

**Untersuchung von
Oberflächenbeschichtungen
bei Gefäßstützen
zur Reduktion der Restenoserate**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Ralf Max Beck

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2001

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weber

Nichts bewahrt uns so gründlich vor Illusionen
wie ein Blick in den Spiegel.

A. Huxley

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis März 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter in der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Voelter danke ich herzlich für die Themenstellung, sein Interesse an dieser Arbeit, sowie seine vielen Anregungen und stets motivierende Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. C. Klein danke ich herzlich für die Hilfe bei den Zellkulturuntersuchungen. Herrn Dr. A. Kalachev danke ich für die Unterstützung bei den Plasmabeschichtungen. Einen ganz besonderen Dank gilt Herrn Dr. F. Herbst für seine stetige Unterstützung meiner Person in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	III
1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	4
2.1 Thrombose	5
2.2 Restenose	6
2.3 Bisherige Verbesserungsansätze	7
2.3.1 Heparinbeschichtete Stents	8
2.3.2 Radioaktive Stents	9
2.4 Biokompatibilität	11
2.4.1 Wechselwirkungen von Gewebe und Implantaten	13
2.5 Korrosion von Metallen	18
2.5.1 Elektrochemische Korrosion	18
2.5.2 Elektrochemische Korrosionsuntersuchungen	22
2.6 Verwendete Implantatwerkstoffe	26
2.6.1 Metalle	26
2.6.2 Polymere	28
2.6.3 Verbundwerkstoffe	32
2.6.4 Diamond-Like-Carbon-Coating	32
2.7 Parallelentwicklungen	34
2.7.1 Beschichtung mit Siliziumcarbid	34
2.7.2 Beschichtung mit Phosphorylcholin	35
2.7.3 Klinische Ergebnisse mit Brachytherapie	36
3 ERGEBNISSE	38
3.1 <i>In vitro</i> -Untersuchung der Thrombozytenaktivierung an DLC-Oberflächen	38
3.2 Proteinadsorption	41
3.2.1 Adsorptionsrate mit der Biosensortechnik	41
3.2.2 Adsorptionsrate mit radioaktiv markierten Proteinen	45
3.3 Thrombozytenadhäsion an Edelstahl-, DLC- und Heparin-beschichteten Stents	48
3.4 Elektrochemische Korrosionsuntersuchungen	49
3.5 <i>In vivo</i> -Korrosionsverhalten	52
3.6 Zellkulturuntersuchungen	53
3.6.1 Humane Endothelzellen	54
3.6.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten	56
3.7 Heparinbeschichtung von Stents	57
3.7.1 Herstellung von Polyethylenimin-TRIMID	59
3.7.2 Untersuchung über das ionische Bindungsvermögen an DLC-Oberflächen	60
3.7.3 Aktivitätsbestimmung von Heparin	62
3.7.4 Untersuchung zur ionischen oder kovalenten Heparinbindung auf Stentoberflächen	63

3.8	Gekapselte Radioaktivität	67
3.8.1	Kalibrierung der Meßgeräte für radioaktive Stents	72
3.9	Klinische Ergebnisse mit DLC-beschichteten Stents	75
4	EXPERIMENTELLER TEIL	80
4.1	Verwendete Materialien und Chemikalien	80
4.1.1	Pufferlösungen	81
4.1.2	Einheiten der Radioaktivität	82
4.2	Beschreibung der verwendeten Methoden	82
4.2.1	Edelstahl Vorbehandlung	82
4.2.2	Beschichtung mit Diamond-Like-Carbon	84
4.2.3	Biosensorexperimente	85
4.2.4	Adsorptionsbestimmung auf Oberflächen mit radioaktiv markierten Proteinen	89
4.2.5	Thrombozytenadhäsion an Oberflächen	90
4.2.6	Elektrochemische Korrosionsuntersuchungen	91
4.2.7	Bestimmung der Stentkorrosion <i>in vivo</i>	93
4.2.8	Zellkulturuntersuchungen	94
4.2.9	Darstellung von Polyethylenimin-TRIMID	97
4.2.10	Kopplung von Heparin an DLC-Oberflächen	98
4.2.11	Bestimmung der Heparinaktivität durch chromogene Substrate	98
4.2.12	Bestimmung der Heparinaktivität mit Auramin O	101
4.2.13	Beschichtung von Edelstahloberflächen mit ³² Phosphor	103
4.2.14	Kalibrierung der Meßgeräte zur Bestimmung der Stentaktivität	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	ANHANG	105
7	LITERATUR	111

Verwendete Abkürzungen

AAS	Atom-Absorptionsspektroskopie
ADP	Adenosindiphosphat
Bq	Bequerel
KAB	Koronararterien Bypass
Ci	Curie
cpm	"counts per minute", Zählrate pro Minute
cps	"counts per second", Zählrate pro Sekunde
CA	lat. Arteria circumflexia
Da	Dalton
DKD	Deutscher kalibrier Dienst
DLC	"Diamond-Like-Carbon", amorphe Kohlenstoffmodifikation mit diamantähnlichen Eigenschaften
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	"Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1"
GD-Stent	Ein radioaktiver Stent mit geringer <u>D</u> osis.
GV	Gefäßverschuß
HBBS	"Hank's Balanced Buffer Solution"
HD-PA	Hochdosis-Post-Applikations-Technik (engl. After-Loading), bei dieser Technik werden radioaktive Präparate mit hoher Aktivität mittels eines Katheters an die gewünschte Stelle gebracht. Sie setzen die gewünschte Strahlendosis innerhalb von 1-2 Minuten frei.
HIT	Heparin-induzierte Thrombocytopenie
HM-Heparin	Hochmolekulares Heparin
HUVEC	"Human Umbilical Endothelial Cell"
ICAM-1	"Intercellular Adhesion Molecule-1"
IE	Internationale Einheit
MACE	"Major Adverse Cardiac Events", Summe von allen auftretenden klinisch relevanten Symptomen, Summe aus: MI + KAB + PTCA
MI	Myokardinfarkt
MID	Minimaler Innendurchmesser

PAF	plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphat-gepufferte isotonische Kochsalzlösung
PEI	Polyethylenimin
PF ₃	Plättchenfaktor 3
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PTCA	"Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty"
QDM	Quarz-Dickemonitor
RT	Raumtemperatur
q-MI	Q-Wellen Myokardinfarkt
SCE	"Saturated Calomel Electrode", gesättigte Kalomelektrode, Referenzelektrode gegen die alle Potentiale in dieser Arbeit angegeben wurden.
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIMID	3-(Trifluormethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirin
TS	Thrombospondin
TX	Thromboxan
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
316L	spezielle Edelstahllegierung die in der Medizin verwendet wird

1 Einleitung

Die Herz-Kreislaufkrankungen stehen in vielen Ländern an erster Stelle der Todesursachenstatistik, wobei Männer bis zu zweimal häufiger betroffen sind als Frauen. In der Herz-Kreislaufkrankungen stellen koronare Herzkrankheiten und Myokardinfarkt die häufigste Todesursache dar. Daneben sind sie aber auch Hauptursache für Morbidität und Verlust der Arbeitsfähigkeit.

Die Entstehung von Gefäßeinengungen durch arteriosklerotische Plaques ist ein komplizierter Prozeß, in dessen Folge es zu Ablagerung von Lipiden und Kalk, sowie zu einer vermehrten Bildung von glatten Muskelzellen und Bindegewebe in der Gefäßwand kommt. Es sind zahlreiche Risikofaktoren für die Koronarsklerose bekannt, von denen die klassischen Risikofaktoren die größte klinische Bedeutung haben: Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und das sogenannte metabolische Syndrom [1]. Durch die Gefäßeinengung oder den Gefäßverschluß bei den Herzkranzgefäßen kommt es zu einer ungenügenden Blut- und Sauerstoffversorgung des Herzmuskels. Die Folge sind Angina Pectoris, Herzinsuffizienz und akuter Myokardinfarkt.

Die Möglichkeiten einer Therapie beinhaltet das Ausschalten der Risikofaktoren, die Prophylaxe einer Koronarthrombose, die medikamentöse Verbesserung und /oder Wiederherstellung des koronaren Blutflusses und die medikamentöse Behandlung der Herzinsuffizienz. Der wichtigste Teil der Therapie stellt aber eine Verbesserung der Durchblutung und somit der Sauerstoffversorgung des Herzens durch Revaskularisation dar. Dies kann durch eine Bypass-Operation oder durch nichtchirurgische Revaskularisationsmaßnahmen wie die

- Rotablator-Atherektomie,
- Laser-Angioplastie,
- perkutane transluminale Koronarangioplastie (englisch: PTCA) und
- Stent-Implantation

erfolgen. Bei der Rotablator-Atherektomie wird mittels eines an einem Katheter befindlichen rotierenden Fräßkopfes, das die Arterie verengende Material entfernt. Bei der Laser-Angioplastie geschieht dies in gleicher Weise durch einen Laserstrahl. Die PTCA stellte lange Zeit die Standardmethode zur Behandlung von Gefäßverschlüssen dar. Bei ihr wird unter Röntgenkontrolle ein Führungskatheter

in das Ostium der linken oder rechten Koronararterie eingebracht und zunächst die Stenose mit Kontrastmittel im Röntgenbild dargestellt. Durch den Katheter wird dann ein Führungsdraht durch die Stenose des betreffenden Gefäßes geschoben und mit dessen Hilfe der Ballonkatheter plaziert. Durch Aufblasen des Ballons mit einem Druck bis zu 14 bar wird die Plaque komprimiert und teilweise auch eine Zunahme des Außendurchmessers der Arterie bewirkt. Das Komprimieren der Plaque kann mehrfach wiederholt werden, bis sich der gewünschte Erfolg eingestellt hat. Es ergeben sich bei dem beschriebenen Verfahren hauptsächlich zwei Probleme:

1. Der akute Gefäßverschluß in ca. 2-11 % der Fälle, der im wesentlichen durch große, nicht kontrollierbare Dissektionen und elastische Rückstellkräfte hervorgerufen wird [2].
2. Die hohe Restenoserate bis zu 45 %, d.h. eine erneute Verengung des Gefäßes nach 6 Monaten auf weniger als 50 % des Ausgangsinnendurchmessers. Dies wird möglicherweise durch die bei der PTCA entstandene Gefäßwandverletzung und der daraus entstehenden Intima-Hyperplasie durch Proliferation der glatten Muskelzellen verursacht [3].

In zunehmenden Maße wird die PTCA durch Stentimplantationen ersetzt, wodurch die beiden oben genannten Gründe für Mißerfolge zumindest teilweise verbessert werden konnten. Die Restenoseraten liegen nach 6 Monaten bei 25 - 30 % und damit unter den Raten bei der einfachen PTCA. Bei kleineren Gefäßen unter 2,5 mm Innendurchmesser steigt die Restenoserate rapide an.

Versuche, durch die Gabe von Medikamenten oder durch die lokale Applikation von Medikamenten die Zellproliferation zu verringern und damit eine weitere Reduzierung der späten Restenose zu erzielen, blieben erfolglos. Durch Hinweise, daß die Zellproliferation bei den mit Stents behandelten Arterien länger anhält als bei der PTCA, wurde ein Zusammenhang mit den Oberflächeneigenschaften des Implantats hergestellt. Auch existieren zahlreiche Hinweise über die Stimulierung durch Schwermetallionen, die durch Metallimplantate freigesetzt werden. Daher wird in neuester Zeit durch Verwendung von Verbundwerkstoffen durch Beschichten der Metallstents mit Keramiken wie Siliziumcarbid, Polymeren wie Dacron oder biologisch aktiven Substanzen wie Heparin die Verbesserung der Erfolgsrate untersucht. Auch sehen neuere Verfahren die radioaktive Markierung der Stentimplantate vor, um die Proliferation von glatten Muskelzellen und so auch die Restenoserate zu reduzieren.

Die Beschichtung von Medizinprodukten mit diamantähnlichem Kohlenstoff durch Niedertemperatur-Plasmatechniken gewinnt immer mehr an Bedeutung, seit dem Arbeiten über die gute biologische Kompatibilität einiger DLC-Beschichtungen veröffentlicht wurden.

In der vorliegenden Arbeit sollten Edelstahlstents für die Verwendung in Koronararterien mit einer Diamond-Like-Carbon-Oberfläche beschichtet und untersucht werden. Dabei sollte ein Niedertemperatur-Plasmaverfahren zur Anwendung kommen. Die Eigenschaften dieser Oberflächenbeschichtung, insbesondere ihre Eignung für den Einsatz bei kardiovaskulären Implantaten muß dabei anhand geeigneter Untersuchungsverfahren beurteilt werden. Dabei sollte der Schwerpunkt bei möglichen Wechselwirkungen des Implantats beim Kontakt mit Blutbestandteilen und der Gefäßwand liegen. Aus diesen Ergebnissen können dann Aussagen über die Bio- und Hämokompatibilität der Oberflächenbeschichtung gemacht werden.

Insbesondere die hohe Restenoserate in kleinen Gefäßen verhindert hier bisher die Verwendung von Stentimplantaten. Mit bereits bekannten Weiterentwicklungen der Stentimplantate wie der radioaktiven Markierung oder Beschichtung mit biologisch aktiven Substanzen wie Heparin konnte nur eine geringe Verbesserung der Restenoserate erzielt werden. Daher war eine weitere Aufgabenstellung die Diamond-Like-Carbon-Beschichtung mit diesen Entwicklungsansätzen zu kombinieren. Die durch die Kombination der DLC-Beschichtung und der radioaktiven Markierung bzw. der Heparin-Beschichtung entstehenden Synergieeffekte sollten zu einer deutlicheren Reduktion der Restenoserate führen. Da die Beschichtung von Metallimplantaten mit radiokativen Substanzen nur durch technisch aufwendige und unökonomische Verfahren möglich ist, sollte in dieser Arbeit eine einfache und wirtschaftliche Methode hierzu entwickelt werden.

2 Kenntnisstand

Der erste Versuch, mittels spezieller Implantate verengte Blutgefäße von Tieren zu erweitern, wurde 1912 von Alexis Carrel beschrieben [4]. Diese waren nicht besonders erfolgreich und Carrel prophezeite schon damals, daß eine strukturelle Verbesserung und die des Implantatmaterials eine erfolgreiche Anwendung ermöglichen wird. Dieses Konzept wurde erst wieder 52 Jahre später von Charles Dotter aufgegriffen [5]. Er implantierte ein Metallrohr mit ansteigendem Durchmesser durch Einschieben an die entsprechende Stelle des peripheren Gefäßes. Er konnte zwar einen besseren Durchfluß des Blutes erreichen, die Langzeitergebnisse waren aber enttäuschend. Spätere Versuche mit Kunststoffrohren, um damit der notwendigen Elastizität Rechnung zu tragen, waren ebenso wenig erfolgreich [6]. Erst die Verwendung von Drahtgebilden aus Edelstahl oder Nickel-Tantal-Legierungen zeigten bessere Verträglichkeit und geringere Thrombosebildung in den Gefäßen [7].

Das Problem der Platzierung der Gefäßstütze wurde durch Cragg [8] mittels eines Nitinol-Stents gelöst, den er mit Hilfe eines durch einen auf 10° C gekühlten Katheter an die gewünschte Stelle brachte. Nach Abstellen der Kühlung, expandierte der Stent durch den Memory-Effekt des Nitinol-Materials auf den gewünschten Durchmesser. Probleme bereiteten hier insbesondere die hohe akute Thromboserate von 10 % und die Wanderung des Stents in etwa 5 % aller Fälle. Eine weitere Möglichkeit stellt das Expandieren eines Stents mittels eines Ballonkatheters dar. Diese Methode wurde erstmals von Palmaz et. al. veröffentlicht [9]. In der Abbildung 1 sind Stents aus 316L Edelstahl, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden abgebildet. Die Expansion erfolgt durch Aufweitung der Elementarzellen des Stents.

Erste Indikationen für eine Stentlegung in koronaren und peripheren Arterien stellten in den ersten Jahren hauptsächlich der akute Verschuß nach einer Angioplastie, Restenose nach einer Angioplastie und bei Problemen mit arteriellen Bypässen dar. Heute ist die Anwendung eines Stents auf eine Vielzahl von weiteren Indikationen erweitert worden. Gängig ist die Verwendung eines Stents bei Verschlüssen an Koronararterien, der Aorta, Halsschlagadern, Iliac-(Leisten)-, Femoral-(Oberschenkel)- und Renal-(Nieren-) Arterien sowie von Gallengängen, Bronchien, Luftröhren und Speiseröhren.

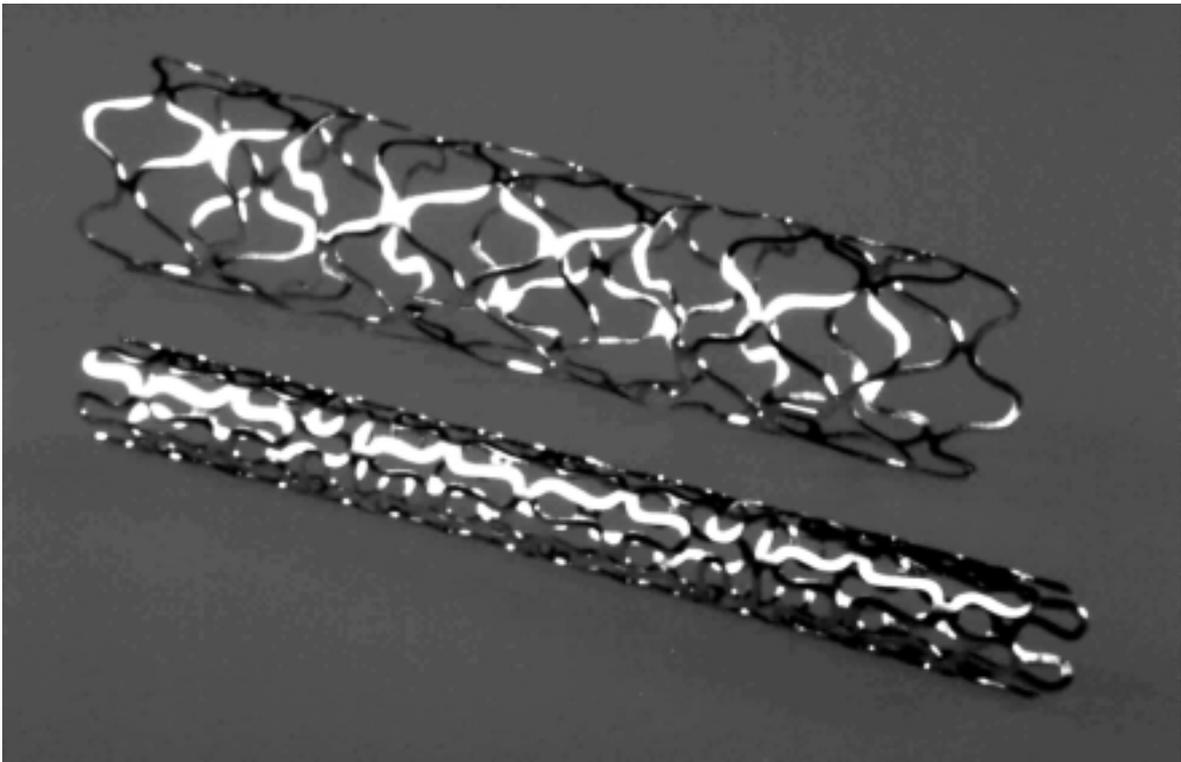


Abbildung 1. Fotografische Abbildung eines 16 mm Stents vor und nach Expansion.

Bisherige klinische Erfahrungen mit Stents zeigen hauptsächlich folgende unerwünschte Komplikationen auf:

- Thrombosebildung und
- Restenose nach spätestens 6 Monaten.

2.1 Thrombose

In den ersten klinischen Studien traten in 30-40 % aller Fälle eine subakute Thrombose auf. Diese tritt in aller Regel zwischen dem 2. und 11. Tag nach der Stentimplantation auf. Erst durch die Gabe von blutgerinnungshemmenden Substanzen wie Heparin , Acetylsalicylsäure und Dipyridamol konnte diese unter Inkaufnahme eines erhöhten Blutungsrisikos auf 5 % reduziert werden. Auslöser für diesen Prozeß scheinen neben der durch die Prozedur verursachten Verletzungen auch das Stentmaterial zu sein (siehe 2.4.1.1).

Unabhängig davon sei darauf hingewiesen, daß auch die strömungsdynamische Beschaffenheit des Stents eine nicht zu vernachlässigende Größe spielt. Durch die hohen Scherkräfte in den Arterien und Wirbelbildungen hinter den Kanten eines Stents können Thrombozyten zur Aggregation gebracht werden, die dabei

Inhaltsstoffe freisetzen, welche die Blutgerinnung und die Thrombenbildung erheblich stimulieren.

2.2 Restenose

Der Begriff Restenose kann je nach Kontext unterschiedlich definiert werden. Einmal wird es als Beschreibung des verstärkten Wundheilungsprozesses der mittels PTCA oder Stentlegung behandelten Stelle verwendet. Andererseits aber als Wiederauftreten der klinischen Symptome eines Gefäßverschlusses nach einer Behandlung. In der Literatur ist es unstrittig, daß sämtliche Patienten eine mehr oder weniger starke Restenose erleiden. Bei der Mehrheit der Patienten bleibt diese ohne klinische Relevanz. Daher ist man zu der Definition übergegangen, daß eine Restenose vorliegt, wenn mehr als 50 % des ursprünglichen Gefäßdurchmessers durch ein erneutes Zuwachsen verloren geht.

Nach dieser Definition hat man je nach Stentdesign und Art des untersuchten Gefäßes mit einer Restenoserate von 30-40 % zu rechnen [10].

Erhöhte Risikofaktoren für eine Restenose sind [11]:

- Gefäßdurchmesser mit weniger als 3 mm,
- überlappende Stents zur Behandlung längerer Verschlüsse,
- Geschichte der Arteriosklerose wie z.B. Diabetes und
- unvollständige Stent-Expansion.

Um den Mechanismus einer Restenose zu verstehen, muß man sich über den Mechanismus, wie der Durchmesser einer Arterie durch eine PTCA bzw. durch den Stent wieder vergrößert wird, im klaren sein. Dies geschieht durch die Expansion des Ballons bzw. des Stents am Verschuß, wobei die Plaque an der Gefäßwand verbleibt. Dabei wird logischerweise der Außendurchmesser über das natürliche Maß gedehnt. Dies führt zu Rissen und Spalten in der Plaque und Gefäßwand und damit zu einer traumatischen Reizung der Arterie.

Die Komponenten, die zu einer Restenose führen, werden mittlerweile in drei Gruppen eingeteilt [12].

1. Elastischer Rückgang des Gefäßes unmittelbar nach der Behandlung in die ursprüngliche Lage. Dies wird durch den Stent weitgehendst vermieden.
2. Proliferation von Zellen innerhalb des Stents nach mehreren Tagen. Dieser Prozeß hält bis zu Monaten an.

3. Anormale Wundkontraktion außerhalb des Stents.

Für den für die Restenose und durch den Stent beeinflussbaren zweiten Grund gibt es zahlreiche Ursachen. Die Verletzung der Gefäßwand führt zu einer komplexen Antwort mit dem Ziel einer Heilung der Gefäßwand und Wiederherstellung einer intakten Endothelschicht. Diese Antwort beinhaltet die Anlagerung von Thrombozyten und Fibrin, die Wanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen und Neointimazellen, sowie Entzündungsprozesse und Bindegewebsvermehrung. Für die nähere Betrachtung sei auf die Literatur und auf die weiteren Kapitel verwiesen [13]. Insbesondere die ständige Präsenz des metallischen Fremdkörpers scheint einen chronischen Entzündungsprozess in Gang zu halten, dessen Auswirkung auf die Hyperplasie der Neointima noch nicht gänzlich erforscht ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen chronischem Entzündungsprozess und letztendlich der Restenose wird durch diese Ergebnisse aber immer wahrscheinlicher [14].

Bisherige Ansätze, die Restenose mittels Gabe von Medikamenten zu beeinflussen, blieben erfolglos [15]. Daher wurden bereits unterschiedliche Ansätze zur Verbesserung von Stentmaterialien bzw. der Stentoberfläche gemacht. Ausgangspunkt dabei ist die Idee, daß das Stentmaterial einen gewünschten lokalen Effekt besitzt oder Nachteile des metallischen Materials vermieden werden sollen.

2.3 Bisherige Verbesserungsansätze

Die Tatsache, daß die Zellproliferation in mit Stents behandelten Arterien länger anhält als bei der einfachen Ballonangioplastie, läßt auf einen Zusammenhang mit dem Stentmaterial schließen, obwohl es auch gegenteilige Untersuchungen gibt [16].

Um das in seiner Ursache nicht vollständig geklärte Problem der Restenose anzugehen, wurden unterschiedliche Wege beschritten. Hierbei wurden biologisch aktive Substanzen wie Heparin (siehe 2.3.1), Peptide und sogar genetisch veränderte Zellen auf die Oberfläche aufgebracht. Andererseits versuchte man durch Beschichten des metallischen Stents mittels Polymeren eine Verbesserung zu erzielen (siehe Kapitel 2.6.2), die aber an den Eigenschaften bisher verfügbarer Polymere scheiterten. Weitere Ansätze waren die lokale Gabe von Medikamenten in der Literatur als sogenanntes *Local Drug Delivery* bekannt, die radioaktive

Markierung des Stents (siehe 2.3.2) und neuerdings die Beschichtung mit Siliciumcarbid (siehe 2.7.1) und Phosphorylcholin (siehe 2.7.2). Da die Behandlung aller Ansätze zur Verbesserung des Restenoseverhaltens und der Thrombogenität im Rahmen dieser Arbeit zu umfangreich werden würde, wurde versucht, einen kurzen Überblick über die wichtigsten Entwicklungen zu geben. Für alle anderen hier nicht behandelten Themen sei auf die sehr umfangreiche Literatur verwiesen.

2.3.1 Heparinbeschichtete Stents

Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin ist bereits seit über 50 Jahren bekannt. Die primäre Wirkung besteht in der Beschleunigung der Reaktion um den Faktor 1000 zwischen Antithrombin III und Thrombin. Die Pentasaccharidsequenz des Heparins (siehe Abbildung 2) ist eine spezifische Bindungsstelle für das Antithrombinmolekül. Zusätzlich besitzt Heparin die Eigenschaft, Faktor Xa und weitere Faktoren der Gerinnungskaskade durch Komplexbildung zu inaktivieren (siehe Abbildung 5) [17].

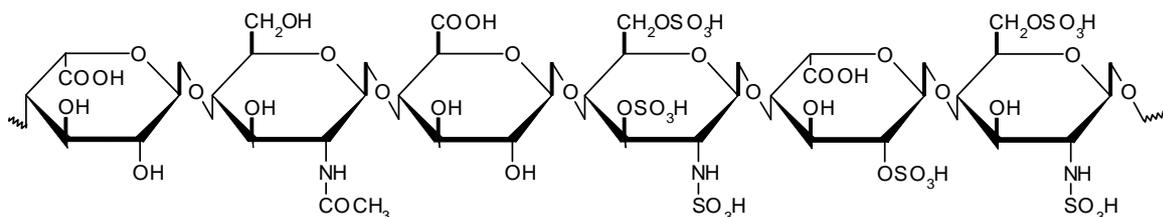


Abbildung 2. Heparinstruktur des mit Antithrombin III reagierenden Zentrums.

Des weiteren besitzt Heparin die Eigenschaft die Proliferation von glatten Muskelzellen zu unterdrücken [18], diese sind, wie in Abschnitt 2.2 erwähnt, der Hauptbestandteil des stenotischen Gewebes.

Erste Versuche zur Bindung von Heparin an Oberflächen wurden durch ionische Bindung an quartäre Ammoniumverbindungen, beispielsweise Benzalkoniumchlorid, erzielt. Nachteilig hierbei war, daß ionisch gebundenes Heparin bei Blutkontakt innerhalb von Stunden ausgewaschen wird [19].

Bei der kovalenten Bindung von Heparin, beispielsweise an Polyvinylalkohol mit Glutaraldehyd und anderen Methoden, wird die aktive Bindungsstelle des Heparins bei der Kopplung einbezogen, was zu einer drastischen Reduktion der Aktivität führt [20]. Eine Verbesserung wurde von Larm et.al. [21] entwickelt. Durch Spaltung der Heparinkette mit Nitrosyl-Kationen erhielt er endständige

Carbonylfunktionen. Diese koppelte er durch reduktive Aminierung an eine aminofunktionalisierte Polymeroberfläche (siehe Abbildung 3).

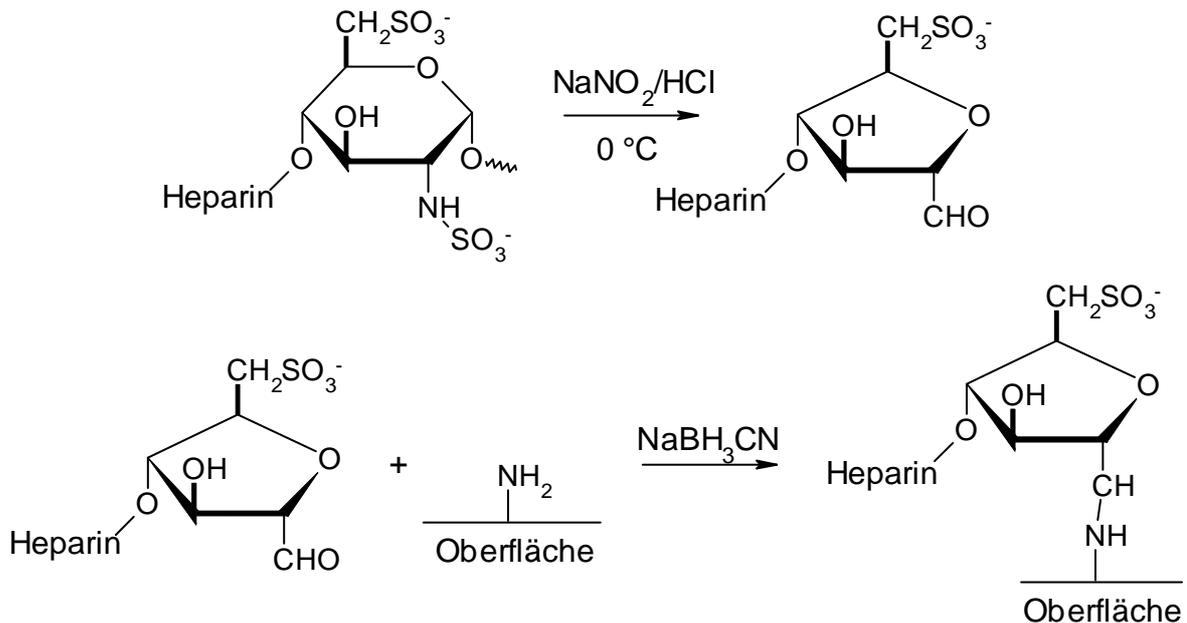


Abbildung 3. Endgruppen-Kopplung von Heparin an aminofunktionalisierte Polymeroberflächen. Durch die Einwirkung von Nitrosylkationen, welche aus Natriumnitrit und Salzsäure bei 0 °C gebildet werden, kommt es zur Spaltung der Heparinkette unter Bildung einer endständigen Carbonylfunktion. Diese wird durch reduktive Aminierung an die aminofunktionalisierte Oberfläche mit Natriumcyanoborhydrid gebunden.

Vorteil bei diesem Verfahren ist, daß durch die Kopplung des Heparins an dessen Kettenende die Bindungsstelle des Antithrombinmoleküls beim Heparin nicht blockiert wird. Dadurch ist die Aktivität im Vergleich mit dem ionisch gebundenem Heparin nicht reduziert.

In vitro-Versuche mit Heparin-beschichteten Stents zeigten eine um 96 % geringere Thrombozytenadhäsion als Edelstahlstents [22]. In der Pilotstudie BENESTENT II, zeigten sich keinerlei Vorfälle einer Thrombusbildung beim heparinbeschichteten Stent [23].

2.3.2 Radioaktive Stents

Bereits 1989 wurde von Fischell [24] die These aufgestellt, die Proliferation der Neointima durch radioaktive Stents zu unterdrücken. Seitdem hat sich das Gebiet der Brachytherapie rasant entwickelt. Es wurden auf unterschiedliche Weise sowohl β - als auch γ -Strahler eingesetzt. Potentielle Isotope für Brachytherapie sind die Betastrahler ³²Phosphor, ¹⁸⁸Rhenium, ⁵⁵Kobalt und das Mutter-Tochter-Paar ⁹⁰Strontium/⁹⁰Yttrium sowie der Gammastrahler ¹⁹²Iridium (siehe Tabelle 1)

[25].Die Radioaktivität wird dabei z. B. mittels eines radioaktiven Stents an die gewünschte Stelle gebracht. Dabei werden nur geringe Aktivitäten benötigt (GD-Stent), um die gewünschte lokale Dosis frei zu setzen. Bei der sogenannten Post Applikations-Technik (engl. After-Loading) wird in gewohnter Weise die Implantation des nicht radioaktiven Stents vorgenommen und anschließend mit Hilfe eines Katheters ein radioaktives Präparat an die gewünschte Stelle gebracht.

Tabelle 1. Verwendete Isotope in der Brachytherapie. GD Stent: radioaktiver Stent mit geringer Dosis, HD-PA: Hochdosis-Post Applikation

Nuklid	Strahlertyp	Halbwertszeit	Anwendung
³² P	β	14.3 Tage	GD Stent, HD-PA
⁹⁰ Y	β	64 Stunden	HD-PA
⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y	β	28 Jahre	HD-PA
^{99m} Tc	β+γ	6 Stunden	Lokale Injektion
¹⁹² Ir	γ	74 Tage	HD-PA
¹⁸⁸ Re	β+γ	16,7 Stunden	HD-PA
¹⁸⁸ W/ ¹⁸⁸ R e	β+γ	69,4 Tage	HD-PA

Dort wird dann innerhalb weniger Minuten die gesamte notwendige Dosis freigesetzt. Hierbei werden verständlicherweise höhere Aktivitäten des radioaktiven Materials benötigt (HD-PA). Eine weitere bisher wenig untersuchte Möglichkeit besteht in der extrakorporalen Bestrahlung der Arterie.

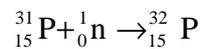
In der Literatur werden für die Brachytherapie radioaktive Dosen in einem Bereich von 5 bis 30 Gray untersucht. Hierbei werden die reinen oder überwiegenden β-Strahler bevorzugt, da diese ihre Energie innerhalb weniger Millimeter Gewebe vollständig abgeben. Im Gegensatz zu den γ-Strahlern, die auch zu einer Bestrahlung weiter entferntem Gewebe führen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Ergebnisse über *in vitro*-Versuche und einige Tierversuche bekannt. Beispielsweise konnte Hehrlein et. al. [26] im Kaninchen zeigen, daß Stents mit einer ³²P-Aktivität von 13 µCi zu einer deutlichen Reduktion der Hyperplasie der Neointima führten. Weiterhin war

bekannt, daß Endothelzellen gegen radioaktive Strahlen beständiger sind als glatte Muskelzellen [24].

Wegen der oben genannten Vorteile reiner β -Strahler sollte im Rahmen dieser Arbeit eine einfache Möglichkeit gefunden werden, radioaktive Stents herzustellen. Es wurden hierzu der reine β -Strahler ^{32}P Phosphor mit einer Energie von 1,7 MeV verwendet. Bisher waren die Methoden zur Erzeugung eines radioaktiven metallischen Stents apparativ sehr aufwendig.

Die erste Möglichkeit besteht in der Bombardierung eines Metallstents mit ^{31}P Phosphor mittels "Ion-Bombardement"-Techniken. Die Stents werden anschließend in einem Kernreaktor mit Neutronen bestrahlt, wobei sich ^{31}P Phosphor unter Aufnahme eines Neutrons in das radioaktive ^{32}P Phosphor umwandelt:



Nachteil hier ist die geringe Ausbeute an ^{32}P und die Erzeugung anderer radioaktiver Isotope. Bei der Implantation von ^{32}P Phosphor mit einem Cyclotron ist ebenfalls ein großer apparativer Aufwand nötig.

2.4 Biokompatibilität

Das Maß für die Verträglichkeit eines Fremdkörpers für das umliegende Gewebe bezeichnet man allgemein als Biokompatibilität, wobei zwischen Oberflächen- und Strukturkompatibilität unterschieden wird. Die Strukturkompatibilität beschreibt die mechanischen Eigenschaften des beobachteten Materials, welches eine möglichst gute mechanische und strukturelle Nachahmung des ersetzten oder unterstützten Gewebes anstrebt. Bei der Oberflächenkompatibilität beobachtet man mehr die chemische, physikalische, biologische und morphologische Anpassung der Oberfläche eines Implantats an die dem Körper umgebenden Verhältnisse, mit dem Ziel einer jeweils lokal angepaßten klinisch erwünschten Wechselwirkung. Der Begriff Biokompatibilität wurde unter anderem wie folgt definiert [27]:

Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Materials, einer Vorrichtung oder eines Systems, seine Aufgabe in einer spezifischen Anwendung, ohne klinisch relevante Reaktion des Organismus, zu erfüllen.

Bezüglich der Oberflächenkompatibilität werden die Materialien folgendermaßen eingeteilt:

Biotolerante Materialien werden vom umliegenden Gewebe als fremd erkannt, mit einer Bindegewebsschicht umschlossen aber nicht abgestoßen.

Bioinerte Materialien verändern weder ihre Struktur noch gehen sie beim Kontakt mit dem umliegenden Gewebe chemische Bindungen ein.

Bioaktive Materialien sind zu chemischen und biologischen Wechselwirkungen mit Knochen und Gewebe befähigt.

Werkstoffe werden dann als biologisch inkompatibel bezeichnet, wenn sie Substanzen in toxischen oder biologisch wirksamen Konzentrationen für das umliegende Gewebe freisetzen und zu Immunreaktionen wie Entzündungen, Allergien, Nekrosen oder zur Abstoßung führen. Beispiele für derartige Freisetzung von Substanzen durch das Implantat sind Korrosion, Zersetzung von Polymeren oder Herauslösen von Weichmachern und Stabilisatoren bei Polymerimplantaten. Im Idealfall sollten die physikalischen wie chemischen Eigenschaften von Implantatwerkstoffen mit dem zu ersetzenden Gewebe übereinstimmen.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Betrachtung von Materialien für die Implantation stellt die Verweildauer des Implantats im Körper dar. Unter *Ultrakurzzeitimplantaten* versteht man Implantate, die nur kurz mit dem Körper in Kontakt kommen, z.B. chirurgische Instrumente bei einer Operation. *Kurzzeitimplantate* sind Implantate, die nach einer vorhersehbaren Zeit wieder aus dem Körper entfernt werden wie z.B. Osteosyntheseplatten, die zur Schienung einer Knochenfraktur eingesetzt werden. *Dauer- oder Permanentimplantate* sollten derart konzipiert werden, daß sie für die Restlebensdauer des Patienten oder des Implantats im Körper verbleiben können. Die hier im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stents lassen sich somit eindeutig in die Klasse der Permanentimplantate einordnen. Es liegt auf der Hand, daß die Anforderungen an die Materialeigenschaften eines Permanentimplantates am größten sind. Durch die lange Verweilzeit im Körper werden Wechselwirkungen von Gewebe mit dem Implantat möglich, die durch langsame mechanische wie chemische Veränderungen des Materials im Laufe der Jahre entstehen. Abschließend muß man bei einem so komplexen Thema wie die Biokompatibilität erwähnen, daß es viele weitere ergänzende oder völlig andere Definitionen in der Literatur gibt. Einen guten Überblick hierzu gibt D.F. Williams in "Fundamental aspects in

biocompatibility" [28]. Auch ist es in der Literatur mittlerweile unstrittig, daß es keinen universellen biokompatiblen Werkstoff gibt. Es soll daher in der weiteren Ausführung dieses Themas verstärkt auf die Anforderungen eines vaskulären Implantats eingegangen werden.

2.4.1 Wechselwirkungen von Gewebe und Implantaten

Eine Reaktion findet bei Implantaten hauptsächlich an der Grenzfläche mit dem umliegenden Gewebe oder der Körperflüssigkeit statt. Es kann hier zu unterschiedlichen Reaktionen kommen, die je nach Werkstoffeigenschaften unterschiedlich ausgeprägt sind. Metalle beispielsweise neigen insbesondere beim Kontakt mit Körperflüssigkeiten zur Korrosion, worauf eingehend im Kapitel 2.5 eingegangen wird. Polymere und andere Werkstoffe sind zu mehr oder weniger starken Abbaureaktionen mit Folgeprodukten befähigt, welche einen Einfluß auf die Biokompatibilität des Werkstoffs haben können. Da Stents fast ausschließlich aus Metallen gefertigt werden, wird hier nur auf diesen Werkstoff eingegangen.

Eine Verbindung des umliegenden Gewebes mit dem Implantat kommt bei toxischen Materialeigenschaften nicht zustande, vielmehr erfolgt ein Absterben des umliegenden Gewebes bzw. es kommt zu den oben genannten Immunreaktionen. Bei inerten Werkstoffen kann es zur Ausbildung eines umschließenden Gewebes kommen. Dieses besitzt nur schwache Bindungen zum Werkstoff. Bei Vorhandensein von Poren kann diese Verankerung mechanisch durch Einwachsen des Gewebes in die Poren stabilisiert werden.

Tabelle 2. Auftretende Wechselwirkungen zwischen Implantat und Gewebe.

Implantat-eigenschaften	Gewebereaktion
toxisch	Gewebenekrose, Immunreaktion
inert	Bildung einer nicht-adhärenen Gewebekapsel um das Implantat
bioaktiv	Ausbildung einer Bindung
abbaubar	Ersatz des Implantats

Bioaktive Implantate sind je nach den verwendeten Materialien und in Abhängigkeit des umliegenden Gewebes bzw. der Gewebeflüssigkeit zu unterschiedlich starker Ausbildung einer Zwischenschicht mit einer lokalen,

klinisch gewünschten Wechselwirkung in der Lage. Bei den neuartigen bioabbaubaren Werkstoffen kommt es entweder zu einem sukzessiven Ersatz des Implantates durch körpereigenes Gewebe oder das Implantat wird nach geraumer Zeit überflüssig und abgebaut (z.B. Nahtmaterial, degradable Stents). Die Gewebe-Implantatwechselwirkungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Ein Problem stellt hier die Entwicklung von Materialien mit entsprechender Abbaupzeit dar, die mit der Gewebeneubildung im Gleichgewicht liegen muß.

2.4.1.1 Wechselwirkung auf intravaskuläre Implantate

Wechselwirkungen von Gewebe und Stentimplantaten finden zwischen Blut und dem Stent sowie der Blutgefäßwand mit der Stentoberfläche statt. Diese Wechselwirkungen sind von ihrer Art und den Folgen für die Verträglichkeit des Implantats unterschiedlich. Dennoch stehen beide in gegenseitiger Beziehung zueinander, die zu beachten ist. Die Wirkung der durch die Korrosion des Stents freigesetzten Metallionen wird eingehend im Kapitel 2.5.2.2 besprochen.

Bei der Beurteilung der Wechselwirkungen von Materialien mit Blut spricht man auch von Hämokompatibilität. Die erste Folge des Kontakts von Materialien mit Gewebe und Blut hat die mehr oder weniger starke Adsorption von Proteinen aus den Körperflüssigkeiten zur Folge. Die in unserem Falle hauptsächlich für die Adsorption in Frage kommenden Plasmabestandteile sind Albumine und Fibrinogen. Bei diesem Prozeß hat man folgende Punkte zu beachten [29]:

- die Adsorption ist auf eine Monolage beschränkt,
- die Art der Monoschicht wird von der Konzentration der Proteine und ihres Adsorptionskoeffizienten bestimmt und
- das Implantatmaterial entscheidet über das Adsorptions-/Desorptionsgleichgewicht und über die Tendenz des Proteins zur Denaturierung auf der Oberfläche.

Die Präsenz einer Monoschicht von Proteinen und deren Natur auf der Implantatoberfläche entscheidet maßgeblich über die weitere Reaktion des umliegenden Gewebes. Es ist bekannt, daß Materialien, die eine große Menge an Fibrinogen binden biokompatibel sind. Hingegen Materialien, die große Mengen an Albumin binden, als biokompatibel angesehen werden können [30]. Dies liegt insbesondere an der Tatsache, daß die Retention von Blutplättchen auf einer Oberfläche mit der Menge an absorbiertem Fibrinogen korreliert.

Über diese Proteinschicht findet die Interaktion der Oberfläche mit Körper- oder Blutzellen statt. Diese können an die Proteinschicht binden und stimuliert werden. Im Falle von Stentimplantaten findet die Interaktion mit der Oberfläche/Proteinschicht hauptsächlich durch Endothelzellen, Thrombozyten und Granulozyten statt.

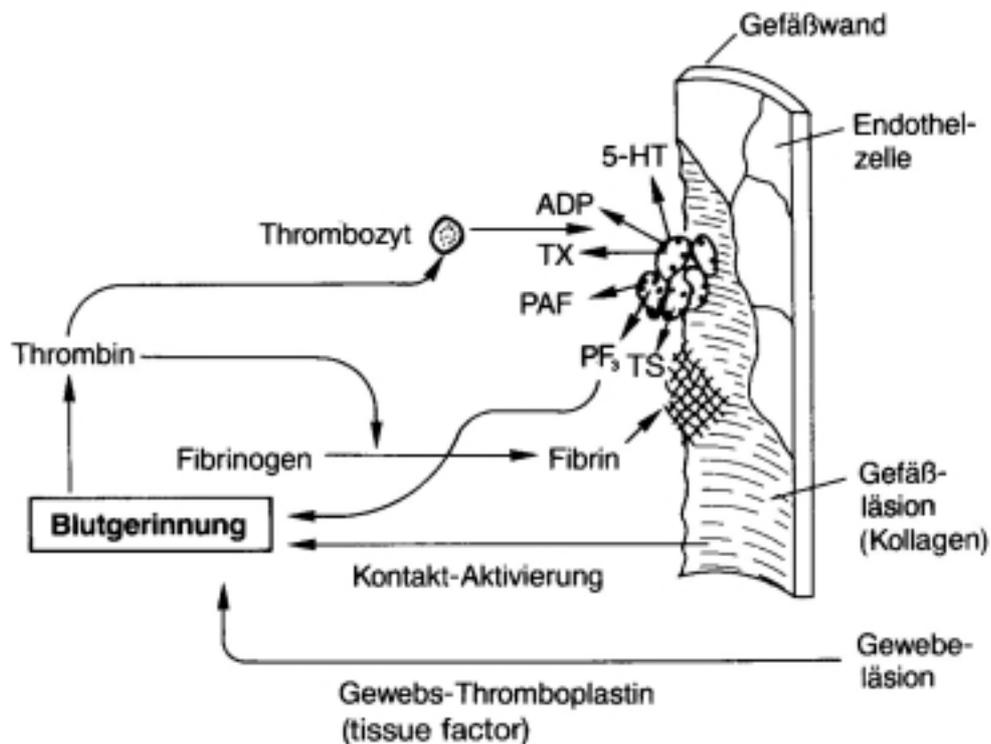


Abbildung 4. Auswirkung der Thrombozytenadhäsion an verletzte Gefäßwände [37]. Thrombozyten adhären an eine verletzte Gefäßwand, setzen Mediatoren frei die die Blutgerinnung und die weitere Adhäsion von Thrombozyten begünstigen. ADP= Adenosindiphosphat, PF₃= Plättchenfaktor 3, 5-HT= 5-Hydroxytryptamin (Serotonin), TX= Thromboxan, PAF= plättchenaktivierender Faktor, TS= Thrombospondin. Zur weiteren Erläuterung siehe vorhergehender Abschnitt.

Im Blut zirkulierende Thrombozyten adsorbieren normalerweise nicht an die Oberfläche des mit Endothelzellen ausgekleidete Endothelium [37]. Wird durch den mit dem Ballonkatheter implantierten Stent die Endothelschicht zerstört, wird die darunterliegende Kollagenschicht frei, die eine Adsorption und Aktivierung der Thrombozyten zur Folge hat (siehe Abbildung 4). Außerdem neigen Thrombozyten je nach Materialeigenschaften auch zu Adsorption an die Implantate bzw. wird diese Adsorption über die Proteinschicht auf dem Biomaterial gefördert. Die Thrombozyten werden danach aktiviert und beginnen zahlreiche Mediatoren auszuschütten. Die wichtigsten Mediatoren sind Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan (TX), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Serotonin und

Plättchenfaktor 3 (PF₃). Über PF₃ erfolgt eine Adsorption von plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Serotonin und Katecholamin fördern die Kontraktion des verletzten Blutgefäßes. Die Mediatoren ADP, PAF, TS und TX begünstigen die gleichzeitig mit der Feisetungs-Reaktion stattfindenede irreversible Aggregation der Plättchen. Eine weitere Möglichkeit zu Bildung eines Thrombus wird über die Blutgerinnungskaskade ermöglicht. Die Gerinnungsfaktoren, die in Form inaktiver Vorstufen wie Faktor XII, XI und XIa im Blut zirkulieren, werden bei Bedarf in unterschiedlicher Weise wie Gewebeerletzungen oder Oberflächenkontakt aktiviert und ineinander umgewandelt. Das entscheidende Enzym Thrombin spaltet Fibrinogen in das unlösliche Fibrin. Es ist ebenso ein potenter Partner für die Adsorption von Thrombozyten, wodurch die Wechselwirkung dieses Vorgangs und dem im vorigen Absatz beschriebenen Prozeß illustriert wird.

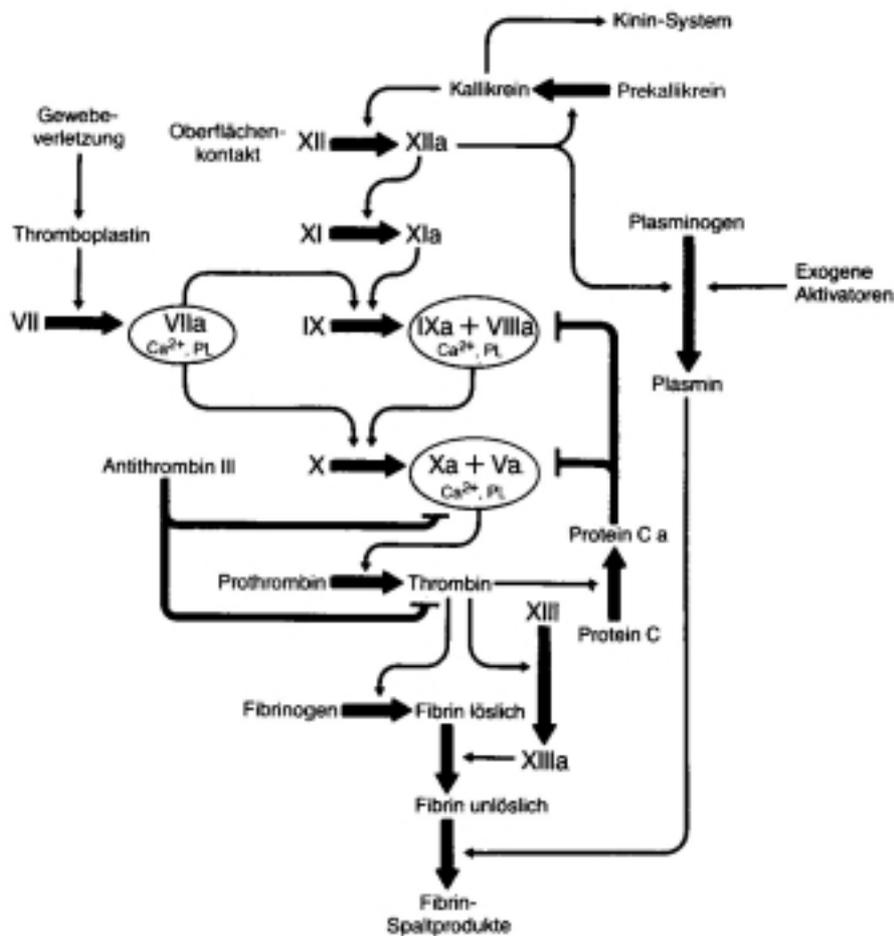


Abbildung 5. Gerinnungskaskade mit Aktivierungs- und Hemmungswegen (| = Hemmung) [37].

Die Blutgerinnung wird je nach Aktivierungsmechanismus entweder über den sogenannten endogenen oder exogenen Weg beschrieben (siehe Abbildung 5).

Beim letztgenannten Weg kann die Gerinnung durch den Kontakt mit Kollagen aktiviert werden. Der Oberflächenkontakt und die Adsorption von Faktor XII an die Oberfläche und die Reaktion zu Faktor XIIa ist ein initiiender Schritt im endogenen Aktivierungsweg, an dessen Ende die Bildung eines Blutgerinnsels durch Fibrin steht. Sowohl die Blutgerinnungskaskade, als auch die Thrombozytenadhäsion führen zu der Bildung eines Thrombus. Da beide Prozesse durch Proteinadsorption ausgelöst werden können, ist es nicht verwunderlich, daß Implantate eine Thrombosebildung auslösen können. Eine Möglichkeit, diese Folgen zu verhindern ist die schnellstmögliche Bedeckung des Endotheliums und des Implantats mit Endothelzellen, da diese Zellen in der Lage sind diese Prozesse zu verhindern.

Für das Konzept eines Idealen Stents, müssen folgende Anforderungen erfüllt sein:

- Er sollte eine möglichst geringe Proteinadsorption, insbesondere bei den an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren besitzen.
- Er sollte eine gute Grundlage für das Wachstum von Endothelzellen bieten.
- Er sollte zu einer geringen Thrombozytenadhäsion neigen.

2.4.1.2 *Unspezifische Immunabwehr*

Die unspezifische Immunabwehr des Körpers findet hauptsächlich durch Granulozyten statt. Das Maß dieser Abwehrreaktion ist somit ein Indiz für die Biokompatibilität eines Implantats.

Neutrophile Granulozyten (PMN) sind kurzlebige Abwehrzellen der myeloischen Reihe des Knochenmarks mit der Aufgabe, eingedrungene Mikroorganismen zu eliminieren. Sie sind klinisch bedeutsame Effektorzellen akuter Entzündungen und nehmen eine äußerst wichtige Stellung in der unspezifischen, zellulären Immunantwort ein.

Ungefähr 70% aller Leukozyten sind Granulozyten, wobei der Anteil der eosinophilen und basophilen so gering ist, daß er in diesem Fall vernachlässigt werden kann. Ihre mittlere Zirkulationszeit im Blut beträgt wegen der hohen Auswanderung auf die Schleimhäute nur 6 bis 8 Stunden. Etwa 50% der Granulozyten zirkulieren nicht im intravasalen Raum, sondern haften den Endothelzellen, besonders in den Gefäßen der Milz und der Lunge, an. Dieser Anteil der Zellen kann in Streß-Situationen durch Cortisol- und Mediatoren-

ausschüttung schnell mobilisiert werden, so daß die Anzahl der im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten zu Beginn von Infektionen besonders rapide ansteigt und die erste Stufe der zellulären Abwehr darstellt.

Durch ihre Fähigkeit, glykolytisch Energie zu gewinnen, sind sie in der Lage, auch in sauerstoffarmen, ödematösen und schlecht durchbluteten Geweben zu existieren. Dort können sie mittels Phagozytose Fremdkörper aufnehmen und deren Zellstrukturen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Wasserstoffsuperoxid zerstören (sogenannter "respiratory burst").

Durch die Freisetzung von Eikosanoiden sind aktivierte Granulozyten in der Lage, Gefäßweite und -permeabilität, Entzündungsreaktionen, Schmerzreiz und Blutstillung zu regulieren.

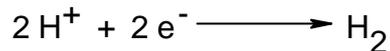
2.5 Korrosion von Metallen

Die chemische Reaktion eines Metalls mit seiner Umgebung bezeichnet man im allgemeinen als Korrosion. Diese führt zu einer Materialveränderung, insbesondere an der Oberfläche, und beeinträchtigt so die Funktion des Bauteils. In den meisten Fällen der Korrosion handelt sich um eine Reaktion elektrochemischer Natur. Seltener beobachtet man chemische Korrosion wie z.B. bei der Verzunderung, einer Hochtemperaturkorrosion eines Metalls, oder bei der Versprödung von Metallen mit Wasserstoff unter Bildung von Metallhydriden. Bei der Versprödung von Metallen durch die Bildung von Gasblasen im Metall hat die Reaktion metallphysikalischen Charakter. Im folgenden soll nur auf die elektrochemische Korrosion eingegangen werden, da sie die Reaktion bei der Korrosion von Metallimplantaten darstellt. Außerdem liefert sie die Grundlage für elektrochemische Korrosionsuntersuchungen.

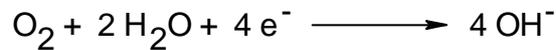
2.5.1 Elektrochemische Korrosion

Man kann die elektrochemische Korrosion eines Metalls in zwei Teilreaktionen einer Redoxreaktion zerlegen. Die kathodische Reaktion stellt den Reduktionsschritt dar und ist somit mit einer Elektronenaufnahme aus der Umgebung verbunden. Der Oxidationsschritt entspricht der anodischen Teilreaktion, die mit einer Elektronenabgabe durch das Metall an seine Umgebung gekennzeichnet ist. Der Oxidationsschritt führt je nach der Art des Metalls und dem umgebenden Medium zu unterschiedlichen Teil- und Folgereaktionen. Unter

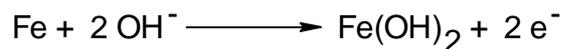
natürlichen Bedingungen kommen in wäßrigen Medien bei der Reduktion nur zwei Reaktionen vor. Zum einen, die Wasserstoffabscheidung:



und zum anderen die Reduktion von gelöstem Sauerstoff:



Eine Möglichkeit bei der Korrosion von Eisen in einer belüfteten Zelle ist folgende Reaktion:



Die nach der Oxidation gebildeten Fe^{2+} - Ionen reagieren im allgemeinen mit den an der kathodischen Teilreaktion gebildeten Hydroxidionen zu Hydroxiden, Oxihydraten bzw. Oxiden ab. Die Reaktionsprodukte sind von den Eigenschaften und der Zusammensetzung des umgebenden Mediums abhängig. Einfluß nehmen hier insbesondere der pH-Wert, die Temperatur und die Art der Ionen und deren Konzentration im umgebenden Medium.

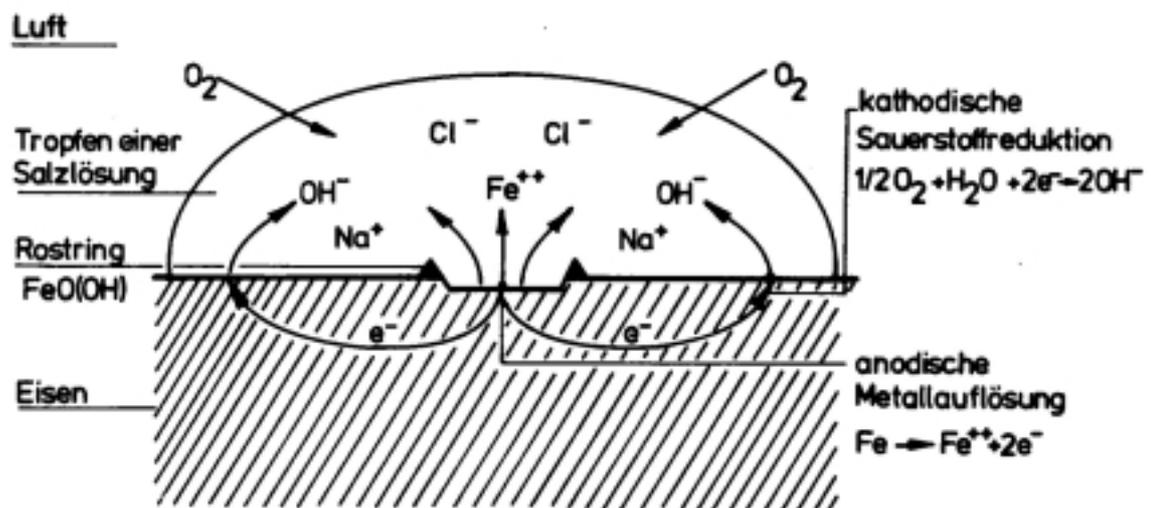


Abbildung 6. Reaktionsabläufe bei der gleichmäßigen Oberflächenkorrosion von Eisen. Die Abbildung zeigt eine gleichmäßige Oberflächenkorrosion von Eisen. Dabei werden getrennte Lokalelemente gebildet an denen die kathodische und anodische Reaktion abläuft. Der Ladungsausgleich erfolgt über einen Stromfluß innerhalb des Metalls.

Die Metalloxidation und die Sauerstoffreduktion bzw. die Abscheidung von Wasserstoff ereignen sich an der Oberfläche an örtlich nicht fixierten Punkten. Die Teilreaktionen finden somit statistisch verteilt an unterschiedlichen Orten statt. Somit existieren eine Vielzahl von anodischen und kathodischen Zentren, die

fortwährend vernichtet und an anderer Stelle wieder neu gebildet werden. Es handelt sich daher um eine gleichmäßige Korrosion, da die statistisch verteilte Korrosion zu einer homogenen Veränderung der Metalloberfläche führen (siehe Abbildung 7). Wie in der Abbildung 6 zu erkennen ist, findet bei der Korrosionsreaktion ein Stromfluß im Metall und ein Stofftransport im umliegenden Medium statt. Neben der hier geschilderten gleichmäßigen Korrosion existieren weitere Korrosionsarten, die man unter dem Begriff der lokalen Korrosion zusammenfassen kann. Bei diesen Korrosionsarten findet ein lokal begrenzter Angriff auf das Metall an bevorzugten Stellen statt. Daher sind die Auswirkungen für das Implantat bei dieser Korrosionsart viel stärker, da die Reaktion auf die bevorzugte Stelle begrenzt bleibt und eine Materialveränderung nur hier erfolgt. Elektrochemisch läßt sich die lokale Korrosion an der Bildung von Korrosionsströmen oder an getrennten anodischen und kathodischen Korrosionsprodukten erkennen. Hierbei ist der anodische Bereich stets vom kathodischen getrennt, die Anodenfläche ist meist viel kleiner als die Kathode. Auch bieten die entstehenden Korrosionsprodukte keinen Schutz vor einer weiteren Reaktion.

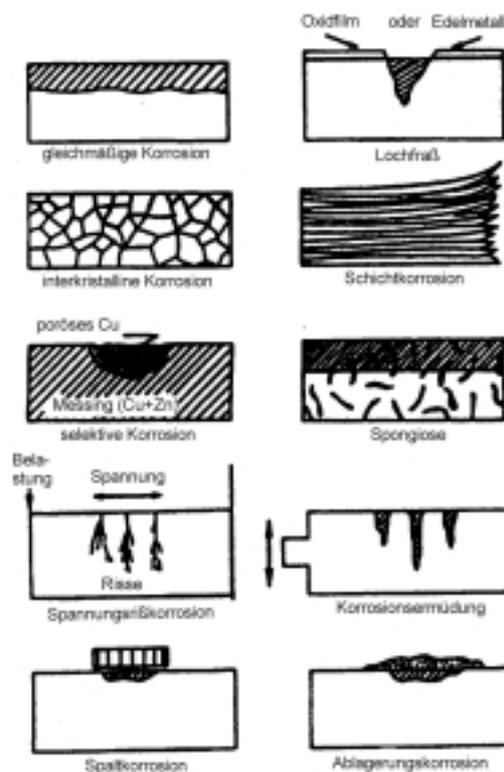


Abbildung 7. Schematische Darstellung unterschiedlicher Korrosionsarten. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Metallkorrosionen und die jeweiligen strukturellen Auswirkungen auf das Metall.

Die unterschiedlichen lokalen Korrosionen werden nach ihren Ursachen unterschieden. Korrosionen mit vorwiegend mechanischen Ursachen sind:

- Erosionskorrosion,
- Tropfenschlagkorrosion,
- Kavitationskorrosion und
- spannungs- und schwingungsinduzierte Korrosion.

Ihre strukturelle Auswirkung auf das Material sind in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Außerdem existieren noch die interkristalline Korrosion, die spezifisch an der Korngrenze auftritt. Beispielsweise läßt sie sich bei austenitischen Stählen an ausgeschiedenen Chromcarbid-Kristallen beobachten. Bei der Legierungs- bzw. Selektive- oder Kontaktkorrosion sind zwei Metalle mit unterschiedlichem elektrochemischen Potential direkt miteinander in Kontakt. Das Metall mit dem negativeren Potential wirkt dabei als Opferanode und löst sich aus dem Gefüge heraus. Die wichtigste lokale Korrosionsart bei Stentimplantaten stellt die Lochfraßkorrosion dar und wird daher noch etwas genauer betrachtet. Sie tritt bei passivierenden Metallen in Anwesenheit von aggressiven Anionen auf. Hierbei kommt es zu einem lokal begrenzten Durchbruch der Passivschicht und zur Ausbildung von Löchern und Mulden. Durch Chlorid-, Bromid- und Jodidionen werden Eisen, Kobalt, Nickel, nichtrostende Stähle, Nickellegierungen und Aluminium angegriffen. Fluoridionen greifen sogar Titan und Zirkonium an. Sulfat- und andere Ionen sind nur wenig beteiligt. Beim Auftreten einer Lochkorrosion wird eine heterogene Oberfläche mit großen Bereichen, an denen die kathodische Reaktion stattfindet, erzeugt. An den kleineren Flächen findet die anodische Reaktion statt. Es entsteht somit eine lokal begrenzte Aktiv/Passiv-Kurzschlußzelle. Für den Mechanismus der Lochinitiation gibt es drei Erklärungsansätze, die alle das Prinzip eines lokalen Angriffs der Ionen auf die Passivschicht und die Korrosion des darunterliegenden Metalls zugrunde legen [31]. Der Penetrationsmechanismus geht davon aus, daß die Ionen die Passivschicht durchdringen und mit dem Grundmaterial reagieren. Beim Adsorptionsmechanismus sollen die aggressiven Anionen an die Passivoxidschicht lokal begrenzt absorbiert werden. An diesen Stellen ist die Löslichkeit der Passivschicht erhöht, wodurch die Schicht langsam von aggressiven Ionen durchdrungen wird und die Korrosion des Metalls stattfindet. In einem weiteren

Erklärungsansatz für die Initiierung der Lochfraßkorrosion nimmt man durch die Eigenspannung der Passivoxidschicht eine Reißbildung an. Danach kann das freigelegte Metall ungehindert reagieren.

Nach der Initiierung bilden sich zuerst punkt- oder nadelstichartige Löcher (sog. "Pits"). Bei weiterem Fortschreiten der Reaktion kann es auch zu unterhöhlender Korrosion kommen. Die Zusammensetzung des Elektrolyten unterscheidet sich in den Löchern vom umgebenden Medium. Der Elektrolyt ist stärker konzentriert und durch die Hydrolyse der gebildeten Metallkationen sauer. Dadurch wird die Korrosion in den Löchern verstärkt.

2.5.2 Elektrochemische Korrosionsuntersuchungen

Korrosionsuntersuchungen von Implantaten *in vivo* sind sehr aufwendig und benötigen lange Verweilzeiten des Implantats, bevor man zu verwertbaren Ergebnissen kommt. Zur Simulation von Korrosionserscheinungen im Körper haben sich aber die in der Technik gebräuchlichen elektrochemischen Untersuchungsmethoden als geeignet erwiesen. Es wurden bereits unterschiedliche metallische Implantate in physiologischen Salzlösungen elektrochemisch untersucht [32,35]. Hingegen sind noch keine elektrochemischen Untersuchungen von mit Diamond-Like-Carbon-beschichteten Implantaten in der Literatur bekannt.

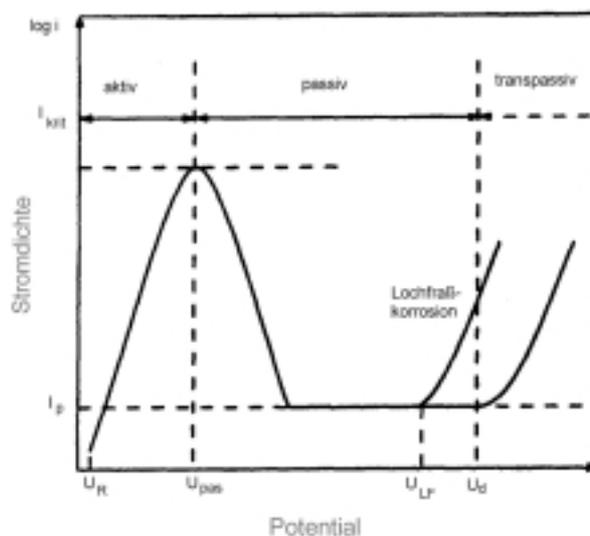


Abbildung 8. Schematische Darstellung einer Stromdichte-Potentialkurve eines passivierenden Metalls bei anodischer Polarisation. U_R = Ruhepotential, U_{pas} = Passivierungspotential, U_{LF} = Lochfraßpotential, U_d = Transpassivitätspotential.

Bei einer elektrochemischen Korrosionsuntersuchung legt man an das zu untersuchende Material ein langsam ansteigendes Potential an und mißt die dabei

auftretenden Stromdichten. Man erhält bei passivierenden Metallen eine nach Abbildung 8 schematisch dargestellte Stromdichte-Potentialkurve.

Vom Ruhepotential U_R steigt die Stromdichte mit steigendem Potential im sogenannten aktiven Bereich bis zur kritischen Stromdichte I_{krit} beim Potential U_{pas} an. Ab diesem Punkt beginnt sich das Metall mit einer schützenden Passivierungsschicht zu überziehen. Dies macht sich an einer abnehmenden Stromdichte bei weiter steigendem Potential bis zur Passivstromdichte I_p bemerkbar. Steigt das Potential weiter bis zum Wert U_d an, so beginnt sich die Passivschicht bei Edelstahl wieder aufzulösen und die Korrosion beginnt, was sich an der wieder steigenden Stromdichte zeigt. Allgemein kann man also sagen, daß ein metallisches Implantat um so korrosionsanfälliger ist je niedriger das Durchbruchpotential U_d ist. Ebenso kann man an der Abbildung 8 erkennen, daß Lochfraßkorrosion erst ab dem bestimmten Lochfraßpotential U_{LF} eintritt. Zur weiteren Theorie und insbesondere den physikalisch-chemischen Formeln sei auf die Literatur verwiesen [33].

Wie in der Abbildung 9 zu sehen ist, stellte sich dabei heraus, daß Titan und Titan-Legierungen über den gesamten Potentialbereich hinweg passiv sind. Hingegen zeigen rostfreie Stähle und Kobalt-Chrom-Legierungen deutliche Korrosion.

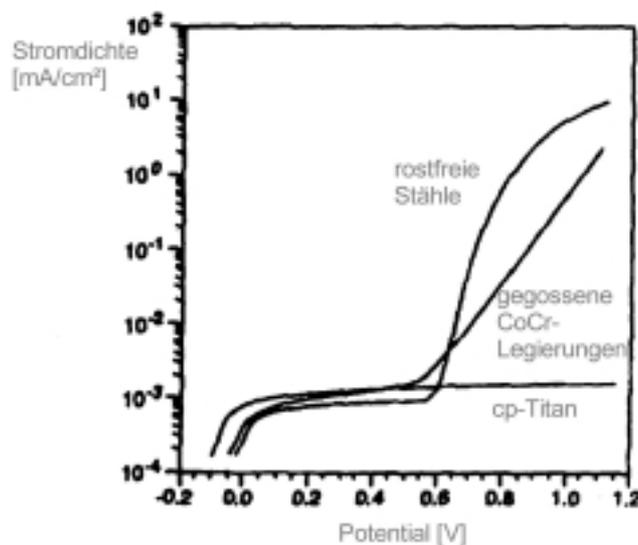


Abbildung 9. Strom-Spannungskurven dreier Implantatwerkstoffe in Ringerlösung.

Bei allen Untersuchungen zur Korrosion von Implantatwerkstoffen muß darauf geachtet werden, daß diese in einer Umgebung durchgeführt werden, die der Körperflüssigkeit möglichst nahe kommt. Alle Korrosionsuntersuchungen wurden daher in "Hank's Balanced Buffer Solution" durchgeführt (HBBS).

2.5.2.1 Lokale Gewebereaktion durch Metallionen

Wie bereits im Kapitel über die Korrosion erwähnt, führen die in Körperflüssigkeiten anwesenden Halogenidionen, insbesondere des Chlorids, zur Korrosion von Edelstahl. Beispielsweise konnte Ferguson [34] nach Implantation eines zylindrischen Metallkörpers aus 316 L Edelstahl oder 17-7 PH Edelstahl (besonders korrosionsbeständig mit ähnlicher Zusammensetzung wie 316 L) in Muskelgewebe nach 6 Monaten erhöhte Konzentrationen an Metallen im umliegenden Muskel durch AAS Analyse nachweisen (siehe Tabelle 3). In zahlreichen weiteren Untersuchungen konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß Metallionen durch Korrosion und Abrieb in das umliegende Gewebe abgegeben werden können [35].

Tabelle 3. Nachweis von Metallspuren nach 6 Monaten im umliegenden Muskelgewebe eines Implantats [34].

Legierung	Metallgehalt [ppm Trockenasche]			
	Chrom	Nickel	Molybdän	Eisen
Kontrolle	3,7 ± 4,9	8,0 ± 9,3	1,8 ± 3,2	37,9 ± 34,6
316 L Edelstahl	76,0 ± 55,7	40,5 ± 41,2	8,4 ± 9,2	76,8 ± 45,7
17-7 PH	12,2 ± 14,2	15,2 ± 11,5	-	34,4 ± 15,4

Die Metallionenkonzentration im untersuchten Gewebe war aber in allen Arbeiten bei gleichen Implantaten und bei gleichen Spezies sehr unterschiedlich. Das heißt der Grad der Korrosion war uneinheitlich, wofür auch in der Literatur keine Erklärung gefunden werden konnte.

Je nach Lokalisation und Verweildauer der Implantate war die Reaktion des Körpergewebes unterschiedlich stark ausgeprägt. Beispielsweise konnte Otter [36] bei 316 L Herzklappen in Hunden in sechs Fällen Eisen-Nickelabscheidungen in der Nähe der Implantate nachweisen. Zwei der sechs beobachteten Hunde waren verendet, bei allen sechs zeigte sich nekrotisches Gewebe und subendotheliales fibrotisches Gewebe um das Implantat. Bei den restlichen 19 Hunden war keine Korrosion feststellbar. Auch Laing et al. stellte einen Zusammenhang von Korrosion und Gewebereaktion her [34]. Er implantierte verschiedene Edelstahltypen in Muskelgewebe. Es zeigte sich auch hier ein direkte Korrelation

zwischen gemessener Metallionenkonzentration und der histologischen Gewebereaktion. In der Arbeit von Ludinghausen [35] wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Verweildauer des Implantats, dem Maß der Korrosion und von Entzündungsreaktionen im Menschen festgestellt. Derlei Untersuchungen an Menschen oder Tieren zur Korrosion von Edelstahlstents sind bisher in der Literatur nicht bekannt.

2.5.2.2 *Wirkung von Metallionen auf Zellen*

Ebenso wie bei den Untersuchungen über die Wirkung von Metallionen auf das umliegende Gewebe sind eine Vielzahl von Wirkungsbeziehungen von Metallen auf Körperzellen bekannt. In diesem Abschnitt wird nur kurz auf die wichtigsten Zelltypen, die in der Immunabwehr oder dem umliegenden Gewebe der Blutgefäße eine Rolle spielen eingegangen.

Die Antigen-unspezifische zelluläre Immunabwehr wird hauptsächlich von zwei Zelltypen, den polymorphkernigen neutrophilen (PMN) Granulozyten und den Monozyten oder Makrophagen bewerkstelligt. Sie sind zur Phagozytose d.h. Aufnahme von partikulärem oder gelöstem Material (Pinozytose) in die Zelle befähigt. Nach Aktivierung durch zahlreiche Mediatoren und der anschließenden Phagozytose sterben die PMN-Granulozyten ab oder neigen zur Verfettung und bilden Demarkations- und Nekrosezonen aus [37]. Klein et.al. konnte nun in einer Untersuchung eindeutig belegen, daß Endothelzellen bereits nach 30-minütiger Inkubation mit Nickel-, Zink- oder Kobaltionen in einen aktivierten Zustand versetzt werden [38]. Dieser Zustand ist unter anderem durch Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen wie ELAM-1 ("Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1") und ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule-1") gekennzeichnet. Die Folge ist eine starke Bindung und Aktivierung von PMN-Granulozyten. Das hohe Aktivierungspotential der PMN-Granulozyten kann zur Zerstörung der Endothelzellschicht führen, was wiederum zu weiteren pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungen und Thrombosebildung führt [39]. Weiterhin begünstigen aktivierte Endothelzellen die Blutgerinnung [37] und können somit die Thrombosebildung begünstigen.

Insbesondere das Nickel²⁺-Ion induziert die Ausschüttung von Interleukin-1 und TNF- α bei Makrophagen, was auf eine Aktivierung dieser Zellen hinweist [40]. Dieses führt wiederum zur Proliferation der glatten Muskelzellen, die

Hauptbestandteil des stenotischen Gewebes sind, sowie der weiteren Aktivierung von Lymphozyten [37].

Eine weiter nachgewiesene Wirkung des Nickelions ist seine hohe Toxizität, was zum lokalen Zelltod führen kann [41]. Ebenso ist bei Nickel und Chrom die starke Bindung der Ionen an Serumproteine und deren Denaturierung bekannt [42]. Erwähnenswert ist ebenso die bekannte und unter der Bevölkerung sehr verbreitete Nickelallergie.

Aus diesen zahlreichen Hinweisen läßt sich zumindest schließen, daß durch die Anwesenheit von Metallionen des Edeltstahls an der Gefäßwand eine Vielzahl von Prozessen der Immunabwehr in Gang gesetzt werden. Einen direkten Zusammenhang zwischen Korrosion und Restenoserate bei Stents ist in der Literatur noch nicht hergestellt worden, aufgrund der zahlreichen oben erläuterten Hinweise aber immer wahrscheinlicher.

2.6 Verwendete Implantatwerkstoffe

Im folgenden wird kurz auf die in der Medizin verwendeten Implantatmaterialien und deren Biokompatibilität eingegangen. Hierbei werden auch die besonderen Einsatzgebiete und deren Vor- und Nachteile sowie ihre Eignung als Stentmaterial kurz beschrieben.

2.6.1 Metalle

Metalle sind die am meisten verwendeten Materialien in der Medizin und finden hauptsächlich zwei Anwendungsgebiete. Zum einen werden sie bei Prothesen wie Knie-, Hüft- oder Schulterprothesen eingesetzt. Zum anderen kommen sie als Hilfsmittel zur Fixierung von Strukturen wie Schrauben, Osteosyntheseplatten, Drähte, Marknägel und Stents zum Einsatz. Bereits 1926 wurde der korrosionsbeständige Chrom-Nickel-Edelstahl für orthopädische Zwecke entdeckt und hat sich bis heute als meist verwendetes Implantatmetall gehalten [43]. Dies ist hauptsächlich durch die langjährige Erfahrung mit diesem Material begründet. Es zeigt gute mechanische Eigenschaften und neigt nur zu geringer Korrosion. Ebenso die leichte Verarbeitung ist ein Grund für diesen Trend. Andere gängige Materialien wie Kobalt-Chrom-Legierungen, CP-Titan (engl. commercial pure, d.h. reinstes Titan) und Titan-Legierungen besitzen ebenso eine sehr gute Korrosionsbeständigkeit. Insbesondere das Titan und seine Legierungen besitzen

eine hohe Festigkeit und ein geringes Elastizitätsmodul im Vergleich zu anderen Metallen. Allgemein lassen sich folgende Anforderungen an einen metallischen Implantatwerkstoff stellen:

- Mechanische Festigkeit und Gewährleistung einer dauerhaften Kraftübertragung zwischen Implantat und Körpergewebe,
- Korrosionsbeständigkeit zur Vermeidung der korrosiven Schädigung des Implantats durch die Wahl elektrochemisch stabiler Werkstoffe und
- Biokompatibilität, um die Schädigung des Gewebes durch den Implantatwerkstoff, dessen Korrosionsprodukte oder Abriebpartikel zu schützen.

Metallische Stents werden überwiegend aus 316L - Edelstahl, Nitinol (Nickel-Titan-Legierungen) und Gold hergestellt. Die gute Korrosionsbeständigkeit des Stahls wird durch den relativ hohen Chromgehalt bestimmt (siehe Tabelle 4), welches zu einer Ausbildung einer passivierenden Oxidschicht auf dem Metall führt. Diese Oxidschicht kann durch zusätzliche Nachbehandlung, sogenanntes Passivieren, verstärkt werden. Dies geschieht durch Behandeln mit Salpeterschwefel- oder Phosphorsäure. Alle in dieser Untersuchung verwendeten Stents wurden aus dem Material 316L Edelstahl hergestellt.

Tabelle 4. Zusammensetzung von 316L Edelstahl.

Element	Anteil in Gew. %
Chrom	16,5 – 18,5
Nickel	12,5 – 14,5
Molybdän	2,5 – 3,0
Mangan	≤ 2
Silizium	≤ 1
Phosphor	≤ 0,045
Schwefel, Kohlenstoff	≤ 0,03
Eisen	ad. 100

2.6.2 Polymere

Die im medizinischen Bereich verwendeten Polymere unterscheidet man nach synthetischen, natürlichen und abbaubaren ("biodegradable"). Bei der Auswahl von Polymeren für medizinische Anwendungen, insbesondere für Stents, hat das Material den folgenden Anforderungen zu genügen:

Tabelle 5. Ausgewählte Polymere und deren medizinisches Hauptanwendungsgebiet.

Polymer	Anwendung
Polyethylen (PE)	Gelenkpfannen für Hüftgelenkprothesen, Knieprothesen, Sehnen- und Bänderersatz, Katheterschläuche
Polypropylen (PP)	Komponenten für Blutoxygeneratoren und Nierendialyse, Fingergelenkprothese, Herzklappen, Nahtmaterial
Polyethylenterephthalat (PET)	Künstliche Blutgefäße, Sehnen- und Bänderersatz, Nahtmaterial
Polyvinylchlorid (PVC)	Extrakorporale Blutschläuche, Blut- und Lösungsbeutel mit intravenöser Anwendung
Polycarbonat (PC)	Komponenten für Dialysegeräte, Schläuche und Verbindungen
Polyamid (PA)	Nahtmaterial, Katheterschläuche, Komponenten für Dialysegeräte, Herzmitralklappen
Polytetrafluorethylen (PTFE)	Gefäßimplantate
Polymethylmethacrylat (PMMA)	Knochenzement, intraokulare Linsen und harte Kontaktlinsen, künstliche Zähne, Zahnfüllmaterial
Polyurethan (PUR)	Künstliche Blutgefäße und Blutgefäßbeschichtungen, Hautimplantate, künstliche Herzklappen, Dialysemembran, Schläuche
Polysiloxane	Brustimplantate, künstliche Sehnen, kosmetische Chirurgie, künstliche Herzen- und Herzklappen, Schläuche, Dichtungen in medizinischen Geräten, Katheter und Schlauchsonden, künstliche Haut, Blasenprothesen
Polyetheretherketon (PEEK)	Matrixwerkstoff für kohlefaserverstärkte Verbundwerkstoffimplantate

Polymer	Anwendung
Polysulfon (PSU)	Matrixwerkstoff für kohlefaserverstärkte Verbundwerkstoffimplantate, Dialysemembran
Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA)	Kontaktlinsen, Harnblasenkatheter, Nahtmaterialbeschichtung

- gute Biokompatibilität,
- gute Hämokompatibilität,
- hohe mechanische Belastbarkeit bei ausreichender Flexibilität,
- Sterilisierbarkeit,
- Langzeitstabilität *in vivo* (Ausnahme: abbaubare Polymere) und
- die genaue Zusammensetzung muß bekannt sein.

Polymere erfordern vielfach den Zusatz von Weichmachern, Stabilisatoren und Antioxidantien, deren Anteil man möglichst gering halten möchte. Außerdem erschweren diese Zusätze die Beurteilung der biologischen Verträglichkeit. Polymere für medizinische Anwendungen können dennoch einen hohen Anteil dieser Substanzen enthalten, wenn dies bei einer spezifischen Anwendung notwendig erscheint. Die meisten Polymere stammen aus technischen Anwendungen und wurden später auf medizinische Verwendbarkeit hin getestet oder entsprechend angepaßt. Wegen der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Polymere und deren unterschiedlichen Eigenschaften werden diese in vielen Bereichen der Medizin verwendet. Medizinische Hauptanwendungsgebiete für Polymere sind in Tabelle 5 zusammen gestellt [44].

Wie man in der Tabelle 5 erkennen kann, wird das Anwendungsgebiet von Polymeren in der Medizintechnik hauptsächlich durch ihre physikalischen Eigenschaften bestimmt. Einige der in Tabelle 5 genannten Kunststoffe wurden bereits im Bereich der Gefäßstützen eingesetzt. In Verbindung mit Stents sind Kunststoffe entweder als alleiniges Material oder als Verbundwerkstoff mit Metallen interessant. Bisher erhoffte man sich durch den Einsatz von Polymeren eine Verringerung der Thrombogenität und Hyperplasie der Neointimazellen. Diverse Polymere wurden im Einsatz für Stents sowohl im arteriellen als auch im

peripheren Bereich untersucht, wobei Ergebnisse in diesen beiden Bereichen nicht übertragbar sind. Die meisten in der Literatur bekannten Arbeiten sind nur Voruntersuchungen bzw. nur als Abstrakt erhältlich. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über die bisher untersuchten Polymere und die Ergebnisse in Tierexperimenten gegeben:

- Polyethylenterephthalat

Dieses auch als Dacron bekannte Material besitzt je nach Herstellungsprozeß ähnliche mechanische Eigenschaften, insbesondere Rigidität, wie Edelstahl. Es kommt somit als Vollmaterial für Stents zur Anwendung. In koronaren Schweinearterien führte die Implantation von Dacronstents zu einem heftigen Anwachsen der Neointima, Entzündungsprozessen und Bildung dauernder Wandausbuchtungen in den Gefäßen [45]. Auch wurde festgestellt, daß Dacron insbesondere Thrombozyten aktiviert, was, wie in Kapitel 2.5.2.2 beschrieben, eine unerwünschte Eigenschaft ist [46].

- Polyurethan

In einer Tierstudie wurden 12 Schweinen mit Polyurethan beschichtete Tantal-Stents implantiert. Bereits 48 Stunden später verstarben 6 Schweine an einer Thrombose, alle anderen zeigten nach einem Monat eine starke Hyperplasie der Neointima [47]. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Untersuchung von Fontaine et. al., der bei *in vitro*-Experimenten diesem Material eine geringere Thrombozytenadhäsion im Vergleich zu Metallen und eine gute Biokompatibilität bescheinigte [48].

- Polyhydroxybutyrat

Bei Versuchen mit Schweinen zeigte dieses Stentmaterial eine Entzündungswirkung sowie die Bildung einer Neointima. Es scheint somit für die Verwendung in diesem Bereich ungeeignet zu sein [54].

- Poly-L-milchsäure und Poly-L-laktid-co-glykolid

Diese Polymere sind biologisch abbaubar und eignen sich auch zur lokalen Freisetzung von Medikamenten. Über beide Polymere existieren widersprüchliche Daten für die Verwendbarkeit als Stentmaterial bzw. als Beschichtungsmaterial. In Schweinearterien zeigte sich eine hohe Thrombogenität und Ausbildung einer Hyperplasie der Neointima [49]. In Kaninchen hingegen sind gute Erfolge mit diesem Material erzielt worden [50].

- Celluloseester

Mit Celluloseester beschichtete Tantal-Stents zeigten im Vergleich mit unbeschichteten Stents keinerlei Vorteile beim Einsatz in koronare Schweinearterien [51].

- Polyglycolsäure

Dieses Polymer ist durch seine semikristalline Eigenschaft schwieriger zu verwenden als andere Polymere. Es kann aber ebenso wie die Poly-L-milchsäure zur lokalen Freisetzung von Medikamenten verwendet werden. Auch hier sind widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur zu finden. Im Hundemodell zeigten sich weder Thrombosen noch Anzeichen für eine Fremdkörperreaktion [52]. Genau gegenteilige Ergebnisse fand Tamai et. al. in einer Untersuchung im Kaninchenmodell [53].

- Polycaprolacton

Dieses Polymer wird photochemisch erzeugt und eignet sich zum Auskleiden der Arterienwand mit einem dünnen Polymerfilm. Auch hier zeigten sich im Schweinemodell bei der Implantation Entzündungsprozesse, Anwachsen der Neointima sowie biologische Abbauprozesse durch eine Phagozytose von Makrophagen [54].

- Collagen

Als ein natürliches Polymer ist es sowohl biologisch abbaubar und hat gute biokompatible Eigenschaften. Aufgrund seiner geringen Rigidität eignet es sich nur in Verbindung mit anderen Polymeren. Bei Versuchen mit Collagen-Dacron-Prothesen war die Thrombogenität gegenüber den reinen Dacronimplantaten nicht verbessert [55].

- Fibrin

Fibrin als Endprodukt bei der Blutgerinnung sollte die Bildung von neuem Fibrin und somit einer Thrombosebildung entgegenwirken. Nachteilig ist, daß Fibrin nur schlecht an Stentmaterialien bindet und beim Ablösen die Gefahr der Bildung einer Embolie besteht. Untersuchungen *in vitro* zeigen eine geringere Thrombozytenadhäsion sowie eine bessere Endothelialisierung im Vergleich zu Edelstahlstents [56]. Bei der Implantation in Schweineherzen zeigte sich keine

erhöhte Bildung von Thrombosen und die Bildung von Neointima war nicht erhöht [57].

Abschließend läßt sich über die Verwendung von Polymeren sagen, daß nahezu alle bei der Verwendung als Stentmaterial oder zur Beschichtung von Stents ungenügende Ergebnisse im Schweinmodell zeigen. Fast sämtliche Polymere neigen zu erhöhter Thrombosebildung und zu Entzündungsprozessen im umliegenden Gewebe. Andere wiederum zeigten keinen Vorteil gegenüber Metallstents, weswegen sich dies Polymere bis heute nicht als Stent- bzw. Beschichtungsmaterial etablieren konnten.

2.6.3 Verbundwerkstoffe

Verbundwerkstoffe sind Produkte, die aus mindestens zwei verschiedenen Materialien zusammengesetzt sind. Es wurde beispielsweise versucht, ungünstige biologische Eigenschaften der Metalle und deren Korrosion durch Beschichtung mit Polymeren (siehe Kapitel 2.6.2) zu verbessern. Weitere bisher erprobte Kombinationen bestehen aus zwei Metallschichten, beispielsweise mit Gold beschichteter Edelstahl. Dieser Verbundwerkstoff findet auch Anwendung bei Stents. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kombination von Edelstahl mit Keramiken, diese besitzt zwar gute Biokompatibilität, läßt sich aber bei Stents aufgrund der nicht vorhandenen Flexibilität von Keramiken nicht verwenden. Eine relativ neue Möglichkeit zur Verbesserung der Biokompatibilität durch Verwendung eines Verbundwerkstoffes besteht in der Beschichtung mit Kohlenstoff in unterschiedlicher Modifikation oder Struktur. Aufgrund der Wichtigkeit dieser Methode wird ihr ein gesondertes Kapitel gewidmet.

2.6.4 Diamond-Like-Carbon-Coating

Die ersten Untersuchungen über die medizinischen Verwendung einer Kohlenstoff-Pigment-haltigen Beschichtung wurde von Gott et.al. bereits 1964 mit guten Ergebnissen durchgeführt [58]. Seitdem wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Kohlenstoffmodifikationen für die medizinische Verwendung untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit soll nur auf die Verwendung des Kohlenstoffs mit diamantähnlicher Struktur eingegangen werden.

Diamond-Like-Carbon (DLC) ist eine amorphe Form des Kohlenstoffs die je nach Herstellungsprozess und den dabei gewählten Bedingungen ein Verhältnis von Kohlenstoff zu Wasserstoff von 1,5-5 besitzt. Auf einer Reihe von in der

Biomedizin verwendeten Materialien wie z.B. Metallen (Edelstahl, Titan, Chrom) oder Kunststoffen (Polyethylen, Polyurethan, Polycarbonat) haftet es sehr gut. Die Synthese einer ersten Diamantoberfläche aus der Gasphase gelang durch Everson und wurde bereits 1958 zum Patent angemeldet [59]. Nachteil bei dieser Methode war die hohe Temperatur von über 1000 °C, was die Verwendung auf wenige zu beschichtende Materialien einschränkt. Seit 1960 beschäftigte sich die Arbeitsgruppe von Derjaguin mit der Synthese von Diamant und diamantartigen Oberflächen [60]. Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen zeigten, daß sich DLC-Oberflächen durch eine Vielzahl von Prozessen wie Laser-induziertes chemisches Gasabscheidungsverfahren, Radiofrequenz-induziertes Plasmaverfahren, Mikrowellen-induziertes Plasmaverfahren und Ionstrahl-induziertes Gasabscheidungsverfahren herstellen lassen [61]. Die Geometrie der dabei entstehenden Mikrokristalle, die Schichtdicke und die physikalischen und chemischen Eigenschaften sind dabei von den gewählten Herstellungsbedingungen abhängig. Mit den neuesten Verfahren lassen sich Diamond-Like-Carbon-Beschichtungen im Hochvakuum bereits bei Raumtemperatur erzeugen und eröffnen damit ein weites Einsatzfeld. Mit ihnen ist es möglich, Kunststoffe aller Art, sowie Metalllegierungen ohne Veränderung der Metalleigenschaften durch das Erhitzen zu beschichten.

2.6.4.1 Bio- und Hämokompatibilität von DLC-Oberflächen

In der Literatur besteht bereits eine Vielzahl von Hinweisen auf eine gute bis sehr gute Biokompatibilität von diamantartigen Oberflächen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit unterschiedlichen Methoden und auf verschiedenen Trägermaterialien DLC-Oberflächen erzeugt. Die genaue chemische Zusammensetzung dieser Beschichtungen wurden meist nicht näher charakterisiert.

In der Arbeit von Lou et.al. [62] wurde mittels Ionstrahl-induziertes Gasabscheidungsverfahren eine DLC-Schicht auf Plastik-Petrischalen aufgebracht. Die Biokompatibilität wurde durch Zellkulturuntersuchungen mit hämatopoetischen Myoblasten (ML-1) und embryonalen menschlichen Nierenzellen 293 (HEK) untersucht. Die Zellen proliferierten mit einer hohen Viabilität und es wurden keinerlei zelltoxische Effekte festgestellt.

Auch konnte gezeigt werden, daß die zelluläre Adhäsion von polymorphkernigen Leukozyten, die für entzündliche Prozesse mitverantwortlich sind, den kleinsten

Adhäsionswert an der in dieser Untersuchung verwendeten DLC-Oberfläche im Vergleich zu Titan- oder Edelstahloberflächen haben [63].

Die Zytotoxizität einer DLC-Oberfläche wurde *in vitro* an 3T3-L1 Mäuse-Fibroblasten untersucht. Die Zellen zeigten dabei ein normales Wachstum der Zellen auf DLC-Oberflächen und damit keinen toxischen Effekt [64]. Auch bei einer Untersuchung mit peritonealen Makrophagen der Maus sowie an Mäuse-Fibroblasten konnten keine hemmenden Effekte auf das Wachstum der Zellen festgestellt werden [65].

Auch existieren in der Literatur Untersuchungen mit 3T3 Balb/C Zelllinien, Endothelzellen und Blutplättchen, bei denen alle eine positive Biokompatibilität an den untersuchten DLC-Oberflächen festgestellt wurde [66].

Bei Untersuchungen über die Adsorption von Proteinen an DLC-Oberflächen zeigte sich je nach gewähltem Protein eine geringere oder mindestens vergleichbare Adsorptionsrate wie an Edelstahl oder Titan [66,63]. Dies läßt auf eine gute Hämokompatibilität von diamantartigen Oberflächen schließen (siehe Kapitel 2.4.1.1).

2.7 Parallelentwicklungen

2.7.1 Beschichtung mit Siliziumcarbid

Ähnlich Ansätze in der Beschichtung von Edelstahlstents veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Schaldach im Jahre 1999 [67]. Sie beschichteten 316 L Stents mit amorphen Siliziumcarbid. In diesem Beschichtungsverfahren wird mittels Plasma-unterstützter Reaktion in der Gasphase das Siliziumcarbid abgeschieden. Bei diesem Prozeß wird in eine Kammer, in der sich die Stents befinden, Silan, Methan und Phosphin eingeleitet. Durch die Erzeugung eines Plasmas werden die Gase chemisch aktiviert und reagieren unter Abscheidung am Substrat miteinander. Hierbei entsteht je nach Gaszusammensetzung und durch die Anwesenheit des Phosphors ein n-dotiertes Siliziumcarbid. Diese Eigenschaft soll einen positiven Einfluß auf die Adsorption und Denaturierung von Fibrinogen an Oberflächen und somit der Thrombogenität [68] haben (siehe auch Kapitel 2.4.1.1).

Klinische Studien

Bei einer Untersuchung an 265 Patienten mit einem Anteil einer Hochrisikogruppe für Thrombosen, zeigte sich keine erhöhte Thrombosebildung gegenüber der Vergleichsgruppe. Dies sind erste Anzeichen für eine geringe Thrombogenität der beschichteten Stents [69]. Die Restenoserate wurde anhand des Auftretens von erneuten klinischen Beschwerden des Patienten ermittelt und lag bei 26,8 % und damit nur wesentlich geringer als bei Edelstahlstents (Vergleich Kapitel 3.9).

Nachteil der Beschichtung mit Siliziumcarbid stellt die mechanische Eigenschaft des keramischen Materials dar. Aufgrund der hohen Härte und der mechanischen Beanspruchung bei der Stentexpansion kommt es zu Brüchen und Rissen in der Beschichtung [67]. Die daraus resultierende Möglichkeit der Korrosion und deren Auswirkungen könnten ein Grund für die im Vergleich zu Edelstahlstents nahezu unveränderte Restenoserate sein.

2.7.2 Beschichtung mit Phosphorylcholin

Auch durch die Beschichtung mit Phosphorylcholin wurde versucht, die Biokompatibilität von Stents zu verbessern.

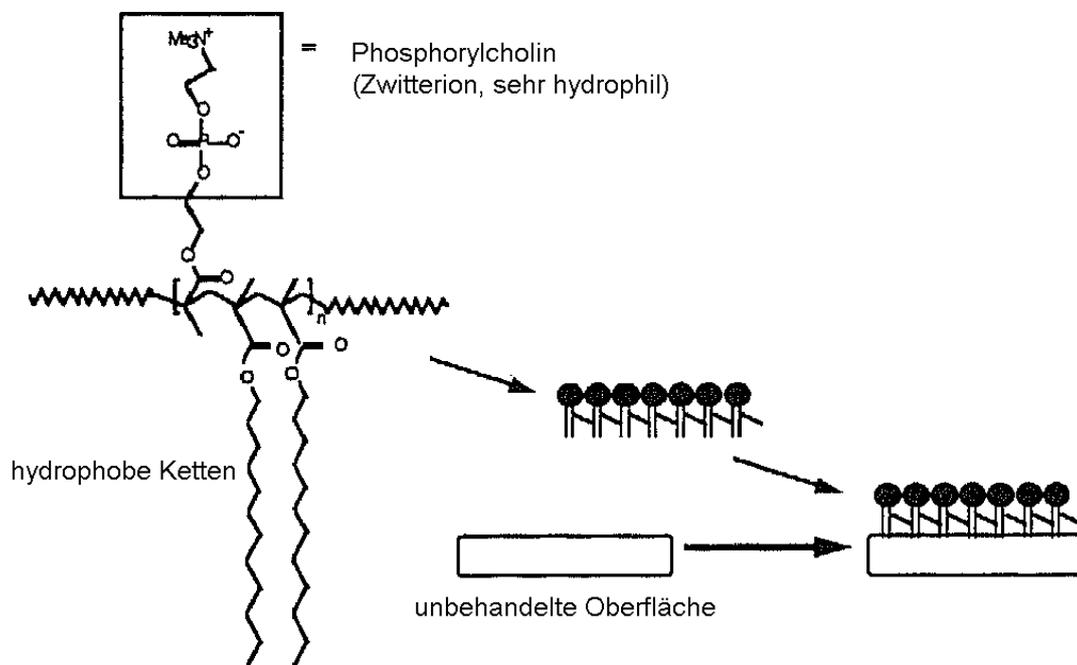


Abbildung 10. Aufbau einer Phosphorylcholin-Beschichtung.

In der Arbeit von Campbell im Jahre 1994 wird bereits die Biokompatibilität von Copolymeren aus Methacrylaten und Phosphorylcholin beschrieben [70]. Der schmetische Aufbau einer solchen Oberflächenbeschichtung ist in der Abbildung

10 dargestellt. Das Prinzip beruht auf der Nachbildung einer Membran, wie man sie beispielsweise bei Erythrozyten findet. Bei dieser Membran ist Phosphorylcholin die am häufigsten vorkommende lipide Endgruppe an der Außenseite. Auch konnte gezeigt werden, daß die dem Zytoplasma zugewandte Seite der Membran *in vitro* thrombogen ist, die entgegengesetzte Seite der Membran hingegen keinen Effekt auf das Gerinnungssystem hat. Heute hat sich Phosphorylcholin bereits bei Kontaktlinsen, urologischen Stents, Kathetern und Drainagen bewährt.

Klinische Studien

In einer ersten klinischen Studie mit Phosphorylcholin-Stents an 200 Patienten zeigte sich eine sehr geringe Thromboserate von 0,4 %. Die Restenoserate als MACE lag nach 6 Monaten bei 16 % und damit nur wenig unter den durchschnittlichen 20-30 % (vergleiche Kapitel 3.9) [71].

Der Nachteil der Beschichtung mit solchen Polymeren dürfte die Anwesenheit von Phosphatasen und Phosphoresterasen im Körper sein. Diese können zu einem langsamen Abbau des Polymers führen, wobei der darunter liegende Edelstahlstent frei gesetzt wird. Außerdem bildet die Polymerschicht keine abdichtende Wirkung, damit ist der Stent nicht vor Korrosion geschützt.

2.7.3 Klinische Ergebnisse mit Brachytherapie

Im Laufe dieser Arbeit wurden zahlreiche klinische Studien zum Thema Brachytherapie veröffentlicht. Einen guten Überblick zum Stand der Untersuchungen von 1999 gibt R. Waksman [72]. Insbesondere bei den untersuchten radioaktiven ³²Phosphorstents sind die Ergebnisse der klinischen Studien bezüglich der Restenoserate ernüchternd (siehe Tabelle 6).

Wie aus den bisher erhaltenen Daten der durchgeführten klinischen Studien ersichtlich ist, waren die bisher verwendeten Aktivitäten in ihrer Dosis zu gering um einen nachhaltigen Effekt auf die Restenoserate zu haben. Bei der Colombo/Isostents- Studie stellte sich ein nachteiliger Effekt bei β -strahlenden Stents heraus. Die Restenoserate innerhalb des Stents waren signifikant erniedrigt, aber es zeigte sich an beiden Enden des Stents eine erhöhte Verschlußrate durch proliferierte glatte Muskelzellen. Die glatten Muskelzellen wurden vermutlich durch die sehr geringe Strahlenintensität der β -Strahlen außerhalb der Stents zur Proliferation angeregt. Um diesen Effekt näher zu

untersuchen, sind bereits zwei weitere Studien mit Aktivitäten im Bereich 3-14 μCi begonnen worden. Die Ergebnisse dieser Studien wurden bis heute noch nicht veröffentlicht.

Tabelle 6. Ergebnisse bisheriger klinischer Studien mit radioaktiven ^{32}P -Phosphor Stents, IRIS= Isostent for Restenosis Intervention Study, nach R.Waksman [72].

Studienleiter/ Sponsor	Studien- Design	Stent- System	Isotop und Dosis	Ergebnisse und Status
Fischell/ Isostent	IRIS IA Multizentren- studie mit <i>de- novo</i> oder restenotischen Fällen	Palmaz- Schatz 15 mm Stent	^{32}P niedrige Aktivität (0,5-1,0 μCi) $\varnothing = 0,69$ μCi	Gute Durchführbarkeit, keine Thrombosen und subakute Verschlüsse, Restenoserate nach 6 Monaten durch Angiographie: 31 %
Mosses/ Isostent	IRIS IB Multizentren- studie an 25 Patienten	Palmaz- Schatz 15 mm Stent	^{32}P niedrige Aktivität (0,7-1,5 μCi) $\varnothing = 1,14$ μCi	Gute Durchführbarkeit, keine subakuten Verschlüsse nach 3 Monaten, angiographische Restenoserate: >35 %
Hehrlein/ Isostent	Heidelberg- Studie mit 15 Patienten bei restenotischen Fällen	Palmaz- Schatz 15 mm Stent	^{32}P mittlere Aktivität (3 μCi)	Keine klinisch relevanten Vorfälle nach 4 Monaten, angiographische Restenoserate: >35 %
Colombo/ Isostent	Einzelzentren- studie über die Sicherheit höherer Aktivität	BX 15 mm Stent	^{32}P 3 und 6 μCi	Keine klinisch relevanten Vorfälle, hohe Restenoserate an beiden Stentenden

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Untersuchung der Thrombozytenaktivierung an DLC-Oberflächenⁱ

Bei dieser durchflußzytometrischen Untersuchung der Thrombozytenaktivierung an verschiedenen Stentoberflächen durch Markierung mit spezifischen gegen die Oberflächenmarker CD62p und CD63 gerichteten monoklonalen Antikörpern wird der in den Abbildungen 11 und 12 aufgezeigte Zusammenhang beobachtet.

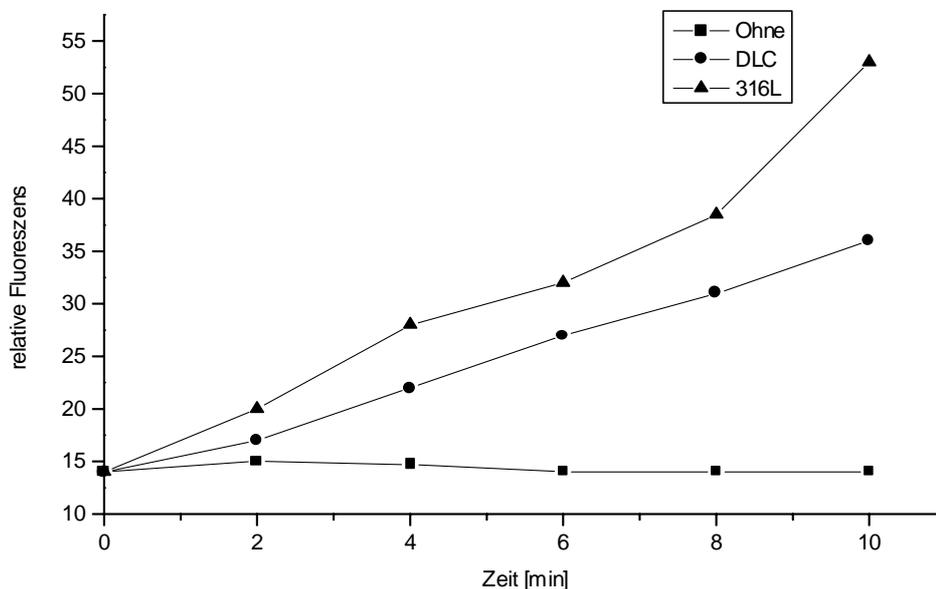


Abbildung 11. Bestimmung der Thrombozytenaktivierung durch Stent-Oberflächen mit Hilfe eines Immunfluoreszenzassays gegen den Oberflächenmarker CD62p. Hierzu wurde Blutplasma mit einer Schlauchpumpe und einem Fluß von 8 ml/min durch einen Schlauch mit einem Innendurchmesser von 3 mm im Kreis gepumpt. Im Schlauch befand sich entweder kein Stent (Kurve:Ohne), ein DLC-Stent (Kurve: DLC) oder ein Edelstahl-Stent (Kurve:316L). Nach 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten wurde 100 µl des durch das System geflossenen Plasmas entnommen und nach Fixierung der monoklonale Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD62p zugegeben. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Durchflußzytometer bestimmt.

Aus den Abbildung 11 und 12 läßt sich erkennen, daß die beiden Oberflächenmarker, an denen man den Aktivierungszustand von Thrombozyten ablesen kann, durch die Anwesenheit von Stents im Meßsystem vermehrt werden.

ⁱ Die Untersuchung wurde von K. Gutensohn an der Eppendorf-Klinik in Hamburg durchgeführt

Somit ist auch die Aktivierung der Thrombozyten erhöht und damit auch das thrombogene Potential.

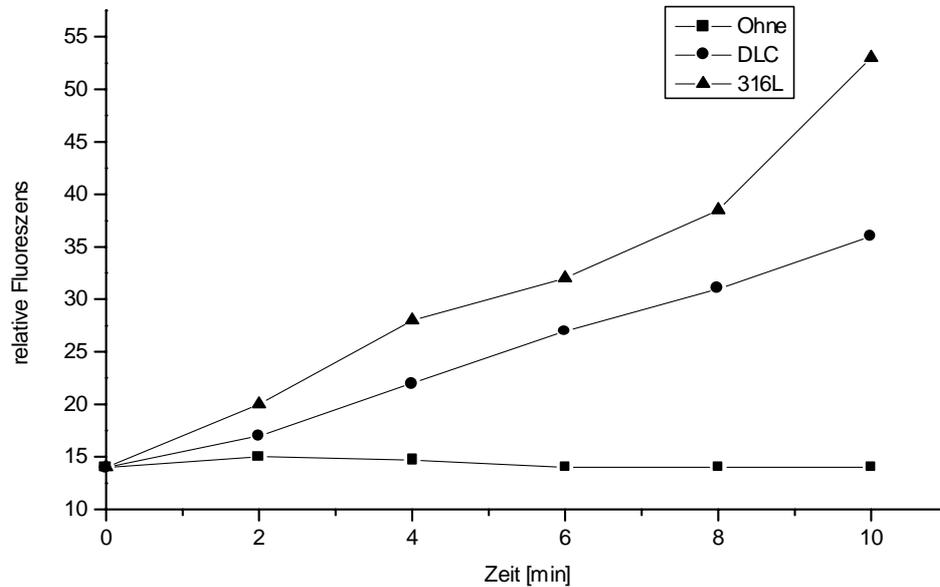


Abbildung 12. Bestimmung der Thrombozytenaktivierung durch Stent-Oberflächen mit Hilfe eines Immunfluoreszenzassays gegen den Oberflächenmarker CD63. Beschreibung siehe Abbildung 11.

Ein deutlicher Unterschied ist aber durch die Beschichtung mit dem DLC-Material zu erkennen. Der Marker CD62p ist gegenüber Edelstahl nach 10 Minuten um 33 % erniedrigt, der Marker CD63 sogar um 38 %.

Man geht davon aus, daß die Aktivierung der Thrombozyten an der Stentoberfläche durch kleine Turbulenzen durch Oberflächenrauheit und Kontakt mit der an Endothelzellen freien Metalloberfläche verursacht wird. Auch hängt die Aktivierung von der Art des gebundenen Proteins ab (siehe Kapitel 2.4.1.1).

Die Oberfläche des DLC-beschichteten Stents ist wesentlich glatter (siehe Abbildungen 13 + 14). Damit dürften die beschichteten Stents eine geringe Oberfläche besitzen und damit eine geringere Wechselwirkung mit den Thrombozyten ermöglichen. Auch dürfte die glattere Oberfläche das Auftreten von Mikroturbulenzen verringern. Damit sollten die auftretende Scherkräfte geringer sein, die letztendlich zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen. Die wesentlich glattere Oberfläche läßt sich auch an den nachstehenden Mikroskopaufnahmen erkennen. Weiterhin ist der Kontakt von Thrombozyten mit der aktivierenden Metalloberfläche bei den beschichteten Stents nicht mehr möglich.

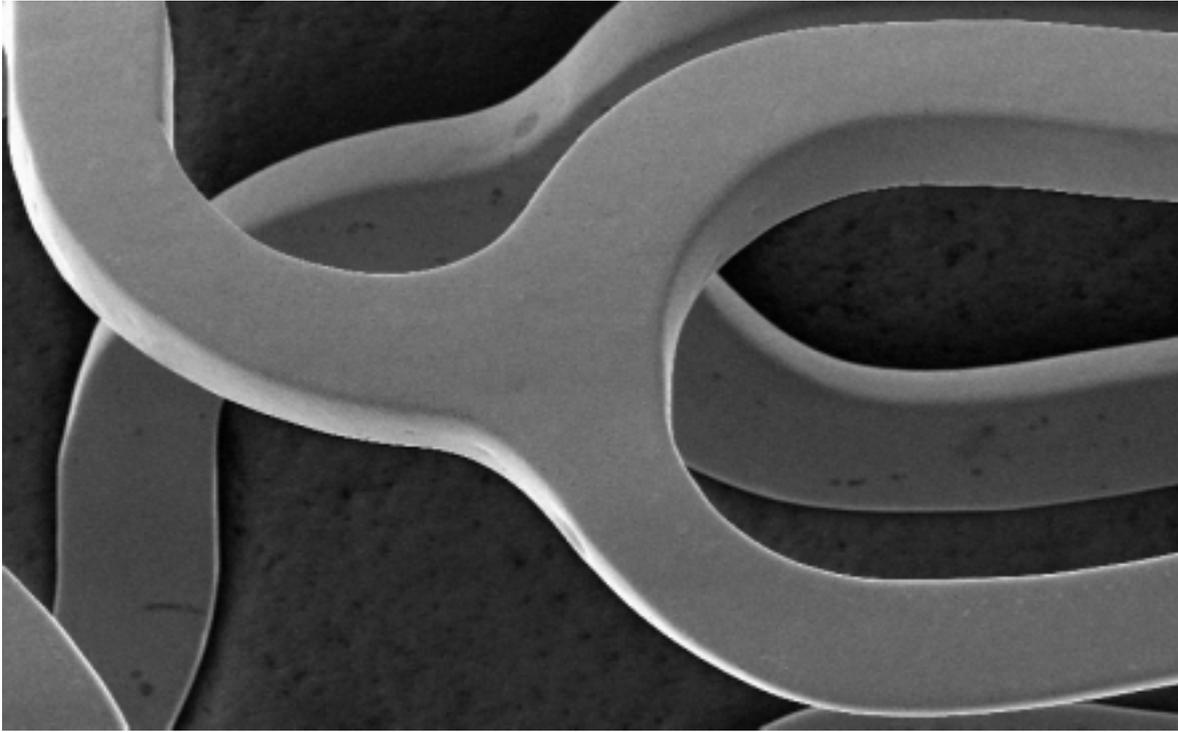


Abbildung 13. Unbeschichteter Edelstahlstent, 250-fache Vergrößerung. Ein elektropolierter Edelstahlstent wurde bei 250-facher Vergrößerung mit einem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen. Deutlich sind hier die feinen Unebenheiten auf der Metalloberfläche zu erkennen.



Abbildung 14. DLC-beschichteter Stent, 250-fache Vergrößerung. Ein elektropolierter Stent wurde mit einer 30 nm starken DLC-Schicht versehen und mit einem Rasterelektronenmikroskop bei 250-facher Vergrößerung aufgenommen. Im Vergleich zum unbeschichteten Stent der Abbildung 13 sind keine Unebenheiten auf der Metalloberfläche mehr zu erkennen.

Weiterhin haben auch die Thrombozytenadhäsionsversuche gezeigt (siehe 3.3), daß DLC im Gegensatz zu Edelstahl eine geringere Adhäsion im Vergleich zu Edelstahl besitzt.

3.2 Proteinadsorption

Die Adsorption der beiden Proteine Albumin und Fibrinogen sollten Hinweise über die Hämokompatibilität der DLC-Oberfläche liefern. Je nach Maß der Adsorptionsrate kann man auf die Thrombogenität des Materials schließen. Daher wurde die Adsorptionsrate sowohl mit der Biosensortechnik als auch durch radioaktives Markieren der Proteine bestimmt

3.2.1 Adsorptionsrate mit der Biosensortechnik

Mit Hilfe der Biosensortechnik wurde die Adsorption der Proteine Fibrinogen und humanes Serumalbumin an die DLC-Oberfläche unter Echtzeitbedingungen untersucht. Dazu wurden die handelsüblichen Biosensorchips ASI 2400 (ASI, Schweiz) mit einer 500 Å dicken DLC-Schicht versehen. Der Biosensorchip wurde so lange mit PBS gespült bis er äquilibriert war (Schritt 1, Abbildung 15). Dies ist an einem über mehr als 5 Minuten nahezu konstanten Brechungsindex zu erkennen. Anschließend wurde ebenfalls bis zum Erreichen eines neuen konstanten Brechungsindex eine Lösung des Proteins mit einer Konzentration von 50 µg/ml bei einem Fluß von 0,1 ml/min über den Chip gepumpt (Schritt 2). Anschließend spülte man den Biosensorchip mit PBS gespült um die überschüssige Proteinlösung zu entfernen (Schritt 3). Zurück bleibt adsorbiertes Protein auf der Oberfläche. Spült man den Biosensor nun mit 0,01 N Salzsäure, so wird alles reversibel adsorbiertes Protein von der Oberfläche gespült (Schritt 4) und es bleibt nur irreversibel gebundenes denaturiertes Protein auf dem Biosensorchip zurück. Die Folge ist, daß der eingangs beim Äquilibrieren auf PBS gemessene Brechungsindex nicht wieder erreicht wird (Schritt 5). Man erhält ein sogenanntes Sensogramm bei dem der Brechungsindex als Funktion der Zeit aufgetragen wird. Durch Berechnungen, die mit Hilfe der Software automatisiert durchgeführt wurden, läßt sich das Sensogramm Brechungsindex in Abhängigkeit von der Zeit direkt in ein Sensogramm mit adsorbierten Masseinheiten in Abhängigkeit von der Zeit umrechnen und die Menge an adsorbiertem Protein/Flächeneinheit ablesen. Die Theorie der Berechnung wird eingehend in Kapitel 3.2.1 besprochen.

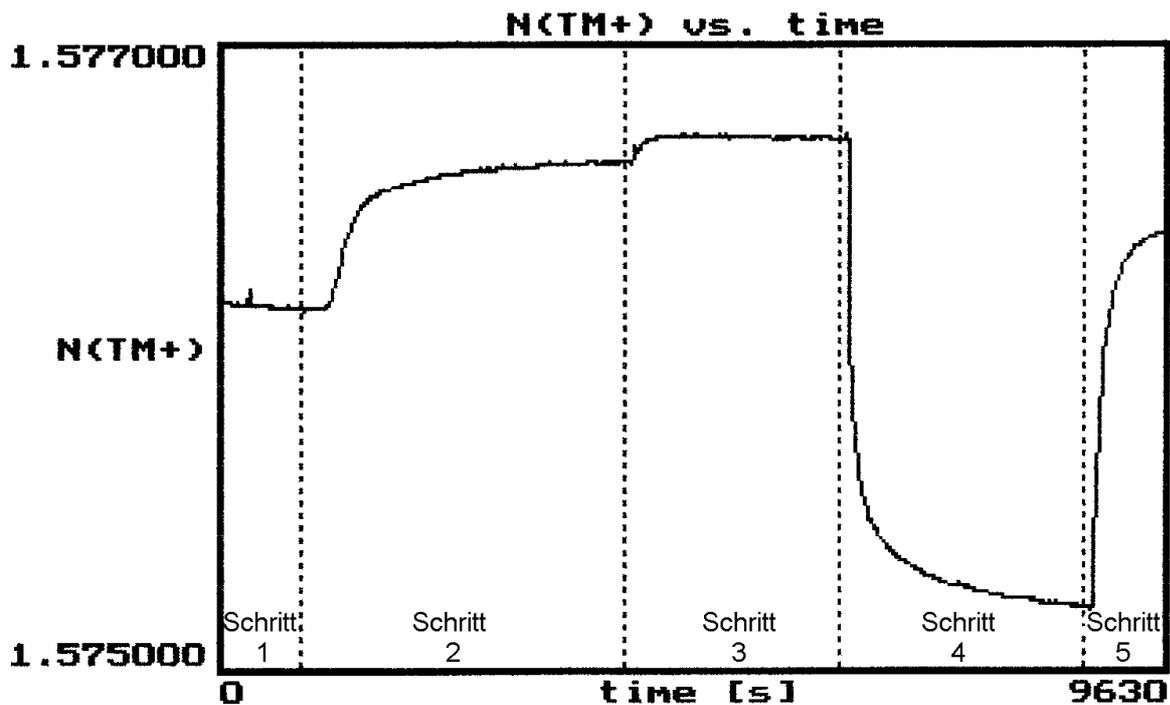


Abbildung 15. Änderung des Brechungsindex bei der Adsorption von Fibrinogen auf einen DLC-beschichteten Biosensor. Ein mit 50 nm DLC-beschichteter Biosensorchip wurde mit PBS äquilibriert (Schritt 1). Anschließend wurde eine Lösung von 50 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen in PBS über den Sensor gepumpt (Schritt 2). Nach der Sättigung wurde mit PBS nachgespült (Schritt 3). Durch Waschen mit 0,01 N Salzsäure (Schritt 4) und anschließendem erneuten Äquilibrieren mit PBS (Schritt 5) wird der eingangs gemessene Brechungsindex (y-Achse) nicht wieder erreicht.

Wie bereits eingangs erwähnt, kann man durch den Vergleich des Adsorptionsverhaltens der Proteine Albumin/Fibrinogen auf die Hämokompatibilität des Materials schließen.

Das Diamond-Like-Carbon-Material zeigt bei den Biosensorexperimenten mit der mit dem Biosensor erreichbaren Genauigkeit (laut Hersteller Picogramm/ mm^2) keine irreversible Bindung von Albumin an die Oberfläche (siehe Abbildung 17 + 18). In Schritt 1 wird der Biosensor mit PBS äquilibriert, im Schritt 2 findet eine schwache Adsorption von Albumin an die Oberfläche statt. Dies ist an dem leichten Anstieg des Brechungsindex zu erkennen. Das gesamte Albumin auf der Oberfläche lässt sich bereits durch Spülen mit dem PBS-Puffer wieder vollständig entfernen (Schritt 3). Ähnlich verhält es sich beim Protein Fibrinogen (siehe Abbildung 15 und 16). Dieses wird zwar anfänglich stärker an die DLC-Oberfläche des Biosensorchips gebunden (Schritt 2), durch Spülen mit PBS wird nur ein Teil des Proteins entfernt (Schritt 3). Erst durch weiteres Waschen mit 0,01 N Salzsäure (pH 2,0) wird das gesamte Fibrinogen wieder von der Oberfläche entfernt (Schritt 4+5).

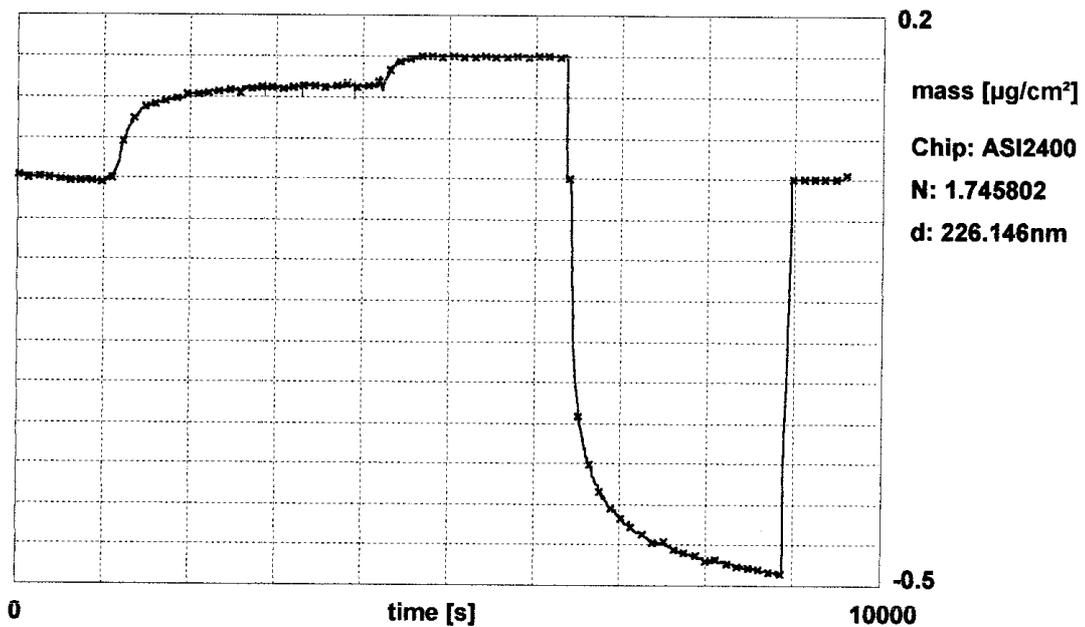


Abbildung 16. Sensogramm der Adsorption von Fibrinogen auf einen DLC-beschichteten Biosensor in der Darstellung Masse/Zeiteinheit. Diese Abbildung ergibt sich aus Abbildung 15 durch Umrechnung des Brechungsindex in adsorbiertes Fibrinogen in µg/cm². Die Berechnung wurde mit der Software des Biosensors durchgeführt.

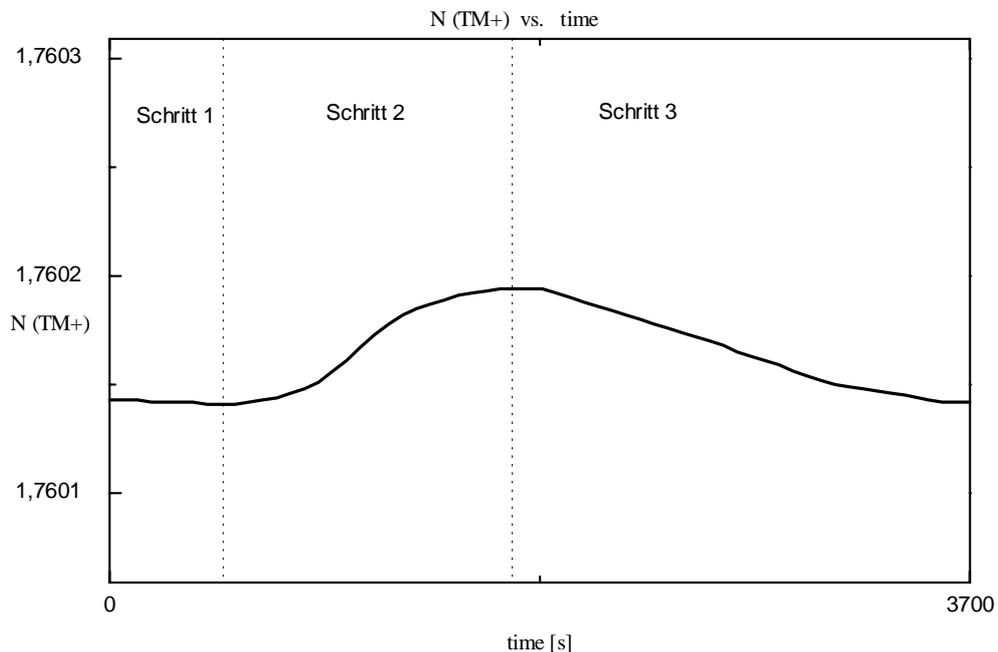


Abbildung 17. Änderung des Brechungsindex bei der Adsorption von humanem Serumalbumin auf einen DLC-beschichteten Biosensor. Ein mit 50 nm DLC-beschichteter Biosensorchip wurde mit PBS äquilibriert (Schritt 1). Anschließend wurde eine Lösung von 50 µg/ml humanem Serumalbumin in PBS über den Sensor gepumpt (Schritt 2). Nach der Sättigung wurde mit PBS nachgespült (Schritt 3) wobei das gesamte Albumin wieder von der Oberfläche gespült wird.

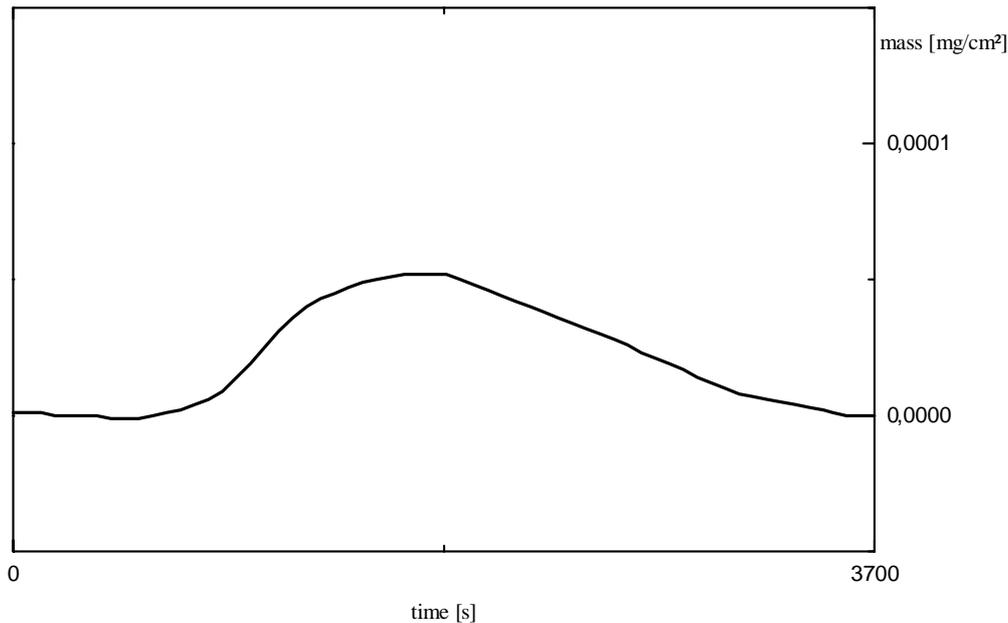


Abbildung 18. Sensogramm der Adsorption von humanem Serumalbumin auf einen DLC-beschichteten Biosensor in der Darstellung Masse/Zeiteinheit. Diese Abbildung ergibt sich aus Abbildung 17 durch Umrechnung des Brechungsindex in adsorbiertes Serumalbumin in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die Berechnung wurde mit der Software des Biosensors durchgeführt.

Zwar wird bei Fibrinogen der ursprüngliche Brechungsindex (Abbildung 15) durch Spülen mit PBS nicht wieder erreicht, die Differenz war aber so gering, daß daraus im Rahmen der Meßgenauigkeit des Biosensors rechnerisch keine Adsorption resultierte (Abbildung 16).

Da sowohl Albumin als auch Fibrinogen keine irreversible Bindung an die DLC-Oberfläche zeigen ist nach Tang et.al. [63] von einer guten Hämokompatibilität im Rahmen der Meßgenauigkeit des Biosensors auszugehen.

Leider ist es mit Hilfe des verwendeten Biosensors aufgrund des Meßprinzips nicht möglich, einen direkten Vergleich mit der Edelstahloberfläche anzustellen, da hier die notwendige Transparenz des Materials fehlt. Ein weiterer Nachteil der Meßmethode betrifft die Versuchstemperatur, die bei den obigen Versuchen bei Raumtemperatur lag, da es die Apparatur nicht zuläßt den Biosensor auf Körpertemperatur zu temperieren.

Um die Proteinadsorption der Oberflächen DLC und Edelstahl direkt miteinander zu vergleichen, wurden die Proteine Albumin und Fibrinogen radioaktiv markiert und bei 37 °C mit den Stents inkubiert.

3.2.2 Adsorptionsrate mit radioaktiv markierten Proteinen

Hierzu wurde humanes Serumalbumin und Fibrinogen mit radioaktivem ^{125}Jod markiert. Anschließend wurde nach Bestimmung der spezifischen Aktivität der Proteine eine Lösung von je 20 $\mu\text{g/ml}$ Lösung an Albumin bzw. Fibrinogen in PBS durch Zugabe von unmarkiertem Protein hergestellt. Durch das bekannte Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Protein konnte auf die totaladsorbierte Menge geschlossen werden. Um den Bedingungen im menschlichen Körper möglichst nahe zu kommen, wurde diesen Lösungen das jeweilige andere unmarkierte Protein in gleicher Konzentration zugesetzt. Die beiden Proteine konkurrieren damit um Bindungsstellen an der Oberfläche des Materials. Zwei Lösungen folgender Zusammensetzung wurden verwendet:

Lösung 1: 20 $\mu\text{g/ml}$ markiertes und unmarkiertes Albumin mit 20 $\mu\text{g/ml}$ unmarkiertem Fibrinogen und

Lösung 2: 20 $\mu\text{g/ml}$ markiertes und unmarkiertes Fibrinogen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ unmarkiertem Albumin.

Die Inkubation der Stents in den Proteinlösungen fand bei 37 °C für 8 Stunden statt. Durch Abzentrifugieren der Stents wurden sie von überschüssiger Lösung befreit und die Aktivität der Stents bestimmt, diese entspricht der Totaladsorption an Protein. Anschließend wurde das reversibel gebundene Protein von der Oberfläche durch Waschen mit PBS entfernt und die Aktivität der Stents bestimmt. Im folgenden Schritt wurden die Stents mit SDS-Lösung gewaschen. Durch die Zugabe des Detergenz sollten nur schwach gebundene Proteine von der Oberfläche gelöst werden.

Bei der Messung der Adsorptionen mit Hilfe der radioaktiven Markierung der Proteine ergibt sich folgendes Bild. Wie aus Abbildung 19 zu erkennen ist, wird an der DLC-Oberfläche nach dem Spülen mit PBS etwa 20 % weniger Fibrinogen adsorbiert wie an der Edelstahloberfläche. Innerhalb der Fehlergrenzen der Messungen und der Streuung der Proben ist diese Adsorption irreversibel und läßt sich mit dem Detergenz SDS nicht wieder in Lösung bringen. Der Einfluß der Passivierung der Oberfläche durch die Elektrolytlösung (Probe 316Lpass) hat sowohl beim Fibrinogen als auch beim Albumin keinen Einfluß auf die Adsorptionsrate.

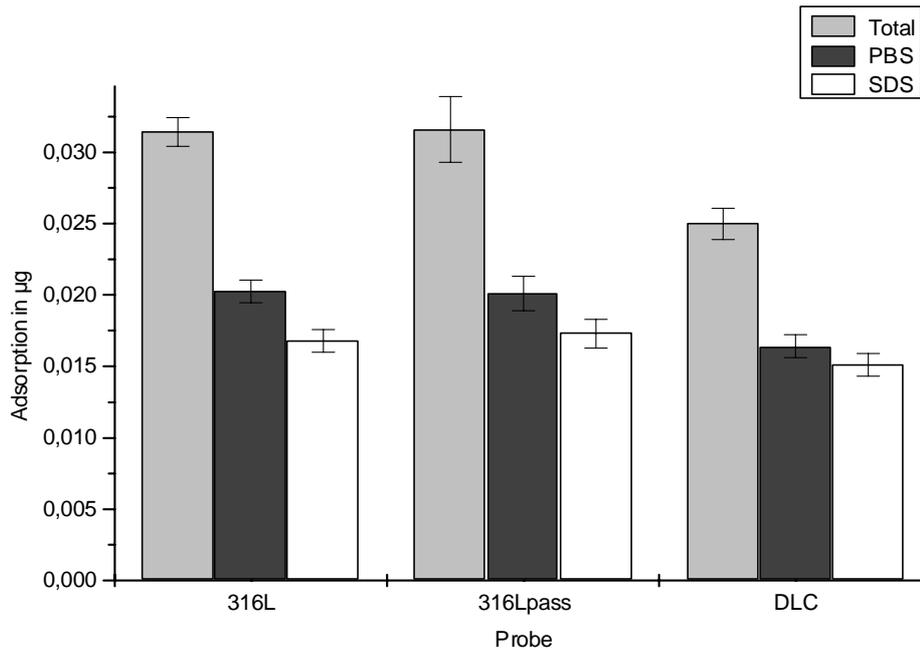


Abbildung 19. Adsorption von Fibrinogen an Stentoberflächen. Unbehandelte Edelstahlstents (Probe 316L), passivierte Edelstahlstents (Probe 316Lpass) und mit 30 nm DLC-beschichtete Stents wurden mit der Lösung 2 (20 µg/ml markiertes und unmarkiertes Fibrinogen mit 20 µg/ml unmarkiertem Albumin) bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde die Aktivität bestimmt (SäuleTotal). Anschließend wurde mit PBS und mit SDS-Lösung gewaschen und jeweils die Aktivität bestimmt (Säule PBS und SDS).

Die Größenordnung der Adsorption von Fibrinogen ist mit den Untersuchungen von Tang et.al. [63] vergleichbar. Dieser fand bei Edelstahl eine Adsorptionsrate von 0,13 µg/cm² und von 0,2 µg/cm² für DLC-beschichtete Proben. Die Stentoberfläche liegt etwa bei 1 cm² und damit sind die erhaltenen Werte vergleichbar. Bei der Adsorption von Albumin findet man ebenfalls keinen großen Unterschied zwischen den Edelstahloberflächen (siehe Abbildung 20). Die Adsorption von Albumin an DLC ist etwa doppelt so groß als an der Edelstahloberfläche.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Biosensorexperimente mit den Adsorptionsraten, die in dieser Versuchsreihe gemessenen Werte, findet man folgendes Bild: Die Werte nach dem Spülen mit PBS liegen beim Biosensorexperiment für Fibrinogen bei 0,15 µg/cm² und bei der Adsorption über das radioaktive Fibrinogen bei 0,32 µg/cm² und damit etwa doppelt so hoch. Insgesamt war auch die Adsorption von Albumin beim Biosensorexperiment geringer und nach dem Spülen mit PBS Puffer im Gegensatz zu dieser Messung vollständig reversibel.

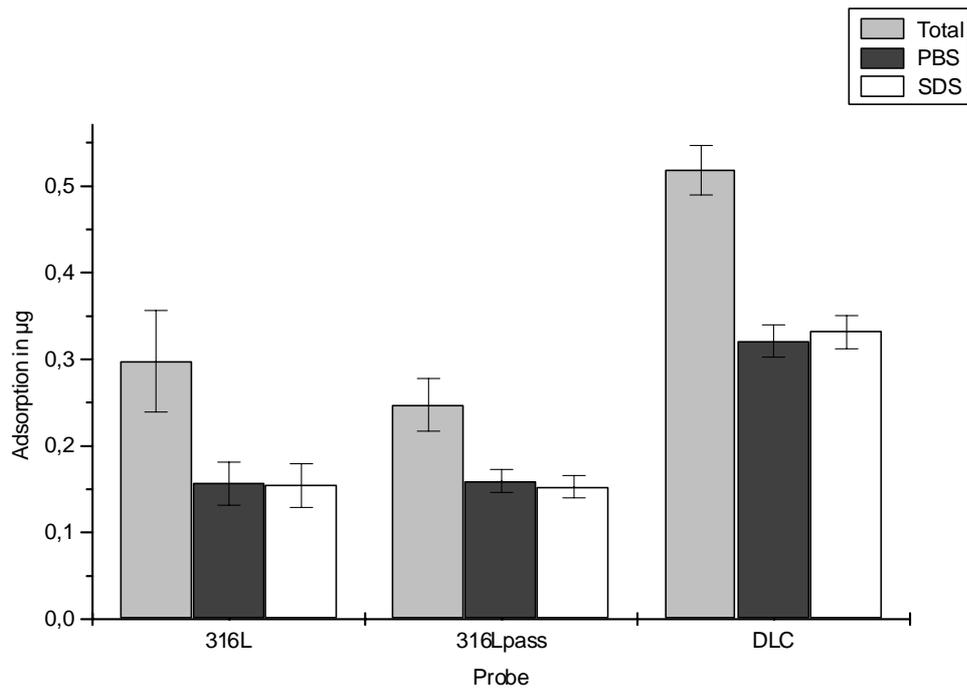


Abbildung 20. Adsorption von humanem Serumalbumin an Stentoberflächen. Unbehandelte Edelstahlstents (Probe 316L), passivierte Edelstahlstents (Probe 316Lpass) und mit 30 nm DLC-beschichtete Stents wurden mit der Lösung 1 (20 µg/ml markiertes und unmarkiertes Albumin mit 20 µg/ml unmarkiertem Fibrinogen) bei 37 °C inkubiert. Nach dem abzentrifugieren wurde die Aktivität bestimmt (Total). Anschließend wurde mit PBS und mit SDS-Lösung gewaschen und jeweils die Aktivität bestimmt (Probe PBS und SDS).

Der Unterschied, der sich zwischen der Messung mit dem DLC-beschichteten Biosensorchip und den DLC-Stents ergibt, kann folgende Ursachen haben: Die Adsorption der Proteine beim Biosensorexperiment fand nur bei Raumtemperatur statt, wogegen beim Test mit den markierten Proteinen die Temperatur auf 37 °C erhöht war. Auch war die Zeit, die die Proteine zur Wechselwirkung mit der Oberfläche hatten, beim Biosensorexperiment wesentlich geringer als bei diesen Versuchen.

In der Arbeit von Tang et.al. [63] und den darin enthaltenen Literaturangaben wird ein Zusammenhang der Fibrinogenadsorption, der Thrombozytenadhäsion und der Thrombogenität der untersuchten Oberfläche vermutet. Bildet man den Quotienten aus der Albuminadsorption zur Fibrinogenadsorption so ist die Thrombogenität einer Oberfläche umso geringer, je größer dieser Quotient ist. Nach der Untersuchung liegt der Quotient für Edelstahl bei 7,5 und bei DLC bei 20. Dies läßt sich nach den hier erhaltenen Ergebnissen bestätigen. Der Aktivierungszustand der Thrombozyten waren bei der durchflußzytometrischen Untersuchung durch Gutensohn [73] bei der DLC Oberfläche eindeutig geringer.

Ebenfalls war die Thrombozytenadhäsion (siehe 3.3) an mit DLC-beschichtete Stents geringer als bei Edelstahlstents. Somit decken sich alle Ergebnisse und lassen eindeutig auf eine geringere Thrombogenität der DLC-Oberfläche schließen.

3.3 Thrombozytenadhäsion an Edelstahl-, DLC- und Heparin-beschichteten Stents

Die Bestimmung der Thrombozytenadhäsionsrate sollte in Ergänzung der von K. Gutensohn [73] durchgeführten Untersuchung über die Thrombozytenaktivierung einen weiteren Hinweis über die Thrombogenität der DLC-Oberflächen im Vergleich zu den Edelstahloberflächen geben.

Hierzu wurden nach bekannten Methoden [82] Thrombozyten aus humanem Blut isoliert und mit radioaktiver Arachidonsäure markiert. Der Zusatz sowohl von Arachidonsäure als auch Adenosindiphosphat versetzt die Thrombozyten in einen aktivierten Zustand, in denen sie zur Aggregation neigen. Alle eingesetzten Stents waren gleicher Bauart und besaßen somit die gleiche Oberfläche. Zur Vereinfachung und um Einflüsse der Meßgeometrie zu verhindern wurden die gemessenen Zählraten bei Edelstahlstents auf 100 % gesetzt und die beschichteten Stents relativ dazu bezogen. Die Heparinstents, die nach der bereits besprochenen Methode beschichtet waren, hatten eine Gesamtaktivität im Faktor Xa-Test von 5,1 mIE/Stent \pm 9,1 %.

Durch die Beschichtung der Stents mit Diamond-Like-Carbon wird die Adhäsion der zur Aggregation neigenden Thrombozyten um fast 60 % erniedrigt (siehe Abbildung 21). Dieser Effekt wird einerseits an der geringeren Oberfläche der DLC-Stents liegen, da Unebenheiten durch die Beschichtung ausgeglichen werden, andererseits aber auch an der offensichtlich geringeren Thrombogenität der DLC-Oberfläche im Vergleich zum Edelmateriale. Zusätzlich aufgebracht Heparin verringert die Adhäsion der Thrombozyten im Vergleich zum Edelstahl um etwa 78 % und im Vergleich zu dem nur mit DLC beschichteten Stent noch einmal um weitere 47 %. Damit stehen diese Untersuchungen im Einklang mit den Ergebnissen von Yasuda et. al. [74] der eine Reduktion der Thrombozytenadhäsion an einer DLC-Oberfläche im Vergleich zu einer Edelstahloberfläche von 66 % fand. Die Abweichung in den Ergebnissen können einerseits an der unterschiedlichen verwendeten Meßmethode liegen,

andererseits aber auch an den unterschiedlichen chemischen und physikalischen Zusammensetzungen der untersuchten DLC-Beschichtungen.

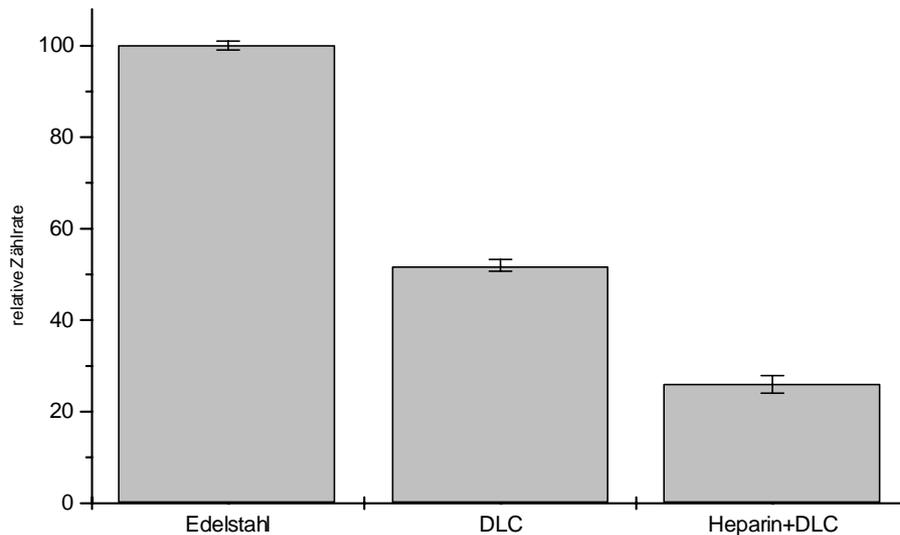


Abbildung 21. Bestimmung der Thrombozytenadhäsion an Edelstahl-, DLC- und Heparin-beschichteten Stents. Edelstahlstents, mit DLC-beschichtete Edelstahlstents und Heparinbeschichtete DLC-Stents wurden bei 37 °C in Plasma inkubiert. Die Thrombozyten wurden zuvor mit radioaktiver Arachidonsäure markiert. Nach dem Abwaschen von nichtadsorbierten Thrombozyten wurde die Aktivität der Stents in einem Flüssigszintillator gemessen. Um dem Einfluß der Meßgeometrie Rechnung zu tragen wurde die Aktivität des Edelstahlstents auf 100 % gesetzt und die anderen Proben relativ dazu angegeben.

Die hier erzielten Ergebnisse decken sich auch mit den Untersuchungen von K. Gutensohn [73] am gleichen Material, bei dem der DLC-Stent eine geringere Aktivierung der Thrombozyten zeigte. Insgesamt ist daher davon auszugehen, daß durch die Beschichtung der Stentoberfläche mit dem Diamond-Like-Carbon eine deutliche Reduktion der Thrombogenität einher geht und somit die Rate der Thrombosefälle beim Einsatz im Menschen geringer sein sollte.

3.4 Elektrochemische Korrosionsuntersuchungen

Anhand der elektrochemischen Korrosionsuntersuchung sollte die Beständigkeit der beschichteten Stents mit den unbeschichteten verglichen werden. Dazu wurden Spannungsverläufe generiert und der auftretende Stromfluß mit Hilfe eines Potentiostaten aufgezeichnet. Die Versuche wurden in einer auf 37 °C temperierten Meßzelle durchgeführt. In Abbildung 22 ist deutlich zu erkennen, daß

der Edelstahlstent bereits bei geringeren Spannungen einen deutlichen Anstieg und somit Korrosion zeigt als der beschichtete Stent.

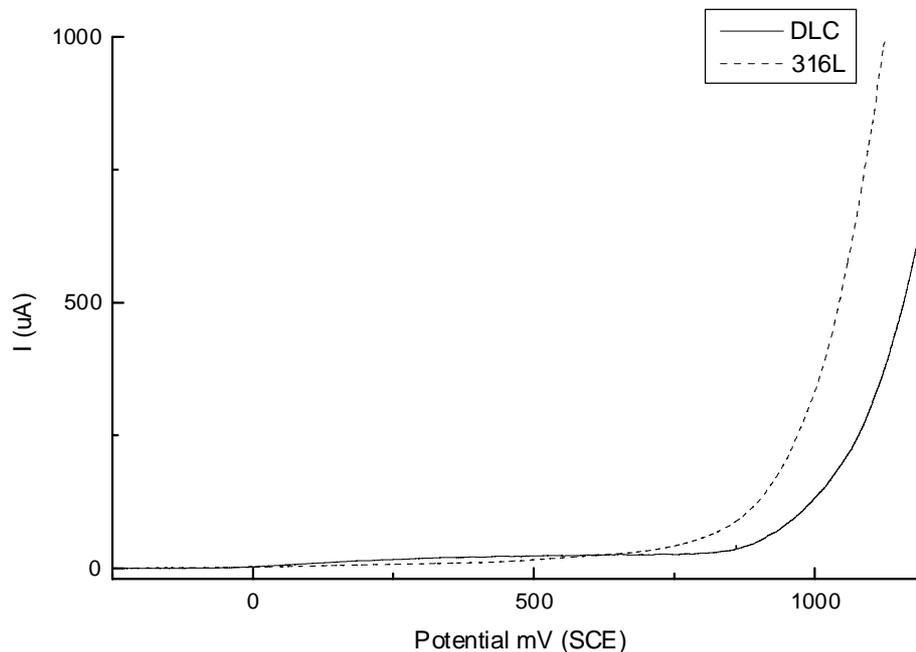


Abbildung 22. Bestimmung des Durchbruchpotentials für verschiedene Stents. Ein Edelstahlstent (316L) und ein mit DLC-beschichteter Stent wurden in HBBS-Puffer einem Potential von -700 - (+) 1400 mV (SCE) ausgesetzt und der Strom gemessen.

Die Lage des Durchbruchpotentials ist beim DLC-Stent um ca. 150 mV verschoben. Dies läßt sich dadurch erklären, daß DLC ähnlich einer Passivierungsschicht die Korrosion und den Ionenfluß hemmt und somit eine schützende Wirkung besitzt.

Anhand der Tafelgerade wurde aus den generierten Spannungsverläufen in der Nähe des Gleichgewichtspotentials mit Hilfe der Software die Korrosionsrate bestimmt. Dabei wurde die Fläche des Stents mit 1 cm^2 und als Elektrodenmaterial Eisen mit einer Wertigkeit von 2, da im basischen Bereich bei pH 7,4 gearbeitet wurde, angenommen.

Bereits die Lage der Kurven auf der y-Achse zeigt einen um etwa eine Zehnerpotenz niedrigeren Stromverlauf bei der DLC beschichteten Probe (vergleiche Abbildung 23 und 24). Je geringer der Stromfluß, desto geringer ist die geflossene Ladung und damit die Korrosion. Die Softwareberechnungen ergaben die Daten der Tabelle 7.

Auch anhand der Korrosionsdaten der elektrochemischen Messung ist eindeutig zu erkennen, daß die DLC-Beschichtung eine schützende Funktion besitzt.

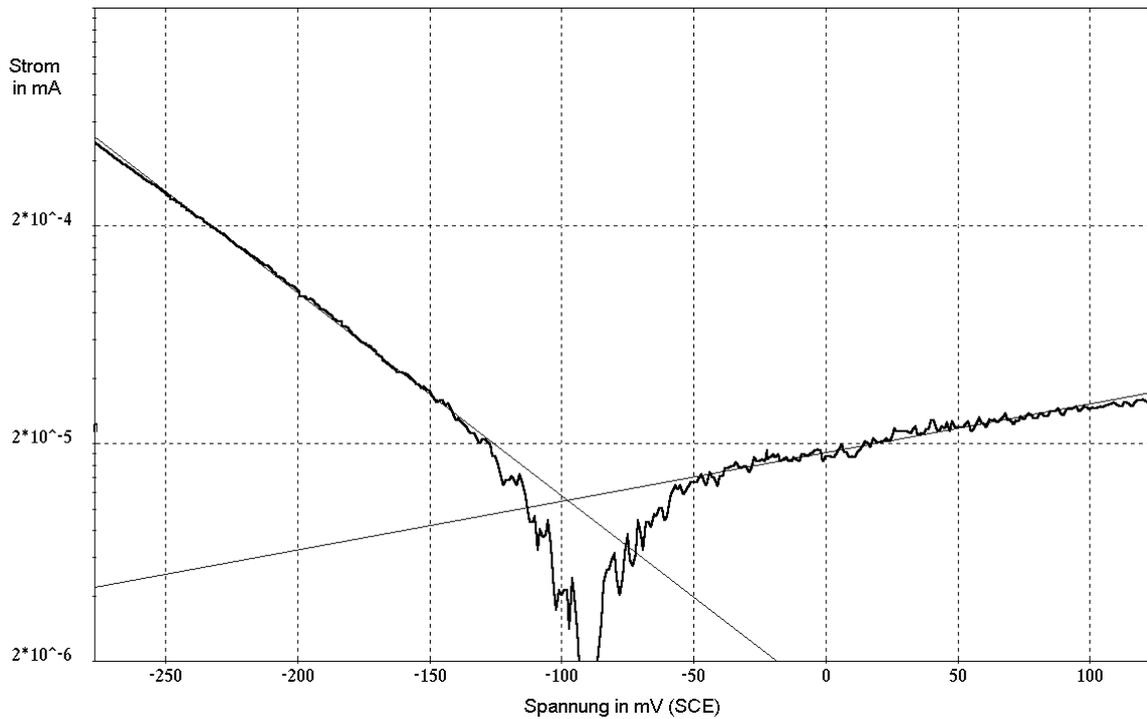


Abbildung 23. Bestimmung der Tafelgeraden für DLC-beschichtete Stents. Ein mit DLC-beschichteter Stent wurden in HBBS-Puffer einem Potential von -700 - (+) 1400 mV (SEC) ausgesetzt und der Strom gemessen. Die obige Abbildung zeigt mit logarithmischer Darstellung den Stromfluß nahe des Gleichgewichtspotentials. Aus den Tafelgeraden läßt sich die Korrosionsrate bestimmen.

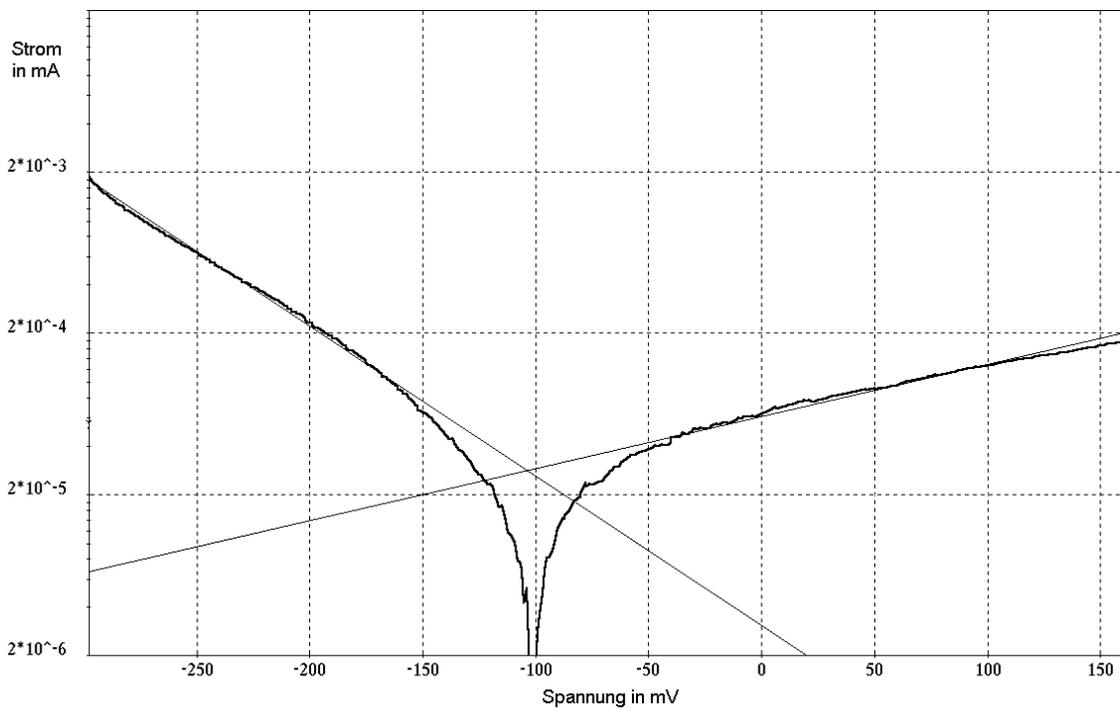


Abbildung 24. Bestimmung der Tafelgeraden für unbeschichtete Stents. Ein Edelstahlstent wurde in HBBS-Puffer einem Potential von -700 - (+) 1400 mV (SEC) ausgesetzt und der Strom gemessen. Die obige Abbildung zeigt mit logarithmischer Darstellung den Stromfluß nahe des Gleichgewichtspotentials. Aus den Tafelgeraden läßt sich die Korrosionsrate bestimmen.

Die ermittelte Korrosionsrate ist von 319 nm/Jahr auf 119 nm/Jahr gesunken und somit um 63 % geringer als bei der unbeschichteten Probe.

Tabelle 7. Zusammenstellung von Korrosionsdaten für Edelstahl- und DLC-beschichtete Stents.

Probe 316L: Edelstahlstent, Probe DLC: DLC-beschichteter Stent, I (Korr)=Korrosionsstrom, Korr.-Rate=Korrosionsrate, zur Tafelgerade und Berechnung siehe Kapitel 4.2.6.2.

Probe	Tafelkonstante anodisch	Tafelkonstante kathodisch	I(korr)	Korr.-Rate
316L	309,8	-107,7	14 nA	319 nm/J
DLC	425,8	-107,9	5 nA	119 nm/J

3.5 *In vivo*-Korrosionsverhalten

Durch die Implantation von Edelstahlstents (316L) und DLC-beschichteten Stents sollte das Korrosionsverhalten *in vivo* verglichen und gleichzeitig der Nachweis erbracht werden, daß Metallionen in das umliegende arterielle Gewebe diffundieren. Hierzu wurden in Kaninchenarterien Stents implantiert und auf 3,2 mm expandiert, was dem durchschnittlichen Durchmesser bei der expandierten Stents beim Menschen entspricht. Damit wurde die mechanische Belastung der Stentoberflächen weitgehend nachempfunden. Nach einer 4-wöchigen Verweilzeit, bei denen den Kaninchen normale Kost verabreicht wurde, entfernte man die betreffenden Aorten und teilte diese in drei Bereiche ein, den Stentbereich, dem Bereich 0-0,2 cm nach dem Stent und 0,2 - 0,5 cm vom Stent entfernt. Da die Hauptbestandteile im Edelstahl neben Eisen, Nickel und Chrom sind, wurde deren Konzentration im Gewebe durch AAS bestimmt. Als Referenzprobe diente ein Aortenstück ohne jeglichen Kontakt mit Implantaten. Wie aus Abbildung 25 eindeutig zu erkennen ist, werden durch die Korrosion der implantierten Stents Metallionen in das umliegende Gewebe abgegeben. Diese Metallionen scheinen sogar im Aortagewebe weiter distal und proximal zum Stent zu diffundieren. Ansonsten wäre der Befund, daß die Metallionenkonzentrationen auch in den umliegenden Bereichen noch erhöht war, nicht zu erklären.

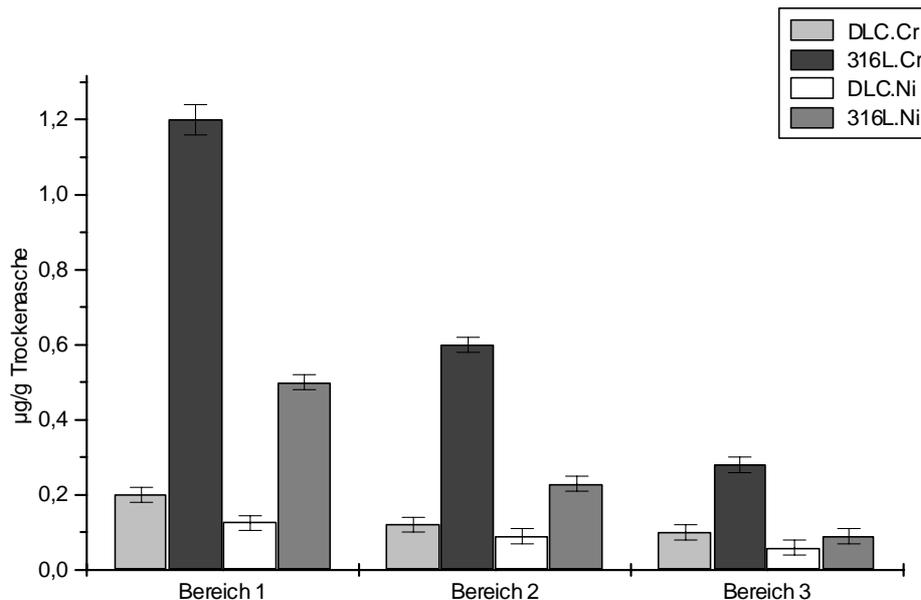


Abbildung 25. Metallionenkonzentration in Kaninchenaorten nach Implantation von Edelstahl- und DLC-Stents nach 4 Wochen. Mit DLC-beschichtete Stents und Edelstahlstents (316L) wurden in Kaninchenaorten implantiert. Nach 4 Wochen wurden die Aorten entfernt und die Metallionenkonzentration von Chrom und Nickel durch AAS in dem Bereich 1: direkt unter dem Stent, dem Bereich 2: 0 - 0,2 cm vor und nach dem Stent und dem Bereich 3: 0,2 - 0,5 cm vom Stent entfernt bestimmt.

Im Bereich 1 der Stentlegung ist die Konzentration erwartungsgemäß am höchsten und nimmt ab, je weiter man sich vom eigentlichen Stentbereich entfernt. Der DLC-beschichtete Stent zeigt eine deutliche Reduktion der Metallionenkonzentration um etwa 84 % für Chrom und um 80 % für Nickel. Dies läßt eindeutig auf eine geringere Korrosionsrate der beschichteten Stents *in vivo* schließen. Die Bedeutung der geringeren Freisetzung wurde bereits eingangs in Kapitel 2.5.2.2 erläutert. Durch die deutlich geringere Freisetzung der Metallionen in das umliegende Gewebe muß kann daher von einer geringeren Stimulierung der Endothelzellen und damit von einer reduzierten Adhäsion von Granulozyten ausgegangen werden. Dies sollte insgesamt zu einer besseren Verträglichkeit des Implantats im umliegenden Gewebe führen.

3.6 Zellkulturuntersuchungen

Mit Hilfe von Zellkulturen ist es möglich, die Bio- und Hämokompatibilität von Materialien zu beurteilen [75]. Die ISO-Norm 10993 schreibt die Standards vor, nach denen solche Test verlaufen sollen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die

Beurteilung der Biokompatibilität das Wachstumsverhalten von Endothelzellen und polymorphkernige Granulozyten untersucht.

3.6.1 Humane Endothelzellen

Endothelzellen kleiden die Gefäßwand aus und es ist nach den Ausführungen im Kapitel 2.4.1 notwendig, daß sie auf dem verwendeten Diamond-Like-Carbon-Material gut wachsen.

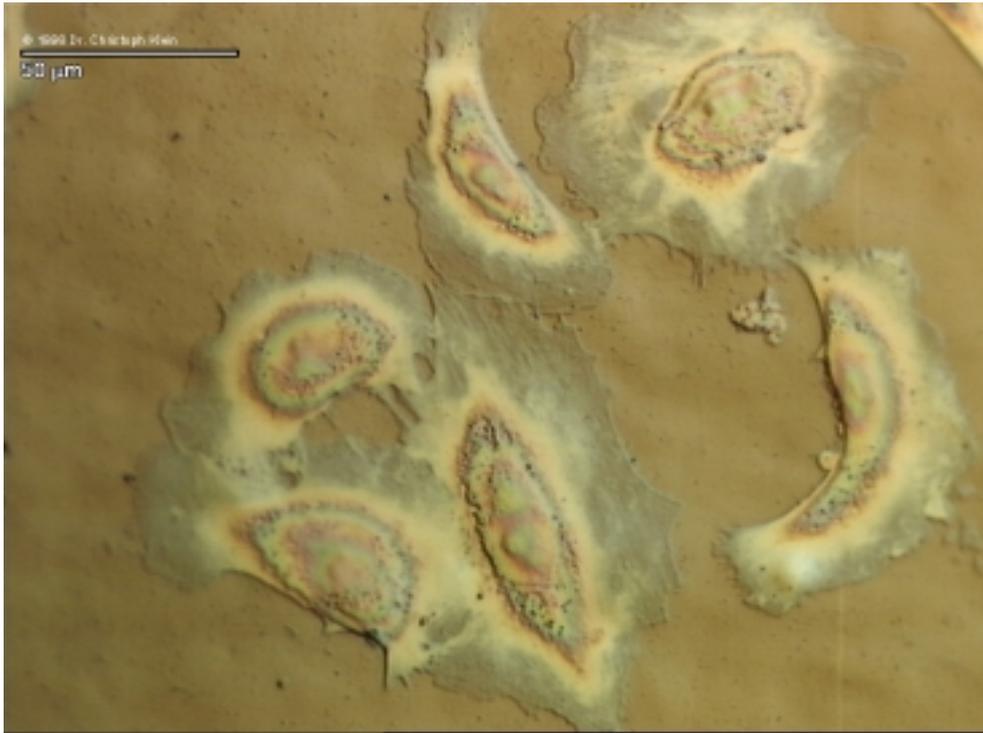


Abbildung 26. Lichtmikroskopische Aufnahme von Endothelzellen auf DLC-beschichteten Edelstahlplättchenⁱⁱ. Humane Endothelzellen wurden aus der Nabelschnurvene isoliert und in einem Gemisch aus Ham's F12 und Iscove's modified Dulbecco's Medium mit 10 % humanem Serum kultiviert. Die mit DLC-beschichtete Edelstahlplatte wurde in einer Fließkammer mit dem Zellmedium bei 37 °C für 4 h umspült. Die Aufnahme wurde bei 600-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop erstellt.

Um darüber eine Aussage treffen zu können, wurden Edelstahlfolien in den Abmessungen eines handelsüblichen Objektträgers zugeschnitten und wie die Edelstahlstents elektropoliert, passiviert und mit 500 Å DLC beschichtet. Als Referenz diente eine Edelstahlfolie mit gleicher Vorbehandlung aber ohne DLC-Schicht. Die Folien wurden vor den Zellkulturuntersuchungen mit Alkohol sterilisiert. Auf Dampfsterilisierung wurde verzichtet, da dabei die Gefahr des

ⁱⁱ Ich danke Herrn Dr. C. Klein, Universität Mainz für die Erstellung der Bilder

Abplatzens der DLC-Beschichtung besteht. Die so präparierten Folien wurden sowohl unter statischen Bedingungen für 24 Stunden, als auch in einer Durchflußkammer über 4 Stunden mit der Zellkulturlösung inkubiert, um die Beständigkeit der Endothelzellschicht gegen Scherkräfte, die durch Strömungen verursacht werden, zu beurteilen.



Abbildung 27. Lichtmikroskopische Aufnahme von Endothelzellen auf Edelstahl^{II}. Humane Endothelzellen wurden aus der Nabelschnurvene isoliert und in einem Gemisch aus Ham's F12 und Iscove's modified Dulbecco's Medium mit 10 % humanem Serum kultiviert. Die Edelstahlplatte wurde in einer Fließkammer mit dem Zellmedium bei 37 °C für 4 h umspült. Die Aufnahme wurde bei 600-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop erstellt.

Die human primär isolierten Endothelzellen aus der Umbilicalvene zeigen auf der Diamond-Like Carbon Oberfläche eine regelrechte Ausbreitung im subkonfluenten Stadium (siehe Abbildung 26). Deutlich ist das gespreitete Zytoplasma der Zellen, welches gut an der Oberfläche anliegt. Die Adhäsion der Zellen und die Scherstabilität ist somit höher einzuschätzen als auf dem Edelstahlmaterial (siehe Abbildung 27). Auf den Edelstahloberfläche lassen die langen zytoplasmatischen Ausläufer in nicht-adhäsive Regionen auf eine schlechtere Adhäsion mit der Oberfläche schließen. Gelegentlich treten aber auch auf der Edelstahloberfläche gute Adhäsion und Verankerungen zwischen Zellen im Verband auf. Insgesamt ist die bessere Ausbreitung und Adhäsion der Endothelzellen auf der DLC-

Oberfläche ein eindeutiger Hinweis für die bessere Biokompatibilität des untersuchten Materials.

Man kann daher von einer schnelleren Endothelialisierung der beschichteten Stents ausgehen, was einerseits zur Verminderung der Thrombogenität führen sollte, andererseits werden dadurch unspezifische Abwehrreaktionen verhindert, da dadurch eine natürliche Umgebung hergestellt wird.

3.6.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Wie in Kapitel 2.4.1 erläutert sind PMN-Granulozyten für die unspezifische Immunabwehr verantwortlich und stellen daher in ihrer Wechselwirkung mit Implantatmaterialien einen guten Parameter zur Beurteilung der Biokompatibilität dar. Daher wurden Edelstahlplättchen analog der Stents elektropoliert und mit DLC beschichtet und mit Zellkulturlösungen inkubiert.

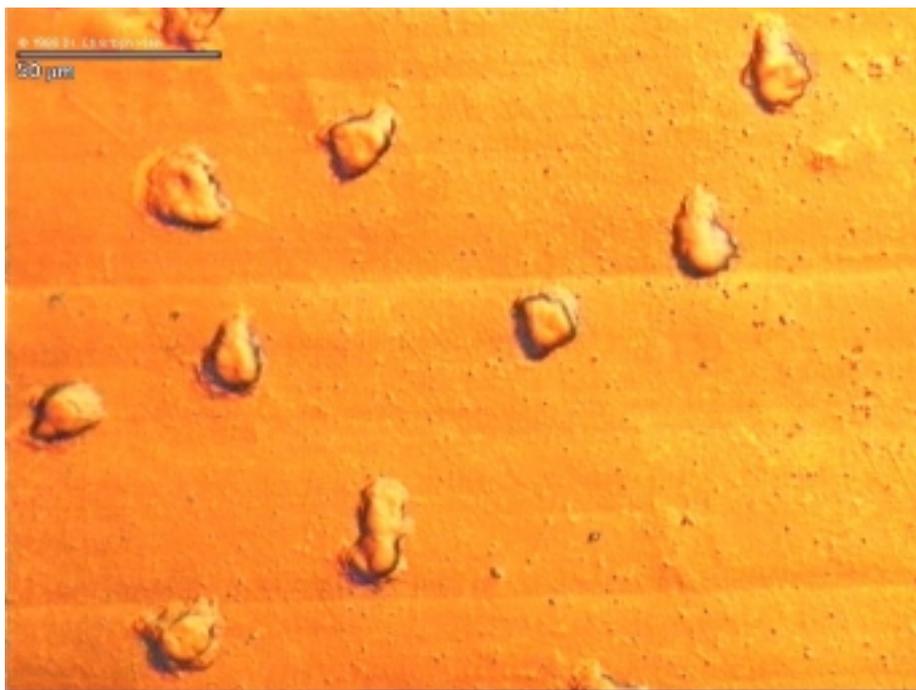


Abbildung 28. Lichtmikroskopische Aufnahme von PMN Granulozyten auf einer DLC-Oberfläche. Die PMN-Granulozyten wurden aus Citratblut durch eine Ficoll-Dichteauftrennung isoliert und in RPMI-Medium aufgenommen. Das mit DLC-beschichtete Edelstahlplättchen wurde für 30 Minuten bei 37 °C der Zellkulturlösung ausgesetzt. Anschließend wurden nicht adhärenente Zellen mit RPMI-Medium gewaschen und das Präparat bei 600 facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop aufgenommen.

Sowohl die Zahl als auch der Grad der Aktivierung der PMN-Granulozyten sind auf der DLC-Oberfläche deutlich vermindert (Vergleich von Abbildung 28 mit Abbildung 29). Die sehr auffällige starke Aktivierung der Granulozyten an der

Edelstahloberfläche, die zur Ausbildung langer Pseudopodien und zur Auflösung der Zelle im Spätstadium der Abwehrreaktion führt, ist bei der DLC-Oberfläche nicht zu beobachten. Für DLC sind teilweise zytoplasmatische Ausstülpungen zu beobachten, größtenteils bleibt die Morphologie der Zellen rundlich und damit nur mäßig aktiviert.

Zusammenfassend läßt sich bei dieser Untersuchung eine nur geringe Aktivierung und somit geringe Abwehrreaktion der DLC-Oberfläche feststellen, was auf eine gute Biokompatibilität schließen läßt.



Abbildung 29. Lichtmikroskopische Aufnahme von PMN Granulozyten auf einer Edelstahloberfläche. Die PMN-Granulozyten wurden aus Citratblut durch eine Ficoll-Dichteaufftrennung isoliert und in RPMI-Medium aufgenommen. Das Edelstahlplättchen wurde für 30 Minuten bei 37 °C der Zellkulturlösung ausgesetzt. Anschließend wurden nicht adhärenente Zellen mit RPMI-Medium gewaschen und das Präparat bei 600 facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop aufgenommen.

3.7 Heparinbeschichtung von Stents

Die Beschichtung von Stents mit Heparin wird in der Literatur zur Verbesserung der Thrombogenität diskutiert. Außerdem existieren Hinweise über die Hemmung des Wachstums von glatten Muskelzellen. Für die Beschichtung von Stentoberflächen kommen sowohl das hochmolekulare als auch das niedermolekulare Heparin in Betracht. Das einfache hochmolekulare Heparin besitzt zwar eine höhere Aktivität, im Gegensatz zum niedermolekularen Heparin,

welches durch hydrolytische Spaltung aus dem hochmolekularen gewonnen wird. Leider kommt es stellenweise bei manchen Patienten bei der Verwendung des hochmolekularen Heparins zur HIT. Dieses ist eine durch Antikörper ausgelöste Aktivierung der Thrombozyten, welche eine Thrombose verursacht (Heparin-induzierten Thrombocytopenie) [76]. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Möglichkeit erarbeitet werden, die gute bio- und hämokompatible Eigenschaft der DLC-Oberfläche mit den Eigenschaften des hoch- und niedermolekularen Heparins zu vereinen.

Bei dem Vorhaben eine chemisch nahezu inerte Diamond-Like-Carbon-Oberfläche mit einem Molekül wie Heparin zu beschichten, hat man mehrere Probleme zu beachten:

Heparin ist in ausreichenden Mengen nur in Wasser löslich. Möchte man über Derivate des Heparins eine Oberflächenbeschichtung durchführen, ist das Risiko des Verlusts der biologischen Aktivität, d.h. der Hemmung der Blutgerinnung groß. Des weiteren ist bekannt, daß durch die bisher durchgeführten Derivatisierungen zur kovalenten Oberflächenbeschichtung stets zu Einbußen der Aktivität geführt haben, da dabei die Bindungsstellen des Heparins verändert wurden. Die bekannte Alternative der Endgruppen-Kopplung läßt sich an der DLC-Oberfläche mangels reaktiver Gruppen nicht durchführen. Eine erste Aktivierung der DLC-Oberfläche sollte aber vermieden werden, da damit mit großer Wahrscheinlichkeit auch die bereits bekannte und gute Bio- und Hämokompatibilität dieser Oberfläche verändert werden würde. Eine ionische Bindung von Heparin, die über kationische Polymere verläuft, hat den Nachteil, daß das Heparin insbesondere im Kontakt mit Blut sehr schnell ausgewaschen wird. Vorteile bei dieser Art der Beschichtung ist aber die einfache Ausführbarkeit und die erzielte hohe biologische Aktivität des Heparins. Daher wurde versucht, das zuerst ionisch gebundene Heparin mittels einer lichtinduzierten Carbenbildung mit einem kationischen Polymer und dieses gleichzeitig an die Oberfläche zu koppeln. Das für die Carbenbildung verwendete 3-(Trifluormethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)-diazirin (TRIMID) hat sich nach der Literatur für die einfache kovalente Kopplung an Glasfaseroberflächen und inerte Polymermembranen bereits bewährt [86].

3.7.1 Herstellung von Polyethylenimin-TRIMID

Die Isothiocyanogruppe des TRIMID-Moleküls reagiert bekanntlich leicht mit Aminofunktionen des verwendeten kationischen Polymers Polyethylenimin. Die Reaktionsfolge ist in Abbildung 30 dargestellt.

Das Polyethylenimin (PEI) wurde hierzu zuvor in einem Dialyseschlauch durch Dialyse gegen Wasser von niedermolekularen Bestandteilen und insbesondere von monomeren Aminen befreit.

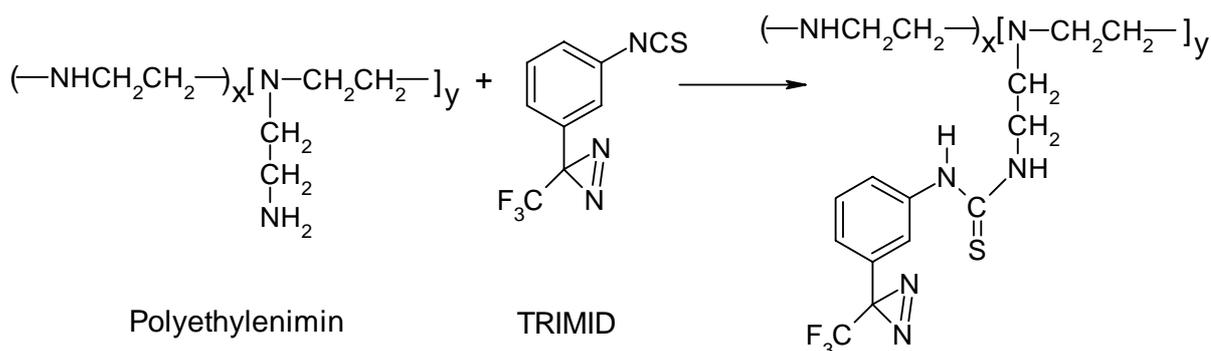


Abbildung 30. Syntheschema zur Herstellung von Polyethylenimin-3-(trifluormethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)-diazirin (TRIMID).

Den genauen Gehalt des so gewonnenen Polyethylenimins wurde durch Entfernen des Wassers und durch anschließendes Wiegen bestimmt, damit eine exakte Reaktionsführung möglich wurde. Das nur in organischen Lösungsmitteln lösliche TRIMID wurde in Ethanol gelöst und der wässrigen PEI-Lösung zugegeben. Nach der Reaktion bei 50 °C konnte durch einfache Dialyse gegen Wasser überschüssiges, nicht abreagiertes TRIMID, entfernt werden.

Die Gehaltsbestimmung des TRIMIDS pro Polyethyleniminmolekül wurde durch Belichten einer Lösung mit bekannter Konzentration und dem spezifischen Absorptionskoeffizienten von TRIMID berechnet. Hierzu wurde eine Lösung von PEI-TRIMID in Wasser hergestellt und eine Absorptionsspektrum aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit UV-Licht bestrahlt und erneut ein Spektrum aufgenommen (Abbildung 31). Die maximale Absorptionsdifferenz liegt bei einer Wellenlänge von 348 nm. Aus dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{348} = 2,24$ mmol/lcm, dem mittleren Molekulargewicht des PEI von 750000 Da und der Konzentration von $2,67 \times 10^{-6}$ mol/l berechnete sich ein Derivatisierungsverhältnis von

$$\frac{\text{TRIMID}}{\text{PEI}} = \frac{140}{1}$$

1

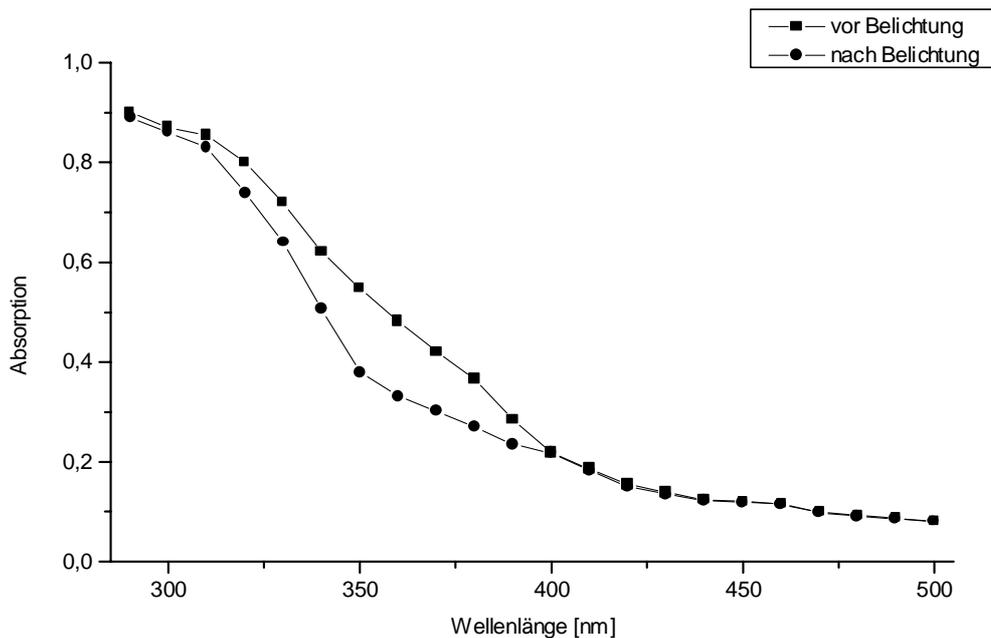


Abbildung 31. Absorptionsspektrum von PEI-TRIMID. Es wurde eine Lösung der Substanz mit einer Konzentration von $2,67 \times 10^{-6}$ mol/l in Wasser hergestellt und ein Absorptionsspektrum in einer 1 cm Küvette aufgenommen. Anschließend wurde die Küvette in einer UV-Kammer bestrahlt und erneut gemessen.

3.7.2 Untersuchung über das ionische Bindungsvermögen an DLC-Oberflächen

Um Heparin durch ionische Bindungen über das kationische Polyethylenimin-TRIMID an DLC-Stents zu binden, ist es notwendig, daß die Bindung des PEI-TRIMIDS an die DLC-Oberfläche und die anschließende Bindung des Heparins an das PEI-TRIMID-Polymer unter den gewählten Bedingungen zumindest so stark sind, daß sie durch Spülen mit Wasser nicht wieder ausgewaschen wird. Dieser Schritt ist notwendig, um überschüssiges Heparin von der Oberfläche zu waschen. Um dieses Verhalten zu untersuchen, wurden ein Biosensorexperiment mit DLC-beschichteten Biosensorchips analog der Versuche mit Albumin/Fibrinogen durchgeführt.

Nach dem Äquilibrieren mit PBS (siehe Abbildung 32, 1) findet die Adsorption von PEI-TRIMID an die DLC-Oberfläche statt (2), auch durch Spülen mit PBS (3) läßt sich dieses nicht wieder von der Oberfläche entfernen. Das Heparin bindet an die so hergestellte PEI-TRIMID-Oberfläche sehr stark, was an dem steilen Anstieg

des Brechungsindexes erkennbar ist (4). Auch hier zeigte sich, daß das ionisch gebundene Heparin durch Spülen mit PBS nicht wieder entfernt werden kann (5).

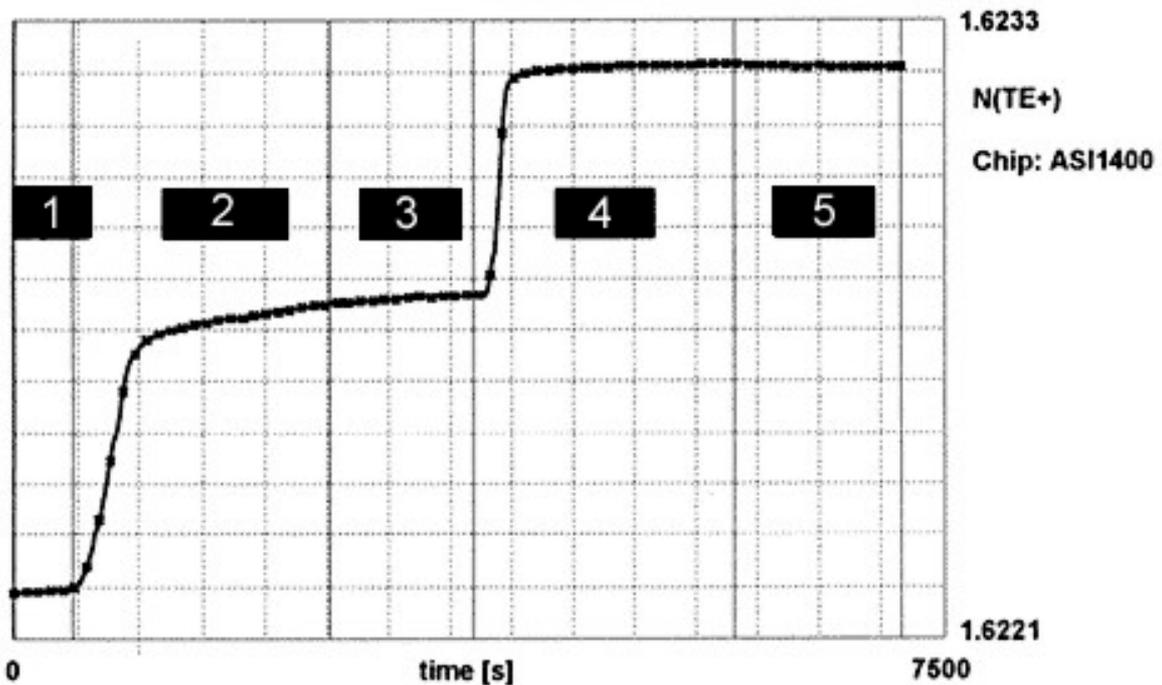


Abbildung 32. Änderung des Brechungsindex bei der Adsorption von PEI-TRIMID und Heparin auf eine DLC-Oberfläche. Ein mit DLC-beschichteter Biosensor wurde mit PBS äquilibriert (1). Anschließend wurde eine PEI-TRIMID-Lösung (50 µg/ml) in PBS aufgetragen (2) und erneut mit PBS gespült (3). Auf die PEI-TRIMID-Schicht adsorbierte man die Heparinschicht (4), indem man eine Lösung von 50 µg/ml Heparin in PBS über den Biosensorchip pumpte. Das gebundene Heparin konnte auch durch Spülen mit PBS nicht entfernt werden (5).

Leider läßt der apparative Aufbau eine Belichtung der Oberfläche nicht zu, so daß es mit der Biosensormethode nicht möglich ist, den Nachweis einer kovalenten Bindung nach dem Belichten nachzuweisen.

Nach der so erarbeiteten Methode konnten dann Stents mit Heparin ionisch beschichtet werden. Die kovalente Bindung wurde durch Belichten der Stents in einem Stratalinker 2400 hergestellt. Bei der Belichtung wird durch Abspaltung von Stickstoff ein reaktives Carben gebildet (siehe Abbildung 33). Das sehr reaktive Carben bildet statistisch verteilt inter- und intramolekulare Bindungen zu Polyethylenimin und führt somit zu einer Vernetzung. Weiterhin reagiert das Carben teilweise mit Doppelbindungen an der DLC-Oberfläche und führt somit zu einer kovalenten Kopplung.

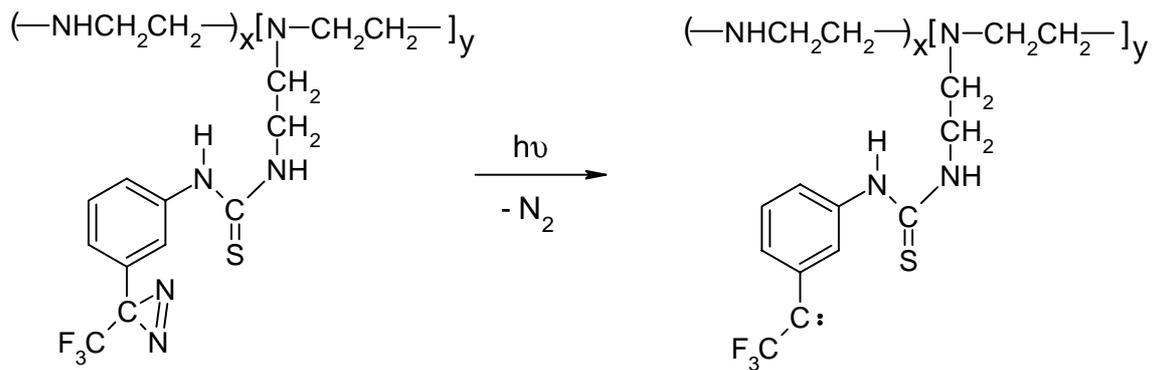


Abbildung 33. Carbenbildung bei PEI-TRIMID. Durch das Belichten von PEI-TRIMID mit UV-Strahlung $<350\text{nm}$ wird unter Bildung eines Carbens Stickstoff abgespalten.

3.7.3 Aktivitätsbestimmung von Heparin

Zur Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirkung von Heparin haben sich verschiedene Testsysteme etabliert. Neben einfachen colorimetrischen Methoden, wie dem Toluidinblau-Test und der Hydrolyse von Auramin O, bei denen eine einfache Quantifizierung erfolgt, wird bei dem Gerinnungstest mit recalcifiziertem Plasma die Zeitverzögerung durch Heparinzusatz bei der Gerinnung gemessen. Der in dieser Arbeit verwendete Faktor Xa-Test wurde bereits in anderen Arbeiten zur Charakterisierung von an Oberflächen gebundenem Heparin herangezogen [19]. Mit einer Maßlösung bekannter Aktivität wurde eine Eichkurve für das verwendete Heparin erstellt, aus der später unter gleichen Bedingungen auf die Aktivität an der Oberfläche geschlossen wurde.

In Abbildung 34 zeigt die Reproduzierbarkeit der Heparinbeschichtung unter gleichen Bedingungen für das HM-Heparin für fünf unabhängige Experimente. Wie Abbildung 34 zeigt, ist es mit der erarbeiteten Methode möglich eine reproduzierbare Heparinbeschichtung mit einer durchschnittlichen Aktivität von $5,2\text{ mIE}$ und einer Abweichung von $\pm 10\%$ auf Stents herzustellen. Ebenfalls wurden DLC-beschichtete Edelstahlplättchen nach dem gleichen Verfahren hergestellt, um eine Flächenaktivität zu bestimmen. Sie betrug $0,47\text{ (IE/cm}^2) \pm 10\%$, was einer Heparinmenge von $2,6\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ entspricht (Ausgangsaktivität des eingesetzten Heparins war $176,6\text{ IE/mg}$). In anderen Arbeiten wurden vergleichbare Aktivitäten je nach Beschichtungsmethode zwischen $0,2 - 0,6\text{ IE/cm}^2$ gemessen [21,20].

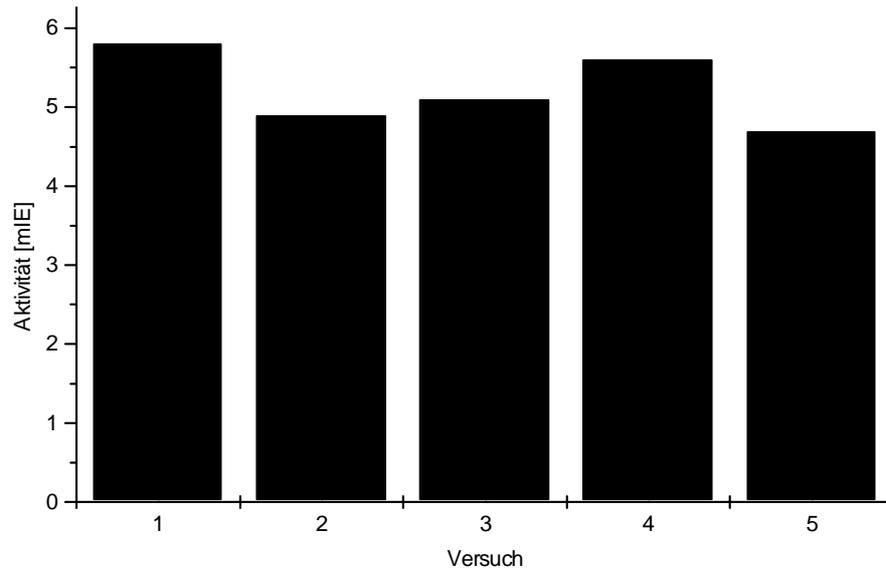


Abbildung 34. Reproduzierbarkeit der Heparinbeschichtung von Stents. In fünf unabhängigen Versuchen wurde die Heparinbeschichtung unter gleichen Bedingungen auf Stents hergestellt, um die Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Die Stents wurden für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in einer Lösung von 0,2 mg/ml PEI-TRIMID in PBS/Wasser (1:10, v/v) inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in Wasser gewaschen. Das Heparin wurde durch Inkubieren mit einer Lösung von 0,2 mg/ml Heparin in PBS/Wasser (1:10, v/v) für 1 h bei Raumtemperatur adsorptiv gebunden. Die Stents wurden nach 5-minütigem Waschen mit Wasser durch Lyophilisieren getrocknet. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Belichtung in einem Stratalinker (Stratagene) im Abstand von 5 cm von der Lichtquelle (350 nm).

Damit liegt die entwickelte Methode bezüglich der Aktivitätsbelegung in vergleichbarem Rahmen. Für das niedermolekulare Heparin betragen die erreichbaren Aktivitäten $0,17 \text{ (IE/cm}^2) \pm 13 \%$. Die geringere Aktivitätsbelegung beim niedermolekularen Heparin ist auf die bereits geringere Ausgangsaktivität des Grundmaterials zurückzuführen.

3.7.4 Untersuchung zur ionischen oder kovalenten Heparinbindung auf Stentoberflächen

Weiterhin mußte geklärt werden, ob die Bindung des Heparins ionischer oder kovalenter Natur ist. Dazu wurde versucht das ionisch gebundene und anschließend belichtete Heparin durch einstündiges Waschen mit hochmolarer Kochsalzlösung (3 M NaCl in PBS pH 7,4) zu entfernen. Nach Spülen des so behandelten Stents mit PBS wurde die Aktivität des Heparins bestimmt und eine Abnahme der Aktivität um 67 % festgestellt. Hieraus könnte geschlossen werden,

daß ein Großteil des Heparins nur ionisch gebunden ist und durch die hochmolare Salzlösung die ionischen Bindungen gelöst werden. Weiterhin ist es aber auch möglich, daß durch die hochmolare Salzlösung es zu einer sterischen Änderung des Heparins kommt, was zu einer Abnahme der Aktivität führen könnte. Um diese Theorie zu untermauern wurde eine Heparinlösung mit bekannter Aktivität hergestellt und 3 mol/l Kochsalz zugegeben. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Lösung so mit Wasser verdünnt, daß die Salzkonzentration unter 0,9 % lag. Auch hier zeigte sich eine Abnahme der Heparinaktivität um 53 %. Daraus wurde geschlossen, daß die Abnahme der Heparinaktivität bei den mit Salzlösung inkubierten Stents vermutlich auf Konformationsänderungen oder andere Effekte zurückzuführen ist. Um die Frage zu klären ob das Heparin kovalent oder ionisch gebunden ist, wurde ein colorimetrisches Testverfahren, welches unabhängig von der biologischen Aktivität des Heparins ist, verwendet.

Die Masse an oberflächlich gebundenem Heparin kann man durch Komplexbildung des Heparins mit Toluidinblau bestimmen. Durch quantitative Bestimmung des gebildeten Komplexes mittels Absorptionsspektroskopie läßt sich auf die gebundene Heparinmenge schließen. Leider ließ sich dieses Verfahren nicht für das oberflächlich gebundene Heparin adaptieren, da die Nachweisgrenze bei diesem Verfahren zu gering war.

Deshalb wurde ein Verfahren adaptiert, in dem Heparin als Katalysator bei der Hydrolyse des Farbstoffs Auramin O zu Michlers Keton führt. Mit diesem Verfahren lassen sich in Lösung Heparinmengen bis unter 10 µg/ml detektieren. Da aber die Mengen des an der Oberfläche gebundenen Heparins gerade im Bereich der Nachweisgrenze des Testverfahrens lag, wurde die Methode entsprechend modifiziert um die Empfindlichkeit zu erhöhen. Hierzu wurde die Reaktionstemperatur auf 35 °C erhöht, dadurch ließ sich die Nachweispfindlichkeit um den Faktor 10 erhöhen. Nach dem obenstehenden Verfahren DLC-beschichtete Edelstahlplättchen mit Heparin beschichtet. Anschließend wurde ein Teil der Plättchen im Stratalinker belichtet, der andere Teil der Plättchen blieb unbelichtet. Alle Versuche wurden daher in der Dunkelheit durchgeführt. Danach wurde an den Edelstahlplättchen ein Stück abgeschnitten und die biologische Aktivität mit dem Faktor Xa-Testverfahren und die chemische Aktivität mit dem Auramin O-Test bestimmt. Durch Messen der Größe des abgeschnitten Teils konnte auf die jeweilige Flächenaktivität geschlossen werden. Nun wurde ein Teil der Edelstahlplättchen in PBS + 3 M Kochsalzlösung der andere Teil nur in

PBS für 24 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde 1 h in PBS und 1 h in Wasser gewaschen, lyophilisiert und zerteilt und erneut die biologische und chemische Aktivität der Edelstahlbleche und deren Größe bestimmt.

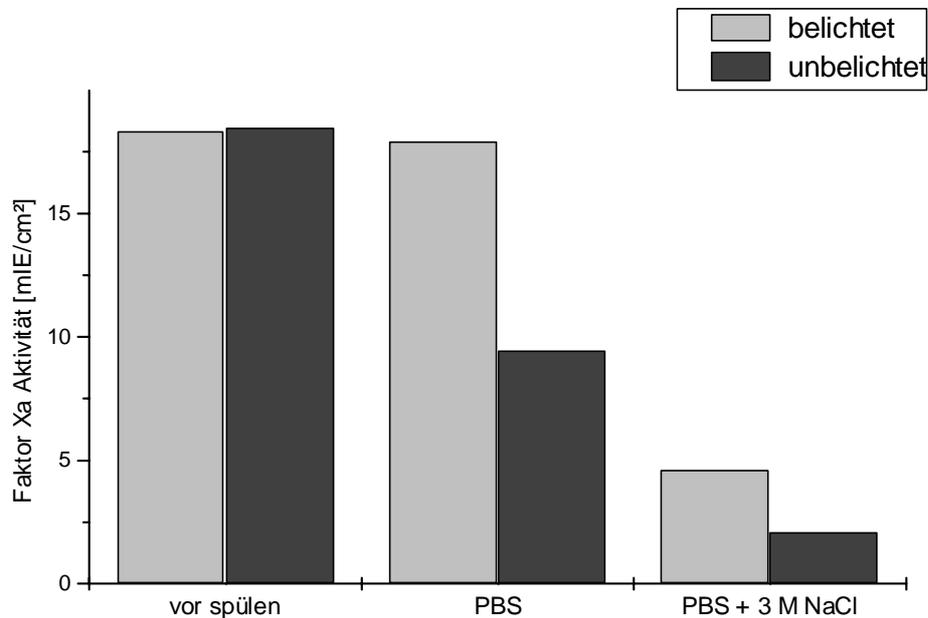


Abbildung 35. Bestimmung der enzymatischen Heparinaktivität im Faktor Xa Test bei DLC-beschichteten Edelstahlplättchen. DLC-Edelstahlplättchen wurden mit PEI-TRIMID und Heparin beschichtet. Ein Teil der Plättchen wurde belichtet, ein Teil blieb unbelichtet. Bei den unbelichteten Plättchen ist die Bindungen des Heparins und des PEI-TRIMIDs an die Oberfläche damit nur rein ionischer Natur. Die Plättchen wurden 24 h bei Raumtemperatur mit PBS oder mit einer Lösung aus 3 M NaCl in PBS gespült und deren biologische Aktivität im Faktor Xa-Test bestimmt.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der beiden Aktivitätsmessungen von den Abbildungen 35 und 36 miteinander, kann man erkennen, daß die biologische Aktivität durch das Spülen mit hochmolaren Salzlösungen stark abnimmt (siehe Abbildung 35). Sogar das Spülen mit PBS führt bei den unbelichteten Plättchen, bei denen die Bindung des Heparins an die Oberfläche auf jeden Fall nur ionischer Natur ist, bereits zu einer Abnahme der biologischen Aktivität, was bereits auf das allmähliche Herunterspülen des Heparins zurückzuführen ist. Die Abnahme der Aktivität der belichteten Plättchen durch Spülen mit PBS resultiert nur in einem geringen Aktivitätsverlust. Im Vergleich dazu führt die hochmolare Salzlösung zu einer deutlichen Reduktion der biologischen Aktivität. Dies kann nun einerseits bedeuten, daß das Heparin von der Oberfläche gespült wurde oder die biologische Aktivität durch Konformationsänderungen verloren gegangen ist.

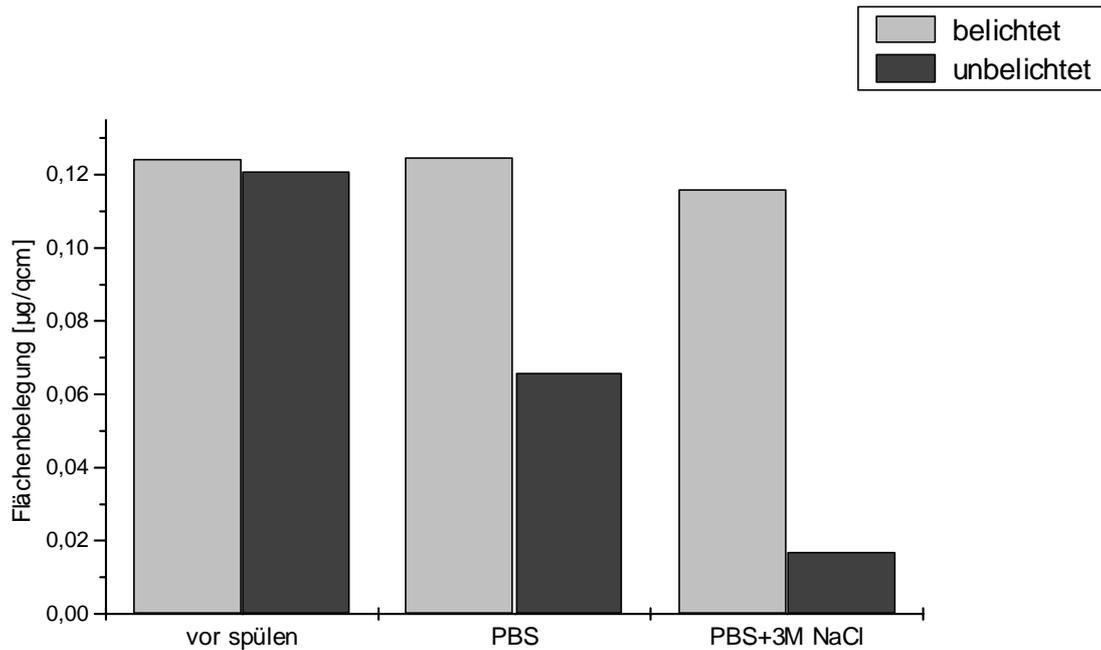


Abbildung 36. Bestimmung der katalytischen Heparinaktivität im Auramin O-Test bei DLC-beschichteten Edelstahlplättchen. DLC-Edelstahlplättchen wurden mit PEI-TRIMID und Heparin beschichtet. Ein Teil der Plättchen wurde belichtet, ein Teil blieb unbelichtet. Bei den unbelichteten Plättchen ist die Bindungen des Heparins und des PEI-TRIMIDS an die Oberfläche damit nur rein ionischer Natur. Die Plättchen wurden 24 h bei Raumtemperatur mit PBS oder mit einer Lösung aus 3 M NaCl in PBS gespült und deren katalytische Aktivität im Auramin O -Test bestimmt.

Ein wesentlich eindeutigeres Bild ergibt sich aus der Interpretation der chemischen Aktivitäten der Heparinplättchen (siehe Abbildung 36). Hier werden die Aktivitäten der belichteten Plättchen durch das Spülen mit PBS und der hochmolaren Salzlösung nur unwesentlich beeinflusst. Dagegen wird die Aktivität der unbelichteten, und damit des rein ionisch gebundenen Heparins deutlich reduziert. Aus diesem Vergleich kann man daher eindeutig schließen, daß das Belichten der PEI-TRIMID + Heparinschicht zu einer kovalenten Bindung an die Oberfläche des DLC-Edelstahls führt. Eine weitere Erklärung wäre auch, daß durch die Belichtung und Carbenbildung es zu einer starken Vernetzung des PEI-TRIMIDS und des Heparins kommt. Die daraus entstehende hochmolekulare Verbindung ist dann unter Erhalt der Aktivität in den verwendeten Lösungsmitteln (PBS oder PBS + 3 M NaCl) nahezu unlöslich.

Für die in dieser Arbeit gestellten Aufgabe, eine beständige Heparinbeschichtung auf DLC-Oberflächen herzustellen, ist die Art der Haftung unwesentlich. Das wesentliche Ziel, das Heparin so an die Oberfläche zu binden, daß es bei Kontakt mit Flüssigkeiten nicht wieder ausblutet, war damit erreicht und nachgewiesen.

3.8 Gekapselte Radioaktivität

Zu Beginn dieser Arbeit beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Entwicklung und der klinischen Untersuchung von β - und γ -strahlenden Stents. Man erhoffte sich durch Einsatz von Radioaktivität die Proliferation der glatten Muskelzellen und somit der Restenose zu verhindern (siehe 2.3.2).

Daher sollte in dieser Arbeit versucht werden, die gute Hämokompatibilität und Biokompatibilität der Diamond-Like-Carbon-Oberfläche, mit den antiproliferativen Eigenschaften der Radioaktivität zu verbinden. Als Strahlerquelle sollte ein reiner β -Strahler mit einer geeigneten Halbwertszeit zum Einsatz kommen. Hier stellt das Isotop ^{32}P Phosphor als reiner Betastrahler mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen einen idealen Kandidaten dar. Die bisher bekannten Methoden zur Herstellung einer radioaktiven metallischen Oberfläche waren sehr aufwendig und kostenintensiv (siehe 2.3.2) Dieser Nachteil verhinderte auch die Möglichkeit, Stents in entsprechender Anzahl zu produzieren.

Als ^{32}P Phosphorquelle ist tracerfreie ortho-Phosphorsäure zu wirtschaftlich vertretbaren Preisen im Handel erhältlich, die somit einen späteren kommerziellen Einsatz im Endprodukt ermöglicht. Bei der Behandlung von Metallen mit Phosphorsäure kommt es zur Bildung von Phosphaten. Diese sind in saurer Umgebung löslich. Da es sich bei der eingesetzten tracerfreien Phosphorsäure um eine sehr verdünnte Säure handelt, ist davon auszugehen, daß der eingesetzte Edelstahl nicht angeätzt wird. Auch sollten die gebildeten Phosphate in der geringen Säurekonzentration unlöslich sein und es daher zu einer Anlagerung an die Metalloberfläche kommen.

Hierzu wurden die elektropolierten Stents, ohne sie zu passivieren, in einer radioaktiven ^{32}P Phosphorsäurelösung bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Phosphorsäure abzentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren bleibt eine dünne Schicht von adsorptiv gebundener verdünnter ^{32}P Phosphorsäure zurück, die entweder nur teilweise oder wegen der geringen Säurestärke nicht mit dem Metall der Stentoberfläche reagiert hat. Bei 30 °C Reaktionstemperatur findet nur eine geringe Aktivierung der Oberfläche statt (siehe Abbildung 37). Erst bei höheren Temperaturen wird das Edelstahlmaterial ausreichend aktiviert wobei eine allmähliche Sättigung bei einer Temperatur etwas über 80 °C zu erwarten ist.

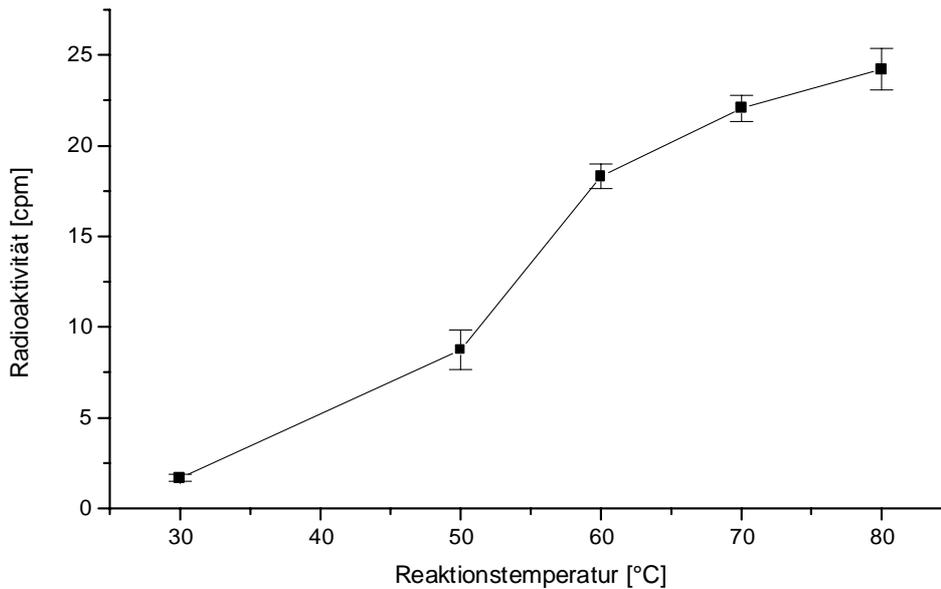


Abbildung 37. Abhängigkeit der Radioaktivität von mit ^{32}P Phosphorsäurelösung behandelten Stents von der Reaktionstemperatur. Edelstahlstents wurden in einer 1 mCi/ml ^{32}P Phosphorsäurelösung bei unterschiedlicher Temperatur für 1 Stunde inkubiert und die Aktivität des Stents mit einem Endfensterzählrohr bestimmt.

Es wurde aber vermieden, die Reaktionstemperatur über 80 °C zu steigern, da die Reaktion in einem geschlossenen Gefäß stattfand und eine zu starke Erhitzung zu einem Überdruck führen könnte. Außerdem sollte ein Verdunsten und somit Aufkonzentrieren der Phosphorsäure vermieden werden. Alle weiteren Untersuchungen wurden daher mit Stents durchgeführt, die bei 80 °C mit der Phosphorsäure reagiert hatten.

Die so behandelten Stents wurden dann in einem Ofen mit steigender Temperatur erhitzt. Dabei verdampft das Wasser der verdünnten Phosphorsäure und es bleibt eine konzentrierte ^{32}P Phosphorsäure zurück die mit dem Edelstahl zu Phosphaten reagiert. Es ist bekannt, dass ortho-Phosphorsäure und primäre Orthophosphate beim Erhitzen über 200 °C zur intermolekularen Wasserabspaltung unter Bildung von Polyphosphorsäuren bzw. Polyphosphaten neigen. Diese sind je nach Struktur in Wasser schwer oder sogar nahezu unlöslich. Daher wurden die Stents anschließend für mehrere Stunden bei 350 °C getempert.

Um die Bindung der Phosphorsäure bzw. der Phosphate an die Oberfläche zu untersuchen, wurden diese anschließend in PBS bei RT inkubiert und die Aktivität der Stents vor der Inkubation, nach der Inkubation und die der Lösung gemessen und miteinander verglichen.

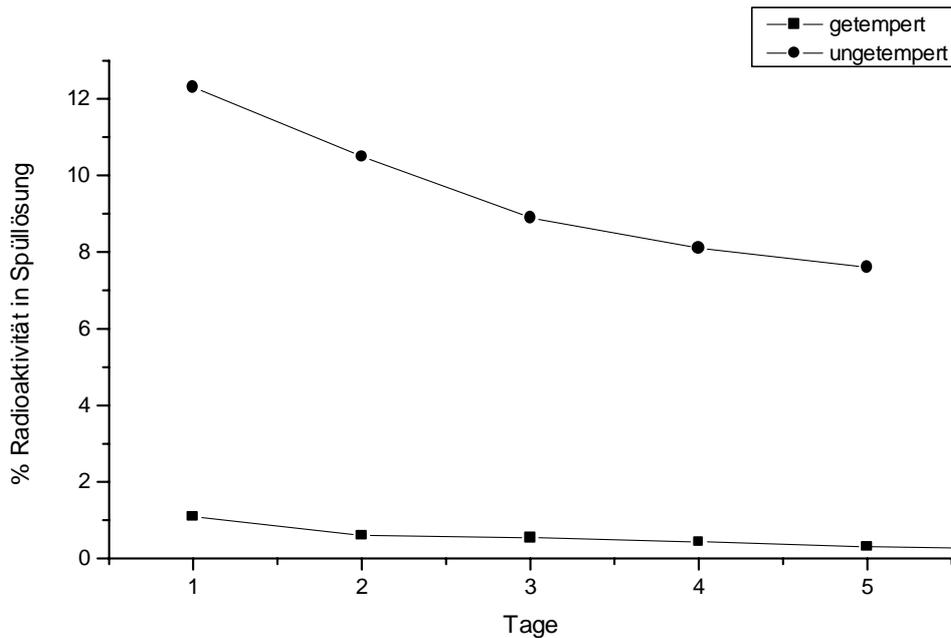


Abbildung 38. Vergleich der Radioaktivitätsverluste von Stents mit getemperter und ungetemperter Phosphatschicht beim Behandeln mit PBS als Funktion der Zeit. Stents wurden bei 80 °C in einer 1mCi/ml ³²Phosphorsäurelösung für 1 h inkubiert. Ein Teil der Stents wurde 2 h bei 150 °C und anschließend 2 h bei 350 °C getempert, die restlichen Stents blieben ungetempert. Die Stents wurden anschließend in PBS inkubiert und die Aktivitätsmenge in der Lösung über 5 Tage in einem Flüssigszintillator gemessen. Die Aktivität in Lösung wird dabei in Relation zur Stentaktivität gesetzt.

Wie Abbildung 38 zeigt wird die Menge an Radioaktivität die relativ zur Stentaktivität in Lösung geht durch die Hitzebehandlung deutlich verringert. Die Aktivität scheint sich asymptotisch einem Wert von 0,1 % Verlust bezogen zur Stentaktivität pro Tag zu nähern. Dieser Verlust dürfte auf die allmähliche Lösung und Rehydratisierung der polymeren Phosphorsäure zurückzuführen sein. Man kann sich daher das Reaktionsschema der ³²Phosphorsäure mit der Oberfläche wie folgt vorstellen (siehe Abbildung 39): Im ersten Schritt bleibt eine verdünnte Phosphorsäurelösung auf der Oberfläche zurück. Diese kann bereits zum Teil mit der Oberfläche des Edelstahls reagiert haben. Durch Erhitzen auf 150 °C verdampft das Wasser und es bleibt eine konzentrierte Phosphorsäure auf der Oberfläche zurück. Diese reagiert mit dem Edelstahl unter Bildung von Phosphaten. Durch das weitere Erhitzen auf 350 °C kommt es zur intermolekularen Wasserabspaltung. Dabei werden vermutlich schwerer lösliche Phosphate und Polyphosphorsäuren gebildet.

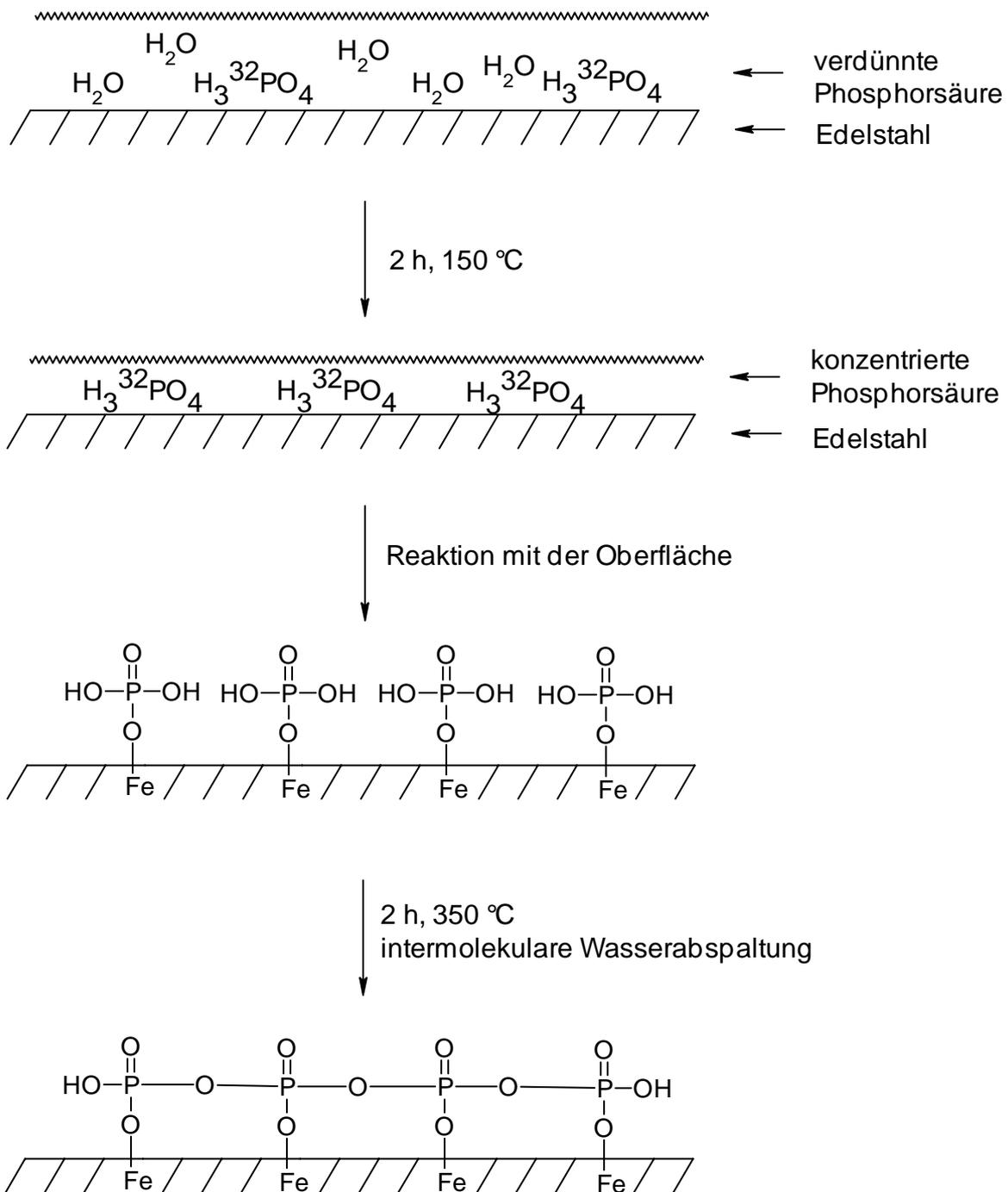


Abbildung 39. Schematische Darstellung der Reaktionsfolge von $^{32}\text{Phosphorsäure}$ auf einer Metalloberfläche beim Erhitzen. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Anlagerung von $^{32}\text{Phosphorsäure}$. Nach der Anlagerung der verdünnten Phosphorsäure kommt es durch das Erhitzen auf 150 °C zum Verdampfen des Wassers. Es bleibt konzentrierte Phosphorsäure auf der Oberfläche zurück. Diese reagiert auf der Metalloberfläche zu Phosphaten. Durch das weitere Erhitzen auf 350 °C findet intermolekulare Wasserabspaltung statt.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden 10 Stents aktiviert, getempert und danach fünf mit einer 500 Å dicken DLC-Schicht versehen. Die Diamond-Like-Carbon-Schicht stellt eine Art Versiegelung dar, die ein Ablösen der Aktivität und

das Verteilen innerhalb des menschlichen Körpers verhindern soll. Daher wurden die DLC-beschichteten und unbeschichteten Stents in PBS inkubiert und die Menge an eluierter Aktivität bestimmt und miteinander verglichen.

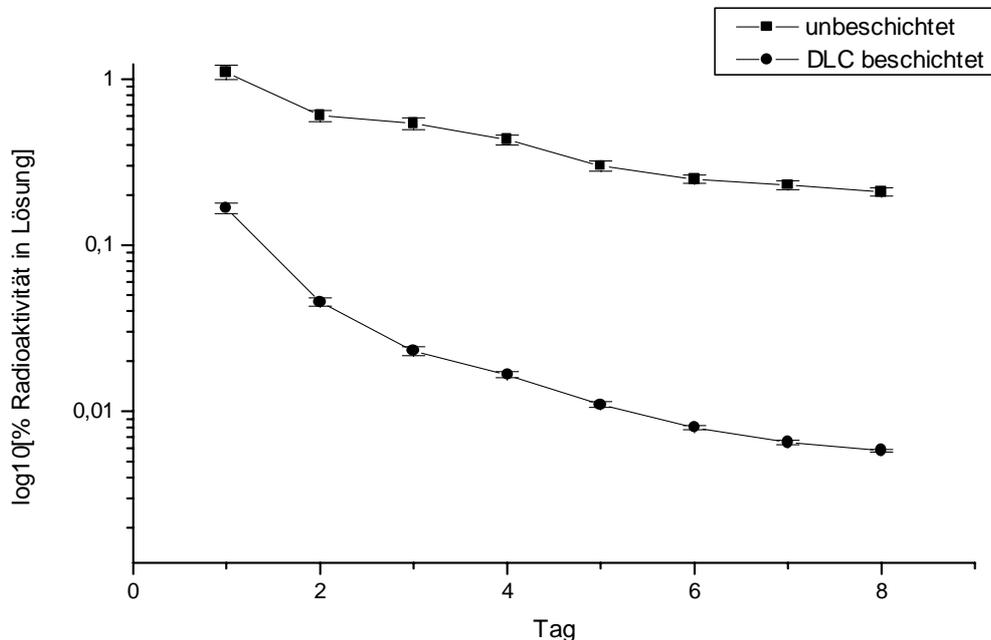


Abbildung 40. Einfluß der DLC-Beschichtung auf den Radioaktivitätsverlust bei getemperten ^{32}P Phosphorstents beim Behandeln mit PBS als Funktion der Zeit. Stents wurden 1 h bei 80 °C mit einer 1 mCi/ml ^{32}P Phosphorsäurelösung inkubiert und für 2 h bei 150 °C und anschließend 2 h bei 350 °C getempert. Ein Teil der Stents wurde mit DLC beschichtet. Der Verlust an Radioaktivität in den PBS-Puffer wurde über 8 Tage mit einem Flüssigszintillator gemessen und relativ zur Stentaktivität aufgetragen.

Durch die DLC Beschichtung wird die Menge an löslicher Radioaktivität nach 8 Tagen um etwa zwei Zehnerpotenzen erniedrigt (siehe Abbildung 40). Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, daß durch die DLC-Schicht eine Versiegelung der Oberfläche stattfindet und dadurch die darunter liegenden ^{32}P Phosphate nicht mehr in Lösung gehen. Für den obigen Befund gibt es daher zwei Erklärungen: Entweder hat die DLC-Schicht kleine Fehlstellen oder Löcher durch die radioaktive Salze allmählich herausgelöst werden können oder beim Plasmaprozess werden durch das sogenannte Etching (siehe Abbildung 44) geringe Mengen von ^{32}P Phosphor durch die Reaktion mit reaktiven Gasteilchen von der Oberfläche gelöst und gehen in die Gasphase über. Anschließend reagieren die in der Gasphase befindlichen ^{32}P Phosphormoleküle mit anderen Bestandteilen unter Abscheidung (Deposition) an die Oberfläche der DLC-Schicht oder lagern sich in die DLC-Schicht ein. Man würde so einen Konzentrationsgradienten mit

abnehmender Konzentration an ^{32}P Phosphor vom Stent zur DLC-Oberfläche erhalten. Diese ^{32}P Phosphorverbindungen können dann durch PBS teilweise in Lösung gehen. Die in Lösung gehende Aktivitätsmenge ist bei genauer Betrachtung sehr gering und führt zu keiner nennenswerten Strahlenbelastung für den Menschen. Die in Untersuchungen eingesetzten Stentaktivitäten bis zu $15\ \mu\text{Ci}$ liegen mit $1,5\ \text{mSv}$ im Bereich der natürlichen Strahlenbelastung des Menschen von $2,5\ \text{mSv}$ (Berechnung siehe Anhang). Die über die Lebenszeit des Strahlers in Lösung freigesetzte Aktivität von Maximal $1\ \%$ der Gesamtaktivität läßt sich damit vernachlässigen.

3.8.1 Kalibrierung der Meßgeräte für radioaktive Stents

Zur Messung der Aktivität der Stents standen ein Szintillationszähler und ein Endfensterzählrohr zur Verfügung. Um den Einfluß der Meßgeometrie und der sogenannten Zählraumbeute zu bestimmen, mußte ein kalibrierter Stent mit bekannter Totalaktivität hergestellt werden.

Hierzu wurde der Flüssig-Szintillationszähler mit einer geeichten ^{32}P Phosphatlösung kalibriert. Diese wurde mit Wasser entsprechend verdünnt um unterschiedliche Aktivitätsproben zu erhalten. Da ^{32}P Phosphor als hochenergetischer β -Strahler mit einer Energie von $1,7\ \text{MeV}$ in Wasser Cerenkov-Strahlung produziert, wurden die Messungen ohne Szintillationscocktail durchgeführt. Als Meßbereich wurden die Kanäle 65-324 des Flüssigszintillators genutzt. Die Bestimmung der Gesamtzählrate der Stents wurde durch die Messung in einem 4π -Proportionalzählrohr durchgeführt. Da dabei der gesamte Stent innerhalb des Zählrohrs liegt wird die gesamte abgestrahlte Energie gemessen. Die Selbsabsorption von β -Strahlen an der Edelstahloberfläche ist als sehr gering anzusehen, da ein Großteil der zur Oberfläche hin abgestrahlten Energie wieder reflektiert wird oder durch das dünne Material hindurch strahlt. Die Gesamtzählrate wurde dann durch Auflösen der Stents und Bestimmung der Aktivität der erhaltenen Lösung im kalibrierten Szintillationszähler gemessen (siehe Abbildung 41). Mit dem Stent bekannter Totalaktivität konnte dann das Endfensterzählrohr und der Szintillationszähler in Verbindung mit dem Festkörper-Szintillator kalibriert werden.

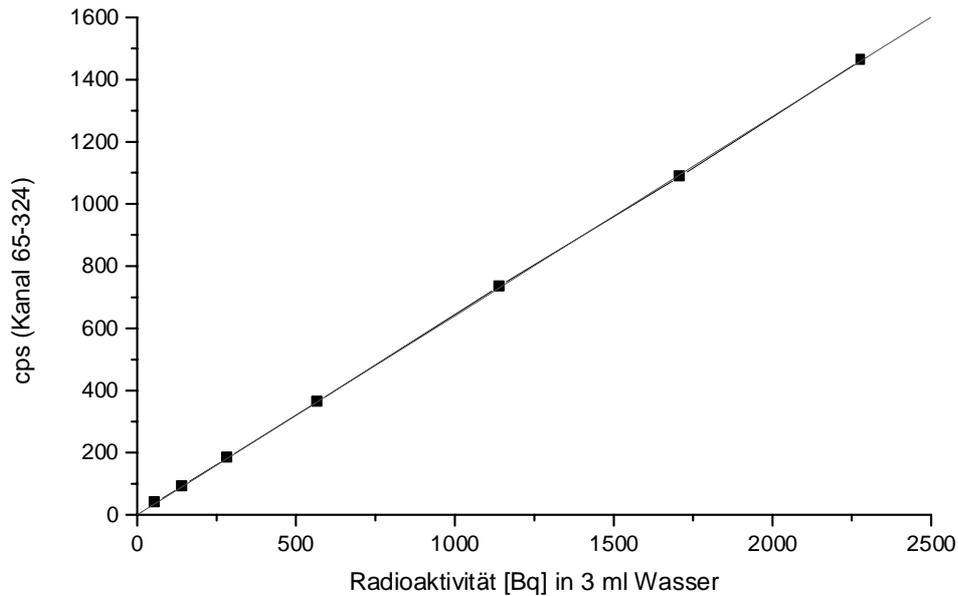


Abbildung 41. Kalibrierung des Szintillationszählers zur Messung der Radioaktivität von ^{32}P Phosphorsäurelösungen. Zur Kalibrierung wurde eine durch ein DKD-Labor geeichte ^{32}P Phosphorsäurelösung (500 MBq in 10 ml) mit Wasser verdünnt und die Cerenkov Strahlung in einem Flüssig-Szintillationszähler unter Verwendung der Meßkanäle 65-324 gemessen.

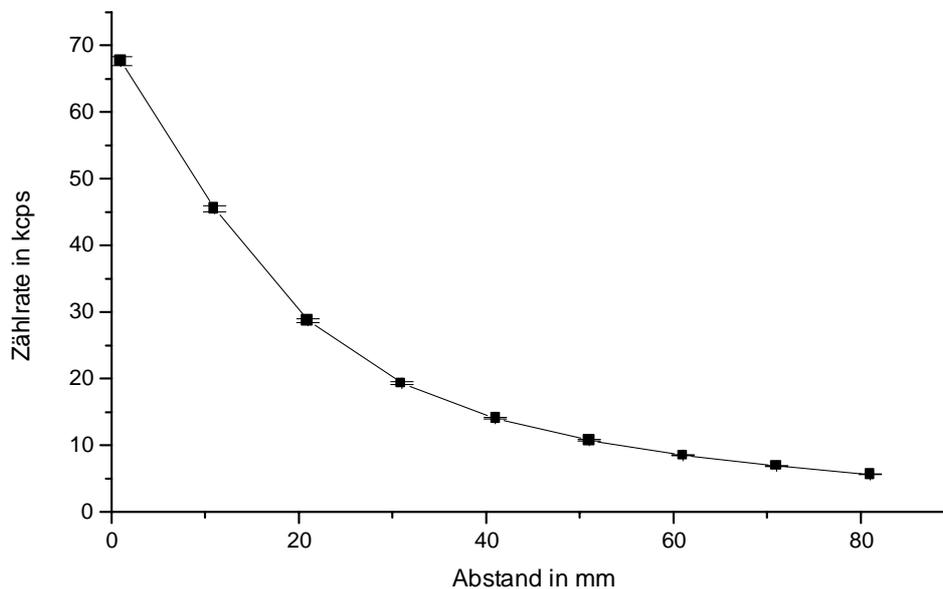


Abbildung 42. Bestimmung der Zählrate als Funktion des Stentabstands vom Endfensterzählrohr. Ein Stent mit einer bekannten Aktivität von 108810 Bq wurde zentrisch mit variierendem Abstand unter ein Endfensterzählrohr gelegt und die Zählraubeute bestimmt.

Der zur Kalibrierung der Meßgeräte verwendete Stent hatte eine Aktivität von **18810 Bq**. Er wurde zentrisch unter das Endfensterzählrohr in zunehmendem Abstand gelegt und die Zählrate bestimmt. Die zuvor ermittelte Nullrate wurde

automatisch abgezogen. Aus Abbildung 42 läßt sich der Kalibrierfaktor zur Ermittlung der unbekanntes Aktivität bei einem bestimmten Abstand in der Meßanordnung ablesen. Er errechnet sich beispielsweise bei 41 mm Abstand aus

$$K = \frac{108810\text{Bq}}{14040\text{cps}} = 7,75 \frac{\text{Bq}}{\text{cps}} \quad \mathbf{2}$$

Abbildung 43 zeigt das Spektrum, welches bei der Messung des Stents im Festkörperszintillator ZA 212 (Zinsser Analytic) erhalten wurde.

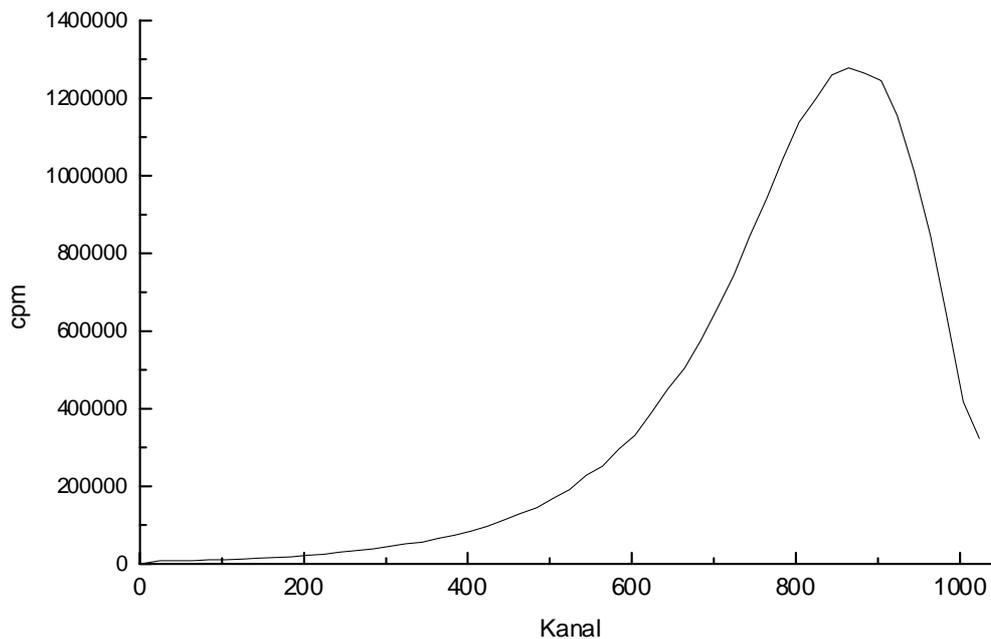


Abbildung 43. Kanalspektrum von ³²Phosphor im Festkörperszintillator ZA 212 (Zinsser Analytic). Ein radioaktiver ³²Phosphor-Stent mit bekannter Aktivität wurde in einem Festkörperszintillator ZA 212 (Zinsser Analytic) gelegt und das Kanalspektrum aufgenommen.

Aus dem Kanalspektrum der Abbildung 43 errechnete man einen Kalibrierfaktor mit dem man die unbekanntes Aktivität eines Stents aus der Zählrate ermittelt. Bei Verwendung der Meßkanäle 785-824 des Szintillationszählers werden 13,3 % der Gesamtzählrate erfaßt.

Daraus errechnet sich unter Verwendung der Gleichung ein Kalibrierfaktor von

$$\mathbf{K = 2,79.}$$

mit Stentaktivität [Bq] = K x Zählrate der Kanäle 785-824 [cps]

3

3.9 Klinische Ergebnisse mit DLC-beschichteten Stentsⁱⁱⁱ

Mit den in dieser Arbeit untersuchten DLC-beschichteten Stents wurde eine klinische Studie am Menschen durchgeführt. Bei 145 Patienten wurden insgesamt 225 DLC-beschichtete Stents implantiert. Die Tabellen 8-10 enthalten die Rahmenbedingungen und Daten dieser Studie. Das durchschnittliche Alter lag bei 62 ± 10 Jahre wobei 77 % der Patienten männlichen Geschlechts waren. Bereits 23 % der untersuchten Personen hatten einen Myokardinfarkt, 12 % hatten eine vorangegangene Bypass-Operation, 25 % eine vorangegangene Angioplastie und 64 ± 13 % hatten bereits eine Kammer-Ejektionsfraktion. Bei den behandelten Patienten lagen als Risikofaktoren bei 48 % Bluthochdruck, bei 54 % Hyperlipidämie, bei 21 % Diabetes, bei 22 % lagen in der Familie bereits einmal eine Dissektion der Arteria circumflexia vor und 25 % waren Raucher. In der Anamnese der Patienten stellte man bei 40 % eine stabile Angina fest, bei 34 % eine instabile Angina, bei 13 % einen akuten Myokardinfarkt, bei 8 % einen vorangegangenen Myokardinfarkt und 5 % hatten eine relative Ischämie.

Bei der Implantation kamen folgende Stents zum Einsatz:

2,5 mm Durchmesser	19 %
3,0 mm Durchmesser	53 %
3,5 mm Durchmesser	28 %
9 mm Länge	32 %
16 mm Länge	55 %
25 mm Länge	13 %

Dabei konnten sämtliche Stentlängen mit allen Durchmessern kombiniert werden.

Die Stents wurden in folgende Herzkranzgefäße implantiert:

- linke vorne abfallende Koronararterie 38 %
- rechte Koronararterie 38 %
- Arteria circumflexia 20 %
- Saphenus Vene 2 %
- linke Hauptarterie 2 %

ⁱⁱⁱ Die klinische Studie wurde unter Leitung von P. Barragan am Kardiologischen Zentrum in Marseille, Frankreich durchgeführt

Die Art der Läsionen, bei denen die DLC-beschichteten Stents eingesetzt wurden, waren nach den internationalen Kategorien (Typ A, B1, B2 und C) wie folgt klassifiziert:

Typ A	25 %
Typ B1	22 %
Typ B2	25 %
Typ C	28 %

Dabei lagen die die Anzahl der Erkrankungen pro Patient bei

Ein-Gefäßkrankung	34 %,
Zwei-Gefäßkrankungen	38 %,
und Drei-Gefäßkrankungen	28 %.

Die Ergebnisse der akuten Angiographie sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8. Akute Angiographiedaten direkt vor und nach der Operation. Pre= vor Stentlegung, Post= nach Stentlegung, MID= Minimaler Innendurchmesser der Arterie, Ref.D= Referenzdurchmesser ausserhalb der Arteriosklerose,

	Pre	Post
MID [mm]	0.76 ± 0.4	2.57 ± 0.5
Ref.D. [mm]	2.85 ± 0.6	2.92 ± 0.6
Verengung [%]	73 ± 18	12 ± 7

Wie aus der Tabelle 8 hervorgeht, lag die durchschnittliche Verengung vor der Stentlegung bei 73 % ± 18, die nach der Operation auf 12 % ± 7 zurückging. Der mittlere Durchmesser der behandelten Arterien lag bei 2,85 ± 0,6 mm vor, bzw. 2,92 ± 0,6 mm nach der Operation.

Die erneute klinische Nachuntersuchung nach 8.1 ± 1.8 Monaten bei 140 Patienten und insgesamt 207 Läsionen ergaben die Daten der

Tabelle 9. Die Ergebnisse der Studie mit DLC-beschichteten Stents wird der Tabelle 11 mit anderen Stentsystemen verglichen. Die Studiengruppe hatte mit 37 % einen hohen Anteil an Hochrisikopatienten, bei denen bereits Restenosen aufgetreten waren, ein chronischer Verlauf der Verschlußkrankheit vorlag bzw. bereits Bypass Operationen durchgeführt worden waren (siehe die Patientengeschichte).

Tabelle 9. Nachuntersuchung. q MI: Q-Wellen Myokardinfarkt, GV: erneuter Gefäßverschluß des behandelten Gefäßes, PTCA: bereits erfolgte PTCA des behandelten Gefäßes, KAB: bereits erfolgte Bypass-Operation des behandelten Gefäßes, MACE: Major Adverse Cardiac Events, engl. Summe aller auftretenden klinisch relevanter Symptome, Summe aus:MI + KAB + PTCA

	Anzahl	Prozentual [%]
Tod	0	0
q MI	1	0,7
GV	17	8,2
PTCA	14	6,7
KAB	3	1,5
MACE Rate	18	8,9

Bei der Nachuntersuchung von 140 Patienten nach $8,1 \pm 1,8$ Monaten nach Implantation war bei einem Patienten ein Herzinfarkt aufgetreten und 17 Patienten mußten wegen Restenosen am Implantat durch re-PTCA (14) bzw. Bypass Operation (3) nachbehandelt werden (siehe Tabelle 9). Daraus ergibt sich eine MACE-Rate ("Major Adverce Cardiac Events", re-PTCA + MI + KAB) von 8,9 %. Dies ist signifikant niedriger als bei anderen klinischen Studien mit beschichteten und unbeschichteten Stents verschiedener Hersteller (siehe Tabelle 11). Bei Studien mit den unbeschichteten Palmatz-Schatz Stents und auch anderen hier nicht aufgeführten Studien waren MACE-Raten deutlich über 20 % beobachtet worden. Der mit Keramik beschichtete Tenax Stent zeigte sogar eine MACE-Rate von fast 25 %. Nur der mit Phosphorylcholin beschichtete BiodivYsio Stent lag mit 16 % deutlich unter 20 %. Die MACE-Raten lagen bei den unbeschichteten Palmatz-Schatz, NIR, PURA, Dinamic und Multilink Stents in einem Bereich von 17,6 bis 30,6 %, während sich die Restenose-Raten (gemessen über Angiographie und definiert als > 50 % Volumenreduktion in der Läsion im Vergleich zum Referenzlumen) von 25,3 bis 35 % erstreckten.

Wie erwähnt, lag der Anteil der Risikopatienten (Bypass-Operation bzw. PTCA bereits vorher durchgeführt) in der Studie mit DLC-beschichteten Stents mit 37 % in Relation zu dem besten beschichteten BiodivYsio-Vergleichstent mit 14,4 % Hochrisikopatienten relativ hoch. In der Tat zeigten diese Patienten bei der

angiographischen Nachuntersuchung eine Restenose-Rate (Restenose definiert als > 50 % Volumenreduktion in der Läsion im Vergleich zum Referenzlumen) zwischen 5,5 und 50 %, je nach Vorgeschichte (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10. Nachuntersuchung unter Berücksichtigung der Vorgeschichte. In Spalte 1 ist nach der Vorgeschichte, die zur Stentlegung bei dem Patienten in dieser Studie führte, unterteilt. Das bedeutet beispielsweise in Zeile 1, 10 Patienten (Summe Spalte 2 +3) kamen in die Studie wegen einer In-Stent Restenose, 5 davon hatten erneut eine Restenose nach 8,1 Monaten. Daraus ergibt sich bei der Indikation In-Stent Restenose unter Verwendung eines DLC-Stents eine Restenoserate von 50 % (Spalte 4).

Grund für die Stent-Implantation (Vorgeschichte)	Erneuter klinischer Vorfall in der Zielläsion	Kein klinischer Vorfall in der Zielläsion	Prozentualer Anteil (Spalte 2+3) Restenoserate
In-Stent Restenose	5	5	50 %
Restenose	1	7	12,5 %
Totale chronische Verengung	3	3	50 %
Saphenus Vene	3	3	50 %
Akuter MI	1	17	5,5 %
<i>De novo</i> Läsion	6	155	3,7 %
Total	17	190	8,2 %

Die Restenose-Rate bei Patienten, bei denen vorher keine Bypass-Operation oder PTC durchgeführt wurde, war mit 3,7 % deutlich das beste Ergebnis, das je mit Stents erzielt wurde. Die Restenose-Rate über die gesamte Patientengruppe lag mit 8,2 % ebenso niedriger, als in allen bisherigen Studien mit beschichteten und unbeschichteten Stents.

Ähnlich positiv fiel der Diamond-Like-Carbon-beschichtete Stent in Bezug auf Thrombosen auf. Nur bei einem Patienten traten in der Nachuntersuchung nach einem Monat in zwei der implantierten Stents subakute Thrombosen auf. Es ist zu bemerken, daß es sich um einen Hochrisikopatienten handelte, der bereits in der Vergangenheit Stent Implantationen erhalten hatte und bei dem Thrombosen aufgetreten waren. Die diamant-ähnlich beschichteten Stents wurden in diesem Fall in bereits implantierte Stents implantiert. Insgesamt wurden in der Studie von Dr. Barragan mit dem diamant-ähnlich beschichteten Stent sowohl in der akuten

Angiographie wie auch bei den Nachuntersuchungen 1 bis 9 Monate nach Implantation hervorragende Ergebnisse erzielt, die in Bezug auf das Auftreten von subakuten Thrombosen, Restenosen und MACE deutlich besser waren, als bei unbeschichteten und mit Keramik bzw. Phosphorylcholin beschichteten Stents.

Tabelle 11. Vergleich der klinischen Ergebnisse unterschiedlicher Stentsysteme. MI: Myokardinfarkt, KAB: Koronararterien Bypass, Re-PTCA: erneute Percutane Transluminale Coronar Angioplasty, MACE: Major Adverse Cardiac Events, engl. Summe aller auftretenden klinisch relevanter Symptome, Summe aus:MI + KAB + PTCA, PC=Phosphorylcholin-Beschichtung, SiC= Siliciumcarbid-Beschichtung.

Stent Typ	Palmaz-Schatz	Tenax	BiodivYsio	Diamond AS and Flex AS
Stentmaterial	316L	316L + SiC	316L + PC	316L +DLC
Studiename	Benestent, I	Tenax Study, NL	SOPHOS, A	Barragan, F
Anzahl Patienten	259	174	200	140
Anzahl Stents		193		207
Stent Länge, mm	15, 25, 35	10, 15, 25	15, 28	9, 16, 25
Stent Durchmesser, mm				2.5, 3, 3.5
Sub-akute Thrombose		0.80%		
Tod	0.80%	2.80%	0.50%	0.00%
MI	4.20%	6.30%	5.00%	0.70%
KAB	5.00%	**	2.50%	1.50%
Re-PTCA	10.00%	15.00%	8.00%	6.70%
MACE	20.10%	24.90%	16.00%	8.90%

4 Experimenteller Teil

In diesem Kapitel werden die für die Experimente verwendeten Materialien und Chemikalien angegeben. Weiterhin werden besondere Methoden und Verfahren kurz beschrieben. Alle Versuche bei denen TRIMID zum Einsatz kam, wurde entweder in abgedunkelten Räumen gearbeitet oder das Reaktionsgefäß wurde mit Alufolie gegen Lichteinfall abgedeckt.

4.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Materialien

316 L Stents,
geschnitten aus Rohren, Wandstärke 150 µm
316 L Edelstahlblech, Stärke 150 µm
Beizlösung Polinox B
Biosensorchips
Elektrolytlösung E-268
Festkörperszintillator ZA 212
L-Glutamin
Hank's Balanced Buffer
Isove's modified Dulbecco's
Medium Ham's F12
Penicillin
Percoll-Lösung
RPMI
Streptomycin

Chemikalien

Antithrombin III
¹⁴C-Arachidonsäure

Chloramin T
Faktor Xa
Fibrinogen

Firma, Land, Stadt

Microtubes, F, Lyon
Rodney Dyne, D, Hannover
Polygrat, D, München
ASI, CH, Bern
Polygrat, D, München
Zinsser, D, Frankfurt
Gibco, D, Karlsruhe
Sigma, D, Taufkirchen
Gibco, D, Karlsruhe
Gibco, D, Karlsruhe
Gibco, D, Karlsruhe
Sigma, D, Taufkirchen
Gibco, D, Karlsruhe
Gibco, D, Karlsruhe

Sigma, D, Taufkirchen
Amersham, D,
Braunschweig
Merck, D, Darmstadt
Sigma, D, Taufkirchen
Sigma, D, Taufkirchen

hochmolekulares (HM) Heparin	
MW: 3-30 kD, Aktivität: 176,6 IE/mg	Kraeber, D, Hamburg
niedermolekulares (NM) Heparin	
MW: >60% < 8kD, Aktivität: 87,6 IE/mg	Kraeber, D, Hamburg
Humanes Serum Albumin	Sigma, D, Taufkirchen
Methan 5.0, Argon 5.0	Messer Griesheim, D, Griesheim
Natrium ¹²⁵ Iodid	Hartmann Analytic, D, Braunschweig
Polyethylenimin	BASF, D, Ludwigshafen
ortho- ³² Phosphorsäurelösung	Hartmann Analytic, D, Braunschweig
geeichte ortho- ³² Phosphorsäurelösung	AEA Technology, D, Braunschweig
S-2732	Haemochrom, D, Hamburg
TRIMID	Biodetek GmbH, D, Bensheim

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheit bei Fluka, D, Neu-Ulm bezogen.

4.1.1 Pufferlösungen

H-Testpuffer:	50 mM Trishydroxymethylaminomethan 7,5 mM EDTA 7,5 mg/l Dextransulfat 8000 mit Salzsäure auf pH 8,4 eingestellt
PBS	
"Phosphate-buffered saline":	10 mM Natriumdihydrogenphosphat 138 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid mit Phosphorsäure auf pH 7,4
Citratpuffer:	20 mM Citronensäure mit Natronlauge auf pH 3,5

4.1.2 Einheiten der Radioaktivität

Als Maß für die Radioaktivität ist im neuen SI-Einheitensystem das Bequerel (Bq) vorgeschrieben. Hierbei entspricht 1 Bequerel einem Zerfall pro Sekunde. Da die alte Einheit Curie (Ci) immer noch weit verbreitet ist und gerade in der medizinischen Literatur alle Angaben in Curie gemacht werden, wird sie ebenfalls angegeben:

$$1 \text{ Ci} = 3,7 * 10^{10} \text{ Bq}$$

Die mit dem Zählern für Radioaktivität gemessenen Impulse pro Minute entsprechen nicht den tatsächlich vorkommenden Zerfällen pro Minuten in der Meßprobe, da nur ein Teil der Zerfälle von Zählern erfaßt werden können. Man spricht hier von der sogenannten Zählraubeute. Der Wirkungsgrad beschreibt das Verhältnis von Zählraubeute zur tatsächlichen Zerfallsrate.

Bei den Versuchen zur Messung der Proteinadsorption wurde auf eine Kalibrierung des Gamma-Zählers verzichtet. Die Zählraubeute des Geräts betrug nach Herstellerangaben ca. 50 %. Da alle Messungen auf dem gleichen Gerät und somit mit der gleichen Zählraubeute durchgeführt wurden, sind die Fehler überall gleich groß und somit vernachlässigbar. Die Umrechnung zwischen der Minutenzählrate cpm (counts per minute) und Bequerel bzw. Curie wurde daher wie folgt angesetzt:

$$1 \text{ Bq} = \frac{2 * \text{cpm}}{60}$$

$$1 \mu\text{Ci} = 1,23 * 10^3 \text{ cpm}$$

Bei allen in dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten wurde vor Beginn der eigentlichen Messung die Nullrate bestimmt und diese von den Meßwerten abgezogen.

4.2 Beschreibung der verwendeten Methoden

Im folgenden wird kurz auf die in dieser Arbeit verwendeten Techniken und Methoden eingegangen, soweit dies noch nicht im Kapitel 2 geschehen ist.

4.2.1 Edelstahl Vorbehandlung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden vor der Verwendung in den weiteren Versuchen oder vor dem Beschichten mit Diamond-Like-Carbon, wenn nicht anderes angegeben, wie nachfolgend beschrieben, behandelt.

a.) Beizen

Sowohl die Stents als auch das verwendete Blech waren aus dem Material 316 L Edelstahl. Um Verunreinigungen, verursacht durch das Laserschneiden und sonstige mechanische Vorarbeiten, zu entfernen, wurde das Material für 15 Minuten in einem Ultraschallbad bei Raumtemperatur in einer Beizlösung der Firma Polygrat Typ Polinox B vorbehandelt. Anschließend wurde es gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und darauf geachtet, das Material nicht mehr mit den Händen anzufassen, um Verunreinigungen durch Hautfett zu vermeiden.

b.) Elektropolieren

Durch Elektropolieren ist es möglich, feinste Unebenheiten abzutragen und das Material zu glätten. Der Edelstahl wurde dafür in Elektrolytlösung E-268 der Firma Polygrat getaucht und an die Anode eines Gleichspannungsnetzgeräts angeschlossen. Als Gegenelektrode diente ein Kupferblech, welches parallel im Abstand von 4 cm von der Anode angebracht wurde. Die Kathode besaß etwa die gleiche Elektrodenfläche wie die Probe. Die Lösung wurde auf 50 °C temperiert und die Probe für 2 Minuten bei 7 V Gleichspannung elektropoliert. Anschließend wurde die Probe um 180° gedreht und die zweite Seite des Probenblechs für weitere 2 Minuten elektropoliert. Danach wurde gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet

Die Stents wurden in eine Vorrichtung montiert, bei dem die Kathode aus einem konzentrisch gewundenem Kupferdraht bestand, der sich im Abstand von 1 cm vom in der Mitte montierten Stent befand. Der Stent wurde mit einem Platin-Iridium (90/10)-Draht mit der Anode des Netzgeräts verbunden und für 160 Sekunden bei 7 V elektropoliert. Die Stegbreite des Stentmaterials sollte nach der Elektropolierung ca 90-110 µm betragen. Dies wurde durch Messung mit einem mit einer Strichplatte kalibrierten Mikroskop überprüft. Anschließend wurde der Stent gründlich mit Wasser gewaschen und für 5 Minuten mit Wasser im Ultraschallbad behandelt und getrocknet.

c.) Passivieren

Durch das Aufbringen einer Passivschicht auf den Edelstahl wird eine höhere Korrosionsbeständigkeit erreicht (siehe 2.5). Dies wurde durch 30-minütiges Eintauchen der Proben in die auf 60 °C erhitzte Elektropolierlösung erreicht. Dabei bilden sich auf der Oberfläche Metallphosphate und -oxide. Anschließend wurde gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.

4.2.2 Beschichtung mit Diamond-Like-Carbon

Der für die Beschichtung eingesetzte Plasmareaktor repräsentiert eine Bell-Jar-Kammer mit parallelen Plattenelektroden. Die untere Elektrode ist mit einem 13,46-MHz-Radiofrequenz Generator und 20-kHz-Ultraschall-Generator verbunden. Die obere Elektrode ist geerdet. Der Reaktor ist mit einer Vorvakuumpumpe und einer Turbomolekularpumpe ausgestattet. Weiterhin ist der Reaktor mit einem Feinventil als Gaseinlaß, einem Druckmeßgerät

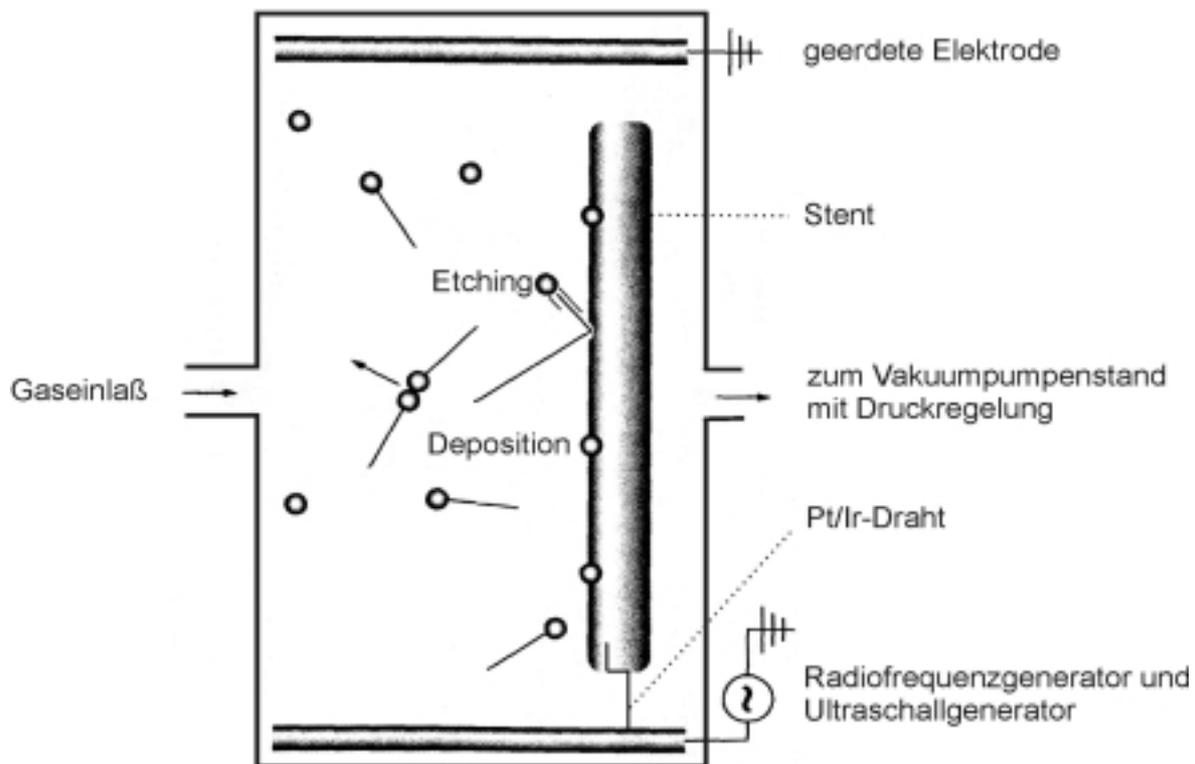


Abbildung 44. Schematische Darstellung des Plasmareaktors. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Plasmareaktors, der aus zwei parallelen Elektroden besteht. An der unteren Elektrode ist ein Radiofrequenz- und Ultraschallgenerator angebracht. Der Stent ist mit einem Platin-Iridiumdraht mit der unteren Elektrode verbunden. Die Kammer wird durch einen Vakuumpumpenstand evakuiert.

und einem Quarz Dicke Monitor (QDM), der an der oberen Elektrode angebracht ist, ausgerüstet. Der Reaktor und der Beschichtungsprozess sind schematisch in Abbildung 44 dargestellt. Die Stents werden in einer vertikalen Position auf der unteren Elektrode plaziert. Ein Pt/Ir Draht (Hilfselektrode), der fest mit der unteren Elektrode verbunden ist, stellt einen elektrischen Kontakt zwischen Stent und unterer Elektrode her. Der Reaktor wird bis zu einem Restdruck $< 0,001$ Torr evakuiert und reines Argon in den Reaktor bis zu einem Druck von 0,04 Torr

eingbracht. Anschließend wird ein Plasma über den Radiofrequenzgenerator erzeugt und die Stents werden darin für 25 min. vorbehandelt. Danach wird der Reaktor mit einer Mischung aus Argon/Methan im Verhältnis 95/5 unter ständigen Abpumpen beschickt. Der Druck wird auf 0,04 Torr gehalten. Über den Radiofrequenz- und den Ultraschallgenerator wird anschließend ein Plasma generiert, mit dessen Hilfe die Stents beschichtet werden. Der Beschichtungsvorgang wird solange durchgeführt, bis der QDM eine Schichtdicke von 18 nm anzeigt, was einer Dickebeschichtung auf den Stents von 50 nm entspricht.

4.2.3 Biosensorexperimente

Mit der Biosensortechnik lassen sich unter Echtzeitbedingungen die intermolekulare Reaktion von Biomolekülen oder die Adsorptionraten an Oberflächen bestimmen. Aus den so gewonnenen Daten ist es möglich, Affinitätskoeffizienten zu bestimmen und Kinetiken zu berechnen. Durch die Verwendung optischer oder akustischer Methoden ist es nicht notwendig Radioaktiv- oder Fluoreszenzmarkierungen durchzuführen.

Bei den optischen Methoden kommen drei Varianten vor, die alle die Veränderung des Brechungsindex durch Adsorption von Molekülen auf der Biosensorchipoberfläche bestimmen:

- Oberflächen-Plasmon-Resonanz, (Biosensor BIAcore, Pharmacia),
- Messung der Phasenverschiebung einer Lichtwelle oder
- Messung der Phasenverschiebung der magnetischen und elektrischen Transversalwelle von linear polarisiertem Licht.

Das letztgenannte Verfahren kommt bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät BIOS-1 (Artificial Sensing Instruments ASI AG, Schweiz) zum Einsatz. Mathematische Grundlage des Verfahrens und der Berechnung der Adsorptionsmenge ist die Langmuirsche Adsorptionsisotherme

$$\Gamma = \Gamma_{\max} \frac{Kc}{Kc + 1} \quad \text{mit} \quad K = \frac{k_a}{k_d} \quad 4$$

wobei Γ = Oberflächenkonzentration, k_a = Adsorptionskoeffizient, k_d = Desorptionskoeffizient, Γ_{\max} = maximale Oberflächenkonzentration, c = Konzentration der überstehenden Lösung sind. Die Menge an gebundenem Protein Γ in

Masse/Flächeneinheit kann nach Ramsden nach folgender Gleichung aus den optischen Parametern (siehe Abbildung 45) berechnet werden [77]:

$$\Gamma = \frac{(n_A - n_C)t_A}{\frac{dn_\infty}{dc}} \quad 5$$

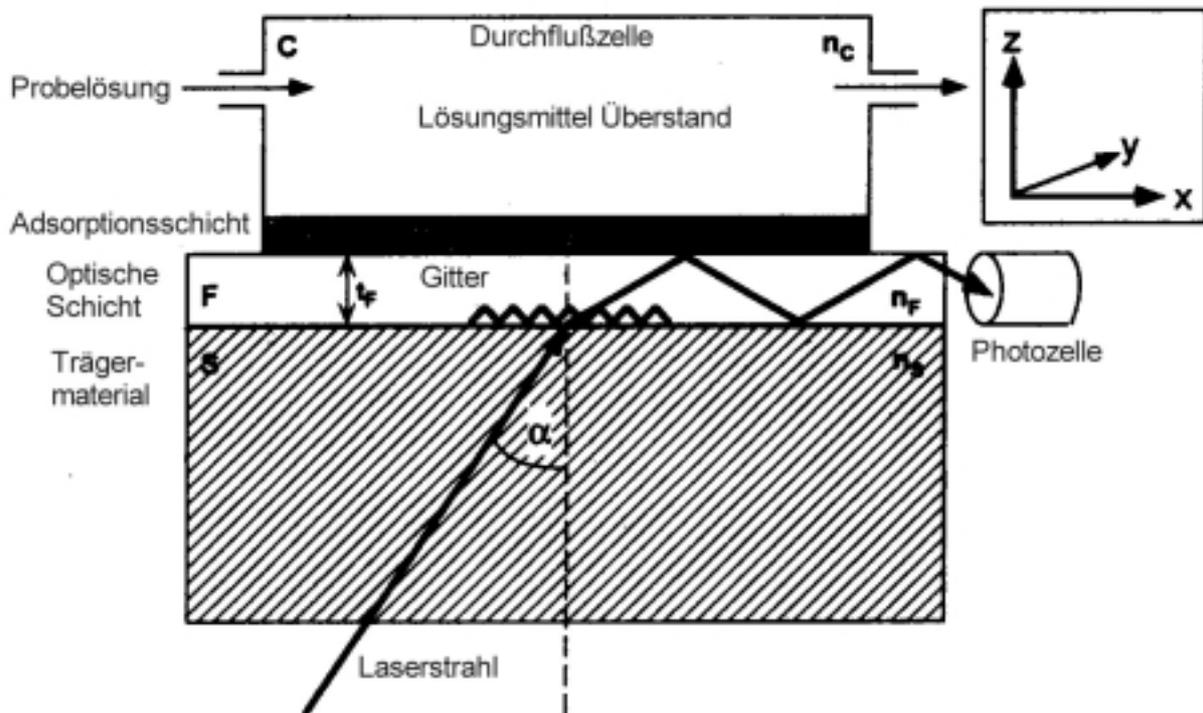


Abbildung 45. Schematische Darstellung des Biosensorchips. n_F = Brechungsindex der Flüssigkeit, n_s = Brechungsindex des Trägermaterials, n_C = Brechungsindex des Lösungsmittelüberstands, t_f = Schichtdicke der Flüssigkeit, α = Einfallswinkel des Laserstrahls, weitere Erklärung siehe Seite 88.

Die Abbildung 45 zeigt den Bereich der Meßzelle des Biosensors. Der Laserstrahl fällt mit dem Einfallswinkel α durch das Trägermaterial (Biosensorchip) ein. Über die optische Schicht, in die ein Gitter eingelassen ist, wird durch eine Durchflußzelle die Untersuchungslösung gepumpt. Durch die Adsorptionsschicht ergibt sich ein Ausfallswinkel der durch die Photozelle registriert wird. Aus der gesamten bekannten Geometrie der Versuchsanordnung lassen sich die angegebenen optischen Parameter ermitteln. Wobei n_A = Brechungsindex der Adsorptionsschicht, n_C = Brechungsindex der überstehenden Lösungsmittelschicht, t_A = Dicke der Adsorptionsschicht ist.

Für die meisten Proteine kann man für den Bruch dn_{∞}/dc einen mittleren Wert von 0,188 ml/g annehmen [78]. Mit Hilfe des Biosensors lassen sich dann die fehlenden Parameter n_a und t_a berechnen.

Der gesamte apparative Aufbau (Abbildung 46) funktioniert folgendermaßen: Mittels einer Peristaltikpumpe (PP) werden unterschiedliche Lösungsmittel durch das Ventil (SV) über die Durchflußzelle (FZ), die auf dem Biosensorchip montiert ist, gepumpt. Der Laserstrahl (L) wird über einen Spiegel (MI) auf den Chip gestrahlt und von den beiden Photozellen (P) detektiert. Der Goniometertisch wird über einen Schrittmotor (M), der Mikrometerschraube und dem Arm (LA) bewegt. Der Winkel des Tisches wird vom Winkelmesser (AE) bestimmt. Der gemessene Winkel wird mit den Messsignalen der beiden Photozellen, die das einfallende Laserlicht registrieren, im Rechner zur Auswertung korreliert.

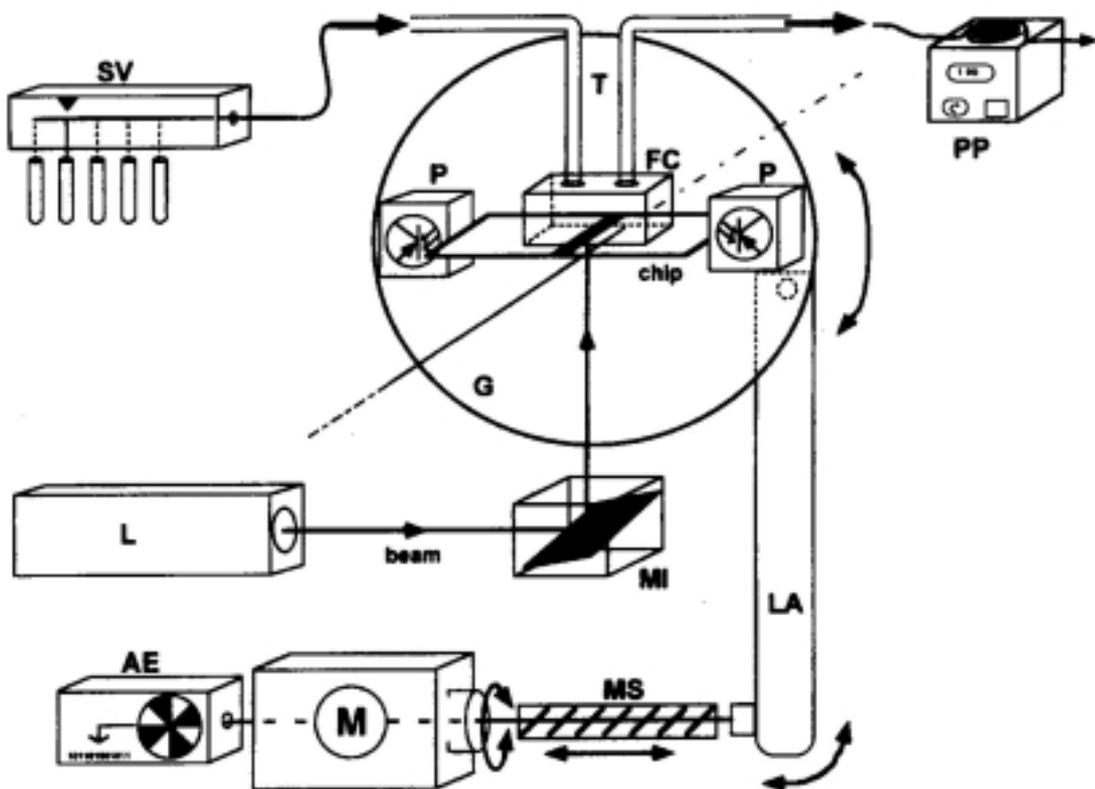


Abbildung 46. Schematische Darstellung der Biosensorapparatur. L=Laser, MI=Spiegel, G=Goniometertisch mit angedeuteter Drehachse, FC= Durchflußzelle, P=Photodioden, LA=Arm zur Kraftübertragung der MS= Mikrometerschraube, M= Schrittmotor mit AE=Winkelmesser, PP=Peristaltikpumpe, SV=Lösungsmittelventil. Weitere Erläuterung siehe vorhergehender Abschnitt.

Der prinzipielle Verlauf eines Biosensorexperiments ist wie folgt:

Man wäscht den neuen Biosensorchips zur Reinigung und Aktivierung mit 1 N Salzsäure. Anschließend äquilibriert man den Biosensorchip mit der gewünschten Pufferlösung (B), beispielsweise PBS, bis eine Basislinie erreicht ist. Nun erfolgt

die Adsorption einer Protein- oder Antikörper-Lösung in der Pufferlösung (cAB), mit der der Biosensor zuvor äquilibriert wurde. Die Adsorption wird so lange durchgeführt, bis eine Sättigung durch einen nahezu konstanten Brechungsindex zu sehen ist. Dieser Schritt kann auch unter Verwendung proteinchemischer Methoden an aktivierten Biosensoren unter Bildung kovalenter Bindungen zur Chipoberfläche durchgeführt werden. Nun wäscht man mit Puffer (B) bis eine neue Basislinie erreicht ist, um überschüssiges Protein zu entfernen. Gegebenenfalls erfolgt eine weitere Adsorption einer zweiten Proteinschichten (mAB) oder Untersuchung von Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen durch Verwendung weiterer Protein- und Pufferlösungen. Abbildung 47 zeigt eine typische Brechungsindexkurve als Funktion der Zeit. Bei dieser Kurve wurde nach der Adsorption des ersten Antikörpers cAB ein monoklonaler Antikörper gebunden. Der monoklonale Antikörper mAB bindet mit hoher Affinität das Antigen AG, was an dem steilen Anstieg der Brechungsindexkurve zu erkennen ist.

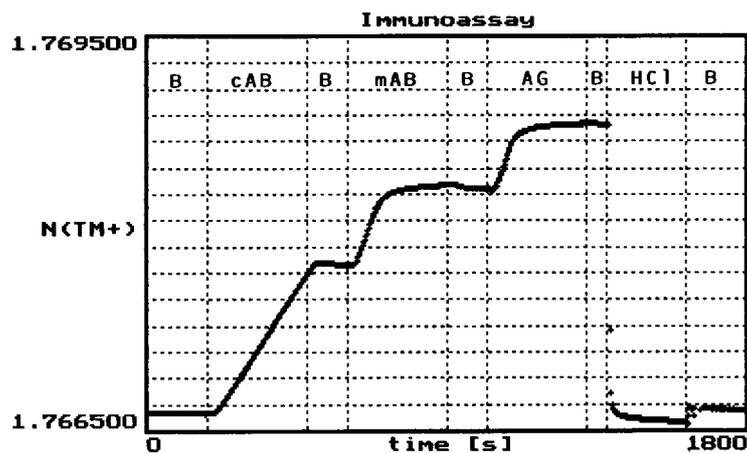


Abbildung 47. Änderung vom Brechungsindex bei der Antigen-Antikörperreaktion eines Biosensorexperiments. Der Verlauf des Experiments war B: Puffer, cAB Antikörper gegen den monoklonalen Antikörper mAB, AG: Antigen, HCL: 1N Salzsäure, B:Puffer.

Am Verlauf des Brechungsindexes kann man die zunehmende Adsorption der Proteine erkennen. Aus dieser Zunahme und dem zeitlichen Verlauf lassen sich wie oben besprochen die Bindungsmenge und Affinitätskoeffizienten der Antikörper berechnen.

4.2.3.1 Versuchsdurchführung eines Biosensorexperiments

Die Puffer und Proteinlösungen wurden für Biosensorexperimente stets frisch vor Versuchsbeginn zubereitet und hatten Raumtemperatur.

Dann wurde wie folgt verfahren:

1. Nach dem Einspannen des Biosensors in die Durchflußkammer wurde das System bei einem Fluß von 0,5 ml/min mit 1 N Salzsäure gespült.
2. Der Biosensor wurde mit PBS bei einem Fluß von 0,5 ml/min für 1 h äquibriert, anschließend sollte sich eine stabile Basislinie gebildet haben, d.h. der Brechungsindex sollte konstant bleiben.
3. Die Adsorption des Proteins wurde mit einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS bei einem Fluß von 0,1 ml/min durchgeführt, dies wurde so lange aufrecht erhalten, bis eine Sättigung zu verzeichnen war.
4. Das Waschen des Biosensors wurde mit PBS bei einem Fluß von 0,2 ml/min durchgeführt, um überschüssiges Protein zu entfernen. Dies geschah solange bis keine Veränderung des Brechungsindex zu verzeichnen war.
5. Anschließend wurde mit 0,01 N HCl bei einem Fluß von 0,2 ml/min für 30 Minuten gewaschen.
6. Dann wurde der Biosensor mit PBS bei einem Fluß von 0,2 ml/min gespült bis eine neue Basislinie erreicht war.

4.2.4 Adsorptionsbestimmung auf Oberflächen mit radioaktiv markierten Proteinen

Das ¹²⁵Jod-Human-Serumalbumin und das ¹²⁵Jod-Fibrinogen wurde nach einer modifizierten Chloramin-T-Methode nach Hunter und Greenwood hergestellt [79]. Die Versuche mit den radioaktiven Substanzen wurden alle hinter einer Bleiabschirmung durchgeführt.

Radioaktive Markierung mit ¹²⁵Jod

Zu 1,5 µg des zu markierenden Proteins in 10 µl 1/15 M Phosphatpuffer, pH 7,4 wurde in ein Eppendorfgefäß mit einer Hamilton-Spritze 2,5 µl Na¹²⁵J-Lösung gegeben. Anschließend gab man 10 µl einer 1mg/ml Chloramin-T Lösung in Wasser zu und ließ für 60 Sekunden im Eppendormixer reagieren. Durch Zugabe von 10 µl einer Natriumdisulfidlösung mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in Wasser wurde die Reaktion abgebrochen und nach kurzem Mischen der Reaktionslösung diese sofort aufgetrennt.

Gelfiltration auf PD-10 Säulen

Zur Entfernung des überschüssigen Jods wurde das Reaktionsgemisch auf einer Sephadex G-25 Säule entsalzt. Hierzu äquibrierte man die PD-10 Säule (Pharmacia) mit 25 ml PBS. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf die

Säule aufgetragen und das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µl PBS nachgespült und die Waschlösung wiederum auf die Säule gegeben. Nachdem das Probenvolumen vollständig in die Säule eingesickert war, wurde mit 2 ml PBS-Puffer nachgespült. Das markierte Protein eluierte durch Zugabe von weiteren 3,5 ml Puffer. Die spezifische Aktivität eines Aliquots des reinen markierten Proteins wurde in einem Gamma-Zähler bestimmt.

Bestimmung der Adsorption des markierten Proteins auf DLC und Edelstahl

Die radioaktiv markierte Albuminlösung mit bekannter spezifischer Aktivität und Konzentration wurde durch Zugabe von unmarkiertem humanem Serumalbumin auf eine Konzentration von 20 µg/ml in PBS gebracht. Zu dieser Albuminlösung gab man 20 µg/ml unmarkiertes Fibrinogen. Bei der Herstellung der markierten Fibrinogenlösung wurde analog verfahren. Anschließend wurden die Stents für 8 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Stents wurden aus der radioaktiven Proteinlösung genommen und die überschüssige Lösung abzentrifugiert. Hierzu wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß etwa 3 mm hoch Glaswolle gegeben und der Stent auf die Glaswolle gelegt und bei 250xg in einem Schwenkrotor für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Aktivität bestimmt. Reversibel gebundenes Protein wurde durch fünfmaliges Inkubieren mit 2 ml PBS für 15 min bei 37 °C und anschließendem Zentrifugieren abgewaschen. Erneut wurde die Aktivität bestimmt. Um nicht-denaturiertes Protein von der Oberfläche zu waschen, wurden die Stents nach der zweiten Messung für 1 h in 2 ml einer 1 %-igen SDS-Lösung inkubiert [80], zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die Aktivität bestimmt.

4.2.5 Thrombozytenadhäsion an Oberflächen

Die nachfolgende Vorschrift ist eine Modifikation und Kombination der Versuchsdurchführungen von C. Baquey et. al. [81], C. Bickel [82] und JW. Burch et.al. [83]. Alle für die Versuche verwendeten Geräte und Puffer wurden zuvor auf 37 °C temperiert.

Zur Bestimmung der Thrombozytenadhäsion an Oberflächen wurde 500 ml heparinisiertes humanes Vollblut für 10 Minuten bei 300xg und 37 °C zentrifugiert. Das Plasma entfernte man mit einer Pipette vom Sediment. Zu einem Drittel des Plasmas gab man pro Milliliter Plasma 1 µl einer ethanolischen [^{14}C]-Arachidonsäurelösung, mit einer Aktivität von 54 mCi/mmol und einer Konzentration von 50 µCi/ml. Diese Plasmalösung inkubierte man für 2 Stunden

bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 50 U/min. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Thrombozyten bei 2500xg für 10 Minuten bei 37 °C abzentrifugiert und zur Entfernung überschüssiger Arachidonsäure je zweimal in Citratpuffer pH 3,5 und PBS-Puffer, pH 5,5, aufgenommen, für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und abzentrifugiert. Das gewaschene Plasma wurde mit einem weiteren Drittel des nichtaktivierten Plasmas versetzt. Das restliche Drittel des nichtaktivierten Plasmas wurde 10 Minuten bei 2500xg und 37 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit diesem thrombozytenarmen Plasma wurde das radioaktive Plasmagemisch mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer) auf eine Konzentration von 3×10^5 Thrombozyten/ μl eingestellt. Danach bestimmte man die Aktivität des Plasmas durch Auszählen mit einem Flüssigszintillationszähler und dem Szintillationscocktail Zinsser Quicksafe A.

Zur Adhäsion der Thrombozyten wurden DLC-Stents, Edelstahlstents und heparinisierte Stents auf 3,5 mm expandiert und in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Das radioaktive Plasma wurde mit einer Adenosindiphosphatlösung versetzt, so daß die Konzentration an Adenosindiphosphat im radioaktiven Plasma 10 μM betrug. Zu den Stents gab man nun 1,5 ml der radioaktiven Plasmalösung und inkubierte für 30 Minuten bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 50 U/min. Anschließend wurden die Stents je zwei mal mit Citratpuffer, pH 3,5, und PBS-Puffer, pH 5,5, für 10 Minuten bei 37 °C gewaschen. Anschließend wurde die Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Als Referenz diente ein Edelstahlstent, der mit einer nicht radioaktiv markierten Plasmalösung nach obiger Vorschrift behandelt wurde.

4.2.6 Elektrochemische Korrosionsuntersuchungen

Mit Hilfe potentiostatischer Versuche kann man auf die Korrosionseigenschaften eines Materials schließen. Zum prinzipiellen Aufbau eines Potentiostaten sei auf die Literatur in Kapitel 2.5.2 verwiesen. Das in dieser Arbeit verwendete Gerät zur Korrosionsmessung bestand aus einem Potentiostaten Voltalab PGZ 100 der Firma Radiometer Copenhagen (Dr. Lange, D, Berlin), der dazugehörigen Software Voltamaster 4 und einer temperierbaren Meßzelle CMPD06 (Dr. Lange, D, Berlin) mit Kalomel-Bezugselektrode und einer Platin-Gegenelektrode.

4.2.6.1 Strom-Spannungs-Kurven

Prinzipiell können Strom-Spannungskurven auf zwei unterschiedliche Arten erstellt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit der potentiostatischen Messung, indem man von außen eine Potentialdifferenz zwischen Arbeitselektrode (Probe) und Gegenelektrode anlegt, wobei der dabei fließende Strom gemessen wird. Zum anderen wird bei der galvanostatischen Methode ein Strom an die Elektroden angelegt und die sich dabei einstellende Potentialdifferenz ermittelt.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Software ein Spannungsverlauf nach der potentiostatischen Methode generiert und der sich dabei einstellende Stromfluß aufgezeichnet. Dabei erhält man eine Spannungs-Strom-Verlaufkurve, aus der sich zwei Aussagen treffen lassen:

4.2.6.2 Korrosionsrate anhand der Tafelgeraden

Im Bereich des Ruhepotentials lassen sich mit Hilfe einer Durchtritts-Strom-Spannungsbeziehung (Butler-Vollmer-Gleichung, **6**) und der sogenannten Tafelgerade (**7**) die Korrosionsrate in mm/Jahr bei bekannter Probenfläche berechnen,

$$j_D = j_D^+ + j_D^- = j_0 \left(e^{\eta_D \frac{\alpha n F}{RT}} - e^{-\eta_D \frac{(1-\alpha)nF}{RT}} \right) \quad \mathbf{6}$$

$$\lg |j_D| = \lg j_0 + \frac{\alpha n F}{2,3RT} |\eta_D| \quad \mathbf{7}$$

wobei j_D^+ / j_D^- der anodische und kathodische Teilstrom der Metallauflösung, j_0 die Austauschstromdichte, α der Durchtrittsfaktor, η_D die Durchtrittspolarisation, n die Wertigkeit, F die Faradaykonstante und R die Gaskonstante ist.

Die für die Berechnung notwendigen Parameter erhält man aus der logarithmischen Darstellung der Potential-Spannungskurve um das Ruhepotential. Dabei ergeben sich die Faktoren durch Anlegen von Geraden an die Kurve im Tafelbereich (siehe Abbildung 48). Die Berechnungen wurden mit Hilfe einer Software durchgeführt.

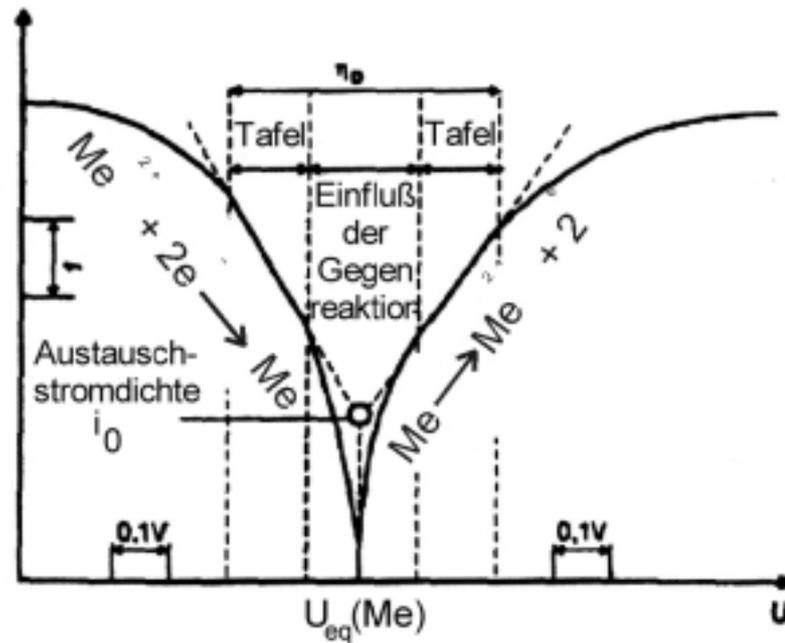


Abbildung 48. Tafelbereich einer Strom/Potentialkurve. i_0 = Austauschstromdichte, ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt am Schnittpunkt der beiden Tafelgeraden. Die Austauschstromdichte liegt am Gleichgewichtspotential U_{eq} . Bei diesem Potential ist die kathodische Abscheidungsreaktion (linke Tafelgerade) und die anodische Korrosionsreaktion (rechte Tafelgerade) im Gleichgewicht.

4.2.6.3 Durchtrittsspannung

Bei hoher anodischer Polarisierung der Probe kommt es nach dem sogenannten Passivbereich (vergleiche Abbildung 8) zu einem Anstieg der Stromstärke. Die Spannung, bei der dieser Anstieg stattfindet, nennt man Durchtrittspotential und ist ein Maß für die Passivität des Metalls, d.h. je höher diese Spannung ist, desto korrosionsbeständiger ist das Material.

4.2.7 Bestimmung der Stentkorrosion *in vivo*

Zur Untersuchung der Stentkorrosion *in vivo* wurden DLC-beschichtete Stents und Edelstahlstents in Kaninchenaorten implantiert. Der Stentdurchmesser betrug nach dem Expandieren 3,2 mm. Nach einer Verweilzeit von 4 Wochen wurden die Aorten aus dem Kaninchen entfernt und in drei Bereiche eingeteilt. Der Bereich 1 im Stentbereich, Bereich 2 und der Bereich 3, 0,2 - 0,5 cm vom Stent entfernt.

Alle mit den Gewebeproben in Kontakt kommenden Geräte wurden zuvor gründlich gereinigt und mit konzentrierter Salpetersäure gewaschen. Die Aortenteile wurden mit einem Titanmesser voneinander getrennt und die Masse bestimmt. Anschließend veraschte man das Gewebe in einem Platintiegel mit Deckel bei 800 °C für 15 Minuten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur nahm

man die Probe in 0,5 ml konzentrierte Salpetersäure (Merck, ACS-Qualität) auf und inkubierte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Salpetersäure dampfte man mit Hilfe einer Infrarotlampe vorsichtig ab und veraschte erneut für 30 Minuten bei 1000 °C. Anschließend wurde die Probe in 1 ml 0,1 N Salpetersäure aufgenommen und in einem Meßkolben auf 2,5 ml mit 0,1 N Salpetersäure aufgefüllt. Die Konzentration an Chrom- und Nickelionen wurde mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie ermittelt.

4.2.8 Zellkulturuntersuchungen^{iv}

4.2.8.1 Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden isoliert wie in Jaffe et al. beschrieben und bei 37 °C in einer CO₂-angereicherten Atmosphäre kultiviert, bei der der Sauerstoffgehalt durch Zusatz von Stickstoff auf 10 % reduziert wurde [84]. Als Medium kam ein 1:1-Gemisch aus Ham's F12 und Iscove's-modified Dulbecco's Medium mit 10 % humanem Serum zum Einsatz.

4.2.8.2 Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus humanem Vollblut

Um die maximal mögliche Reinheit der Zellfraktion zu erzielen, wurde ein Zellisoliationsverfahren gewählt, das die Voraktivierung der PMN auf ein Minimum reduzierte. Hierbei kam eine modifizierte Methode nach Dooley et al. zum Einsatz [85].

Zunächst wurden 40 ml Na-Citratblut (32 ml Blut, 8 ml Na-Citrat) für 10 Minuten bei 200xg in einem 50ml-Falcon-Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus PRP, wurde verworfen und das nun fehlende Volumen durch RPMI 1640 ersetzt. Danach folgte eine Ficoll-Dichteauffrennung. Hierzu wurde das bereits angereicherte Blut nochmals mit RPMI 1640 im Verhältnis 2:1 verdünnt und über Ficoll der Dichte 1,077 in zwei neuen Falcon-Röhrchen geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation ohne Bremse bei 1000xg und 10°C befanden sich die mononukleären Zellen in der Interphase, die Granulozyten und Erythrozyten im Sediment. Anschließend wurden die Zellpellets im Sediment gepoolt, 1:3 mit RPMI 1640 vermischt und 10 Vol.% einer 4%igen Dextran-Lösung zugesetzt. Die Zellsuspension wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und

^{iv} Die Zellkulturuntersuchungen wurden an der Universität Mainz durchgeführt

für 45 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wobei es zur Ausbildung von zwei Phasen kam (Erythrozyten oben, Granulozyten unten). Die obere Phase wurde abgenommen und abzentrifugiert. Um eventuell immer noch vorhandene Erythrozyten zu lysieren, folgte für 5 Minuten der Zusatz einer 4° kalten Erythrozyten-Lyse-Lösung. Anschließend wurde die Lyselösung zweimal mit 37°C warmen RPMI 1640 ausgewaschen. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Kammer nach Schnellfärbung mit Türks-Lösung. Dabei betrug der mikroskopisch abgeschätzte Reinheitsgrad der Granulozyten 97%. Zur Sicherstellung des nicht-aktivierten Ausgangszustandes der Granulozyten erfolgte eine LTB₄-Bestimmung der Zellkonzentrate.

Die Zellzahl wurde nun auf 10⁶ PMN / ml RPMI eingestellt und die Zellen unmittelbar danach bei 37°C in den Versuchen eingesetzt.

4.2.8.3 Fließkammer- und Bildverarbeitungssystem

Bei dem hier benutzten Fließkammersystem handelt es sich um eine Weiterentwicklung des von Klein et.al. vorgestellten [38]. Es besteht aus einer Kammer, die einen vorbereiteten Objektträger aufnimmt und dessen physiologische Umspülung mit Zellsuspensionen ermöglicht (siehe Abbildung 49). Die beiden Enden der Kammer sind über ein kurzes Schlauchsystem miteinander verbunden, das durch eine Rollpumpe geleitet wird. Damit ist es möglich, für die im gesamten System befindliche Zellsuspension eine beliebige physiologische Fließbedingung herzustellen.

Das Kammersystem ist auf einem eigens konstruierten, beheizbaren Mikroskop-Tischaufsatz montiert, das Schlauchsystem an ein externes Wasserbad angeschlossen, so daß die Versuche bei konstant 37°C durchgeführt werden konnten.

Um das Verhalten der Granulozyten während des Versuchs beurteilen zu können, wurde eine Drei-Chip-CCD-Kamera der Firma Sony an ein Lichtmikroskop (Leitz) angeschlossen, die direkt mit einer Videokarte in einem PC verbunden war. Mit Hilfe der verwendeten Software konnte die Anzahl der adhärenen Zellen und deren Aktivierungszustand on-line unter Subtraktion des Hintergrundbildes bestimmt werden. Außerdem war es damit möglich, Zellanhäufungen durch Stapelung der Bilder über die Zeit darzustellen.

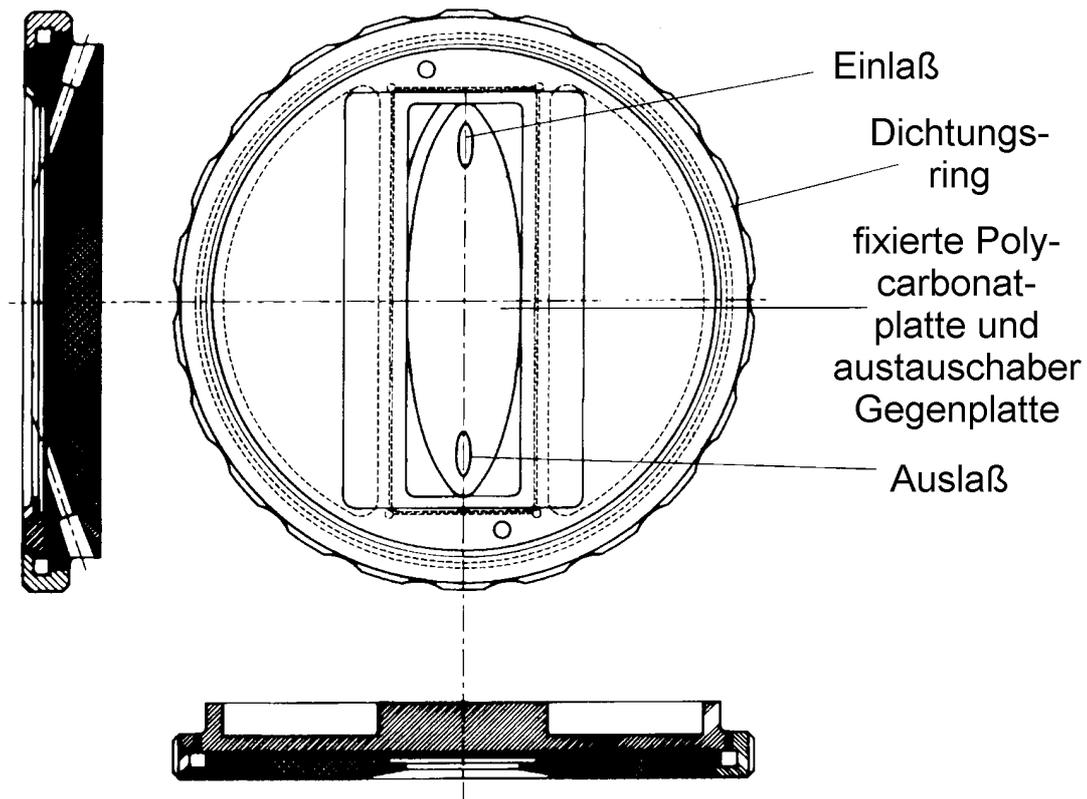


Abbildung 49. Schematische Darstellung der Durchflußkammer für die Zelluntersuchungen. Die Durchflußkammer für die Zelluntersuchungen besteht aus einer Halterung mit zwei parallelen Platten im Abstand von etwa 100 µm. Die Zellkulturlösung wird mit einer Peristaltikpumpe (nicht abgebildet) in den Einlaß gepumpt. Sie fließt zwischen der Polycarbonatplatte und der zu untersuchenden Oberfläche der parallel angebrachten Platte zum Auslaß.

4.2.8.4 Dynamische und statische Testung

Bei der statischen Testung wurden zuerst die Testmaterialien steril in 96-Lochplatten eingebracht. Nach Abschluß der Granulozytenisolation konnten die gewonnenen und wie oben beschrieben eingestellten Zellen sofort mit einer Eppendorf-Pipette in die präparierten Testplatten überführt werden (1 ml / well) und bei Raumtemperatur für 30 Minuten adhären.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Materialien steril mit einer Pinzette entnommen. Zum Entfernen nicht-adhärenter Zellen erfolgte vorsichtiges Spülen mit RPMI 1640 der Testmaterialien, die dann zum Fixieren für 15 Minuten in eine 4%ige PFA/PBS-Lösung gebracht wurden. Danach wurden die Präparate erneut zweimal vorsichtig mit RPMI 1640 gespült und zur mikroskopischen Beurteilung auf einem Objektträger fixiert.

4.2.9 Darstellung von Polyethylenimin-TRIMID

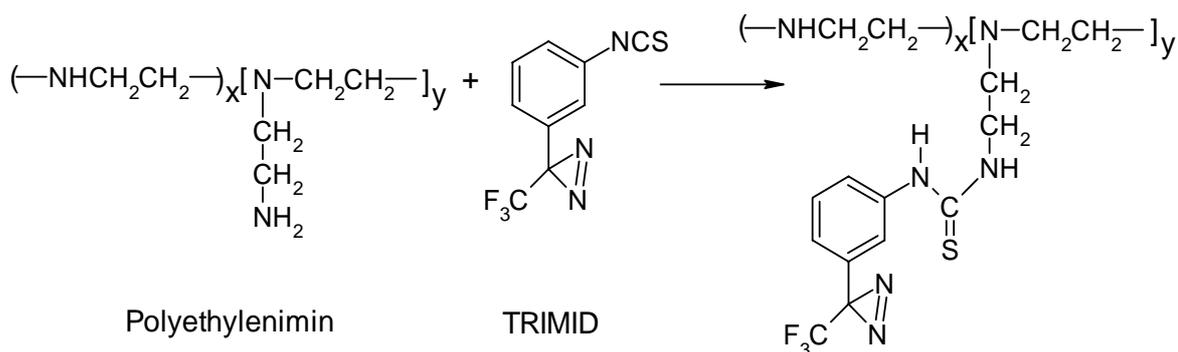


Abbildung 50. Reaktion von Polyethylenimin mit 3-(Trifluormethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirin.

In einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgröße von 12 kD wurden 5 ml einer 40 %igen wässrigen Polyethylenimin-Lösung, mit einem mittleren Molekulargewicht von 750.000 Dalton und 20 ml Wasser für 48 h gegen 5 Liter Wasser dialysiert. Das Wasser wurde nach 24 h gewechselt. Anschließend lyophilisierte man den Inhalt des Dialyseschlauchs für 3 Tage, um durch Wiegen den Festgehalt zu bestimmen.

In einem 2 ml Reactivial (Pierce) löste man 64 mg des dialysierten Polyethylenimins in 500 µl Wasser und gab eine Lösung von 21,2 mg TRIMID in 500 µl Ethanol zu (Reaktionsgleichung siehe Abbildung 50). Die klare gelbe Lösung wurde für 2 Stunden bei 50 °C in einem Thermoblock inkubiert. Die Reaktionslösung wurde mit 5 ml Wasser verdünnt, wobei die Lösung trüb wurde. Man dialysierte erneut in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlußgröße von 12 kD für 48 h gegen 5 Liter Wasser. Nach dem Lyophilisieren erhält man 47,8 mg einer zähen, schwach gelben Substanz. Diese wurde in 23,9 ml Wasser gelöst um den Derivatisierungsgrad (Anzahl der TRIMID-Moleküle pro Polyethyleniminmolekül) des Polyethylenimins zu bestimmen. Durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums und anschließender Bestrahlung und erneuter Aufnahme des Spektrums konnte mit Hilfe des bekannten molaren Extinktionskoeffizienten von TRIMID der Derivatisierungsgrad bestimmt werden [86].

Bestimmung des Verhältnisses PEI zu TRIMID

Es wurden je eine Lösung von dialysiertem Polyethylenimin und Polyethylenimin-TRIMID mit einer Konzentration von 2 mg/ml hergestellt. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum von 290 bis 490 nm der PEI-TRIMID-Lösung gegen PEI-

Lösung aufgenommen. Beide Lösungen bestrahlte man in einem Stratalinker 2400, der mit fünf Sylvania Röhren 350 Blacklight 8 WF8T5/350BL ausgestattet war und eine Strahlenverteilung von 300-420 nm mit einem Maximum bei 350 nm besaß (Stratagene, D, Heidelberg), für 15 Minuten in einem Abstand von 10 cm von der Strahlenquelle. Danach wurde das obige Spektrum erneut aufgenommen.

4.2.10 Kopplung von Heparin an DLC-Oberflächen

Die zu koppelnde DLC-Probe wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in einer Lösung von 0,2 mg/ml PEI-TRIMID in PBS/Wasser (1:10, v/v) inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in Wasser gewaschen. Das Heparin wurde durch Inkubieren mit einer Lösung von 0,2 mg/ml Heparin in PBS/Wasser (1:10, v/v) für 1 h bei Raumtemperatur adsorptiv gebunden. Die Probe wurde nach 5-minütigem Waschen mit Wasser durch Lyophilisieren getrocknet. Anschließend erfolgte ein 15-minütige Belichtung in einem Stratalinker (Stratagene) im Abstand von 5 cm von der Lichtquelle (350 nm). Die Proben wurden nach dem Belichten ohne besondere Vorkehrungen am Tageslicht weiterverarbeitet und wurden bis zur Bestimmung des Heparingehalts im Kühlschrank bei 4 °C trocken aufbewahrt.

4.2.11 Bestimmung der Heparinaktivität durch chromogene Substrate

Zur Bestimmung der Heparinaktivität auf der Stentoberfläche wurde die komplexkatalysierende Wirkung von Heparin ausgenutzt [87]. Heparin bildet in dem verwendeten Testverfahren mit überschüssigen Antithrombin III (**AT**) den Komplex (**A**). Durch diesen wird die Bildung eines Komplexes (**B**) von Antithrombin III und dem in der Lösung im Überschuß befindlichen Faktor Xa beschleunigt.

Faktor Xa ist bei der Blutgerinnung für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin verantwortlich. Dies geschieht durch enzymatische Peptidspaltung. Unkomplexierter Faktor Xa ist in der Lage, selektiv die Sequenzen Glycin-Arginin, Arginin-Threonin und Arginin-Isoleucin zu spalten.

Nach dem Zusatz von Faktor Xa (Fxa) zum Komplex (**A**) und dem Substrat S-2732 finden zwei konkurrierende Reaktionen statt: Zum einen die Komplexierung von Faktor Xa zum Komplex (**B**) und zum anderen die Spaltung der Substanz S-2732 in Peptid und p-Nitroanilin, welches bei 405 nm quantitativ bestimmt wird

(siehe Abbildung 51). Seine Konzentration ist somit umgekehrt proportional zur Heparinaktivität.

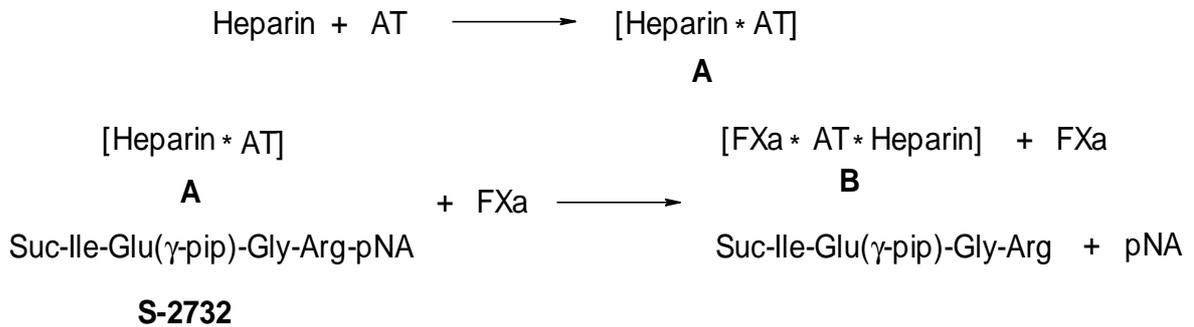


Abbildung 51. Reaktionsschema der Heparinbestimmung beim Faktor Xa Test.

Die Reaktion wurde nach 10 Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von Essigsäure gestoppt. Zur Eichung der Messung wurden Lösungen mit bekannter Aktivität des verwendeten Heparins hergestellt und eine Eichkurve erstellt. Hierzu wurde eine Heparin-Maßlösung in dest. Wasser hergestellt.

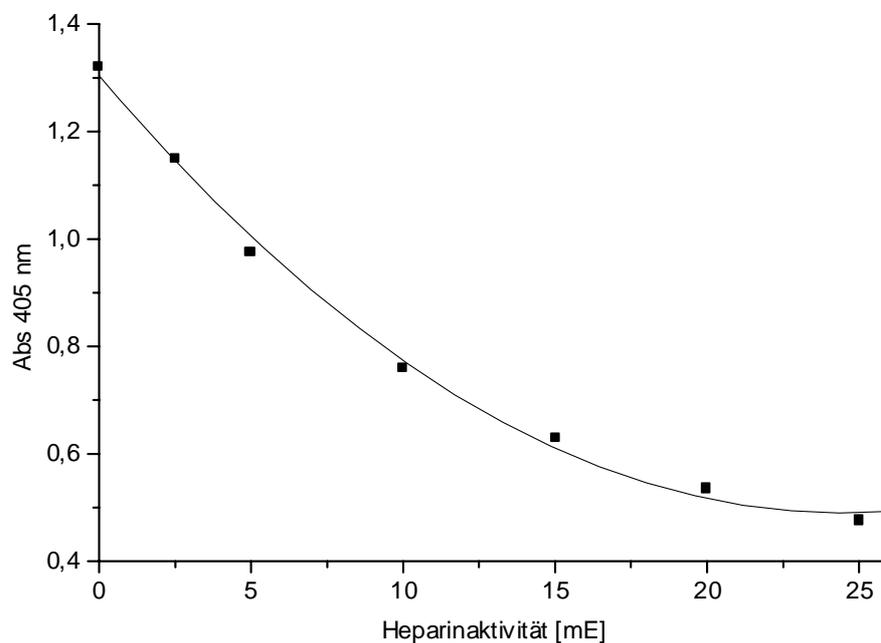


Abbildung 52. Eichkurve für die Bestimmung der HM-Heparinaktivität durch das chromogene Substrat S-2732 (Haemochrom). Es wurden Proben mit bekannter Heparinaktivität hergestellt und deren katalytische Aktivität für die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrats S-2732 bestimmt.

Das Heparin hatte eine Aktivität von 176,6 IE/mg bei HMW Heparin mit einer Molekulargewichtsverteilung von 3-30 kD und von 87,6 iE/mg bei LMW Heparin

und einer Molekulargewichtsverteilung von 60 % < 6 kD. Die entsprechende Aktivitätsmenge an Heparin wurde vorgelegt und eine Lösung von 0.025 E Antithrombin III und 0,15 μmol S-2732 in 300 μl H-Testpuffer zugegeben. Anschließend wurde das Volumen der Lösung mit H-Testpuffer auf 500 μl aufgefüllt.

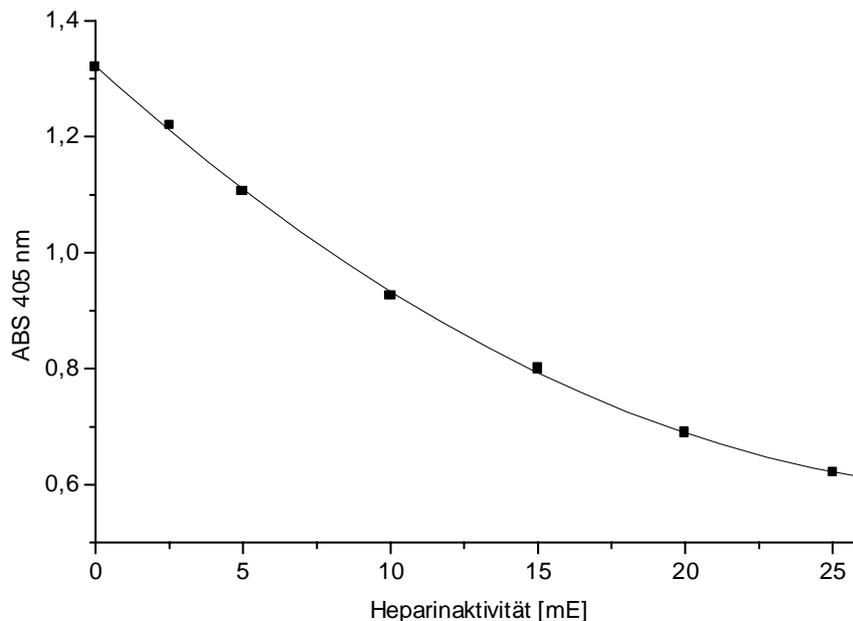


Abbildung 53. Eichkurve für die Bestimmung der LM-Heparinaktivität durch das chromogene Substrat S-2732 (Haemochrom). Es wurden Proben mit bekannter Heparinaktivität hergestellt und deren katalytische Aktivität für die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrats S-2732 bestimmt.

Die Reaktion wurde durch weitere Zugabe von 100 μl 0,3 nE Faktor Xa bei Raumtemperatur gestartet. Nach 10-minütigem leichtem Schütteln wurde die Reaktion mit 200 μl 5 % Essigsäure abgebrochen und die Absorption in einer 1 cm Küvette bei 405 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen wurden in den Abbildung 52 und Abbildung 53 dargestellt und resultieren in einer guten Eichkurve mit geringer Abweichung der Meßwerte. Zur Bestimmung der Heparinaktivität auf Edelstahlplättchen oder Stents wurden diese analog der obigen Vorschrift behandelt. Die Reaktionslösung wurde mit 200 μl H-Testpuffer auf 600 μl aufgefüllt, so daß das Endvolumen nach Zugabe der Essigsäure stets 800 μl betrug.

4.2.12 Bestimmung der Heparinaktivität mit Auramin O

Heparin katalysiert die saure Hydrolyse des Farbstoffs Auramin O zum Michlers Keton (siehe Abbildung 54) [88].

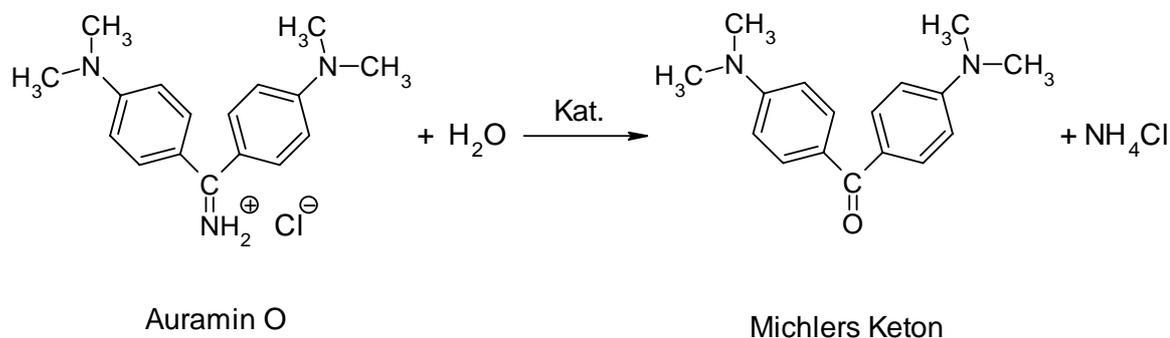


Abbildung 54. Hydrolyse von Auramin O zu Michlers Keton.

Beim Einsatz unterschiedlicher Glucosaminglycane als Katalysator für die obige Reaktion in einer Konzentration von 0,1 mM, basierend auf dem mittleren Molekulargewicht, kommt man zu den Ergebnissen der Tabelle 12.

Tabelle 12. Vergleich der katalytischen Aktivität unterschiedlicher Glycosaminglycane [88].

Glycosaminglycan	mittleres Molekulargewicht [g/mol]	Rate der Auramin O Hydrolyse ($\Delta A_{430}/\text{min} \times 10^3$)
ohne Zusatz		0,3
Heparin	18.000	17,5
Chondroitin 6-sulfat	50.000	0,4
Chondroitin 4-sulfat	50.000	0,4
Hyaluronat	8×10^6	0,3
Heparansulfat	36.000	0,8
Dermatansulfat	50.000	0,7
Keratansulfat	120.000	0,7

Der von P. Band et. al entwickelte Test wurde aufgrund der geringeren Heparinaktivität auf Oberflächen wie folgt abgewandelt und eine Eichkurve erstellt: Alle Lösungen und die Reaktionsgefäße, in denen die Bestimmung stattfand, wurden vor der Versuchsdurchführung auf 35 °C in einem Präzisionsthermoschrank (Mettler, 35 °C ± 0,1 °C) vortemperiert. Zu 1,00 ml einer $7,3 \times 10^{-5}$ M Auramin O-Lösung in Wasser wurden 0,200 ml der Heparinprobelösung und 1,00 ml einer 6 mM Salzsäurelösung gegeben und die Mischung 2 h lang bei 35 °C unter Lichtausschluß inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,200 ml 0,3 M Natriumdihydrogenphosphatlösung, pH 7,2, beendet und die Abnahme der Auramin O Konzentration gegen eine Probe ohne Heparinzugabe bestimmt bei 430 nm gemessen. Die Abbildung 55 zeigt eine gute Linearität der Meßwerte.

Zur Bestimmung der Heparinaktivität auf Oberflächen wurde anstelle von 0,2 ml Heparinlösung 0,2 ml Wasser vorgelegt und die Probe bei der Bestimmung kräftig im Präzisionsthermoschrank geschüttelt.

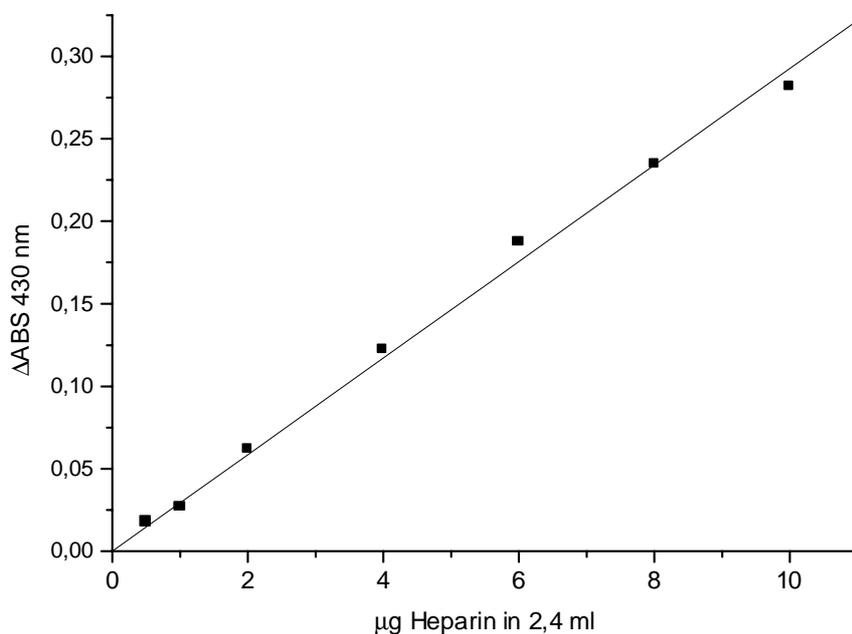


Abbildung 55. Eichkurve für die Bestimmung der katalytischen HM-Heparinaktivität für die Hydrolyse von Auramin O. Es wurden Proben mit bekannter Heparinmenge hergestellt und die Abnahme der Absorption, bei der durch Heparin katalysierten sauren Hydrolyse des Farbstoffs Auramin O zum Michlers Keton gemessen.

4.2.13 Beschichtung von Edelstahloberflächen mit ³²Phosphor

Hierzu wurden die Edelstahlproben, wie eingangs besprochen, in Beizlösung Polinox B gebeizt und in Elektrolytlösung E-268 elektropoliert. Auf den Passivierungsvorgang wurde verzichtet. Alle Versuche mit ³²Phosphor-Substanzen wurden hinter einer 1 cm starken Plexiglasplatte durchgeführt. Die Stents oder Edelstahlplättchen wurden in einer Tracer- und Salzsäure-freien ³²Phosphorsäurelösung inkubiert. Die Phosphorsäurelösung mit einer Aktivität von 186 mBq \equiv 93 μ l Phosphorsäure wurde auf 1 ml mit Wasser aufgefüllt und in ein Reactivial (Pierce) gegeben. Mittels eines Thermoblocks wurde 1 h lang auf 80 °C erhitzt. Die Proben wurden aus der radioaktiven Phosphorsäurelösung genommen und die überschüssige Lösung, die an der Oberfläche des Metalls haftete, abzentrifugiert. Hierzu wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß etwa 1 cm hoch Glaskugeln (mittlerer Durchmesser: 1,5 mm) gegeben, der Stent auf die Kugeln gebracht und bei 250xg in einem Schwenkrotor 5 min lang zentrifugiert. Die am Boden des Eppendorfröhrchens befindliche ³²Phosphorsäurelösung wurde mit einer Eppendorfpipette entnommen und wieder verwendet.

Anschließend wurde die radioaktive Metallprobe in 2 ml Wasser 10 Minuten lang unter Schütteln bei 200 U/min gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Metallprobe wurde dann in ein Glasröhrchen gebracht und 2 Stunden in einem Muffelofen auf 150 °C erhitzt. Anschließend wurde die Temperatur 2 h lang auf 350 °C erhöht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Diamond-Like-Carbon beschichtet und die Aktivität wahlweise nach 2 Methoden bestimmt.

- Der Stent wurde in einem festgelegten Abstand zentriert, unter eine Beta-Gamma Sonde (EG&G Berthold Typ LB 1231) mit Monitor (Umo LB123) gelegt und die Zählrate bestimmt.
- Der Stent wurde in einem Festkörper-Szintillator (Zinsser Typ ZA 212, Durchmesser: 15,5 mm, Länge: 56 mm; und Bohrung: 3,0 x 36,0 mm) gelegt und im Szintillationszähler (Typ LKB Wallac 1219 Rackbeta SzintiCounter) die Zählrate bestimmt.

4.2.14 Kalibrierung der Meßgeräte zur Bestimmung der Stentaktivität

Hierzu wurden 4 Stents nach Vorschrift 4.2.13 radioaktiv markiert und beschichtet. Die Zählrate der so beschichteten Stents wurde in einem 4 π Zählrohr (AEA

Technology) für 4 h bestimmt. Die Hälfte der Stents wurde jeweils in einem Gemisch von 5 ml konzentrierter Salpetersäure und 15 ml konzentrierter Salzsäure aufgelöst. Anschließend wurde in einem Meßkolben auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Aktivität dieser Lösungen wurde durch Messen der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigszintillationszähler bestimmt. Der Szintillationszähler war zuvor mit einer geeichten Natrium³²phosphatlösung kalibriert. Bei der Messung der Cerenkov-Strahlung war das Kanalfenster des Szintillationszählers auf 65-324 eingestellt. Damit wurden ca. 32 % der Gesamtsignale erfaßt. Durch Vergleich der Zählraten der Stents und der Aktivität der Lösungen konnte auf die Gesamtaktivität der verbliebenen Stents geschlossen werden. Mit diesen Stents wurden die beiden Meßanordnungen, die Beta-Gamma Sonde mit Monitor und der Szintillationszähler mit Festkörperszintillator (ZA 212) (siehe 4.2.13), kalibriert.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Stützimplantate aus Edelstahl, sogenannte Stents, die in der Kardiologie zur Behandlung von Verschlüssen eingesetzt werden, durch ein Niedertemperatur-Plasmaverfahren mit Diamond-Like-Carbon beschichtet. Das erhaltene Verbundmaterial aus DLC/Edelstahl wurde auf seine biologische Verträglichkeit hin untersucht.

Bei bisherigen Edelstahlimplantaten stellt die Freisetzung von Schwermetallen durch Korrosion einen Grund für die Stimulierung von Zellproliferation und der Immunabwehr dar. Dieses führt häufig zu Unverträglichkeiten und unerwünschten Körperreaktionen.

Daher wurde zur Beurteilung der Biokompatibilität die Korrosionseigenschaften *in vitro* anhand elektrochemischer Methoden unter körpernen Bedingungen an beschichteten und unbeschichteten Metallstents untersucht. Dabei zeigte sich ein um 150 mV erhöhtes Durchbruchpotential und eine um 200 nm/Jahr geringere Korrosionsrate. Diese war somit im Vergleich zu Edelstahl um 63 % geringer. Beide Parameter lassen daher auf eine bessere Korrosionsbeständigkeit und geringere Korrosion der mit DLC-beschichteten Implantate schließen. Diese Ergebnisse deckten sich mit *in vivo*-Untersuchungen, bei denen Stents in Kaninchenarterien implantiert wurden. Die Bestimmung der Metallionenkonzentration in den umliegenden Gefäßen zeigte eine deutliche Reduktion der Schwermetallionen um durchschnittlich 82 % bei den mit DLC beschichteten Stents.

Als weiterer Parameter zur Beurteilung der Biokompatibilität der eingesetzten Diamond-Like-Carbon-Schicht wurden Zellkulturuntersuchungen, die von der ISO 10993 zur Beurteilung von Medizinprodukten empfohlen werden, durchgeführt. Die DLC-Oberfläche zeigte hier eine geringere Adhäsion von polymorphkernige Granulozyten im Vergleich zur Edelstahloberfläche. Auch zeigten diese Zellen eine geringere Stimulierung durch das beschichtete Material. Aus diesen Zellkulturuntersuchungen wurde geschlossen, daß bei dem beschichteten Material die unspezifische Immunabwehr geringer ist als bei reinen Edelstahlimplantaten.

Für intravaskuläre Implantate stellt die Besiedlung mit Endothelzellen ein wichtiger Mechanismus zur Herstellung einer körpereigenen Umgebung dar. Experimente unter statischen, wie dynamischen Bedingungen, die die Umgebung einer Arterie nachahmen sollten, zeigten beim Einsatz von humanen Endothelzellen eine bessere

Proliferation und Beständigkeit gegen Scherkräfte auf den DLC-Oberflächen. Aus all diesen Versuchen wurde geschlossen, daß die hergestellte Diamond-Like-Carbon-Oberfläche eine gute Biokompatibilität beim Einsatz als intravaskuläres Implantat besitzt.

Zur Beurteilung des Verbundwerkstoffes DLC/Edelstahl in Kontakt mit Blut wurden Untersuchungen zur Hämokompatibilität der Oberfläche angestellt. Ein wichtiger Parameter hierbei sind die Adsorptionsrate von Albumin und Fibrinogen, die Indikatoren für die Thrombogenität sind. Bei Biosensorexperimenten zeigte die DLC-Oberfläche im Rahmen der Meßgenauigkeit des verwendeten Geräts keine irreversible Adsorption der Proteine Albumin und Fibrinogen, den wichtigsten Blutbestandteilen zur Beurteilung der Hämokompatibilität. Im Gegensatz dazu wurde bei der Adsorptionsbestimmung mit radioaktiv markierten Proteinen bei Albumin eine um den Faktor 2 erhöhte Adsorption an der DLC-Oberfläche gefunden. Bei Fibrinogen war die Adsorption mit den Werten bei Edelstahl vergleichbar. Nach Bildung des Albumin/Fibrinogenquotienten, welcher ein Maß für die Thrombogenität darstellt, konnte damit eine geringere Thrombogenität für die DLC-Oberfläche bestätigt werden.

Die Adsorption von Thrombozyten ist eine unerwünschte Eigenschaft bei Stents, da diese auf eine hohe Thrombogenität schließen läßt. Daher wurde die Thrombozytenadhäsion bei den eingesetzten Oberflächen untersucht. Diese war bei den DLC-beschichteten Stents um 60 % geringer. Paralleluntersuchungen einer weiteren Arbeitsgruppe, die sich auch mit den beschichteten Stents beschäftigt, zeigten mittels Durchflußzytometrie eine geringere Stimulierung der Thrombozyten durch die DLC-Oberfläche im Vergleich zum Edelstahl. Sowohl die geringere Thrombozytenadhäsion an der DLC-Oberflächen als auch eine geringere Aktivierung der Thrombozyten ließen auf eine nur mäßig thrombogene Oberfläche schließen.

Die festgestellte gute Bio- und Hämokompatibilität der untersuchten DLC-Beschichtung führte im Anschluß zu einer klinischen Studie am Menschen, bei der DLC-beschichtete Stents mit Edelstahlstents verglichen wurden. Auch hier lagen die Ergebnisse eindeutig zugunsten der beschichteten Implantate. Das Major-Adverse-Cardiac-Event (MACE), das alle klinischen resultierenden Folgeschäden einer Implantation zusammenfaßt, wird häufig zur Beurteilung der Qualität von Stentimplantationen herangezogen. Dieser lag bei der erwähnten Untersuchung beim DLC-Stent bei 8,9 % im Vergleich zu durchschnittlichen 22 % bei anderen Studien mit unbeschichteten Stents.

Insgesamt lassen die gute Bio- und Hämokompatibilität der Oberfläche, die sich in der besseren Erfolgsrate bei der klinischen Studie niederschlägt, auf einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Oberflächen- bzw. der Implantateigenschaften und der Restenoserate schließen. Vermutlich wird durch die geringere Korrosion eine ständige Stimulierung von Zellen reduziert. Weiterhin bietet die DLC-Oberfläche eine gute Grundlage zum Wachstum von Endothelzellen und wird nicht in dem Maß als Fremdkörper durch die unspezifische Immunabwehr des Körpers erkannt, wie der Edelstahl. Der bisher in der Literatur oft diskutierte Zusammenhang zwischen Gefäßwandverletzung und Reizung durch den Fremdkörper und der Restenoserate dürfte daher nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Eine weitere Aufgabe in dieser Arbeit war die kovalente Beschichtung der DLC-Oberfläche mit Heparin, da dieses eine gerinnungshemmende Wirkung besitzt und die Proliferation der glatten Muskelzellen hemmt. Zur Beschichtung wurde Polyethylenimin, ein kationisches Polymer, mit einem Diaziridinderivat gekoppelt. Diese Verbindung konnte anschließend an die DLC Oberfläche gebunden werden. Das anionische Heparin wurde zuerst ionisch an das Polymer gekoppelt und durch lichtinduzierte Carbenbildung das Heparin mit dem Polyethylenimin und der Oberfläche vernetzt. Die biologische Aktivität der Heparinoberfläche konnte mittels eines enzymatischen Tests bestimmt werden. Hierbei wird die Spaltung eines chromogenen Substrats durch das Enzym Faktor Xa durch die Bildung eines Heparin/Faktor Xa Komplexes gehemmt. Die erzielte Aktivität lag mit 0,47 IE/cm² im Rahmen der in der Literatur durch andere Kopplungsmethoden erzielten Aktivitäten. Prinzipiell ist das verwendete Kopplungsverfahren auch für andere Substanzen geeignet, welches für andere Aufgaben genutzt werden kann. Die irreversible Bindung des Heparins an die DLC-Oberfläche konnte über die katalytische Wirkung des Heparins bei der sauren Hydrolyse des Farbstoffs Auramin O zu Michlers Keton nachgewiesen werden. Es konnte durch Spülen mit einer 3 molaren Kochsalzlösung bei einer unbelichteten und damit nur ionisch gebundenen Heparinschicht, im Gegensatz zur belichteten Oberfläche, ein Verlust der katalysierenden Wirkung des Heparins um 90 % festgestellt werden. Dadurch wurde bewiesen, daß durch Belichten ein Vernetzen von Heparin mit dem Diaziridin-Polyethylenimin und der Oberfläche stattgefunden hat.

Für die Aufgabenstellung einer radioaktiven Beschichtung wurde die Oberfläche mit ³²Phosphorsäure behandelt. Dabei fand eine Aktivierung der Oberfläche statt, die in

einem Bereich von 100 kBq bis 555 kBq lag. Die Bindungsstärke der Phosphorsäure oder Phosphate an die Oberfläche konnte durch Temperieren bei 350 °C, bei der es zur Bildung von schwerlöslichen Polyphosphorsäuren und Phosphaten kommt, um den Faktor 10 erhöht werden. Durch das Beschichten der so erhaltenen radioaktiven Edelstahlstents mit DLC konnte eine weitere Reduktion der in Lösung gehenden Radioaktivität um den Faktor 100 erreicht werden. Nach 8-tägiger Inkubation der radioaktiven Stents in Pufferlösung sank die in Lösung gehende Aktivitätsmenge damit auf unter $7 \times 10^{-3} \%$, bezogen auf die Stentaktivität, gegenüber $300 \times 10^{-3} \%$ einer unbeschichteten Probe ab. Die durch die maximal in Lösung gehende Aktivität entstehende Strahlenbelastung wäre mit 0,015 mSv gegenüber der durch den Stent freigesetzten Aktivität von maximal 1,5 mSv vernachlässigbar. Auch ist die Strahlenbelastung durch die inkorporierte Aktivität mit der natürlichen Strahlenbelastung des Menschen von 2,5 mSv vergleichbar. Zur Messung der Stentaktivität wurden ein Proportionalzählrohr, sowie ein Szintillationszähler mit eigens konstruiertem Festkörperszintillator kalibriert. Die Aktivitätsbestimmung der Stents erfolgte durch Vergleich der Zählrate in einem 4π Zählrohr zweier Stents, wobei die Aktivität des einen durch anschließendes Auflösen in Säure und Bestimmung der Aktivität der Salzlösung in einem zuvor kalibrierten Flüssigszintillationszähler bestimmt wurde. Damit stand eine einfache und schnelle Meßmethode zur Ermittlung der Stentaktivität zur Verfügung.

Abschließend ist zu erwähnen, daß die Herstellung einer Diamond-Like-Carbon-Oberfläche mittels gängiger Plasmaverfahren zu Beschichtungen mit unterschiedlichen Eigenschaften führen. Daher sind alle in dieser Arbeit erhaltenen Resultate und Entwicklungen nicht auf andere DLC-Beschichtungen die nach anderen Verfahren oder unter anderen Bedingungen hergestellt wurden zu übertragen.

6 Anhang

6.1 Abschätzung der aufgenommenen Dosis/Äquivalentdosis

Nach der Medical Internal Radiation Dose (MIRD) kann man die Dosisleistung (\dot{D}), die durch ein Organ mit der Masse M von einem radioaktiven β -Strahler mit der Aktivität A aufgenommen wird anhand folgender Formel berechnen^v:

$$\dot{D} = \left(\frac{A}{M} \right) \Delta \Phi$$

wobei $\Delta = 0,575 \cdot 10^{-6} \cdot \bar{E}_\beta \left[\frac{\text{Gray} \cdot \text{g}}{\text{Bq} \cdot \text{h} \cdot \text{MeV}} \right]$ und \bar{E}_β die mittlere Energie eines β -

Partikels ist, welche für ³²Phosphor 0.695 MeV beträgt^{vi}. Der radioaktive Stent strahlt nach allen Seiten gleichmäßig ab. Somit wird 50 % der abgestrahlten Aktivität durch das Blut, welches durch die Arterie fließt, aufgenommen. Die restlichen 50 % werden durch den „Gewebezyylinder“ um den Stent absorbiert ($\Phi = 0,5$). Man kann davon ausgehen, daß 95 % der β -Partikel innerhalb einer Gewebetiefe von 3-4 mm ihre Energie vollständig abgeben.^{vii} Bei einem Stent 3 x 16 mm mit einer Aktivität von 185 kBq (5 μ Ci) und einem Gewebezyylinder (ID=3 mm, AD= 10 mm, Dichte des Gewebes = 1 g/cm³) beträgt die Dosisleistung somit:

$$\dot{D} = 0,575 \cdot 10^{-6} \frac{A}{M} \bar{E}_\beta \Phi \left[\frac{\text{Gray} \cdot \text{g}}{\text{Bq} \cdot \text{h} \cdot \text{MeV}} \right] = 0,575 \cdot 10^{-6} \frac{185000}{1.14} \cdot 0,695 \cdot 0,5 \left[\frac{\text{Gray}}{\text{h}} \right] =$$
$$\frac{0,032 \text{Gray}}{\text{h}} = \frac{0,54 \text{mGray}}{\text{min}}$$

$$1 \text{ Gray} \equiv 100 \text{ rad}$$

Die Äquivalentdosisleistung (\dot{H}) ergibt sich aus der Dosisleistung mal dem Qualitätsfaktor, der bei β -Teilchen = 1 ist. Somit ist \dot{H} zum Zeitpunkt der Implantation des Stents an das umliegende Gewebe

^v R. Loevinger, T.F. Budinger, E.E. Watson, *MIRD Primer*, New York: The Society of Nuclear Medicine **1988**; R. Loevinger, M. Berman, MIRD pamphlet No. 1, *J. Nucl. Med.* **1968**, 9 (Suppl 1), 7-14.

^{vi} S.K. Jani, *Handbook of Dosimetry for Radiotherapy*, CRC Press **1993**, 152

^{vii} D.J. Simpkin, T.R. Mackie, EGS4 Monte Carlo determinants of the beta dose kernel in water, *Med. Phys.* **1990**, 17, 179-186.

$$\dot{H}_0 = \frac{0,54mSv}{\text{min}}$$

$$1 \text{ Sv} \equiv 100 \text{ rem}$$

Die über die gesamte Lebenszeit des ³²Phosphors aufgenommene Äquivalentdosis beträgt damit:

$$\dot{H} = \dot{H}_0 \int_0^{\infty} e^{-\lambda t} dt = \frac{\dot{H}}{\lambda} \text{ wobei } \lambda = \frac{1}{1,44 \cdot t_{1/2}}$$

mit der Halbwertszeit von ³²Phosphor $t_{1/2} = 14,3 \text{ d} = 20592 \text{ min}$ folgt eine Äquivalentdosis von 16 Sv, dies entspricht einer Dosis von 16 Gray.

6.2 Strahlenbelastung des Patienten

Bei der Strahlenbelastung des Patienten muß man die gesamte absorbierte Radioaktivität berücksichtigen, die dabei auf den Körper wirkt. Wie oben beschrieben, werden 50 % vom umliegenden Gewebe und 50 % vom Blut aufgenommen, also insgesamt:

$$\left(\frac{32Sv}{\text{Körpergewicht}[g]} \right)$$

Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 70 Kg folgt eine ungefähre Ganzkörperdosis von 0,5 mSv. Die natürliche effektive Dosis eines Menschen durch die Umwelt liegt bei ca. 2,4 mSv/Jahr.^{viii}

6.3 Strahlenbelastung durch gelöste Aktivität

Bei einer Lebenszeit des Strahlers von 10 Halbwertszeiten kann man grob eine Belastung von $1,7 \times 10^{-3} \% \times 14,3 \text{ Tage} \times 10 \text{ Halbwertszeiten}$ rechnen. Dies ergibt ungefähr 1 % der Gesamtaktivität.

^{viii} United Nation Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation; Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation (UNSCEAR 1993), United Nations, New York 1993.

7 Literatur

- [1] G.H. Rao, J.G. White, Coronary artery disease: An overview of risk factors, *Indian Heart J.* **1993**, *45*, 143-153; P.W. Wilson, J.C. Evans, Coronary artery disease prediction, *Am. J. Hypertens.* **1993**, *6*, 309S-313S.
- [2] C. Simpfendorfer, J. Belardi, G. Bellamy, K. Galan, I. Franco, J. Hooman, Frequency, management and follow-up of patients with acute coronary occlusions after PTCA, *Am. J. Cardiol.* **1987**, *59*, 267-269; K.J. Vaska J.M. Nonnweiler, F.E. Cummins, Acute coronary occlusion after PTCA of the right coronary artery, *Am. J. Cardiol.* **1990**, *65*, 1263-1264.
- [3] MERCATOR Study Group, Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor Cilazaperil prevent restenosis after PTCA?, *Circulation* **1992**, *86*, 100-110.
- [4] A. Carrel, Results of the permanent intubation of the thoracic aorta, *Surg. Gyn. Obst.* **1912**, *15*, 245-248.
- [5] C.T. Dotter, MP. Judkins, Transluminal treatment of atherosclerotic obstruction: description of a new technique and preliminary report of its application, *Circulation* **1964**, *30*, 654-660.
- [6] C.T. Dotter Transluminal placed coiled endarterial tube grafts, *Invest. Radiol.* **1969**, *4*, 329-332.
- [7] C.T. Dotter, RW: Buschmann, MK. Kinney, Transluminal expandable nitinol stent grafting: preliminary report, *Radiology* **1983** *147*, 259-260.
- [8] A. Cragg, G. Lund, J. Rysavy, Nonsurgical placement of arterial endoprotheses: a new technique using nitinol wire, *Radiology* **1983**, *147*, 261-263.
- [9] J.C. Palmaz, R.R. Sibbitt, F.O. Tio, Expandable intraluminal vascular graft: a feasibility study, *Surgery* **1986**, *99*, 199-205.
- [10] D.L. Fischmann, M.B. Leon, D.S. Baim, A randomized comparison of stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 496-501.
- [11] M. Haude, R. Erbel, G. Hafner, B. Heublein, HW. Höpp, D. Franzen, Multi center results after coronary implantation of balloon expandable Palmaz-Schatz stents, *Z. Kardiol.* **1993**, *82*, 77-86.
- [12] B. Spencer, M.D. King, Restenosis following angioplasty, *Vascular brachytherapy 2. Ed.*, Ed. R. Waksman, **1999**, Futura Publishing NY, 3-11.
- [13] M.W. Liu, G.S. Roubin, S.B. King, Restenosis after coronary angioplasty, *Circulation* **1989**, *79*, 1374-87; M.J. Post, C. Borst, R.E. Kunz, The relative importance of arterial remodelling compared to intimal hyperplasia in lumen renarrowing following balloon angioplasty, *Circulation* **1994**, *89*, 2816-21; M. Nobuyoshi, T. Kimura, H. Ohishi, Restenosis after PTCA, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1991**, *17*, 433-439.
- [14] C. Rogers, E.R. Edelman, Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis, *Circulation* **1995**, *91*, 2995-3001; G.P. Rodgers, S.T. Minor, K. Robinson, D. Cromeens, S.C. Woolbert, L.C. Stephens, J.R. Guyton, K. Wright, G.S. Roubin, A.E. Raizner, Adjuvant therapy for intracoronary stents, *Circulation* **1990**, *82*, 520-529; H.M.M.

-
- van Beusekamm W.J. van der Giessen, R.J. van Suylen, E. Bos, F.T. Bosman, P.W. Serruys, Histology after stenting of human saphenous vein bypass grafts, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1993**, *21*, 45-54.
- [15] A.W. Clowes, M.J. Karnowsky, Suppression by heparin of smooth muscle cells proliferation in injured arteries, *Nature* **1977**, *265*, 625-626; P.D. Henry, K.I. Bentley, Suppression of atherogenesis in cholesterol-fed rabbits treated with Nifedipine, *J. Clin. Invest.* **1981**, *68* 1366-1369; M.A. Thornton, Gruentzig, A.R. Hollman, S.B. King III, J.S Jr. Douglas, Coumadin and Aspirin in the prevention of recurrence after transluminal coronary angioplasty: a randomised study, *Circulation* **1984**, *69*, 721-727; T. Corcos, P.R. David, P.G. Val, J. Renkin, V. Dangiosse, H.G. Rapold, M.G. Bourassa, Failure of Diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty, *Am. Heart J.* **1985**, *109*, 926-931.
- [16] S.P. Karas, M.B. Gravanis, E.C. Santioian, K.A. Robinson, K.A. Andernerg, S.B. King III, Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1992**, *20*, 467-474; H. Hanke, S. Hassenstein, J. Kamenz, M. Oberhoff, A. Baumbach, E. Betz, K.R. Karsch, Prolonged proliferation response of smooth muscle cells after experimental intravascular stenting: a stent wire related phenomenon, *Circulation* **1992**, *86*, 1-186; C. Rogers, M.J. Karnovsky, E.R. Edelman, Inhibition of experimental neointimal hyperplasia and thrombosis depends on the type of vascular injury and the site of drug administration, *Circulation* **1993**, *88*, 1215-1221.
- [17] I.C. Højensgård, H. Stürup, Heparin, Copenhagen, Leo Pharmaceutical **1995**.
- [18] A.W. Clowes, M.J. Karnowsky, Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries, *Nature* **1977**, *265*, 625-626.
- [19] V.L. Gott, J.D. Whiffen, R.C. Dutton, Heparin Bonding colloidal graphite surfaces, *Science* **1963**, *142*, 1297-98.
- [20] L.C. Hsu, Principles of heparin coating techniques, *Perfusion* **1991**, *6*, 209-219.
- [21] O. Larm, R. Larsson, P. Olsson, A new non thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue, *Biomater. Med. Dev. Art. Org.* **1983**, *11*, 161-173.
- [22] P.A. Hardhammar, H.M. van Beusekom, H.U. Emanuelsson, S.H. Hofma, P.A. Robertsson, P.D. Verdouw, E. Boersma, P.W. Serruys, W.J. van der Giessen, Reduction in thrombotic events with heparin-coated Palmaz-Schatz stents in normal porcine coronary arteries, *Circulation* **1996**, *93*, 423-430.
- [23] P.W. Serruys, H.U. Emanuelsson, W. van der Giessen, Heparin-coated Palmaz-Schatz stents in human coronary arteries, *Circulation* **1996**, *93*, 412-426.
- [24] T.A. Fischell, B.K. Khanna, D.R. Fischell, Low-dose beta particle emission from 'stent' wire results in complete, localized inhibition of smooth muscle cell proliferation, *Circulation* **1994**, *90*, 2956-2963.
- [25] B. Stephen, Endovascular brachytherapy, *Vascular Brachytherapy* **1999**, R. Waksman ED., Futura Publishing, New York, 191-203.

-
- [26] C. Hehrlein, M. Stintz, R. Kinscherf, Pure beta-particle-emitting stents inhibit neointima formation in rabbit, *Circulation* **1996**, 93, 641-645.
- [27] H.J. Gurland, Definition and terminology in biocompatibility, *Nephrology Dialysis Transplantation* **1994**, 9 Suppl.2.
- [28] D.F. Williams, Fundamental aspects in biocompatibility, Vol. I u. II, CRC Press, Boca Raton, Florida **1981**.
- [29] T.A. Horbett, Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interaction with foreign materials, *Cardiovasc. Path.* **1993**, 2, 137S.
- [30] M.A. Packam, G. Evans, M.F. Glynn, The effect of plasma proteins on the interaction of platelets with glass surfaces, *J. Lab. Clin. Med.* **1969**, 73, 686-697.
- [31] H. Kaesche, Die Korrosion der Metalle, Springer, Berlin **1990**.
- [32] H.J. Müller, E.H. Greener, Polarisation studies of surgical implants in Ringer's solution, *J. Biomed. Mater. Res.* **1970**, 4, 29-41; H. Zitter, H. Plenk, The electrochemical behaviour of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21, 881-896.
- [33] W. Schmickler, Grundlagen der Elektrochemie, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsges. mbH Braunschweig/Wiesbaden **1989**; E. Heitz, R. Henkhaus, A. Rahmel, Korrosionskunde im Experiment, Verlag Chemie Weinheim, **1990**.
- [34] A.B. Furgeson, P.G. Laing, E.S. Hodge, The ionization of metal implants in living tissues, *J. Bone Jt. Surg. AM.* **1960**, 42, 77.
- [35] E.J. Sutow, S.R. Pollack, Biocompatibility of implant materials, Ed. D.F. Williams, CRC Press, Boca Raton, Florida **1981**, 46-90 und die darin enthaltene Literatur.
- [36] G. den Otter, Total prosthetic replacement of atrioventricular valves in the dog, *Thorax* **1972**, 27, 105.
- [37] H. Greiling, A.M. Gressner, *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, Schattauer, Stuttgart **1995**, 3. Auflage, 1165-1280.
- [38] C.L. Klein, H. Köhler, C.J. Kirkpatrick, Increased adhesion and activation of polymorphonuclear neutrophil granulocytes to endothel cells under heavy metal exposure in vitro, *Pathobiology* **1994**, 62, 90-98; C.L. Klein, P. Nieder, M. wagner, H. Köhler, F. Bittinger, C.J. Kirkpatrick, J.C. Lewis, The role of metal corrosion in inflammatory processes: induction of adhesion molecules by heavy metal ions, *J. Mater. Sc. Mater. Med.* **1994**, 5, 798-807.
- [39] H.Z. Movat, M.I. Cybulzky, Neutrophil emigration and microvascular injury. Roles of chemotaxins, endotoxins, interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, *Pathol. Immunopathol. Res.* **1987**, 6, 153-176.
- [40] J.C. Wataha, S. Ratanasathien, C.T. Hanks, Z. Sun, In-vitro IL-j3 and TNF release from macrophages in response to metal ions. *Denatl. Mater.* **1996**, 12, 322-327.
- [41] L.C. Lucas, L.J. Bearden, J.E. Lemons, Ultrastructural examination of in vitro and in vivo cells exposed to elements from type 316L stainless steel. Corrosion and degradation of implant materials: Second symposium, ED: A.C. Fraker, C.D. Griffin, American society for testing and materials, Philadelphia **1985**, 208-222.

-
- [42] J.L. Woodman, J. Back, S.A. Jiminez, Isolation of serum protein organo metallic corrosion products from 316L stainless steel and HS-21 in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res.* **1984**, *18*, 99-114.
- [43] C.G. Fink, J.S. Smatko, Bone fixation and the corrosion resistance of stainless steels to the fluids of the human body, *J Electrochem. Soc.* **1948**, *94*, 271-5.
- [44] H. Tanzawa, Biomedical polymers: Current status and overview, Ed: T. Tsatura, T. Hayashi, H. Kataoka, K. Ishihara, Y. Kimura, Biomedical applications of polymeric materials, CRC Press, Boca Raton, **1993**, 1-15.
- [45] J.G. Murphy, R.S. Schwartz, W.D. Edwards, A.R. Camrud, R.E. Vlietstra, D. Holmes, Percutaneous polymeric stents in porcine coronary arteries: initial experience with polyethylene terephthalate stents, *Circulation* **1992**, *86*, 1596-1604.
- [46] N.A. Shoenfeld, R. Connolly, K. Ramberg, C.R. Valeri, J. Eldrup-Jorgensen, The systemic activation of platelets by Dacron grafts, *Surg. Gyn. Obstet* **1988**, *166*, 454-457.
- [47] D.R. Holmes, A.R. Camrud, M.A. Jorgenson, W.D. Edwards, 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*, 525-431.
- [48] A.B. Fontaine K. Koelling, J. Clay, Decreased platelet adherence of polymeric coated tantalum stents, *J. Vasc. Interven. Radiol.* **1994**, *5*, 567-72.
- [49] J.P. Zidar, S.F. Gammon, G.D. Chapman, Short-and long-term vascular tissue response to the Duke bioabsorbable stent, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1993**, *21*, 439A.
- [50] C.M. Agrawal, K.F. Haas, D.A. Leopold, H.G. Clark, Evaluation of poly-L-lactic acid as a material for intravascular polymeric stents, *Biomaterials* **1992**, *13*, 176-82.
- [51] D.A. Cox, P.G. Anderson, G.S. Roubin, C.Y. Chou, S.K. Agrawal, J.B. Cavander, Effects of local delivery of heparin and methotrexate on neointimal proliferation in stented porcine coronary arteries, *Coron Art. Dis.* **1992**, *3*, 237-248.
- [52] T. Susawa, K. Shiraki, Y. Shimizu, Biodegradable intracoronary stents in adult dogs, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1993**, *21*, 483A.
- [53] H. Tamai, T. Doi, Y.S. Hsu, Initial and long term results of biodegradable polymer stents in canine coronary artery, *J. Invas. Cardiol.* **1995**, *7*, 9A.
- [54] A.M. Lincoff, R.S. Schwartz, W.J. van der Giessen, Biodegradable polymers can evoke a unique inflammatory response when implanted into the coronary artery, *Circulation* **1992**, *86*, I-801; HT. Barrow, Synthetic bioabsorbable polymers, Ed. M. Szycher, *High Performance Biomaterials*, Lancaster **1991**, PA: Technomic, 243-257; M.J. Slepjan, A. Schindler, Polymeric endoluminal paving/sealing: a biodegradable alternative to intracoronary stenting, *Circulation* **1988**, *78*, II-409.

-
- [55] J.C. De Mol, Van Otterloo, J.H. Van Bockel, E.D. Ponfoort, Systemic effect of collagen-impregnated aortoiliac Dacron vascular prostheses on platelet activation and fibrin formation, *J. Vasc. Surg.* **1991**, *14*, 59-66.
- [56] N. Kipshidze, J.E. Baker, V. Nikolaychik, Fibrin coated stents as an improved vehicle for endothelial cell seeding, *Circulation* **1994**, *90*, I-597.
- [57] D.R. Holmes, A.R. Camrud, M.A. Jorgenson, W.D. Edwards, 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*, 525-531; C.J. McKenna, A.R. Camrud, G. Sangiorgi, H.M. Kwon, W.D. Edwards, D.R. Holmes, R.S. Schwartz, Fibrin-film stenting in a porcine coronary injury model: efficacy and safety compared with uncoated stents, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1998**, *31*, 1434-1438.
- [58] V.L. Gott, J.D. Wiffen, R.C. Dutton, D.E. Koepken, R.L. Daggert, W.P. Young, The anticlot properties of graphite coating on artificial heart valves, *Carbon* **1964**, *1*, 378-382.
- [59] P. Eversol US Patent US3030187 und US3030188.
- [60] B.V. Derjaguin, D.B. Fedoseev, Kapitel 4, The growth of diamond and graphite from the gas phase, Nauka, Moskau **1977**.
- [61] C.P. Chang, D.L. Flamme, D.E. Ibbotson, J.A. Mucha, Diamond crystal growth by plasma chemical vapour deposition, *J. Appl. Phys.* **1988**, *63*, 1744-1748; Y. Saito, K. Sato, K. Gomi, H. Miyadera, Diamond synthesis from COH₂ mixed gas plasma, *J. of Mater. Sci.* **1990**, *25*, 1246-1250; Y. Mitsuda, Y. Kojima, T. Yoshida, K. Akashi, The growth of diamonds in microwave plasma under low pressure, *J. of Mater. Sci.* **1987**, *22*, 1557-1562. Und die jeweils darin enthaltene Literatur.
- [62] L. Lou, W.J. Michael, R.L.C. Wu, Diamond-Like Carbon as biological compatible material for cell culture and medical application, *Bio-Medical Mat. Eng.* **1993**, *3*, 223-228.
- [63] L. Tang, C. Tsai, W.W. Gerberich, L. Kruckeberg, D.R. Kania, Biocompatibility of chemical-vapour deposited diamond. *Biomaterials* **1995**, *16*, 483-488.
- [64] T.L. Parker, K.L. Parker, I.R. McColl, D.M. Grant, J.V. Wood, The biocompatibility of low temperature diamond-like carbon films: a transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytotoxicity study, *Diamond Rel. Mat.* **1994**, *3*, 1120-1123.
- [65] L.A. Thomson, F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, Biocompatibility of diamond-like carbon coating, *Biomaterials* **1991**, *12*, 37-40.
- [66] I. Dion, X. Roques, C.H. Baquey, E. Baudet, B.B. Cathalinat, N. Moore, Hemocompatibility of Diamond-Like Carbon coating, *Bio-Medical Mat. Eng.* **1993**, *3*, 51-55; I. Dion, L. Bordenave, F. Lefebvre, Physicochemistry and cytotoxicity of ceramics Part II: Cytotoxicity of ceramics, *J of Mater. Sci. Materials in Medicine* **1994**, *5*, 18-24; I. Dion, C. Baquey, J.R. Monties, Diamond: the biomaterial of the 21st century, *Inter. J. Art. Org.* **1993**, *16*, 623-627; Yasuda, Hirotsugu, Koge. A method of making a biocompatible prosthesis. PCT application, patent No.: WO89/11919.

-
- [67] C. Harder, A. Rzany, M. Schaldach, Coating of vascular stents with anti thrombogenic amorphous silicon carbide, *Prog. Biomed. Res.* **1999**, *4*, 71-77.
- [68] A. Bolz, M. Schaldach, Amorphous silicon carbide, *Artif. Organs* **1991**, *14*, 151-160.
- [69] B. Heublein, K. Pethig, A.M Elsayed, Silicon carbide coating, a semi conducting hybrid design of coronary stents, N A Feasibility Study, *J Invasive Cardiol* **1998**, *10*, 255-262.
- [70] E.J. Campbell, V. O'Byrne, P.W. Stratford, Biocompatible surfaces using methacryloylphosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer, *ASAIO J.* **1994**, *3*, 858-867.
- [71] H. Zheng, P. Barragan, T. Corcos, J.B. Simeoni, X. Favereau, P.O. Roquebert, Y. Guerin, J. Sainsous, Clinical experience with a new biocompatible Phosphorylcholine-coated coronary stent, *J. Invasive. Cardiol.* **1999**, *11*, 608-614.
- [72] R. Waksman, Intracoronary radiation therapy for restenosis prevention: Status of the clinical trials, *Card. Rad. Med.* **1999**, *1*, 20-29.
- [73] Methode: K. Gutensohn, C. Beythien, J. Bau, T. Meinertz, P. Kuehnl, Flow cytometric analysis of coronary stent-induced alterations of platelet antigens in an in vitro model, *Thromb. Res.* **1997**, *86*, 49-56; Ergebnisse bisher unveröffentlicht.
- [74] Yasuda, Hirotsugu, Koge, A method of making a biocompatible prosthesis. PCT application, Patent No.: WO89/11919
- [75] C.L. Klein, M. Otto, H. Köhler, C.J. Kirkpatrick, Methodological approaches to biocompatibility and haemocompatibility: Testing of biomaterials, *Infusionsther. Transfusionsmed.* **1995**, *22*, 155-158.
- [76] T.E. Warkentin, Venous thromboembolism in heparin-induced thrombocytopenia, *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2000**, *6*, 343-51.
- [77] J.J. Ramsden, Review of new experimental techniques for investigating random sequential adsorption, *J. Stat. Phys.* **1993**, *73*, 853-877.
- [78] J.A. de Feijter, J. Benjamin, F.A. Veer, Ellipsometry as a tool to study the adsorption behaviour of synthetic and biopolymers at the air water interface, *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759-1772.
- [79] M.W. Hunter, F.C. Greenwood, *Nature* **1992**, *194*, 495-98.
- [80] J.L. Bohnert, T.A. Horbett, Changes in adsorbed fibrinogen and albumin interactions with polymers indicated by decreases in detergent elutability, *J.Colloid.Interface. Sci.* **1986**, *111*, 363-377.
- [81] C. Baquey, L. Bordenave, N. More, J. Caix, B. Basse-Cathalinat, Biocompatibility of carbon-carbon materials: blood compatibility, *Biomaterials*, **1989**, *10*, 435-440.
- [82] C. Bickel, Universität Mainz, unveröffentlicht.
- [83] J.W. Burch, R.J. Lamb, Sodium arachidonate induced platelet aggregation is independent of secreted adenosine diphosphate, *Thromb. Res.* **1983**, *31*, 747-758.

-
- [84] E.A. Jaffe, R.L. Nachmann, C.G. Becker, C.R. Minnick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, *J. Clin. Invest.* **1973**, *52*, 2745-56.
- [85] D.C. Dooley, J.F. Simpson, H.T. Meryman, Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils, *Exp. Haematol* **1982**, *10*, 591-99.
- [86] M. Dolcher, H. Michel, H. Sigrist, 3-(Trifluormethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirine synthesis and chemical characterization of a heterobifunctional carbene-generating crosslinking reagent, *J. Prot. Chem.* **1990**, *9*, 407-415.
- [87] B. Seifert, T.H. Groth, K. Herrmann, P. Romaniuk, Immobilization of heparin on polylactide for application to degradable biomaterials in contact with blood, *J. Biomater. Sci. Polymer, Edn.* **1995**, *7*, 277-287.
- [88] P. Band, A. Lukton, The specific assay of heparin by its chemical properties, *Anal. Biochem.* **1982**, *120*, 19-24.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren, Dozenten und Doktoren

in Heidelberg: A. Berkessel, C. Birr, G. Ege, R. Gleiter, W.G. Forßmann,
D. Hellwinkel, G. Helmchen, F. Herbst, B. Hess, P. Hess,
H. Irganginger, U. Kazmaier, J. Knappe, B. Schramm, G.K.

Wolf

in Tübingen: W. Voelter

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Beck
Vorname: Ralf Max

Anschrift: Schelklystraße 16
69126 Heidelberg

Geburtsdatum: 17. Dezember 1966
Geburtsort: Frankenthal/Pfalz

Schulbesuch

1973 - 1977 Pestalozzi-Grundschule in Frankenthal
1977 - 1983 Schiller-Realschule in Frankenthal
1983 - 1985 Berufsbildende Schule für Naturwissenschaften in
Ludwigshafen
27.6.1985 Staatsexamen zum Chemisch-technischen
Assistenten

Beruflicher Werdegang

09.85 - 03.88 Angestellt als CTA bei der Orpegen GmbH in
Heidelberg
04.88 - 12.89 Anstellung als CTA bei der Braunschweiger
Produktionsgesellschaft für Biotechnologie mbH
Arbeitsplatz am Institut für Anatomie und
Zellbiologie III in Heidelberg bei Prof. Dr. Forßmann
01.90 - 09.91 Freier Mitarbeiter der Biotek GmbH in Östringen

Abitur

1987 - 14.6.1991 Abendgymnasium Heidelberg

Hochschulstudium

10.91 - 12.97 Universität Heidelberg im Fach Chemie - Diplom -
5.5.94 Vordiplom an der Universität Heidelberg
17.10.96 Diplomprüfung an der Universität Heidelberg
11.96 - 12.97 Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Helmchen
Thema: Asymmetrische allylische Substitution

1.98 – 3.2001 Promotion an der Universität Tübingen, an der Abteilung für
Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts,
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Voelter