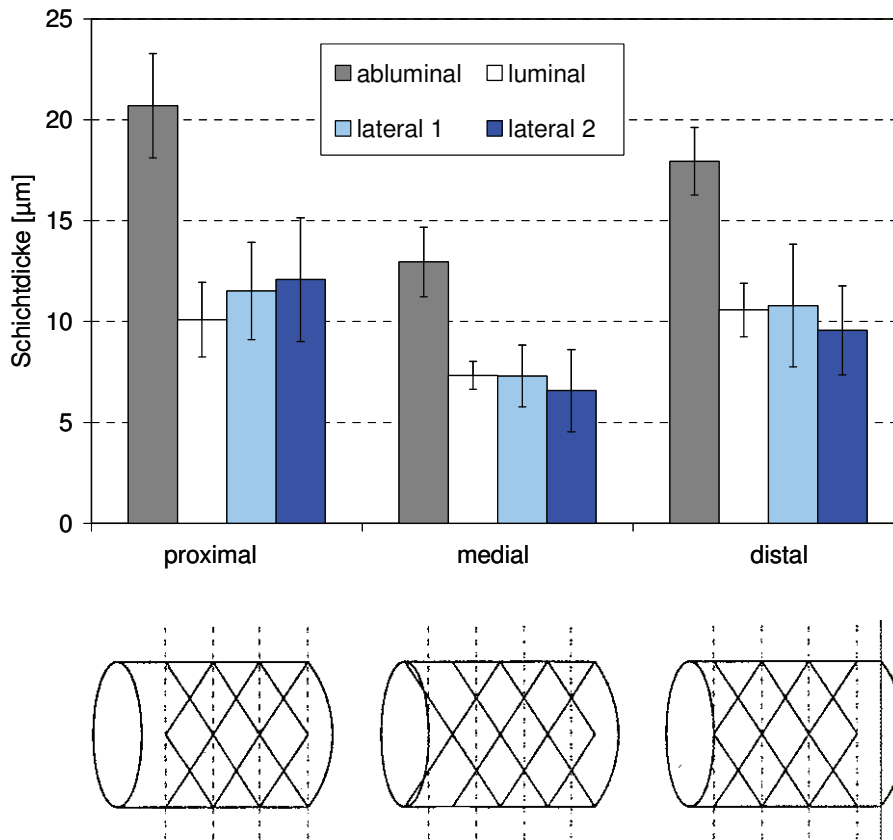


Abb. 48: Schichtdickenverteilung eines DES (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm, Schichtmasse ca. 1100 µg) über den Stentstegquerschnitt (abluminal, luminal, lateral 1, lateral 2 mit jeweils n=14 Meßpunkten) und über die Stentlänge (proximal, medial, distal), ermittelt durch die sukzessive Präparation und digitale lichtmikroskopische Dokumentation (Auflicht) dreier Schnittebenen [233]

Die höhere Schichtdicke an den Stentenden ist prozessbedingt damit zu erklären, dass der Sprühstrahl in der Beschichtungsanlage bauartbedingt abgelenkt wird, so dass es zu einer höheren Polymerablagerung im Bereich der Stentenden kommt. Deshalb wurden die Prozessparameter in den durchgeführten Parameterstudien optimiert (Kap. 4.2.2), um eine möglichst homogene Schichtverteilung über die Stentlänge zu erreichen.

4.4 In vitro Elutionsverhalten von Drug-Eluting Stents

Die klinische Wirksamkeit eines DES wird neben der Auswahl eines für die Applikation geeigneten Wirkstoffes, beispielsweise zu Verhinderung der In-Stent-Restenose, entscheidend durch sein Wirkstofffreisetzungsverhalten bestimmt, durch das die lokale Konzentration erreicht wird, bei der die erwünschte Wirkung eintritt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind DES-Beschichtungen auf der Basis langsam degradierbarer Polymere, bei denen primär von einer Wirkstofffreisetzung (-elution) durch Diffusion aus der intakten Polymerbeschichtung und weniger von einer Wirkstofffreisetzung während der Fragmentation der Polymerbeschichtung auszugehen ist. Dabei diffundieren die Wirkstoffmoleküle aus der Polymerschicht in das den DES umgebende Elutionsmedium, wo der zeitliche Anstieg der Konzentration der Wirkstoffmoleküle gemessen wird. Beim Diffusionsvorgang von Wirkstoffen aus Stentbeschichtungen sind somit zu berücksichtigen:

- die Diffusion der Wirkstoffmoleküle aus der Polymerschicht
- die zeitliche Abhängigkeit der Konzentration der Wirkstoffmoleküle an der Oberfläche der Polymerschicht
- die Rückdiffusion der im Elutionsmedium gelösten Wirkstoffmoleküle

Die in die Polymerbeschichtung eingebrachten Wirkstoffe diffundieren in das umgebende Medium, d. h. in das umgebende Gewebe und in die umgebende Körperflüssigkeit. Die Diffusion von Wirkstoffmolekülen aus einer dünnen Schicht in ein Gewebe oder eine ruhende Flüssigkeit kann näherungsweise als ein eindimensionaler Diffusionsvorgang angesehen werden, bei der die Konzentration der diffundierenden Moleküle eine Funktion $c(x,t)$ des Ortes x und der Zeit t darstellt. Die Zeit- und Ortsabhängigkeit von c wird hier durch das 2. Fick'sche Gesetz beschrieben [234]. Da bei den nach der DIN EN ISO 10993-12 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 12, 2006: „Probenvorbereitung und Referenzmaterialien“) durchgeführten in vitro Wirkstofffreisetzungsbildungsuntersuchungen (Kap. 4.4.2) eine bewegte Flüssigkeit simuliert wird, wurde jedoch zur theoretischen Beschreibung der Wirkstoffelution aus Stentbeschichtungen das Modell der Auflösung eines festen Stoffes in einer bewegten Flüssigkeit unter Zuhilfenahme des 1. Fick'schen Gesetzes [234] herangezogen, das im Kapitel 4.4.1 vorgestellt wird.

4.4.1 Theoretische Grundlagen zur diffusionsgesteuerten Wirkstoffelution

Zur Beschreibung des Diffusionsvorganges, der die Wirkstofffreisetzung der innerhalb dieser Arbeit untersuchten DES bestimmt, kann ansatzweise das Modell der Auflösung eines festen Stoffes in einer bewegten Flüssigkeit verwendet werden. Bei dieser Näherung wird davon ausgegangen, dass die Konzentration des Stoffes an der Oberfläche des Festkörpers konstant bleibt und der Konzentrationsgradient sich auf die Nernst'sche Diffusionsschicht beschränkt (Abb. 49).

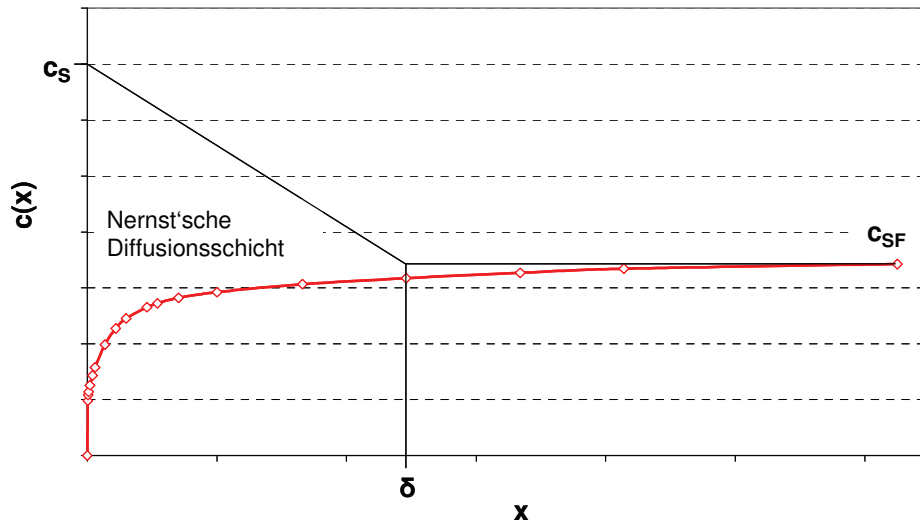


Abb. 49: Schematische Darstellung des charakteristischen Freisetzungssprofils eines DES (rote Kurve) und modellhafte Näherung unter Betrachtung des Diffusionsvorganges infolge des Konzentrationsgradientens in der Nernst'schen Diffusionsschicht

Wird nun das 1. Fick'sche Gesetz (Gl. 4.3), das die Diffusion als Folge eines Konzentrationsgradientens an einer Phasengrenze beschreibt, herangezogen, so ergeben sich unter Berücksichtigung der oben genannten Annahmen folgende Beziehungen (Gl. 4.3-4.5):

$$\frac{dM}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx} \quad (4.3)$$

wenn
$$-\frac{dc}{dx} \approx \frac{(c_s - c)}{\delta}, \quad (4.4)$$

dann
$$\frac{dM}{dt} = D \cdot A \cdot \frac{(c_s - c)}{\delta} \quad (4.5)$$

mit

- M - Menge des Stoffes (Anzahl der Moleküle)
- t - Zeit
- D - Diffusionskonstante
- A - Fläche, von der Moleküle abdiffundieren
- c - Konzentration des Stoffes
- x - Ort (Strecke)
- c_s - Sättigungskonzentration an der Oberfläche des Festkörpers
- δ - Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht

Bezogen auf das Volumen V ist:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot (c_s - c) \quad (4.6)$$

und somit
$$\frac{dc}{(c_s - c)} = k \cdot dt \quad (4.7)$$

mit

k - Auflösungskonstante,
$$k = \frac{D \cdot A}{V \cdot \delta}$$

Die Integration führt dann zur Gl. 4.8:

$$c_s - c = c_s \exp(-kt) \quad (4.8)$$

Da nach hinreichend langer Diffusionszeit in Näherung die Sättigungskonzentration an der Oberfläche des Festkörpers c_s der Sättigungskonzentration in der Flüssigkeit c_{SF} gleichzusetzen wäre, kann der Konzentrationsverlauf in der Flüssigkeit somit durch folgende Beziehung beschrieben werden:

$$c(t) = c_{SF} (1 - \exp(-kt)) \quad (4.9)$$

mit

c_{SF} - Sättigungskonzentration in der Flüssigkeit, hier im Elutionsmedium

Die Gleichsetzung $c_s \approx c_{SF}$ bedeutet aber, dass c_s zeitabhängig ist in Abweichung zur eingangs beschriebenen Näherung $c_s = \text{konstant}$. Dies erfordert eine Korrektur, die unter Berücksichtigung des physikalischen Prozesses durch die Zeitabhängigkeit der Auflösungskonstante k in Gl. 4.10 realisiert wird.

$$k = k(t) \quad (4.10)$$

Die Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht wird somit zeitabhängig. Ist das Volumen der Flüssigkeit V_F groß gegenüber dem Volumen der Stentbeschichtung, so ist bei Erreichen des Gleichgewichts näherungsweise folgende Beziehung anzunehmen (Gl. 4.11):

$$c_{SF} = \frac{M}{V_F} \quad (4.11)$$

Unter Berücksichtigung der oben getroffenen Annahmen ergeben sich die Gl. 4.12 und 4.13 (für diskrete $c(t)$ Messungen), mit denen das Wirkstofffreisetzungverhalten von DES annäherungsweise beschrieben werden kann:

$$k(t) = - \frac{\ln (1 - c(t) / c_{SF})}{t} \quad (4.12)$$

Für diskrete $c_i(t_i)$ -Messungen:

$$k_i = - \frac{\ln(1 - c_i / c_{SF})}{t_i} \quad (4.13)$$

Die Funktion $k(t)$ charakterisiert dabei die zeitliche Änderung der Beladung des flüssigen Elutionsmediums mit Wirkstoffmolekülen aus der Stentbeschichtung und damit die Änderung der Ergiebigkeit der „momentan ebenen Quelle“ der Stentbeschichtung. Jeder k -Wert beschreibt eine bestimmte Aufladefunktion des Elutionsmediums und damit die Entladefunktion der Stentbeschichtung.

Die zeitliche Änderung soll mit Hilfe der $k(t)$ -Funktion an einem Beispiel erläutert werden. Grundlage dafür ist die Gl. 4.12, wobei als Sättigungswert c_{SF} für eine Stentschicht der nach hinreichend langer Zeit gemessene Konzentrationswert c (in $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt wird. Um $k(t)$ zu bestimmen, genügen wenige diskrete Messungen der Wirkstofffreisetzung in Abhängigkeit von der Zeit, da sich markante Unterschiede in der Diffusion des Wirkstoffes aus den zu untersuchenden DES bereits innerhalb eines Elutionszeitraumes von wenigen Stunden zeigen. Der k -Wert kennzeichnet dabei den zeitlichen Verlauf der Diffusion des Wirkstoffes aus der Stentschicht sowie die zeitliche Abnahme der Wirkstoffkonzentration an der Stentoberfläche in Relation zum Sättigungswert c_{SF} . Außerdem wird durch k die zeitliche Zunahme der Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht beschrieben.

Exemplarisch wird dies somit an den Messwerten von vier DES-Typen veranschaulicht (s. Tab. 16), deren kumulativ freigesetzte Wirkstoffkonzentrationen $c_i(t_i)$ (in $\mu\text{g/ml}$) bestimmt wurden (s. Abb. 55). Die Sättigungswerte c_{SF} werden durch die ermittelten Konzentrationswerte nach ca. 260 Stunden Elutionszeit repräsentiert.

Die Diffusion des Wirkstoffes aus der Stentbeschichtung beginnt zum Zeitpunkt $t = 0$, bei dem die Konzentration des Wirkstoffes in der Flüssigkeit $c(0) = 0$ ist. Nach Gl. 4.12 ergibt sich für $k(0)$ nach Anwendung der L'Hospital'schen Regel

$$k(0) = k_0 = \frac{(dc/dt)}{c_{SF}} \quad (4.14)$$

Messtechnisch wird bei $t = 0$ $\Delta c/\Delta t$ ermittelt, wobei das Zeitintervall Δt möglichst klein bleiben soll. Da bei der *in vitro* Untersuchung von DES das Verhalten der Wirkstofffreisetzung über längere Zeit im Vordergrund steht, wurde auf die Bestimmung des Konzentrationsgradientens im Nullpunkt und damit auf k_0 verzichtet.

Tab. 16: Berechnete k_i -Werte aus der gemessenen Wirkstoffkonzentration c (in $\mu\text{g/ml}$) und der Zeit t nach dem Start der Diffusion bei $t = 0$ nach Gleichung 4.13

DES 1		DES 2		DES 3		DES 4	
mit $c_{\text{CSF}} = 83.5 \mu\text{g/ml}$		mit $c_{\text{CSF}} = 49 \mu\text{g/ml}$		mit $c_{\text{CSF}} = 54 \mu\text{g/ml}$		mit $c_{\text{CSF}} = 68.5 \mu\text{g/ml}$	
t [h]	k_i [h^{-1}]	t [h]	k_i [h^{-1}]	t [h]	k_i [h^{-1}]	t [h]	k_i [h^{-1}]
0.25	0,28	0.25	0.27	0.25	0.26	0.25	0.29
0.58	0.21	0.58	0.18	0.58	0.17	0.58	0.2
1	0.19	-	-	-	-	-	-
1.5	0.18	1.5	0.12	1.5	0.105	1.5	0.133
2.25	0.16	-	-	-	-	-	-
3	0.15	3	0.08	3	0.07	3	0.093
8	0.1	5	0.064	5	0.05	5	0.073
20	0.06	11	0.052	11	0.039	11	0.055
62	0.04	25	0.036	25	0.027	25	0.039
104	0.037	106	0.02	106	0.017	106	0.023
196	0.026	196	0.016	196	0.015	196	0.019

Im Falle der untersuchten vier DES-Typen beginnt die Messung der Wirkstofffreisetzung erst ab $t = 0.25 \text{ h}$ und reicht bis zu $t = 260 \text{ h}$ für jede Stentschicht. Die in der Tabelle 16 berechneten k -Werte ergeben in Abhängigkeit von der Zeit charakteristische $k(t)$ -Schichtentleerungsfunktionen, wie sie in der Abbildung 50 dargestellt sind.

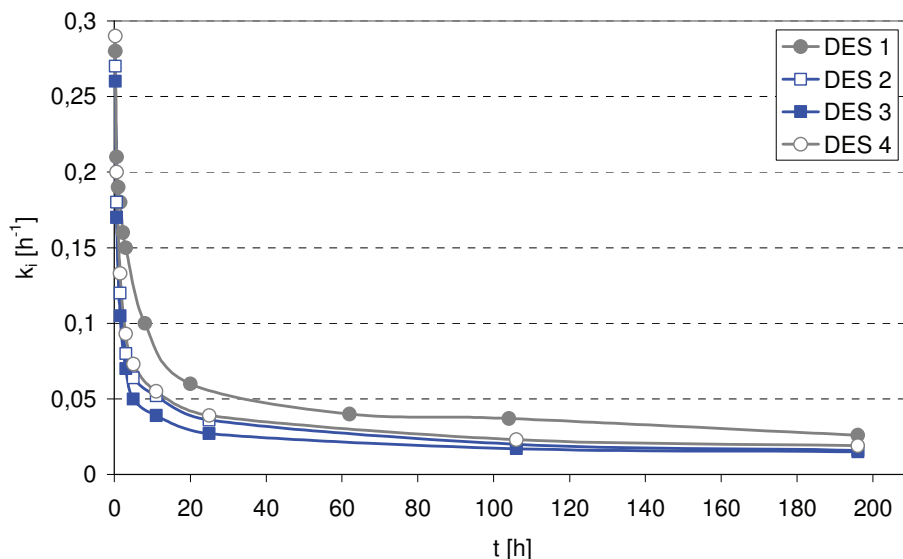


Abb. 50: $k(t)$ -Schichtentleerungsfunktionen nach den Messergebnissen von vier DES-Typen (s. Abb. 55): DES 1 - Stent P(4HB)/SIR 85/15, P(4HB)-Deckschicht_733-510, DES 2 - Stent PLLA/P(4HB) 70/30, 15 % SIR, P(4HB)-Deckschicht_733-510, DES 3 - Stent PLLA/P(4HB) 50/50, 15 % SIR, P(4HB)-Deckschicht_733-510, DES 4 - Stent PLLA/P(4HB) 30/70, 15 % SIR, P(4HB)-Deckschicht_733-510

Der Ansatz der Zeitabhängigkeit des k-Wertes korrigiert die eingangs gemachte Annahme, dass die Konzentration der Moleküle an der Oberfläche des festen Körpers, der sich in einer Flüssigkeit auflöst, konstant bleibt. Diese Korrektur wird durch die zu Beginn der Wirkstoffelution auftretende starke Abnahme der Konzentration des Wirkstoffes an der Oberfläche der Stentschicht und somit durch die Abnahme der k-Werte bestätigt. Die starken Unterschiede in den k-Werten zeigen sich besonders im niedrigen Zeitbereich bis annähernd 10 h. Danach verringern sie sich und gehen oberhalb von 100 h in wenig zeitabhängige k-Werte über.

Der Übertragungsprozess der Wirkstoffmoleküle aus der Stentbeschichtung in das Elutionsmedium wird vom DES-Design, d. h. von der Art des Polymers, der Schichtdicke und dem Schichtaufbau, bestimmt und beeinflusst somit maßgeblich den Prozess der Wirkstoffdiffusion und seiner zeitlichen Änderung.

Die Zielsetzung der entwickelten und in den folgenden Kapiteln dargestellten in vitro Prüfmethoden war die Charakterisierung des Wirkstofffreisetzungsverhaltens von koronaren DES hinsichtlich der Wirkstoffmenge, die pro Zeiteinheit in ein das Blut simulierendes Elutionsmedium abgegeben wird, und hinsichtlich der Wirkstoffverteilung in einer die Blutgefäßwand simulierenden Alginatmatrix in Abhängigkeit von den Parametern des DES-Designs.

4.4.2 In vitro Wirkstoffelution in Abhängigkeit vom DES-Design

Zur quantifizierenden Charakterisierung des Wirkstofffreisetzungsverhaltens von DES in Anlehnung an die DIN EN ISO 10993-12 wurden die im Elutionsmedium dilatierten DES jeweils in schraubdeckelverschließbaren Glasvials in 1.0 ml Elutionsmedium bei 37 °C in einem Wärmeschrank aufbewahrt (Abb. 51).

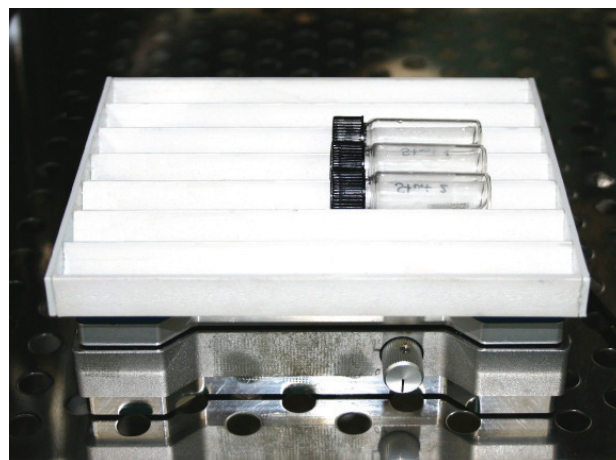


Abb. 51: Aufbau der Apparatur zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung von DES in ein bewegtes, wässriges Elutionsmedium bei 37 °C im Wärmeschrank

Die Probengefäße wurden dabei auf einer Schüttelmaschine bewegt, um eine ungehinderte Wirkstoffdiffusion und eine homogene Wirkstoffverteilung im Elutionsmedium zu gewährleisten. Außerdem wurde das Elutionsmedium regelmäßig erneuert, um die Konzentration des gelösten Wirkstoffs innerhalb des kalibrierten Messbereichs des Analysenverfahrens zu halten. Das resultierende Eluat wurde der HPLC zugeführt und die Elution des jeweiligen DES wurde sofort mit 1.0 ml frischem Elutionsmittel fortgesetzt. Um die untersuchten lipophilen Wirkstoffe in den wässrigen Eluatproben analytisch vollständig zu erfassen, wurden die Eluatproben vor ihrer chromatografischen Auswertung mit Acetonitril oder Methanol als Lösungsvermittler verdünnt (1:1, v/v).

Die für die Wirkstofffreisetzungsforschungen verwendete HPLC-Anlage der Firma Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland) bestand aus folgenden Komponenten: der HPLC-Pumpe K-1001, dem Spektralphotometer K-2501 (Detektor), dem manuellen 6-Port-3-Kanal-Injektionsventil, dem 4-Kanal-Vakuum-Entgaser PL-DG 804, dem Steuer-Computer Compaq Deskpro P4, 1.5 GHz und der Software Euro-Chrom 2000 WIN 2.05 HPLC. Die Art der Trennsäule richtete sich nach dem zu untersuchenden Wirkstoff.

Der Gehalt des innerhalb des Zeitintervalls Δt_i zwischen zwei Entnahmepunkten in das Elutionsmedium freigesetzten Wirkstoffes $m_i(\Delta t_i)$ wurde aus dem erhaltenen Detektorsignal, in Form der Peakfläche über die Retentionszeit bestimmt. Die Versuchsdauer sowie der Abstand und die Anzahl der Probenentnahmezeitpunkte sind von vielen Einflußfaktoren abhängig, beispielsweise von der Art und Morphologie der Polymermatrix, der Art des Wirkstoffs, der Konzentration des zu testenden Wirkstoffs in der Polymermatrix, der Löslichkeit des Wirkstoffs im Elutionsmedium sowie dem Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen des Prüfkörpers.

Da zu jeder Probennahme das Elutionsmittel völlig erneuert wurde, wurden die Messwerte der eluierten Wirkstoffmasse akkumuliert (Gl. 4.15). Darüber hinaus wurde der eluierte Wirkstoffanteil (in %) bezogen auf die gesamte ursprünglich in der Stentbeschichtung installierte Wirkstoffmasse kalkuliert (Gl. 4.16).

$$m_{j, \text{summiert}} = \sum_{i=0}^j m_i (\Delta t_i) \quad (4.15)$$

$$W_j = \frac{\sum_{i=0}^j m_i (\Delta t_i)}{m_{\text{WS}}} \cdot 100 \% \quad (4.16)$$

mit

- $i \in N_0^+$ - Nummer des Probenentnahmeintervalls
- $j \in [0; i]$ - Anzahl der Probenentnahmeintervalle bis $i = j$
- $m_{j, \text{summiert}}$ - Summierte eluierte Wirkstoffmasse von $i = 0$ bis $i = j$
- $\Delta t_i = t_i - t_{i-1}$ - Zeit zwischen zwei Probeentnahmen
- W_j - Eluierter Wirkstoffanteil bezogen auf die gesamte ursprünglich in der Probe installierte Wirkstoffmasse
- $m_i (\Delta t_i)$ - Eluierte Wirkstoffmasse im Probenentnahmeintervall i
- m_{WS} - Gesamte in der Probe installierte Wirkstoffmasse

Die ursprünglich in der Stentbeschichtung vorhandene Wirkstoffmasse m_{WS} wurde nach vollständiger Extraktion des Wirkstoffes aus der Polymermatrix durch organische Lösungsmittel, wie Methanol oder Acetonitril, durch Untersuchung des Extraktes in der HPLC bestimmt. Darüber hinaus wurde die Wirkstoffmasse vergleichend aus der durch Wägung ermittelten Schichtmasse berechnet.

Um das in vitro Modell den physiologischen Bedingungen besser anzupassen, wurde zur Charakterisierung des Wirkstofffreisetzungsverhaltens der entwickelten koronaren DES-Prototypen neben isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung porcines Blutplasma als Elutionsmedium benutzt.

Zur Auswertung der Wirkstofffreisetzung in Blutplasma wurde nach *Bardelmeijer et al.* [235] folgende Probenvorbereitung durchgeführt: 0.8 ml Plasmaprobe wurden in einem 4 ml-Vial mit 3.2 ml Diethylether versetzt, verschlossen und 5 Minuten heftig geschüttelt. Danach ließ man die Phasen trennen und für die wässrige Phase im Gefrierschrank (-18 °C) ein. Die Etherphase wurde abgetrennt, im Wasserbad bis zur Trockne eingeeengt und mit 0.2 ml Acetonitril aufgenommen. Zur Kalibrierung des Verfahrens wurde exakt die gleiche Verfahrensweise an definiert mit Wirkstoff dotierten Leerplasmaproben angewandt.

Die in Abbildung 52 exemplarisch dargestellten Ergebnisse der Freisetzung des lipophilen Wirkstoffes Cyclosporin A (CsA) zeigen, dass aus der Affinität des CsA zu den Eiweißen des Blutplasmas (Plasmaeiweißbindung 33 % [83]) und damit verbunden aus dem höheren Konzentrationsgradienten eine höhere CsA-Freisetzungsgeschwindigkeit aus DES, eingelagert in Blutplasma, resultiert im Vergleich zu DES der gleichen Herstellungscharge, die in NaCl-Lösung eluiert wurden.

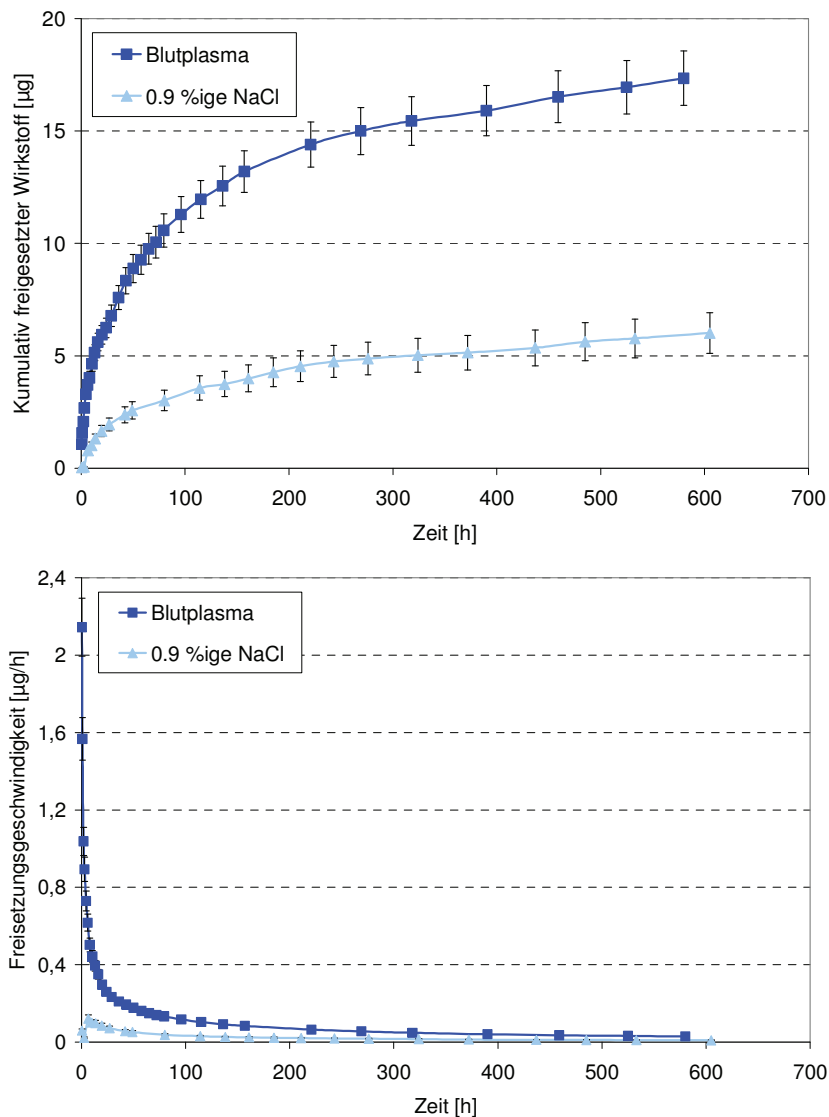


Abb. 52: Abhängigkeit der in vitro Wirkstofffreisetzung vom Elutionsmedium (0.9 %ige NaCl-Lösung, porcines Blutplasma) am Beispiel von PLLA/CsA DES (70/30 % w/w, pro Elutionsmedium jeweils n=2) bei 37 °C [83]

Weiterhin wurde die Wirkstofffreisetzungskinetik ausgewählter im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelter DES in Abhängigkeit vom DES-Design, speziell in Abhängigkeit vom *Wirkstoffmasseanteil* in der Polymerbeschichtung, von der *Art der polymeren Beschichtungsmatrix*, von der *Schichtdicke* und vom *Schichtaufbau* untersucht.

Wirkstoffelution in Abhängigkeit vom Wirkstoffmasseanteil

Die Abbildung 53 den Einfluss des Wirkstoffmasseanteils (in %) in der Polymerbeschichtung auf das Freisetzungsverhalten von DES, exemplarisch an DES-Prototypen (*DES-Variante H*, Kap. 3.2.4) auf der Basis von PLLA und all-trans-Retinoesäure (Tretinoin, atRA) dargestellt. atRA wurde als potentieller Wirkstoff für DES untersucht, da atRA in vitro bei Konzentrationen von 1×10^{-5} M bis 1×10^{-8} M eine Inhibition der Proliferation und Migration von glatten

Muskelzellen verursacht [236-238]. Mit der Fragestellung, ob aus PLLA/atRA-Stentbeschichtungen diese für die Verhinderung der In-Stent-Restenose relevanten atRA-Konzentrationen freigesetzt werden können, wurden in die PLLA-Beschichtungsmatrix 20, 40 bzw. 60 % (w) atRA inkorporiert. Das Freisetzungsverhalten der DES-Prototypen, eingelagert in porcinem Blutplasma bei 37 °C, wurde über 20 Tage verfolgt.

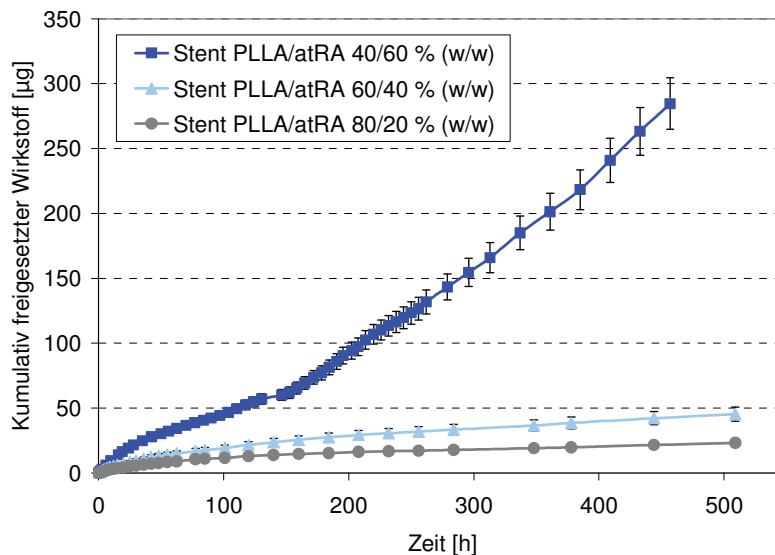


Abb. 53: In vitro Freisetzung von Tretinoin (atRA) aus PLLA-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichen atRA-Konzentrationen (20, 40, 60 %; jeweils n=2) in porcinem Blutplasma (37 °C) [197]

Es zeigte sich, dass mit zunehmendem atRA-Masseanteil in der PLLA-Beschichtung höhere atRA-Konzentrationen im Blutplasma nachweisbar waren. Wird die plasmatische Halbwertszeit des atRA von annähernd 1 Stunde [239] berücksichtigt und wird davon ausgegangen, dass nur das atRA und nicht seine Metabolite die gewünschte Wirksamkeit bei Konzentrationen von 1×10^{-5} M bis 1×10^{-8} M besitzen, so ist festzustellen, dass bei der PLLA/atRA (40/60 % w/w)-Beschichtung ausreichend hohe atRA-Konzentrationen in das Blutplasma pro Stunde abgegeben wurden. Lokale Effekte, die aus der Anreicherung des Wirkstoffes in der Gefäßwand resultieren, bleiben bei dieser Betrachtungsweise unberücksichtigt, da mit dem verwendeten Freisetzungsmodell die Elution des Wirkstoffes in blutähnliche Medien simuliert wird.

Wirkstoffelution in Abhängigkeit von der Art der polymeren Beschichtungsmatrix

In der in der Abbildung 54 dargestellten Untersuchungsreihe wurden verschiedene biodegradierbare, hydrophobe Polymere als Beschichtungsmatrizes für DES erprobt. Dabei wurde analysiert, wie sich die Verwendung von Homopolymeren und Copolymeren sowie von Polymerblends unterschiedlicher Zusammensetzung auf das Freisetzungsverhalten des

antiproliferativen Modellwirkstoffes TETD [240] aus DES-Prototypen (*DES-Variante H*, Kap. 3.2.4) auswirken. Zur vergleichenden Untersuchung des durch die Art des Polymers bedingten Wirkstofffreisetzungsverhaltens wurden CoCr-Stentgrundkörper der gleichen Herstellungscharge verwendet. Außerdem wurden der TETD-Masseanteil in der Beschichtung und die Schichtmasse konstant gehalten.

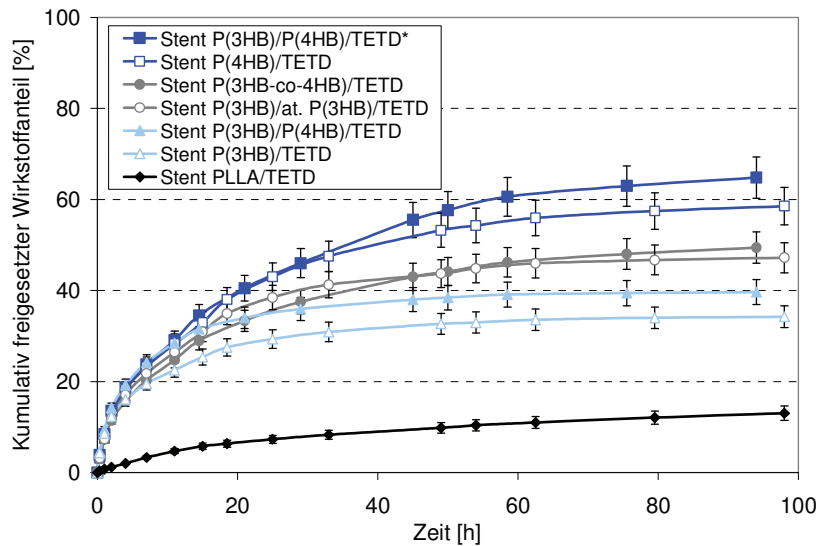


Abb. 54: In vitro Freisetzung von TETD aus verschiedenen biodegradierbaren Stentbeschichtungen (jeweils $n=2$) in 0.9 %iger NaCl-Lösung (37 °C); P(3HB)/P(4HB) 50/50 % w/w mit 30 % TETD (*), P(4HB)/TETD 70/30 % w/w, P(3HB-co-4HB)/TETD 70/30 % w/w, P(3HB)/at. P(3HB) 70/30 % w/w mit 30 % TETD, P(3HB)/P(4HB) 70/30 % w/w mit 30 % TETD, P(3HB)/TETD 70/30 % w/w, PLLA/TETD 70/30 % w/w.

Vergleicht man die Freisetzungsprofile der teilkristallinen Homopolymere PLLA, P(3HB) und P(4HB) so ist festzustellen, dass der freigesetzte TETD-Anteil im Untersuchungszeitraum von annähernd 4 Tagen bei PLLA am niedrigsten und bei P(4HB) am höchsten war. Da bei den genannten Homopolymeren von einem ähnlichen Kristallisationsverhalten unter Ausbildung kristalliner und amorpher Bereiche ausgegangen werden kann, wird die deutlich schnellere TETD-Freisetzung aus P(4HB) wahrscheinlich durch ihre chemische Struktur bestimmt. Aufgrund des Fehlens der hydrophoben Methylgruppe ($-CH_3$) in der Polymerkette ist gegenüber PLLA und P(3HB) ein höherer Wassereintrag pro Zeiteinheit anzunehmen, der die beschleunigte TETD-Freisetzung begründet. Die im Kapitel 4.1.2 für PLLA bestimmten größeren Kontaktwinkel mit Wasser verdeutlichen das schlechtere Benetzungsverhalten von PLLA im Vergleich zu P(3HB) und bedingen die langsamere TETD-Freisetzung aus der PLLA- gegenüber der P(3HB)-Matrix. Die Inkorporation von TETD in das untersuchte Copolymer aus 3-HB und 4-HB (Copolymerverhältnis 3-HB/4-HB 82/18, Tephra Inc., Boston, USA) führt aufgrund des 4-HB-Anteils zu einer schnelleren TETD-Freisetzung als die im Homopolymer P(3HB). Eine Verblendung der isotaktischen P(3HB) mit ataktischer (amorpher) P(3HB) [241] bzw. mit P(4HB) hat ebenfalls eine höhere TETD-Freisetzungsrates im

Vergleich zur unverblendeten P(3HB) zur Folge. Außerdem zeigte die Steigerung der P(4HB)-Konzentration im P(3HB)/P(4HB)-Blend von 30 % auf 50 % (w) eine weitere Zunahme der Freisetzungsrates, die höher als die von P(4HB) war.

Diese gezielte Steuerung des Freisetungsverhaltens von DES in Abhängigkeit von der Blendzusammensetzung der Beschichtungsmatrix konnte darüber hinaus an Sirolimus (SIR)-haltigen Stentbeschichtungen gezeigt werden. Dazu wurden verschiedene Stentbeschichtungen auf der Basis von PLLA und P(4HB) inkorporiert mit SIR hergestellt und hinsichtlich ihres Freisetungsverhaltens in vitro im Vergleich zum klinisch wirksamen Cypher-Stent (Fa. Johnson & Johnson, USA, DES-Design: Polymerblend-Grundbeschichtung aus Poly(butylmethacrylat) (PBMA) und Poly(ethylen-co-vinylacetat) (PEVA) 50/50 % w/w mit einem SIR-Anteil von 33 % (w) gegenüber PEVA/PBMA, SIR-Beladung 1.4 µg/mm², SIR-freie PBMA-Deckschicht) analysiert (Abb. 55). Bei einem SIR-Anteil von 15 % wurde die dem Cypher-Stent analoge SIR-Beladung von annähernd 1.4 µg/mm² durch die Schichtmasse der Grundschicht realisiert. Die Freisetzungsgeschwindigkeit in der initialen Phase wurde durch das Verblenden von P(4HB) mit PLLA sowie durch das Auftragen einer P(4HB)-Deckschicht erniedrigt (*DES-Variante F*, Kap. 3.2.4). Bei hinsichtlich ihres Schichtaufbaus analogen PLLA/SIR-Beschichtungen mit einer Zusammensetzung von 85/15 % (w/w) lagen die gemessenen Wirkstoffkonzentrationen im Eluat nahe der Nachweisgrenze des HPLC-Analyseverfahrens von 0.05 µg/ml. Deshalb wurde auf die Aufnahme der Daten in die Abbildung 55 sowie auf die weitere Untersuchung von DES diesen Typs verzichtet.

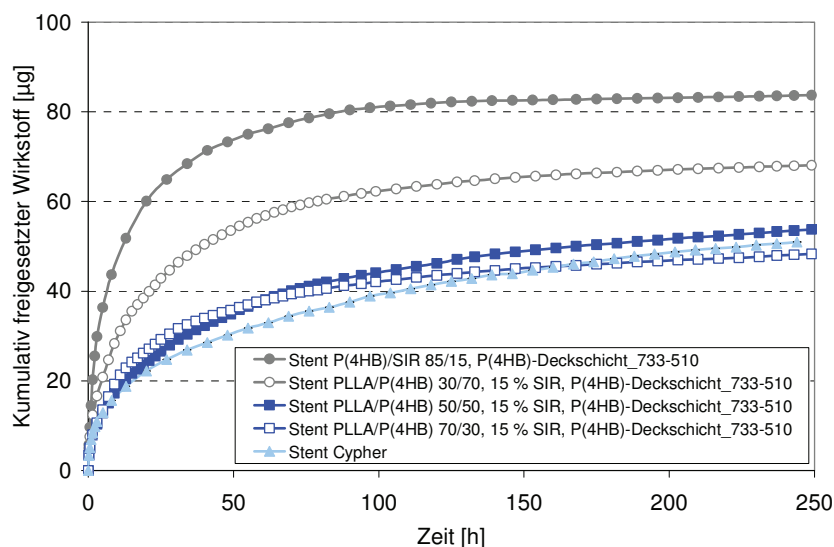


Abb. 55: In vitro Freisetzung von SIR aus PLLA/P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen (jeweils n=1) im Vergleich zum kommerziellen CYPHER-Stent (n = 1) in 0.9 %iger NaCl-Lösung/0.06 % Brij 35 (37 °C); PLLA/P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichen PLLA/P(4HB)-Blendzusammensetzungen (70/30, 50/50, 30/70 % w/w) und 15 % SIR in der PLLA/P(4HB)-Grundschicht mit einer Schichtmasse von 733 µg sowie einer SIR-freien P(4HB)-Deckschicht mit einer Schichtmasse von 510 µg.

Die Verwendung hydrophiler Polymere und deren Einfluss auf die Wirkstoffelution wurde anhand einer chemisch vernetzten Hyaluronsäure (HA)-Beschichtung experimentell getestet (*DES-Variante D*, Kap. 3.2.4). Dafür wurden CoCr-Stents zuerst mit wässriger 0.1 %iger (w/w) HA-Lösung und dann mit einer 1×10^{-4} M Dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC)-Lösung besprüht. Nach Trocknung (40 °C, Vakuum 6-8 mbar, 2 Tage) und Wägung der mit HA beschichteten Stents wurden diese für 30 Minuten mit einer 0.01 M atRA-Lösung inkubiert. Zum Schluss wurden die getrockneten HA/atRA-DES (40 °C, Vakuum 6-8 mbar, 2 Tage) einer abschließenden Wägung zur Bestimmung der installierten atRA-Masse unterzogen.

Die Ergebnisse der atRA-Freisetzung von drei mit diesem Beschichtungsverfahren hergestellten HA/atRA-DES verdeutlichen die geringe Reproduzierbarkeit des Verfahrens, da sehr unterschiedliche Freisetzungprofile resultierten, die durch die starken Unterschiede im erreichten Beladungsgrad der HA-Matrix mit atRA hervorgerufen wurden (Abb. 56).

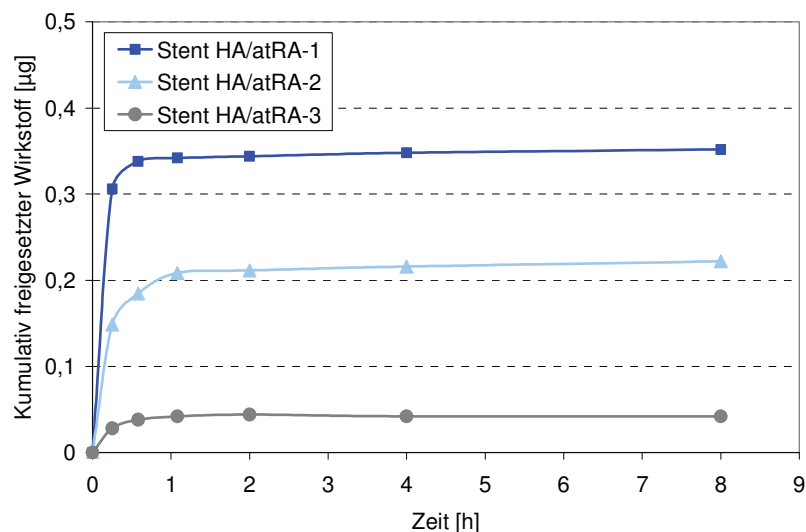


Abb. 56: In vitro Freisetzung von Tretinoin (atRA) aus chemisch vernetzten Hyaluronsäure (HA)-Stentbeschichtungen (n=3, jede Kurve repräsentiert einen Stent) in porcinem Blutplasma (37 °C); Wirkstoffinkorporation durch Inkubation der HA-Beschichtung in 0.01 M atRA-Lösung [197]

Außerdem war festzustellen, dass atRA aus der hydrophilen, quellbaren HA-Matrix innerhalb von 0.3-1 h vollständig abgegeben wurde. Die aus der HA-Beschichtung maximal freigesetzte absolute atRA-Masse von 0.35 µg war auf Grund des gewählten Verfahrens der Wirkstoffinkorporation durch Inkubation und der dadurch erreichten geringen Beladung der HA-Matrix mit atRA deutlich kleiner als bei den untersuchten PLLA/atRA-Beschichtungen, bei denen eine höhere atRA-Beladung in der PLLA-Matrix realisiert werden konnte und bei denen im Mittel absolute atRA-Massen von 23 µg atRA (PLLA/atRA 80/20 % w/w) bis 285 µg atRA (PLLA/atRA 40/60 % w/w) freigesetzt wurden (s. vergleichend Abb. 53).

Wirkstoffelution in Abhängigkeit von der Schichtdicke und vom Schichtaufbau

Die Abhängigkeit des DES-Freisetungsverhaltens von der Schichtdicke und dem Schichtaufbau wird an P(4HB)/SIR-DES (*DES-Variante F*, Kap. 3.2.4) demonstriert, die bei gleichem SIR-Anteil von 15 % (w) in der P(4HB)-Grundschrift unterschiedliche Schichtmassen und somit -dicken der Grund- und Deckschicht aufweisen (Abb. 57).

Die kumulativ höchsten SIR-Konzentrationen im Eluat wurden bei dieser Untersuchungsreihe mit den DES-Prototypen erzielt, die über die höchste Grundschriftmasse von 733 µg verfügten. Eine Retardation der Wirkstofffreisetzungsgeschwindigkeit wurde erwartungsgemäß mit zunehmender Deckschichtmasse erreicht. Die maximale deckschichtbedingte Retardation wurde innerhalb der ersten 5 Stunden beobachtet, was darauf schließen lässt, dass trotz P(4HB)-Deckschicht ein schneller Wassereintrag in die Beschichtung erfolgt. Mit zunehmender Erschöpfung des Wirkstoffreservoirs in der Polymermatrix und somit mit abnehmendem Konzentrationsgradienten wurde eine Angleichung der Elutionskurven unter geringer Freisetzungsgeschwindigkeit festgestellt.

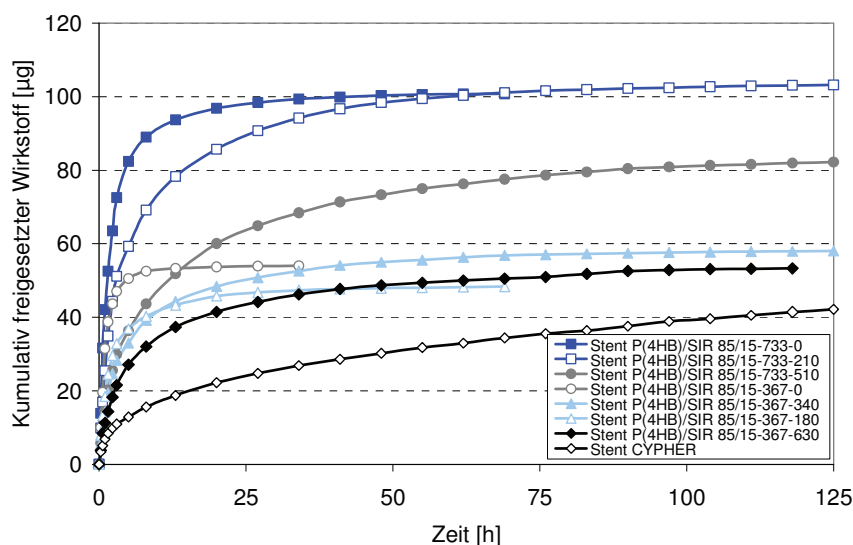


Abb. 57: In vitro Freisetzung von SIR aus P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen (jeweils n=1) im Vergleich zum kommerziellen CYPHER-Stent (n=1) in 0.9 %iger NaCl-Lösung/0.06 % Brij 35 (37 °C); P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen mit P(4HB)/SIR 85/15 % (w/w) in einer hinsichtlich der Schichtmasse und somit -dicke variierten Grundschrift (Basecoat) und mit einer hinsichtlich der Schichtmasse und somit -dicke variierten SIR-freien Deckschicht (Topcoat); Beispiele: Stent 85/15-733-0 = DES mit P(4HB)/SIR 85/15 % (w/w)-Grundschrift mit einer Schichtmasse von 733 µg, ohne Topcoat; Stent 85/15-733-210 = DES mit P(4HB)/SIR 85/15 % (w/w)-Grundschrift mit einer Schichtmasse von 733 µg, mit einem SIR-freien P(4HB)-Topcoat mit einer Schichtmasse von 210 µg.

Bei der Beladung von CoCr-Stents mit dem Mitosehemmer Paclitaxel (PTX) [242] wurden zwei unterschiedliche Strategien bei der Gestaltung des Schichtaufbaus verfolgt. So wurde zum einen das herkömmliche Beschichtungsverfahren unter Inkorporation des PTX in den

Polymerbulk angewandt (*DES-Variante H*, Kap. 3.2.4). Zum anderen wurde zunächst eine polymerfreie PTX-Grundschrift aufgetragen, die zum Schutz vor mechanischer Ablösung und zur Retardation der PTX-Freisetzung durch eine dünne formschlüssige Polymerbeschichtung abgedeckt wurde (modifizierte *DES-Variante G*, Kap. 3.2.4). Die Ergebnisse der Freisetzungsstudien mit derartigen P(4HB)/PTX-DES-Prototypen sind in der Abbildung 58 dargestellt.

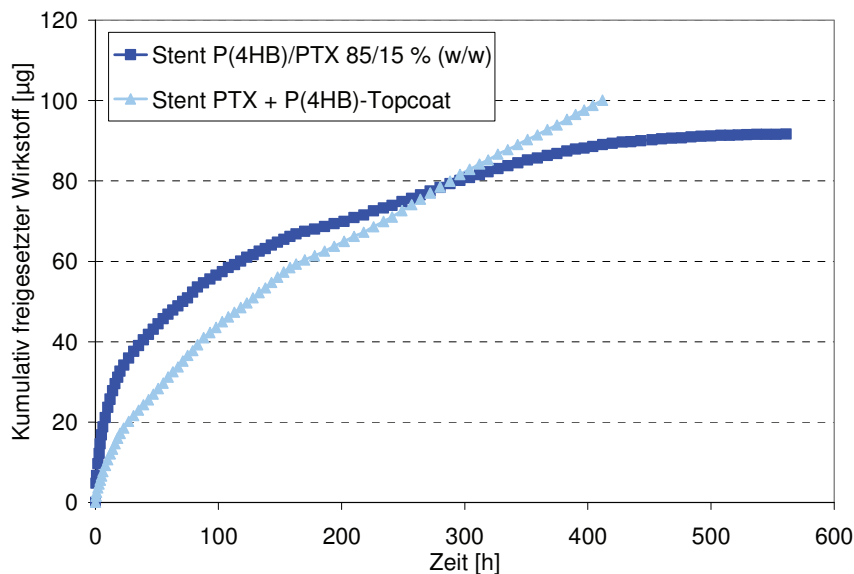


Abb. 58: In vitro Freisetzung von Paclitaxel (PTX) aus P(4HB)-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichem Schichtaufbau (jeweils $n=1$) in 0.9 %iger NaCl-Lösung (37 °C); DES-Prototyp 1: P(4HB)-Beschichtung mit Inkorporation von 15 % PTX (ca. 100 µg), DES-Prototyp 2: PTX-Grundschrift (ca. 100 µg) mit PTX-freier P(4HB)-Deckschrift (ca. 150 µg)

Bei annähernd gleicher absoluter Wirkstoffbeladung von 100 µg PTX wurden innerhalb der ersten 220 h bei der mit 15 % PTX inkorporierten P(4HB)-Beschichtung (DES-Prototyp 1) höhere PTX-Konzentrationen im Eluat gemessen als bei der reinen PTX-Beschichtung mit P(4HB)-Deckschrift (DES-Prototyp 2). Im weiteren zeitlichen Freisetzungsverlauf wurde das PTX aus dem DES-Prototyp 2 mit höherer Geschwindigkeit freigesetzt, was am stärkeren Kurvenanstieg des DES-Prototyps 2 und am Schnittpunkt beider Kurven bei annähernd 280 h erkennbar ist. Eine vollständige PTX-Freisetzung wurde beim DES vom Typ 2 nach annähernd 400 h erreicht. Die Freisetzungsgeschwindigkeit verringerte sich beim untersuchten DES des Typs 1 deutlich, was durch die Abflachung der Freisetzungskurve nach annähernd 400 h sichtbar wird. Nach annähernd 550 h war die PTX-Freisetzungsrates des DES vom Typ 1 so gering, dass die Studie beendet wurde. Die PTX-Restbeladung dieses DES betrug im Mittel 8 %.

4.4.3 Räumliches Wirkstoffverteilungsmuster in einem in vitro Imprägnierungsmodell

Außerdem wurden von *Neubert et al.* [243] im Rahmen der gemeinsamen Forschungstätigkeit der Nachwuchsgruppe „Stenttechnologien für die vaskuläre Regeneration“ (FKZ: 0402010, Leiterin: Dr. K. Sternberg) zur Untersuchung der in vitro Freisetzung von DES eine an das Arzneibuch adaptierte Methode entwickelt, bei der eine für die Freisetzungsforschung von Tabletten und Kapseln etablierte Durchflusszelle (USP 4) aus Poly(methylmethacrylat) (PMMA) als Vorbild diente (Abb. 59). Um die Wirkstoffverteilung auf der abluminalen Stentseite untersuchen zu können, wurde eine die Gefäßwand simulierende, durch den Zusatz von 10 % (w) Lipofundin lipophilisierte Alginatmatrix in die Durchflusszelle gegossen. Dabei diente ein 3 mm dicker Metallstab im Zentrum der Zelle als Platzhalter, der nach der Gelierung der Alginat-Lipofundin-Matrix entnommen wurde. In das resultierende Lumen kann anschließend der zu untersuchende DES mit Hilfe eines Ballonkatheters implantiert werden. Im unteren Teil der so adaptierten Durchflusszelle befanden sich Glasperlen von ca. 1 mm Durchmesser, die eine laminare Strömung erzeugten. Das Medium wurde von unten kommend mittels einer Schlauchpumpe mit einer Flussrate von 35 ml/min durch die Zelle geleitet [243]. Die einzelnen Komponenten wurden über PVC-Schläuche miteinander verbunden. Die Zelle wurde in einem Dissolutionstester (PT-DT7) auf 37 °C temperiert. Als Durchflussmedium wurde NaCl-haltiger Phosphatpuffer (pH 7.4) verwendet.

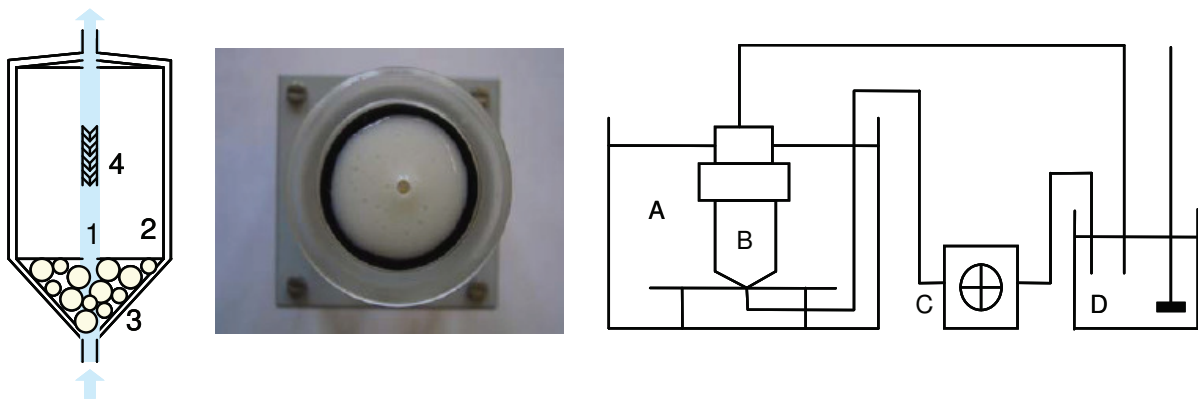


Abb. 59: Modifizierte Durchflusszelle mit Stent (schematisch, links): 1 Durchflussmedium, 2 Hydrogelmatrix, 3 Glasperlen, 4 Stent; Durchflusszelle mit lipophilisierter Alginatmatrix (Draufsicht, Mitte) und Durchflusszellenapparat (schematisch, rechts): A auf 37 °C temperiertes Wasserbad, B Durchflusszelle, C Schlauchpumpe, D auf 37 °C temperiertes Vorratsgefäß mit Rührer [243]

Für die Matrixgenerierung wurde Natriumalginat als Hydrogelbildner ausgewählt, da es nach Zugabe von Kalziumionen durch deren Einlagerung in die Hohlräume der Polyguluronatketten geliert und formstabile, im Freisetzungsmedium unlösliche Gele bildet. Alginatgele

bieten darüber hinaus den Vorteil, dass Öl-in-Wasser-Emulsionen, wie das verwendete Lipofundin, oder Proteine in die Matrix eingebettet werden können.

Zur Etablierung der Methode wurden CoCr-Stents mit dem fluoreszierenden Wirkstoff Triamteren, inkorporiert in PLLA, beschichtet. Zur qualitativen Auswertung der Triamteren-Verteilung in der Alginatmatrix wurde diese in ca. 5 mm dicke Segmente geschnitten, die zunächst in Tissue Tec eingebettet und dann in Petrolether bei -80 °C eingefroren wurden. Danach wurden mit einem Kryomikrotom (Microm HM 550) 20 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Wirkstoffdiffusion senkrecht zur Flussrichtung wurde anhand der Schnitte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200, Zeiss) bei einer Belichtungszeit von 50 ms ausgewertet. Das Lumen, in den der Stent implantiert wurde, war durch den intensiv blau fluoreszierenden ringförmigen Saum im Mikroskop erkennbar (Abb. 60).

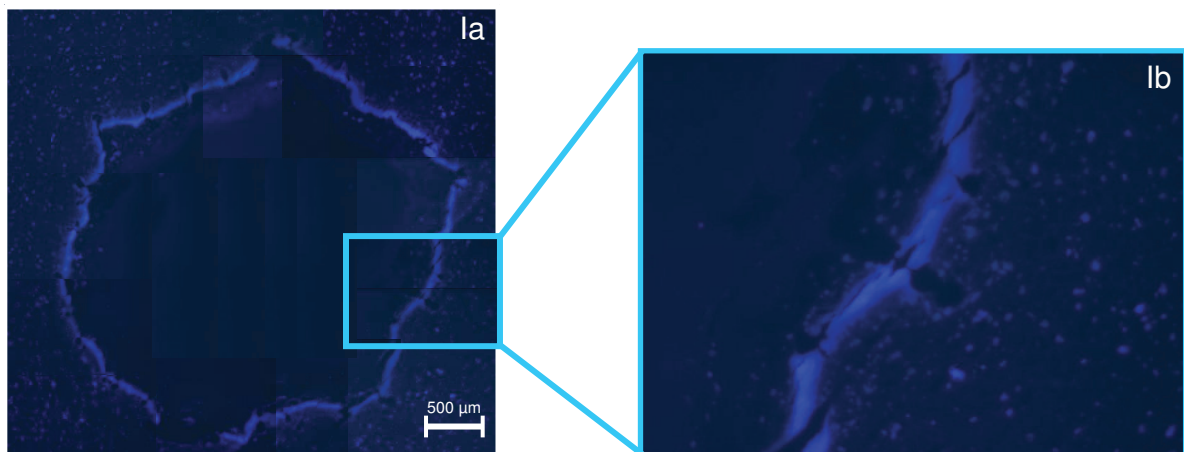


Abb. 60: Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme (la, Fotocollage) sowie Ausschnittsvergrößerung (lb) der Alginat-Lipofundin-Matrix (20 µm dicke Schnitte) nach Implantation eines mit PLLA/Triamteren (70/30 % w/w)-beschichteten Stents und Triamterenfreisetzung über 48 h [244]

Zur Untersuchung der Triamteren-Verteilung parallel zur Flussrichtung wurden 500 µm dicke Alginatfilme hergestellt, die zur Erzeugung des für die Stentimplantation notwendigen Lumens um einen 3 mm dicken Metallstab gerollt wurden. Der so aufgerollte Film wurde zur Stabilisierung in der Durchflusszelle zusätzlich mit Alginatgel umhüllt. Nach Beendigung der Freisetzungsstudie wurde der Film entnommen und direkt im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 61).

Die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung entlang der Flussrichtung hat den Vorteil, dass die Wirkstoffverteilung in Abhängigkeit von der Stentstegposition beurteilt werden kann, da die Abdrücke der Stege auf dem Alginatfilm sichtbar sind. Die Filme zeigten nach Implantation eines Polyvinylpyrrolidon (PVP)/Triamteren-Stents und Inkubation über 20 Minuten eine intensive blaue Fluoreszenz (Abb. 61, IIb), die beim unbeschichteten Stent nicht erkennbar

war (Abb. 61, IIa). Besonders hohe Triamterenkonzentrationen waren im Bereich der Stentstege durch eine verstärkte Farbintensität detektierbar.

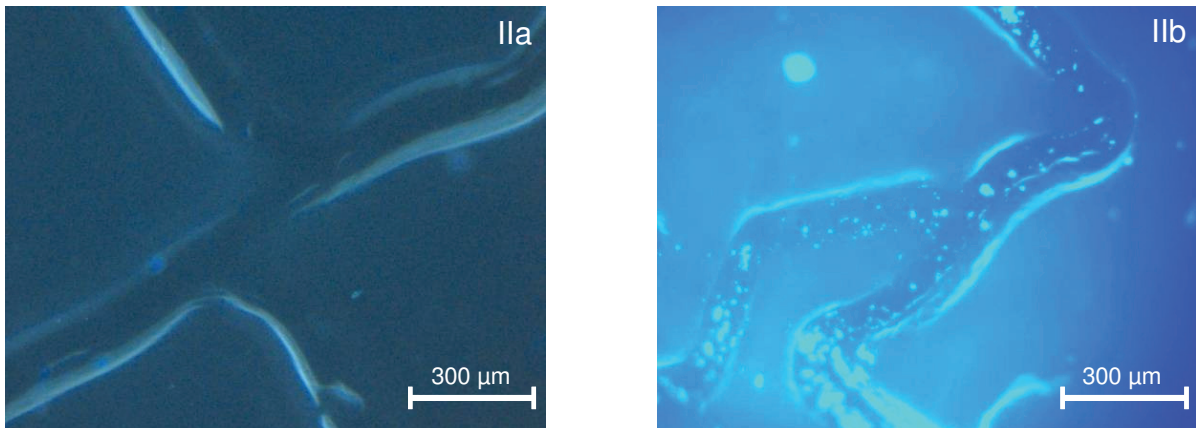


Abb. 61: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Alginatfilms nach Implantation eines unbeschichteten Stents (IIa) sowie eines mit Polyvinylpyrrolidon (PVP)/Triamteren (50/50 % w/w)-beschichteten Stents und Triamterenfreisetzung über 48 h (IIb) [243]

Das entwickelte *in vitro* Modell ist somit geeignet, eine qualitative Beurteilung der Verteilung von fluoreszierenden bzw. fluoreszenzmarkierten Wirkstoffen, die aus Stentbeschichtungen in eine lipophilisierte Alginatmatrix durch Diffusion freigesetzt wurden, vorzunehmen. Darüber hinaus ist es möglich, quantifizierende Aussagen zur Wirkstoffanreicherung in der Alginatmatrix durch die anhand von Kalibrationsgeraden nachgewiesene lineare Beziehung von Fluoreszenzintensität und Wirkstoffkonzentration sowie zur Wirkstoffanreicherung im Durchflussmedium zu treffen, was in weiterführenden Untersuchungen von *Neubert et al.* [243] gezeigt werden konnte.

4.5 *In vitro* Degradationsverhalten der polymeren Beschichtungsmatrizes

Eine weitere wesentliche Fragestellung bei der Entwicklung von DES stellt die Charakterisierung des Abbauverhaltens der verwendeten biodegradierbaren, polymeren Beschichtungsmatrizes dar. Da im Rahmen der hier vorgestellten DES-Entwicklungen bevorzugt Polyhydroxycarbonsäuren, wie PLLA, P(3HB) und P(4HB), verwendet wurden, soll in den folgenden Ausführungen näher auf diese Polymere und ihr Degradationsverhalten eingegangen werden.

Entsprechend ihrer chemischen Struktur werden die teilkristallinen Polyester PLLA, P(3HB) und P(4HB) im wässrigen Milieu durch Hydrolyse bis hin zu ihren monomeren Ausgangs-

stoffen abgebaut. Die relativ langen Degradationszeiten (Kap. 2.1.2) werden durch den hydrophoben Charakter der Polymere erklärt, der eine relativ niedrige Wasseraufnahme gewährleistet und somit eine verminderte Hydrolyserate zur Folge hat. Der hydrolytische Abbau von PLLA, P(3HB) und P(4HB) im wässrigen Milieu kann in 4 Phasen unterteilt werden: 1. Lockerung sowie Auflösung sekundärer und tertiärer Strukturen des Polymers durch Wasseraufnahme (Hydratation), 2. Hydrolytische Spaltung von Esterbindungen - Verkürzung der Polymerketten und Verringerung der Molmasse (Festigkeitsverlust), 3. Weitere Spaltung von Esterbindungen - Unterschreiten einer kritischen Molmasse (ca. 10000-20000 g/mol), die für den Massenzusammenhalt unzureichend ist (Verlust des Massenzusammenhalts), 4. Vollständiger Abbau - Fragmentierung und Auflösung der niedermolekularen Verbindungen. Während der Degradation ist ein Anstieg der Kristallinität zu beobachten, der auf die Kristallisation von Kettenfragmenten in den hydrolysierten, amorphen Bereichen des Polymers zurückzuführen ist.

Hinsichtlich des Einflusses der Molmasse auf das Degradationsverhalten der Polymere ist zu bemerken, dass generell eine schnellere Degradation mit abnehmender Molmasse diskutiert wird, dass aber auch der Kristallinitätsgrad der Polymere von Bedeutung ist. Außerdem spielen Faktoren, wie die Implantatgröße (Oberflächen-Volumen-Verhältnis), der Implantationsort und Beimengungen zum Polymer, eine große Rolle. So führen amorphe oder hydrophile Blendpartner zu einer verstärkten Wasseradsorption und damit beschleunigten Hydrolyse. Wasserlösliche Zusätze, beispielsweise auch wasserlösliche Wirkstoffe, haben durch das Herauswaschen des Zusatzes aus der Polymermatrix eine Vergrößerung der inneren Oberfläche zur Folge, was zu einer Beschleunigung der Degradation führen kann. Darüber hinaus ist durch saure bzw. basische Zusätze, beispielsweise auch in Form inkorporierter Wirkstoffe, ein beschleunigter Abbau von PLLA, P(3HB) und P(4HB) zu erwarten, da die Spaltung der Esterbindungen sowohl säurekatalysiert als auch durch den stöchiometrischen Zusatz von Basen erfolgt.

Beim hydrolytischen Polymerabbau muss in vivo zusätzlich der Einfluss von körpereigenen Enzymen diskutiert werden. So wurden höhere Degradationsraten bei PLLA-Implantaten in vivo (s.c., Ratte) gegenüber vergleichbaren in vitro Untersuchungen damit erklärt, dass am Degradationsprozess in vivo zusätzlich Enzyme, wie die Lactatdehydrogenase, beteiligt sind [245].

4.5.1 Nachweis des durch Hydrolyse bedingten Molmasseabbaus

Da PLLA, P(3HB) und P(4HB) primär durch Hydrolyse abgebaut werden, ist die Prüfung der in vitro Degradation in wässrigen Lösungen vor allem für das Materialscreening von großer

Relevanz. Die Polymerproben in Form von Folien und beschichteten Stents wurden zu diesem Zwecke in Sørensen-Puffer bei 37 °C (Echtzeittest) bzw. bei 70 °C (beschleunigter Test) eingelagert. Für die Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung wird auf die DIN EN ISO-Norm 10993-13 („Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten in Medizinprodukten aus Polymeren“) und die ISO-Norm 13781:1997-02 („Chirurgische Implantate - Poly-L-lactid als Rohmaterial und in verarbeitender Form für chirurgische Implantate - In vitro Prüfung auf Degradation“) verwiesen. Die verwendeten Methoden werden in den folgenden Ausführungen dargestellt.

Die zu untersuchenden gewogenen Polymerfolien ($\varnothing = 6 \text{ mm}$, $d = 100 \text{ }\mu\text{m}$) wurden in mit Schraubdeckel verschließbare Vials gegeben und unter sterilen Bedingungen jeweils mit 4 ml Sørensen-Puffer versetzt. Die fest verschlossenen Gefäße wurden dann bei 37 °C bzw. 70 °C über verschiedene Zeiträume gelagert. Der Puffer wurde wöchentlich erneuert. Am Entnahmezeitpunkt wurden die Polymerfolien zweimal mit je 4 ml dest. Wasser gewaschen und für einen Tag im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C getrocknet. Zur Bestimmung des degradationsbedingten Molmasseabbaus mittels Gelpermeationschromatografie (GPC) wurden die Polymerfolien in Chloroform gelöst.

Um den Molmasseabbau der polymeren Stentbeschichtungen analysieren zu können, mussten mindestens 3 Stents mit einer Schichtmasse von jeweils 500 μg gepoolt werden. In tarabestimmten Vials wurden deshalb in Abhängigkeit von der zu erwartenden Polymerfragmentation jeweils 3 bzw. 5 Stents mit 1 ml Chloroform überschichtet und verschlossen bei 50 °C 30 Minuten gelagert. Danach wurden die Stents vorsichtig entnommen und mit 150 μl Chloroform gespült. Das Chloroform wurde bei Raumtemperatur unter dem Abzug in 48 Stunden eingedampft. Anschließend erfolgten die Trocknung der in den Vials befindlichen Polymerrückstände im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C und deren Wägung. Die in den Vials befindlichen Polymerproben wurden vor der GPC-Untersuchung in definierten Mengen Chloroform gelöst.

Die GPC-Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Elutionsmittel Chloroform (ethanolstabilisiert), Temperatur 35 °C, Flussrate 1 ml/min, interner Standard Hexylbenzen und Probenkonzentration 0.7-1.4 mg/ml. Für die 3-fachen Bestimmungen jeder Polymerprobe fand eine GPC-Anlage der Firma Polymer Standards Service GmbH, (Mainz, Deutschland) Verwendung, bestehend aus der isokratischen Doppelkolbenpumpe (Spectra Series P100), dem Autosampler (Spectra Series AS100), dem Säulenofen (K4 mit Graphic Gradient Controller), dem RI-Detektor (Shodex RI 71), dem Viskositätsdetektor (η 1000), dem A/D-Wandler (VFC 24/126) sowie dem Online-Entgaser (PL-DG 804, Polymer Laboratories, Darmstadt, Deutschland). Die Trennung der Polymermoleküle entsprechend ihrer Größe wurde durch drei Trennsäulen (8 mm x 300 mm, Packungsmaterial SDV, Teilchen-

größe 10 µm) in der Anordnung von 106 Å, 105 Å und 103 Å Porengröße realisiert. Aus dem resultierenden Chromatogramm und den Viskositätswerten können mit der für das System bestimmten Kalibrierkurve die Molmassenverteilung, der Zahlenmittelwert der Molmasse (M_n) und der Gewichtsmittelwert der Molmasse (M_w) sowie der Heterogenitäts- oder Polydispersitätsindex M_w/M_n berechnet werden. Das in den weiteren Ausführungen verwendete Gewichtsmittel der Molmasse M_w wird durch die *Mark-Houwink*-Gleichung definiert, die eine Beziehung zwischen dem Gewichtsmittel der Molmasse M_w der gelösten Polymerketten und der intrinsischen Viskosität η darstellt (Gl. 4.17).

$$M_w = ([\eta] K^{-1})^{\alpha^{-1}} \quad (4.17)$$

mit

- M_w - Gewichtsmittelwert der Molmasse
- $[\eta]$ - intrinsische Viskosität
- K, α - polymer- und lösungsmittelspezifische Konstanten

K und α sind Konstanten, die nicht exakt theoretisch berechnet werden können und deshalb für jedes Polymer-Lösungsmittel-Paar empirisch bestimmt werden müssen. Sie sind von der geometrischen Gestalt (hydrodynamisches Volumen) und damit auch von der Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel abhängig. Die Werte werden mit Hilfe von Eichproben ermittelt, die eine sehr enge Molmassenverteilung mit bekanntem Viskositätsmittel haben sollten. Nach konventioneller Auswertung (Standardkalibrierung) wurden folgende Mittelwerte für K und α zugrunde gelegt: $K = 1.29 \times 10^{-4} \text{ l mol g}^{-2}$ und $\alpha = 0.82$ (PLLA) (25 °C, in Chloroform) [246] sowie $K = 1.18 \times 10^{-4} \text{ l mol g}^{-2}$ und $\alpha = 0.78$ (P(3HB)) (25 °C, in Chloroform) [247].

Degradation in Abhängigkeit vom Polymer und von Weichmacherzusätzen

Im Rahmen der durchgeführten Degradationsstudien konnte im Echtzeittest bei 37 °C an Polymerfolien gezeigt werden, dass es sich bei den untersuchten Homopolymeren PLLA und P(3HB) um langsam degradierbare Polymere handelt, bei denen nach 52 Wochen erst eine Molmassenreduktion um annähernd 45-50 % zu verzeichnen war (Abb. 62). Bei PLLA war im Vergleich zu P(3HB) im Degradationszeitraum von bis zu 26 Wochen eine niedrigere Degradationsgeschwindigkeit und somit eine weniger starke Molmassenreduktion zu beobachten, die sich aber nach 52 Wochen auf die von P(3HB) angleich. Außerdem wurde festgestellt, dass durch die Zugabe von 30 % (w) niedermolekularer P(3HB) zur hochmolekularen P(3HB) keine Erhöhung der Degradationsgeschwindigkeit zu erzielen ist. Eine beschleunigter Molmassenabbau wurde bei P(3HB) durch den Zusatz des Weichmachers Triethylcitrat (TEC) erreicht, da das Herauslösen von TEC im für die Einlagerung der Polymerproben ver-

wendeten Sørensen-Puffer zu einem erhöhten Wassereintrag in die Polymermatrix und zu einer vergrößerten Polymeroberfläche führten.

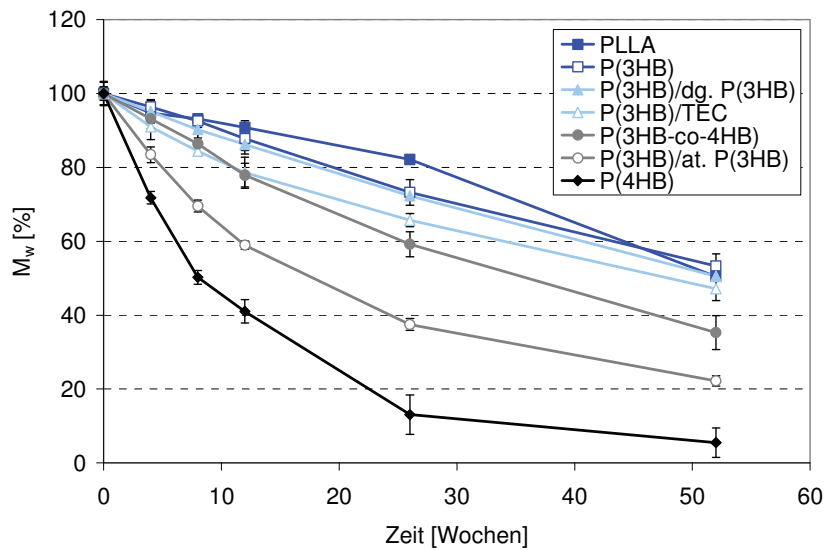


Abb. 62: Degradationsbedingter Molmasseabbau verschiedener Polymere in Sørensen-Puffer (pH 7,4, 37 °C); Prüfkörper: Polymerfolien ($\varnothing = 6$ mm, $d = 100$ μm); PLLA: reines PLLA-Homopolymer mit $M_w = 650000$ g/mol, P(3HB): reines P(3HB)-Homopolymer mit $M_w = 640000$ g/mol, P(3HB)/dg. P(3HB): Blend aus P(3HB)/degradierter P(3HB) mit $M_w = 3000$ g/mol 70/30 % w/w, P(3HB)/TEC: P(3HB) mit Weichmacherzusatz Triethylcitrat (TEC) 70/30 % w/w, P(3HB-co-4HB): Copolymer aus 3-HB/4-HB (82/18), P(3HB)/at. P(3HB): Blend aus natürlicher, isotaktischer P(3HB) und synthetischer, ataktischer P(3HB) mit $M_w = 10000$ g/mol 70/30 % w/w, P(4HB): reines P(4HB)-Homopolymer mit $M_w = 450000$ g/mol [248]

Die stärkste Degradationsbeschleunigung wurde bei P(3HB) durch deren Verblendung mit 30 % (w) ataktischer, amorpher P(3HB) (at. P(3HB)) nachgewiesen (Abb. 62), da die synthetische, amorphe P(3HB) deutlich schneller degradiert als die natürliche, teilkristalline P(3HB) [249]. Die beschleunigte Degradation des P(3HB)/at. P(3HB)-Blends manifestierte sich in einer Molmassenreduktion nach 52 Wochen um annähernd 80 %. Außerdem ist von Vorteil, dass die Hydrolyse von amorpher P(3HB) zum gleichen natürlichen Abbauprodukt 3-Hydroxybuttersäure (3-HB) führt und somit zusätzlich auftretende Biokompatibilitäten durch den Blendpartner ausgeschlossen werden können. Auch das untersuchte Copolymer der 3-Hydroxybuttersäure und 4-Hydroxybuttersäure (P(3HB-co-4HB) 82/18) zeigte gegenüber dem Homopolymer P(3HB) einen schnelleren Abbau innerhalb des Untersuchungszeitraumes, da nach 52 Wochen eine Verringerung der Molmasse um annähernd 65 % resultierte. Die beschleunigte Degradation sowohl von P(3HB-co-4HB) als auch von P(4HB) im Vergleich zu P(3HB) kann mit dem Fehlen der Methylgruppe bei 4-HB begründet werden, da die bei P(3HB) vorhandene hydrophobe Methylgruppe am asymmetrischen C-Atom den Angriff des Wassers und somit die Hydrolyse der Esterbindung sterisch behindert. Beim Homopolymer P(4HB) war nach 52 Wochen ein Molmasseabbau um über 90 % mit Hilfe der GPC nachzuweisen.

Degradation in Abhängigkeit vom Wirkstoffzusatz

Die Abhängigkeit des Degradationsverhaltens vom Wirkstoffzusatz als relevanter Einflussgröße für die Beurteilung des Degradationsverhaltens von DES-Beschichtungen wurde an PLLA sowie an PLLA mit Zusatz von 30 % Wirkstoff im beschleunigten Test bei 70 °C untersucht (Abb. 63). Dafür wurden PLLA-Folien verwendet, die mit den Modellwirkstoffen TETD bzw. CsA beladen waren.

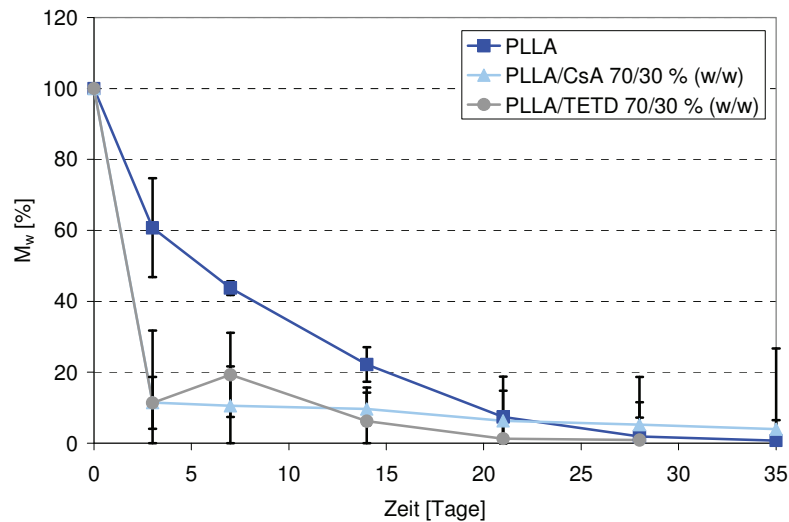


Abb. 63: Degradationsbedingter Molmasseabbau wirkstoffbeladener Polymerfolien ($\varnothing = 6$ mm, $d = 100$ μ m) in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 70 °C); PLLA: reines PLLA-Homopolymer mit $M_w = 650000$ g/mol; PLLA/CsA 70/30 % (w/w): PLLA-Matrix, in die 30 % Cyclosporin A inkorporiert wurde; PLLA/TETD 70/30 % (w/w): PLLA-Matrix, in die 30 % Disulfiram inkorporiert wurde.

Die Untersuchungen zeigten, dass in der initialen Degradationsphase von bis zu 14 Tagen eine deutlich beschleunigte Degradation des PLLA infolge Wirkstoffzusatzes stattfand. Dies kann damit erklärt werden, dass durch die aus der Wirkstoffelution resultierende Wasseraufnahme in die gebildeten Hohlräume der hydrophoben Polymermatrix und die Vergrößerung der inneren Oberfläche eine höhere Anzahl von Esterbindungen gespalten wurde. Die PLLA-Degradation war bei den mit TETD inkorporierten Proben nach 28 Tagen vollständig. Bei den CsA enthaltenen PLLA-Proben war der Molmassenabbau nach 35 Tagen auf 96 % vorangeschritten. Die reine PLLA-Matrix war nach 35 Tagen nahezu vollständig degradiert, da nur noch 0.8 % der ursprünglichen Molmasse mit Hilfe der GPC detektiert wurden.

Die Unterschiede in der Degradation der PLLA-Matrix bei Zusatz der lipophilen Wirkstoffe TETD und CsA können durch die langsamere Elution des großen CsA-Moleküls ($M = 1202.6$ g/mol) gegenüber dem TETD-Molekül ($M = 296.5$ g/mol) verursacht worden sein, da nachgewiesen wurde, dass die Wirkstoffelution nach initialem „burst release“ von CsA unter den gewählten Bedingungen langsamer verlief als die von TETD. Die TETD-Freisetzung war

nach etwa 14 Tagen und die CsA-Freisetzung war nach etwa 21 Tagen abgeschlossen. Somit konnte während der Einlagerung der Proben, der PLLA/TETD-Komposit stärker vom Wasser durchdrungen werden als der PLLA/CsA-Komposit, was die tendenziell etwas schnellere Degradation der PLLA-Matrix erklärt, die mit TETD inkorporiert wurde.

Degradation von Stentbeschichtungen nach β -Sterilisation

Weiterhin wurde getestet, welchen Einfluss die β -Sterilisation mit einer für Medizinprodukte üblichen Strahlendosis von 25 kGy auf das Degradationsverhalten von PLLA hat. Um eine realitätsnahe Beurteilung bei relevantem Oberflächen-Volumen-Verhältnis für DES vornehmen zu können, wurden deshalb β -sterilisierte PLLA-Stentbeschichtungen mit einer Dicke von annähernd 10 μm im Vergleich zu unsterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen in Sørensen-Puffer bei 70 °C eingelagert und hinsichtlich ihres Degradationsverhaltens untersucht (Abb. 64).

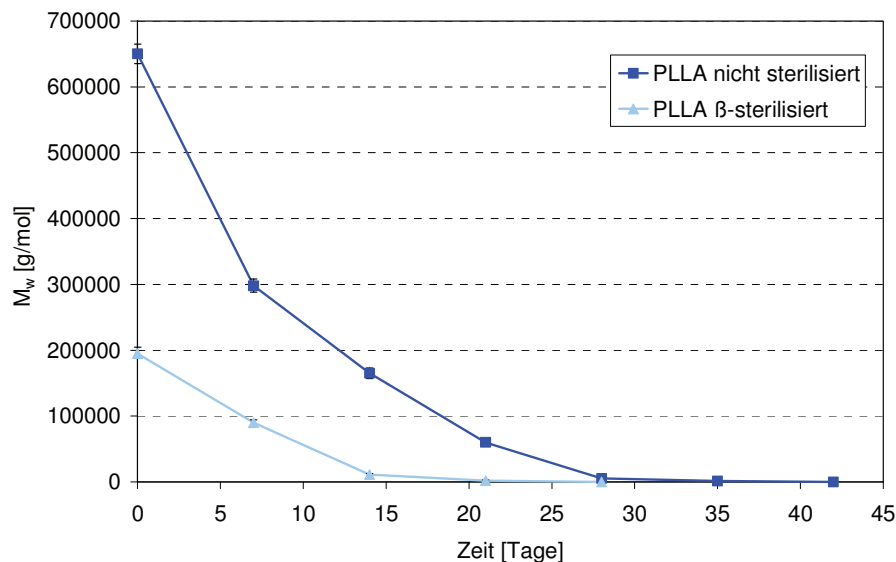


Abb. 64: Degradationsbedingter Molmasseabbau unsterilierter und β -sterilierter PLLA-Stentbeschichtungen ($d = 10 \mu\text{m}$) in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 70 °C); pro Probennahmezeitpunkt wurden $n = 3$ Stents (für nicht sterilisierte Stents bis einschließlich 21 Tage) und $n = 5$ Stents (für alle β -sterilisierten Stents und nicht sterilisierten Stents ab 28 Tagen Einlagerungsdauer) herangezogen [83]

Da durch die β -Sterilisation annähernd 70 % der ursprünglichen Molmasse von PLLA abgebaut wurden, degradierten die sterilisierten deutlich schneller als die nicht sterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen. Ein nahezu vollständiger Abbau der sterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen war nach 21 Tagen zu verzeichnen. Das Degradationsverhalten der unsterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen war mit dem der untersuchten PLLA-Folien (Abb. 63) vergleichbar, da auch hier nach 35 Tagen die PLLA-Matrix so stark abgebaut war, dass die Proben der GPC nicht mehr zugeführt werden konnten. In diesem Zusammenhang ist zu be-

rücksichtigen, dass mit dem beschleunigten Degradationstest innerhalb von 21 Tagen ein Einlagerungszeitraum bei 37 °C simuliert wird, der vergleichend mit einem PLLA ähnlicher Molmasse (Resomer® L210, $M_w = 280000$ g/mol, Boehringer-Ingelheim Pharma, Ingelheim, Deutschland) einer Degradationszeit bei 37 °C von etwa 2 Jahren entspricht [248].

4.5.2 Nachweis des Masseverlustes infolge Polymerfragmentation

Der Masseabbau der PLLA-Stentbeschichtungen während der *in vitro* Degradation als Maß für deren Fragmentation wurde durch Wägung mit Hilfe einer Analysenwaage (Typ: Kern 770, Ablesbarkeit ± 10 μ g) an den zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten entnommenen und getrockneten Stents bestimmt (Abb. 65).

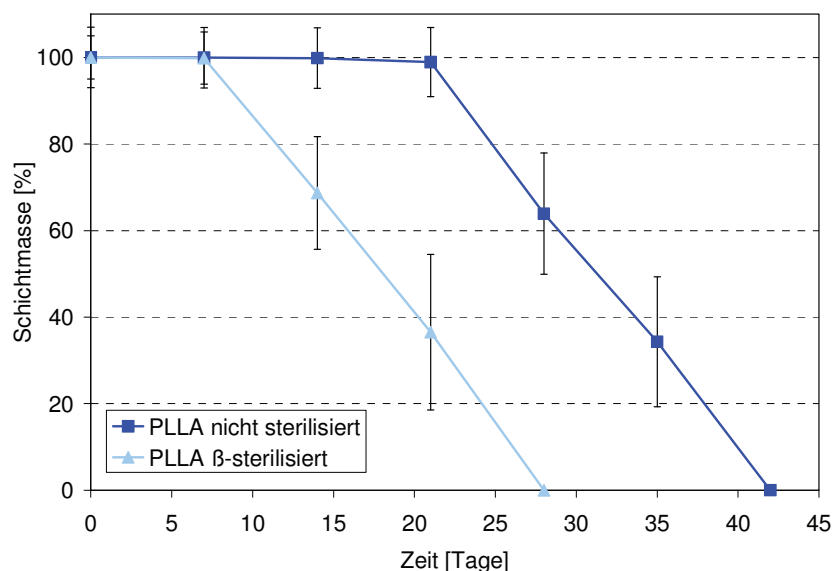


Abb. 65: Degradationsbedingter Masseabbau unsterilierter und β -sterilierter PLLA-Stentbeschichtungen ($d = 10$ μ m) in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 70 °C)

Die Untersuchungen zum degradationsbedingten Masseabbau ergaben, dass bei den β -sterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen verursacht durch den vorangeschrittenen Molmasseabbau (im Vergleich dazu Abb. 64) bereits nach 7 Tagen die Schichtfragmentation einsetzte. Die Einlagerung der unsterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen in Sørensen-Puffer führte erst nach 21 Tagen zu einem deutlichen Masseabbau.

Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Oberflächenmorphologie der β -sterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen während des Degradationsprozesses bei 70 °C vorgenommen, die zeigen, dass es nach 7 Tagen zu Rissbildungen in der Beschichtung und zu ersten Fragmentablösungen kam. Nach 14 Tagen verlor die sterilisierte PLLA-Beschichtung ihre mechanische Integrität, die mit einer starken Ablösung der Schichtfragmente vom

Stentgrundkörper einherging (Abb. 66). Da die Temperatur im Schnelltest über der Glasübergangstemperatur von PLLA liegt (s. Kap. 2.1.2), das Material jedoch in der Praxis unterhalb der Glasübergangstemperatur eingesetzt wird und zudem ein stark beschleunigter Polymerabbau bei 70 °C erfolgt (s. Kap. 4.5.1), sind derartige Fragmentationen der PLLA-Schicht bei 37 °C erst nach einer Degradationszeit von 6-9 Monaten zu erwarten.

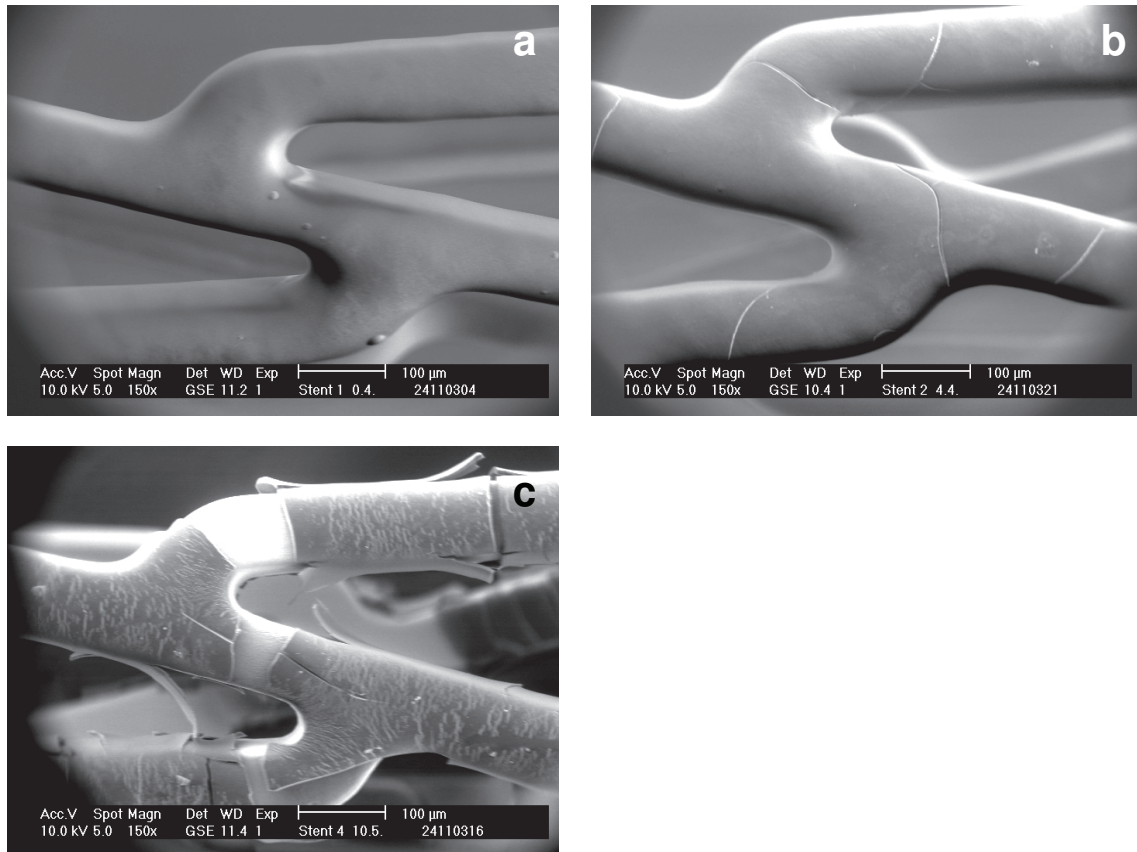


Abb. 66: Rasterelektronenmikroskopische (ESEM) Aufnahmen von β -sterilisierten PLLA-beschichteten Stents nach 0 (a), 7 (b) und 14 (c) Tagen in vitro Degradation (in Sørensen-Puffer, pH 7.4, 70 °C)

Weiterhin konnte in im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in vivo Studien im Tiermodell Kaninchen nachgewiesen werden, dass die Endothelialisierung von DES auf der Basis von PLLA nach 4 Wochen Implantation und somit weit vor dem Beginn der Fragmentation abgeschlossen ist (s. Kap. 5.5) und dass somit eine unkontrollierte Abgabe von Schichtfragmenten in das Stentlumen hinein, die einen Wiederverschluss des Stents bzw. Irritationen in der Gefäßwand verursachen können, auszuschließen ist. Außerdem ist daraus abzuleiten, dass biodegradierbare Polymere, wie PLLA, trotz ihrer degradationsbedingten Fragmentationsneigung als Beschichtungsmaterialien für DES empfohlen werden können.

4.6 Ermittlung klinisch relevanter Funktionalitätsparameter

Neben den in den Kapiteln 4.1 bis 4.5 dargestellten grundlagenorientierten Untersuchungen zur Entwicklung und Charakterisierung von DES-Prototypen steht im folgenden Kapitel die Funktionalitätsprüfung zu deren Eignung für den klinischen Alltag im Vordergrund. Dazu zählen Untersuchungen zur Sterilisierbarkeit von DES (Kap. 4.6.1), zur Systemintegrität zwischen DES und Ballonkatheter (Kap. 4.6.2) sowie zu den tribologischen Eigenschaften ausgewählter DES-Systeme (Kap. 4.6.3).

4.6.1 Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren auf Drug-Eluting Stent-Beschichtungen

Die Anwendung von Werkstoffen als Implantatmaterialien schreibt zwingend deren Sterilität vor, die durch verschiedene etablierte Standard-Sterilisationsverfahren erreicht werden kann. Durch die Sterilisation sollte bei gleichzeitiger Gewährleistung der Abtötung aller Mikroorganismen inklusive der Dauerformen und Sporen die chemische und mechanische Beschaffenheit der Implantatmaterialien gar nicht oder nur wenig beeinflusst werden.

Für die biomedizinische Anwendung kommen vor allem in Betracht:

- die Dampfsterilisation mit gespanntem und gesättigtem Wasserdampf
- die Gassterilisation mit Formaldehyddampf (FAD) bzw. Ethylenoxid (EtO)
- die Plasmasterilisation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
- die Strahlensterilisation mit β - oder γ -Strahlung.

Die Sterilisation mit Wasserdampf bei ca. 120 °C und 2 bar Druck für 20 Minuten ist für biodegradierbare Polymere im Allgemeinen nicht geeignet, da deren hydrolytischer Abbauprozess bereits während der Sterilisation beginnen würde. Zusätzlich kann die thermische Behandlung, die im Rahmen der Sterilisation notwendig ist, zu einer Veränderung der Kristallinität, zu einem thermischen Abbau oder zum Erweichen bzw. Schmelzen des Polymers führen. Darüber hinaus ist eine thermische Zersetzung von in die Polymere eingebetteten Wirkstoffen bei diesen hohen Temperaturen möglich, die den Verlust der biologischen Aktivität der Wirkstoffe zur Folge hat.

Auch die zum Zwecke der Sterilisation verwendeten Substanzen, wie FAD und EtO, dürfen keine Inaktivierung der inkorporierten Wirkstoffe hervorrufen, indem sie mit diesen chemisch reagieren. Außerdem müssen diese Substanzen vollständig aus den Implantaten entfernbar sein, da sie toxisch und zum Teil kanzerogen wirken.

Die sterilisierende Wirkung bei der Plasmasterilisation ist einerseits auf die im Plasma generierte UV-Strahlung und andererseits auf die Bildung freier Radikale sowie den Beschuss der Mikroorganismen mit Ionen zurückzuführen. Bei der Plasmasterilisation von wirkstoffbeladenen Polymeren ist somit zu beachten, dass deren Oberflächen aktiviert werden und nach der Plasmasterilisation gegebenenfalls veränderte Eigenschaften aufweisen, die sich zum einen in einer drastischen Reduktion der biologischen Aktivität der inkorporierten Wirkstoffe und zum anderen in einer Verschlechterung der Biokompatibilität der Polymeroberfläche ausdrücken können.

Sterilisationsbedingte Veränderungen des Polymers

Aufgrund der Nachteile, die sich durch die Wasserdampf- und die Plasmasterilisation für wirkstoffbeladene, biodegradierbare Polymere ergeben, wurden für DES als potentielle Sterilisationsverfahren die Gassterilisation mit EtO sowie die Sterilisation mit β - und γ -Strahlen untersucht. Das Ziel der Studie war, die Molmasse von PLLA-Folien nach Sterilisation mit Hilfe der GPC zu bestimmen und den Einfluss der Strahlendosis bei β - und γ -Sterilisation auf den zu erwartenden Molmasseabbau zu analysieren (Abb. 67).

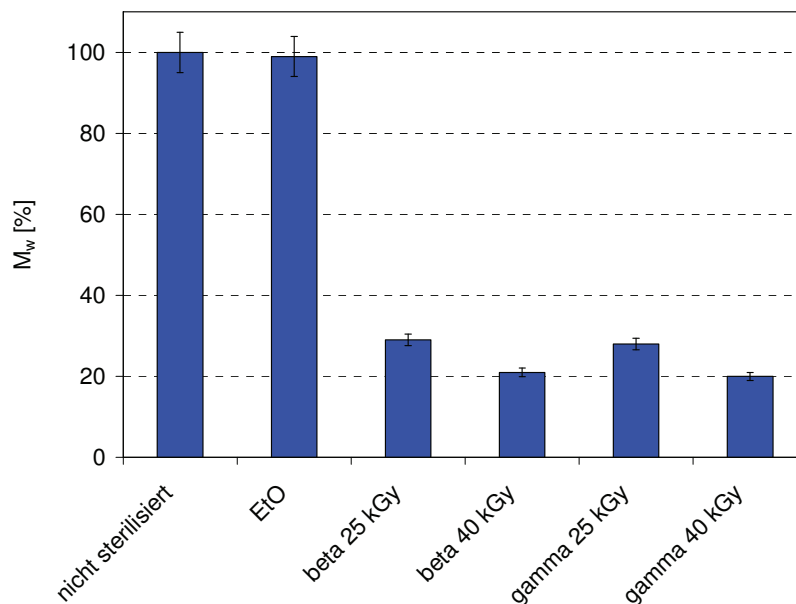


Abb. 67: Abbau von PLLA infolge Sterilisation mit Ethylenoxid (EtO), β -Strahlen (25 kGy, 40 kGy) und γ -Strahlen (25 kGy, 40 kGy)

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass sowohl die β - als auch die γ -Sterilisation bei einer Strahlendosis von 25 kGy (4.5 MeV) einen Molmasseabbau von annähernd 70 % verursachen. Bei einer Erhöhung der Strahlendosis auf 40 kGy (4.5 MeV) wurde bei beiden Strahlensterilisationen ein Molmasseabbau von annähernd 80 % festgestellt. Werden für DES die β - oder γ -Sterilisation verwendet, müssen die Auswirkungen des strahlungsindu-

zierten Molmasseabbaus sowohl bei der Beurteilung des Degradationsverhaltens (Kap. 4.5) als auch des Elutionsverhaltens (Kap. 4.4) Berücksichtigung finden. Demzufolge sollten die damit im Zusammenhang stehenden in vitro Prüfungen an sterilisierten DES durchgeführt werden. Die EtO-Sterilisation hatte dagegen keine nennenswerte Reduktion der Molmasse von PLLA zur Folge.

Die mit der Sterilisation einhergehenden chemischen Veränderungen können ferner eine Änderung der mechanischen Eigenschaften des Polymers bewirken. Um dies zu prüfen, wurden deshalb von *Grabow et al.* [250] mechanische Untersuchungen unter Verwendung eines *Dynamic Mechanical Analyzer* (DMA 2980, TA-Instruments, New Castle, Delaware, USA) bei 37 °C durchgeführt. Die sterilisierten PLLA-Proben wurden im Vergleich zur unsterilisierten PLLA-Probe einer Zugbeanspruchung unterworfen und jeweils der Elastizitätsmodul (E-Modul), die Reißdehnung und die Zugfestigkeit ermittelt (Abb. 68). Die Prüfgeschwindigkeit betrug 1 N/min.

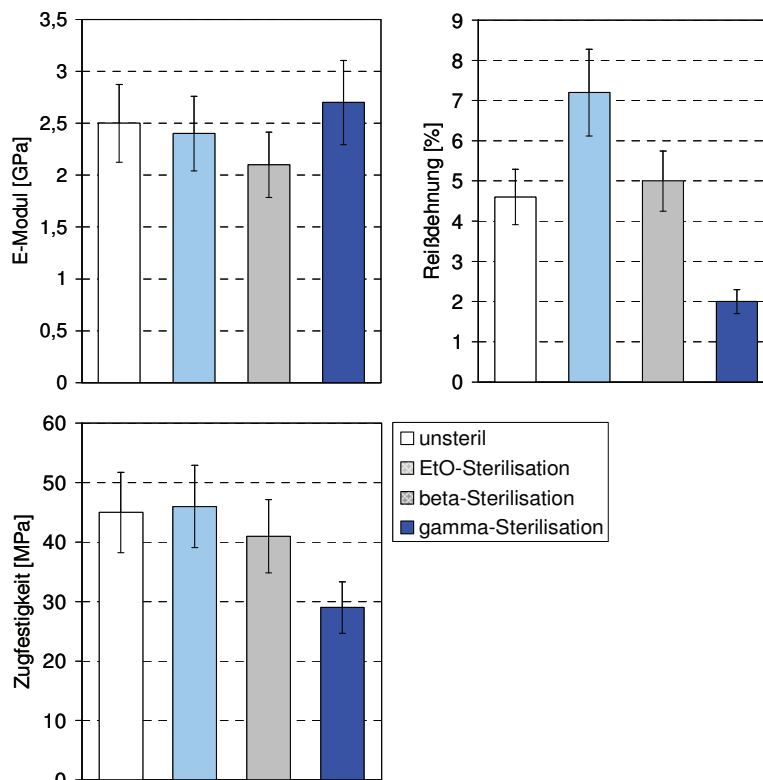


Abb. 68: Änderung ausgewählter im Zugversuch ermittelter mechanischer Kennwerte von PLLA-Prüfkörpern infolge Sterilisation mit Ethylenoxid (EtO), β -Strahlen (25 kGy) und γ -Strahlen (25 kGy) (Grabow, Schlun, Sternberg et al. [250])

Die EtO-Sterilisation bewirkte eine deutliche Erhöhung der Reißdehnung der PLLA-Prüfkörper, die mit einer unvollständigen EtO-Entfernung aus der PLLA-Matrix und der damit verbundenen weichmachenden Wirkung des in der Matrix verbliebenen EtO erklärt werden kann. Die mechanischen Kennwerte E-Modul und Zugfestigkeit blieben im Vergleich zur un-

sterilisierten PLLA-Probe nahezu unverändert. Die β -Sterilisation verursachte eine leichte Erniedrigung des E-Moduls und der Zugfestigkeit, die im Rahmen der ermittelten Standardabweichungen im Vergleich zur unsterilisierten PLLA-Probe tolerierbar ist. Die γ -Sterilisation erwies sich dagegen als weniger geeignet, da diese energiereiche Strahlung zu einer deutlichen Erniedrigung der Reißdehnung und der Zugfestigkeit führte, die mit der Erhöhung des Kristallinitätsgrades der γ -sterilisierten PLLA-Prüfkörper korrelierte [250].

Sterilisationsbedingte Veränderungen des Wirkstoffs

Die Stabilität der Wirkstoffe während des Sterilisationsprozesses wurde zunächst an der Reinsubstanz untersucht, die den für DES in Frage kommenden Sterilisationsverfahren mit EtO und β -Strahlen unterzogen wurde. Die Auswertung der sterilisierten Wirkstoffe hinsichtlich der Bildung möglicher Additions- und Zersetzungsprodukte erfolgte mit der HPLC und wenn erforderlich zur Strukturaufklärung der Produkte mit der NMR-Spektroskopie. Bei komplexen Wirkstoffmolekülen, wie SIR, kann außerdem die Kombination HPLC-MS angewendet werden, bei der die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie zur Auftrennung und die Massenspektrometrie zur Identifikation der Substanzen dient.

Danach wurden darüber hinaus die mit dem Wirkstoff inkorporierten polymeren Stentbeschichtungen hinsichtlich ihrer Sterilisationsfähigkeit geprüft, indem der Wirkstoff mit organischen Lösungsmitteln aus der sterilisierten Stentbeschichtung extrahiert und der Analyse zugeführt wurde. Um eine zusätzliche thermische Schädigung der Wirkstoffe bei der EtO-Sterilisation ausschließen zu können, wurde mit Kaltgas bei 35 °C sterilisiert. Wirkstoffe, die mit EtO reagierende funktionelle Gruppen, wie Hydroxyl- oder Aminogruppen, enthielten, wurden bevorzugt mit β -Strahlen behandelt.

4.6.2 Systemintegrität zwischen Drug-Eluting Stent und Ballonkatheter

Komplikationen bei der DES-Implantation können auftreten, wenn sich der auf den Ballonkatheter gecrimpte DES vorzeitig vom Ballon ablöst. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen geprüft, ob durch die DES-Beschichtung die Systemintegrität zwischen dem Stent und dem Ballonkatheter im Vergleich zum unbeschichteten Stent herabgesetzt wird.

Der strukturelle Verbund des Systems DES-Ballonkatheter wurde anhand von Stentabzugstests ermittelt. Dazu wurden sowohl mit PLLA beschichtete Stents mit und ohne Wirkstoffinkorporation als auch lediglich (α -SiC:H)-beschichtete Stents mit einer Stentlänge von 13 mm auf Ballonkatheter (3.5x15 mm) manuell aufgecrimpt. Der auf dem Ballon montierte Stent wurde mittels Klebestreifen in einem Haltejoch in der oberen Einspannung einer Uni-

versalprüfmaschine (Zwick, Typ BZ2.5/TN1S) fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Stentenden, insbesondere das für den Abzug relevante distale Ende, durch die Fixierung nicht beeinflusst werden. Der Katheterschaft wurde in die untere Einspannung der Prüfmaschine geklemmt, wobei durch einen aufgeschobenen Silikonschlauch Beschädigungen des Schafts vermieden werden sollten. Die freie Einspannlänge zwischen der Unterkante des Haltejochs und der unteren Einspannung betrug 200 mm. Die Messung wurde mit einer Prüfgeschwindigkeit von 20 mm/min durchgeführt. Eine eingestellte Vorkraft von 0.001 mN sicherte den exakten Messbeginn. Als Parameter für die Crimpfestigkeit diente das mit dem Lösen des Stents aus der Crimpposition korrespondierende Kraftmaximum der ermittelten Kraft-Weg-Kurve beim Abzug (Abb. 69).

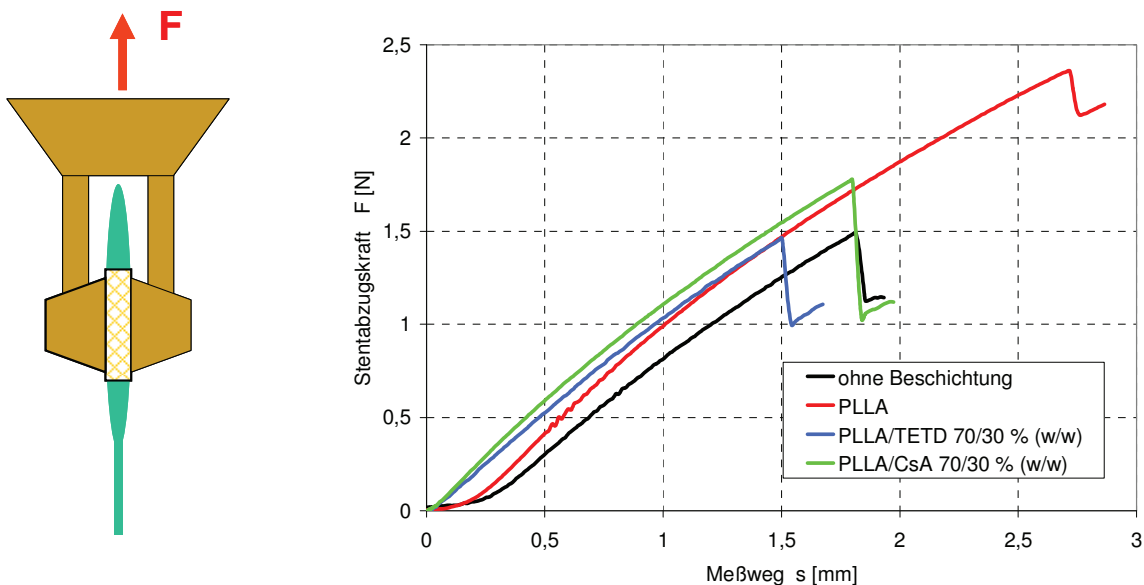


Abb. 69: Schematische Darstellung zur Ermittlung der Stentabzugskraft mittels Universalprüfmaschine (links) und ermittelte Kraft-Weg-Kurven beim Abzug von (α -SiC:H)-beschichteten Stents ohne PLLA-Beschichtung, mit PLLA-Beschichtung, mit PLLA/Disulfiram (TETD)-Beschichtung 70/30 % (w/w) bzw. mit PLLA/Cyclosporin A (CsA)-Beschichtung 70/30 % (w/w) (rechts)

Die in der Tabelle 17 zusammengefassten Ergebnisse der Abzugstests verdeutlichen, dass für das Abziehen des gecrimpten Stents vom Ballon bei der reinen PLLA-Beschichtung eine höhere Kraft aufgewendet werden musste als bei der (α -SiC:H)-Beschichtung. Somit wurde durch die PLLA-Beschichtung eine Erhöhung der Crimpfestigkeit des Stents auf dem Ballon erreicht. Durch die Inkorporation von Wirkstoffen in die PLLA-Matrix wurde sowohl mit TETD als auch mit CsA eine Verringerung der Stentabzugskraft gegenüber der reinen PLLA-Beschichtung beobachtet, die aber nicht die mit dem klinisch etablierten (α -SiC:H)-beschichteten Stent erreichte Stentabzugskraft unterschritt, so dass von einer sicheren Applizierbarkeit der entwickelten DES auf PLLA-Basis ausgegangen werden kann.

Tab. 17: Ergebnisse der Abzugstests mittels Universalprüfmaschine zur Ermittlung der Systemintegrität Stent - Ballonkatheter

Stentbeschichtung	Stentabzugskraft [N]
a-SiC:H	1.49
PLLA	2.36
PLLA/TETD 70/30 % (w/w)	1.46
PLLA/CsA 70/30 % (w/w)	1.78

Als grenzwertig sind in dieser praxisnahen Prüfung Stentabzugskräfte von ≤ 1.2 N zu betrachten. In weiteren Untersuchungen zum Einfluss der Wirkstoffbeladung auf die Crimpfestigkeit von DES auf PLLA-Basis konnte gezeigt werden, dass mit 50 % CsA in der PLLA-Matrix im Mittel 10 % höhere Abzugskräfte aufgebracht werden mussten als bei den DES mit 30 % CsA-Beladung (jeweils $n=3$ Stents) [83].

4.6.3 Schichtintegrität nach „Delivery“ im in vitro Gefäßmodell

Für die Untersuchung der entwickelten DES hinsichtlich ihrer Schichtintegrität bei praxisnaher Belastung wurde eine Prüfstrecke mit Gefäßsimulation nach *Schmidt et al.* [251] verwendet (Abb. 70).

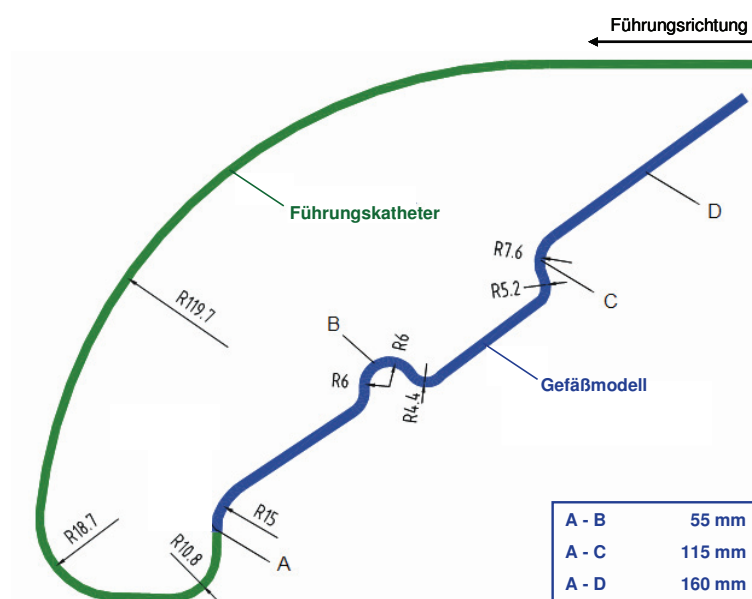


Abb. 70: Schematische Darstellung der in vitro Prüfstrecke mit Gefäßsimulation nach *Schmidt et al.* [251] zur Untersuchung der Schichtintegrität von DES nach Delivery

Bei dieser in vitro Prüfstrecke wird der auf den Ballonkatheter gecrimpte DES im Wasserbad bei 37 °C zuerst durch einen Führungskatheter und dann durch eine mit Hilfe eines Polyethylenschlauchs simulierte, nachgeschaltete Gefäßstrecke mit einem Innendurchmesser von 2.0 mm geschoben wurde (= „Delivery“). Nach der Passage der Prüfstrecke erfolgte die Stentdilataion mittels Handpumpe mit einem Druck von 10 bar.

Um die Schichtintegrität nach Delivery und Dilatation beurteilen zu können, wurden die DES getrocknet und der hochauflösenden Rasterelektronenmikroskopie (REM) zugeführt. Exemplarisch sind in der Abbildung 71 REM-Aufnahmen von mit PLLA/Pimecrolimus (55/45 % w/w) beschichteten Stentoberflächen dargestellt, die verdeutlichen, dass selbst bei hohen Wirkstoffbeladungen in der PLLA-Matrix keine Einrisse oder flächenhaften Ablösungen der Schichten zu verzeichnen waren.

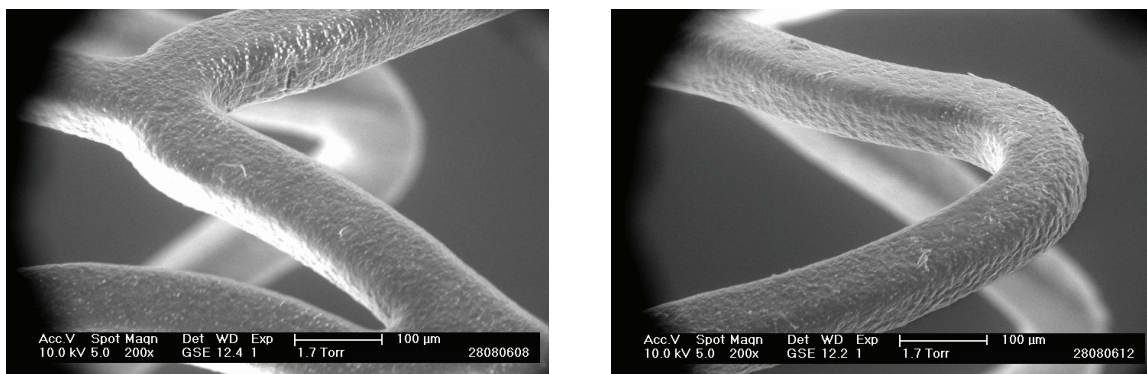


Abb. 71: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (ESEM, 200x) einer PLLA/Pimecrolimus-Beschichtung (PLLA/Pimecrolimus 55/45 % w/w) auf einem gecrimpten, β -sterilisierten und dilatierten Metallstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.0 mm, Länge: 18 mm) nach Delivery im in vitro Gefäßmodell, Schichtmasse ca. 1800 μ g

Dies lässt auch unter praxisnahen Bedingungen auf eine hohe strukturelle Integrität zwischen dem Stentgrundkörper und der Stentbeschichtung schließen, die bereits im Kapitel 4.3.1 an DES derselben Beschichtungscharge nach Crimpung und β -Sterilisation unter Beweis gestellt werden konnte.

Die Schichtintegrität wird dabei maßgeblich durch das feindisperse Versprühen der Polymer-Wirkstoff-Lösungen und den damit verbundenen Formschluss der Beschichtung um die Stentstege herum erreicht. Da selbst in den Stentzonen hoher Deformation kein Einreißen und Ablösen der Stentbeschichtung beobachtet wurde, konnte somit gezeigt werden, dass sich das teilkristalline, relativ spröde PLLA als Beschichtungsmatrix für DES unter praxisnaher Belastung eignet, sofern die angestrebten Schichtdicken von 5-10 μ m nicht überschritten werden. Sind hohe absolute Wirkstoffdosen in der Stentimplantationszone und somit höhere Schichtdicken von etwa 20 μ m notwendig, wurde zur Verhinderung der Rissbil-

dung beispielsweise eine Verblendung von PLLA mit P(4HB) vorgenommen (Kap. 4.4.2). Darüber hinaus können in der Medizintechnik etablierte und hinsichtlich ihrer Biokompatibilität als unbedenklich eingestufte Weichmacher, wie z. B. Triethylcitrat (TEC), verwendet werden. Der mit dem Zusatz des Weichmachers TEC zusätzlich verbundene Vorteil des schnelleren Abbaus der Polymermatrix wurde im Kapitel 4.5.1 nachgewiesen.

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen nach Passieren einer künstlichen Gefäßstrecke bestätigen ein optimales tribologisches Verhalten der entwickelten DES am Beispiel von PLLA/Pimecrolimus-DES und veranschaulichen, dass durch diese Stentbeschichtungen die Schichtintegrität bei DES-Implantation und -Dilatation sichergestellt werden kann.

5. Entwicklung von Drug-Eluting Stents für die Kardiologie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DES zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit und zur Verhinderung der In-Stent-Restenose (Kap. 3.1.1) entwickelt, bei denen Koronarstents (Durchmesser 3.5 mm, Länge 13 mm) aus einer CoCr-Legierung mit den Wirkstoffen Tetraethylthiuramdisulfid (TETD) bzw. Genistein beschichtet wurden, die in hochmolekulares PLLA (Resomer[®] L214, $M_w = 650000$ g/mol, Fa. Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) eingebettet waren. Die Stents wurden mit den PLLA/Wirkstoff-Lösungen im Sprühverfahren (Kap. 4.2.2) beschichtet. Die Oberflächenmorphologie der DES-Beschichtungen ist an Hand der REM-Aufnahmen in der Abbildung 72 ersichtlich.

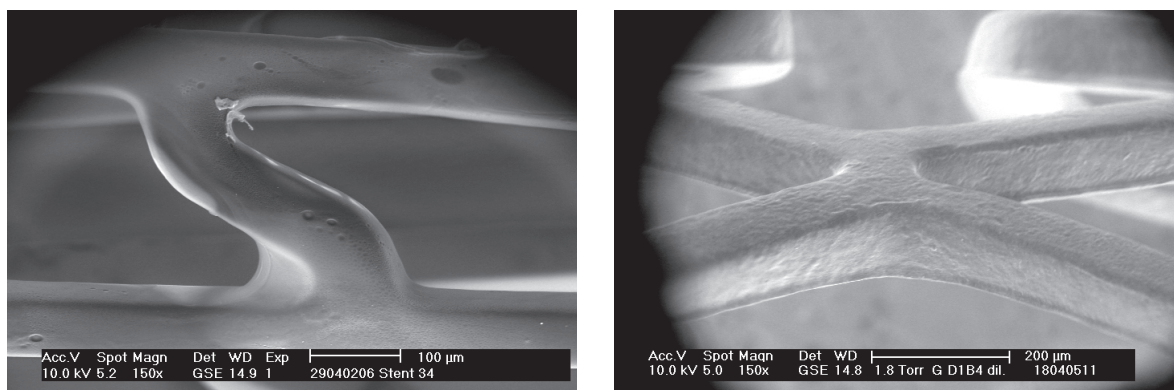


Abb. 72: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (ESEM, 150x) der PLLA/TETD-Beschichtung (70/30 % w/w, links) und der PLLA/Genistein-Beschichtung (70/30 % w/w, rechts) auf Metallstents (CoCr-Legierung, Durchmesser 3.5 mm, Länge 13 mm)

TETD wurde als 0.01 M und Genistein als 0.045 M methanolische Lösung der 0.16 %igen (w/w) PLLA-Lösung zugemischt, so dass die entsprechenden Masseverhältnisse von PLLA/TETD 70/30 % und einer TETD-Beladung von 2 µg/mm² sowie von PLLA/Genistein 70/30 % und einer Genistein-Beladung von 2.5 µg/mm² resultierten. Die PLLA/TETD- bzw. PLLA/Genistein-DES wurden im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C über 2 Wochen getrocknet, um die Lösungsmittelfreiheit zu gewährleisten.

TETD ist in Deutschland als Arzneimittel Antabus[®] zur Alkoholentwöhnung zugelassen. Außerdem wurde über die Anwendung von TETD als Immunmodulator [252] sowie zur Therapie von Aids [253] und von Metallvergiftungen [254-256] berichtet. TETD und das durch Reduktion entstehende Diethyldithiocarbamat (DETC) hemmen eine Vielzahl von Enzymen durch Komplexbildung mit Metallen in Metalloenzymen (in Superoxiddismutase, Dopamin-β-Hydroxylase, DNA-Polymerase, Metalloproteinasen) oder durch Reaktion mit funktionellen SH-Gruppen von Enzymen (Hexokinase, Ecto-ATPase). Außerdem können TETD/DETC mit funktionell wichtigen SH-Gruppen verschiedener Zellproteine, unter anderem mit SH-Gruppen von Mikrotubuli, reagieren und diese inaktivieren [257]. TETD/DETC haben auf verschiedene Zellen in vitro antiproliferative Wirkung und hemmen andere Zellfunktionen (unter anderem die Migration). Aus dem Vergleich der Konzentrationen, die in vitro biologisch wirksam sind, mit den pharmakologisch und toxisch wirksamen Dosen in vivo kann eine gute lokale Wirksamkeit bei sehr geringen oder keinen systemischen Effekten angenommen werden.

Genistein ist ein Isoflavon-Derivat und wird aus der Sojabohne gewonnen. Es ist ein sogenannter sekundärer Pflanzenstoff und zählt zur Familie der Phytoöstrogene. Genistein hat eine antioxidative Wirkung sowie einen regulierenden Einfluss auf das Immunsystem und den Gesamt-Cholesterin- und Kalziumhaushalt [258]. Die in der Literatur beschriebenen Wirkungen und Wirkmechanismen des Genisteins, die unter anderem für die Verhinderung der In-Stent-Restenose ausschlaggebend sein können, werden in den folgenden Ausführungen spezifiziert. Genistein ist ein Hemmstoff der Protein-Tyrosinkinase (PTK) und der Topoisomerase II. Außerdem hemmt dieser Wirkstoff die kardialen L-Typ Kalziumkanäle. Hinsichtlich der Wirkungen auf Endothelzellen sind die durch Genistein hervorgerufenen Hemmungen der kollageninduzierten Plättchenaggregation, der Monozytenadhäsion an Endothelzellen nach Stimulation des Tumornekrosefaktors (TNF), der durch Homocystein ausgelösten Apoptose und der durch mechanische Scherkräfte ausgelösten Expression des chemotaktisch wirkenden Interleukins IL-8 zu nennen [259]. Die Wirkungen des Genisteins auf vaskuläre glatte Muskelzellen sind im Wesentlichen die Inhibition der Proliferation dieses Zelltyps durch die Hemmung der PTK und die Inhibition der durch oxidativen Stress induzierten Zellmigration [260].

Neben der in vitro Biokompatibilität von Polymeren, die als Beschichtungsmatrizes Verwendung finden können, wurden die zellspezifischen und konzentrationsabhängigen Effekte der Wirkstoffe Tetraethylthiuramdisulfid und Genistein auf die Zellen der Gefäßwand untersucht. Darüber hinaus war das Wirkstofffreisetzungsverhalten der auf der Basis von Tetraethylthiuramdisulfid und Genistein generierten DES-Prototypen Gegenstand der Untersuchungen. Die in vitro Studien wurden durch die Erprobung von DES auf der Basis von Genistein im Tiermodell Kaninchen vervollständigt. Die Ergebnisse dieser umfangreichen in vitro und in vivo Prüfungen werden in den folgenden Kapiteln 5.1 bis 5.5 vorgestellt und erläutert.

5.1 In vitro Biokompatibilität polymerer Beschichtungsmatrizes

Da für die Beschichtung von Stents äußerst biokompatible Polymere Anwendung finden sollen, wurden zur Beurteilung der Biokompatibilität verschiedener permanenter und biodegradierbarer Polymere Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Hilfe des MTS-Tests (Kap. 4.1.4) gemäß der Europäischen Norm zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (Teil 5: Prüfungen auf in vitro Zytotoxizität, DIN EN ISO 10993-5, 1999) durchgeführt. Dafür wurden humane koronare, arterielle Endothelzellen (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*, HCAEC) und humane koronare, arterielle glatte Muskelzellen (*Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells*, HCASMC) auf den Folienstanzen (\varnothing 6 mm, $d=100\ \mu\text{m}$) der verschiedenen Polymere ausgesät (Direktkontakttest) und die metabolische Aktivität der HCAEC und HCASMC nach 48 h im MTS-Test überprüft. Als Kontrollen wurden Polystyrol (Negativkontrolle NC) und Zinn-PVC (Positivkontrolle, PC) mitgeführt. Die HCAEC und HCASMC sowie die Basal- und Wachstumsmedien wurden von der PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Die Ergebnisse der MTS-Tests zur Beurteilung der Biokompatibilität der für die Stentbeschichtungen zu verwendenden Polymere verdeutlichten eine gute Biokompatibilität der biodegradierbaren, teilkristallinen Polymere PLLA und P(4HB) (Abb. 73). Die relative Vitalität in Bezug zur Negativkontrolle Polystyrol betrug auf PLLA bei den HCAEC im Mittel 83 % und bei den HCASMC im Mittel 97 %. Die niedermolekulare P(4HB) zeigte im Direktkontakt mit den HCASMC eine mit PLLA vergleichbare Biokompatibilität, da eine mittlere relative Zellvitalität von 99 % resultierte. Mit den HCAEC wurde auf P(4HB) mit Hilfe des MTS-Tests eine mittlere relative Zellvitalität von 64 % ermittelt. Die teilkristalline P(3HB) und das amorphe PDLLA waren weniger biokompatibel und führten zu einer Reduktion der HCAEC-Vitalität um 33 % (P(3HB)) und 42 % (PDLLA) sowie der HCASMC-Vitalität um 43 % (P(3HB)) und 30 % (PDLLA). Bei Direktkontakt mit dem teilkristallinen Copolymer PLLGA, ein statistisches Co-

polymer des L,L-Dilactids und Diglycolids mit 12-18 % Diglycolid-Anteil, zeigten die beiden untersuchten Zelltypen ein sehr unterschiedliches Verhalten, da die HCAEC PLLGA besser tolerierten als die HCASMC, was sich in einer höheren metabolischen Aktivität der HCAEC gegenüber den HCASMC ausdrückte (Abb. 73). In der Gruppe der permanenten Polymere wurde die höchste Vitalität der Zellen auf den PMMA-Oberflächen nachgewiesen. Ein starke Hemmung der Zellvitalität hatten aufgrund einer auf diesen Polymeroberflächen geminderten Zelladhäsion die permanenten Polymere PBMA, PUR und PEVA zur Folge.

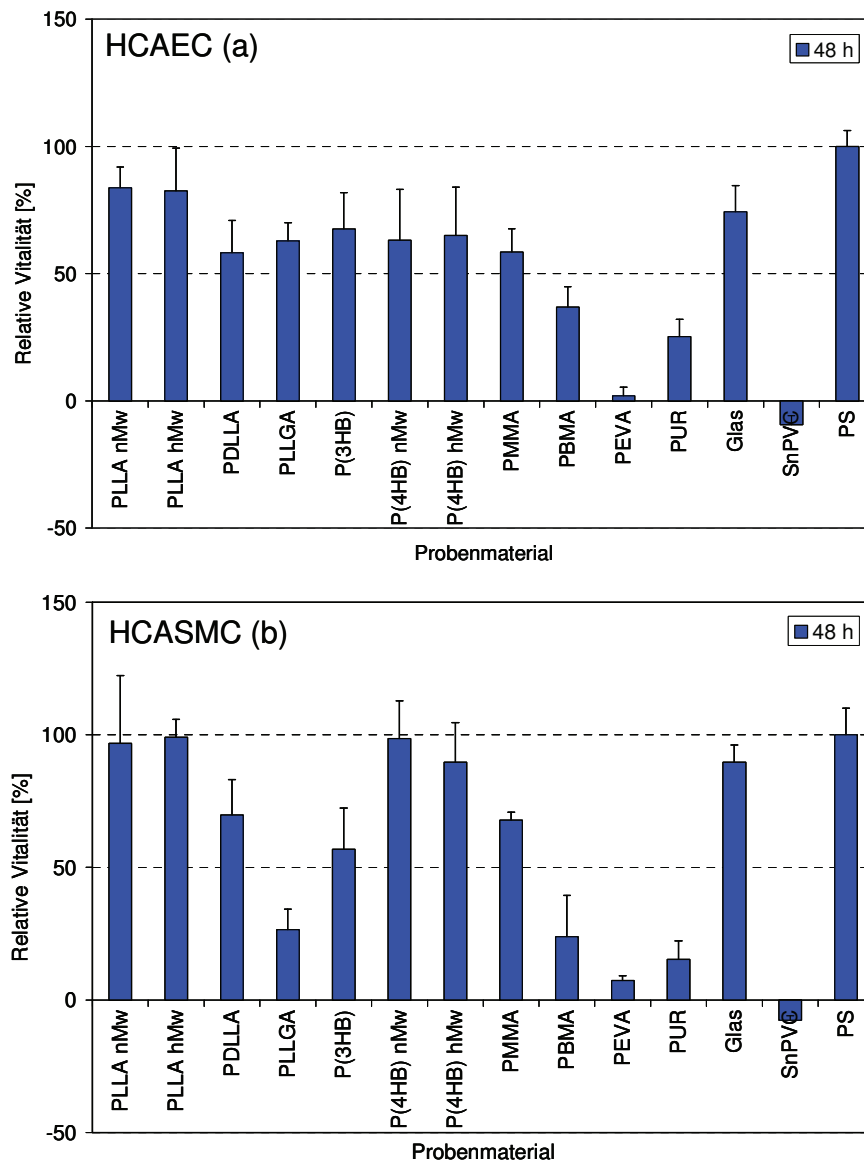


Abb. 73: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCAEC (a) und HCASMC (b) nach Direktkontakt (48 h) mit verschiedenen Probenmaterialien in Bezug zur Negativkontrolle Polystyrol (PS): PLLA nM_w - PLLA mit niedriger Molmasse von 280000 g/mol, PLLA hM_w - PLLA mit hoher Molmasse von 650000 g/mol, PDLLA - Poly(D,L-lactid), PLLGA - Poly(L-lactid-co-glycolid), P(3HB) - Poly(3-hydroxybuttersäure), P(4HB) nM_w - Poly(4-hydroxybuttersäure) mit niedriger Molmasse von 140000 g/mol, P(4HB) hM_w - Poly(4-hydroxybuttersäure) mit hoher Molmasse von 450000 g/mol, PMMA - Poly(methylmethacrylat), PBMA - Poly(butylmethacrylat), PEVA - Poly(ethylen-co-vinylacetat), PUR - Polyurethan Pellethane®, Glas - Glasplättchen, SnPVC - Zinn-PVC als Positivkontrolle (PC)

Relevante Unterschiede in der Biokompatibilität in Abhängigkeit von der Molmasse des Polymers waren nicht zu verzeichnen, da die untersuchten PLLA- und P(4HB)-Chargen mit jeweils hoher und niedriger Molmasse zu sehr ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Vitalität der auf den Polymeroberflächen ausgesäten Zellen führten.

5.2 Untersuchung ausgewählter wirkstoffbedingter Effekte auf zellulärer Ebene

In diesem Kapitel werden ausgewählte Untersuchungsergebnisse über zelluläre Effekte in kultivierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen vorgestellt, die durch die Wirkstoffe Tetraethylthiuramdisulfid (TETD) und Genistein hervorgerufen werden. Da die Wirkstoffe die In-Stent-Restenose (Kap. 3.1.1) verhindern sollen, wurden in diesem Zusammenhang folgende wirkstoffbedingte Effekte untersucht:

- zytotoxische bzw. die Zellvitalität beeinflussende Effekte durch den Nachweis der Aktivität der zellulären Dehydrogenasen (MTS-Test),
- die Zellproliferation beeinflussende Effekte durch den Nachweis des Einbaus des Thymidin-analogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin, das in die DNA proliferierender Zellen inkorporiert wird (BrdU-Test),
- die durch zytotoxische Effekte hervorgerufene Veränderung der Ultrastruktur der Zellen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM),
- die Veränderung des Zytoskeletts mit Hilfe der Immunhistochemie und
- die Beeinflussung der Zellmigration in Chemotaxis-Experimenten.

Es wurden folgende Zellen verwendet: BFA - Zelllinie boviner, fötaler Endothelzellen aus der Aorta (European Collection of Cell Cultures - ECACC), A7r5 - Zelllinie glatter Muskelzellen aus der thorakalen Aorta einer embryonalen BDIX-Ratte (ECACC), HCAEC - primäre, humane koronare, arterielle Endothelzellen (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) und HCASMC - primäre, humane koronare, arterielle glatte Muskelzellen (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die in den Tests verwendeten HCAEC und HCASMC stammten aus der zweiten bis sechsten Passage. Sie wurden jeweils in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml in 96-Lochplatten ausgesät und in den jeweiligen Wachstumsmedien kultiviert, die wie die Basalmedien von der PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen wurden. Um den natürlichen Zustand der Zellen in der Gefäßwand zu simulieren, wurden die Zellen in der Zellkultur zunächst arretiert. Zur Nachahmung der während des In-Stent-Restenoseprozesses (s. Kap. 3.1.1) gesteigerten Zellproliferation in Folge der Freisetzung von Wachstums-

faktoren erfolgte danach die Restimulierung der Zellen, indem den Zellkulturmedien die entsprechenden Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden. Zur Arretierung der Zellen wurde das Wachstumsmedium gegen das Basalmedium, das mit 0.5 % fötalem Kälberserum (FKS) für die HCAEC und 0.1 % FKS für die HCASMC angereichert war, ausgetauscht. Danach wurden die Zellen weitere 2 Tage unter 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Der zu untersuchende Wirkstoff wurde in frischem Basalmedium mit dem entsprechenden FKS-Gehalt appliziert und nach 6 h wurden die Zellen mit 25 ng/ml rekombinatem, humanem EGF (HCAEC) bzw. 25 ng/ml rekombinatem, humanem PDGF (HCASMC) sowie 5 % FKS restimuliert. Die folgenden Kontrollen wurden mitgeführt: NC1 – die Zellen wurden in frischem Basalmedium kultiviert, dem FKS zugesetzt war; NC2 - die Zellen wurden in frischem Basalmedium kultiviert, dem FKS zugesetzt war und anschließend erfolgte die Restimulierung mit EGF bzw. PDGF zur Überprüfung der Restimulierbarkeit und als Referenz (= 100 % gesetzt) für die Wirkstoffapplikation.

Das Medium für die Kultivierung der BFA-Zellen bestand aus Ham's F12-Medium mit 20 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 14 mmol/l NaHCO₃ und 25 mmol/l HEPES. Für die Arretierung der BFA-Zellen wurde das Ham's F12-Medium ohne weitere Zusätze verwendet. Die glatten Muskelzellen der Zelllinie A7r5 wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0.045 mol/l NaHCO₃ und 25 mmol/l HEPES kultiviert. DMEM, supplementiert mit 2 % FKS fand bei der Arretierung der A7r5-Zellen Verwendung.

Um die Effekte auf die Testzellen in Abhängigkeit vom Wirkstoff und von der Wirkstoffkonzentration beurteilen zu können, wurden diese mit TETD- bzw. Genistein-Lösungen (verdünnt aus den ethanolischen Wirkstoffstammlösungen mit einer Konzentration von 1x10⁻¹ M TETD bzw. Genistein) verschiedener Konzentrationen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert und die wirkstoffbedingte Inhibition bzw. Stimulation zellulärer Prozesse in Bezug zu den TETD- bzw. Genistein-freien Negativkontrollen untersucht. Zur besseren Veranschaulichung der komplexen Untersuchungsergebnisse der in vitro Studien, sind diese in den folgenden Ausführungen wirkstoff- und zelltypbezogen untergliedert worden.

TETD-Wirkung auf die Endothelzellen BFA

In den Untersuchungen zum Einfluss von TETD auf BFA konnte gezeigt werden, dass das TETD nur eine schwach hemmende Wirkung auf die Vitalität der Endothelzellen im Konzentrationsbereich von 1x10⁻⁵ M bis 1x10⁻⁴ M TETD hatte. Bei Konzentrationen von 1x10⁻¹² M bis 1x10⁻⁶ M TETD war eine die Zellvitalität leicht stimulierende Wirkung durch das TETD nachzuweisen, da die ermittelten Werte der relativen Zellvitalitäten in diesem Konzentrationsbereich im Mittel 119 % in Bezug zur Negativkontrolle (NC) betragen (Abb. 74).

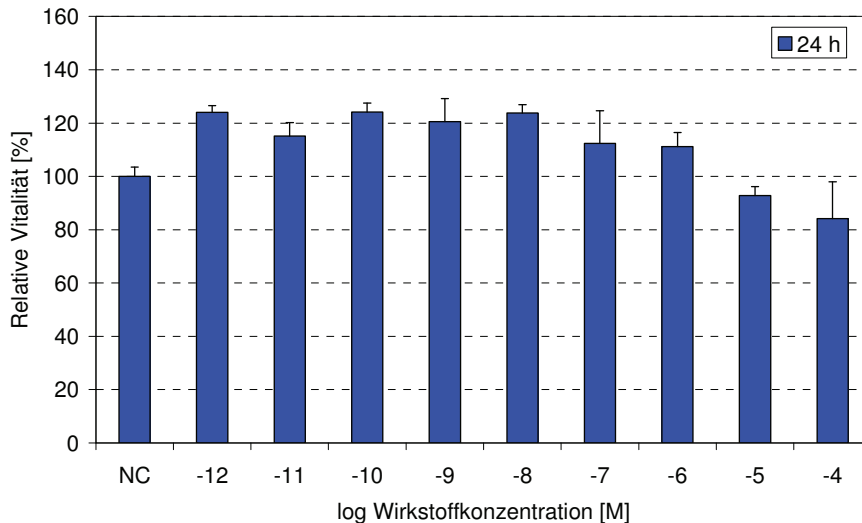


Abb. 74: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von BFA nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-4} M, n=6 pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, n=6)

Betrachtet man die Ergebnisse des BrdU-Tests, bei dem die Teilungsaktivität der Testzellen durch den Einbau des Thymidinanalogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin in die neu synthetisierte DNA mit einem ELISA-Reader (Anthos III, Anthos-Microsystems, Krefeld, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert wird, so ist festzustellen, dass bei TETD-Konzentrationen von 1×10^{-6} M bis 1×10^{-4} M eine starke Hemmung der Proliferation der Endothelzellen um im Mittel 91 % zu verzeichnen war. Bei geringeren TETD-Konzentrationen war keine Hemmung der Proliferation der Endothelzellen mehr nachzuweisen (Abb. 75).

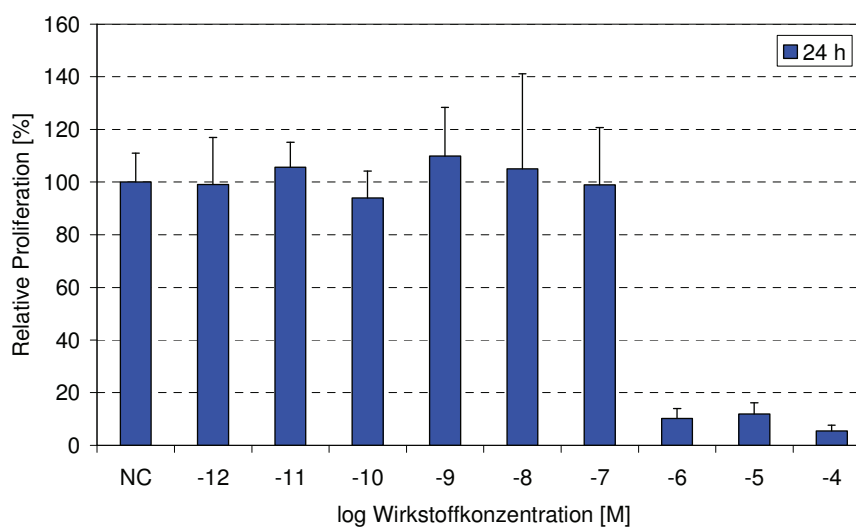


Abb. 75: Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von BFA nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-4} M, n=6 pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, n=6)

TETD-Wirkung auf die glatten Muskelzellen A7r5

Die glatten Muskelzellen A7r5 reagierten sensitiver auf TETD als die Endothelzellen BFA, da die Vitalität dieser Zellen bereits ab einer Konzentration von $\geq 1 \times 10^{-7}$ M stark gehemmt wurde. Die höhere Sensitivität der A7r5-Zellen im Vergleich zu den BFA-Zellen wird besonders dadurch deutlich, dass bei einer TETD-Konzentration von 1×10^{-7} M die mittlere relative Vitalität in Bezug zur TETD-freien Negativkontrolle (NC) bei den A7r5-Zellen nur 35 % betrug, während bei den BFA-Zellen bei dieser Konzentration eine mittlere relative Vitalität von 112 % ermittelt wurde. Bei TETD-Konzentrationen von $\leq 1 \times 10^{-8}$ M war keine Hemmung der Vitalität der A7r5-Zellen mehr nachweisbar (Abb. 76).

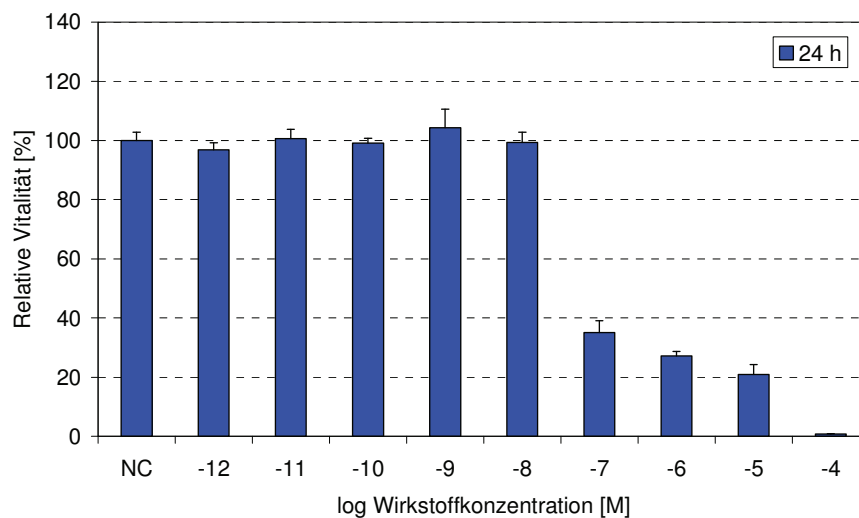


Abb. 76: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von A7r5 nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-4} M, $n=6$ pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=6$)

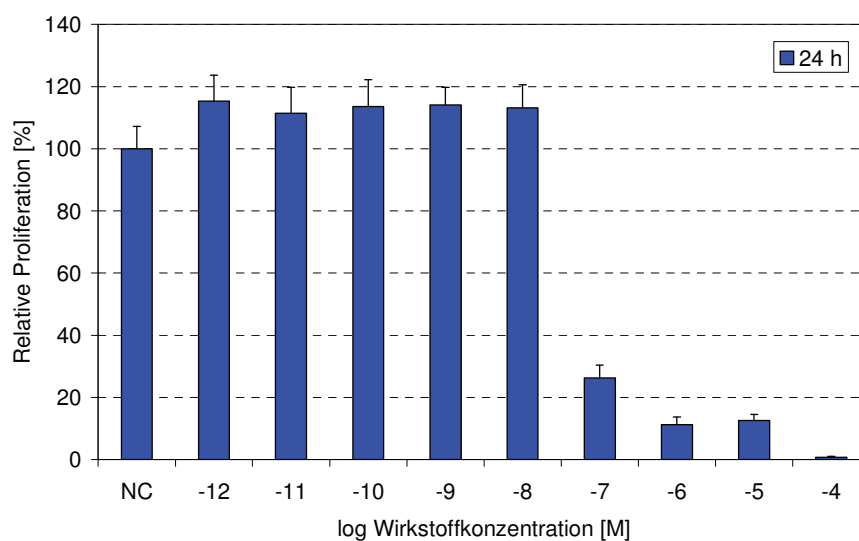


Abb. 77: Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von A7r5 nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-4} M, $n=6$ pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=6$)

Die Ergebnisse der MTS-Tests bestätigten sich in den BrdU-Tests, da auch hier im Konzentrationsbereich von 1×10^{-7} M bis 1×10^{-4} M eine starke Inhibition der Proliferation der A7r5-Zellen aufgrund des zytotoxischen Effekts des TETD festgestellt wurde. Bei Konzentrationen von $\leq 1 \times 10^{-8}$ M war keine Proliferationshemmung durch TETD zu verzeichnen (Abb. 77). Dass die TETD-Konzentrationen von $\geq 1 \times 10^{-7}$ M TETD stark zytotoxisch auf die Testzellen A7r5 wirken, wurde auch durch die durchgeführten TEM-Untersuchungen bestätigt (Abb. 78). Dafür wurden die nach Zentrifugation (175xg) der Zellansätze und Absaugung des Kulturmediums erhaltenen Zellpellets mit Fixierlösung, bestehend aus 25 % Glutardialdehyd und 0.2 M Natriumkaskodylat in Phosphatpuffer (PBS), überschichtet [261]. Für die mikroskopische Begutachtung der Zellultrastruktur wurde ein TEM vom Typ EM 902 A (Typ Libra 120 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

Die untersuchten TETD-Konzentrationen von 1×10^{-6} M und 1×10^{-4} M führten zu starken Veränderungen in der Zellultrastruktur, die sich in einer zusätzlichen Vakuolenbildung infolge vakuolärer Degeneration (Vakuolisierung) und in einer Fragmentation der Zellkerne ausdrückten. Nach Inkubation der A7r5-Zellen mit einer 1×10^{-8} M TETD-Lösung waren nur noch geringe Unterschiede in der Zellmorphologie im Vergleich zu den mit TETD unbehandelten A7r5-Zellen zu erkennen.

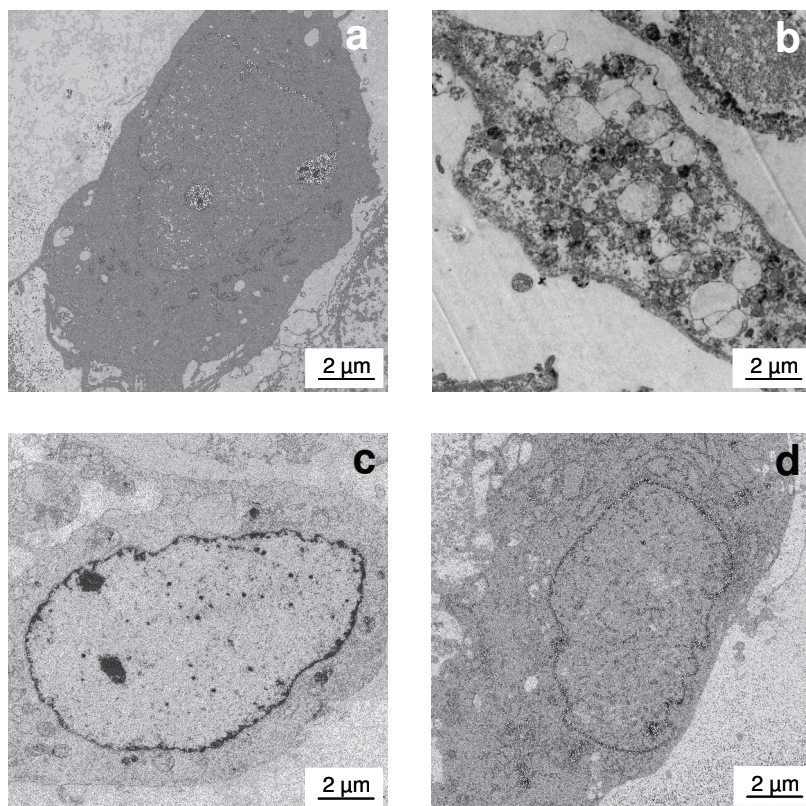


Abb. 78: TEM-Aufnahmen von A7r5-Zellen nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen: a - ohne Wirkstoff TETD, b - 1×10^{-4} M TETD, c - 1×10^{-6} M TETD, d - 1×10^{-8} M TETD

Die intrazelluläre Veränderung der Zellstruktur durch hohe TETD-Konzentrationen wurde auch immunhistochemisch nachgewiesen, indem die Effekte von TETD auf den Spindelapparat, im Speziellen auf die Mikrotubuli in den Spindelfasern, dargestellt werden konnten (Abb. 79).

Durch die Zugabe von Wirkstoffen kann es zur Stabilisierung oder Destabilisierung der Mikrotubuli kommen, indem die Depolymerisation des in den Mikrotubuli befindlichen, in helicaler Anordnung polymerisierten α - und β -Tubulins, behindert oder gefördert wird. Um den Effekt von TETD auf den Spindelapparat der A7r5-Zellen zu untersuchen, wurden die in Aceton fixierten Zellen mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper (Maus, Klon: DM1A+DM1B, Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland, 1:100-Verdünnung in PBS) inkubiert. An diesen Primärantikörper wurde ein anti-Maus Immunglobulin-Konjugat (IgG-HRP-Konjugat, Dako, Hamburg, Deutschland) als Sekundärantikörper gebunden. Die Visualisierung wurde mit einem chromogenen Enzymsubstrat (AEC Reagenz, Dako, Hamburg, Deutschland) erreicht. Darüber hinaus wurden die Zellen mit Hämalaun (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) gegengefärbt.

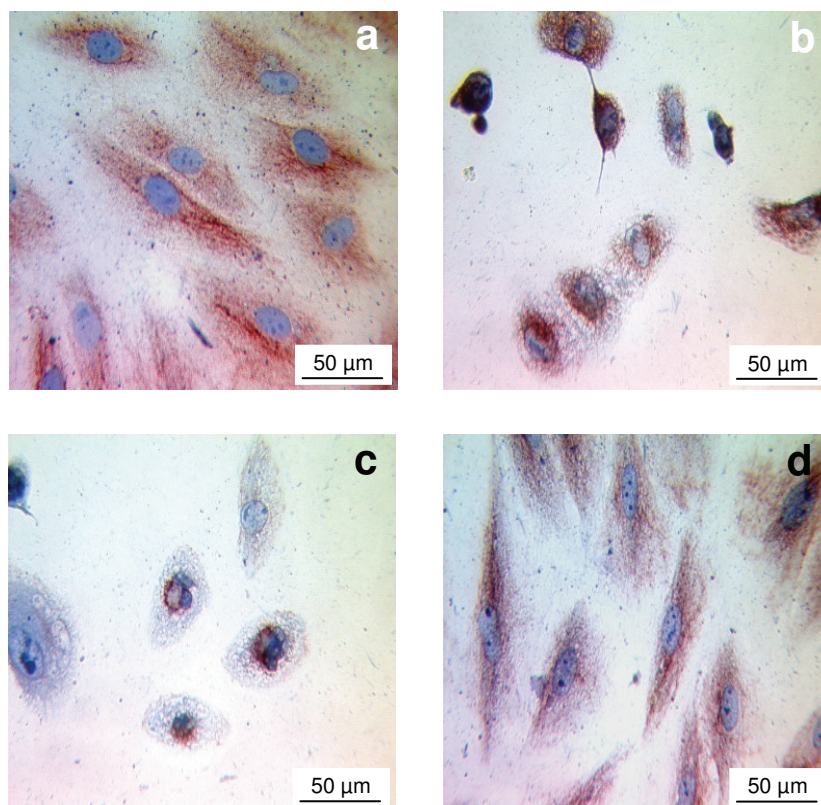


Abb. 79: Immunhistochemische Tubulin-Färbung von A7r5-Zellen mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper (Maus) und einem anti-Maus IgG-HRP-Konjugat nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen: a - ohne TETD, b - 1×10^{-4} M TETD, c - 1×10^{-6} M TETD, d - 1×10^{-8} M TETD; Visualisierung mit chromogenem AEC Reagenz; Zellfärbung mit Hämalaun

Durch die immunhistochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Inkubation der A7r5-Zellen mit einer 1×10^{-4} M TETD-Lösung die nahezu vollständige Zerstörung des Spindelapparats der Zellen unter Depolymerisation des Tubulins zur Folge hat. Bei einer TETD-Konzentration von 1×10^{-6} M wurde ebenfalls eine starke Veränderung der Struktur des Spindelapparats festgestellt. Nach Behandlung der A7r5-Zellen mit einer 1×10^{-8} M TETD-Lösung waren nur noch geringe morphologische Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten A7r5-Zellen beobachtbar (Abb. 79).

Als weiterer wesentlicher Parameter wurde der Einfluss von TETD auf die Migration der A7r5-Zellen unter dem Einfluss eines Attraktans (Lockstoff) untersucht. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die Versuchszellen entlang eines Konzentrationsgradienten des Attraktans in einem Zweikammersystem wandern zu lassen. Man bezeichnet diese gerichtete Bewegung als Chemotaxis. Die beiden Kammern sind dabei durch einen Membranfilter getrennt, der es nur aktiv wandernden Zellen erlaubt, aus der oberen Kammer zum Attraktans in der unteren Kammer zu gelangen. Nach einer bestimmten Zeit werden die gewanderten Zellen in definierten Filtertiefen bzw. in ihrer Gesamtheit auf der Unterseite des Filters gezählt.

Für die Untersuchung der Migration der A7r5-Zellen wurde die untere Kammer des Zweikammersystems mit DMEM gefüllt, das 1 % bovines Serumalbumin (BSA) enthielt. Die A7r5-Zellen wurden dann im selben Medium in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml auf dem mit Kollagen beschichteten Filter in der oberen Kammer ausgesät. Nach Zugabe der jeweiligen TETD-Lösung in die obere Kammer und Inkubation für 6 h wurde in der unteren Kammer das Attraktans PDGF (10 ng/ml) zugesetzt. Nach 18 h wurden die migrierten A7r5-Zellen auf der Unterseite des Filters fixiert, gefärbt und gezählt. Die Negativkontrolle (NC, = 100 %) stellte auch in diesen Versuchen die unbehandelte Zellprobe dar, bei der die Migration der A7r5-Zellen allein unter dem Einfluss des Attraktans PDGF untersucht wurde.

Die Migrationsexperimente zeigten, dass aufgrund der zytotoxischen Wirkung von TETD im Konzentrationsbereich von 1×10^{-7} M bis 1×10^{-5} M nur wenige A7r5-Zellen migrieren. Bei einer Konzentration von 1×10^{-4} M TETD wurde keine Zellmigration beobachtet, da nach Inkubation der A7r5-Zellen mit dieser hohen TETD-Konzentration die Zellen fast ausschließlich avital waren (s. Abb. 76). Bei einer TETD-Konzentration von 1×10^{-10} M waren keine Unterschiede im Migrationsverhalten der A7r5-Zellen im Vergleich zur wirkstofffreien Negativkontrolle (NC) mehr zu verzeichnen (Abb. 80).

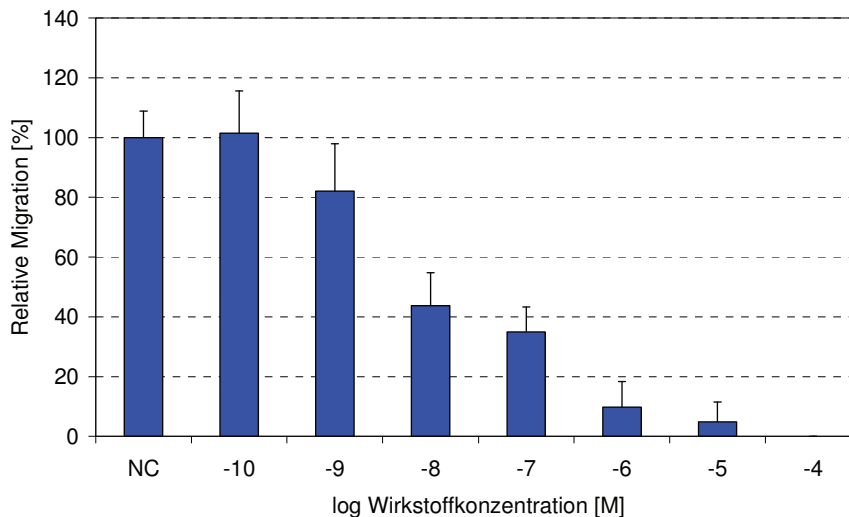


Abb. 80: Relative Migration von A7r5 nach Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, n=3 pro TETD-Konzentration) entlang eines Konzentrationsgradientens des Attraktans PDGF in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, n=3)

Aufgrund der nachgewiesenen Zytotoxizität von TETD bei Konzentrationen von $> 1 \times 10^{-7}$ M ist dieser Wirkstoff nur im relativ engen Konzentrationsbereich von 1×10^{-9} M bis 1×10^{-7} M für die DES-Anwendung einsetzbar. Von Vorteil ist, dass in diesem Konzentrationsbereich TETD keine Inhibition der Vitalität und Proliferation der Endothelzellen (BFA) bewirkte, wohl aber die Vitalität und Proliferation der glatten Muskelzellen (A7r5) bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M TETD noch stark hemmte. Ebenso wurde in dem genannten Konzentrationsbereich die Migration der glatten Muskelzellen (A7r5) inhibiert. Diese konzentrationsabhängigen Effekte des TETD rechtfertigten dessen weitere Erprobung für die DES-Indikation im Konzentrationsbereich von 1×10^{-9} M bis 1×10^{-7} M TETD.

Genistein-Wirkung auf die primären Endothelzellen HCAEC

Als potentielle Wirkstoffe zur Proliferationshemmung vaskulärer glatter Muskelzellen wurden von verschiedenen Forschergruppen humane Östrogene untersucht, da sie einen kardioprotektiven Effekt in der Hormonersatztherapie bewiesen hatten [262]. Die Anwendung humaner Östrogene ist jedoch durch deren kanzerogene und feminisierende Eigenschaften begrenzt [263]. Unter dem Gesichtspunkt publizierter Ergebnisse zum 17β -Estradiol, die eine hohe zellspezifische Wirkung dieses humanen Östrogens auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen zeigten [264], war es von Interesse, das strukturell ähnliche Phytoöstrogen Genistein in der Zellkultur auf ein vergleichbar zellspezifisches Potenzial hin zu untersuchen.

Die Untersuchungen zum Einfluss von Genistein auf HCAEC zeigten, dass das Genistein nur bei einer Konzentration von 1×10^{-4} M eine schwach hemmende Wirkung auf deren Vitalität

hatte. Bei Konzentrationen von 1×10^{-10} M bis 1×10^{-5} M TETD war eine die Zellvitalität deutlich steigernde Wirkung durch das Genistein nachzuweisen, da die ermittelten Werte der relativen Zellvitalitäten in diesem Konzentrationsbereich im Mittel 160 % in Bezug zur Negativkontrolle NC2 betragen (Abb. 81).

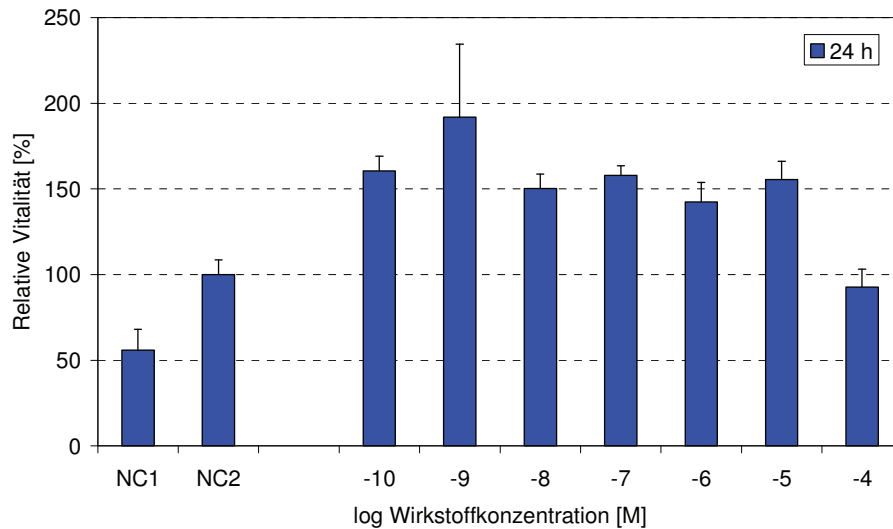


Abb. 81: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, n=6 pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, n=6)

Diese die Endothelzellen stimulierende Wirkung des Genisteins wurde auch in den BrdU-Tests bestätigt. Die Proliferation der HCAEC wurde lediglich bei der hohen Genistein-Konzentration von 1×10^{-4} M um 25 % inhibiert. Bei Genistein-Konzentrationen $\leq 1 \times 10^{-5}$ M war eine Steigerung der Zellproliferation um im Mittel 90 % zu verzeichnen (Abb. 82).

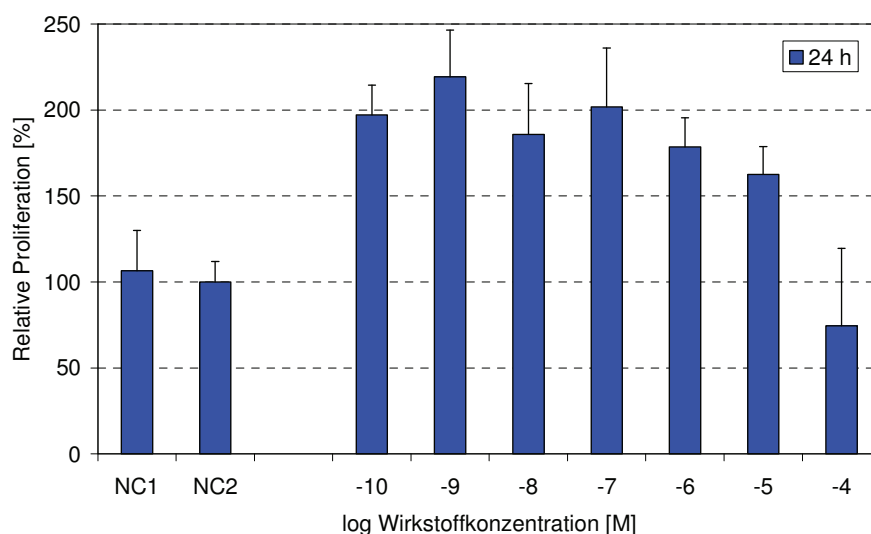


Abb. 82: Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, n=6 pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, n=6)

Genistein-Wirkung auf die primären glatten Muskelzellen HCASMC

Die Vitalität der HCASMC wurde durch das Genistein im untersuchten Konzentrationsbereich von 1×10^{-10} M bis 1×10^{-4} M nur wenig beeinflusst. Mit Hilfe des MTS-Tests war eine maximale Hemmung der HCASMC-Vitalität um 30 % nach Inkubation mit 1×10^{-4} M Genistein feststellbar (Abb. 83).

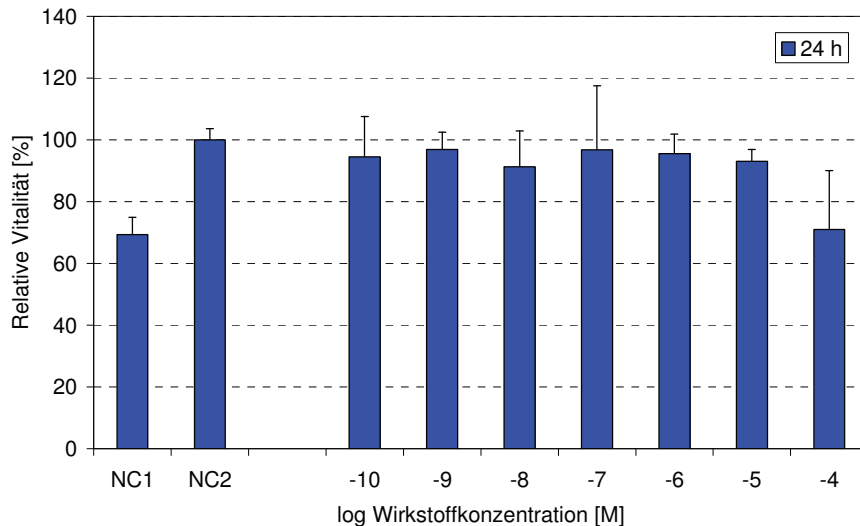


Abb. 83: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, $n=6$ pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, $n=6$)

Die Proliferation der HCASMC wurde dagegen durch die Zugabe von Genistein stärker inhibiert als deren Vitalität, da bei einer Genistein-Konzentration von 1×10^{-4} M eine Reduktion der relativen Zellproliferation um 91 % und im Bereich von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-5} M um im Mittel 22 % in Bezug zur wirkstofffreien Negativkontrolle nachzuweisen war (Abb. 84).

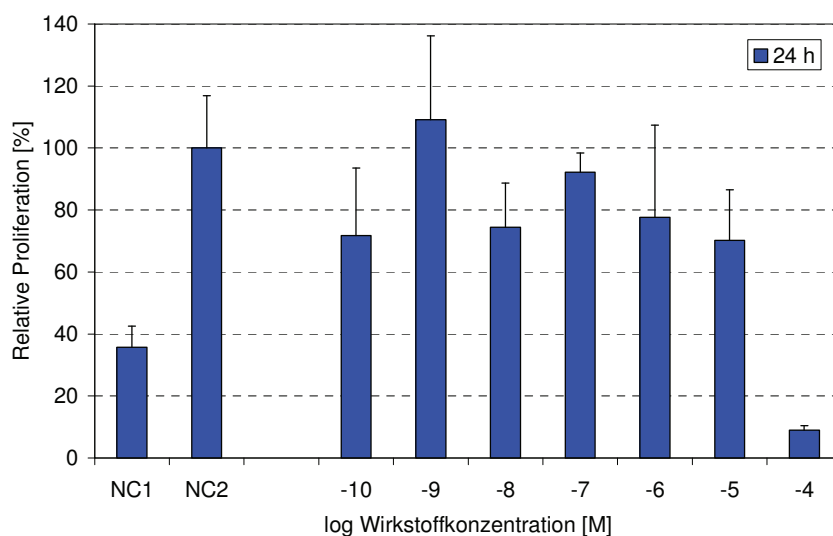


Abb. 84: Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, $n=6$ pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, $n=6$)

Das Phytoöstrogen Genistein erweist sich aufgrund seiner differenziellen Wirkung auf Endothelzellen (HCAEC) und glatte Muskelzellen (HCASMC) als geeigneter Kandidat für die DES-Indikation. Die Vorteile des Genisteins mit Hinblick auf die Verhinderung der In-Stent-Restenose (s. Kap. 3.1.1) sind die Förderung der Vitalität und Proliferation von Endothelzellen innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 1×10^{-10} M bis 1×10^{-5} M Genistein und die Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen bei Konzentrationen von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-5} M Genistein unter Erhalt der Vitalität dieses Zelltyps. Diese zellspezifischen Effekte des Genisteins innerhalb eines großen Konzentrationsfensters rechtfertigten dessen weitere Erprobung für DES im Konzentrationsbereich von 1×10^{-10} M bis 1×10^{-5} M Genistein.

5.3 In vitro Wirkstoffelution koronarer Drug-Eluting Stents

Das Ziel der Untersuchungen bestand darin, die Wirkstofffreisetzung der entwickelten koronaren DES auf der Basis der Wirkstoffe TETD bzw. Genistein in vitro zu bestimmen. Zur Beurteilung des in vitro Elutionsverhaltens von mit TETD beladenen Koronarstents wird auf die im Kapitel 4.4.2 dargestellten Ergebnisse verwiesen. Das methodische Vorgehen und die Resultate der in vitro Freisetzungsstudien, die mit koronaren PLLA/Genistein DES erzielt wurden, werden in den folgenden Ausführungen erläutert.

Zur Untersuchung der Genistein-Freisetzung wurden die entwickelten DES-Prototypen mit einer Schichtzusammensetzung von PLLA/Genistein 70/30, 50/50 und 40/60 % (w/w) in 0.9 %iger NaCl-Lösung bzw. in porcinem Blutplasma bei 37 °C eluiert. An den Probennahmezeitpunkten wurden die DES entnommen und in einem neuen Glasvial mit frischem Elutionsmedium dem weiteren Elutionsvorgang unterzogen. Das resultierende Eluat in NaCl-Lösung wurde direkt im Anschluss mit Hilfe der HPLC vermessen.

Zur Auswertung der Genistein-Freisetzung in porcinem Blutplasma wurde die Probenvorbereitung nach *Bardelmeijer et al.* [235] durchgeführt (s. auch Kap. 4.4.2). Der Rückstand der eingedampften Diethyletherphase wurde im Laufmittel, bestehend aus 0.1 % (w) wässriger ortho-Phosphorsäure/Acetonitril (62/38 v/v), aufgenommen und die Genistein-Konzentration in der Lösung mit Hilfe der HPLC bestimmt. Die zeitlichen Abstände zwischen den Probennahmen sind dafür so eingestellt worden, dass die Konzentrationsmesswerte innerhalb des kalibrierten Messbereichs des Analysenverfahrens von 0.1-10.0 mg/l lagen.

Für die Analyse des Genisteins kamen folgende HPLC-Bedingungen zur Anwendung: Eurospher-Säule 100 C18, Körnung 5 µm, Innendurchmesser 125 x 4 mm (Wissenschaft-

liche Gerätebau Dr.-Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland); Säulentemperatur 25 °C; mobile Phase 0.1 % (w) wässrige ortho-Phosphorsäure/Acetonitril (62/38 v/v, isokratisch); Flussrate 1.0 ml/min und UV-Detektion bei 262 nm. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 0.005 mg/l.

In den in vitro Freisetzungsstudien mit PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-Stentbeschichtungen wurde festgestellt, dass das Genistein in 0.9 %iger NaCl-Lösung weitaus schneller freigesetzt wird als in porcinem Blutplasma. Die Elution des Wirkstoffs Genistein aus dieser Beschichtung war in 0.9 %iger NaCl-Lösung innerhalb von 49 Tagen vollständig abgeschlossen, während in das Blutplasma im gleichen Untersuchungszeitraum erst 53 % des in der Beschichtung inkorporierten Genisteins freigesetzt worden waren (Abb. 85).

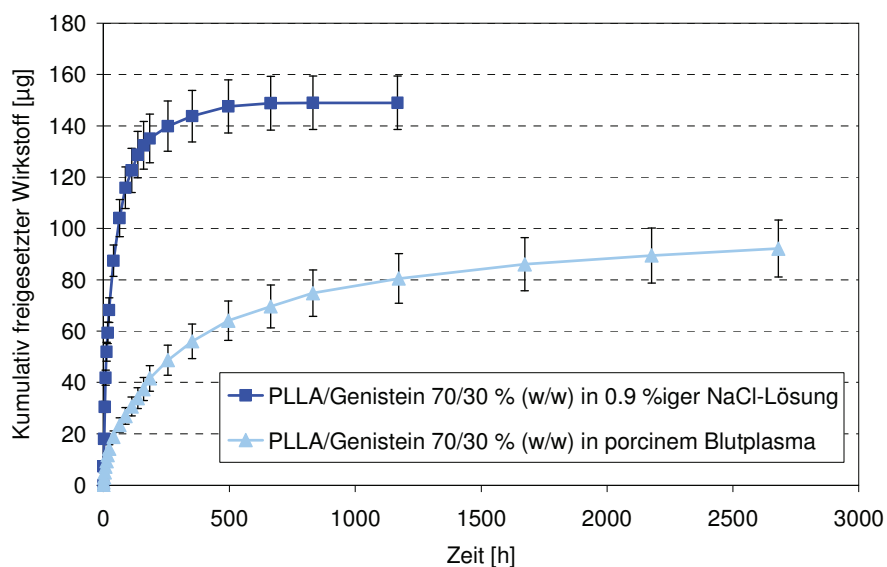


Abb. 85: In vitro Freisetzung von Genistein aus PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-Beschichtungen in 0.9 %iger NaCl-Lösung bzw. porcinem Blutplasma bei 37 °C (jeweils n=2) [265, 266]

Dieses Phänomen ist nicht erklärbar, da das Genistein in der NaCl-Lösung sehr schwer löslich ist und die schnellere Wirkstofffreisetzung nicht durch eine höhere Löslichkeit des Wirkstoffs in dieser Lösung im Vergleich zum Blutplasma begründet werden kann.

Da die PLLA/Genistein DES einer Herstellungscharge diese starken Unterschiede hinsichtlich ihres Elutionsverhaltens in den untersuchten Medien gleicher Volumina zeigten (s. Abb. 85) und um eine möglichst realitätsnahe in vitro Prüfung zu gewährleisten, wurden auch die PLLA/Genistein-DES mit einer Zusammensetzung von 50/50 und 40/60 % (w/w) in porcinem Blutplasma eluiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit allen untersuchten Stentbeschichtungen auf der Basis von PLLA/Genistein eine Wirkstofffreisetzung über 3 Monate realisierbar ist (Abb. 86).

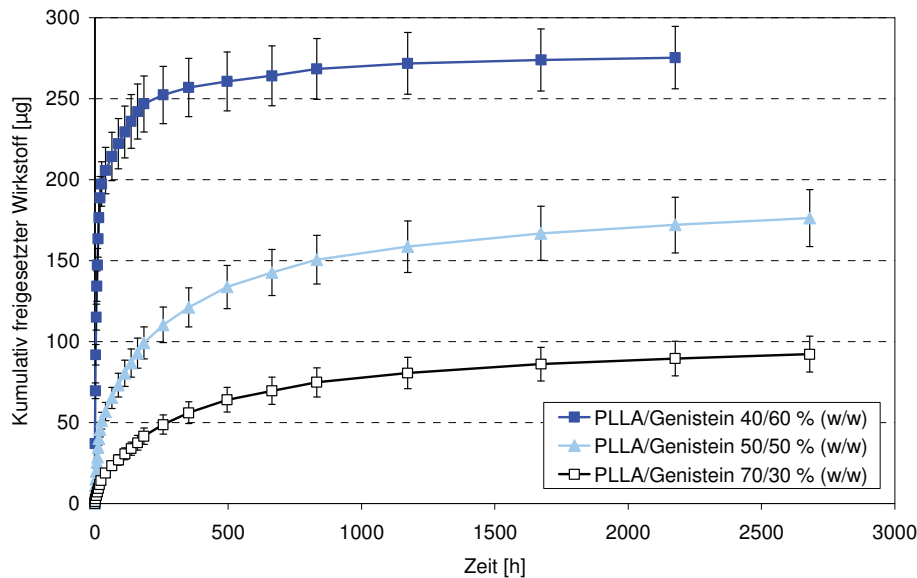


Abb. 86: In vitro Freisetzung von Genistein aus PLLA-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichen Genistein-Konzentrationen (30, 50, 60 %; jeweils n=2) in porcinem Blutplasma (37 °C) [265, 266]

Die PLLA/Genistein-Beschichtung mit 30 % Genistein erwies sich als besonders geeignet, den Wirkstoff in Konzentrationen von $\geq 1 \times 10^{-6}$ M Genistein über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten zu eluieren, so dass Genistein-Konzentrationen pro Tag freigesetzt werden konnten, die in vitro eine Förderung der Vitalität und Proliferation der Endothelzellen (HCAEC) sowie eine Hemmung der Proliferation der glatten Muskelzellen (HCASMC) bewirkten (Kap. 5.2). Die Ergebnisse der in vivo Studie, bei der die PLLA/Genistein DES mit 30 % Genistein im Tiermodell Kaninchen erprobt wurden, werden im Kapitel 5. 5 vorgestellt.

5.4 Beurteilung der Stent-Gewebe-Interaktion im kultivierten Blutgefäßabschnitt

Gewebekulturen müssen im Gegensatz zu Zellkulturen nicht proliferierend in einem möglichst vitalen Zustand so lange wie möglich unter in vitro Bedingungen gehalten werden. Dies erscheint zwar sehr einfach, ist aber aus den unterschiedlichsten Gründen sehr schwierig, Gewebe unter Erhalt der Form und Funktion zu kultivieren. Im Allgemeinen werden erste Gewebekulturen damit begonnen, dass sterile, etwa 0.5 mm dünne Gewebeschnitte in Kulturschalen kultiviert werden, um das für die Versorgung optimale Medium zu sondieren. Da unter statischen Milieubedingungen jedoch die Gefahr besteht, dass tiefer liegende Zellschichten des Gewebes nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und

durch Metabolite zellulären Ursprungs geschädigt werden, wird die Kultivierung von Geweben danach in Perfusionscontainern bzw. Bioreaktoren durchgeführt, da sie kontinuierlich mit immer frischem Medium durchströmt werden.

Kultivierung der Blutgefäßabschnitte im Perfusionsmodell

Zur Kultivierung von vaskulären Geweben und zur Charakterisierung der durch die entwickelten DES hervorgerufenen Gewebereaktionen musste eine experimentelle Basis aufgebaut werden, die es ermöglicht, für die Applikation relevante Gewebeteile unter Perfusionsbedingungen zu kultivieren und die Zellen im Gewebeverband für 14 Tage vital zu erhalten. Es wurden aufgrund der Abmaße der DES-Prototypen und aufgrund der Verfügbarkeit des biologischen Materials Abschnitte porciner *Arteria carotis externa* verwendet, in die die DES implantiert wurden. Die Blutgefäßabschnitte wurden unmittelbar nach der Tötung des Tieres im Schlachthof des Forschungsinstituts für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf entnommen und für den Transport sowie bis zum Aufbau der Perfusionskultur bei 4 °C in DMEM, supplementiert mit 10 % FKS, 4.5×10^{-2} M NaHCO_3 , 2.5×10^{-2} M HEPES, 200 U/ml Penicillin/Streptomycin und 5×10^{-3} M Amphotericin B, gelagert.

Die Kultivierung der Blutgefäßabschnitte erfolgte in Perfusionscontainern nach Minuth [267] bei 37 °C unter Aufrechterhaltung steriler Bedingungen unter Raumluftatmosphäre. Die Apparatur für die Perfusionskultur bestand aus folgenden Teilen: 1. der Vorratsflasche, 2. der Peristaltikpumpe, 3. der Heizplatte, 4. dem Perfusionscontainer, 5. der Wärmeabdeckung und 6. der Abfallflasche (Abb. 87).

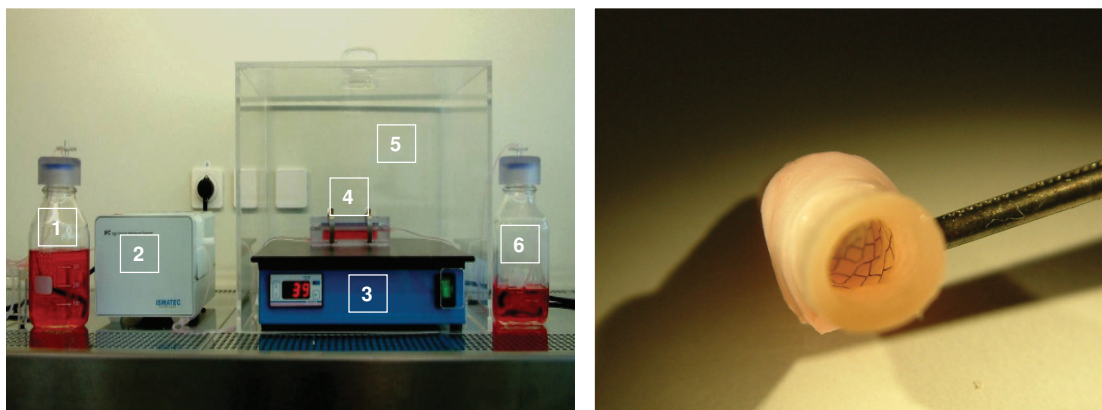


Abb. 87: Aufbau der Apparatur für die Perfusionskultur von Abschnitten porciner *Arteria carotis externa* (links) und in eine porcine *Arteria carotis externa* implantiertes DES (rechts) [268]

Die Blutgefäßabschnitte wurden aus dem Transportmedium entnommen, mit sterilem Präparierbesteck von Bindegewebsresten befreit und auf eine Länge von etwa 3 cm zugeschnitten. Nach Waschen in PBS erfolgte die Kultivierung der Blutgefäßabschnitte mit und ohne DES parallel in zwei Perfusionscontainern. Das Blutgefäß, welches ohne DES kultiviert

werden sollte, wurde sofort in den entsprechenden Perfusionscontainer überführt. Für den Perfusionsansatz des mit dem DES kultivierten Blutgefäßabschnittes wurde der auf dem Ballonkatheter gecrimpte DES zuvor in das Blutgefäß eingeführt und mit Hilfe einer Handpumpe aufgedehnt. Die irreversible Dilatation des Stents erfolgte mit einem Druck von 8 bar für 10 Sekunden. Danach wurde der deflatierte Ballon wieder vorsichtig aus dem Blutgefäß entfernt. Der mit dem DES versehene Blutgefäßabschnitt wurde dann in den zweiten Perfusionscontainer verbracht. Die Perfusionscontainer wurden anschließend mit Gewebekulturmedium bei maximaler Pumpleistung geflutet. Das für die Perfusion der Arterienabschnitte verwendete Kulturmedium bestand aus DMEM mit folgenden Zusätzen: 2.5×10^{-2} M Glukose, 2.5×10^{-2} M HEPES, 2.7×10^{-3} M Amphothericin B, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Gentamycin, 2.4×10^{-3} M NaHCO_3 , 9×10^{-4} M Insulin, 1.4×10^{-6} M Hydrocortison, 5.7×10^{-3} M Ascorbinsäure, 1×10^{-2} g/l bFGF, 5×10^{-4} g/l VEGF und 2 % FKS. Für die Gewebekultur wurde eine kontinuierliche Flussrate von 70-75 µl/min eingestellt, um eine kontinuierliche Nährstoffversorgung der Blutgefäße zu sichern.

Nach einem Zeitraum von 7 bzw. 14 Tagen wurden die Blutgefäßabschnitte aus den Perfusionscontainern entnommen, in je drei Abschnitte geteilt und der Rasterelektronenmikroskopie, der Histologie sowie der Immunhistochemie zugeführt.

Morphologische Untersuchung der Blutgefäßabschnitte

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die Morphologie des Lumens der Blutgefäßabschnitte vergleichend untersucht, um morphologische Veränderungen der Intima nach der Kultur und speziell unter DES-Einfluss beurteilen zu können. Dafür wurden die Blutgefäßabschnitte zunächst längs aufgeschnitten und mit der Gefäßinnenseite nach oben auf einer Präparierunterlage befestigt. Im Anschluss wurde die Gefäßinnenseite für 30 Minuten mit einer Lösung, bestehend aus Natriumkakodylat und Glutardialdehyd, fixiert. Die Entwässerung der Gewebeproben erfolgte in einer ansteigenden Alkoholreihe. Nach der Kritisch-Punkt-Trocknung wurden die Präparate mit einer 10 nm dicken Goldschicht besputtert und im REM untersucht.

In der Abbildung 88 sind exemplarisch die REM-Aufnahmen einer nativen Gewebeprobe (Abb. 88a) sowie von Gewebeproben nach 7 Tagen Kultur (Abb. 88b), nach 14 Tagen Kultur (Abb. 88c) und nach Implantation eines PLLA/TETD (80/20 % w/w) DES und Kultur über 7 Tage (Abb. 88d) dargestellt. Diese Aufnahmen verdeutlichen die große Varianz innerhalb des biologischen Materials, da die Proben bereits im nativen Zustand eine sehr unterschiedliche Oberflächenmorphologie zeigten. Eine durch die Kultivierung der Gefäßabschnitte im Perfusionsmodell verursachte zusätzliche Schädigung des Endothels der Intima war mikroskopisch nicht nachweisbar. Eine Veränderung der Morphologie des Endothels wurde jedoch

nach Implantation des mit TETD-beladenen DES beobachtet, da hier eine höhere Anzahl von abgekugelten (toten) Zellen auf der untersuchten Innenseite des Blutgefäßes zu erkennen war (Abb. 88d). Diese Beobachtung kann mit einer zu hohen TETD-Freisetzung in das den DES umgebende Gewebe und somit mit einer zytotoxischen Reaktion erklärt werden, da in der Abbildung 88d ein Gewebeabschnitt betrachtet wurde, der zwischen den Stentstegen lag. Gewebeareale, die im direkten Kontakt mit den Stentstegen waren, wiesen dagegen aufgrund der mechanischen Verletzung des Gewebes kein Endothel mehr auf und konnten so für die Beurteilung der durch den Wirkstoff TETD ausgelösten Gewebereaktion nur bedingt herangezogen werden.

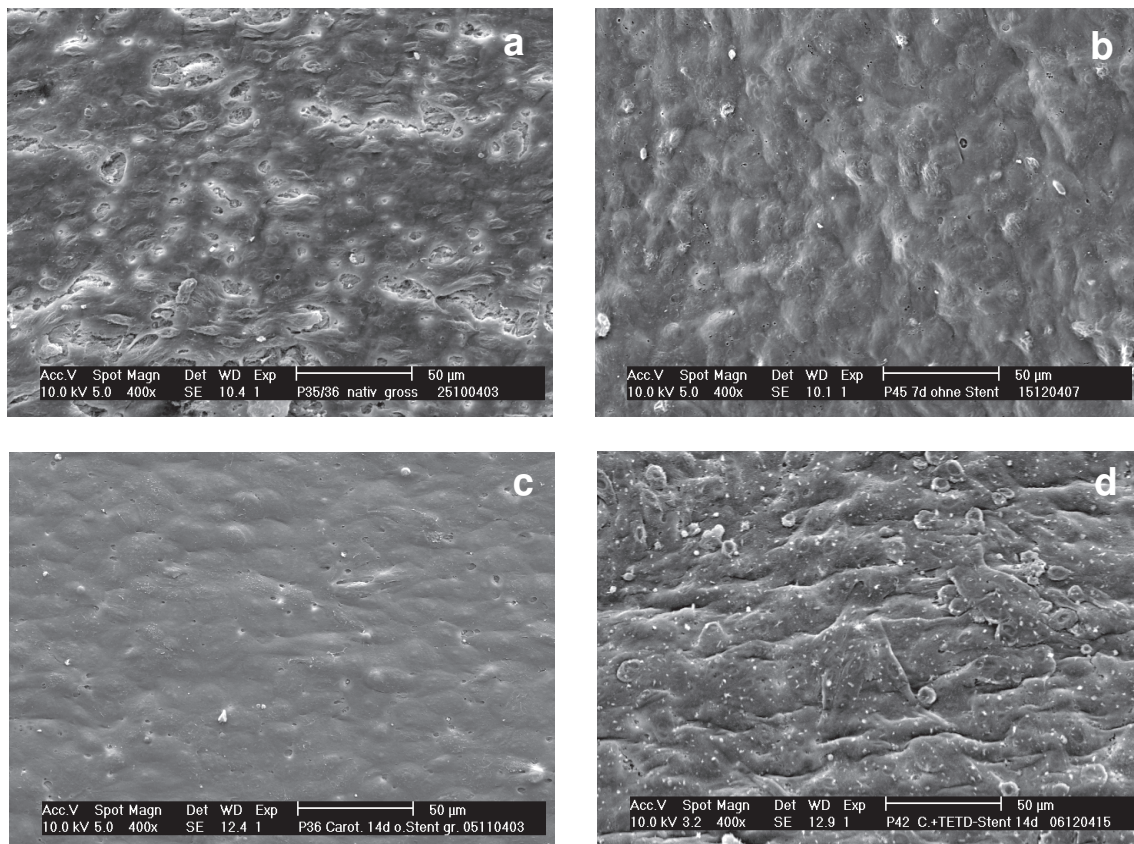


Abb. 88: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Endothels porciner *Arteria carotis externa*-Abschnitte: nativ (a), nach 7 Tagen Kultur (b), nach 14 Tagen Kultur (c), nach Implantation eines PLLA/TETD (80/20 % w/w) DES und Kultur über 7 Tage (d)

Histologische Untersuchung der Blutgefäßabschnitte

Für die histologische Bewertung der in 5 µm dicke Kryoschnitte überführten Gewebeproben wurden folgende Färbungen entsprechend den Färbeprotokollen von *Burck et al.* [269] verwendet:

- die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung als Übersichtsfärbung, bei der die Zellkerne und andere basophile Bestandteile blau und das Zytoplasma (azidophil) rosa bis rot gefärbt sind,
- die Azanfärbung nach *Heidenhain*, bei der das kollagene Bindegewebe blau und das Muskelgewebe je nach Fixierung rötlich bis orange gefärbt ist und
- die Elastikafärbung nach *Hart* zur Hervorhebung elastischer Fasern, bei der diese blauschwarz und die Zellkerne rot gefärbt sind.

Der Wandaufbau des Blutgefäßes, bestehend aus Intima, Media und äußerer, bindegewebiger Adventitia, ist mit Hilfe der histologischen Färbungen gegeneinander abgrenzbar. Die breite Media erscheint nach 7 Tagen Gewebekultur immer noch homogen. Sie besteht vor allem aus glatter Muskulatur (Abb. 89b, rot), elastischen Lamellen und Fasern (Abb. 89c, blauschwarz), Kollagenfasern sowie Proteoglykanen. Die Zellkerne in der Media sind den glatten Muskelzellen zuzuordnen (Abb. 89a, blau). Die Intima trägt innen ein Endothel. Die Adventitia ist relativ dünn und setzt sich aus Fibroblasten, vorwiegend längs verlaufenden Kollagenfasern und einem lockeren Netz elastischer Fasern zusammen (Abb. 89b, blau).

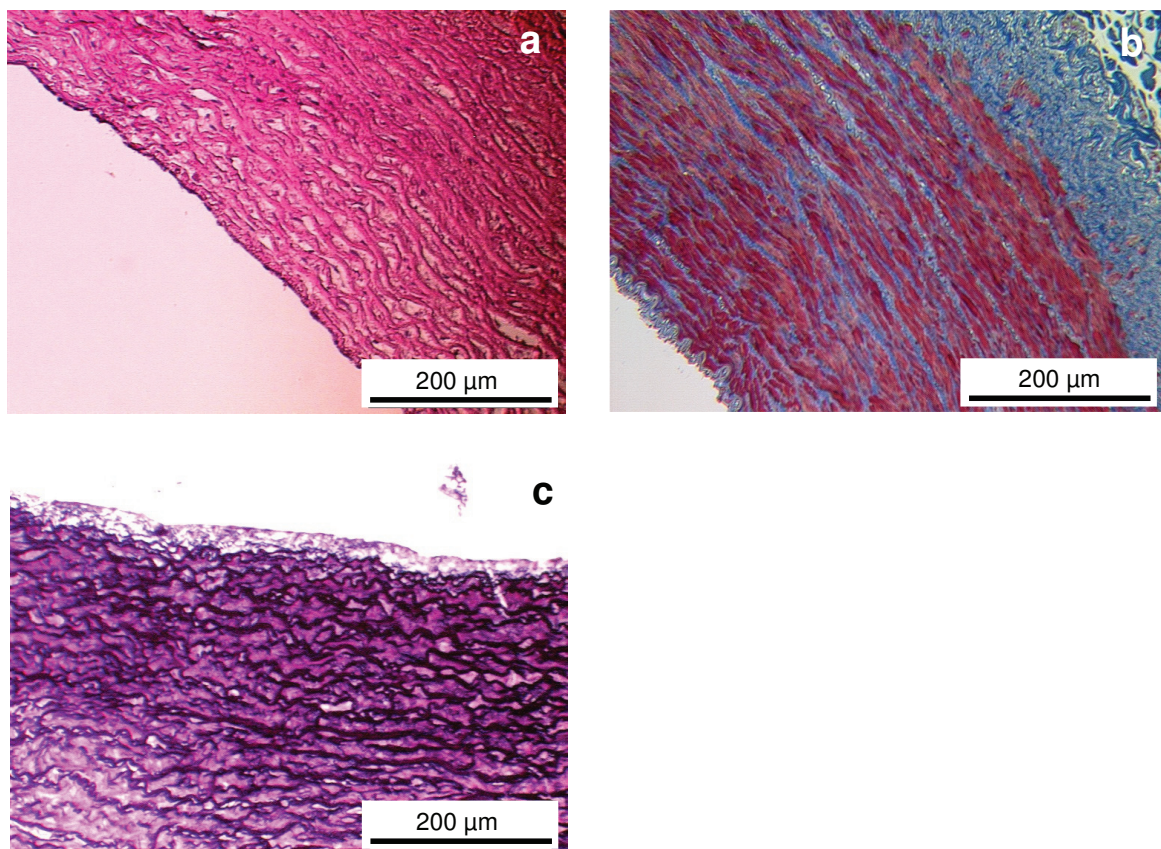


Abb. 89: Histologische Färbungen eines über 7 Tage kultivierten porcinen *Arteria carotis externa*-Abschnitts: HE-Färbung (a), Azanfärbung nach *Heidenhain* (b) und Elastikafärbung nach *Hart* (c)

Immunhistochemische Untersuchung der Blutgefäßabschnitte

Für den Nachweis der endothelialen Integrität der Blutgefäßabschnitte wurde ein polyklonaler Antikörper gegen VE-Cadherin (Anti-VE-Cadherin C-19, Ziege, Santa Cruz Biotechnology, USA) in einer Verdünnung mit PBS von 1:100 verwendet. Zur Verhinderung der Maskierung der Gewebeproben wurden diese für die immunhistochemischen Nachweise unfixiert aufgeblickt und zu 5 µm dicken Kryoschnitten verarbeitet. Die Detektion erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines FITC-markierten Sekundärantikörpers (Kaninchen-anti-Ziege-IgG, 1:400 in PBS verdünnt, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), indem die Präparate mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten, feuchten Kammer für 30 Minuten inkubiert und anschließend dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen wurden. Danach wurden die Präparate dauerhaft eingedeckt (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories, Inc., USA) und auf ihre Immunfluoreszenz hin im Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse, TE 300) untersucht (Abb. 90).

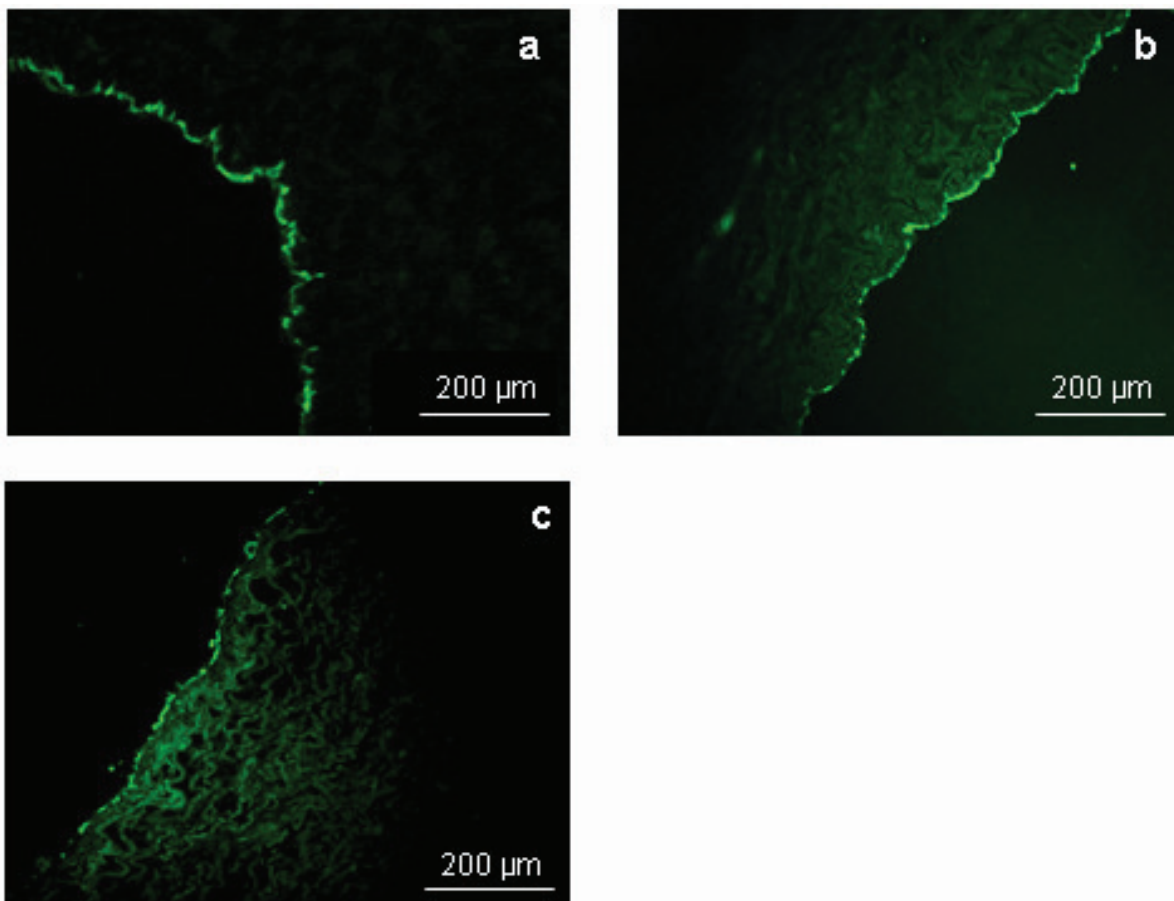


Abb. 90: Nachweis des Endothels in porcinen *Arteria carotis externa*-Abschnitten mit Anti-VE-Cadherin als Primärantikörper und einem FITC-markierten Sekundärantikörper über indirekte Immunfluoreszenz: nativ (a), nach 7 Tagen Kultur (b) und nach 14 Tagen Kultur (c)

Die grüne Immunfluoreszenz als indirekter Nachweis des VE-Cadherins und somit des Endothels konnte sowohl bei der nativen Gewebeprobe als auch bei den Gewebeproben nach 7 und 14 Tagen Gewebekultur dargestellt werden. Da die negative Färbekontrolle, d. h. die alleinige Inkubation in FITC-Reagenz keine Fluoreszenz zeigte, konnte die Antikörperbindung als spezifisch angesehen werden.

In den Blutgefäßabschnitten, die mit PLLA/TETD (80/20 % w/w) DES versehen waren, war nach 7 und 14 Tagen Gewebekultur kein intaktes Endothel mit indirekter Immunfluoreszenz detektierbar, was wiederum auf die starke mechanische Schädigung durch die DES-Implantation und auf die zytotoxische Wirkung des TETD zurückgeführt werden kann.

5.5 Beurteilung der Biokompatibilität koronarer Drug-Eluting Stents im Tiermodell Kaninchen

Die tierexperimentellen Studien zur Biokompatibilität der entwickelten koronaren DES auf der Basis von PLLA und Genistein mit einer Schichtzusammensetzung PLLA/Genistein 70/30 % (w/w) wurden im Rahmen der gemeinsamen Forschungstätigkeit der Nachwuchsgruppe „Stenttechnologien für die vaskuläre Regeneration“ (FKZ: 0402010, Leiterin: Dr. K. Sternberg) in Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin und mit der Experimentellen Chirurgie der Universität Rostock durchgeführt. Die für die koronare Anwendung entwickelten DES auf der Basis von TETD wurden im Zusammenhang mit einer in vivo Untersuchung nicht priorisiert, da die DES-Prototypen auf der Basis von PLLA/TETD (80/20 % w/w) im Gewebekulturmodell zu lokal zytotoxischen Effekten in der Gefäßwand geführt hatten (s. Kap. 5.4).

Die Auswahl der Versuchstiere erfolgte unter Berücksichtigung der anatomischen Voraussetzungen der zu testenden Implantate. Die menschlichen Koronararterien, die üblicherweise mit Stents versorgt werden können, haben einen Durchmesser von 2.5 bis 4 mm. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden beim Tiermodell für die tierexperimentelle Erprobung koronarer DES, dem weiblichen *White-New-Zealand*-Kaninchen (Gewicht ca. 3.5-4 kg), Arterien gewählt, die diese Durchmesser aufweisen und bilateral angelegt sind. Dadurch war es möglich, in einem Individuum zwei unterschiedliche Stents gleichzeitig zu testen. Da die Versuchstiere außer der nach Stentimplantation üblichen Medikation Acetylsalicylsäure und Clopidogrel keine weiteren Medikamente erhielten und von einem annähernden Normalkol-

ektiv auszugehen war, wurde für diese Versuchseinheit eine Anzahl von 7 Kaninchen als ausreichend angesehen.

Bei den *White-New-Zealand*-Kaninchen wurde nach chirurgischer, schichtweiser Präparation der rechten Leiste sowie nach Skelettierung und nach Punktion der *A. femoralis* mit einer 20G-Venenverweilkanüle eine 5F-Schleuse in der *A. femoralis* platziert (Seldinger-Technik) (Abb. 91).



Abb. 91: Implantation von koronaren DES in die *A. subclavia* des *White-New-Zealand*-Kaninchens nach chirurgischer, schichtweiser Präparation der Leiste und Punktion der *A. femoralis*

Über einen Führungsdraht und Führungskatheter wurden die auf dem Ballonkatheter montierten Stents (CoCr-Legierung, 3.0/13 mm) mit der reinen PLLA-Beschichtung und mit der PLLA/Genistein-Beschichtung unter Röntgendurchleuchtung in die linke bzw. rechte *A. subclavia* mit 12 bar für 15 Sekunden implantiert. Dabei wurde das Gefäß in einem Verhältnis des Ballondurchmessers bei Aufdehnung zum Gefäßdurchmesser (*Oversizing*) von 1.2:1 bis 1.3:1 überdehnt. Nach Entfernung der Schleuse wurde die *A. femoralis* ligiert. Abschließend erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss.

Der Eingriff wurde unter Heparin 500 I.E. i.a. und ASS 500 mg i.a. durchgeführt. Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Ketamin/Rompun (2/1 v/v) s.c. narkotisiert. Die post-operative Nachbehandlung zur Thrombozytenaggregationshemmung wurde mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel vorgenommen und wurde über die gesamte Versuchsdauer oral verabreicht.

Für die koronaren DES wurden nach vier Wochen über die kontralaterale *A. femoralis* eine Angiografie und eine digitale quantitative Auswertung durchgeführt, deren Ergebnisse der Tabelle 18 zu entnehmen sind. Danach wurden die Tiere geopfert. Es erfolgte eine chirurgische Explantation der gestenteten Gefäßabschnitte.

Tab. 18: Ergebnisse der quantitativen Koronarangiografie (*Quantitative Coronary Angiography*, QCA) nach 4 Wochen-Implantation von PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-beschichteten Koronarstents (n=7) in die *A. subclavia* von *White-New-Zealand*-Kaninchen im Vergleich zu PLLA-beschichteten Koronarstents (n=7); *) statistische Auswertung (X, SD, T-Test) mit SPSS für Windows, Version 14.0

QCA-Parameter	PLLA/Genistein	PLLA	p ^{*)}
Diameterstenose [%]	6.84 ± 3.73	20.27 ± 14.18	0.047
Flächenstenose [%]	13.13 ± 6.87	33.74 ± 23.40	0.06
Obstruktionsdurchmesser [mm]	2.01 ± 0.24	1.57 ± 0.45	0.048
Obstruktionsfläche [mm ²]	3.19 ± 0.68	2.09 ± 1.11	0.045
Referenzgefäßdurchmesser [mm]	2.14 ± 0.25	1.96 ± 0.36	0.30
Referenzgefäßfläche [mm ²]	3.63 ± 0.78	3.10 ± 1.17	0.33

Für die histomorphologische und histomorphometrische Auswertung wurden die Explantate in 10 %iger Formalin-Lösung fixiert. Die Entwässerung der Gewebeproben erfolgte in einer ansteigenden Alkoholreihe. Dann wurden die Explantate für 1 h in Xylol bei Raumtemperatur und danach für 10 h in Xylol bei 4 °C eingelagert. Die entwässerten Proben wurden wie folgt weiter behandelt: 1) Präinfiltration der Explantate für 1 h bei Raumtemperatur in Technovit 9100 Neu Basis (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)/Xylol 1:1 v/v, 2) Präinfiltration der Explantate für 1 h bei Raumtemperatur in 20 ml Technovit 9100 Neu Basis mit 0.1 g Härter und 3) Infiltration der Explantate für 1 h bei 4 °C in 40 ml Technovit 9100 Neu Basis mit 3.2 g PMMA-Pulver und 0.32 g Härter. Nach der Infiltration der Explantate wurden diese eingebettet. Dafür wurden die Stammlösungen A, bestehend aus 30 ml Technovit 9100 Neu Basis, 4.8 g PMMA-Pulver und 0.24 g Härter 1, und B, bestehend aus 3 ml Technovit 9100 Neu Basis, 0.24 ml Härter 2 und 0.12 ml Regler, im Verhältnis A:B von 9:1 (v/v) gemischt. Die Aushärtung der entgasten und mit Argon belüfteten Proben wurde im Kühlschrank bei 4 °C für 24-72 h vorgenommen. Die mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2155) gefertigten Dünnschnitte von 5 Schnittebenen (proximal, distal, 3 Schnittebenen innerhalb des Stents) wurden entplastet und der Elastica van Gieson-Färbung unterzogen, durch die die Zellkerne schwarzbraun und die Kollagenfasern rot gefärbt werden.

Exemplarisch ist in der Abbildung 92 der histologische Befund eines DES mit PLLA/Genistein-Beschichtung (70/30 % w/w) im Vergleich zur reinen PLLA-Beschichtung dargestellt. Die histologischen Schnitte, gefärbt mit der Elastica van Gieson-Färbung, zeigten über den Stentstreben eine neointimale Hyperplasie, die beim mit PLLA beschichteten Stent ausgeprägter war als beim PLLA/Genistein-DES.

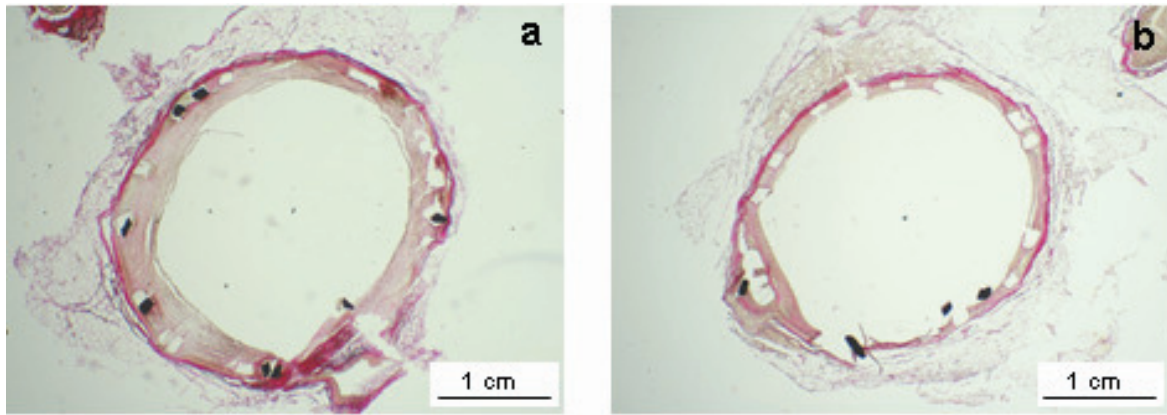


Abb. 92: Histologische Schnitte (Elastica van Gieson-Färbung) von Explantaten der *A. subclavia* des *White-New-Zealand*-Kaninchens nach 4 Wochen-Stentimplantation: reine PLLA-Beschichtung (a) und PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-Beschichtung (b)

Zur histomorphometrischen Auswertung der Dünnschnitte wurden diese im jpg-Format digitalisiert und anschließend in das Bitmap-Format umgewandelt. Zur Ermittlung der flächenbezogenen Parameter wurde eine Kalibrierung durchgeführt, damit die erhaltenen Pixel in die Flächeneinheit mm^2 umgerechnet werden können. Anschließend wurde eine manuelle Konturfindung an geschlossenen Splines realisiert und die ermittelten Pixelgrößen wurden in reale Flächeneinheiten umgerechnet. Die Histomorphometrie von 5 Dünnschnitten pro Schnittenebene aller Explantate konnte die Ergebnisse der QCA (s. Tab. 18) nicht bestätigen, da weder nach der Auswertung der mittleren flächenbezogenen Restenose (in %, Abb. 93) noch der mittleren Neointimafläche (in mm^2 , Abb. 94), zu deren Ermittlung die bestimmten Daten für die Original- und Residuallumina zugrunde gelegt wurden, signifikante Unterschiede zwischen der PLLA- und der PLLA/Genistein-DES-Gruppe zu beobachten waren.

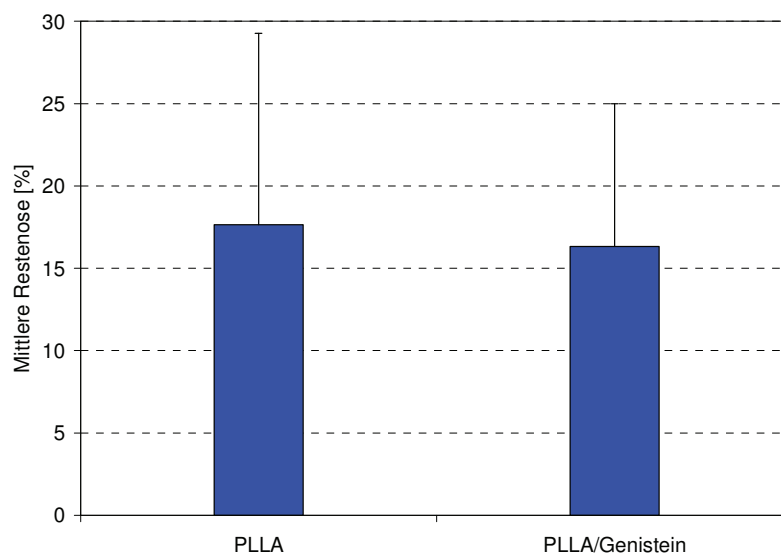


Abb. 93: Mittlere flächenbezogene Restenose im Bereich der PLLA- und PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-beschichteten Stents (jeweils $n=7$) nach 4 Wochen Implantation in die *A. subclavia* des *White-New-Zealand*-Kaninchens

Die mittlere flächenbezogene Restenose als arithmetischer Mittelwert der Restenosen aller Schnittebenen betrug nach Implantation der mit PLLA beschichteten Stents $17.6 \% \pm 11.6$ und nach Implantation der PLLA/Genistein-DES $16.3 \% \pm 8.65$ (Abb. 93).

Als Werte der mittleren Neointimafläche, die aus der Differenz zwischen Originallumen und Residuallumen resultierte, wurden im Bereich der PLLA-beschichteten Stents $0.48 \text{ mm}^2 \pm 0.27$ und im Bereich der PLLA/Genistein-DES $0.5 \text{ mm}^2 \pm 0.32$ ermittelt (Abb. 94).

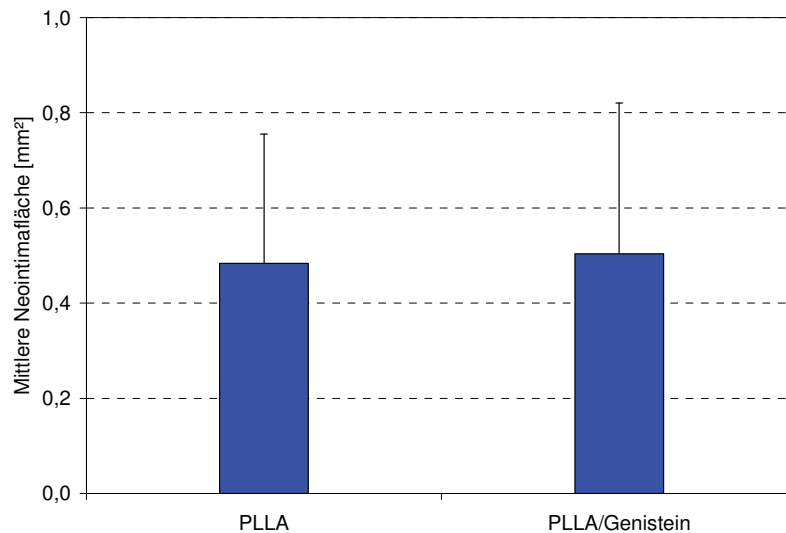


Abb. 94: Mittlere Neointimafläche im Bereich der PLLA- und PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-beschichteten Stents (jeweils $n=7$) nach 4 Wochen Implantation in die *A. subclavia* des *White-New-Zealand*-Kaninchens

Die Wirksamkeit des entwickelten koronaren DES auf der Basis einer PLLA/Genistein-Beschichtung konnte somit im dargestellten Tiermodell nicht ausreichend bewiesen werden, da keine signifikant verminderte neointimale Reaktion in den 4 Wochen-Ergebnissen durch die PLLA/Genistein-Beschichtung im Vergleich zur reinen PLLA-Beschichtung erzielt wurde. Eine Kombination des Phytoöstrogens Genistein mit einem antiproliferativen Wirkstoff, wie Sirolimus oder Paclitaxel, in der PLLA-Beschichtung könnte eine Verbesserung des in vivo Ergebnisses hinsichtlich der Inhibition der In-Stent-Restenose bewirken.

6. Entwicklung von Drug-Eluting Stents für die Gefäßchirurgie

Zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) im Zusammenhang mit dem „Überstenten“ einer Prothesenbypass-Anastomose (Kap. 3.1.2) wurde ein biodegradierbarer DES auf der Basis von Poly(L-lactid) (PLLA) und Sirolimus (SIR, auch genannt: Rapamycin) entwickelt, der neben seiner vollständigen Abbaubarkeit den Vorteil einer lokalen Medikation über ein LDD-System in sich vereint.

Der periphere Polymerstentgrundkörper (6.0x25 mm, Strutdicke 250 µm) wurde aus hochmolekularem PLLA (Resomer[®] L214, $M_w = 650000$ g/mol, Fa. Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) gefertigt. Die Herstellung der hohlzylindrischen Halbzeuge erfolgte mit Hilfe eines Tauchverfahrens aus der chloroformhaltigen PLLA-Lösung (1.6 % w/v). Um reproduzierbare Herstellungsbedingungen gewährleisten zu können, wurde für die Fertigung der Halbzeuge ein Tauchroboter verwendet [270]. Zum Erreichen der Lösungsmittelfreiheit wurden die Halbzeuge zwei Tage in Methanol und danach zweimal für einen Tag in dest. Wasser gewaschen. Aus den lösungsmittelfreien, getrockneten Halbzeugen wurden mit einem CO₂-Laser (Wild Emco Lasertec, Österreich) die Stents geschnitten. In der Abbildung 95 sind eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des undilatierten PLLA-Stents und eine fotografische Aufnahme des undilatierten und dilatierten PLLA-Stents dargestellt.

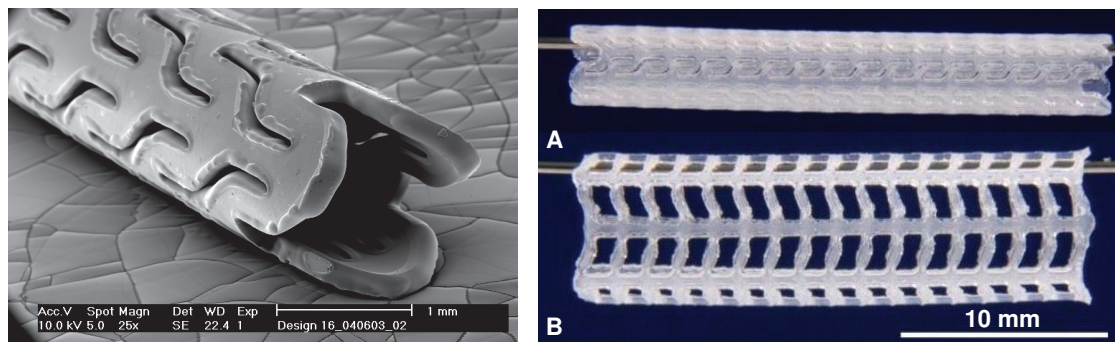


Abb. 95: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines undilatierten, peripheren PLLA-Stents (links) und fotografische Aufnahme des peripheren PLLA-Stents (A: undilatiert, B: dilatiert) [271]

Um einen Wiederverschluss des PLLA-Stents zu verhindern, wurde das hinsichtlich seiner antiproliferativen Effekte auf Zellen bekannte makrozyklische Immunsuppressivum SIR verwendet, da es eine Reihe von Zytokin-vermittelten Signaltransduktionswegen durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) inhibiert. Die Hemmung von mTOR verhindert die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase p34cdc2 und somit die Komplexbildung mit Cyclin E. Dieses hat zur Folge, dass der Übergang ver-

schiedener Zelltypen, beispielsweise T-Zellen, von der postmitotischen G₁-Phase in die Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklusses verhindert wird [272]. Zur Entwicklung der PLLA/SIR-DES war der Wirkstoff von der Fa. Wyeth Pharma GmbH (Münster, Germany) bezogen worden. Die PLLA-Stents wurden mit einer PLLA/SIR-Lösung im Sprühverfahren (Kap. 4.2.2) beschichtet, die resultierte, indem die mit absolutem Methanol angesetzte SIR-Lösung (16 % w/v) mit der chloroformhaltigen PLLA-Lösung (1.6 % w/v) so gemischt wurde, dass die Endkonzentration von SIR in PLLA 30 % (w/w) betrug. Danach wurden die PLLA/SIR-DES bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) getrocknet, bis nach 21 Tagen ein Chloroformrestgehalt von kleiner 60 µg/g Beschichtung (s. Kap. 4.2.3) zu verzeichnen war. Eine Trocknung der DES bei 80 °C war nicht möglich, da das SIR bei dieser Temperatur in der Beschichtung thermisch instabil war. Die PLLA/SIR-Schichten wiesen im Mittel eine Masse von 1.2 mg pro Stent auf, was einer SIR-Beladung von annähernd 1.5 µg/mm² entsprach. Die Therapievariante unter Verwendung eines biodegradierbaren Stentgrundkörpers hat den Vorteil, dass weitere Optionen für eine Nachbehandlung bestehen, sobald der biodegradierbare DES vollständig abgebaut ist.

6.1 Untersuchung des ausgewählten Wirkstoffes hinsichtlich seiner Effekte auf Gefäßwandzellen

Um den vitalitäts- und proliferationshemmenden Effekt des Wirkstoffs SIR in Abhängigkeit von dessen Konzentration auf die Zellen der Gefäßwand beurteilen zu können, wurden humane koronare, arterielle Endothelzellen (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*, HCAEC) und humane koronare, arterielle glatte Muskelzellen (*Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells*, HCASMC) mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen inkubiert und die relative Zellvitalität (in %) mit Hilfe des MTS-Tests (Kap. 4.1.4) sowie die relative Zellproliferation (in %) mit Hilfe des BrdU-Tests (Kap. 5.2) unter SIR-Einfluss in Bezug zur SIR-freien Negativkontrolle bestimmt. Die HCAEC und HCASMC sowie die Basal- und Wachstumsmedien wurden von der PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Die den Zellkulturuntersuchungen zugrunde liegende Versuchsdurchführung wird in den folgenden Ausführungen erläutert. Für die Zellkulturtests wurde eine 1×10^{-3} M ethanolische SIR-Stammlösung angesetzt, die dann weiter mit Zellkulturmedium auf SIR-Konzentrationen von 1×10^{-5} M bis 1×10^{-12} M (in 1×10^{-1} M-Verdünnungsschritten, entspricht Ethanolkonzentrationen von 1 % bis 1×10^{-7} %) verdünnt wurde. Dieser Konzentrationsbereich wurde gewählt, da unterhalb einer Ethanolkonzentration von 1 % keine Hemmung der Vitalität und Proliferation von HCAEC und HCASMC durch Ethanol zu beobachten war. Die HCAEC und

HCASMC wurden zur Nachahmung der in vivo Situation (s. Kap. 3.1.1) wie im Kapitel 5.2 beschrieben kultiviert, arretiert und restimuliert. Es wurden wiederum folgende Kontrollen mitgeführt: NC1 - die Zellen wurden in frischem Basalmedium kultiviert, dem FKS zugesetzt war; NC2 - die Zellen wurden in frischem Basalmedium kultiviert, dem FKS zugesetzt war und anschließend erfolgte die Restimulierung mit EGF bzw. PDGF und 5 % FKS zur Überprüfung der Restimulierbarkeit und als Referenz (= 100 % gesetzt) für die Wirkstoffapplikation. Die Ansätze wurden für 24 h mit den SIR-Lösungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Dehydrogenaseaktivität (MTS-Test) oder des in die DNA eingebauten 5-Brom-2'-desoxyuridins (BrdU-Test).

SIR-Wirkung auf die primären Endothelzellen HCAEC

Die Untersuchungen zur Testung des Einflusses von SIR auf die Vitalität von HCAEC mit Hilfe des MTS-Tests zeigten, dass im Konzentrationsbereich von 1×10^{-11} bis 1×10^{-5} M SIR eine Hemmung der Zellvitalität um maximal 47 % (bei 1×10^{-8} M SIR nach 24 h) zu verzeichnen ist (Abb. 96). Bei einer SIR-Konzentration von 1×10^{-12} M war keine Beeinträchtigung der Vitalität der Testzellen mehr nachweisbar.

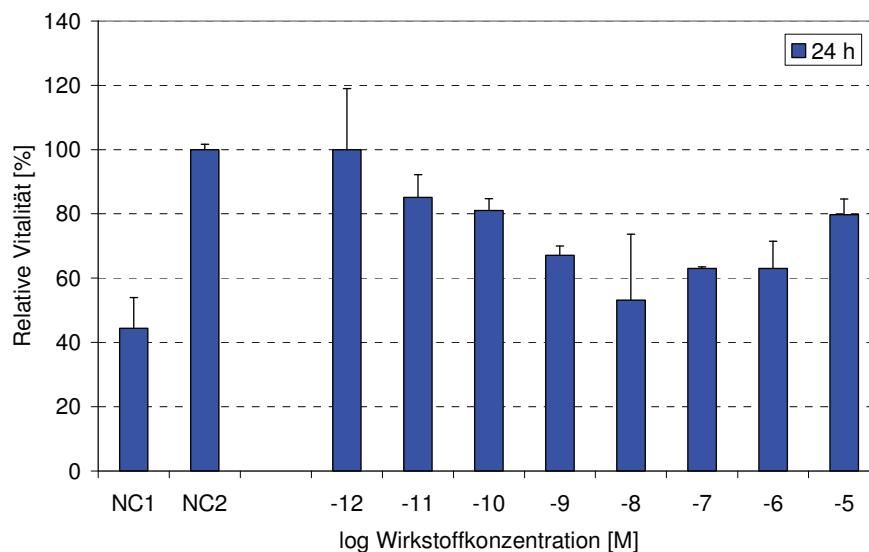


Abb. 96: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, n=6 pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, n=6) [271]

Die Proliferation der HCAEC wurde wie die Vitalität durch SIR im Konzentrationsbereich von 1×10^{-11} bis 1×10^{-5} M SIR beeinflusst (Abb. 97). Eine maximale Hemmung der Zellproliferation um 58 % war bei 1×10^{-9} M SIR zu beobachten.

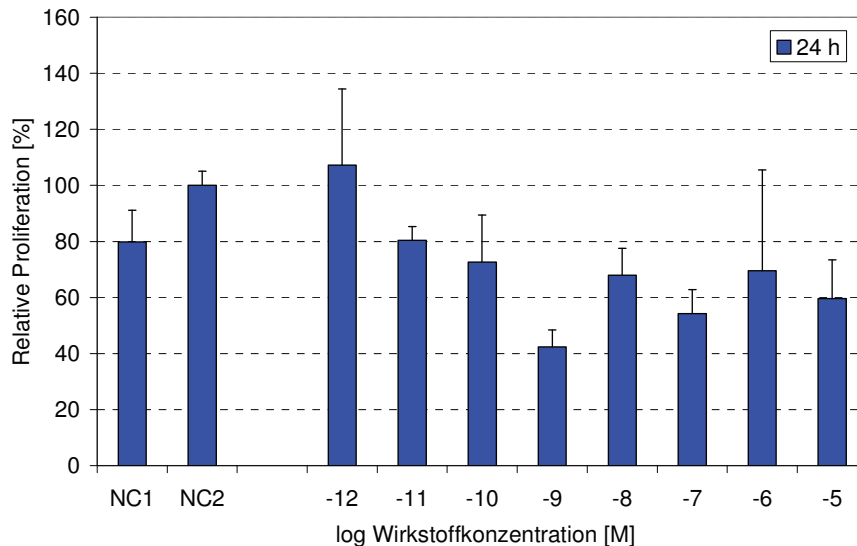


Abb. 97: Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, $n=6$ pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, $n=6$) [271]

SIR-Wirkung auf die primären glatten Muskelzellen HCASMC

Die Vitalität von HCASMC wurde im Konzentrationsbereich von 1×10^{-12} bis 1×10^{-5} M SIR inhibiert. Die Hemmung der Vitalität betrug in diesem Konzentrationsbereich im Mittel 17 % in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (Abb. 98).

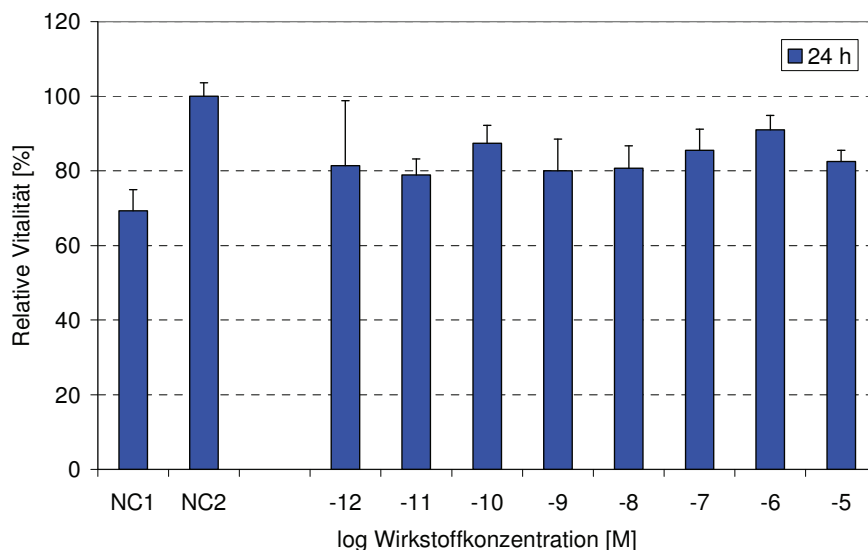


Abb. 98: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, $n=6$ pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, $n=6$) [271]

Die SIR-bedingte Hemmung der HCASMC-Proliferation wurde bei einer SIR-Konzentration $\geq 1 \times 10^{-9}$ M SIR im Mittel um 32 % in Bezug zur Negativkontrolle NC2 beobachtet (Abb. 99).

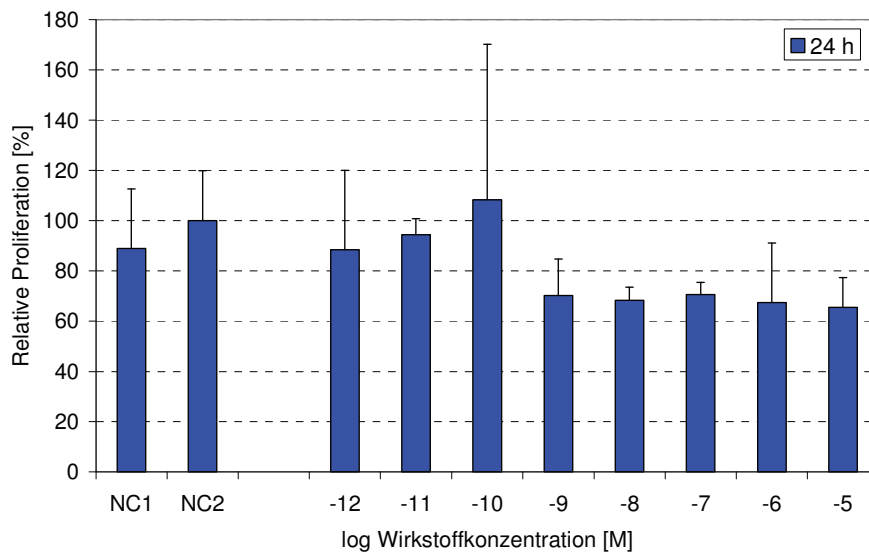


Abb. 99: Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, $n=6$ pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, $n=6$) [271]

Die Zellkulturuntersuchungen zur SIR-bedingten Hemmung der Zellvitalität und -proliferation gestatten die Auswahl der wirksamen SIR-Konzentrationen und sind somit eine wichtige Voraussetzung, um die notwendigen SIR-Konzentrationen, die aus der Stentbeschichtung freigesetzt werden müssen, in erster Näherung abschätzen zu können.

Von Nachteil ist bei der Verwendung des SIR, dass nicht nur die HCASMC in ihrer Proliferation gehemmt werden, sondern auch die HCAEC. Dies birgt die Gefahr der Ausbildung einer späten Stentthrombose in sich, da das SIR auch die Ausbildung der Neointima verhindert und sich über einen längeren Zeitraum Thrombozyten an der Stentoberfläche anheften können, die zum Wiederverschluss des DES führen. Das Vorkommen von Spätthrombosen wurde bereits beim klinisch etablierten Cypher-Stent auf der Basis einer PEVA/PBMA/SIR-Beschichtung (Fa. Johnson & Johnson, USA, Kap. 4.4.2) beobachtet und muss auch bei der peripheren DES-Indikation durch die längerfristige systemische Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern verhindert werden [273-275].

6.2 In vitro Wirkstoffelution polymerer, peripherer Drug-Eluting Stents

Zur Untersuchung der SIR-Freisetzung wurden die aufgeweiteten PLLA/SIR-DES mit 2 ml 0.9 %iger NaCl-Lösung als Elutionsmedium versetzt. An den Probennahmezeitpunkten wurden die DES entnommen und in einem neuen Glasvial mit frischem Elutionsmedium dem weiteren Elutionsvorgang unterzogen. Die resultierende Eluat wurde direkt im Anschluss mittels HPLC vermessen. Die zeitlichen Abstände zwischen den Probennahmen sind dabei so eingestellt worden, dass die Konzentrationsmesswerte innerhalb des kalibrierten Messbereichs des Analysenverfahrens von 0.1-10.0 mg/l lagen. Da zu jeder Probennahme das Elutionsmedium völlig erneuert wurde, wurden die Messwerte akkumuliert. Für die Analyse von SIR wurden nach *French et al.* [276] folgende HPLC-Bedingungen gewählt: Eurospher-Säule 100 C18, Körnung 5 µm, Innendurchmesser 250 x 4 mm (Wissenschaftliche Gerätebau Dr.-Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, Deutschland); mobile Phase Acetonitril/Wasser (65/35 v/v, isokratisch); Temperatur 50 °C; Flussrate 1.0 ml/min und UV-Detektion bei 278 nm. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 0.05 mg/l.

In Voruntersuchungen mit PLLA/SIR-Stentbeschichtungen war festgestellt worden, dass das relativ große SIR-Molekül ($M = 914.2$ g/mol) erst bei einem prozentualen SIR-Gehalt von > 20 % in mit Hilfe der HPLC detektierbaren Konzentrationen aus der hydrophoben PLLA-Matrix freigesetzt wird. Deshalb wurde für den biodegradierbaren, peripheren DES eine Beschichtung mit einer Zusammensetzung von PLLA/SIR 70/30 % (w/w) erprobt (Abb. 100).

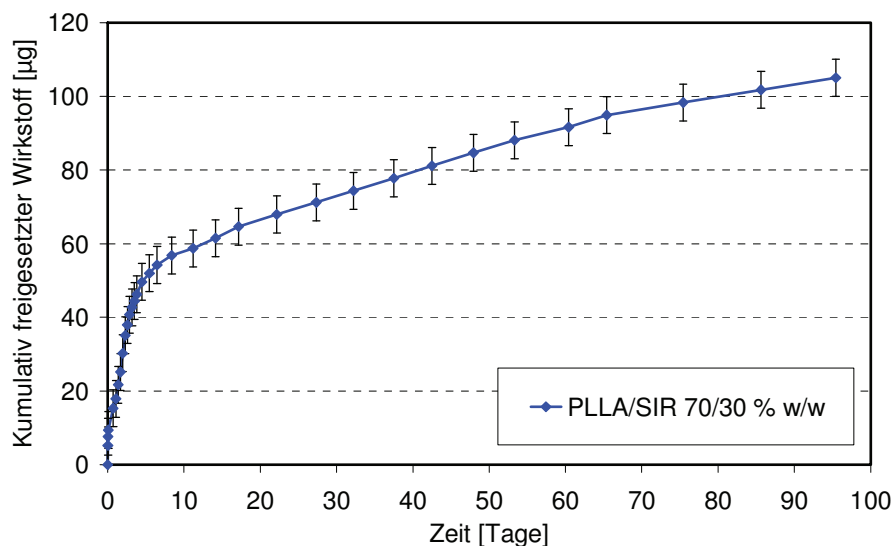


Abb. 100: In vitro Freisetzung von SIR aus PLLA/SIR (70/30 % w/w)-Beschichtungen, die auf biodegradierbare, periphere PLLA-Stentgrundkörper ($n=3$) im Sprühverfahren aufgetragen wurden, in 0.9 %iger NaCl-Lösung (37 °C) [277, 278]

Die entwickelte PLLA/SIR-Beschichtung auf dem PLLA-Stentgrundkörper erwies sich als geeignet, den Wirkstoff in Konzentrationen von $> 1 \times 10^{-7}$ M SIR über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten zu eluieren. Zu Beginn der in vitro Elution wurden pro Tag 8-12 μ g SIR freigesetzt. Nach 4 Wochen betrug die täglich freigesetzte absolute Dosis 0.5-1 μ g SIR. Nach dem Untersuchungszeitraum von 3 Monaten waren annähernd 30 % der auf der Stentoberfläche installierten SIR-Masse eluiert, so dass auch über 3 Monate hinaus SIR in Konzentrationen freigesetzt werden kann, die in vitro eine Hemmung der Zellproliferation bewirkten (Kap. 6.1).

6.3 Beurteilung der Biokompatibilität polymerer, peripherer Drug-Eluting Stents im Tiermodell Schwein

Die tierexperimentellen Studien zur Biokompatibilität der peripheren DES wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie und mit der Experimentellen Chirurgie der Universität Rostock durchgeführt. Als Versuchstiere dienten weibliche Landschweine mit einem Gewicht von 35 - 40 kg. Die Genehmigung zur Durchführung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes erteilte das Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern (Az: LVL M-V/ 310-4/ 7221.3-1.1-017/ 02). Zur Erprobung der PLLA/SIR-DES im Blutkontakt wurde nach *Bünger et al.* [279, 280] ein operativer Hybrideingriff vorgenommen, bei dem Prothesenbypass-Anastomosen überstentet wurden (Abb. 101). Als Referenzstents für den PLLA/SIR-DES dienten der unbeschichtete, biodegradierbare PLLA-Stent (6.0x25 mm) und ein kommerziell verfügbarer Edelstahlstent (6.0 x 26 mm, Biotronik GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) mit einer (α -SiC:H)-Beschichtung. Bei der Implantation des jeweiligen Stents im Bereich der distalen iliakalen Anastomose (s. Kap. 3.1.2) wurde der Stent, der auf einen 6/40 mm Ballonkatheter montiert war, über die Inzision eingebracht und mittig im Anastomosenbereich platziert. Die Stentdilataion erfolgte durch Aufweitung des Ballonkatheters auf 8 bar. Aufgrund der mechanischen Eigenschaften der PLLA-Stents und der PLLA/SIR-DES wurden diese vor dem Gebrauch auf 37 °C temperiert und langsam innerhalb von 8 min aufgedehnt (1 bar/min). Die Edelstahlstents konnten zügig innerhalb von wenigen Sekunden dilatiert werden. Nach Entfernung des deflatierten Ballonkatheters und nach kurzem Spülen mit Heparin-NaCl-Lösung wurde die Längsinzision durch Einzelknopfnähte verschlossen. Alle Tiere erhielten intraoperativ eine kontinuierliche Heparin-gabe (i.v., 50 IU/kg pro Stunde). Die Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel begann einen Tag präoperativ und wurde über die gesamte Versuchsdauer oral verabreicht. Die arteriellen, femoralen Flusseigenschaften, d. h. distal der iliakalen Anastomose, wurden durch Dopplersonografie (HiDop[®] 300, 4 MHz Sonde, Regensburg, Schweiz; Abb.

101) an Hand der maximalen systolischen Frequenz präoperativ, intraoperativ nach Prothesenimplantation und nach Anastomosen-Stenting sowie postoperativ geprüft.

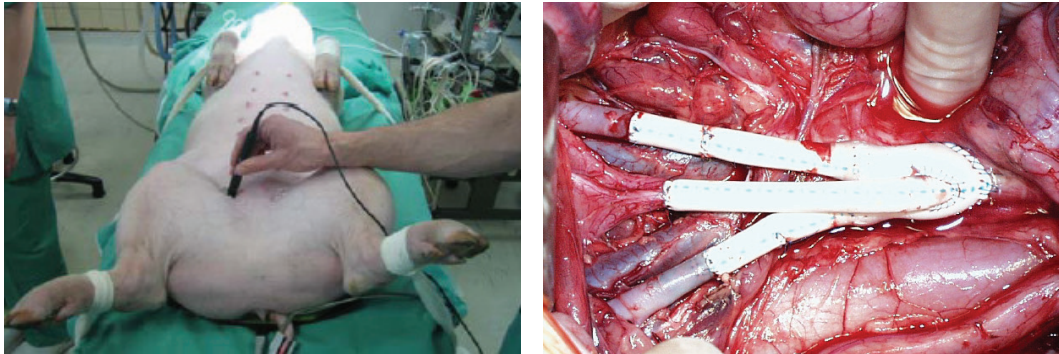


Abb. 101: Untersuchung des femoralen Flusses mit Hilfe der Dopplersonografie (links) sowie intraoperativer Situs des Landschweins nach Implantation einer PTFE-Bifurkationsprothese und nach biliakalem Stenting von PLLA/SIR-DES im PTFE-Prothesen-Anastomosebereich (rechts) nach *Bünger et al.* [277, 278]

Für die Auswertung der Stentbiokompatibilität nach einem Implantationszeitraum von 6 Wochen wurden die gestenteten Iliakalanastomosensegmente, einschließlich der angrenzenden proximalen (Prothese) und distalen (Iliakalarterie) Segmente, nach einer intravenösen Bolus-Heparinisierung (10.000 U) chirurgisch explantiert. Danach wurden die Tiere mit einer intravenösen Überdosis Kaliumchlorid (60 mval) getötet. Die Explantate wurden in 10 %iger Formalin-Lösung fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Poly(glycolmethacrylat) (Technovit 9100, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und zum Schluss zu 10 µm dicken Dünnschnitten verarbeitet. Jeweils 6 Schnitte eines Segments wurden zur Unterscheidung der verschiedenen Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die histologischen Schnitte zeigten über den Stentstreben eine neointimale Hyperplasie, die beim unbeschichteten PLLA-Stent ausgeprägter war als beim PLLA/SIR-DES (Abb. 102).

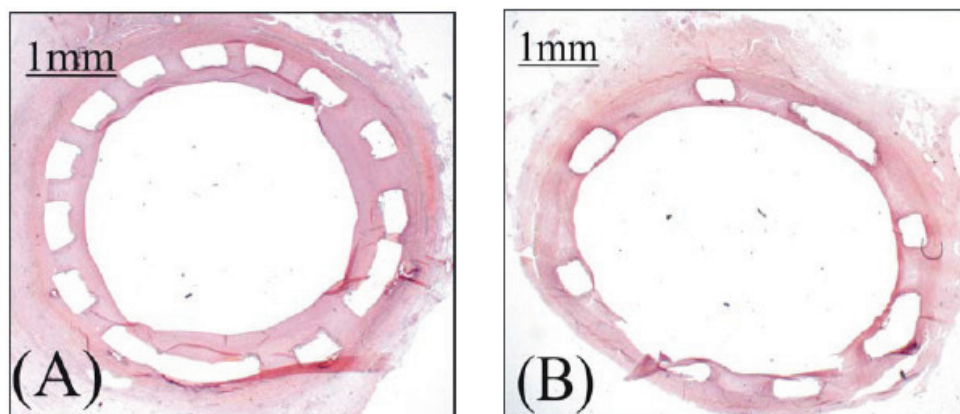


Abb. 102: Histologische Schnitte (HE-Färbung) distal der iliakalen Anastomose; A: PLLA-Stent, B: PLLA/SIR-DES [277, 278]

Um die histologischen Schnitte morphometrisch auswerten zu können, wurden die digitalisierten mikroskopischen Bilder mit der Software Image J (Version 1.32j, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) vermessen. Die ermittelten Werte wurden dann in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel 2000, Microsoft Corporation) überführt und verarbeitet. Nach Auswertung der histomorphometrischen Daten konnte gezeigt werden, dass bei den PLLA/SIR-DES die geringste mittlere Neointimadicke ($0.09 \text{ mm} \pm 0.02$) zu verzeichnen war, die signifikant niedriger als die bei den Metallstents ($0.19 \text{ mm} \pm 0.04$, $p = 0.004$) und bei den unbeschichteten PLLA-Stents ($0.31 \text{ mm} \pm 0.15$, $p < 0.001$) war (Abb. 103). Die mittlere Neointimadicke errechnete sich dabei aus dem arithmetischen Mittel der Neointimadicken über die einzelnen Stentstreben.

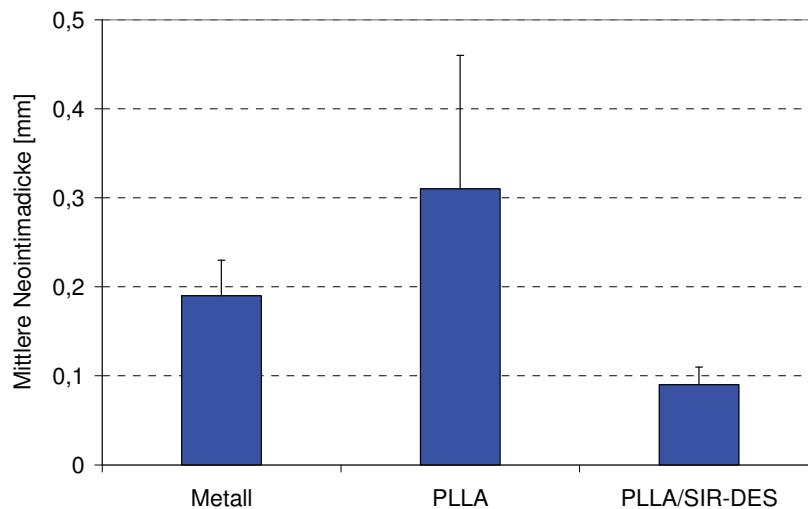


Abb. 103: Mittlere Neointimadicke im Bereich der Metall-, PLLA- und PLLA/SIR-Stents (jeweils $n=6$) nach 6 Wochen Implantation im Landschwein distal der iliakalen Anastomose [277, 278]

Als Maß für die durch den Stent ausgelöste Entzündungsreaktion wurde der *Inflammatory-Score* bestimmt, der durch Division aller addierten Punktwerte durch die Anzahl der untersuchten Stentstreben der Schnittebene distal der iliakalen Anastomose berechnet wurde. Die Werte ergaben sich dabei durch folgendes 0 bis 3-Punktesystem: 0 - keine inflammatorische Reaktion; 1 - Vorhandensein von leichten, nicht-zirkumferenten, lymphohistiozytären Infiltraten in der Stentstegumgebung; 2 - Vorhandensein lokalisierter, nicht-zirkumferenter, mäßiger bis dichter zellulärer Aggregate in der Stentstegumgebung und 3 - Vorhandensein zirkumferenter, dichter, lymphohistiozytärer Infiltrate um die Stentstege herum. In der Umgebung der Stentstreben der PLLA/SIR-DES wurde nur eine milde inflammatorische Reaktion (1.14 ± 0.46) beobachtet, die vergleichbar war mit der Gruppe der Metallstents (1.27 ± 0.45), aber signifikant geringer war als die der Gruppe der unbeschichteten PLLA-Stents (1.79 ± 0.56 , $p < 0.001$) (Abb. 104). Es war somit festzustellen, dass die durch das PLLA ausgelöste inflammatorische Reaktion durch die lokale Freisetzung des Wirkstoffes SIR beim PLLA/SIR-DES deutlich reduziert werden konnte.

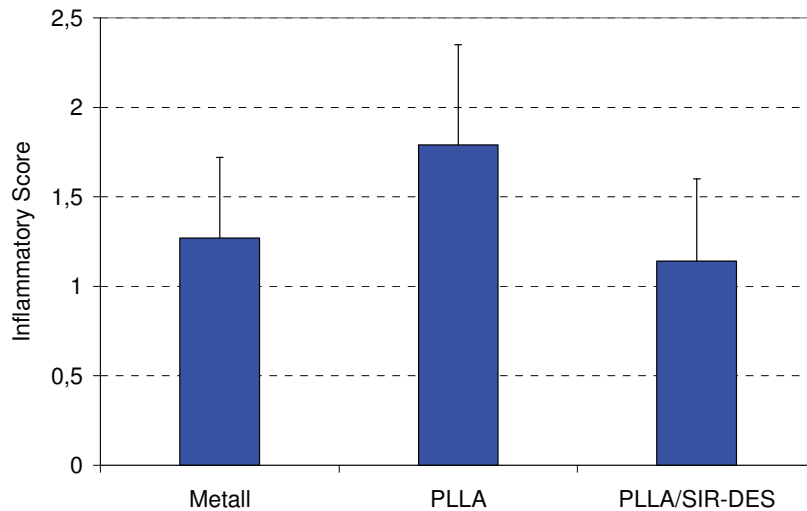


Abb. 104: Inflammatory-Score als Ausdruck der Entzündungsreaktion um die Stenosen von Metall-, PLLA- und PLLA/SIR-Stents (jeweils n=6) nach 6 Wochen Implantation im Landschwein distal der iliakalen Anastomose [277, 278]

Der *Injury-Score* als Maß für die stentbedingte Gefäßwandverletzung distal der iliakalen Anastomose wurde semiquantitativ evaluiert, indem die Verletzungen der Lamina elastica interna (LEI), Tunica media (TM) und Lamina elastica externa (LEE) nach folgendem 0 bis 3-Punktesystem bewertet wurden: 0 - keine Verletzung der Gefäßwand, 1 - Perforation der LEI, 2 - Perforation der TM und 3 - Perforation der LEE. Der durchschnittliche Injury-Score resultierte nach Division aller addierten Punktwerte durch die Anzahl der untersuchten Stentstrecken der Schnittebene distal der iliakalen Anastomose. Die Auswertung des Injury Score ergab eine milde vaskuläre Verletzung bei allen untersuchten Stents (Metall: 0.50 ± 0.62 , PLLA: 0.53 ± 0.64 , PLLA/SIR: 0.42 ± 0.63) ohne signifikante Differenzen (Abb. 105).

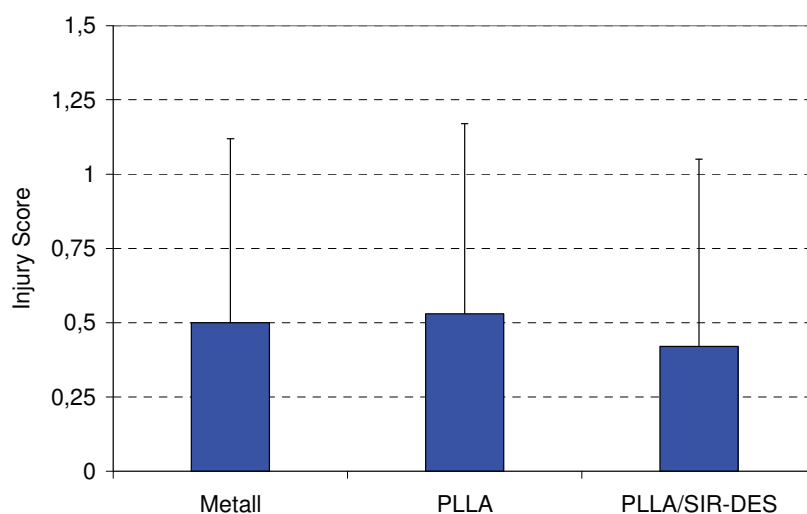


Abb. 105: Injury-Score als Ausdruck der Gefäßwandverletzung nach 6 Wochen Implantation von Metall-, PLLA- und PLLA/SIR-Stents (jeweils n=6) im Landschwein distal der iliakalen Anastomose [277, 278]

Die Wirksamkeit des entwickelten biodegradierbaren PLLA/SIR-DES wurde somit im gewählten Tiermodell bewiesen, da eine signifikant verminderte inflammatorische und neointimale Reaktion einhergehend mit einer deutlich erhöhten luminalen Durchgängigkeit in den 6 Wochen-Ergebnissen durch die PLLA/SIR-Beschichtung im Vergleich zum unbeschichteten PLLA-Stent gezeigt werden konnte.

7. Entwicklung von Drug-Eluting Stents für die Urologie

Zur lokalen Behandlung von Stenosen der Urethra beim Prostatakarzinom (Kap. 3.1.3) sollte ein polymerbasierter, biodegradierbarer DES entwickelt werden. Als Stentplattform sollte ein Urethrastent aus PLLA dienen, der neben seiner mechanischen Stützfunktion zusätzlich die Funktion als LDD-System zu wirken in sich vereint. Als Modellwirkstoff wurde das Methotrexat (MTX) ausgewählt. MTX ist ein Analogon der Folsäure und inhibiert als Folsäure-Antagonist kompetitiv und reversibel die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) [281]. Die DHFR katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat und stellt somit einen wichtigen Zwischenschritt für die Synthese von DNA, RNA und Proteinen dar. Da die DHFR eines der gebräuchlichsten Zielmoleküle bei der Chemotherapie ist, wird MTX bevorzugt als Zytostatikum (Antimetabolit) in der Krebsbehandlung eingesetzt.

Neben der in vitro Prüfung der Biokompatibilität des verwendeten Polymers PLLA stand zunächst die in vitro Studie zur Beurteilung der Wirksamkeit von MTX, d. h. dessen wachstumshemmender Effekt auf Karzinomzellen, im Vordergrund. Danach wurden die PLLA-Urethrastents mit PLLA/MTX-Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung aus der Lösung beschichtet und hinsichtlich ihres MTX-Freisetzungsverhaltens in vitro beurteilt [282].

Für die Urethrastents (4.0x10 mm, Strutdicke 400 µm) kam wie bei den peripheren DES (Kap. 6) das hochmolekulare PLLA Resomer[®] L214 ($M_w = 650000$ g/mol) zur Anwendung, das als Granulat von der Firma Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim, Deutschland) bezogen wurde. Das Modellzytostatikum MTX wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Das Design der PLLA-Urethrastents [270] ist dadurch gekennzeichnet, dass es aus vier Ringen mit S-förmigen Struts besteht, die paarweise spiegelverkehrt zueinander angeordnet sind. Die Ringe sind durch Versatzelemente miteinander verbunden (Abb. 106). Mit Hinblick auf eine spätere, geplante in vivo Testung wurden die PLLA-Urethrastents zunächst für das Tiermodell Kaninchen dimensioniert. Die Fertigung der PLLA-Urethrastents erfolgte wie die der peripheren PLLA-Stents (Kap. 6) wiederum mit Hilfe des teilautomatisierten Tauchverfahrens aus der PLLA-Lösung (1.6 %

w/v) und unter Verwendung des CO₂-Lasers (Wild Emco Lasertec, Österreich). Die Lösungsmittelfreiheit wurde analog, wie im Kapitel 6 erläutert, durch einen Waschprozess in Methanol und dest. Wasser realisiert.

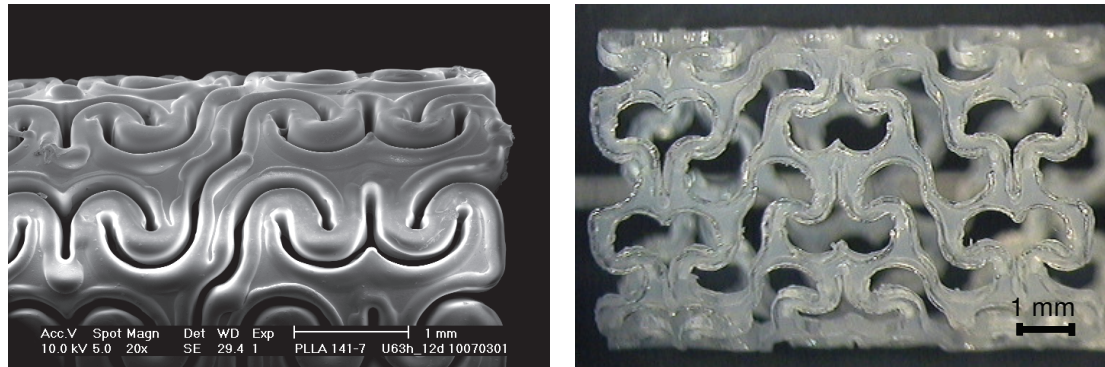


Abb. 106: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines undilatierten PLLA-Urethrostents (links) und lichtmikroskopische Aufnahme eines dilatierten PLLA-Urethrostents (rechts) [282]

Für die MTX-Beschichtung der PLLA-Stents wurden Suspensionen aus dem schwerlöslichen MTX in PLLA-Lösung hergestellt, indem das MTX in die chloroformhaltige PLLA-Lösung (1.6 % w/v) eingerührt wurde, so dass Endkonzentrationen von MTX in PLLA von 30 % und 60 % (w/w) erreicht wurden. Die PLLA/MTX-Suspensionen wurden dann im Sprühverfahren (Kap. 4.2.2) auf die PLLA-Stentoberflächen aufgetragen. Die Schichtmassen der im Vakuumtrockenschrank (6-8 mbar) bei 40 °C getrockneten DES-Typen betragen annähernd 1.3 mg. Die beschichteten Stents wurden anschließend den *in vitro* Untersuchungen zugeführt.

7.1 *In vitro* Biokompatibilität des verwendeten Polymers

Zum Nachweis der Biokompatibilität des für die Stents und für die Beschichtungen verwendeten PLLA wurden Vitalitätstests an porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) mit Eluaten von PLLA-Folien (indirekter Kontakt) und mit PLLA-Folien (direkter Kontakt) gemäß der Europäischen Norm zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (Teil 5: Prüfungen auf *in vitro* Zytotoxizität, DIN EN ISO 10993-5, 1999) durchgeführt. Herangezogen wurde wiederum der bereits im Kapitel 4.1.4 beschriebene MTS-Test. Zur Gewinnung der pPUC wurden Gewebeproben aus porcinen Harnleitern verwendet.

Für die Eluatuntersuchungen wurden die zu untersuchenden Polymerfolien mit Zellkulturmedium bei 37 °C für 48 h unter ständigem Schütteln im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Folieneluatate mit frischem Zellkulturmedium verdünnt (100 % Eluat, 50 %

Eluat, 25 % Eluat). Als Negativkontrolle wurde reines Zellkulturmedium ohne Prüfkörper und als Positivkontrollen wurden Eluate von Latex-Folien bekannter Toxizität mitgeführt.

Die pPUC wurden 24 h vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 1×10^5 c/ml in 96-Well-Platten mit einem Volumen von 200 μ l Zellkulturmedium/Well ausgesät und unter standardisierten Kulturbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte ein Austausch des Zellkulturmediums durch die oben genannten Prüfmedien. Diese Ansätze wurden für 24 h und 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Prüfmedium gegen das MTS-Medium (MTS-Reagenz/DMEM-Medium ohne Phenolrot 1/5 v/v, 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) ausgetauscht und der MTS-Test durchgeführt.

Für die Beurteilung der Biokompatibilität von PLLA-Folienstanzen im Direktkontakt mit pPUC wurden diese in einer Konzentration von 1×10^5 c/ml in 24-Well-Platten auf die Folien ausgesät. Nach 24 h und 48 h wurden Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) entnommen, mit 6.25 %igem Glutardialdehyd fixiert und morphologisch begutachtet. Nach 72 h wurde außerdem die pPUC-Vitalität mittels MTS-Test bewertet.

Die Ergebnisse der MTS-Tests zur Beurteilung der Biokompatibilität des für die Stents und für die Beschichtungen mit MTX verwendeten PLLA zeigten, dass keine zytotoxischen Effekte durch die getesteten PLLA-Folien ausgelöst werden. Die im MTS-Test überprüfte metabolische Aktivität der pPUC wurde durch die Inkubation mit den Eluaten der PLLA-Folien nicht beeinflusst (Abb. 107).

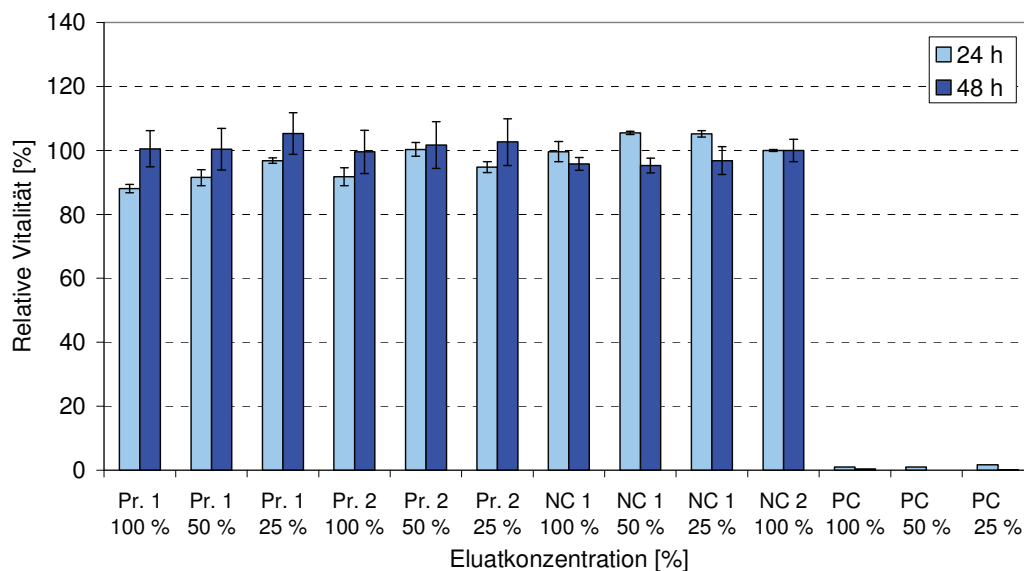


Abb. 107: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) nach Inkubation (24 h, 48 h) mit PLLA-Eluaten ($n=4$ pro Zeitpunkt und Eluat) in Bezug zur Negativkontrolle (NC), Untersuchung von unverdünnten (100 %) und mit Zellkulturmedium verdünnten (50 %, 25 %) Eluaten zweier PLLA-Folien (Probe 1, Probe 2), Postivkontrolle (PC): Eluate einer Latex-Folie, Negativkontrolle (NC): reines Zellkulturmedium

Nach direktem Kontakt der pPUC mit den PLLA-Folien blieb die Morphologie der Zellen unbeeinflusst. Die REM-Aufnahmen zeigten einen geschlossenen Zellrasen prismatisch auf den PLLA-Folien ausgebreiteter pPUC (Abb. 108). Die wenigen zu beobachtenden Risse im Zellverband wurden durch die notwendige Entwässerung der Proben vor der Begutachtung verursacht. Zum Vergleich ist die Positivkontrolle dargestellt, bei der die pPUC nicht auf der Latexoberfläche adhären und als Folge dessen absterben (abgekugelte Zellen).

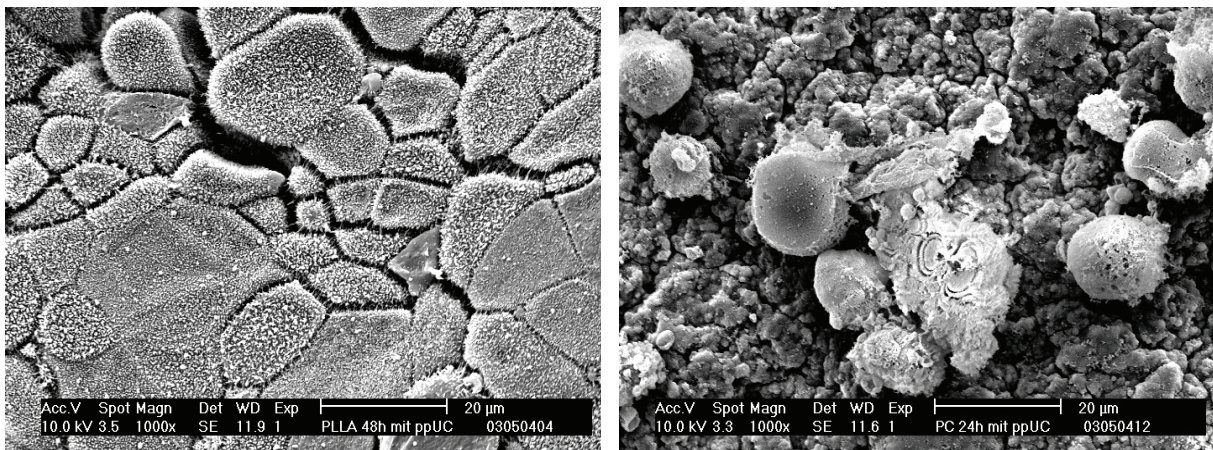


Abb. 108: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) auf der PLLA-Oberfläche (links) und auf der Latex-Oberfläche (rechts), 1000-fache Vergrößerung

Diese Ergebnisse, die eine sehr gute Biokompatibilität des Polymers PLLA verdeutlichen, wurden auch im MTS-Test bestätigt, da nach 72 h Kultivierung die Vitalität der pPUC auf den PLLA-Oberflächen mit der auf der Negativkontrolle Glas vergleichbar war (Abb. 109).

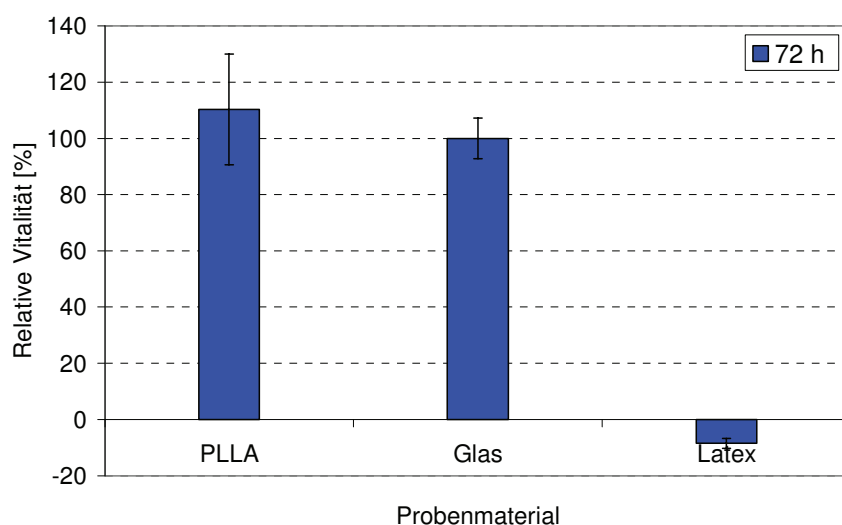


Abb. 109: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) bei Direktkontakt mit der PLLA-Folienoberfläche nach 72 h in Bezug zur Negativkontrolle (NC), n=6 pro Material, Negativkontrolle (NC): Glas, Postivkontrolle (PC): Latex-Folie

7.2 Untersuchung des ausgewählten Wirkstoffes hinsichtlich seiner Effekte auf Karzinomzellen

Um relevante Konzentrationen des Zytostatikums MTX für die DES-Anwendung zu ermitteln, wurden Modellkarzinomzellen (humane Blasenkarzinomzellen der Zelllinie 5637) mit MTX-Lösungen verschiedener Konzentrationen inkubiert und die relative Vitalität (in %) der Zellen unter Werkstoffeinfluss in Bezug zur MTX-freien Negativkontrolle (NC) mit Hilfe des MTS-Tests bestimmt (Abb. 110). Dafür wurde eine 1×10^{-1} M MTX-Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt, die mit Zellkulturmedium auf MTX-Konzentrationen von 1×10^{-4} M bis 1×10^{-9} M (entspricht 0.1 % bis 1×10^{-6} % DMSO) verdünnt wurde. Die Verdünnung erfolgte dabei in 1×10^{-1} M-Verdünnungsschritten. Dieser Konzentrationsbereich zur Untersuchung des MTX ergab sich aus der Notwendigkeit, dass eine zusätzliche Wirkung des Lösungsmittels DMSO auszuschließen war. Da in Voruntersuchungen mit DMSO-Kontrollen bei einer Konzentration von ≤ 0.1 % DMSO keine Hemmung der Zellvitalität bei 5637-Karzinomzellen festgestellt werden konnte, wurden MTX-Lösungen bis zu einer Konzentration von 1×10^{-4} M MTX hinsichtlich ihres vitalitätshemmenden Potenzials untersucht.

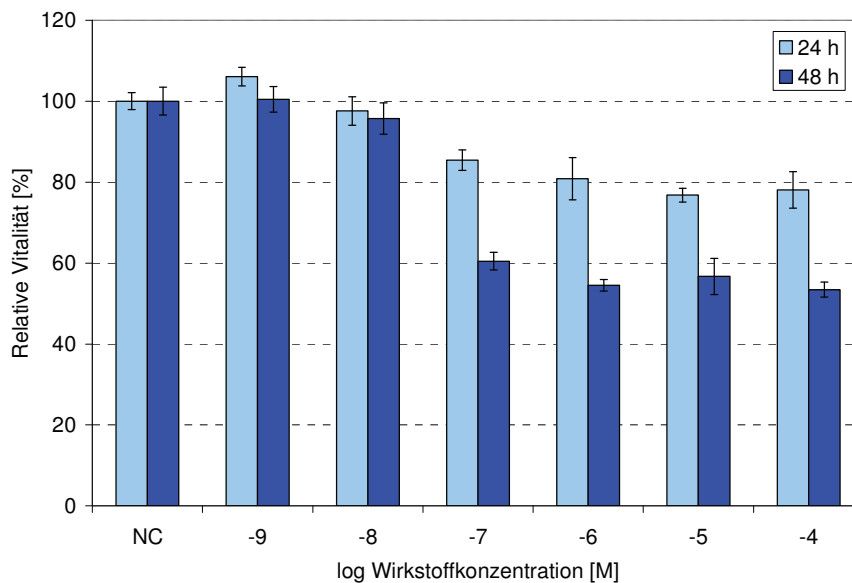


Abb. 110: Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von humanen Blasenkarzinomzellen (Zelllinie 5637) nach Inkubation (24 h, 48 h) mit MTX-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M, $n=4$ pro Zeitpunkt und MTX-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle (NC), Zellkonzentration: 3×10^4 c/ml, Zellaussaat: 24 h vor Wirkstoffzugabe [282]

Die Untersuchungen zur Testung des Einflusses von MTX auf die humane Blasenkarzinomzelllinie 5637 mit Hilfe des MTS-Tests führten zu dem Ergebnis, dass im Konzentrationsbereich von 1×10^{-7} bis 1×10^{-4} M MTX eine Hemmung der Zellvitalität um maximal 22 % (nach 24 h) und maximal 47 % (nach 48 h) zu verzeichnen ist (Abb. 110). Die verstärkte Hemmung

der Vitalität der Testzellen nach 48 h Inkubation war im genannten Konzentrationsbereich gegeben, wobei die maximale Verstärkung der Hemmung der Zellvitalität nach 48 h im Vergleich zu 24 h um 25 % bei einer MTX-Konzentration von 1×10^{-4} M zu beobachten war. Bei einer Konzentration von $\leq 1 \times 10^{-8}$ M MTX war keine Beeinträchtigung der Vitalität der 5637-Zellen mittels MTS-Reagenz nachweisbar. Anhand dieser Untersuchungen ist es somit möglich, für die geplante DES-Indikation relevante, wirksame MTX-Konzentrationen zu bestimmen und eine annähernde Übertragung auf die erforderliche Freisetzungskinetik des Wirkstoffs MTX aus der Stentbeschichtung vorzunehmen.

7.3 In vitro Wirkstoffelution polymerer, wirkstoffbeladener Urethrastents

Die in vitro Freisetzung des in eine PLLA-Beschichtung inkorporierten MTX zur lokalen Behandlung von Karzinomen über die Implantation eines DES wurde getestet, indem die mit PLLA/MTX beschichteten PLLA-Stentprototypen in Kunsturin (nach *Griffith*) [283] eingelagert wurden. Das Elutionsmedium wurde an jedem Probennahmezeitpunkt erneuert, um einer Wirkstoffsättigung im Medium entgegenzuwirken und um die Konzentration des gelösten Wirkstoffs innerhalb des kalibrierten Messbereichs des Analysenverfahrens zu halten. Das resultierende Eluat wurde im UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) vermessen und die Elution des jeweiligen DES wurde sofort mit 2.0 ml frischem Kunsturin fortgesetzt.

Es wurde analytisch nachgewiesen, dass im Untersuchungszeitraum von annähernd 3 Monaten das Zytostatikum aus der Beschichtung in für die Applikation relevanten Dosen freigesetzt wird. Die höchste Freisetzungsgeschwindigkeit war bei beiden DES-Typen in den ersten 2 Tagen zu verzeichnen (Abb. 111).

Nach 2 Tagen Elution wurden bei der PLLA/MTX-Beschichtung mit 30 % (w) MTX 5.5×10^{-5} M MTX in das Elutionsmedium freigesetzt. Die PLLA/MTX-Beschichtung mit 60 % (w) MTX hatte die Freisetzung einer etwa doppelt so hohen MTX-Konzentration von 1×10^{-4} M nach 2 Tagen zur Folge. Nach dieser initialen Freisetzungsphase verringerte sich im weiteren Untersuchungszeitraum die Freisetzungsgeschwindigkeit. Es kann abgeschätzt werden, dass innerhalb des Elutionszeitraumes von 16-91 Tagen immer noch annähernd 1.0×10^{-7} M MTX pro Tag (PLLA/MTX 70/30 % w/w) bzw. 1.5×10^{-7} M MTX pro Tag (PLLA/MTX 40/60 % w/w) eluiert wurden. Basierend auf den mit den Blasenkarzinomzellen 5637 durchgeführten Untersuchungen zum vitalitätshemmenden Potenzial des MTX (Kap. 7.2) kann in vitro auch

im weiteren zeitlichen Verlauf von einer ausreichenden Wirksamkeit ausgegangen werden, die durch geeignete in vivo Studien zu untermauern ist.

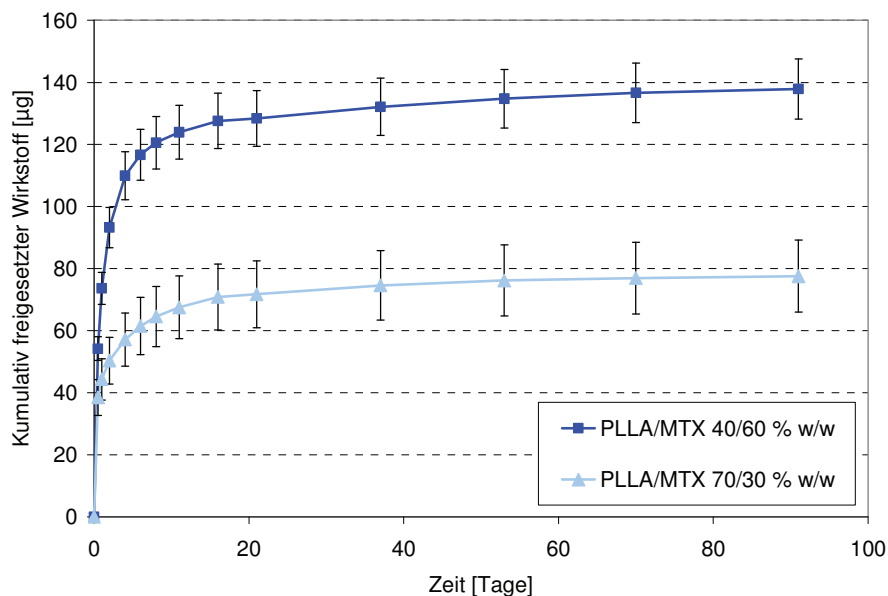


Abb. 111: In vitro Freisetzung von Methotrexat (MTX) aus PLLA/MTX-Beschichtungen des PLLA-Urethrastents in Kunsturin nach Griffith [283] (37 °C)

Nach dem Untersuchungszeitraum von 3 Monaten waren bei der PLLA/MTX-Beschichtung mit der Zusammensetzung 70/30 % (w/w) erst annähernd 20 % sowie bei der PLLA/MTX-Beschichtung mit der Zusammensetzung 40/60 % (w/w) erst annähernd 18 % des ursprünglich installierten MTX freigesetzt worden. Da das MTX vollständig aus der PLLA-Matrix durch Diffusion und während des Degradationsprozesses der Beschichtung freigesetzt wird, ist davon auszugehen, dass ein biodegradierbarer PLLA/MTX-DES das Potenzial hat, eine MTX-Freisetzung bis hin zur Fragmentation des PLLA-Stents zu ermöglichen, sofern das installierte MTX-Depot ausreichend hoch ist, um diese langanhaltende MTX-Freisetzung zu realisieren. Eine Steigerung der lokal freigesetzten MTX-Konzentration kann in diesem Zusammenhang durch die Erhöhung des prozentualen MTX-Gehalts in der Beschichtung und eine Verlängerung des MTX-Elutionszeitraumes durch die Erhöhung der Schichtmasse und somit -dicke erreicht werden. Darüber hinaus ist eine geringe MTX-Beladung des PLLA-Stentgrundkörpers denkbar, ohne dessen mechanische Eigenschaften grundlegend zu verändern.

In die Urethra könnte dann nach vollständiger Fragmentation des DES, die an diesem Implantationsort komplikationsfrei durch die Ausscheidung der Polymerfragmente über den Urogenitaltrakt verläuft, ein neuer MTX-beladener DES zur Fortführung der Behandlung implantiert werden.

8. Diskussion

Die Methoden und Ergebnisse wurden in den vorangegangenen Kapiteln bereits im Einzelnen unter Einbeziehung der internationalen Literatur diskutiert. An dieser Stelle sollen besondere Aspekte in einer zusammenfassenden Diskussion betrachtet werden.

Die vorrangigen Ziele dieser Arbeit bestanden in der Entwicklung und Charakterisierung funktionalisierter, biodegradierbarer Polymerbeschichtungen zur lokalen Freisetzung von Wirkstoffen für verschiedene medizinische Indikationen. Der Fokus der hier vorgestellten Untersuchungen war auf Drug-Eluting Stents (DES) [127, 169, 215, 284] gerichtet, die einen erheblichen Fortschritt bei der lokalen Freisetzung und Wirkung von Arzneimitteln in verschiedenen Teilbereichen der Medizin darstellen können. Unter diesem Gesichtspunkt wurden Möglichkeiten zur chemischen Oberflächenmodifizierung und zur Beschichtung von Stentoberflächen mit dem Ziel der lokalen Wirkstofffreisetzung vorgestellt. Für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten DES-Entwicklungen wurden methodische Grundlagen erarbeitet, die neben der Herstellung von DES-Prototypen deren *in vitro* Charakterisierung unter den Gesichtspunkten der Wirkstofffreisetzung, der Polymerdegradation, der Biokompatibilität der polymeren Trägermatrizes und der biologischen Aktivität der ausgewählten Wirkstoffe auf zellulärer Ebene beinhaltete. Darüber hinaus wurden ausgewählte DES hinsichtlich ihrer Biokompatibilität in verschiedenen Tiermodellen erprobt.

Chemische Oberflächenmodifizierung versus Polymerbeschichtung zur lokalen Freisetzung von Wirkstoffen

Die Grundlage für die DES-Entwicklung bildete der Aufbau eines geeigneten Herstellungsverfahrens. In diesem Zusammenhang wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Beladung der Stentoberflächen verfolgt und hinsichtlich ihrer Eignung geprüft.

Die nasschemische Oberflächenankopplung des Modellwirkstoffes Acetylsalicylsäure (ASS) an biodegradierbare Polymere, die als Matrizes für die Generierung des Stentgrundkörpers und der Beschichtungsmatrix zur Anwendung kamen, wurde als eine Strategie zur lokalen Wirkstofffreisetzung vorgestellt. Bei diesem nasschemischen Verfahren sind nur die funktionellen Gruppen an der Polymeroberfläche für die Wirkstoffankopplung zugänglich, da es sich um einen heterogenen Prozess handelt. Da bei den untersuchten hochmolekularen biodegradierbaren Polyhydroxycarbonsäuren Poly(L-lactid) (PLLA), Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) und Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) für die direkte Wirkstoffankopplung nur die vergleichsweise wenigen freien Hydroxyl- und Carboxylgruppen an den Enden der Polymerketten zur Verfügung standen, waren zusätzliche Oberflächenaktivierungsreaktionen erforderlich [66-68].

Bei der Untersuchung der ASS-Freisetzung von den nasschemisch modifizierten Polymeroberflächen wurde festgestellt, dass mit PLLA eine ASS-Freisetzung über etwa 20 Tage in sehr geringen ASS-Konzentrationen realisiert werden kann, die nach einer initialen Freisetzungsphase von etwa 24 Stunden eine konstante Freisetzungsgeschwindigkeit aufwies. Diese ASS-Freisetzungskinetik könnte sich als Vorteil für die DES-Anwendung erweisen, da die Mechanismen des In-Stent-Restenose-Prozesses eine entzündungshemmende Wirkung auch über die Inflammationsphase von 5 Tagen hinaus erfordern, sofern zusätzliche Entzündungsprozesse, die durch den Abbau der polymeren Beschichtungsmatrix verursacht werden, nicht auszuschließen sind [111]. Die Modifizierung der Polyhydroxycarbonsäuren P(3HB) und P(4HB) hatte eine sehr schnelle ASS-Freisetzung innerhalb weniger Stunden zur Folge. Das Verfahren der nasschemischen Oberflächenmodifizierung der Polyhydroxycarbonsäuren bot somit die Möglichkeit, eine Beladung der Polymeroberflächen mit Wirkstoff vorzunehmen.

Zur Schaffung von Wirkstoffdepots auf der Stentoberfläche wurde außerdem eine zweite Strategie verfolgt. Diese beinhaltete die Beschichtung der Stentoberflächen mit Polyhydroxycarbonsäuren, wie PLLA, P(3HB) und P(4HB), in die die Wirkstoffe inkorporiert waren. Zur Beschichtung der Stentoberflächen wurden ein Tauch- und ein Sprühverfahren in die Untersuchung einbezogen. Dabei wurde festgestellt, dass es nur mit dem Sprühverfahren gelingt, unter Erhalt einer hohen Oberflächengüte die für ein Wirkstoffdepot von 1-5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ [127, 128] notwendigen Schichtmassen mit hoher Reproduzierbarkeit auf der Stentoberfläche zu installieren. Durch diese etwa 5-10 μm dicken Polymerbeschichtungen war es möglich, die Stentoberfläche mit einem Wirkstoffdepot zu versehen, das etwa 50-mal höher war als das, das durch nasschemische Oberflächenmodifizierung von PLLA realisiert werden konnte. Diese Polymer-Wirkstoff-Beschichtungen sind aufgrund ihres modularen Aufbaus von Vorteil, wenn lokal sehr hohe Wirkstoffdosen erforderlich sind und wenn die Wirkstofffreisetzung über mehrere Monate erfolgen muss. Hier stößt die Wirkstoffapplikation über chemische Oberflächenmodifizierungsreaktionen an Grenzen, da unter dem Aspekt der Dosis-Wirkungs-Beziehung möglicherweise kein ausreichend hohes Wirkstoffdepot zur Verhinderung der In-Stent-Restenose zur Verfügung gestellt werden kann.

Die Kombination beider Strategien hat das Potenzial, eine optimale Stent-Gewebe-Interaktion in den verschiedenen Phasen des Einheilungsprozesses des Stents zu realisieren. Die methodische Umsetzbarkeit beider Strategien wurde in den durchgeführten Untersuchungen nachgewiesen und stellt somit eine wichtige Voraussetzung für die Realisierung eines differenziellen Wirkprinzips durch den Stent dar, das die Adressierung unterschiedlicher biologischer Wirkungen am Implantationsort berücksichtigt. In diesem Zusammenhang ist es möglich, die aufgebauten Methoden zur nasschemischen Oberflächenaktivierung

dahingehend zu verwenden, dass funktionelle Biomoleküle, wie Antikörper bzw. Adhäsionsmoleküle oder Wachstumsfaktoren, an die Oberfläche der Polymerbeschichtung angeheftet werden können mit dem Ziel, das Einwachsen des Stents zu fördern. Durch eine gleichzeitige Inkorporation antiproliferativer Wirksubstanzen in die Polymerbeschichtung kann das überschießende Wachstum von Zellen, die den Wiederverschluss des Stents bewirken, verhindert werden. Somit bieten die im Rahmen der Arbeit entwickelten Methoden zur Wirkstoffbeladung von Stentoberflächen die Möglichkeit, die bestehenden Limitationen bei DES der 1. Generation erfolgreich zu beheben.

Untersuchung biodegradierbarer, biokompatibler Polymere und zellspezifischer Wirkstoffe unter dem Gesichtspunkt der bestehenden Limitationen bei Drug-Eluting Stents der 1. Generation

Weitere Vorteile der hier entwickelten DES sind die vollständige Biodegradierbarkeit und die exzellente Biokompatibilität der polymeren Wirkstoffträger sowie die dosisabhängige Zellspezifität der verwendeten Wirkstoffe. Diese Vorteile sind von besonderer Relevanz, da nach Implantationen von klinisch etablierten DES der 1. Generation Spätthrombosen auftraten, die auf ein fehlendes Einwachsen der DES zurückgeführt wurden [274, 275, 285, 286]. Damit eine vollständige Endothelialisierung von DES gewährleistet werden kann, müssen deshalb biokompatible Polymere Verwendung finden.

Um eine durch das Polymer bedingte Fremdkörperreaktion nach vollständiger Wirkstofffreisetzung zu verhindern, ist darüber hinaus die Verwendung biodegradierbarer Beschichtungsmatrizes erwünscht [181]. Da der Abbau schnell degradierender Polymerbeschichtungen eine Anreicherung hoher Konzentrationen an Abbauprodukten im umliegenden Gewebe und somit eine zusätzliche Fremdkörperreaktion hervorrufen kann [17], wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen die langsam degradierenden Polyhydroxycarbonsäuren PLLA, P(3HB) und P(4HB) verwendet. Die Ergebnisse der in vitro Tests zur Beurteilung der Zytotoxizität der verwendeten Polymere bestätigten eine gute Biokompatibilität von PLLA und P(4HB). Eine starke Hemmung der Vitalität von humanen koronaren, arteriellen Endothelzellen (HCAEC) und humanen koronaren, arteriellen glatten Muskelzellen (HCASMC) lösten in den durchgeführten Untersuchungen die permanenten Polymere Poly(butylmethacrylat) (PBMA), Poly(ethylen-co-vinylacetat) (PEVA) und das Polyurethan Pellethane[®] (PUR) aus.

Ein Indiz für die Bioinkompatibilität von PBMA und PEVA könnte auch die verzögerte bis fehlende Endothelialisierung des klinisch etablierten Cypher-Stents mit einer PBMA/PEVA/Sirolimus (SIR)-Beschichtung (Fa. Johnson & Johnson, USA) sein, die durch verschiedene pathologische Untersuchungen nachgewiesen wurde [273, 285, 286]. Unabhängig davon ist

zu diskutieren, in welchem Maße SIR neben dem gewünschten proliferationshemmenden Effekt auf die glatten Muskelzellen auch die Endothelzellen beeinflusst. In eigenen in vitro Untersuchungen zum Effekt von SIR auf die Gefäßwandzellen wurde nachgewiesen, dass nicht nur die Vitalität und die Proliferation der HCASMC, sondern auch die der HCAEC im Konzentrationsbereich von 1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M SIR inhibiert wird.

Eine differenzielle Wirkung auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen konnte durch die Inkubation der HCAEC und HCASMC mit dem Phytoöstrogen Genistein erzielt werden. Die zellspezifischen Effekte des Genisteins unter Stimulation der HCAEC und Hemmung der HCASMC innerhalb eines großen Konzentrationsfensters von 1×10^{-10} M bis 1×10^{-5} M Genistein rechtfertigten dessen weitere Erprobung für die DES-Anwendung.

Die aktuelle Datenlage zum Vergleich der DES gegenüber den klassischen unbeschichteten Metallstents ist sehr komplex und die Diskussion hierüber ist nicht abgeschlossen. Neueste Metaanalysen zeigen bezüglich der Sterblichkeitsrate von Patienten keinen Nachteil von DES gegenüber den Metallstents [124, 287]. Die untersuchten DES auf der Basis von Sirolimus und Paclitaxel verringerten das Risiko einer Revaskularisierung der Zielstenose im Vergleich zum unbeschichteten Stent nachweislich. Von den Klinikern wird empfohlen, DES bevorzugt bei erhöhtem Risiko einer In-Stent-Restenose, jedoch zurückhaltend bei erhöhtem Risiko einer Stentthrombose einzusetzen. Nach DES-Implantation ist zur Minimierung des Spätthromboserisikos außerdem die längerfristige systemische Gabe eines zusätzlichen Thrombozytenaggregationshemmers neben Acetylsalicylsäure notwendig.

Verwendung finden DES zum einen in Blutgefäßen, speziell den Herzkranzgefäßen, um nach deren Aufdehnung einen erneuten Wiederverschluss durch eine In-Stent-Restenose zu verhindern. Zum anderen können DES in der Krebsbehandlung dazu dienen, durch Karzine verursachte Verengungen, beispielsweise in den harnableitenden Wegen, in den Atemwegen (Luftröhre), in den Gallenwegen oder in der Speiseröhre zu öffnen und offen zu halten. Dabei ist unter dem Gesichtspunkt der jeweiligen DES-Indikation das klinische Ergebnis nach DES-Implantation maßgeblich von der Auswahl der Wirkstoffe und von der erreichten lokalen Wirkstoffdosis über die Zeit abhängig. Als Beispiele für DES-Indikationen wurden die Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK), der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) und von Stenosen der Urethra beim Prostatakarzinom ausgewählt und die im Rahmen der Arbeit getätigten Entwicklungsleistungen in den verschiedenen Teilgebieten der Medizin, der Kardiologie, der Gefäßchirurgie und der Urologie, vorgestellt.

Drug-Eluting Stents für die Kardiologie

Eine wichtige DES-Indikation stellt die Verengung von Koronararterien bei der KHK dar, die durch die Arteriosklerose verursacht wird. In einer Reihe von Patientenstudien konnte statistisch belegt werden, dass die Anwendung von DES die In-Stent-Restenose deutlich verringert [127, 128].

Beispiele koronarer DES auf der Basis der Wirkstoffe Tetraethylthiuramdisulfid (TETD) und Genistein, die im Rahmen der Arbeit entwickelt wurden, sowie die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der DES wurden beschrieben. Zur Beurteilung der DES-Gewebe-Interaktion wurde ein Gewebekulturmodell entwickelt, das es erlaubt, mit DES versehene Blutgefäßabschnitte unter Perfusionsbedingungen zu kultivieren. Um morphologische Veränderungen der Intima nach der Gewebekultur und speziell unter DES-Einfluss beurteilen zu können, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Eine durch die Kultivierung der Gefäßabschnitte im Perfusionsmodell verursachte Schädigung des Endothels der Intima war rasterelektronenmikroskopisch nicht nachweisbar. Eine starke Schädigung der Gewebe wurde jedoch nach Implantation von mit TETD-beladenen DES beobachtet, die nicht allein durch eine mechanische Verletzung, sondern auch durch zytotoxische Effekte, bedingt durch eine möglicherweise zu hohe TETD-Anreicherung im Gewebe, zu erklären waren. Der Verlust des intakten Endothels durch die Implantation von DES auf der Basis von TETD wurde auch durch die immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt.

Eine *in vivo* Prüfung koronarer DES erfolgte deshalb ausschließlich mit DES auf der Basis des untersuchten Genisteins, da dieses Phytoöstrogen in der Zellkultur eine differenzielle Wirkung auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen gezeigt hatte. Die Wirksamkeit der entwickelten koronaren DES auf der Basis einer PLLA/Genistein-Beschichtung konnte im Tiermodell Kaninchen nicht ausreichend bewiesen werden, da keine signifikant verminderte neointimale Reaktion in den 4 Wochen-Ergebnissen durch die PLLA/Genistein-Beschichtung im Vergleich zur reinen PLLA-Beschichtung erzielt wurde. Eine Kombination des Genisteins mit einer antiproliferativen Wirksubstanz, wie Sirolimus oder Paclitaxel, in der PLLA-Beschichtung könnte eine Verbesserung des *in vivo* Ergebnisses hinsichtlich der Inhibition der In-Stent-Restenose bewirken.

Drug-Eluting Stents für die Gefäßchirurgie

Zur Behandlung der PAVK im Sinne eines Hybrideingriffs durch das Überstenten einer Prothesenbypass-Anastomose [132, 133, 135] wurde ein biodegradierbarer DES auf der Basis von PLLA und Sirolimus (SIR) entwickelt. Die Therapievariante unter Verwendung

eines biodegradierbaren Stentgrundkörpers hat den Vorteil, dass weitere Optionen für eine Nachbehandlung bestehen, sobald der biodegradierbare DES vollständig abgebaut ist.

Die entwickelte PLLA/SIR-Beschichtung auf dem PLLA-Stentgrundkörper erwies sich als geeignet, den Wirkstoff in Konzentrationen von $> 1 \times 10^{-7}$ M SIR über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten freizusetzen. Die tierexperimentellen Studien im Tiermodell Schwein bestätigten die Wirksamkeit des entwickelten biodegradierbaren PLLA/SIR DES, da eine signifikant verminderte inflammatorische und neointimale Reaktion einhergehend mit einer deutlich erhöhten luminalen Durchgängigkeit in den 6 Wochen-Ergebnissen im Vergleich zum unbeschichteten PLLA-Stent nachgewiesen werden konnte.

Drug-Eluting Stents für die Urologie

Mit dem Ziel, die Ausbildung von Stenosen der Urethra beim Prostatakarzinom zu verhindern, wurde ein polymerbasierter, biodegradierbarer DES auf der Basis von PLLA und Methotrexat (MTX) entwickelt. Neben der Biokompatibilität des verwendeten Polymers PLLA im Kontakt mit Urothelzellen wurde der wachstumshemmende Effekt von MTX auf Karzinomzellen in vitro beurteilt. Als relevante Konzentrationen des Zytostatikums MTX für die beabsichtigte DES-Anwendung wurden Konzentrationen von 1×10^{-7} M bis 1×10^{-4} M MTX ermittelt. In den durchgeführten in vitro Wirkstofffreisetzungstudien wurde außerdem analytisch bestätigt, dass aus den entwickelten PLLA/MTX DES-Prototypen im Untersuchungszeitraum von 3 Monaten der Wirkstoff aus der Beschichtung in für die Applikation relevanten Dosen freigesetzt werden kann.

Eine Steigerung der lokal freigesetzten MTX-Konzentration könnte darüber hinaus durch die Erhöhung des prozentualen MTX-Gehalts in der Beschichtung und eine Verlängerung des Wirkstofffreisetzungszeitraumes durch die Erhöhung der Schichtmasse und somit der Schichtdicke erreicht werden. Eine Wirkstoffbeladung des polymeren Stentgrundkörpers ist nur begrenzt möglich, da dessen mechanische Eigenschaften durch eine Wirkstoffbeladung grundlegend verändert werden können.

Nach vollständiger Fragmentation des DES, die am Implantationsort komplikationsfrei durch die Ausscheidung der Polymerfragmente über den Urogenitaltrakt verläuft, kann zur Fortführung der Behandlung ein neuer wirkstoffbeladener DES implantiert werden.

9. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung wirkstofffreisetzender Stents, so genannter Drug-Eluting Stents (DES), für verschiedene medizinische Anwendungen. Die wesentliche Zielsetzung ist neben dem Aufbau der methodischen Grundlagen zur DES-Entwicklung die Charakterisierung der entwickelten DES hinsichtlich ihrer Funktionalität in vitro und in vivo.

Für die DES-Entwicklung sind Wirkstoffträger auf der Basis von Polymerwerkstoffen besonders geeignet, da sie durch relativ einfache Verfahren mit Wirkstoffen beladen werden können. Außerdem ist von Vorteil, dass die Funktion des Polymers als Implantatmaterial, hier im Speziellen als biodegradierbarer Stentgrundkörper, gleichzeitig mit der als lokaler Wirkstoffträger verbunden werden kann. Die Polymerwerkstoffe sollen dabei den Wirkstoff effektiv gegenüber metabolischen Einflüssen des Organismus abschirmen, zugleich aber eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung im Organismus über einen möglichst definierten Zeitraum gewährleisten. In Abhängigkeit vom Stentapplikationsort müssen deshalb die physikochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Polymere mit chemischen und physikalischen Methoden gezielt optimiert werden. Um ein maximales therapeutisches Ergebnis zu erzielen, erfordert die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen somit eine Vielzahl unterschiedlicher polymerer Trägersysteme.

Im Rahmen der dargestellten Untersuchungen zur DES-Entwicklung wurden biodegradierbare und bioresorbierbare polymere Trägersysteme erprobt und verwendet, da diese nach erfolgter lokaler Wirkstoffabgabe vollständig degradieren und somit keine späten Fremdkörperreaktionen induzieren. Die lokale, über mehrere Monate in ausreichenden Dosen zu realisierende Wirkstofffreisetzung wurde vorwiegend durch eine Polymerbeschichtung erzielt. Der Wirkstoff wurde in diesem Falle als Polymer-Wirkstoff-Gemisch auf die Stentoberflächen aufgetragen. Durch die Art des Polymers wurde mit hydrophilen Polymeren eine schnelle Freisetzung und mit hydrophoben Polymeren eine langsame Freisetzung erreicht. Außerdem wurde der Stent zusätzlich mit wirkstofffreien polymeren Deckschichten (Topcoats) versehen, um eine Retardation der Wirkstofffreisetzung zu erzielen. Aber auch die Wirkstoffanbindung an biodegradierbare polymere Träger als direkte Oberflächenankopplung des Wirkstoffes an die Polymerbeschichtung wurde untersucht.

Für die DES-Entwicklung sind deshalb nasschemische Oberflächenreaktionen etabliert worden, mit denen die Ankopplung von Wirkstoffen mit wenigen Modifizierungsschritten praktikabel umsetzbar ist. Dabei musste garantiert werden, dass trotz der chemischen Ankopplung des Wirkstoffes an die Polymeroberfläche dessen biologische Aktivität erhalten bleibt. Dies kann durch hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen oder durch ionische Bindungen rea-

lisiert werden. Mit dem Ziel einer lokalen Wirkstofffreisetzung wurde exemplarisch das Antiphlogistikum Acetylsalicylsäure (ASS) ionisch an die oberflächenaktivierten biodegradierbaren Polyhydroxycarbonsäuren Poly(L-lactid) (PLLA), Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) und Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) angekoppelt. Als Referenzpolymer diente ein Polyetherurethan (PUR, Pellethane[®]), das durch die Substitution des Urethan-NH-Protons nasschemischen Oberflächenmodifizierungen gut zugänglich ist. Das ASS-Freisetzungsverhalten der modifizierten Polymeroberflächen wurde durch die Messung von ASS und Salicylsäure mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie quantifiziert. In Hämokompatibilitätsstudien wurde darüber hinaus geprüft, ob die oberflächenmodifizierten Polymere bei in vitro Kontakt mit humanem Blutserum das Komplementsystem aktivieren bzw. die plasmatische Gerinnung in humanem, heparinisierten Blutplasma auslösen. Im Vergleich zu den entsprechenden Positivkontrollen und den unmodifizierten Polymeren konnte festgestellt werden, dass die mit endständigen Aminogruppen beladenen Polymeroberflächen keine Beeinträchtigung der Hämokompatibilität bedingen. In Analogie dazu zeigten die Polymere in dieser Modifizierungsstufe, deren Oberflächen nach vollständiger Freisetzung von ASS mit den Zellen des Gewebeverbandes in Interaktion treten, keine Reduktion der Zellvitalität von L929-Mausfibroblasten.

Aufgrund der filigranen Strukturen der Stentgrundkörper müssen an die Herstellung der Stentbeschichtungen besondere Anforderungen gestellt werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurden hinsichtlich ihrer Eignung ein Tauch- und ein Sprühverfahren in Abhängigkeit von verschiedenen Prozessparametern untersucht. Die Polymer-Wirkstoff-Gemische wurden dafür aus der Lösung verarbeitet. Das Tauchverfahren eignete sich nur für die Erzeugung sehr dünner Beschichtungen, da es bei einer Wiederholung der Tauchvorgänge zur Ausbildung einer höheren Anzahl von Fehlstellen im Bereich der Stentgelenke und Stentschlaufen kam. Für die Beschichtung der Stents im Sprühverfahren wurde eine elektro-pneumatische Beschichtungsanlage verwendet, die es gestattete, DES-Prototypen im Labormaßstab in ausreichend hoher Stückzahl für die Durchführung der in vitro und in vivo Studien zu fertigen. Das Sprühverfahren hatte gegenüber dem Tauchverfahren auch den Vorteil, dass die Prozessparameter dieser Beschichtungstechnologie in einem großen Bereich variierbar sind. Dadurch gelang es unter Erhalt einer hohen Oberflächengüte, die für die jeweilige DES-Indikation notwendigen Wirkstoffbeschichtungen mit hoher Reproduzierbarkeit auf die Stentoberflächen aufzutragen. Die gewünschten Schichtmassen wurden über eine gezielte Einstellung der Prozessparameter Sprühabstand und Sprühdruck unter Variation der Sprühzeit realisiert. Darüber hinaus wurde im Rahmen der Parameterstudie Dichlormethan als alternatives Lösungsmittel für die Polymere PLLA, P(3HB) und P(4HB) getestet. Vorteil des Dichlormethans gegenüber dem herkömmlich verwendeten Chloroform

ist der höhere Dampfdruck dieses Lösungsmittels, der zur Beschleunigung des Trocknungsprozesses der DES führen sollte. Da entsprechend der Sicherheitsrichtlinie der International Conference on Harmonization (ICH) „Impurities: Guideline For Residual Solvents“ der Grenzwert für den Gehalt an Dichlormethan in Arzneimittelformen um das Zehnfache höher liegt als der für Chloroform, war es darüber hinaus sinnvoll, Dichlormethan als alternatives Lösungsmittel für die Herstellung der Stentbeschichtungen zu testen. Die Untersuchungen zur Bestimmung des Chloroformrestgehaltes in den Stentbeschichtungen nach Trocknung der DES unter verschiedenen Auslagerungsbedingungen zeigten, dass es erst bei einer Temperatur von 80 °C im Vakuum (6-8 mbar) gelingt, eine Lösungsmittelfreiheit der Stentbeschichtungen nach 2 Tagen zu erreichen. Auch die Verwendung des flüchtigeren Dichlormethans erforderte höhere Trocknungstemperaturen, da nach Trocknung der DES über 2 Tage bei 40 °C nach der ICH-Richtlinie noch unzulässige Dichlormethangehalte in den Beschichtungen nachweisbar waren.

Für eine umfassende Charakterisierung von DES ist auch die Untersuchung der Oberflächen- und Volumenmorphologie erforderlich, die in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung verschiedener mikroskopischer Methoden beurteilt wurden. Die eingesetzten Methoden erstreckten sich dabei über die Lichtmikroskopie, die Rasterelektronenmikroskopie, die Rasterkraftmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie. Für die Untersuchung der Volumenmorphologie des Verbundes zwischen Stentgrundkörper und Stentbeschichtung sowie für die Bestimmung der Schichtdicke der Stentbeschichtung und ihrer örtlichen Verteilung wurde darüber hinaus die Lichtmikroskopie in Kombination mit Bildanalyseverfahren verwendet.

Die klinische Wirksamkeit der DES wird neben der Auswahl eines für die Applikation geeigneten Wirkstoffes entscheidend durch sein Wirkstofffreisetzungsverhalten bestimmt, durch das die lokale Konzentration erreicht wird, bei der die gewünschte Wirkung eintritt. Deshalb wurde die Wirkstofffreisetzung in verschiedenen Elutionsmedien analysiert, indem der zeitliche Anstieg der Konzentration der Wirkstoffmoleküle mit Hilfe chromatografischer Verfahren gemessen wurde. Dadurch konnte die Wirkstofffreisetzung verschiedener DES-Prototypen in Abhängigkeit vom DES-Design, speziell in Abhängigkeit vom Wirkstoffmasseanteil in der Polymerbeschichtung, von der Art der polymeren Beschichtungsmatrix, von der Schichtdicke und vom Schichtaufbau beurteilt werden. Weiterhin wurde ein in vitro Modell zur Beurteilung der Verteilung von fluoreszierenden bzw. fluoreszenzmarkierten Wirkstoffen, die aus Stentbeschichtungen in eine lipophilisierte Alginatmatrix durch Diffusion freigesetzt werden, vorgestellt.

Eine weitere wesentliche Fragestellung bei der Entwicklung von DES stellt die Charakterisierung des Abbauverhaltens der verwendeten biodegradierbaren, polymeren Beschichtungsmatrizes dar. Da im Rahmen der getätigten DES-Entwicklungen bevorzugt die Polyhydroxycarbonsäuren PLLA, P(3HB) und P(4HB) und Copolymere Verwendung fanden, wurde deren in vitro Degradationsverhalten, das durch den Zusatz von Weichmachern, Blendpartnern und Wirkstoffen gezielt beeinflusst werden kann, in verschiedenen Degradationsstudien mit Hinblick auf den durch Hydrolyse bedingten Molmasse- und Masseabbau untersucht. Weiterhin wurde getestet, welchen Einfluss die β -Sterilisation mit einer für Medizinprodukte üblichen Strahlendosis von 25 kGy auf das Degradationsverhalten der Polymere hat.

Neben diesen grundlagenorientierten Untersuchungen steht auch die Funktionalitätsprüfung der DES zu deren Eignung für den klinischen Alltag im Blickpunkt des Interesses. Dazu zählen beispielsweise die durchgeführten Untersuchungen zur Sterilisierbarkeit von DES, zur Systemintegrität zwischen DES und Ballonkatheter sowie zu den tribologischen Eigenschaften ausgewählter DES-Systeme. Wurden für DES beispielsweise die β - oder γ -Sterilisation verwendet, fanden die Auswirkungen des strahlungsinduzierten Molmasseabbaus sowohl bei der Beurteilung des Degradationsverhaltens als auch des Wirkstofffreisetzungsverhaltens Berücksichtigung, indem die in vitro Prüfungen an sterilisierten DES durchgeführt wurden. Außerdem wurde eine durch die γ -Sterilisation verursachte Versprödung des Beschichtungsmaterials nachgewiesen, die durch mechanische Tests belegt wurde.

In den Untersuchungen zur Systemintegrität zwischen DES und Ballonkatheter konnte festgestellt werden, dass die polymeren Stentbeschichtungen auf PLLA-Basis eine Erhöhung der Crimpfestigkeit der DES auf dem Ballon bewirkten und somit von einer sicheren Applizierbarkeit der entwickelten DES auf PLLA-Basis ausgegangen werden kann. Weiterhin bestätigte die nachgewiesene Schichtintegrität nach Passieren einer künstlichen Gefäßstrecke ein optimales tribologisches Verhalten dieser DES.

Die weitere Entwicklung von DES zur klinischen Anwendung wurde für drei verschiedene DES-Indikationen untersucht, die sich vom klassischen Einsatz in der Kardiologie über die Gefäßchirurgie bis hin zur Urologie erstreckten. Die in vitro Prüfungen der für diese Indikationen speziell entwickelten DES-Systeme konnten für die kardiologischen und peripheren DES durch deren Erprobung in entsprechenden Tiermodellen untermauert werden.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AFM	Atomic Force Microscopy
A7r5	Zelllinie glatter Muskelzellen aus der thorakalen Aorta einer embryonalen BDIX-Ratte
ASI	Advanced Surgical Interventions
(a-SiC:H)	Amorphes, wasserstoffdotiertes Siliziumkarbid
ASS	Acetylsalicylsäure
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
atRA	all-trans-Retinoesäure
BFA	Zelllinie boviner, fötaler Endothelzellen aus der Aorta
β-BL	β-Butyrolacton
γ-BL	γ-Butyrolacton
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
-CH ₃	Methylgruppe
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CO ₂	Kohlendioxid
CoCr	Kobalt-Chrom-Legierung
-COOH	Carboxylgruppe
CsA	Cyclosporin A
d	Dicke
DES	Drug-Eluting Stent
DETC	Diethyldithiocarbamat
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DLC	Diamantartige Kohlenstoffschichten (Diamant-like-Carbon)
DMA	Dynamic Mechanical Analyzer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Diameterstenose
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDA	Ethylendiamin
EDC	Dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
E-Modul	Elastizitätsmodul
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy
EtO	Ethylenoxid
FAD	Formaldehyddampf
FKS	Fötales Kälberserum
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GPC	Gelpermeationschromatografie
HA	Hyaluronsäure
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells
HCASMC	Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie
ICH	Impurities: Guideline For Residual Solvents
ILC	Interstitial Laser Coagulation
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
KHK	Koronare Herzkrankheit

LEE	Lamina elastica externa
LEI	Lamina elastica interna
LL	Läsionslänge
LLL	Late lumen loss
LLLL	Late lumen loss index
M _n	Zahlenmittelwert der Molmasse
M _w	Gewichtsmittelwert der Molmasse
MACE	Major Adverse Cardiac Event
MDI	4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat)
MLD	Minimaler Lumendurchmesser
MPN	Maligne Prostataneoplasie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium
MTX	Methotrexat
NC	Negativkontrolle
-NCO	Isocyanatgruppe
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
-NH ₂	Aminogruppe
NH ₃	Ammoniak
NiTi	Nickel-Titan-Legierung
-OH	Hydroxylgruppe
PA	Polyamide
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMA	Poly(butylmethacrylat)
PBS	Phosphatpuffer
PC	Positivkontrolle
PCL	Poly(ε-caprolacton)
PDE	Permitted Daily Exposure
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDLA	Poly(D-lactid)
PDLLA	Poly(D,L-lactid)
PE	Polyethylen
PECVD	Plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung
PET	Poly(ethylenterephthalat)
PEVA	Poly(ethylen-co-vinylacetat)
PGA	Polyglycolid
P(3HB)	Poly(3-hydroxybuttersäure)
P(4HB)	Poly(4-hydroxybuttersäure)
PLA	Poly(lactid)
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PLLA	Poly(L-lactid)
PLLGA	Poly(L-lactid-co-glycolid)
PMA	Polymethacrylate
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
POE	Polyorthoester
pPUC	Porcine, primäre Urothelzellen
PS	Polystyrol
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTMC	Polytrimethylencarbonat
PTX	Paclitaxel
PUR	Polyurethane
PVC	Poly(vinylchlorid)
QCA	Quantitative Koronarangiografie
RAMSES	Rostock Advanced Manufacturing of Spray-coated drug-Eluting Stents
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROP	Ringöffnende Polymerisation
RR	Restenoserate

RVD	Referenzgefäßdurchmesser
SIBS	Poly(styren- <i>b</i> -isobutylen- <i>b</i> -styren)
SIR	Sirolimus
SnPVC	Zinn-PVC
S-Phase	Synthese-Phase
SR	Self-reinforced
SS	Salicylsäure
T _g	Glasübergangstemperatur
T _m	Schmelztemperatur
TEC	Triethylcitrat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TETD	Tetraethylthiuramdisulfid (Disulfiram)
TLR	Target Lesion Revascularization
TM	Tunica media
TUMT	Transurethral Microwave Thermotherapy
TVF	Target Vessel Failure
TVR	Target Vessel Revascularization
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLAP	Visual Laser Ablation of the Prostate

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1:	Möglichkeiten der Implantatmodifizierung zur gezielten Steuerung der Zelle-Implantat-Interaktion (schematisch)	1
Abb. 2:	Ausgewählte Beispiele für die Verwendung von Biomaterialien in Form von Implantaten.....	4
Abb. 3:	Reaktionsschema zur Synthese von Polylactid (PLA) aus dem cyclischen Dimer Lactid durch ringöffnende Polymerisation (ROP)	9
Abb. 4:	Reaktionsschema zur chemischen Synthese von Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) aus β -Butyrolacton (β -BL) durch ringöffnende Polymerisation (ROP) und Biosynthese von P(3HB) in <i>Ralstonia eutropha</i> unter Beteiligung folgender Enzyme: 1. β -Ketothiolase, 2. NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase, 3. Glucose-Dehydrogenase, 4. PHA-Synthase [25].	10
Abb. 5:	Reaktionsschema zur chemischen Synthese von Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) aus γ -Butyrolacton (γ -BL) durch ringöffnende Polymerisation (ROP) und Biosynthese von P(4HB) in <i>Escherichia coli</i> K12 unter Beteiligung folgender Enzyme: 1. Succinsemialdehyd-Dehydrogenase, 2. 4-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase, 3. Diol-Oxidoreduktase, 4. Aldehyd-Dehydrogenase, 5. Coenzym A-Transferase und 6. PHA-Synthase [47].	12
Abb. 6:	Koronarstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm, Goldröntgenmarker an den Stentenden) mit wirkstoffhaltiger PLLA-Beschichtung (Sternberg et al. (2007) [83])	17
Abb. 7:	Schematische Darstellung des Wirkprinzips eines Drug-Eluting Stents (DES): Lokale Wirkstofffreisetzung von der beschichteten Stentoberfläche (orange) ausgehend in das umliegende Gewebe (gelb) zur Adressierung einer gewünschten biologischen Reaktion... ..	19
Abb. 8:	Aufweitung verengter, stenosierter Arterienabschnitte durch die Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (PTCA) in Kombination mit der Stentimplantation.....	21
Abb. 9:	Histologische Schnitte von Blutgefäßabschnitten nach Implantation eines klassischen unbeschichteten, koronaren Metallstents (links) und eines koronaren DES (rechts)	23
Abb. 10:	Harmonisierung der Stufe zwischen dem Blutgefäß und der Prothese bei einer Prothesen-Gefäßanastomose (links) durch die Implantation eines Stents (rechts)	24
Abb. 11:	Schematische Darstellung relevanter Untersuchungsschritte der DES-Entwicklung bis hin zur Durchführung präklinischer Studien	28
Abb. 12:	Schematischer Aufbau eines Stents bestehend aus dem Stentgrundkörper und der Beschichtung und exemplarische Übersicht bereits verwendeter Stentmaterialien und Beschichtungsmatrizes nach dem derzeitigen Stand der Technik, modifiziert nach [181]... ..	29
Abb. 13:	DES-Konzepte, die aus der Variabilität des Stentgrundkörpers und aus der Art des Wirkstoffdepots resultieren [215, 216]	33
Abb. 14:	DES-Konzepte, die aus verschiedenen Modifizierungsvarianten des Wirkstoffs resultieren.....	35
Abb. 15:	Schematische Darstellung eines Stentstegs mit Beschichtung der Stentaußenseite (<i>Variante P</i>) sowie der -außenseite und -innenseite (<i>Variante Q</i>)	35
Abb. 16:	Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von Polyurethanen (PUR, Pellethane®): 1. Reaktion mit 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI), 2. Reaktion mit Wasser unter Abspaltung von Kohlendioxid, 3. Ionische Ankopplung von Acetylsalicylsäure (ASS).....	37
Abb. 17:	Reaktionsschema zur Oberflächendegradation von Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) unter Spaltung von Esterbindungen durch Hydrolyse (Verseifung) mit Natronlauge (NaOH) bzw. durch Aminolyse mit Ethylendiamin (EDA)	38
Abb. 18:	Reaktionsschema zur Oberflächenmodifizierung von Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)): 1. Reaktion mit 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI), 2. Reaktion mit Wasser unter Abspaltung von Kohlendioxid, 3. Ionische Ankopplung von Acetylsalicylsäure (ASS)	39
Abb. 19:	FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten PUR-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Probe (Pellethane®) sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten PUR-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)	42

Abb. 20:	FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten PLLA-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten PLLA-Probe sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten PLLA-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)	43
Abb. 21:	FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten P(3HB)-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten P(3HB)-Probe sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten P(3HB)-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)	44
Abb. 22:	FTIR-Spektren der nasschemisch modifizierten P(4HB)-Oberflächen in einzelnen Stufen der Modifikation im Vergleich zur unmodifizierten P(4HB)-Probe sowie Zuordnung der Peaks des FTIR-Spektrums der nasschemisch modifizierten P(4HB)-Oberflächen zu den Schwingungsdaten von wichtigen Molekülgruppen (s. Tabelle)	45
Abb. 23:	Tropfen auf einer Festkörperoberfläche mit dem Kontaktwinkel Θ	46
Abb. 24:	Oberflächenreaktion der primären Aminogruppen der modifizierten Polymere mit Ninhydrin zum Ruhemanns Purpur [224].....	48
Abb. 25:	Aminogruppenbeladung von PLLA, P(3HB) und P(4HB)-Folien nach Oberflächendegradation mit Natronlauge (NaOH) bzw. Ethylendiamin (EDA), Umsetzung mit 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI) und anschließender Reaktion mit Ammoniak (NH ₃) bzw. EDA; Vergleich mit PUR-Modifizierung nach Umsetzung mit MDI und anschließender Reaktion mit NH ₃	49
Abb. 26:	Freisetzung der an die PUR-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C	50
Abb. 27:	Freisetzung der an die PLLA-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C	51
Abb. 28:	Freisetzung der an die P(3HB)-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C	52
Abb. 29:	Freisetzung der an die P(4HB)-Oberfläche ionisch gebundenen ASS in isotonischer (0.9 %iger) NaCl-Lösung bei 37 °C	52
Abb. 30:	C3a-desArg-Konzentrationen in humanem Blutserum nach Kontakt der mit endständigen Aminogruppen im 3. Modifizierungsschritt beladenen PUR-Oberfläche im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Oberfläche (jeweils 200 mm ²) als Maß für deren Hämokompatibilität; Kontrollen: NC ohne Material, PC Inulin (2 mg/ml)	54
Abb. 31:	F1+2-Konzentrationen in humanem Heparinplasma nach Kontakt der mit endständigen Aminogruppen im 3. Modifizierungsschritt beladenen PUR-Oberfläche im Vergleich zur unmodifizierten PUR-Oberfläche (jeweils 200 mm ²) als Maß für deren Hämokompatibilität; Kontrollen: NC ohne Material, PC Kaolinit (5 mg/ml)	55
Abb. 32:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von L929-Mausfibroblasten im Direktkontakt mit verschiedenen P(3HB)-Oberflächen (jeweils 28 mm ²) im Vergleich zur Negativkontrolle Polystyrol (PS); P(3HB): unmodifizierte P(3HB), P(3HB)-OH, COOH: Basische Oberflächendegradation, P(3HB)-NCO: Reaktion zur endständigen -NCO, P(3HB)-NH ₂ : Reaktion zur endständigen -NH ₂	56
Abb. 33:	Detailausschnitt eines Koronarstents der Fa. Biotronik GmbH & Co. KG, Maßangaben in Millimeter (mm) und Grad (°).....	58
Abb. 34:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Beschichtungsfehlstellen, die im Tauchprozess mit einer chloroformhaltigen PLLA/TETD-Lösung (PLLA: 1.1 % w/w, TETD: 0.47 % w/w, PLLA/TETD 70/30 % w/w) mit Zunahme der Anzahl der Tauchgänge entstehen; Fehlertypen: a) Hautbildung in Stentschlaufe, b) Hautbildung zwischen zwei Stentstegen, c) Hautbildung im Bereich des Stentgelenks, d) Fadenbildung	61
Abb. 35:	Elektro-pneumatische Beschichtungsanlage (links) und deren Blockschema (rechts)	62
Abb. 36:	Schematische Darstellung des Ablaufplanes des DES-Sprühbeschichtungsprozesses mit der RAMSES (Rostock Advanced Manufacturing of Spraycoated drug-Eluting Stents)-Anlage	63
Abb. 37:	Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer chloroformhaltigen 0.1 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit vom Sprühabstand und Gleichung der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühdruck 2 bar, Lösungsdruck 0.05 bar, Sprühdauer 60 s; n=5 Stents [226]	65
Abb. 38:	Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer chloroformhaltigen 0.1 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit vom Sprühdruck bei	

	Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühabstand 30 cm, Lösungsdruck 0.05 bar, Sprühdauer 60 s; n=5 Stents [226]	66
Abb. 39:	Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer chloroformhaltigen 0.1 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit von der Sprühzeit und Gleichung der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühabstand 30 cm, Sprühdruck 2 bar, Lösungsdruck 0.05 bar; n=5 Stents [226]	66
Abb. 40:	Mittlere PLLA-Schichtmasse, die im Sprühprozess mit einer dichlormethanhaltigen 0.16 %igen (w/w) PLLA-Lösung erhalten wurde, in Abhängigkeit von der Sprühzeit und Gleichung der Regressionsgeraden mit Bestimmtheitsmaß bei Konstanz der folgenden Prozessparameter: Sprühabstand 35 cm, Sprühdruck 2.5 bar, Lösungsdruck 0.05 bar; n=5 Stents [226]	68
Abb. 41:	Lichtmikroskopische Aufnahmen (Auflicht) der Oberfläche zweier PLLA/TETD (70/30 % w/w)-Folien; Herstellung des Polymer-Wirkstoff-Komposits aus der Lösung ohne (a) und mit (b) Lösungsvermittlung	72
Abb. 42:	Lichtmikroskopische Aufnahmen (Auflicht, Strutbreite 90 µm) einer P(3HB)-Beschichtung auf einem undilatierten Metallstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm), Schichtmasse ca. 900 µg	73
Abb. 43:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (ESEM) von P(3HB)-Beschichtungen (Schichtmasse ca. 900 µg) auf Metallstents (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm) nach unterschiedlichen Stadien der Stentprozessierung: a-b: undilatiert, c-d: maschinell gecrimpt und β-sterilisiert, e-f: maschinell gecrimpt, β-sterilisiert und dilatiert	75
Abb. 44:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM, 150x) einer PLLA/Pimecrolimus-Beschichtung (PLLA/Pimecrolimus 55/45 % w/w) auf einem gecrimpten und β-sterilisierten, undilatierten Metallstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 15 mm), Schichtmasse ca. 1500 µg	75
Abb. 45:	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen einer PLLA/TETD (70/30 % w/w)-Folie (Ia) und eines im Sprühverfahren hergestellten PLLA/TETD (70/30 % w/w) DES (IIa) sowie Darstellung der charakteristischen Höhenprofile der Folie (Ib) und des DES (IIb) entlang der in Ia und IIa eingezeichneten Linien von jeweils 4 µm Offset (<i>Gocke, Sternberg et al.</i> [232])	76
Abb. 46:	TEM-Aufnahmen des PLLA/TETD-Komposits (70/30 % w/w, Ia,b) und des PLLA/CsA-Komposits (70/30 % w/w, IIa,b) in zwei unterschiedlichen Auflösungen: Ia, IIa – Übersichtsaufnahmen, Ib, IIb – Wirkstoffverteilungen in der Polymermatrix mit vereinzelt Kumulationsbereichen höherer Wirkstoffkonzentration	78
Abb. 47:	Schichtdicke im Stegquerschnitt; links: Tauchverfahren, rechts: Sprühverfahren, Schlifffanfertigung R. Rohde, LBAO Hannover [83]	79
Abb. 48:	Schichtdickenverteilung eines DES (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.5 mm, Länge: 13 mm, Schichtmasse ca. 1100 µg) über den Stentstegquerschnitt (abluminal, luminal, lateral 1, lateral 2 mit jeweils n=14 Meßpunkten) und über die Stentlänge (proximal, medial, distal), ermittelt durch die sukzessive Präparation und digitale lichtmikroskopische Dokumentation (Auflicht) dreier Schnittebenen [233]	80
Abb. 49:	Schematische Darstellung des charakteristischen Freisetzungsprofils eines DES (rote Kurve) und modellhafte Näherung unter Betrachtung des Diffusionsvorganges infolge des Konzentrationsgradientens in der Nernst'schen Diffusionsschicht	82
Abb. 50:	k(t)-Schichtentleerungsfunktionen nach den Messergebnissen von vier DES-Typen (s. Abb. 55): DES 1 - Stent P(4HB)/SIR 85/15, P(4HB)-Deckschicht_733-510, DES 2 - Stent PLLA/P(4HB) 70/30, 15 % SIR, P(4HB)-Deckschicht_733-510, DES 3-Stent PLLA/P(4HB) 50/50, 15 % SIR, P(4HB)-Deckschicht_733-510, DES 4 - Stent PLLA/P(4HB) 30/70, 15 % SIR, P(4HB)-Deckschicht_733-510	85
Abb. 51:	Aufbau der Apparatur zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung von DES in ein bewegtes, wässriges Elutionsmedium bei 37 °C im Wärmeschrank	86
Abb. 52:	Abhängigkeit der in vitro Wirkstofffreisetzung vom Elutionsmedium (0.9 %ige NaCl-Lösung, porcines Blutplasma) am Beispiel von PLLA/CsA DES (70/30 % w/w, pro Elutionsmedium jeweils n=2) bei 37 °C [83]	89
Abb. 53:	In vitro Freisetzung von Tretinoin (atRA) aus PLLA-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichen atRA-Konzentrationen (20, 40, 60 %; jeweils n=2) in porcinem Blutplasma (37 °C) [197]	90

Abb. 54:	In vitro Freisetzung von TETD aus verschiedenen biodegradierbaren Stentbeschichtungen (jeweils n=2) in 0.9 %iger NaCl-Lösung (37 °C); P(3HB)/P(4HB) 50/50 % w/w mit 30 % TETD (*), P(4HB)/TETD 70/30 % w/w, P(3HB-co-4HB)/TETD 70/30 % w/w, P(3HB)/at. P(3HB) 70/30 % w/w mit 30 % TETD, P(3HB)/P(4HB) 70/30 % w/w mit 30 % TETD, P(3HB)/TETD 70/30 % w/w, PLLA/TETD 70/30 % w/w.....	91
Abb. 55:	In vitro Freisetzung von SIR aus PLLA/P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen (jeweils n=1) im Vergleich zum kommerziellen CYPHER-Stent (n = 1) in 0.9 %iger NaCl-Lösung/0.06 % Brij 35 (37 °C); PLLA/P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichen PLLA/P(4HB)-Blendzusammensetzungen (70/30, 50/50, 30/70 % w/w) und 15 % SIR in der PLLA/P(4HB)-Grundschrift mit einer Schichtmasse von 733 µg sowie einer SIR-freien P(4HB)-Deckschrift mit einer Schichtmasse von 510 µg.	92
Abb. 56:	In vitro Freisetzung von Tretinoin (atRA) aus chemisch vernetzten Hyaluronsäure (HA)-Stentbeschichtungen (n=3, jede Kurve repräsentiert einen Stent) in porcinem Blutplasma (37 °C); Wirkstoffinkorporation durch Inkubation der HA-Beschichtung in 0.01 M atRA-Lösung [197].....	93
Abb. 57:	In vitro Freisetzung von SIR aus P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen (jeweils n=1) im Vergleich zum kommerziellen CYPHER-Stent (n=1) in 0.9 %iger NaCl-Lösung/0.06 % Brij 35 (37 °C); P(4HB)/SIR-Stentbeschichtungen mit P(4HB)/SIR 85/15 % (w/w) in einer hinsichtlich der Schichtmasse und somit -dicke variierten Grundschrift (Basecoat) und mit einer hinsichtlich der Schichtmasse und somit -dicke variierten SIR-freien Deckschrift (Topcoat); Beispiele: Stent 85/15-733-0 = DES mit P(4HB)/SIR 85/15 % (w/w)-Grundschrift mit einer Schichtmasse von 733 µg, ohne Topcoat; Stent 85/15-733-210 = DES mit P(4HB)/SIR 85/15 % (w/w)-Grundschrift mit einer Schichtmasse von 733 µg, mit einem SIR-freien P(4HB)-Topcoat mit einer Schichtmasse von 210 µg.....	94
Abb. 58:	In vitro Freisetzung von Paclitaxel (PTX) aus P(4HB)-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichem Schichtaufbau (jeweils n=1) in 0.9 %iger NaCl-Lösung (37 °C); DES-Prototyp 1: P(4HB)-Beschichtung mit Inkorporation von 15 % PTX (ca. 100 µg), DES-Prototyp 2: PTX-Grundschrift (ca. 100 µg) mit PTX-freier P(4HB)-Deckschrift (ca. 150 µg)	95
Abb. 59:	Modifizierte Durchflusszelle mit Stent (schematisch, links): 1 Durchflussmedium, 2 Hydrogelmatrix, 3 Glasperlen, 4 Stent; Durchflusszelle mit lipophilisierter Alginatmatrix (Draufsicht, Mitte) und Durchflusszellenapparat (schematisch, rechts): A auf 37 °C temperiertes Wasserbad, B Durchflusszelle, C Schlauchpumpe, D auf 37 °C temperiertes Vorratsgefäß mit Rührer [243]	96
Abb. 60:	Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme (Ia, Fotocollage) sowie Ausschnittsvergrößerung (Ib) der Alginat-Lipofundin-Matrix (20 µm dicke Schnitte) nach Implantation eines mit PLLA/Triamteren (70/30 % w/w)-beschichteten Stents und Triamterenfreisetzung über 48 h [244].....	97
Abb. 61:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Alginatfilms nach Implantation eines unbeschichteten Stents (IIa) sowie eines mit Polyvinylpyrrolidon (PVP)/Triamteren (50/50 % w/w)-beschichteten Stents und Triamterenfreisetzung über 48 h (IIb) [243].....	98
Abb. 62:	Degradationsbedingter Molmasseabbau verschiedener Polymere in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 37 °C); Prüfkörper: Polymerfolien (Ø = 6 mm, d = 100 µm); PLLA: reines PLLA-Homopolymer mit M _w = 650000 g/mol, P(3HB): reines P(3HB)-Homopolymer mit M _w = 640000 g/mol, P(3HB)/dg. P(3HB): Blend aus P(3HB)/degradierter P(3HB) mit M _w = 3000 g/mol 70/30 % w/w, P(3HB)/TEC: P(3HB) mit Weichmacherzusatz Triethylcitrat (TEC) 70/30 % w/w, P(3HB-co-4HB): Copolymer aus 3-HB/4-HB (82/18), P(3HB)/at. P(3HB): Blend aus natürlicher, isotaktischer P(3HB) und synthetischer, ataktischer P(3HB) mit M _w = 10000 g/mol 70/30 % w/w, P(4HB): reines P(4HB)-Homopolymer mit M _w = 450000 g/mol [248].....	102
Abb. 63:	Degradationsbedingter Molmasseabbau wirkstoffbeladener Polymerfolien (Ø = 6 mm, d = 100 µm) in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 70 °C); PLLA: reines PLLA-Homopolymer mit M _w = 650000 g/mol; PLLA/CsA 70/30 % (w/w): PLLA-Matrix, in die 30 % Cyclosporin A inkorporiert wurde; PLLA/TETD 70/30 % (w/w): PLLA-Matrix, in die 30 % Disulfiram inkorporiert wurde.....	103
Abb. 64:	Degradationsbedingter Molmasseabbau unsterilisierter und β-sterilisierter PLLA-Stentbeschichtungen (d = 10 µm) in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 70 °C); pro Probennahmezeitpunkt wurden n = 3 Stents (für nicht sterilisierte Stents bis einschließlich 21 Tage) und n = 5 Stents (für alle β-sterilisierten Stents und nicht sterilisierten Stents ab 28 Tagen Einlagerungsdauer) herangezogen [83].....	104

Abb. 65:	Degradationsbedingter Masseabbau unsterilisierten und β -sterilisierten PLLA-Stentbeschichtungen ($d = 10 \mu\text{m}$) in Sørensen-Puffer (pH 7.4, 70°C)	105
Abb. 66:	Rasterelektronenmikroskopische (ESEM) Aufnahmen von PLLA-beschichteten Stents nach 0 (a), 7 (b) und 14 (c) Tagen in vitro Degradation (in Sørensen-Puffer, pH 7.4, 70°C)	106
Abb. 67:	Abbau von PLLA infolge Sterilisation mit Ethylenoxid (EtO), β -Strahlen (25 kGy, 40 kGy) und γ -Strahlen (25 kGy, 40 kGy).....	108
Abb. 68:	Änderung ausgewählter im Zugversuch ermittelter mechanischer Kennwerte von PLLA-Prüfkörpern infolge Sterilisation mit Ethylenoxid (EtO), β -Strahlen (25 kGy) und γ -Strahlen (25 kGy) (Grabow et al. [250])	109
Abb. 69:	Schematische Darstellung zur Ermittlung der Stentabzugskraft mittels Universalprüfmaschine (links) und ermittelte Kraft-Weg-Kurven beim Abzug von (a-SiC:H)-beschichteten Stents ohne PLLA-Beschichtung, mit PLLA-Beschichtung, mit PLLA/Disulfiram (TETD)-Beschichtung 70/30 % (w/w) bzw. mit PLLA/Cyclosporin A (CsA)-Beschichtung 70/30 % (w/w) (rechts)	111
Abb. 70:	Schematische Darstellung der in vitro Prüfstrecke mit Gefäßsimulation nach Schmidt et al. [251] zur Untersuchung der Schichtintegrität von DES nach Delivery	112
Abb. 71:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (ESEM, 200x) einer PLLA/Pimecrolimus-Beschichtung (PLLA/Pimecrolimus 55/45 % w/w) auf einem gecrimpten, β -sterilisierten und dilatierten Metallstent (CoCr-Legierung, Durchmesser: 3.0 mm, Länge: 18 mm) nach Delivery im in vitro Gefäßmodell, Schichtmasse ca. $1800 \mu\text{g}$	113
Abb. 72:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (ESEM, 150x) der PLLA/TETD-Beschichtung (70/30 % w/w, links) und der PLLA/Genistein-Beschichtung (70/30 % w/w, rechts) auf Metallstents (CoCr-Legierung, Durchmesser 3.5 mm, Länge 13 mm)	114
Abb. 73:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492 \text{ nm}$) von HCAEC (a) und HCASMC (b) nach Direktkontakt (48 h) mit verschiedenen Probenmaterialien in Bezug zur Negativkontrolle Polystyrol (PS): PLLA nM_w - PLLA mit niedriger Molmasse von 280000 g/mol , PLLA hM_w - PLLA mit hoher Molmasse von 650000 g/mol , PDLLA - Poly(D,L-lactid), PLLGA - Poly(L-lactid-co-glycolid), P(3HB) - Poly(3-hydroxybuttersäure), P(4HB) nM_w - Poly(4-hydroxy-buttersäure) mit niedriger Molmasse von 140000 g/mol , P(4HB) hM_w - Poly(4-hydroxy-buttersäure) mit hoher Molmasse von 450000 g/mol , PMMA - Poly(methylmethacrylat), PBMA - Poly(butylmethacrylat), PEVA - Poly(ethylen-co-vinylacetat), PUR - Polyurethan Pellethane®, Glas - Glasplättchen, SnPVC - Zinn-PVC als Positivkontrolle (PC)	117
Abb. 74:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492 \text{ nm}$) von BFA nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n=6$ pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=6$).....	120
Abb. 75:	Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450 \text{ nm}$) von BFA nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n=6$ pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=6$).....	120
Abb. 76:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492 \text{ nm}$) von A7r5 nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n=6$ pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=6$).....	121
Abb. 77:	Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450 \text{ nm}$) von A7r5 nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n=6$ pro TETD-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=6$).....	121
Abb. 78:	TEM-Aufnahmen von A7r5-Zellen nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen: a - ohne Wirkstoff TETD, b - $1 \times 10^{-4} \text{ M TETD}$, c - $1 \times 10^{-6} \text{ M TETD}$, d - $1 \times 10^{-8} \text{ M TETD}$	122
Abb. 79:	Immunhistochemische Tubulin-Färbung von A7r5-Zellen mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper (Maus) und einem anti-Maus IgG-HRP-Konjugat nach 24 h-Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen: a - ohne TETD, b - $1 \times 10^{-4} \text{ M TETD}$, c - $1 \times 10^{-6} \text{ M TETD}$, d - $1 \times 10^{-8} \text{ M TETD}$; Visualisierung mit chromogenem AEC Reagenz; Zellfärbung mit Hämalaun	123
Abb. 80:	Relative Migration von A7r5 nach Inkubation mit TETD-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n=3$ pro TETD-Konzentration) entlang eines Konzentrationsgradientens des Attraktans PDGF in Bezug zur Negativkontrolle NC (ohne TETD-Zugabe, $n=3$)	125
Abb. 81:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492 \text{ nm}$) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $n=6$ pro	

	Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, n=6).....	126
Abb. 82:	Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, n=6 pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, n=6).....	126
Abb. 83:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, n=6 pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, n=6).....	127
Abb. 84:	Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit Genistein-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, n=6 pro Genistein-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne Genistein-Zugabe, n=6).....	127
Abb. 85:	In vitro Freisetzung von Genistein aus PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-Beschichtungen in 0.9 %iger NaCl-Lösung bzw. porcinem Blutplasma bei 37 °C (jeweils n=2) [265, 266]	129
Abb. 86:	In vitro Freisetzung von Genistein aus PLLA-Stentbeschichtungen mit unterschiedlichen Genistein-Konzentrationen (30, 50, 60 %; jeweils n=2) in porcinem Blutplasma (37 °C) [265, 266]	130
Abb. 87:	Aufbau der Apparatur für die Perfusionskultur von Abschnitten porciner <i>Arteria carotis externa</i> (links) und in eine porcine <i>Arteria carotis externa</i> implantierter DES (rechts) [268]	131
Abb. 88:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Endothels porciner <i>Arteria carotis externa</i> -Abschnitte: nativ (a), nach 7 Tagen Kultur (b), nach 14 Tagen Kultur (c), nach Implantation eines PLLA/TETD (80/20 % w/w) DES und Kultur über 7 Tage (d).....	133
Abb. 89:	Histologische Färbungen eines über 7 Tage kultivierten porcinen <i>Arteria carotis externa</i> -Abschnitts: HE-Färbung (a), Azanfärbung nach <i>Heidenhain</i> (b) und Elastikafärbung nach <i>Hart</i> (c)	134
Abb. 90:	Nachweis des Endothels in porcinen <i>Arteria carotis externa</i> -Abschnitten mit Anti-VE-Cadherin als Primärantikörper und einem FITC-markierten Sekundärantikörper über indirekte Immunfluoreszenz: nativ (a), nach 7 Tagen Kultur (b) und nach 14 Tagen Kultur (c)	135
Abb. 91:	Implantation von koronaren DES in die <i>A. subclavia</i> des <i>White-New-Zealand</i> -Kaninchens nach chirurgischer, schichtweiser Präparation der Leiste und Punktion der <i>A. femoralis</i> ..	137
Abb. 92:	Histologische Schnitte (Elastica van Gieson-Färbung) von Explantaten der <i>A. subclavia</i> des <i>White-New-Zealand</i> -Kaninchens nach 4 Wochen-Stentimplantation: reine PLLA-Beschichtung (a) und PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-Beschichtung (b).....	139
Abb. 93:	Mittlere flächenbezogene Restenose im Bereich der PLLA- und PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-beschichteten Stents (jeweils n=7) nach 4 Wochen Implantation in die <i>A. subclavia</i> des <i>White-New-Zealand</i> -Kaninchens	139
Abb. 94:	Mittlere Neointimafläche im Bereich der PLLA- und PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-beschichteten Stents (jeweils n=7) nach 4 Wochen Implantation in die <i>A. subclavia</i> des <i>White-New-Zealand</i> -Kaninchens	140
Abb. 95:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines undilatierten, peripheren PLLA-Stents (links) und fotografische Aufnahme des peripheren PLLA-Stents (A: undilatiert, B: dilatiert) [271].....	141
Abb. 96:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, n=6 pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, n=6) [271].....	143
Abb. 97:	Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCAEC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, n=6 pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, n=6) [271].....	144
Abb. 98:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, n=6 pro SIR-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, n=6) [271].....	144
Abb. 99:	Relative Proliferation (BrdU-Test, bei $\lambda=450$ nm) von HCASMC nach 24 h-Inkubation mit SIR-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-12} - 1×10^{-5} M, n=6 pro SIR-	

	Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle NC2 (nach Zellarretierung und -restimulierung, ohne SIR-Zugabe, n=6) [271].....	145
Abb. 100:	In vitro Freisetzung von SIR aus PLLA/SIR (70/30 % w/w)-Beschichtungen, die auf biodegradierbare, periphere PLLA-Stentgrundkörper (n=3) im Sprühverfahren aufgetragen wurden, in 0.9 %iger NaCl-Lösung (37 °C) [277, 278]	146
Abb. 101:	Untersuchung des femoralen Flusses mit Hilfe der Dopplersonografie (links) sowie intraoperativer Situs des Landschweins nach Implantation einer PTFE-Bifurkationsprothese und nach biliakalem Stenting von PLLA/SIR-DES im PTFE-Prothesen-Anastomosebereich (rechts) nach <i>Bünger et al.</i> [277, 278].....	148
Abb. 102:	Histologische Schnitte (HE-Färbung) distal der iliakalen Anastomose; A: PLLA-Stent, B: PLLA/SIR-DES [277, 278].....	148
Abb. 103:	Mittlere Neointimadicke im Bereich der Metall-, PLLA- und PLLA/SIR-Stents (jeweils n=6) nach 6 Wochen Implantation im Landschwein distal der iliakalen Anastomose [277, 278]	149
Abb. 104:	Inflammatory-Score als Ausdruck der Entzündungsreaktion um die Streben von Metall-, PLLA- und PLLA/SIR-Stents (jeweils n=6) nach 6 Wochen Implantation im Landschwein distal der iliakalen Anastomose [277, 278]	150
Abb. 105:	Injury-Score als Ausdruck der Gefäßwandverletzung nach 6 Wochen Implantation von Metall-, PLLA- und PLLA/SIR-Stents (jeweils n=6) im Landschwein distal der iliakalen Anastomose [277, 278]	150
Abb. 106:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines undilatierten PLLA-Urethrastents (links) und lichtmikroskopische Aufnahme eines dilatierten PLLA-Urethrastents (rechts) [282]	152
Abb. 107:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) nach Inkubation (24 h, 48 h) mit PLLA-Eluaten (n=4 pro Zeitpunkt und Eluat) in Bezug zur Negativkontrolle (NC), Untersuchung von unverdünnten (100 %) und mit Zellkulturmedium verdünnten (50 %, 25 %) Eluaten zweier PLLA-Folien (Probe 1, Probe 2), Postivkontrolle (PC): Eluate einer Latex-Folie, Negativkontrolle (NC): reines Zellkulturmedium	153
Abb. 108:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) auf der PLLA-Oberfläche (links) und auf der Latex-Oberfläche (rechts), 1000-fache Vergrößerung	154
Abb. 109:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von porcinen, primären Urothelzellen (pPUC) bei Direktkontakt mit der PLLA-Folienoberfläche nach 72 h in Bezug zur Negativkontrolle (NC), n=6 pro Material, Negativkontrolle (NC): Glas, Postivkontrolle (PC): Latex-Folie	154
Abb. 110:	Relative Vitalität (MTS-Test, bei $\lambda=492$ nm) von humanen Blasenkarzinomzellen (Zelllinie 5637) nach Inkubation (24 h, 48 h) mit MTX-Lösungen verschiedener Konzentrationen (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M, n=4 pro Zeitpunkt und MTX-Konzentration) in Bezug zur Negativkontrolle (NC), Zellkonzentration: 3×10^4 c/ml, Zellaussaat: 24 h vor Wirkstoffzugabe [282]	155
Abb. 111:	In vitro Freisetzung von Methotrexat (MTX) aus PLLA/MTX-Beschichtungen des PLLA-Urethrastents in Kunsturin nach Griffith [283] (37 °C)	157

Tabellen

Tab. 1:	Überblick über einige wichtige Vertreter synthetischer, biodegradierbarer Polymere, deren Abbaumechanismus in erster Linie die nicht-enzymatische Hydrolyse darstellt [9].....	7
Tab. 2:	Überblick über einige wichtige Vertreter biodegradierbarer Polymere, die durch Enzyme abgebaut werden [9]	8
Tab. 3:	Überblick über ausgewählte Eigenschaften von Polyhydroxycarbonsäuren [47]	13
Tab. 4:	Phasen der Restenoseentwicklung [98].....	21
Tab. 5:	Übersicht über ausgewählte Wirkstoffe für DES.....	30
Tab. 6:	Überblick über randomisierte klinische Studien Paclitaxel-freisetzender DES und Charakteristika der in diesen Studien verwendeten DES in Abhängigkeit von der Stenttechnologie und Dosisdichte [127].....	31
Tab. 7:	Überblick über randomisierte klinische Studien Sirolimus- bzw. Everolimus-freisetzender DES und Charakteristika der in diesen Studien verwendeten DES in Abhängigkeit von der Stenttechnologie und Dosisdichte [127]	31
Tab. 8:	Übersicht über die Reaktionsbedingungen der nasschemischen Oberflächenmodifizierungen von PUR, PLLA, P(3HB) und P(4HB)	40
Tab. 9:	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen nach Oberflächenmodifizierung, Mittelwerte der gemessenen Kontaktwinkel von n=12 Polymerproben pro Modifizierungsstufe	47
Tab. 10:	Schichtmassezuwachs nach Beschichtung von Koronarstents (jeweils n = 6) mit einer chloroformhaltigen PLLA/TETD-Lösung (PLLA: 1.1 % w/w, TETD: 0.47 % w/w, PLLA/TETD 70/30 % w/w) im Tauchverfahren in Abhängigkeit von der Anzahl der Tauchgänge	60
Tab. 11:	Überblick über die beim Tauchverfahren wesentlichen Prozessparameter und die optimalen Parametergrößen für eine Stentbeschichtung, die als polymeren Träger PLLA, gelöst in Chloroform, enthält	62
Tab. 12:	Übersicht über wesentliche Schichtkenngößen, die aus den im Tauch- bzw. Sprühprozess aufgetragenen mittleren Schichtmassen nach Beschichtung von Koronarstents (jeweils n = 6, Länge: 15 mm, Masse: ca. 15 mg, Oberfläche: 71 mm ²) mit chloroformhaltiger PLLA/TETD-Lösung (70/30 % w/w) resultieren	64
Tab. 13:	Überblick über die beim Sprühverfahren wesentlichen Prozessparameter und die optimalen Parametergrößen für eine Stentbeschichtung, die als polymeren Träger PLLA enthält; Umgebungsbedingungen: Temperatur 23 °C, Luftfeuchtigkeit 48 %.....	67
Tab. 14:	Entsprechend der ICH-Richtlinie vorgegebene Konzentrationslimits [µg/g] für den Gehalt an Chloroform (CHCl ₃) und Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂) in Arzneimittelformen [227]	69
Tab. 15:	Gehalte an Chloroform (CHCl ₃) und Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂) in PLLA/Pimecrolimus (55/45 % w/w)-Stentbeschichtungen nach Stentauslagerung unter verschiedenen Bedingungen (mit n = 2 Stents pro Auslagerungsbedingung)	70
Tab. 16:	Berechnete k _i -Werte aus der gemessenen Wirkstoffkonzentration c (in µg/ml) und der Zeit t nach dem Start der Diffusion bei t = 0 nach Gleichung 4.13	85
Tab. 17:	Ergebnisse der Abzugstests mittels Universalprüfmaschine zur Ermittlung der Systemintegrität Stent - Ballonkatheter.....	112
Tab. 18:	Ergebnisse der quantitativen Koronarangiografie (<i>Quantitative Coronary Angiography</i> , QCA) nach 4 Wochen-Implantation von PLLA/Genistein (70/30 % w/w)-beschichteten Koronarstents (n=7) in die <i>A. subclavia</i> von <i>White-New-Zealand</i> -Kaninchen im Vergleich zu PLLA-beschichteten Koronarstents (n=7); *) statistische Auswertung (X, SD, T-Test) mit SPSS für Windows, Version 14.0.....	138

Literaturverzeichnis

1. Langer, R., 1994 *Whitaker Lecture: polymers for drug delivery and tissue engineering*. Ann Biomed Eng, 1995. 23(2): 101-11.
2. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. Nature, 1998. 392(6679 Suppl): 5-10.
3. Langer, R., *Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience*. Acc Chem Res, 2000. 33(2): 94-101.
4. Ratner, B.D., *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. 2 ed. 2004, Amsterdam: Academic Press.
5. Lendlein, A., *Polymere als Implantatwerkstoffe*. Chemie in unserer Zeit, 1999. 33(5): 279-95.
6. Mathur, A.B., T.O. Collier, W.J. Kao, M. Wiggins, M.A. Schubert, A. Hiltner, und J.M. Anderson, *In vivo biocompatibility and biostability of modified polyurethanes*. J Biomed Mater Res, 1997. 36(2): 246-57.
7. Heumann, S., A. Eberl, H. Pobeheim, S. Liebminger, G. Fischer-Colbrie, E. Almansa, A. Cavaco-Paulo, und G.M. Gubitz, *New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres*. J Biochem Biophys Methods, 2006. 69(1-2): 89-99.
8. King, R.N. und D.J. Lyman, *Polymers in contact with the body*. Environ Health Perspect, 1975. 11: 71-4.
9. Hayashi, T., *Biodegradable polymers for biomedical uses*, Prog. Polym. Sci., 1994. 19: 663-702.
10. Schwach, G., J. Coudane, R. Engel, und M. Vert, *Influence of polymerization conditions on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide) polymerized in the presence of stannous octoate or zinc-metal*. Biomaterials, 2002. 23(4): 993-1002.
11. Kopecek, J. und K. Ulbrich, *Biodegradation of Biomedical Polymers*. Prog Polym Sci, 1983. 9(1): 34-35.
12. Jamshidi, K., *Synthesis and Properties of Polylactides*. Dissertation, Kyoto University, Kyoto, Japan, 1984.
13. Hollinger, J.O., *Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA)*. J Biomed Mater Res, 1983. 17(1): 71-82.
14. Schneider, A.K., *Polylactide sutures*. US 00003636956 A, 1972.
15. Wise, D.L., G.J. McCormick, G.P. Willet, und L.C. Anderson, *Sustained release of an antimalarial drug using a copolymer of glycolic/lactic acid*. Life Sci, 1976. 19(6): 867-73.
16. Wassermann, D., US 3375088, 1971.
17. Labinaz, M., J.P. Zidar, R.S. Stack, und H.R. Phillips, *Biodegradable stents: the future of interventional cardiology?* J Interv Cardiol, 1995. 8(4): 395-405.
18. Tsuji, T., H. Tamai, K. Igaki, E. Kyo, K. Kosuga, T. Hata, M. Okada, T. Nakamura, H. Komori, S. Motohara, und H. Uehata, *Biodegradable Polymeric Stents*. Curr Interv Cardiol Rep, 2001. 3(1): 10-17.
19. Tsuji, T., H. Tamai, K. Igaki, E. Kyo, K. Kosuga, T. Hata, T. Nakamura, S. Fujita, S. Takeda, S. Motohara, und H. Uehata, *Biodegradable stents as a platform to drug loading*. Int J Cardiovasc Intervent, 2003. 5(1): 13-6.
20. Tamai, H., K. Igaki, E. Kyo, K. Kosuga, A. Kawashima, S. Matsui, H. Komori, T. Tsuji, S. Motohara, und H. Uehata, *Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans*. Circulation, 2000. 102(4): 399-404.
21. Sharma R, R.A., *Polyhydroxybutyrate, its copolymers and blends*. J Macromol Sci - Rev Macromol Chem Phys, 1995. C35(2): 327-359.
22. Dawes, E.A. und P.J. Senior, *The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms*. Adv Microb Physiol, 1973. 10: 135-266.
23. Byrom, D., *Polyhydroxyalkanoates*, in *Plastics from Microbes. Microbial Synthesis of Polymers and Polymer Precursors*, D.P. Mobley, Editor. 1994, Carl Hanser Verlag: München. 5–33.
24. Hocking, P.J. und R.H. Marchessault, *Biopolyesters*, in *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*, G.J.L. Griffin, Editor. 1994: London. 48-96.
25. Woodyer, R.D., T.W. Johannes, und H. Zhao, *Regeneration of Cofactors for Enzyme Biocatalysis*, in *Enzyme Technology*, A. Pandey, et al., Editors. 2005, Asiatech Publishers Inc: Neu Delhi. 85-103.
26. Jung, C. und A. Steinbüchel, *Bioplastik aus Nutzpflanzen: Palette der nachwachsenden Rohstoffe erweitert*. Biologie in unserer Zeit, 2001. 31(4): 250-8.

27. Doi, Y., *Microbial Polyesters*. 1990, Weinheim: Wiley-VCH.
28. Lee, S.Y., *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. *Biotechnol Bioeng*, 1996. 49(1): 1-14.
29. Engelberg, I. und J. Kohn, *Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study*. *Biomaterials*, 1991. 12(3): 292-304.
30. Ishikawa, K., Y. Kawaguchi, und Y. Doi, *Plasticization of bacterial polyester by the addition of acyl-glycerols and its enzymatic degradability*. *Kobunshi Ronbunshu*, 1991. 48: 221-226.
31. Abe, H., D. Y., M.M. Satkowski, und I. Noda, *Morphology and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] plasticized with acylglycerols*, in *Biodegradable plastics and polymers (Studies in polymer science)*, Y.D.u.K. Fukuda, Editor. 1994, Elsevier: Amsterdam. 591-595.
32. Hammond, T., J.J. Liggat, J.H. Montador, und A. Webb, *Polyester composition*. WO 001994028061 A1, 1994.
33. Ghiya, V.P., V. Dave, R.A. Gross, und S.P. McCarthy, *Citrate esters as biodegradable plasticizers for poly(hydroxybutyrate-co-valerate)*. *Polymer Prepr*, 1995. 36: 420-421.
34. Kumagai, Y. und Y. Doi, *Physical properties and biodegradability of blends of isotactic and atactic poly(3-hydroxybutyrate)*. *Macromol Chem Rapid Commun*, 1992. 13: 179-183.
35. Freier, T., Schmitz K.-P., *Poly-3-hydroxybuttersäure ein Biomaterial für die medizinische Anwendung: Mechanische Eigenschaften, Biokompatibilität, in vitro und in vivo Degradation und klinische Anwendung*. Bericht mit Literaturübersicht und eigenen Untersuchungen, Kompetenzzentrum für Biomaterialien Rostock, 1999.
36. Malm, T., S. Bowald, A. Bylock, T. Saldeen, und C. Busch, *Regeneration of pericardial tissue on absorbable polymer patches implanted into the pericardial sac. An immunohistochemical, ultrastructural and biochemical study in the sheep*. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992. 26(1): 15-21.
37. Malm, T., S. Bowald, A. Bylock, und C. Busch, *Prevention of postoperative pericardial adhesions by closure of the pericardium with absorbable polymer patches. An experimental study*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992. 104(3): 600-7.
38. Malm, T., S. Bowald, S. Karacagil, A. Bylock, und C. Busch, *A new biodegradable patch for closure of atrial septal defect. An experimental study*. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992. 26(1): 9-14.
39. Heimerl, A., H. Pietsch, K.H. Rademacher, H. Schwengler, G. Winkeltau, und K.H. Treutner, *Chirurgische Implantate*. EP 000000336148 A2, 1989.
40. Hazari, A., G. Johansson-Ruden, K. Junemo-Bostrom, C. Ljungberg, G. Terenghi, C. Green, und M. Wiberg, *A new resorbable wrap-around implant as an alternative nerve repair technique*. *J Hand Surg [Br]*, 1999. 24(3): 291-5.
41. Fambri, L., M. Bianchetti, C. Migliaresi, C. Domenici, A. Ahluwalia, und G. Vozzi, *Preparation and characterization of piezoelectric poly-l-lactide films for electrostimulated tissue regeneration*. Proceedings of the 15th European Conference on Biomaterials, Bordeaux, Frankreich, 1999.
42. Holmes, P.A., *Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic*. *Phys Technol*, 1985. 16: 32-6.
43. Tanguay, J.F., J.P. Zidar, H.R. Phillips, 3rd, und R.S. Stack, *Current status of biodegradable stents*. *Cardiol Clin*, 1994. 12(4): 699-713.
44. Zidar, J.P., A.M. Lincoff, und R.S. Stack, *Biodegradable stents*, in *Textbook of interventional cardiology*, E.J. Topol, Editor. 1994: Philadelphia. 787-802.
45. van der Giessen, W.J., A.M. Lincoff, R.S. Schwartz, H.M. van Beusekom, P.W. Serruys, D.R. Holmes, Jr., S.G. Ellis, und E.J. Topol, *Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries*. *Circulation*, 1996. 94(7): 1690-7.
46. Unverdorben, M., A. Spielberger, M. Schywalsky, D. Labahn, S. Hartwig, M. Schneider, D. Looz, D. Behrend, K. Schmitz, R. Degenhardt, M. Schaldach, und C. Vallbracht, *A polyhydroxybutyrate biodegradable stent: preliminary experience in the rabbit*. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2002. 25(2): 127-32.
47. Martin, D.P. und S.F. Williams, *Poly-4-hydroxybutyrate matrices for sustained drug delivery*. US 020050025809 A1, 2005.
48. Sodian, R., S.P. Hoerstrup, J.S. Sperling, D.P. Martin, S. Daebritz, J.E. Mayer, Jr., und J.P. Vacanti, *Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves*. *ASAIO J*, 2000. 46(1): 107-10.

49. Grabow, N., K. Schmohl, A. Khosravi, M. Philipp, M. Scharfschwerdt, B. Graf, C. Stamm, A. Haubold, K.P. Schmitz, und G. Steinhoff, *Mechanical and structural properties of a novel hybrid heart valve scaffold for tissue engineering*. *Artif Organs*, 2004. 28(11): 971-9.
50. Yang, C., R. Sodian, P. Fu, C. Luders, T. Lemke, J. Du, M. Hubler, Y. Weng, R. Meyer, und R. Hetzer, *In vitro fabrication of a tissue engineered human cardiovascular patch for future use in cardiovascular surgery*. *Ann Thorac Surg*, 2006. 81(1): 57-63.
51. Williams, S.F., D.P. Martin, T. Gerngross, und D.M. Horowitz, *Polyhydroxyalkanoates for in vivo applications*. US 020040053381 A1, 2004.
52. Williams, S.F., D.P. Martin, und F. Skraly, *Medical devices and applications of polyhydroxyalkanoate polymers*. CA 000002368470 A1, 2000.
53. Schmitz, K.P., D. Behrend, K. Sternberg, N. Grabow, D.P. Martin, und S.F. Williams, *Polymeric, Degradable Drug-Eluting Stents and Coatings*. US 020070185561 A1, 2007.
54. Huang, B., H. Wu, S. Kim, und R.N. Zare, *Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl-beta-D-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption*. *Lab Chip*, 2005. 5(10): 1005-7.
55. Schliephake, H., A. Aref, D. Scharnweber, S. Bierbaum, S. Roessler, und A. Sewing, *Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation*. *Clin Oral Implants Res*, 2005. 16(5): 563-9.
56. Nahar, P., A. Naqvi, und S.F. Basir, *Sunlight-mediated activation of an inert polymer surface for covalent immobilization of a protein*. *Anal Biochem*, 2004. 327(2): 162-4.
57. Nahar, P., N.M. Wali, und R.P. Gandhi, *Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein ligand*. *Anal Biochem*, 2001. 294(2): 148-53.
58. Kojima, N., T. Matsuo, und Y. Sakai, *Rapid hepatic cell attachment onto biodegradable polymer surfaces without toxicity using an avidin-biotin binding system*. *Biomaterials*, 2006. 27(28): 4904-10.
59. Nobs, L., F. Buchegger, R. Gurny, und E. Allemann, *Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods*. *Int J Pharm*, 2003. 250(2): 327-37.
60. Zhu, Y., C. Gao, und J. Shen, *Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility*. *Biomaterials*, 2002. 23(24): 4889-95.
61. Freier, T., K. Sternberg, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Health Issues of Biopolymers: Polyhydroxybutyrate*, in *Biopolymers: General Aspects and Special Applications*, A. Steinbüchel, Editor. 2004, Wiley-VCH: Weinheim. 247-280.
62. Long, T.M., S. Prakash, M.A. Shannon, und J.S. Moore, *Water-vapor plasma-based surface activation for trichlorosilane modification of PMMA*. *Langmuir*, 2006. 22(9): 4104-9.
63. Safinia, L., N. Datan, M. Hohse, A. Mantalaris, und A. Bismarck, *Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds*. *Biomaterials*, 2005. 26(36): 7537-47.
64. Pan, F., P. Wang, K. Lee, A. Wu, N.J. Turro, und J.T. Koberstein, *Photochemical modification and patterning of polymer surfaces by surface adsorption of photoactive block copolymers*. *Langmuir*, 2005. 21(8): 3605-12.
65. Song, H., G.X. Wu, und K. Liu, *Photochemical surface modification of poly(arylsulfone) ultrafiltration membrane and covalent immobilization of enzyme*. *J Environ Sci (China)*, 2004. 16(3): 392-6.
66. Perego, G., P. Preda, G. Pasquinelli, T. Curti, A. Freyrie, und E. Cenni, *Functionalization of poly-(L-lactic-co-epsilon-caprolactone): effects of surface modification on endothelial cell proliferation and hemocompatibility [corrected]*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2003. 14(10): 1057-75.
67. Yang, X., K. Zhao, und G.Q. Chen, *Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates*. *Biomaterials*, 2002. 23(5): 1391-7.
68. Wang, S., W. Cui, und J. Bei, *Bulk and surface modifications of polylactide*. *Anal Bioanal Chem*, 2005. 381(3): 547-56.
69. Gugala, Z. und S. Gogolewski, *Attachment, growth, and activity of rat osteoblasts on polylactide membranes treated with various low-temperature radiofrequency plasmas*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. 76(2): 288-99.
70. Sundarababu, G., H. Gao, und H. Sigrist, *Photochemical linkage of antibodies to silicon chips*. *Photochem Photobiol*, 1995. 61(6): 540-4.
71. Sundarababu, G. und H. Sigrist, *Photoinduced surface immobilization of biomolecules*. *Trends Photochem Photobiol*, 1994. 3: 229-241.

72. Zhu, Y., C. Gao, Y. Liu, und J. Shen, *Endothelial cell functions in vitro cultured on poly(L-lactic acid) membranes modified with different methods*. J Biomed Mater Res A, 2004. 69(3): 436-43.
73. Bolz, A., M. Amon, C. Ozbek, B. Heublein, und M. Schaldach, *Coating of cardiovascular stents with a semiconductor to improve their hemocompatibility*. Tex Heart Inst J, 1996. 23(2): 162-6.
74. Gutensohn, K., C. Beythien, J. Bau, T. Fenner, P. Grewe, R. Koester, K. Padmanaban, und P. Kuehnl, *In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents. Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity*. Thromb Res, 2000. 99(6): 577-85.
75. Bolz, A. und M. Schaldach, *Artificial heart valves: improved blood compatibility by PECVD a-SiC:H coating*. Artif Organs, 1990. 14(4): 260-9.
76. Roy, R.K. und K.R. Lee, *Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. 83(1): 72-84.
77. Massaro, C., M.A. Baker, F. Cosentino, P.A. Ramires, S. Klose, und E. Milella, *Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques*. J Biomed Mater Res, 2001. 58(6): 651-7.
78. Schmidmaier, G., B. Wildemann, A. Stemberger, N.P. Haas, und M. Raschke, *Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors*. J Biomed Mater Res, 2001. 58(4): 449-55.
79. Letzner, G., H. von Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Degradable Biopolymers for Coating of Dental Implants*. ZWR, 2004. 113: 373-6.
80. Sternberg, K., T. Stöver, K. Schmohl, T. Lenarz, und K.P. Schmitz, *Functionalization of Cochlear Implant surfaces for focused local Pharmacotherapy of the inner Ear*. Biomaterialien (München), 2005. 6(S1): 50-51.
81. Duncan, G., I.M. Wormstone, C.S. Liu, J.M. Marcantonio, und P.D. Davies, *Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth*. Nat Med, 1997. 3(9): 1026-8.
82. Sternberg, K., N. Grabow, T. Langer, M. Löbler, C. Bünger, H. Dittrich, und K.P. Schmitz, *Entwicklung von Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Applikationen*. Biomaterialien (München), 2007. 8(S1): 78-79.
83. Sternberg, K., S. Kramer, C. Nischan, N. Grabow, T. Langer, G. Hennighausen, und K.P. Schmitz, *In vitro study of drug-eluting stent coatings based on poly(L-lactide) incorporating cyclosporine A – drug release, polymer degradation and mechanical integrity*. J Mater Sci Mater Med, 2007. 18(7): 1423-32.
84. Haynes, E., *Alloys of Cobalt with Cr and other metals*. Trans Am Inst Metall Pet Eng, 1913. 44: 573.
85. Waksman, R., R. Pakala, P.K. Kuchulakanti, R. Baffour, D. Hellings, R. Seabron, F.O. Tio, E. Wittchow, S. Hartwig, C. Harder, R. Rohde, B. Heublein, A. Andreae, K.H. Waldmann, und A. Haverich, *Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries*. Catheter Cardiovasc Interv, 2006. 68(4): 607-17; discussion 618-9.
86. Bose, D., H. Eggebrecht, und R. Erbel, *Absorbable metal stent in human coronary arteries: imaging with intravascular ultrasound*. Heart, 2006. 92(7): 892.
87. Peuster, M., C. Hesse, T. Schloo, C. Fink, P. Beerbaum, und C. von Schnakenburg, *Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta*. Biomaterials, 2006. 27(28): 4955-62.
88. Peuster, M., P. Wohlsein, M. Brugmann, M. Ehlerding, K. Seidler, C. Fink, H. Brauer, A. Fischer, und G. Hausdorf, *A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits*. Heart, 2001. 86(5): 563-9.
89. Dieterich, H.A. und H. Mörl, *Koronare Herzkrankheit*. 1993, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
90. Serruys, P.W., P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand, P. Materne, und e. al., *A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group*. N Engl J Med, 1994. 331(8): 489-95.
91. Fischman, D.L., M.B. Leon, D.S. Baim, R.A. Schatz, M.P. Savage, I. Penn, K. Detre, L. Veltri, D. Ricci, M. Nobuyoshi, und e. al., *A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators*. N Engl J Med, 1994. 331(8): 496-501.

92. Haude, M., R. Erbel, H. Issa, and J. Meyer, *Quantitative analysis of elastic recoil after balloon angioplasty and after intracoronary implantation of balloon-expandable Palmaz-Schatz stents*. J Am Coll Cardiol, 1993. 21(1): 26-34.
93. Waller, B.F., *Pathology of transluminal balloon angioplasty used in the treatment of coronary heart disease*. Hum Pathol, 1987. 18(5): 476-84.
94. Lovqvist, A., H. Emanuelsson, J. Nilsson, H. Lundqvist, and J. Carlsson, *Pathophysiological mechanisms for restenosis following coronary angioplasty: possible preventive alternatives*. J Intern Med, 1993. 233(3): 215-26.
95. Gray, B.H., T.M. Sullivan, M.B. Childs, J.R. Young, and J.W. Olin, *High incidence of restenosis/reocclusion of stents in the percutaneous treatment of long-segment superficial femoral artery disease after suboptimal angioplasty*. J Vasc Surg, 1997. 25(1): 74-83.
96. Kornowski, R., M.K. Hong, F.O. Tio, O. Bramwell, H. Wu, and M.B. Leon, *In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia*. J Am Coll Cardiol, 1998. 31(1): 224-30.
97. Sullivan, T.M., S.D. Ainsworth, E.M. Langan, S. Taylor, B. Snyder, D. Cull, J. Youkey, and M. Laberge, *Effect of endovascular stent strut geometry on vascular injury, myointimal hyperplasia, and restenosis*. J Vasc Surg, 2002. 36(1): 143-9.
98. Machraoui, A., P. Grewe, and A. Fischer, *Pathogenese der Atherosklerose*, in *Koronarstenting*. 2001, Dietrich Steinkopf Verlag: Darmstadt. 49-81.
99. Lam, J.Y., J.H. Chesebro, P.M. Steele, M.K. Dewanjee, L. Badimon, and V. Fuster, *Deep arterial injury during experimental angioplasty: relation to a positive indium-111-labeled platelet scintigram, quantitative platelet deposition and mural thrombosis*. J Am Coll Cardiol, 1986. 8(6): 1380-6.
100. Miller, D.D., A.J. Boulet, F.O. Tio, O.J. Garcia, D.M. Guy, R.P. McEver, J.C. Palmaz, K.Y. Pak, D.S. Neblock, H.J. Berger, and e. al., *In vivo technetium-99m S12 antibody imaging of platelet alpha-granules in rabbit endothelial neointimal proliferation after angioplasty*. Circulation, 1991. 83(1): 224-36.
101. Steele, P.M., J.H. Chesebro, A.W. Stanson, D.R. Holmes, Jr., M.K. Dewanjee, L. Badimon, and V. Fuster, *Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model*. Circ Res, 1985. 57(1): 105-12.
102. Bar-Shavit, R., M. Benezra, A. Eldor, E. Hy-Am, J.W. Fenton, 2nd, G.D. Wilner, and I. Vlodaysky, *Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action*. Cell Regul, 1990. 1(6): 453-63.
103. Daniel, T.O., V.C. Gibbs, D.F. Milfay, M.R. Garovoy, and L.T. Williams, *Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1986. 261(21): 9579-82.
104. Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, and S.M. Prescott, *Thrombin stimulates neutrophil adherence by an endothelial cell-dependent mechanism: characterization of the response and relationship to platelet-activating factor synthesis*. Ann N Y Acad Sci, 1986. 485: 349-68.
105. Bar-Shavit, R., A. Kahn, G.D. Wilner, and J.W. Fenton, 2nd, *Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin*. Science, 1983. 220(4598): 728-31.
106. Grewe, P.H., T. Deneke, A. Machraoui, J. Barmeyer, and K.M. Muller, *Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen*. J Am Coll Cardiol, 2000. 35(1): 157-63.
107. Nikkari, S.T., H.T. Jarvelainen, T.N. Wight, M. Ferguson, and A.W. Clowes, *Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury*. Am J Pathol, 1994. 144(6): 1348-56.
108. Strauss, B.H., R.J. Chisholm, F.W. Keeley, A.I. Gotlieb, R.A. Logan, and P.W. Armstrong, *Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis*. Circ Res, 1994. 75(4): 650-8.
109. Chen, D., T. Asahara, K. Krasinski, B. Witzenbichler, J. Yang, M. Magner, M. Kearney, W.A. Frazier, J.M. Isner, and V. Andres, *Antibody blockade of thrombospondin accelerates reendothelialization and reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid artery*. Circulation, 1999. 100(8): 849-54.
110. Schwartz, R.S., K.C. Huber, J.G. Murphy, W.D. Edwards, A.R. Camrud, R.E. Vlietstra, and D.R. Holmes, *Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model*. J Am Coll Cardiol, 1992. 19(2): 267-74.
111. Ferns, G.A. and T.Y. Avades, *The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models*. Int J Exp Pathol, 2000. 81(2): 63-88.

112. Yutani, C., H. Ishibashi-Ueda, T. Suzuki, und A. Kojima, *Histologic evidence of foreign body granulation tissue and de novo lesions in patients with coronary stent restenosis*. *Cardiology*, 1999. 92(3): 171-7.
113. Edelman, E.R. und C. Rogers, *Pathobiologic responses to stenting*. *Am J Cardiol*, 1998. 81(7A): 4E-6E.
114. Furman, M.I., I.A. Frelinger, und A.D. Michelson, *Antithrombotic therapy in the cardiac catheterization laboratory: focus on antiplatelet agents*. *Curr Cardiol Rep*, 2000. 2(5): 386-94.
115. Schomig, A., F.J. Neumann, A. Kastrati, H. Schuhlen, R. Blasini, M. Hadamitzky, H. Walter, E.M. Zitzmann-Roth, G. Richardt, E. Alt, C. Schmitt, und K. Ulm, *A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents*. *N Engl J Med*, 1996. 334(17): 1084-9.
116. Huang, L.Y. und M.C. Yang, *Hemocompatibility of layer-by-layer hyaluronic acid/heparin nanostructure coating on stainless steel for cardiovascular stents and its use for drug delivery*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2006. 6(9-10): 3163-70.
117. Beythien, C., K. Gutensohn, J. Bau, C.W. Hamm, P. Kuhn, T. Meinertz, und W. Terres, *Influence of stent length and heparin coating on platelet activation: a flow cytometric analysis in a pulsed floating model*. *Thromb Res*, 1999. 94(2): 79-86.
118. Voisard, R., A. Stemberger, R. Baur, T. Herter, I. Hahnel, A. Resch, C. Seliger, W. Hemmer, A. Hannekum, V. Hombach, und E. Alt, *Triple-coated stents (Hirudin/Iloprost/Paclitaxel): an in vitro approach for characterizing the antiproliferative potential of each individual compound*. *Int J Cardiol*, 2005. 102(3): 425-33.
119. Serruys, P.W., H. Emanuelsson, W. van der Giessen, A.C. Lunn, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Suryapranata, V. Legrand, J.J. Goy, P. Materne, H. Bonnier, M.C. Morice, J. Fajadet, J. Belardi, A. Colombo, E. Garcia, P. Ruygrok, P. de Jaegere, und M.A. Morel, *Heparin-coated Palmaz-Schatz stents in human coronary arteries. Early outcome of the Benestent-II Pilot Study*. *Circulation*, 1996. 93(3): 412-22.
120. Mehran, R., E. Nikolsky, E. Camenzind, M. Zelizko, I. Kranjec, R. Seabra-Gomes, M. Negoita, S. Slack, und C. Lotan, *An Internet-based registry examining the efficacy of heparin coating in patients undergoing coronary stent implantation*. *Am Heart J*, 2005. 150(6): 1171-6.
121. Bauters, C., E. Hubert, A. Prat, K. Bougrimi, E. Van Belle, E.P. McFadden, P. Amouyel, J.M. Lablanche, und M. Bertrand, *Predictors of restenosis after coronary stent implantation*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 31(6): 1291-8.
122. Kastrati, A., A. Schomig, S. Elezi, H. Schuhlen, J. Dirschinger, M. Hadamitzky, A. Wehinger, J. Hausleiter, H. Walter, und F.J. Neumann, *Predictive factors of restenosis after coronary stent placement*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. 30(6): 1428-36.
123. Schwartz, R.S., E.R. Edelman, A. Carter, N. Chronos, C. Rogers, K.A. Robinson, R. Waksman, J. Weinberger, R.L. Wilensky, D.N. Jensen, B.D. Zuckerman, und R. Virmani, *Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group*. *Circulation*, 2002. 106(14): 1867-73.
124. Daemen, J., P. Wenaweser, K. Tsuchida, L. Abrecht, S. Vaina, C. Morger, N. Kukreja, P. Juni, G. Sianos, G. Hellige, R.T. van Domburg, O.M. Hess, E. Boersma, B. Meier, S. Windecker, und P.W. Serruys, *Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study*. *Lancet*, 2007. 369(9562): 667-78.
125. Stone, G.W., J.W. Moses, S.G. Ellis, J. Schofer, K.D. Dawkins, M.C. Morice, A. Colombo, E. Schampaert, E. Grube, A.J. Kirtane, D.E. Cutlip, M. Fahy, S.J. Pocock, R. Mehran, und M.B. Leon, *Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents*. *N Engl J Med*, 2007. 356(10): 998-1008.
126. McKeage, K., D. Murdoch, und K.L. Goa, *The sirolimus-eluting stent: a review of its use in the treatment of coronary artery disease*. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2003. 3(3): 211-30.
127. Silber, S., *[When are drug-eluting stents effective? A critical analysis of the presently available data]*. *Z Kardiol*, 2004. 93(9): 649-63.
128. Mudra, H., C. Bode, E. Grube, F. de Haan, B. Levenson, G. Schuler, und S. Silber, *[Position paper on the use of drug eluting stents in coronary heart disease]*. *Z Kardiol*, 2004. 93(5): 416-22.
129. Liapis, C.D. und E.A. Tzortzis, *Advances in the management of iliac artery occlusive disease: a short review*. *Vasc Endovascular Surg*, 2004. 38(6): 541-5.
130. Cronenwett, J.L., *Vascular surgery training in the United States, 1994 to 2003*. *J Vasc Surg*, 2004. 40(4): 660-9; discussion 669.

131. Nykanen, D.G. und E.M. Zahn, *Transcatheter techniques in the management of perioperative vascular obstruction*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. 66(4): 573-9.
132. Ombrellaro, M.P., S.L. Stevens, J. Sciarrotta, D.O. Schaeffer, M.B. Freeman, und M.H. Goldman, *Effect of balloon-expandable and self-expanding stent fixation on endoluminal polytetrafluoroethylene graft healing*. Am J Surg, 1997. 173(6): 461-6.
133. Ohki, T., M.L. Marin, F.J. Veith, J.G. Yuan, M. Ohki, K. Soundararajan, L.A. Sanchez, R.E. Parsons, R.T. Lyon, und Y. Yamazaki, *Anastomotic intimal hyperplasia: a comparison between conventional and endovascular stent graft techniques*. J Surg Res, 1997. 69(2): 255-67.
134. Ombrellaro, M.P., S.L. Stevens, J. Sciarrotta, M.B. Freeman, und M.H. Goldman, *Effect of endoluminal PTFE graft placement on cell proliferation, PDGF secretion, and intimal hyperplasia*. J Surg Res, 1996. 63(1): 110-4.
135. Chalmers, R.T., J.J. Hoballah, W.J. Sharp, T.F. Kresowik, und J.D. Corson, *Effect of an endovascular stent on healing of an end-to-end polytetrafluoroethylene-artery anastomosis in a canine model*. Br J Surg, 1994. 81(10): 1443-7.
136. Worsey, M.J., A.L. Laborde, B.V. Miller, T.R. Bower, S. Landas, T.K. Kresowik, W.J. Sharp, J. Hoballah, und J.D. Corson, *Endovascular canine anastomotic stenting*. J Surg Res, 1993. 54(1): 29-33.
137. Tai, N.R., H.J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton, und A.M. Seifalian, *Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction*. Br J Surg, 2000. 87(11): 1516-24.
138. Ameli, F.M., J.L. Provan, C. Williamson, und P.M. Keuchler, *Etiology and management of aorto-femoral bypass graft failure*. J Cardiovasc Surg (Torino), 1987. 28(6): 695-700.
139. Cantelmo, N.L., W.C. Quist, und F.W. Lo Gerfo, *Quantitative analysis of anastomotic intimal hyperplasia in paired Dacron and PTFE grafts*. J Cardiovasc Surg (Torino), 1989. 30(6): 910-5.
140. Hasson, J.E., J. Megerman, und W.M. Abbott, *Increased compliance near vascular anastomoses*. J Vasc Surg, 1985. 2(3): 419-23.
141. Holmes, D.R., A.R. Camrud, M.A. Jorgenson, W.D. Edwards, und R.S. Schwartz, *Polymeric stenting in the porcine coronary artery model: differential outcome of exogenous fibrin sleeves versus polyurethane-coated stents*. J Am Coll Cardiol, 1994. 24(2): 525-31.
142. McBride, W., R.A. Lange, und L.D. Hillis, *Restenosis after successful coronary angioplasty. Pathophysiology and prevention*. N Engl J Med, 1988. 318(26): 1734-7.
143. Fabian, K.M., [The intra-prostatic "partial catheter" (urological spiral) (author's transl)]. Urologe A, 1980. 19(4): 236-8.
144. Saporta, L., M. Beyar, und D. Yachia, *New temporary coil stent (Urocoil) for treatment of recurrent urethral strictures*. J Endourol, 1993. 7(1): 57-9.
145. Nissenkorn, I. und M. Shalev, *Polyurethane stent for treatment of urethral strictures*. J Endourol, 1997. 11(6): 481-3.
146. Yachia, D., *The use of urethral stents for the treatment of urethral strictures*. Ann Urol (Paris), 1993. 27(4): 245-50; discussion 251-2.
147. Morey, A.F., *Long-term results of a self-expanding wallstent in the treatment of urethral stricture*. J Urol, 2005. 173(6): 2032.
148. Clark, J.S., G.N. Buchanan, A.R. Khawaja, P.H. Rowe, B.J. Stoodley, M.P. Saunders, und H.J. Anderson, *Use of the Bard Memotherm self-expanding metal stent in the palliation of colonic obstruction*. Abdom Imaging, 2003. 28(4): 518-24.
149. Pauer, W. und K. Kerbl, *Self-expanding permanent endoluminal stents in the ureter: technical considerations*. Tech Urol, 1995. 1(2): 67-71.
150. Kempainen, E., M. Talja, M. Riihela, T. Pohjonen, P. Tormala, und O. Alfthan, *A bioresorbable urethral stent. An experimental study*. Urol Res, 1993. 21(3): 235-8.
151. Talja, M., T. Tammela, A. Petas, T. Valimaa, K. Taari, E. Viherkoski, und P. Tormala, *Biodegradable self-reinforced polyglycolic acid spiral stent in prevention of postoperative urinary retention after visual laser ablation of the prostate-laser prostatectomy*. J Urol, 1995. 154(6): 2089-92.
152. Petas, A., P. Karkkainen, M. Talja, K. Taari, M. Laato, T. Valimaa, und P. Tormala, *Effects of biodegradable self-reinforced polyglycolic acid, poly-DL-lactic acid and stainless-steel spiral stents on uroepithelium after Nd:YAG laser irradiation of the canine prostate*. Br J Urol, 1997. 80(6): 903-7.
153. Dahlstrand, C., S. Grundtman, und S. Pettersson, *High-energy transurethral microwave thermotherapy for large severely obstructing prostates and the use of biodegradable stents to avoid catheterization after treatment*. Br J Urol, 1997. 79(6): 907-9.

154. Petas, A., T. Isotalo, M. Talja, T.L. Tammela, T. Valimaa, und P. Tormala, *A randomised study to evaluate the efficacy of a biodegradable stent in the prevention of postoperative urinary retention after interstitial laser coagulation of the prostate*. Scand J Urol Nephrol, 2000. 34(4): 262-6.
155. Petas, A., M. Talja, T.L. Tammela, K. Taari, T. Valimaa, und P. Tormala, *The biodegradable self-reinforced poly-DL-lactic acid spiral stent compared with a suprapubic catheter in the treatment of post-operative urinary retention after visual laser ablation of the prostate*. Br J Urol, 1997. 80(3): 439-43.
156. Isotalo, T., T.L. Tammela, M. Talja, T. Valimaa, und P. Tormala, *A bioabsorbable self-expandable, self-reinforced poly-L-lactic acid urethral stent for recurrent urethral strictures: a preliminary report*. J Urol, 1998. 160(6 Pt 1): 2033-6.
157. Isotalo, T., M. Talja, T. Valimaa, P. Tormala, und T.L. Tammela, *A pilot study of a bioabsorbable self-reinforced poly L-lactic acid urethral stent combined with finasteride in the treatment of acute urinary retention from benign prostatic enlargement*. BJU Int, 2000. 85(1): 83-6.
158. Holzl, F., O. Pfannschmidt, E. Manegold, D. Rohrmann, G. Jakse, und A. Brauers, *[In vitro analysis and animal experiment study of surface modified biodegradable polylactide ureteral stents]*. Urologe A, 2000. 39(6): 557-64.
159. Isotalo, T.M., J.P. Nuutinen, A. Vaajanen, P.M. Martikainen, M. Laurila, P. Tormala, M. Talja, und T.L. Tammela, *Biocompatibility properties of a new braided biodegradable urethral stent: a comparison with a biodegradable spiral and a braided metallic stent in the rabbit urethra*. BJU Int, 2006. 97(4): 856-9.
160. Nuutinen, J.P., T. Valimaa, C. Clerc, und P. Tormala, *Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable knitted stents*. J Biomater Sci Polym Ed, 2002. 13(12): 1313-23.
161. Vaajanen, A., J.P. Nuutinen, T. Isotalo, P. Tormala, T.L. Tammela, und M. Talja, *Expansion and fixation properties of a new braided biodegradable urethral stent: an experimental study in the rabbit*. J Urol, 2003. 169(3): 1171-4.
162. Cormio, L., P. La Forgia, A. Siitonen, M. Ruutu, P. Tormala, und M. Talja, *Immersion in antibiotic solution prevents bacterial adhesion onto biodegradable prostatic stents*. Br J Urol, 1997. 79(3): 409-13.
163. Multanen, M., M. Talja, S. Hallanvuori, A. Siitonen, T. Valimaa, T.L. Tammela, J. Seppala, und P. Tormala, *Bacterial adherence to ofloxacin-blended polylactone-coated self-reinforced L-lactic acid polymer urological stents*. BJU Int, 2000. 86(9): 966-9.
164. Multanen, M., T.L. Tammela, M. Laurila, J. Seppala, T. Valimaa, P. Tormala, und M. Talja, *Biocompatibility, encrustation and biodegradation of ofloxacin and silver nitrate coated poly-L-lactic acid stents in rabbit urethra*. Urol Res, 2002. 30(4): 227-32.
165. Isotalo, T., E. Alarakkola, M. Talja, T.L. Tammela, T. Valimaa, und P. Tormala, *Biocompatibility testing of a new bioabsorbable X-ray positive SR-PLA 96/4 urethral stent*. J Urol, 1999. 162(5): 1764-7.
166. Lambert, T.L., V. Dev, E. Rechavia, J.S. Forrester, F. Litvack, und N.L. Eigler, *Localized arterial wall drug delivery from a polymer-coated removable metallic stent. Kinetics, distribution, and bioactivity of forskolin*. Circulation, 1994. 90(2): 1003-11.
167. Hou, D., H. Narciso, K. Kamdar, P. Zhang, B. Barclay, und K.L. March, *Stent-based nitric oxide delivery reducing neointimal proliferation in a porcine carotid overstretch injury model*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2005. 28(1): 60-5.
168. Suzuki, T., G. Kopia, S. Hayashi, L.R. Bailey, G. Llanos, R. Wilensky, B.D. Klugherz, G. Papandreou, P. Narayan, M.B. Leon, A.C. Yeung, F. Tio, P.S. Tsao, R. Falotico, und A.J. Carter, *Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model*. Circulation, 2001. 104(10): 1188-93.
169. Serruys, P.W., E. Regar, und A.J. Carter, *Rapamycin eluting stent: the onset of a new era in interventional cardiology*. Heart, 2002. 87(4): 305-7.
170. Ranade, S.V., K.M. Miller, R.E. Richard, A.K. Chan, M.J. Allen, und M.N. Helmus, *Physical characterization of controlled release of paclitaxel from the TAXUS Express2 drug-eluting stent*. J Biomed Mater Res A, 2004. 71(4): 625-34.
171. de Scheerder, I., K. Wang, K. Wilczek, J. van Dorpe, E. Verbeken, W. Desmet, E. Schacht, und J. Piessens, *Local methylprednisolone inhibition of foreign body response to coated intracoronary stents*. Coron Artery Dis, 1996. 7(2): 161-6.
172. Unverdorben, M., R. Degenhardt, P. Sick, A. Kastrati, W. Desmet, A. Colombo, E. Garcia, W. Klein, E. Wagner, H. Kohler, M. Scholz, H.K. Berthold, und C. Vallbracht, *Evaluation of the*

- Coroflex Theca-Stent for reduction of restenosis (ECORI)*. J Invasive Cardiol, 2005. 17(4): 199-202.
173. Schellhammer, F., M. Walter, A. Berlis, H.G. Bloss, E. Wellens, und M. Schumacher, *Polyethylene terephthalate and polyurethane coatings for endovascular stents: preliminary results in canine experimental arteriovenous fistulas*. Radiology, 1999. 211(1): 169-75.
 174. Lincoff, A.M., J.G. Furst, S.G. Ellis, R.J. Tuch, und E.J. Topol, *Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model*. J Am Coll Cardiol, 1997. 29(4): 808-16.
 175. Banai, S., S.D. Gertz, L. Gavish, M. Chorny, L.S. Perez, G. Lazarovichi, M. Ianculovich, M. Hoffmann, M. Orłowski, G. Golomb, und A. Levitzki, *Tyrphostin AGL-2043 eluting stent reduces neointima formation in porcine coronary arteries*. Cardiovasc Res, 2004. 64(1): 165-71.
 176. Thierry, B., Y. Merhi, J. Silver, und M. Tabrizian, *Biodegradable membrane-covered stent from chitosan-based polymers*. J Biomed Mater Res A, 2005. 75(3): 556-66.
 177. Billinger, M., F. Buddeberg, J.A. Hubbell, D.L. Elbert, T. Schaffner, D. Mettler, S. Windecker, B. Meier, und O.M. Hess, *Polymer stent coating for prevention of neointimal hyperplasia*. J Invasive Cardiol, 2006. 18(9): 423-6; discussion 427.
 178. Cox, D., P. Anderson, und G. Roubin, *Effects of local delivery of heparin and methotrexate on neointimal proliferation in stented porcine coronary arteries*. Coron Artery Dis, 1992. 3: 237-48.
 179. Alt, E., I. Haehnel, C. Beilharz, K. Prietzel, D. Preter, A. Stemberger, T. Fliedner, W. Erhardt, und A. Schomig, *Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost*. Circulation, 2000. 101(12): 1453-8.
 180. Lewis, A.L., T.A. Vick, A.C. Collias, L.G. Hughes, R.R. Palmer, S.W. Leppard, J.D. Furze, A.S. Taylor, und P.W. Stratford, *Phosphorylcholine-based polymer coatings for stent drug delivery*. J Mater Sci Mater Med, 2001. 12(10-12): 865-70.
 181. Mani, G., M.D. Feldman, D. Patel, und C.M. Agrawal, *Coronary stents: a materials perspective*. Biomaterials, 2007. 28(9): 1689-710.
 182. Degertekin, M., E. Regar, K. Tanabe, C.H. Lee, und P.W. Serruys, *Sirolimus eluting stent in the treatment of atherosclerosis coronary artery disease*. Minerva Cardioangiol, 2002. 50(5): 405-18.
 183. Huang, Y., K. Salu, L. Wang, X. Liu, S. Li, G. Lorenz, S. Wnendt, E. Verbeken, J. Bosmans, F. Van de Werf, und I. De Scheerder, *Use of a tacrolimus-eluting stent to inhibit neointimal hyperplasia in a porcine coronary model*. J Invasive Cardiol, 2005. 17(3): 142-8.
 184. Beijik, M.A. und J.J. Piek, *XIENCE V everolimus-eluting coronary stent system: a novel second generation drug-eluting stent*. Expert Rev Med Devices, 2007. 4(1): 11-21.
 185. Grube, E. und L. Buellesfeld, *BioMatrix Biolimus A9-eluting coronary stent: a next-generation drug-eluting stent for coronary artery disease*. Expert Rev Med Devices, 2006. 3(6): 731-41.
 186. Behrend, D., K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Biowerkstoffe im Kontakt mit Weichgewebe und Blut*, in *DGM-Fortbildungsseminar Biomaterialien*. 2006. 59-74.
 187. Abizaid, A., M. Albertal, J. Ormiston, H. Londero, P. Ruygrok, A.C. Seixas, F. Feres, L.A. Mattos, R. Staico, R.L. Silva, M. Webster, J. Stewart, F. Paoletti, T. Kataoka, P. Fitzgerald, A. Sousa, und J.E. Sousa, *IMPACT Trial: angiographic and intravascular ultrasound observations of the first human experience with mycophenolic acid-eluting polymer stent system*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. 66(4): 491-5.
 188. Lasala, J.M., G.W. Stone, K.D. Dawkins, P.W. Serruys, A. Colombo, E. Grube, J. Koglin, und S. Ellis, *An overview of the TAXUS Express, paclitaxel-eluting stent clinical trial program*. J Interv Cardiol, 2006. 19(5): 422-31.
 189. Serruys, P.W., J.A. Ormiston, G. Sianos, J.E. Sousa, E. Grube, P. den Heijer, P. de Feyter, P. Buszman, A. Schomig, J. Marco, L. Polonski, L. Thuesen, A.M. Zeiher, J.H. Bett, M.J. Suttorp, H.D. Glogar, M. Pitney, G.T. Wilkins, R. Whitbourn, S. Veldhof, K. Miquel, R. Johnson, L. Coleman, und R. Virmani, *Actinomycin-eluting stent for coronary revascularization: a randomized feasibility and safety study: the ACTION trial*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(7): 1363-7.
 190. Grube, E. und L. Buellesfeld, *Initial experience with paclitaxel-coated stents*. J Interv Cardiol, 2002. 15(6): 471-5.
 191. Kwok, O.H., W.H. Chow, T.C. Law, A. Chiu, W. Ng, W.F. Lam, M.K. Hong, und J.J. Popma, *First human experience with angiopentin-eluting stent: a quantitative coronary angiography*

- and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005. 66(4): 541-6.
192. Kipshidze, N.N., P. Iversen, H.S. Kim, H. Yiazdi, G. Dangas, R. Seaborn, G. New, F. Tio, R. Waksman, R. Mehran, M. Tsapenko, G.W. Stone, G.S. Roubin, S. Iyer, M.B. Leon, and J.W. Moses, *Advanced c-myc antisense (AVI-4126)-eluting phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with complete vascular healing and reduced neointimal formation in the porcine coronary restenosis model*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2004. 61(4): 518-27.
 193. Buellfeld, L. und E. Grube, *ABT-578-eluting stents. The promising successor of sirolimus- and paclitaxel-eluting stent concepts?* *Herz*, 2004. 29(2): 167-70.
 194. Fontaine, A.B., J.J. Borsa, S. Dos Passos, E.K. Hoffer, R.D. Bloch, F. Starr, und C. So, *Evaluation of local abciximab delivery from the surface of a polymer-coated covered stent: in vivo canine studies*. *J Vasc Interv Radiol*, 2001. 12(4): 487-92.
 195. Nunes, G.L., A.C. Abizaid, M.P. Theodoro, F.S. Brito, Jr., A. Caixeta, L.F. da Silva, N.G. Mazzotti, A. Bello-Klein, und N. Clausell, *Role of probucol in inhibiting intimal hyperplasia after coronary stent implantation: a randomized study*. *Am Heart J*, 2006. 152(5): 914 e1-7.
 196. Johst, U., A. Betsch, J. Wiskirchen, W. Schober, R. Vonthein, N. Rinkert, R. Kehlbach, C.D. Claussen, und S.H. Duda, *All-trans and 9-cis retinoid acids inhibit proliferation, migration, and synthesis of extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells by inducing differentiation in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003. 41(4): 526-35.
 197. Sternberg, K., T. Langer, R. Bock, A. Borck, und K.P. Schmitz, *In vitro Drug Release from Tretinoin-based Drug-Eluting Stents*. *Biomed Tech (Berl)*, 2005. 50(Suppl 1 Pt 2): 1607-8.
 198. Nagler, A., H.Q. Miao, H. Aingorn, M. Pines, O. Genina, und I. Vlodyavsky, *Inhibition of collagen synthesis, smooth muscle cell proliferation, and injury-induced intimal hyperplasia by halofuginone*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(1): 194-202.
 199. Nwogu, J.I., D. Geenen, M. Bean, M.C. Brenner, X. Huang, und P.M. Buttrick, *Inhibition of collagen synthesis with prolyl 4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction*. *Circulation*, 2001. 104(18): 2216-21.
 200. Guo, H., J.D. Lee, H. Uzui, H. Yue, J. Wang, K. Toyoda, T. Geshi, und T. Ueda, *Effects of folic acid and magnesium on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells*. *Circ J*, 2006. 70(1): 141-6.
 201. Araujo, C.M., G.A. Rando, M.F. Mauro, S.A. Cristovao, I.S. Sanchez, A.A. Salman, J.B. Oliveira Neto, und J.A. Mangione, *[Batimastat-eluting stent implantation for the treatment of coronary artery disease: results of the Brazilian pilot study]*. *Arq Bras Cardiol*, 2005. 84(3): 256-60.
 202. Abizaid, A., M. Albertal, M.A. Costa, A.S. Abizaid, R. Staico, F. Feres, L.A. Mattos, A.G. Sousa, J. Moses, N. Kipshidze, G.S. Roubin, R. Mehran, G. New, M.B. Leon, und J.E. Sousa, *First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(6): 1118-21.
 203. Jaschke, B., C. Michaelis, S. Milz, M. Vogeser, T. Mund, L. Hengst, A. Kastrati, A. Schomig, und R. Wessely, *Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform*. *Cardiovasc Res*, 2005. 68(3): 483-92.
 204. Yamawaki, T., H. Shimokawa, T. Kozai, K. Miyata, T. Higo, E. Tanaka, K. Egashira, T. Shiraishi, H. Tamai, K. Igaki, und A. Takeshita, *Intramural delivery of a specific tyrosine kinase inhibitor with biodegradable stent suppresses the restenotic changes of the coronary artery in pigs in vivo*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 32(3): 780-6.
 205. Van Belle, E., L. Maillard, F.O. Tio, und J.M. Isner, *Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 235(2): 311-6.
 206. Abizaid, A., *Sirolimus Analogs*. *Terapia Endovascular & Miocardica TEAM 2006*, 25. - 27. September, Madrid, Spanien, 2006.
 207. Adriaenssens, T., J. Mehilli, R. Wessely, G. Ndrepepa, M. Seyfarth, A. Wieczorek, B. Blaich, R. Iijima, J. Pache, A. Kastrati, und A. Schomig, *Does addition of estradiol improve the efficacy of a rapamycin-eluting stent? Results of the ISAR-PEACE randomized trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 49(12): 1265-71.
 208. Aoki, J., P.W. Serruys, H. van Beusekom, A.T. Ong, E.P. McFadden, G. Sianos, W.J. van der Giessen, E. Regar, P.J. de Feyter, H.R. Davis, S. Rowland, und M.J. Kutryk, *Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM*

- (*Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man*) Registry. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(10): 1574-9.
209. Verma, S., M.A. Kuliszewski, S.H. Li, P.E. Szmitko, L. Zucco, C.H. Wang, M.V. Badiwala, D.A. Mickle, R.D. Weisel, P.W. Fedak, D.J. Stewart, und M.J. Kutryk, *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease*. *Circulation*, 2004. 109(17): 2058-67.
 210. Kaul, S., R.R. Makkar, M. Nakamura, F.I. Litvack, P.K. Shah, J.S. Forrester, T.C. Hutsell, und N.L. Eigler, *Inhibition of acute stent thrombosis under high-shear flow conditions by a nitric oxide donor, DMHD/NO. An ex vivo porcine arteriovenous shunt study*. *Circulation*, 1996. 94(9): 2228-34.
 211. Van Belle, E., F.O. Tio, T. Couffinhal, L. Maillard, J. Passeri, und J.M. Isner, *Stent endothelialization. Time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition*. *Circulation*, 1997. 95(2): 438-48.
 212. Varenne, O., S. Pislaru, H. Gillijns, N. Van Pelt, R.D. Gerard, P. Zoldhelyi, F. Van de Werf, D. Collen, und S.P. Janssens, *Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs*. *Circulation*, 1998. 98(9): 919-26.
 213. Janssens, S., D. Flaherty, Z. Nong, O. Varenne, N. van Pelt, C. Haustermans, P. Zoldhelyi, R. Gerard, und D. Collen, *Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats*. *Circulation*, 1998. 97(13): 1274-81.
 214. Silber, S., *Which parameter should be chosen as primary endpoint for randomized drug-eluting stent studies?* *J Interv Cardiol*, 2004. 17(6): 375-85.
 215. Sousa, J.E., P.W. Serruys, und M.A. Costa, *New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part I*. *Circulation*, 2003. 107(17): 2274-9.
 216. Teske, M., T. Langer, C. Gocke, N. Grabow, K.P. Schmitz, und K. Sternberg, *Nasschemische Modifizierung polymerer Implantatoberflächen zur lokalen Freisetzung von Medikamenten*. *Biomaterialien (München)*, 2007. 8(3): 171.
 217. Ge, J., J. Qian, X. Wang, Q. Wang, W. Yan, Y. Yan, B. Fan, L. Ge, und X. Liu, *Effectiveness and safety of the sirolimus-eluting stents coated with bioabsorbable polymer coating in human coronary arteries*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007. 69(2): 198-202.
 218. Bhargava, B., N.K. Reddy, G. Karthikeyan, R. Raju, S. Mishra, S. Singh, R. Waksman, R. Virmani, und B. Somaraju, *A novel paclitaxel-eluting porous carbon-carbon nanoparticle coated, nonpolymeric cobalt-chromium stent: evaluation in a porcine model*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2006. 67(5): 698-702.
 219. Serruys, P.W., G. Sianos, A. Abizaid, J. Aoki, P. den Heijer, H. Bonnier, P. Smits, D. McClean, S. Verheye, J. Belardi, J. Condado, M. Pieper, L. Gambone, M. Bressers, J. Symons, E. Sousa, und F. Litvack, *The effect of variable dose and release kinetics on neointimal hyperplasia using a novel paclitaxel-eluting stent platform: the Paclitaxel In-Stent Controlled Elution Study (PISCES)*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(2): 253-60.
 220. Kolodgie, F.D., M. John, C. Khurana, A. Farb, P.S. Wilson, E. Acampado, N. Desai, P. Soon-Shiong, und R. Virmani, *Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel*. *Circulation*, 2002. 106(10): 1195-8.
 221. Hesse, M., H. Meier, und B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*. 7 ed. 2005, Stuttgart: Thieme Verlag.
 222. Lin-Vien, D., N.B. Colthup, W.G. Fateley, und J.G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. 1991, San Diego: Academic Press Inc.
 223. Israelachvili, J., *Intermolecular & Surface Forces*. 2 ed. 1995, San Diego: Academic Press Inc.
 224. Ruhemann, S.J., *Chem Soc Trans*, 1910. 97: 1438-49.
 225. Malich, G., B. Markovic, und C. Winder, *The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines*. *Toxicology*, 1997. 124(3): 179-92.
 226. Lange, S., *Entwicklung einer Prozesstechnologie zur Beschichtung von Drug-Eluting Stents*. Diplomarbeit, Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock, 2007.
 227. *Harmonised Tripartite Guideline "Impurities: Guideline For Residual Solvents" Q3C(R3)*. 2005: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

228. Diener, T., *Koronarstents zur lokalen Wirkstoffelution: Entwicklung und Charakterisierung pharmakonbeladener Polymermatrizes*. Dissertation, Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock, 2005.
229. Jacobsen, S., *Darstellung von Polylactiden mittels reaktiver Extrusion*. Dissertation, Institut für Kunststofftechnologie, Universität Stuttgart, 2000.
230. Merkel, M. und K.H. Thomas, *Technische Stoffe*. 1976, Leipzig: Fachbuchverlag.
231. Beckert, M., ed. *Technische Mechanik, Werkstoffe, Werkstoffprüfung*. 1970, Fachbuchverlag: Leipzig.
232. Gocke, C., K. Sternberg, M. Teske, und K.P. Schmitz, *Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von wirkstofffreisetzenden Polymeroberflächen an vaskulären Implantaten*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52(Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
233. Schultze, C., C. Gocke, N. Grabow, W. Schmidt, K. Sternberg, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Validierung verschiedener Messmethoden zur Bestimmung der Schichtdicke polymerbeschichteter Metallstents*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52(Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
234. Fick, A., *Über Diffusion*. Poggendorff Ann Phys, 1855. 94: 59-86.
235. Bardelmeijer, H.A., M. Ouwehand, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, und O. van Tellingen, *Determination of cyclosporin A in human and mouse plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. 763(1-2): 201-6.
236. Axel, D.I., A. Frigge, J. Dittmann, H. Runge, I. Spyridopoulos, R. Riessen, R. Viebahn, und K.R. Karsch, *All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2001. 49(4): 851-62.
237. Neuville, P., Z. Yan, A. Gidlof, M.S. Pepper, G.K. Hansson, G. Gabbiani, und A. Sirsjo, *Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RARalpha-dependent signaling pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(6): 1430-6.
238. Wiegman, P.J., W.L. Barry, J.A. McPherson, C.A. McNamara, L.W. Gimple, J.M. Sanders, G.G. Bishop, E.R. Powers, M. Ragosta, G.K. Owens, und I.J. Sarembock, *All-trans-retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit: a favorable effect on vessel remodeling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(1): 89-95.
239. Smith, M.A., D.R. Parkinson, B.D. Cheson, und M.A. Friedman, *Retinoids in cancer therapy*. J Clin Oncol, 1992. 10(5): 839-64.
240. Sternberg, K., C. Selent, M. Löbler, E. Siegl, D. Jakobs, M. Petzsch, C. Nienaber, und K.P. Schmitz, *Disulfiram inhibits smooth muscle cell proliferation*. Biomaterialien (München), 2006. 7(S1): 118.
241. Jedlinski, Z., M. Kowalczyk, W. Glowkowski, J. Grobelny, und M. Szwarc, *Novel polymerization of b-butyrolactone initiated by potassium naphthalenide in the presence of a crown ether or a cryptand*. Macromolecules, 1991. 24: 349-52.
242. Marupudi, N.I., J.E. Han, K.W. Li, V.M. Renard, B.M. Tyler, und H. Brem, *Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies*. Expert Opin Drug Saf, 2007. 6(5): 609-21.
243. Neubert, A., C. Gutzeit, K. Sternberg, und W. Weitschies, *Design of a Novel Method for In Vitro Dissolution Testing of Drug-Eluting Stents*. Biomaterialien (München), 2007. 8(S1): 64-65.
244. Gutzeit, C., *Entwicklung eines Prüfsystems zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus Stents*. Diplomarbeit, Institut für Pharmazie, Universität Greifswald, 2007.
245. Reed, A., *In vivo and in vitro studies of biodegradable polymers for use in medicine*. Dissertation, Liverpool, 1978.
246. *Produktspezifikation der Polylactide L210 und L214*, Ingelheim: Boehringer Ingelheim.
247. Akita, S., Y. Einaga, Y. Miyaki, und H. Fujita, *Solution Properties of Poly (D-β-hydroxybutyrate). 1. Biosynthesis and Characterization*. Macromolecules, 1976. 9: 774-80.
248. Freier, T., C. Kunze, C. Nischan, S. Kramer, K. Sternberg, M. Sass, U.T. Hopt, und K.P. Schmitz, *In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate)*. Biomaterials, 2002. 23(13): 2649-57.
249. Kurcok, P., M. Kowalczyk, G. Adamus, Z. Jedlinski, und R.W. Lenz, *Degradability of poly(β-hydroxybutyrate)s. Correlation with chemical microstructure*. J Macromol Sci - Rev Macromol Chem Phys, 1995. A32: 875-80.

250. Grabow, N., M. Schlun, K. Sternberg, N. Hakansson, S. Kramer, und K.P. Schmitz, *Mechanical properties of laser cut poly(L-lactide) micro-specimens: implications for stent design, manufacture, and sterilization*. J Biomech Eng, 2005. 127(1): 25-31.
251. Schmidt, W. und K.P. Schmitz, *Devices*, in *Mastering of Endovascular Techniques -- A guide to excellence*, P. Lanzer, Editor. 2006, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 114-135.
252. Marikovskiy, M., V. Ziv, N. Nevo, C. Harris-Cerruti, und O. Mahler, *Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response*. J Immunol, 2003. 170(6): 2993-3001.
253. McDonnell, N.B., R.N. De Guzman, W.G. Rice, J.A. Turpin, und M.F. Summers, *Zinc ejection as a new rationale for the use of cystamine and related disulfide-containing antiviral agents in the treatment of AIDS*. J Med Chem, 1997. 40(13): 1969-76.
254. Scott, L.K., L.R. Grier, T.C. Arnold, und S.A. Conrad, *Respiratory failure from inhalational nickel carbonyl exposure treated with continuous high-volume hemofiltration and disulfiram*. Inhal Toxicol, 2002. 14(11): 1103-9.
255. Sunderman, F.W., Sr., *Chelation therapy in nickel poisoning*. Ann Clin Lab Sci, 1981. 11(1): 1-8.
256. Kurta, D.L., B.S. Dean, und E.P. Krenzelok, *Acute nickel carbonyl poisoning*. Am J Emerg Med, 1993. 11(1): 64-6.
257. Potchoo, Y., D. Braguer, V. Peyrot, A.M. Chauvet-Monges, J.C. Sari, und A. Crevat, *In vitro inhibition of microtubule assembly by disulfiram*. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1986. 24(9): 499-504.
258. Polkowski, K. und A.P. Mazurek, *Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data*. Acta Pol Pharm, 2000. 57(2): 135-55.
259. Tang, R., M. Cheng, Y. Nie, und H. Chen, *[Force-dependent effects of interleukin-8 production in endothelial cells exposed to fluid shear stress]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2004. 21(3): 363-6.
260. Kim, J., G. Min, Y.S. Bae, und D.S. Min, *Phospholipase D is involved in oxidative stress-induced migration of vascular smooth muscle cells via tyrosine phosphorylation and protein kinase C*. Exp Mol Med, 2004. 36(2): 103-9.
261. Jonas, L., G. Fulda, C. Radeck, K.O. Henkel, G. Holzhuter, und H.J. Mathieu, *Biodegradation of titanium implants after long-time insertion used for the treatment of fractured upper and lower jaws through osteosynthesis: element analysis by electron microscopy and EDX or EELS*. Ultrastruct Pathol, 2001. 25(5): 375-83.
262. Farhat, M.Y., M.C. Lavigne, und P.W. Ramwell, *The vascular protective effects of estrogen*. FASEB J, 1996. 10(5): 615-24.
263. Dubey, R.K., D.G. Gillespie, B. Imthurn, M. Rosselli, E.K. Jackson, und P.J. Keller, *Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells*. Hypertension, 1999. 33(1 Pt 2): 177-82.
264. Tanguay, J.F., *Vascular healing after stenting: the role of 17-beta-estradiol in improving re-endothelialization and reducing restenosis*. Can J Cardiol, 2005. 21(12): 1025-30.
265. Sternberg, K., K.P. Schmitz, D. Behrend, G. Hennighausen, C. Martini, und C. Harder, *Stent mit einer genisteinhaltigen Beschichtung oder Kavitätenfüllung*. PCT-Anmeldung 07013429.1-1219, 2007.
266. Sternberg, K., N. Grabow, M. Löbler, M. Petzsch, J. Lipiecki, C. Harder, C. Nienaber, und K.P. Schmitz, *Development of Drug-Eluting Stents on the Basis of Genistein and Poly(L-lactide) - In vitro and in vivo Results*. Proceedings of the 8th World Biomaterials Congress (WBC), Amsterdam, 28. Mai - 1. Juni, 2008 (eingereicht).
267. Minuth, W.W., K. Schumacher, R. Strehl, und S. Kloth, *Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering*. J Biomater Sci Polym Ed, 2000. 11(5): 495-522.
268. Selent, C., K. Sternberg, B. Hummel, M. Nerger, und K.P. Schmitz, *Entwicklung eines in vitro Modells zur Kultivierung von Karotiden für die Untersuchung von Gewebereaktionen nach Drug-Eluting-Stent-Kontakt*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 642-3.
269. Burck, H.C., *Histologische Technik*. 6 ed. 1988, Stuttgart: Thieme. 111-7.
270. Lootz, D., D. Behrend, K.P. Schmitz, H. Martin, K. Metzner, J. Schaffer, und W. Urbaszek, *Entwicklung eines Herstellungsverfahrens für resorbierbare Stents und FEM-Simulation des Verformungsverhaltens*. Biomed Tech (Berl), 1996. 41(Suppl 1): 586-7.
271. Sternberg, K., N. Grabow, C.M. Büniger, T. Langer, W. Schmidt, K. Schmohl, W. Schareck, H. Dittrich, und K.P. Schmitz, *Development of a biodegradable Sirolimus-eluting polylactide stent for peripheral vascular applications*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der

- Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.
272. Sharma, D., S.S. Kumar, R. Raghu, S. Khanam, und K.B. Sainis, *Differential modulation of mitogen driven proliferation and homeostasis driven proliferation of T cells by rapamycin, Ly294002 and chlorophyllin*. Mol Immunol, 2007. 44(11): 2831-40.
 273. Nebeker, J.R., R. Virmani, C.L. Bennett, J.M. Hoffman, M.H. Samore, J. Alvarez, C.J. Davidson, J.M. McKoy, D.W. Raisch, B.K. Whisenant, P.R. Yarnold, S.M. Belknap, D.P. West, J.E. Gage, R.E. Morse, G. Gligoric, L. Davidson, und M.D. Feldman, *Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(1): 175-81.
 274. Joner, M., A.V. Finn, A. Farb, E.K. Mont, F.D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H.K. Gold, und R. Virmani, *Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk*. J Am Coll Cardiol, 2006. 48(1): 193-202.
 275. Finn, A.V., G. Nakazawa, M. Joner, F.D. Kolodgie, E.K. Mont, H.K. Gold, und R. Virmani, *Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(7): 1500-10.
 276. French, D.C., M. Saltzgueber, D.R. Hicks, A.L. Cowper, und D.W. Holt, *HPLC assay with ultraviolet detection for therapeutic drug monitoring of sirolimus*. Clin Chem, 2001. 47(7): 1316-9.
 277. Bünger, C.M., N. Grabow, C. Kröger, B. Lorenzen, K. Hauenstein, M. Goosmann, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, D. Lootz, H. Ince, C.A. Nienaber, E. Klar, W. Schareck, und K. Sternberg, *Iliac Anastomotic Stenting With a Sirolimus-Eluting Biodegradable Poly-L-Lactide Stent: A Preliminary Study After 6 Weeks*. J Endovasc Ther, 2006. 13(5): 630-9.
 278. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Sternberg, C. Kroger, L. Ketner, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, H. Ince, C.A. Nienaber, E. Klar, und W. Schareck, *Sirolimus-Eluting Biodegradable Poly-L-Lactide Stent for Peripheral Vascular Application: A Preliminary Study in Porcine Carotid Arteries*. J Surg Res, 2007. 139(1): 77-82.
 279. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Sternberg, L. Ketner, C. Kröger, B. Lorenzen, K. Hauenstein, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, D. Lootz, H. Ince, C.A. Nienaber, E. Klar, und W. Schareck, *Iliac Anastomotic Stenting With a Biodegradable Poly-L-Lactide Stent: A Preliminary Study After 1 and 6 Weeks*. J Endovasc Ther, 2006. 13(4): 539-48.
 280. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Hauenstein, L. Ketner, C. Kröger, K. Sternberg, S. Kramer, D. Lootz, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, E. Klar, und W. Schareck, *Anastomotic stenting in a porcine aortoiliac graft model*. Lab Animals, 2007. 41(1): 71-9.
 281. Rajagopalan, P.T., Z. Zhang, L. McCourt, M. Dwyer, S.J. Benkovic, und G.G. Hammes, *Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(21): 13481-6.
 282. Sternberg, K., C. Selent, N. Hakanßon, J. Töllner, T. Langer, H. Seiter, und K.-P. Schmitz, *Gewebekultivierung zur in vitro Testung polymerbasierter bioresorbierbarer Urethrostents*. Urologe A, 2004. 43(10): 1200-7.
 283. Griffith, D.P., D.M. Musher, und C. Itin, *Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones*. Invest Urol, 1976. 13(5): 346-50.
 284. Virmani, R., F.D. Kolodgie, und A. Farb, *Drug-eluting stents: are they really safe?* Am Heart Hosp J, 2004. 2(2): 85-8.
 285. Finn, A.V., M. Joner, G. Nakazawa, F. Kolodgie, J. Newell, M.C. John, H.K. Gold, und R. Virmani, *Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization*. Circulation, 2007. 115(18): 2435-41.
 286. Virmani, R., G. Guagliumi, A. Farb, G. Musumeci, N. Grieco, T. Motta, L. Mihalcsik, M. Tespili, O. Valsecchi, und F.D. Kolodgie, *Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious?* Circulation, 2004. 109(6): 701-5.
 287. Stettler, C., S. Wandel, S. Allemann, A. Kastrati, M.C. Morice, A. Schomig, M.E. Pfisterer, G.W. Stone, M.B. Leon, J.S. de Lezo, J.J. Goy, S.J. Park, M. Sabate, M.J. Suttorp, H. Kelbaek, C. Spaulding, M. Menichelli, P. Vermeersch, M.T. Dirksen, P. Cervinka, A.S. Petronio, A.J. Nordmann, P. Diem, B. Meier, M. Zwahlen, S. Reichenbach, S. Trelle, S. Windecker, und P. Juni, *Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis*. Lancet, 2007. 370(9591): 937-48.

Thesen zur Habilitation

„Funktionalisierte, degradierbare Polymerbeschichtungen zur lokalen Freisetzung von Wirkstoffen - Entwicklung und Charakterisierung von Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Indikationen“

1. Drug-Eluting Stents (DES), die die örtlich begrenzte und zeitlich gesteuerte Abgabe von Wirkstoffen ermöglichen, sind aufgrund ihres modularen Konzeptes sehr vielseitig anwendbar und besitzen ein großes Potenzial für zahlreiche medizinische Anwendungen. Das Prinzip der DES besteht darin, dass die Stents nicht mehr nur als Stütze zur Kontinuitätserhaltung von Lumina, sondern auch als Träger zur lokalen Applikation biologisch aktiver Wirksubstanzen dienen.
2. Das klinische Ergebnis nach DES-Implantation ist dabei maßgeblich von der Auswahl für die jeweilige DES-Indikation geeigneter Wirkstoffe und Polymere sowie von der Wirkstofffreisetzung, d. h. von der erreichten lokalen Wirkstoffdosis über die Zeit und somit von der Art, wie der Wirkstoff bzw. die -kombination auf der Stentoberfläche fixiert wird, abhängig.
3. Die existierenden Drug-Eluting Stent-Konzepte basieren hauptsächlich auf Polymerbeschichtungen, in die die Wirkstoffe inkorporiert sind. Unter dem Gesichtspunkt, dass permanente polymere Beschichtungsmatrizes Fremdkörperreaktionen induzieren können, sind langsam degradierende Polymere, wie sie im Rahmen der Untersuchungen verwendet wurden, von Vorteil.
4. Das für die Beschichtung von Stents untersuchte Tauchverfahren eignet sich nur für die Erzeugung sehr dünner Beschichtungen, da es bei einer Wiederholung der Tauchvorgänge zur Ausbildung einer höheren Anzahl von Fehlstellen im Bereich der Stentgelenke und Stentschlaufen kommt. Außerdem wird bei der Wiederholung der Tauchgänge die bereits vorhandene Schicht stark angelöst und somit ein weiterer Schichtaufbau verhindert.
5. Die Verwendung des Sprühverfahrens zur Stentbeschichtung hat gegenüber dem Tauchverfahren den Vorteil, dass die Prozessparameter dieser Beschichtungstechnologie in einem großen Bereich variierbar sind. Dadurch gelingt es unter Erhalt einer hohen Oberflächengüte, die für die jeweilige DES-Indikation notwendigen Wirkstoff-

beschichtungen mit hoher Reproduzierbarkeit auf die Stentoberflächen aufzutragen. Die gewünschten Schichtmassen sind über die Prozessparameter Sprühabstand und Sprühdruk unter Variation der Sprühzeit gezielt einstellbar.

6. Bei der chemischen Oberflächenmodifizierung sind nur die funktionellen Gruppen an der Polymeroberfläche für die Wirkstoffankopplung zugänglich. Um die Wirkstoffankopplung auf den Oberflächen der biodegradierbaren Polyhydroxycarbonsäuren Poly(L-lactid) (PLLA), Poly(3-hydroxybuttersäure) (P(3HB)) und Poly(4-hydroxybuttersäure) (P(4HB)) realisieren zu können, sind zusätzliche Oberflächendegradationsreaktionen, beispielsweise durch basische Hydrolyse bzw. Aminolyse, notwendig.
7. Das im folgenden Syntheseschritt an die oberflächenaktivierten Polymere angekoppelte 4,4'-Methylen-bis(phenylisocyanat) (MDI) ist mit Hilfe der FTIR-ATR-Spektroskopie anhand der Absorptionsbande bei $2270\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ detektierbar, die der auf der Polymeroberfläche synthetisierten, endständigen Isocyanatgruppe zuzuordnen ist.
8. Die quantifizierende Bestimmung der durch Hydrolyse der endständigen Isocyanatgruppen gebildeten Aminogruppen gelingt mit Ninhydrin, das unter Bildung der Zwischenstufen Azomethin und Amino-Ninhydrin zum Ruhemanns Purpur dimerisiert. Die Intensität dieses von der Polymeroberfläche freigesetzten Farbstoffes, die durch Mesomerie unter Beteiligung einer Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des Systems konjugierter Doppelbindungen erklärt werden kann, ist dabei der Konzentration der zu bestimmenden Aminogruppen an der Polymeroberfläche proportional.
9. Bei der chemischen Wirkstoffankopplung, die exemplarisch mit dem Antiphlogistikum Acetylsalicylsäure (ASS) unter Bildung eines Arylammoniumacetylsalicylats vollzogen wurde, ist zu garantieren, dass die biologische Aktivität des Wirkstoffes erhalten bleibt. Dies kann durch hydrolytisch spaltbare, kovalente Bindungen oder durch ionische Bindungen realisiert werden.
10. Eine wichtige Indikation für die Anwendung von Drug-Eluting Stents ist die Verengung von Koronararterien im Rahmen der koronaren Herzkrankheit, die durch die Arteriosklerose verursacht wird. Die untersuchte Wirkstoff Genistein erweist sich aufgrund seiner differenziellen Wirkung auf humane, koronare arterielle Endothelzellen und glatte Muskelzellen als geeigneter Kandidat für diese Indikation.
11. Die Vorteile des Genisteins mit Hinblick auf die Verhinderung der In-Stent-Restenose sind die Förderung der Vitalität und Proliferation von Endothelzellen innerhalb eines Konzentrationsbereichs von $1 \times 10^{-10}\text{ M}$ bis $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ Genistein und die Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen bei Konzentrationen von $1 \times 10^{-8}\text{ M}$ bis $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ Genistein unter Erhalt der Vitalität dieses Zelltyps.

12. Die entwickelten Drug-Eluting Stents auf der Basis von PLLA und Genistein mit einer Schichtzusammensetzung von 70/30 % (w/w) sind geeignet, den Wirkstoff in Konzentrationen von $\geq 1 \times 10^{-6}$ M Genistein über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten zu eluieren, so dass Genistein-Konzentrationen pro Tag freigesetzt werden konnten, die in vitro eine Förderung der Vitalität und Proliferation der Endothelzellen sowie eine Hemmung der Proliferation der glatten Muskelzellen bewirken.
13. Die Wirksamkeit der entwickelten koronaren DES auf der Basis der PLLA/Genistein-Beschichtung ist im Tiermodell Kaninchen nicht ausreichend bewiesen worden, da keine signifikant verminderte neointimale Reaktion in den 4 Wochen-Ergebnissen durch die PLLA/Genistein-Beschichtung im Vergleich zur reinen PLLA-Beschichtung erzielt wurde. Eine Kombination des Genisteins mit einer antiproliferativen Wirksubstanz, wie Sirolimus oder Paclitaxel, in der PLLA-Beschichtung kann eine Verbesserung des in vivo Ergebnisses hinsichtlich der Inhibition der In-Stent-Restenose bewirken.
14. Zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit durch ein sogenanntes „Überstenten“ von Prothesenbypass-Anastomosen sind biodegradierbare Drug-Eluting Stents, beispielsweise auf der Basis von PLLA und Sirolimus, von Vorteil, da weitere Optionen für eine Nachbehandlung bestehen, sobald der biodegradierbare Drug-Eluting Stent vollständig abgebaut ist.
15. Die Zellkulturuntersuchungen über die durch den Wirkstoff Sirolimus hervorgerufene Hemmung der Zellvitalität und -proliferation gestatten die Auswahl der wirksamen Sirolimus-Konzentrationen und sind somit eine wichtige Voraussetzung, um die notwendigen SIR-Konzentrationen, die aus der Stentbeschichtung freigesetzt werden müssen, in erster Näherung abschätzen zu können.
16. Von Nachteil ist bei der Verwendung des Sirolimus, dass nicht nur die glatten Muskelzellen in ihrer Proliferation gehemmt werden, sondern auch die Endothelzellen. Dies birgt die Gefahr der Ausbildung einer späten Stentthrombose in sich, da das Sirolimus somit die Ausbildung der Neointima verhindert und sich über einen längeren Zeitraum Thrombozyten an der Stentoberfläche anheften können.
17. Die Ergebnisse mit biodegradierbaren Drug-Eluting Stents auf der Basis von PLLA und Sirolimus beweisen deren Wirksamkeit in tierexperimentellen Studien, die die Neointimabildung zeigen einhergehend mit einer signifikant verminderten inflammatorischen Reaktion und mit einer deutlich erhöhten luminalen Durchgängigkeit im 6 Wochen-Versuch im Vergleich zum unbeschichteten PLLA-Stent.
18. Polymerbasierte, biodegradierbare Drug-Eluting Stents sind darüber hinaus einsetzbar, um die Ausbildung von Stenosen der Urethra beim Prostatakarzinom zu verhindern.

19. Für diese Drug-Eluting Stent-Indikation scheinen Konzentrationen des Modellzytostatikums Methotrexat von 1×10^{-7} M bis 1×10^{-4} M geeignet, die in vitro eine Hemmung des Wachstums von Karzinomzellen bewirken.
20. Die entwickelten biodegradierbaren Drug-Eluting Stent-Prototypen mit einer Beschichtung aus PLLA/Methotrexat (70/30 %, w/w) setzen den Wirkstoff in für die Applikation relevanten Dosen innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 3 Monaten in vitro frei.
22. Eine Steigerung der lokal freigesetzten Methotrexatdosis kann durch die Erhöhung des prozentualen Methotrexat-Gehalts in der Beschichtung und eine Verlängerung des Wirkstofffreisetzungszeitraumes durch die Erhöhung der Schichtmasse und somit der Schichtdicke erreicht werden.
23. Eine Wirkstoffbeladung des PLLA-Stentgrundkörpers ist nur begrenzt möglich, da dessen mechanische Eigenschaften durch eine Wirkstoffbeladung grundlegend verändert werden können.

Wissenschaftliche Leistungen

Veröffentlichungen

1. Sternberg, K., C. Selent, G. Hennighausen, M. Löbler, E. Siegl, D. Jakobs, N. Grabow, M. Petzsch, C. Nienaber, und K.P. Schmitz, *Dose-dependent inhibition of in vitro smooth muscle cell proliferation by Disulfiram*. Eur J Pharm Sci, 2008 (eingereicht).
2. Sternberg, K., T. Therwee, O. Stachs, R. Guthoff, M. Löbler, und K.P. Schmitz, *An ex vivo model for drug-induced secondary cataract prevention - Experimental results with Disulfiram, Methotrexate and Actinomycin D*. Invest Ophthal Vis Sci, 2007 (eingereicht).
3. Sternberg, K., S. Kramer, C. Nischan, N. Grabow, T. Langer, G. Hennighausen, und K.P. Schmitz, *In vitro study of drug-eluting stent coatings based on poly(L-lactide) incorporating cyclosporine A – drug release, polymer degradation and mechanical integrity*. J Mater Sci Mater Med, 2007. 18(7): 1423-32.
4. Grabow, N., C.M. Bünger, K. Sternberg, S. Mews, K. Schmohl, und K.P. Schmitz, *Mechanical Properties of a Biodegradable Balloon-expandable Stent from Poly(L-lactide) for Peripheral Vascular Applications*. J Med Devices, 2007. 1(1): 84-8.
5. Grabow, N., C.M. Bünger, C. Schultze, K. Schmohl, D.P. Martin, S.F. Williams, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *A Biodegradable Slotted Tube Stent based on Poly(L-lactide) and Poly(4-hydroxybutyrate) for Rapid Balloon-Expansion*. Ann Biomed Eng, 2007. 35(12): 2031-8.
6. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Hauenstein, L. Ketner, C. Kröger, K. Sternberg, S. Kramer, D. Lootz, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, E. Klar, und W. Schareck, *Anastomotic stenting in a porcine aortoiliac graft model*. Lab Animals, 2007. 41(1): 71-9.
7. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Sternberg, C. Kroger, L. Ketner, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, H. Ince, C.A. Nienaber, E. Klar, und W. Schareck, *Sirolimus-Eluting Biodegradable Poly-L-Lactide Stent for Peripheral Vascular Application: A Preliminary Study in Porcine Carotid Arteries*. J Surg Res, 2007. 139(1): 77-82.
8. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Sternberg, M. Goosmann, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, H. Ince, S. Klische, C.A. Nienaber, D.P. Martin, S.F. Williams, E. Klar, und W. Schareck, *A Biodegradable Stent based on Poly(L-lactide) and Poly(4-hydroxybutyrate) for peripheral vascular application: Preliminary experience in the pig*. J Endovasc Ther, 2007. 14(5): 725-33.
9. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Sternberg, L. Ketner, C. Kröger, B. Lorenzen, K. Hauenstein, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, D. Lootz, H. Ince, C.A. Nienaber, E. Klar, und W. Schareck, *Iliac Anastomotic Stenting With a Biodegradable Poly-L-Lactide Stent: A Preliminary Study After 1 and 6 Weeks*. J Endovasc Ther, 2006. 13(4): 539-48.
10. Bünger, C.M., N. Grabow, C. Kröger, B. Lorenzen, K. Hauenstein, M. Goosmann, K.P. Schmitz, H.J. Kreutzer, D. Lootz, H. Ince, C.A. Nienaber, E. Klar, W. Schareck, und K. Sternberg, *Iliac Anastomotic Stenting With a Sirolimus-Eluting Biodegradable Poly-L-Lactide Stent: A Preliminary Study After 6 Weeks*. J Endovasc Ther, 2006. 13(5): 630-9.
11. Letzner, G., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Beschichtung dentaler Implantate mit Biopolymeren unter Inkorporation von Metronidazol*. Dtsch Zahnärztl Z, 2005. 60: 83-6.
12. Grabow, N., M. Schlun, K. Sternberg, N. Hakansson, S. Kramer, und K.P. Schmitz, *Mechanical properties of laser cut poly(L-lactide) micro-specimens: implications for stent design, manufacture, and sterilization*. J Biomech Eng, 2005. 127(1): 25-31.
13. Sternberg, K., C. Selent, N. Hakanßon, J. Töllner, T. Langer, H. Seiter, und K.-P. Schmitz, *Gewebekultivierung zur in vitro Testung polymerbasierter bioresorbierbarer Urethrastents*. Urologe A, 2004. 43(10): 1200-7.
14. Letzner, G., H. von Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Degradable Biopolymers for Coating of Dental Implants*. ZWR, 2004. 113: 373-6.

15. Heublein, B., R. Rohde, S. Barlach, K. Sternberg, K.P. Schmitz, C. Harder, G. Bayer, M. Tittelbach, T. Diener, und S. Hartwig, *Stents as Carriers for Applying a Local Active Agent: The Concept of the "Drug-Eluting Stent"*. Prog Biomed Res, 2002. 7(4): 216-25.
16. Freier, T., C. Kunze, C. Nischan, S. Kramer, K. Sternberg, M. Sass, U.T. Hopt, und K.P. Schmitz, *In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate)*. Biomaterials, 2002. 23(13): 2649-57.
17. Behrend, D., G. Zinner, K. Sternberg, M. Schröder, K.P. Schmitz, und A. Haubold, *Assessment of Explanted PTCA Balloons*. J Biomater Appl, 2000. 15(2): 160-7.
18. Sternberg, K., H. Reinke, und H. Oehme, *The Reaction of Transient 1,1-Bis(trimethylsilyl)silanes with Tris(trimethylsilyl)silyllithium - Synthesis and Structure of Sterically Congested 1-Trimethylsilylalkyl-polysilanes*. Z Anorg Allg Chem, 1999. 625(3): 467-73.
19. Sternberg, K. und H. Oehme, *The Acid-Induced Rearrangement of 1-Hydroxyalkyltris(trimethylsilyl)-silanes*. Chem Berichte, 1998. 2: 177-81.
20. Sternberg, K., M. Michalik, und H. Oehme, *The acid promoted rearrangement of 1-hydroxyalkyl-tris(trimethylsilyl)silanes into bis(trimethylsilyl)-1-trimethylsilylalkylsilanols: Generation of a transient silylium ion*. J Organometal Chem, 1997. 533(1-2): 265-8.
21. Schmitz, K.P., N. Grabow, M. Löbler, D. Behrend, W. Schmidt, und K. Sternberg, *Drug-eluting stent technologies for vascular regeneration*. Int J Mater Res, 2007. 98(7): 637-42.
22. Schmitz, K.P., N. Grabow, K. Sternberg, und C.A. Nienaber, *Kleine Implantate mit großer Bedeutung - Stents für die vaskuläre Regeneration*. Traditio et Innovatio, 2005. 10(2): 22-5.
23. Schmitz, K.P., W. Schmidt, K. Sternberg, und P. Behrens, *Stützen im Blutgefäß - Stents als Herausforderung für die Medizintechnik*. Traditio et Innovatio, 2002. 7(2): 25-9.
24. Behrend, D., K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Biowerkstoffe im Kontakt mit Weichgewebe und Blut*, in DGM-Fortbildungsseminar Biomaterialien. 2006. 59-74.
25. Freier, T., K. Sternberg, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Health Issues of Biopolymers: Polyhydroxybutyrate*, in *Biopolymers: General Aspects and Special Applications*, A. Steinbüchel, Editor. 2004, Wiley-VCH: Weinheim. 247-280.
26. Sternberg, K., N. Grabow, M. Löbler, M. Petzsch, J. Lipiecki, C. Harder, C. Nienaber, und K.P. Schmitz, *Development of Drug-Eluting Stents on the Basis of Genistein and Poly(L-lactide) - In vitro and in vivo Results*. Proceedings of the 8th World Biomaterials Congress (WBC), Amsterdam, 28. Mai - 1. Juni, 2008 (eingereicht).
27. Sternberg, K., M. Löbler, W. Schmidt, C.F. Kreiner, K.P. Schmitz, und R. Guthoff, *Entwicklung von bioresorbierbaren Medikamente-freisetzenden Drainageröhrchen für die Glaukomtherapie*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52(Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
28. Sternberg, K., N. Grabow, T. Langer, M. Löbler, C. Bünger, H. Dittrich, und K.P. Schmitz, *Entwicklung von Drug-Eluting Stents für verschiedene medizinische Applikationen*. Biomaterialien (München), 2007. 8(S1): 78-9.
29. Schultze, C., C. Gocke, N. Grabow, W. Schmidt, K. Sternberg, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Validierung verschiedener Messmethoden zur Bestimmung der Schichtdicke polymerbeschichteter Metallstents*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52 (Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
30. Schmidt, W., P. Behrens, M. Teske, C. Schultze, N. Grabow, K. Sternberg, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der Schichtintegrität von polymerbeschichteten Drug-Eluting-Stents*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52 (Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
31. Neubert, A., C. Gutzeit, K. Sternberg, und W. Weitschies, *Design of a Novel Method for In Vitro Dissolution Testing of Drug-Eluting Stents*. Biomaterialien (München), 2007. 8(S1): 64-5.

32. Müller, M., K. Sternberg, C. Lurtz, D. Behrend, R. Maletz, und K.P. Schmitz, *Physikochemische Eigenschaften pharmakabeladener Polymethacrylate*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52(Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
33. Lurtz, C., D. Behrend, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Charakterisierung mechanischer Eigenschaften verschiedener dentaler Nano-Komposite*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52(Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
34. Grabow, N., C. Schultze, C.M. Bünger, K. Schmohl, H. Martin, W. Schmidt, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *A Biodegradable Balloon-expandable Stent for Interventional Endovascular Applications*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52 (Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
35. Grabow, N., C.M. Bünger, K. Sternberg, K. Schmohl, und K.P. Schmitz, *A Biodegradable Balloon-expandable Stent for Endovascular Applications - In vitro Data*. Biomaterialien (München), 2007. 8(S1): 30-1.
36. Gocke, C., K. Sternberg, M. Teske, und K.P. Schmitz, *Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von wirkstofffreisetzenden Polymeroberflächen an vaskulären Implantaten*. Biomed Tech (Berl), 2007. 52 (Ergänzungsband): Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland, 26.-29. September 2007.
37. Bünger, C.M., N. Grabow, K. Sternberg, K.P. Schmitz, C. Kröger, H.J. Kreutzer, E. Klar, und W. Schareck, *Interactions among biodegradable stents and endothelium*. Biomaterialien (München), 2007. 8(S1): 18-9.
38. Wolf, J.M., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Kumulative Wirkstofffreisetzung von Poly-L-lactid-beschichteten dentalen Implantaten nach Ethylenoxidsterilisation*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.
39. Sternberg, K., N. Grabow, C.M. Bünger, T. Langer, W. Schmidt, K. Schmohl, W. Schareck, H. Dittrich, und K.P. Schmitz, *Development of a biodegradable Sirolimus-eluting polylactide stent for peripheral vascular applications*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.
40. Schmohl, K., K. Sternberg, N. Grabow, T. Langer, und K.P. Schmitz, *Entwicklung eines Röntgenmarkers für polymere Stentgrundkörper*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.
41. Schmidt, W., P. Behrens, N. Grabow, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Untersuchung mechanischer Eigenschaften von polymerbeschichteten Drug-Eluting-Stents*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.
42. Löbler, M., D. Behrend, K. Sternberg, H. v. Schwanewede, und K.P. Schmitz, *Biocompatibility of dental filling material depends on material surface characteristics and the cell line used for testing*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.
43. Grabow, N., S. Mews, K. Schmohl, K. Sternberg, C.M. Bünger, und K.P. Schmitz, *In vitro degradation study for a biodegradable PLLA stent: 1-year data*. Proceedings der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, Zürich, Schweiz, 06.-09. September 2006. In: Biomed Tech (Berl), de Gruyter, Berlin, 2006.

44. Wolf, J.M., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Drug release kinetics from coated teeth implant neck region*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 1): 546-7.
45. Sternberg, K., T. Langer, R. Bock, A. Borck, und K.P. Schmitz, *In vitro Drug Release from Tretinoin-based Drug-Eluting Stents*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 2): 1607-8.
46. Sternberg, K., T. Stöver, K. Schmohl, T. Lenarz, und K.P. Schmitz, *Functionalization of Cochlear Implant surfaces for focused local Pharmacotherapy of the inner Ear*. Biomaterialien (München), 2005. 6(S1): 50-1.
47. Schmohl, K., S. Kramer, K. Sternberg, D. Behrend, P. Pokinskyj, F. Schilke, und K.P. Schmitz, *Development and in vitro performance of a novel bone adhesive*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 2): 1603-4.
48. Schmidt, W., K. Sternberg, N. Grabow, D. Behrend, B. Chichkov, T. Lenarz, und K.P. Schmitz, *Microstents in ear, nose and throat medicine*. Biomaterialien (München), 2005. 6(S1): 42-3.
49. Ostwald, J., S. Dommerich, K. Sternberg, und B. Kramp, *Charakterisierung des Wachstums von respiratorischen Epithelzellen auf artifiziellen Matrizes*. Biomaterialien (München), 2005. 6(S1): 34-5.
50. Kramer, S., K. Schmohl, K. Sternberg, H. Dittrich, und K.P. Schmitz, *Development of customized foam matrix of polymeric base for medical application*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 2): 1597-8.
51. Grabow, N., S. Mews, K. Sternberg, C.M. Bünger, S. Kramer, und K.P. Schmitz, *In vitro degradation studies for a biodegradable stent based on PLLA*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 2): 1605-6.
52. Grabow, N., K. Sternberg, P. Weise, C.M. Bünger, und K.P. Schmitz, *Development of a novel biodegradable drug-eluting stent system based on poly(L-lactide) and disulfiram*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 2): 1613-4.
53. Dommerich, S., K. Sternberg, B. Kramp, und J. Ostwald, *Möglichkeiten des Wachstums von respiratorischen Epithelzellen auf artifiziellen Matrizes*. Biomaterialien (München), 2005. 6(S1): 70-1.
54. Diener, T., M. Tittelbach, C. Harder, J. Zeitvogel, K. Sternberg, B. Hensel, und K.P. Schmitz, *Concept of the Drug Eluting Stent*. Biomed Tech (Berl), 2005. 50(Suppl 1 Pt 1): 538-9.
55. Sternberg, K., T. Freier, N. Grabow, B. Nies, P. Pokinskyj, F. Schilke, und K.P. Schmitz, *Modifizierung und Testung von Oligolactonen für die Entwicklung eines resorbierbaren Weichgewebeklebers*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2 Pt 2): 598-9.
56. Sternberg, K., T. Langer, C. Harder, B. Heublein, und K.P. Schmitz, *In vitro Charakterisierung der Wirkstofffreisetzung von Drug-Eluting-Stents*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 606-7.
57. Selent, C., K. Sternberg, B. Hummel, M. Nerger, und K.P. Schmitz, *Entwicklung eines in vitro Modells zur Kultivierung von Karotiden für die Untersuchung von Gewebereaktionen nach Drug-Eluting-Stent-Kontakt*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 642-3.
58. Schmohl, K., K. Sternberg, C. Nischan, und K.P. Schmitz, *Methodische Untersuchungen an modifizierten Polyurethan-Folien auf Furanbasis*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 610-1.
59. Sayegh, R., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Werkstoffkundliche Untersuchungen von modifizierten Polyurethanen als Prothesenbasiswerkstoff*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 566-7.
60. Palluch, J., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Vergleichende werkstoffkundliche Untersuchungen zum Verbund weichbleibender Polymerer mit PMMA und Polyurethan als Prothesenmatrix*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 604-5.
61. Letzner, G., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Polymerbeschichtete dentale Implantate mit antibiotischem Depot nach ETO-Sterilisation und Thermocyclierung*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 602-3.
62. Letzner, G., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Modifizierungen von Poly-L-lactid und Poly-3-hydroxybuttersäure unter Inkorporation von Metronidazol zur Beschichtung dentaler Implantate*. Biomaterialien (München), 2004. 5(S 1): 28-9.

63. Kramer, S., K. Sternberg, D. Behrend, E. Hammer, K. Manda, F. Schauer, und K.P. Schmitz, *Enzymkatalysierte Vernetzungsreaktionen von Peptiden als Grundlage für die Anwendung als Weichgewebekleber*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 598-9.
64. Grunow, E., K. Sternberg, G. Zinner, T. Langer, G. Mernitz, B. Cuypers, und D. Behrend, *Beladung von Polyhydroxyalkanoaten mit antibiotischen Wirkstoffen - physikochemische Eigenschaften dieser Biomaterialien*. Biomed Tech (Berl), 2004. 49(Suppl 2): 572-3.
65. Sternberg, K., T. Langer, S. Kramer, E. Grunow, T. Diener, B. Heublein, und K.P. Schmitz, *In vitro Methoden zur Beurteilung von Polymerbeschichtungen mit Pharmakabeladung*. Biomed Tech (Berl), 2003. 48(Suppl 2): 396-7.
66. Schlun, M., K. Sternberg, N. Grabow, N. Hakansson, S. Kramer, und K.P. Schmitz, *Polymeric stents: The influence of plasticizer content on the mechanical properties*. Biomed Tech (Berl), 2003. 48(Suppl 1): 390-1.
67. Kramer, S., K. Sternberg, D. Behrend, E. Hammer, F. Schauer, und K.P. Schmitz, *Bioresorbierbarer Weichgewebekleber auf Strukturbasis von Mussel Adhesive Proteins (MAPs)*. Biomed Tech (Berl), 2003. 48(Suppl 1): 382-3.
68. Grunow, E., K. Sternberg, A. Rohde, G. Mernitz, B. Cuypers, und D. Behrend, *Antibiotisch wirksame Implantatmaterialien aus der Kombination von Biopolymeren und Wirkstoffen mariner Mikroorganismen*. Biomed Tech (Berl), 2003. 48(Suppl 1): 398-9.
69. Diener, T., B. Heublein, S. Barlach, K. Sternberg, E. Strikovic, C. Harder, S. Hartwig, M. Tittelbach, K.P. Schmitz, und B. Hensel, *Hochmolekulare Poly-L-lactid Trägermatrix für Local Drug Delivery - Applikationen*. Biomed Tech (Berl), 2003. 48(Suppl 1): 74-5.
70. Sternberg, K., T. Freier, C. Kunze, K. Peseke, und K.P. Schmitz, *Synthese und Modifizierung von Polyurethanen*. Biomed Tech (Berl), 2001. 46(Suppl 1): 218-9.
71. Behrend, D., P. Behrens, G. Zinner, K. Sternberg, W. Schmidt, M. Schröder, und K.P. Schmitz, *Biomaterialien - Wiederverwendung von kardiovaskulären Einwegprodukten - Eine kritische Analyse*. Biomed Tech (Berl), 2000. 45(Suppl.): 100-1.

Abstracts

72. Teske, M., T. Langer, C. Gocke, N. Grabow, K.P. Schmitz, und K. Sternberg, *Nasschemische Modifizierung polymerer Implantatoberflächen zur lokalen Freisetzung von Medikamenten*. Biomaterialien (München), 2007. 8(3): 171.
73. Schmitz, K.P., N. Grabow, M. Löbler, D. Behrend, W. Schmidt, und K. Sternberg, *Stenttechnologie für die vaskuläre Regeneration*. Biomaterialien (München), 2007. 8(3): 269.
74. Grabow, N., H. Martin, J.F. Wieding, S. Guo, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Entwicklungsbegleitende Simulation der Pharmakafreisetzung aus Drug-Eluting Stents*. Biomaterialien (München), 2007. 8(3): 231.
75. Sternberg, K., C. Selent, M. Löbler, E. Siegl, D. Jakobs, M. Petzsch, C. Nienaber, und K.P. Schmitz, *Disulfiram inhibits smooth muscle cell proliferation*. Biomaterialien (München), 2006. 7(S1): 118.
76. Grabow, N., S. Mews, K. Schmohl, K. Sternberg, C.M. Büniger, und K.P. Schmitz, *Long-term in vitro degradation study for a biodegradable PLLA stent*. Biomaterialien (München), 2006. 7(3): 154.
77. Grabow, N., K. Jahnel, A. Löhn, H. Martin, C.M. Büniger, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Stent-Artery Interaction of a Novel Poly(L-Lactide) Coronary Stent and a Stenotic Coronary Vessel: A Finite Element Study*. Clin. Hemorheol. Microcirc., 2006. 35(3): 421.
78. Büniger, C.M., K. Sternberg, N. Grabow, C. Kröger, K.P. Schmitz, E. Klar, und W. Schareck, *Sirolimus eluting biodegradable Poly-L-Lactic acid vascular stent equals metallic stent within 6 weeks*. Eur Surg Res, 2006. 38(Suppl 1): 69.
79. Sternberg, K., N. Grabow, P. Weise, C.M. Büniger, T. Langer, und K.P. Schmitz, *Development of a biodegradable drug-eluting stent based on poly(L-lactide) and disulfiram*. Biomaterialien (München), 2005. 6(3): 207.

80. Grabow, N., S. Mews, K. Sternberg, S. Kramer, K. Schmohl, C. Stamm, G. Steinhoff, und K.P. Schmitz, *The influence of in vitro degradation on the mechanical properties of different polyhydroxybutyrates*. Biomaterialien (München), 2005. 6(3): 224.
81. Behrend, D., H.W. Pau, W. Schmidt, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Klinische und technische Anforderungen an die Cochlea-Elektrodenentwicklung*. Biomaterialien (München), 2005. 6(S1): 14.
82. Selent, C., K. Sternberg, E. Siegl, G. Hennighausen, und K.P. Schmitz, *Untersuchung des Stoffeinfusses von Disulfiram zur Verhinderung der Restenose*. Biomaterialien (München), 2004. 5(3): 200.
83. Palluch, J., H. v. Schwanewede, K. Sternberg, und D. Behrend, *Der Verbund weicher und harter Polyurethane im Vergleich zum Verbund von Polymeren auf Silikon- und PMMA-Basis*. Biomaterialien (München), 2004. 5(S1): 38.
84. Kramer, S., K. Schmohl, K. Sternberg, D. Behrend, E. Hammer, K. Manda, F. Schauer, und K.P. Schmitz, *Bioresorbierbarer Weichgewebekleber*. Proceedings "BioCon Valley - Life Science for the Future 2004", Rostock, 2004: 36.
85. Jakobs, D., K. Sternberg, C. Selent, E. Siegl, und K.P. Schmitz, *Charakterisierung von Gewebereaktionen auf Stents mit Cyclosporinbeladung in porcinen, kultivierten Blutgefäßen*. Biomaterialien (München), 2004. 5(3): 174.
86. Grabow, N., M. Schlun, N. Hakansson, B. Becher, H. Martin, D. Lootz, S. Kramer, K. Sternberg, P. Behrens, W. Schmidt, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Mechanical properties of poly(L-lactide) stents: the interaction of material properties, sterilization, manufacture and design*. Proceedings of the 14th Congress of the European Society of Biomechanics, 's Hertogenbosch, Niederlande, 2004.
87. Sternberg, K., C. Selent, E. Grunow, T. Langer, B. Heublein, und K.P. Schmitz, *LDD Stents: Polymer Coating as Local Drug Depot*. Proceedings of the 18th European Conference on Biomaterials, Stuttgart, Germany, 2003: P111.
88. Sternberg, K., T. Langer, N. Grabow, S. Kramer, G. Hennighausen, und K.P. Schmitz, *LDD-Stents durch bioresorbierbare Polymer-Beschichtung*. Biomaterialien (München), 2002. 3(3/4): 195.
89. Grunow, E., K. Sternberg, B. Hummel, G. Mernitz, B. Cuypers, und D. Behrend, *Verbindung neuer antibiotischer Wirkstoffe aus marinen Mikroorganismen mit Biopolymeren - antibiotisch wirksame Implantatmaterialien*. Biomaterialien (München), 2002. 3(3/4): 159.
90. Rybka, M., D. Burmeister, K. Sternberg, H. Seiter, D. Behrend, und K.P. Schmitz, *Rasterelektronenmikroskopische Oberflächenanalyse eines langzeitimplantierten Ureterstents*. Eur J Cell Biol, 1999. 78: 35.

Offenlegungsschriften und Patente

91. Sternberg, K., K.P. Schmitz, D. Behrend, G. Hennighausen, C. Martini, und C. Harder, *Stent mit einer genesteinhaltigen Beschichtung oder Kavitätenfüllung*. PCT-Anmeldung 07013429.1-1219, 2007.
92. Schmitz, K.P., D. Behrend, K. Sternberg, N. Grabow, D.P. Martin, und S.F. Williams, *Polymeric, Degradable Drug-Eluting Stents and Coatings*. WO 002007092418 A2, 2007.
93. Schmitz, K.P., D. Behrend, K. Sternberg, N. Grabow, D.P. Martin, und S.F. Williams, *Polymeric, Degradable Drug-Eluting Stents and Coatings*. US 020070185561 A1, 2007.
94. Pau, H.W., D. Behrend, W. Schmidt, K. Sternberg, und K.P. Schmitz, *Cochlea electrode*. WO 002007090655 A1, 2007.
95. Behrend, D., K.P. Schmitz, K. Sternberg, K. Schmohl, S. Kramer, und B. Nies, *Neue Klebstoffe für Medizinische Anwendungen*. WO 002007090373 A2, 2007.
96. Heublein, B., K. Sternberg, und M. Tittelbach, *Method for producing an implantable stent with a polymeric coating of high-molecular poly-L-lactide*. EP 000001389471 B1, 2006.

97. Heublein, B., K. Sternberg, und M. Tittelbach, *Verfahren zur Herstellung eines Implantationsfähigen Stents mit einer polymeren Beschichtung aus hochmolekularem Poly-L-Lactid*. AT 000000336272 E, 2006.
98. Rohde, R., K. Sternberg, und T. Diener, *Endovascular implant with an active coating*. US 020040073297 A1, 2004.
99. Rohde, R., K. Sternberg, und T. Diener, *Endovascular implant having an active coating*. EP 000001389472 A3, 2004.
100. Rohde, R., K. Sternberg, und T. Diener, *Endovaskuläres Implantat mit aktiver Beschichtung*. DE 000010237571 A1, 2004.
101. Heublein, B., K. Sternberg, und M. Tittelbach, *Stent with polymeric coating*. US 020040034409 A1, 2004.
102. Heublein, B., K. Sternberg, und M. Tittelbach, *Stent mit polymerer Beschichtung*. DE 000010237572 A1, 2004.
103. Behrend, D., T. Freier, K. Peseke, K.P. Schmitz, und K. Sternberg, *Polyurethane für die Herstellung von Weichschaum*. DE 000019928927 B4, 2000.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,
diese Arbeit selbstständig angefertigt,
die verwendeten Ergebnisse und Daten anderer vollständig angegeben und korrekt zitiert
sowie die weitere Mitwirkung Dritter offen gelegt zu haben.

Rostock, 08.01.2008

Dr. rer. nat. Katrin Sternberg

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen und allen Personen danken, die die Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Klaus-Peter Schmitz für seine ständige Förderung und Unterstützung durch wertvolle Anregungen und Diskussionen, die mich darin bestärkt haben, diese Forschungsarbeit durchzuführen.

Allen meinen Kollegen im Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock, die mich während meiner Forschungsarbeiten begleitet haben, sei an dieser Stelle für die kollegiale Zusammenarbeit und das Engagement bei der gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeit gedankt. Für ihre hohe Einsatzbereitschaft bei zeitaufwändigen präparativen Laborarbeiten bedanke ich mich außerdem bei den studentischen Mitarbeitern Frau Anne Roock und Herrn Sven Lange.

Herrn Professor Dr.-med. habil. Gerhard Hennighausen danke ich herzlich für die stets wertvollen Hinweise und die Sensibilisierung für die pharmakologischen und klinischen Aspekte.

Herrn Professor Dr.-med. habil. Christoph Nienaber gilt mein Dank für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Bearbeitung der klinischen Fragestellungen.

Zum Gelingen der Arbeit haben außerdem Herr Dr.-med. habil. Carsten Büniger und Herr Dr.-med. habil. Michael Petzsch entscheidend beigetragen, die durch ihr operatives Geschick und ihr Engagement die tierexperimentellen Studien zum Erfolg führten.

Die Arbeit haben darüber hinaus die Kollegen der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Heyo K. Kroemer, Herr Professor Dr. rer. nat. habil. Werner Weitschies, Herr Dr. rer. nat. Matthias Gratz und Frau Dipl.-Pharm. Anne Neubert, innerhalb der Forschungskoooperation der Nachwuchsgruppe „StentTechnologien für die vaskuläre Regeneration“ durch ihre konstruktive und professionelle Zusammenarbeit bei pharmakologischen und pharmazeutischen Fragestellungen entscheidend unterstützt. Dafür gilt auch ihnen mein herzlicher Dank.

Dem Gastprofessor Herrn Axel Haubold gebührt mein ausdrücklicher Dank, da er mit seiner Erfahrung die publikatorische Verwertung der Ergebnisse mitgeprägt hat.

Herrn Professor Dr.-Ing. Otto Fiedler danke ich für die Unterstützung bei der modellhaften Beschreibung der Wirkstoffdiffusion aus Stentbeschichtungen.

Frau Dr. rer. nat. Kathleen Schmohl, Frau Dr. rer. nat. Claudia Nischan, Frau Dr. rer. nat. Christin Selent, Herrn Professor Dr.-Ing. habil. Detlef Behrend, Herrn Dr. rer. nat. Thomas

Langer, Herrn Dr. rer. nat. Marian Löbler, Herrn Dr.-Ing. Niels Grabow, Herrn Dr.-Ing. Wolfram Schmidt, Herrn Dr. rer. nat. Thomas Freier, Herrn Dr. rer. nat. Sven Kramer, Herrn Dr. rer. nat. Gerd Zinner, Frau Vet.-Ing. Martina Schröder, Herrn Dipl.-Biochem. Michael Teske, Herrn Dipl.-Ing. Peter Littwin, Frau Andrea Rohde, Frau Babette Hummel und Frau Martina Nerger sei für die hervorragende Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den zahlreichen interdisziplinären Fragestellungen gedankt.

Den Mitarbeitern des Instituts für ImplantatTechnologie und Biomaterialien e. V. gilt mein Dank für das kollegiale Arbeitsumfeld und die Diskussionsbereitschaft zu verschiedensten Fragestellungen in der Stenttechnologie.

Unterstützt wurde die Forschungsarbeit zudem von der Biotronik GmbH & Co. KG durch die freundliche Bereitstellung von Stentmustern. Herrn Dr. rer. nat. Claus Harder möchte ich in diesem Zusammenhang meinen besonders herzlichen Dank aussprechen, der mich während meiner gesamten Forschungsarbeit durch seine wertvollen Ratschläge sehr vorangetrieben hat.

Die für die Untersuchungen verwendete Poly(4-hydroxybuttersäure) wurde von der Firma Tepha, Inc., Cambridge, MA, USA, bereitgestellt. Ich danke dafür und für die interessante Forschungsk Kooperation Herrn Simon Williams, PhD und Herrn David Martin, PhD.

Mein an dieser Stelle letzter und herzlichster Dank gilt meiner Familie. Ohne die große Unterstützung meines Mannes Wieland Sternberg und meines Sohnes Malte Sternberg wäre meine intensive Forschungstätigkeit nicht möglich. Meinen Eltern Gisela und Rainer Kömmel danke ich für die Unterstützung jeglicher Art und ihr Vertrauen, das sie immer in mich gesetzt haben.