

**Polylaktidbeschichtung zur antithrombogenen
Ausrüstung von Biomaterialien
- ein Beitrag zur Freisetzung der
eingearbeiteten Arzneistoffe und
Nachweis der antiinfektiven Eigenschaften -**

von

Siegrun Mebus

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Polylaktidbeschichtung zur antithrombogenen
Ausrüstung von Biomaterialien
- ein Beitrag zur Freisetzung der
eingearbeiteten Arzneistoffe und
Nachweis der antiinfektiven Eigenschaften -**

Siegrun Mebus

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 29.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.07.2000 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1. Beschichtungstechnologie	10
2.1.1. Arzneistoffträger	10
2.1.2. Arzneistoffe	10
2.1.2.1. <u>P</u> oly <u>e</u> thylenglycol (PEG)-Hirudin	10
2.1.2.2. <u>R</u> ekombinantes (r)-Hirudin	10
2.1.2.3. Iloprost	11
2.1.3. Lösungsmittel	11
2.1.4. Biomaterialien zur Beschichtung.....	11
2.1.4.1. Metallröhrchen.....	11
2.1.4.2. Gefäßprothesen.....	11
2.1.5. Materialien und Geräte zur aseptischen Beschichtung.....	12
2.1.5.1. Materialien.....	12
2.1.5.2. Geräte	12
2.1.6. Arbeitsanweisung zur Durchführung von Beschichtungen.....	13
2.1.6.1. Vorbereitende Arbeiten.....	13
2.1.6.2. Herstellen der Beschichtungslösung.....	13
2.1.6.3. Methodik der aseptischen Beschichtung von Biomaterialien.....	13
2.2. Mikrobiologische Adhäsionsversuche.....	14
2.2.1. Materialien, Nährmedien und Geräte	14
2.2.1.1. Materialien.....	15
2.2.1.2. Nährmedien.....	15
2.2.1.3. Geräte	15
2.2.2. Methodik zum Abrollversuch	16
2.2.3. Methode des Adhäsionsversuches mit radioaktiv markierten Bakterien.....	17

2.3. Abbau des Trägers und Freisetzung der eingearbeiteten Wirkstoffe	18
2.3.1. Materialien und Geräte	18
2.3.1.1. Materialien.....	18
2.3.1.2. Geräte	18
2.3.2. Elutionsversuch.....	18
2.3.3. Inhärente Viskosität.....	20
2.4. Gerinnungsanalytische Untersuchungen.....	20
2.4.1. Ecarinzeitbestimmung nach der Methode von Nowak.....	20
2.4.2. Thrombozytenaggregation	20
3. ERGEBNISTEIL	22
3.1. Beschichtungsmassen.....	22
3.2. Abbau des Trägers und Freisetzung der eingearbeiteten Wirkstoffe	24
3.2.1. Abbau des Polylaktids R 203.....	24
3.2.2. Freisetzung von Hirudin	25
3.2.3. Freisetzung von Iloprost	35
3.3. Adhäsion und Wachstum von Bakterien an Biomaterialien.....	36
3.3.1. Abrollversuch	36
3.3.2. Adhäsionsversuch mit radioaktiv markierten Bakterien.....	38
4. DISKUSSION.....	40
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	48
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	50
7. ABBILDUNGEN UND TABELLEN	66
8. DANKSAGUNG.....	69

1. Einleitung

Die Entwicklung von Biomaterialien hat in den letzten Jahren die Medizin verändert und innovative Biomaterialien sind aus dem medizinischen Alltag in unzähligen Diagnose- und Therapieverfahren nicht wegzudenken.

Biomaterialien werden heute am Computer mittels CAD entworfen, und neue Materialien, Kunststoffe wie Legierungen, den Anforderungen entsprechend entwickelt. Besondere Bedeutung haben Biomaterialien, die in den Organismus eingebracht werden und mit Blut in Kontakt kommen. Dies sind intravasale Katheter, künstliche Herzklappen, Gefäßprothesen oder Stents. Im extrakorporalen Kreislauf werden nicht implantierte Materialien wie Dialysemembranen oder Oxygenatoren benötigt.

Nach Kontakt der Biomaterialien mit Blut verhalten sich diese als Fremdkörper und aktivieren im Organismus und an der Grenzschicht der eingebrachten Materialien eine Vielzahl von zellulären und plasmaständigen Reaktionen, Blutzellen sowie die Mechanismen der Gerinnung, Fibrinogen und Komplementsystem mit entsprechenden Interaktionen dieser Systeme. Als Endprodukt dieser Reaktionen kommt es unabhängig von der systemischen Antikoagulation der Patienten und Entwicklung neuer Kunststoffe bzw. Legierungen zur Bildung eines Thrombus; ein Problem, das bisher nicht befriedigend gelöst werden konnte (29, 55).

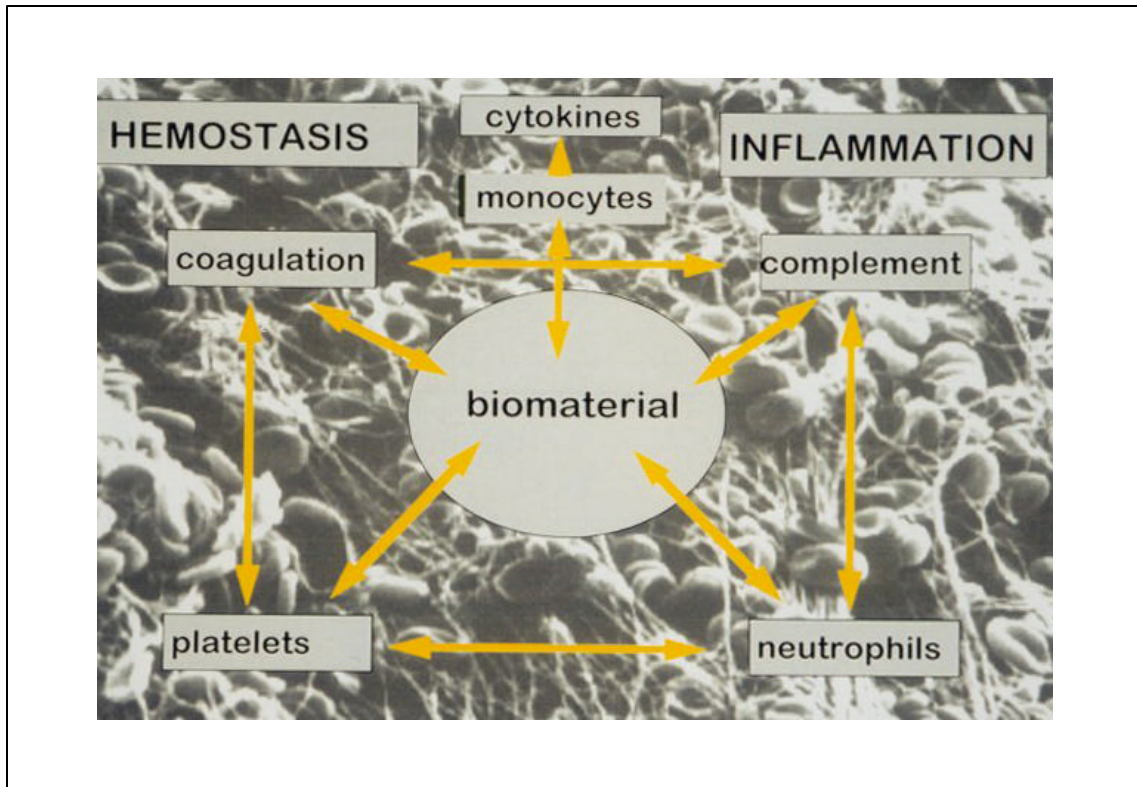


Abb. 1.1. Interaktion zellulärer und plasmaständiger Blutkomponenten mit Biomaterialien

Nach Kontakt der Implantate mit Blut kommt es unabhängig von Thrombogenität der Oberflächen sofort zur Anlagerung adhäsiver Proteine des Blutes, vor allem von Fibrinogen. Es folgt eine Induktion der plasmatischen Gerinnung, der Aktivierung des Komplementsystems und der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten. Desweiteren bewirken Leukozyten inflammatorische Reaktionen („sticking“ mit den Endothelzellen). Die hier aufgezählten Systeme sind untereinander verknüpft und können sich verstärken, wobei das Thrombin eine zentrale Rolle spielt (6, 10, 41, 42, 76, 97).

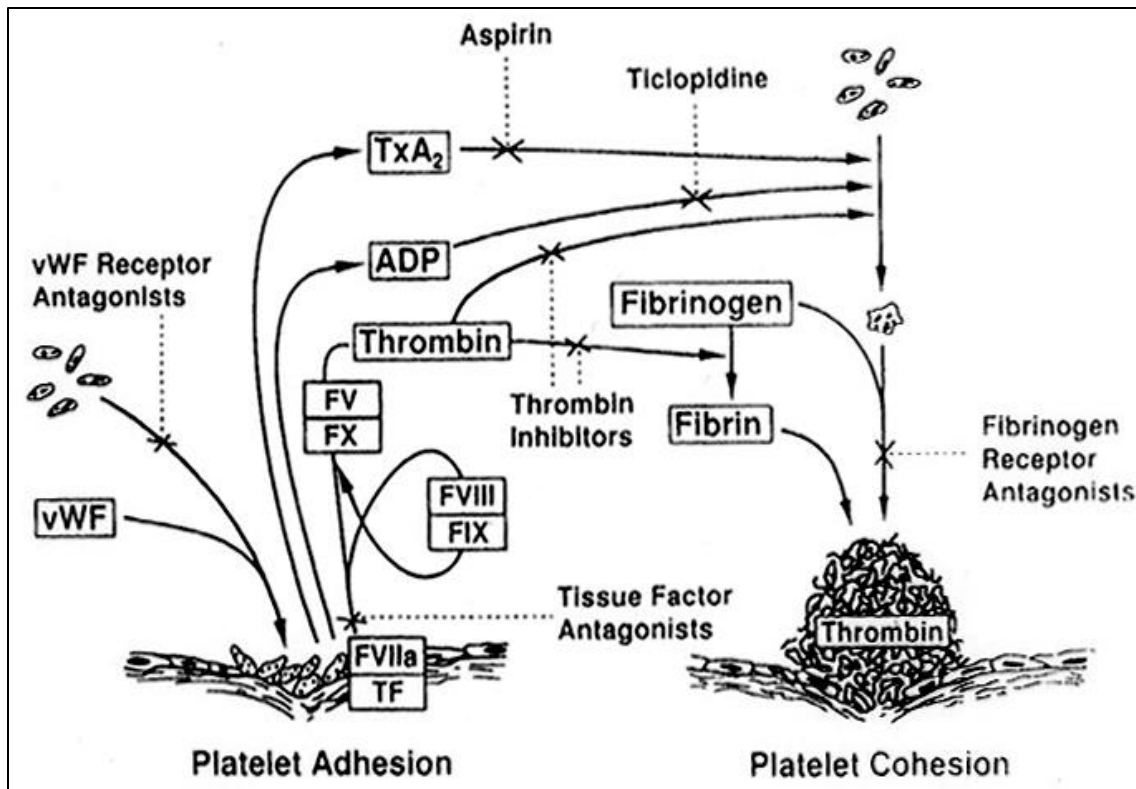


Abb. 1.2. Entstehung eines Thrombus (43)

Nach dem Einbringen von Bioimplantaten kommt es zu einer Verletzung des Gefäßendothels. Dabei wird die subendotheliale extrazelluläre Matrix freigelegt. Die freigelegten Strukturen, insbesondere Kollagen, treten in Kontakt mit dem Blutstrom, aktivieren die Thrombozyten und, via oberflächenkatalysierter Prothrombinaktivierung resultiert eine lokale Thrombinbildung (48). Dieses bindet direkt an spezifische Rezeptoren der Thrombozytenmembran, aktiviert die Plättchen und katalysiert so seine eigene weitere Bildung im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus. Desweiteren induziert Thrombin in den Plättchen die Freisetzung von Arachidonsäure, welche durch das Enzym Cyclooxygenase in Endoperoxide und Thromboxan A₂ umgewandelt wird. Thromboxan A₂ löst eine irreversible Aggregation der Plättchen aus, die daraufhin die Inhaltsstoffe ihrer Speichergranula freisetzen. Insbesondere das in den elektronendichten Granula enthaltene ADP und Calcium verstärken die Freisetzungsreaktion und die Thromboxan A₂-Bildung; eine Kaskade von Reaktionen, die weitere Plättchen stimuliert und in der Bildung eines Gerinnsels mündet, zu dessen Stabilisierung ebenfalls das Thrombin beiträgt: durch die Interaktion von Thrombin mit Fibrinogen wird vermehrt Fibrin gebildet, wobei sich Fibrinpolymere an die Thrombozytenoberflächen an-

haften. Es resultiert ein äußerst reagibles Oberflächennetzwerk aus Fibrinfäden, eine Matrix für das Wachstum von Thromben (1, 6, 10, 30, 41, 42, 70).

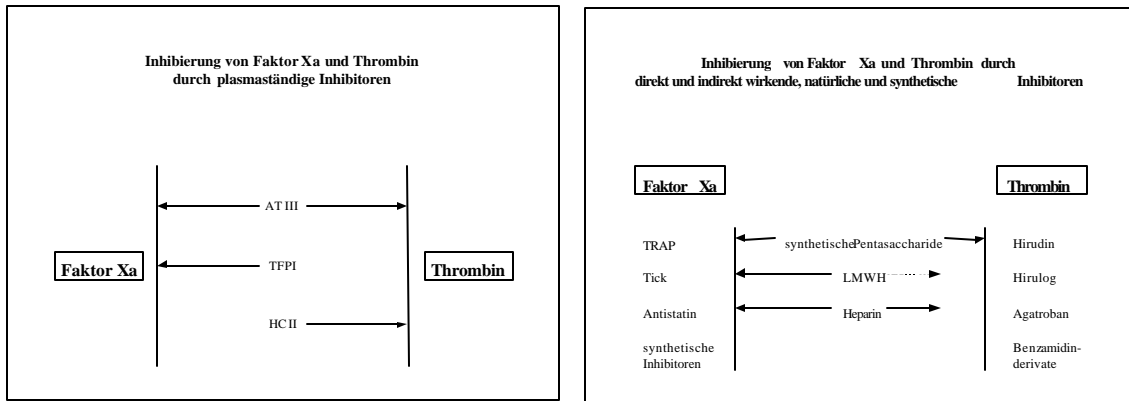


Abb. 1.3. Schemata zur Inhibierung von Faktor Xa und Thrombin

Im gesunden Organismus existieren endogene Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung, die eine Aktivierung des Hämostasesystems verhindern und in Form von Schutzmechanismen eine Kontrolle über die enzymatische Aktivität des Thrombins ausüben. Hierbei handelt es sich um Antithrombin III (hemmt die Bildung und Wirkung von Thrombin und Faktor Xa) und den Heparin-Kofaktor II (hemmt nur Thrombin). Thrombomodulin, ein Protein auf intakten Endothelzellen von Blutgefäßen, bindet Thrombin auf der Oberfläche des Endothels und aktiviert Protein C, welches wiederum die Inaktivierung der gerinnungsfördernden Faktoren Va und VIIIa induziert. Glykosaminoglykane, ebenfalls von intaktem Gefäßendothel sezerniert, zeigen eine dem Heparin ähnliche Wirkung und katalysieren die Reaktionen der endogenen Gerinnungsinhibitoren.

Desweiteren werden vom Endothel hochaktive Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels in Form von Prostaglandin- und Prostacyclinderivaten freigesetzt, die eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten unterbinden und auch die Anlagerung von Leukozyten verhindern (10, 17, 29, 76, 101). Von großer Bedeutung sind die Lipidmembranen der Zellen zur Aufrechterhaltung der Hämostase: die Außenseite der Zellmembranen ist durch zahlreich eingelagerte Phosphatidylcholinmoleküle antithrombogen, während an der Membraninnenseite eingelagerte Phosphatidylserinverbindungen thrombogene Eigenschaften aufweisen (23, 106).

Das wohl bisher etablierteste Behandlungsverfahren in Zusammenhang mit der Implantation von Biomaterialien zur Verhütung von Thrombosen oder thrombotischen Ablagerungen ist die Heparinisierung, die bei der Implantation von Koronarstents teilweise in Kombination mit einem Thrombozytenaggregationshemmer angewandt wird. Heparin als Kofaktor für AT III und Heparin-Kofaktor II unterbindet lokale Gerinnungsprozesse, indem es nach Kontakt mit AT III Thrombin und den Faktor Xa bzw. mit Heparin-Kofaktor II Thrombin inaktiviert und somit die Fibrinbildung und -polymerisation hemmt. Als Folge davon werden die Aktivierung der Gerinnung gehemmt, Thrombin nicht mehr ausreichend aktiviert und Plättchen nicht mehr aggregiert. Die Entstehung lokaler Gefäßverschlüsse wird durch Antikoagulanzen zwar deutlich reduziert, aber nicht vollständig gehemmt, da lokal gebildetes Thrombin bei systemischer Gabe von Antikoagulanzen wie Heparin im Gerinnsel nicht immer erfaßt wird. So kann es trotz Thrombininhibition durch Heparin zu thrombotischen Ablagerungen auf Gefäßprothesen bzw. Stents kommen, die sich in lokalen thrombotischen Verschlüssen manifestieren und als Embolien zu enormen Komplikationen führen können. Die gleichzeitige Applikation von Aggregationshemmern wie Aspirin, Ticlopidin oder GP IIb/IIIa-Inhibitoren ist daher notwendig (6, 9, 17, 42, 54, 80, 97).

Insbesondere bei Patienten mit Implantaten von lebenslanger Verweildauer im Organismus kann die notwendige Antikoagulation nach jahrelanger Verabreichung schwerwiegende Nebenwirkungen wie Kalzifizierung von z.B. Herzklappen durch Marcumar oder Osteoporose durch Heparin hervorrufen. Polytraumatisierte und dialysepflichtige Patienten können trotz verringerter Thrombogenität der verwendeten Biomaterialien auch unter Heparintherapie das Komplementsystem aktivieren und sogar ein ARDS (acute respiratory distress syndrome) entwickeln. Weiter ist bekannt, daß Heparin eine Thrombozytopenie mit fatalen klinischen Folgen induzieren kann (42, 54, 59, 100).

Seit kurzem steht mit Hirudin ein weiteres Antikoagulanzen zur Verfügung. Hirudin, ein natürlich im Speichel des Blutegels „*Hirudo medicinalis*“ vorkommendes Polypeptid, kann seit einiger Zeit mittels Gentechnologie hergestellt werden und ist somit der modernen Antikoagulantientherapie zugänglich geworden. Es handelt sich hierbei um einen selektiven Thrombininhibitor, der hochspezifisch wirkt und mit Thrombin einen Hirudin-Thrombin-Komplex bildet, dadurch sämtliche proteolytischen Funktionen des Enzyms hemmt und aufgrund seiner hohen Affinität nur in relativ geringen Konzentrationen verabreicht werden muß, um in die Gerinnung einzugreifen (6, 42, 64).

Weiter stellt die systemische Verabreichung von Thrombozytenaggregationshemmern eine sinnvolle Ergänzung zu den bisher genannten Maßnahmen bei der Thromboseprophylaxe dar. Hierbei handelt es sich mit Acetylsalicylsäure, Ticlopidin und GP IIb/IIIa-Inhibitoren um Substanzen mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften.

Durch Acetylsalicylsäure wird eine irreversible Cyclooxygenasehemmung mit resultierender Thromboxan A₂-Inhibition induziert, desweiteren blockiert Acetylsalicylsäure via Membranmodifikation an den Thrombozytenoberflächen sämtliche Wege der Plättchenverstärkung. Somit können die Thrombozyten nicht mehr aggregieren, die amplifizierende Freisetzungreaktion und die Anlagerung adhäsiver Proteine werden unterbunden, die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung kann weder ausgelöst noch unterhalten werden und die Fibrinbildung und -polymerisation wird nicht katalysiert. Folglich stellt die Anwendung von Thrombozytenaggregationshemmern eine effektive Möglichkeit zur Prävention eines Blutgerinnsels dar, die allerdings mit dem Risiko von auftretenden Nebenwirkungen wie Blutungskomplikationen, Thrombopenie, Ulcera des Gastrointestinaltraktes, allergischen Reaktionen, Bronchospasmen und im Extremfall mit einer Agranulozytose verbunden sein kann (22, 39, 41, 42, 54, 56, 102).

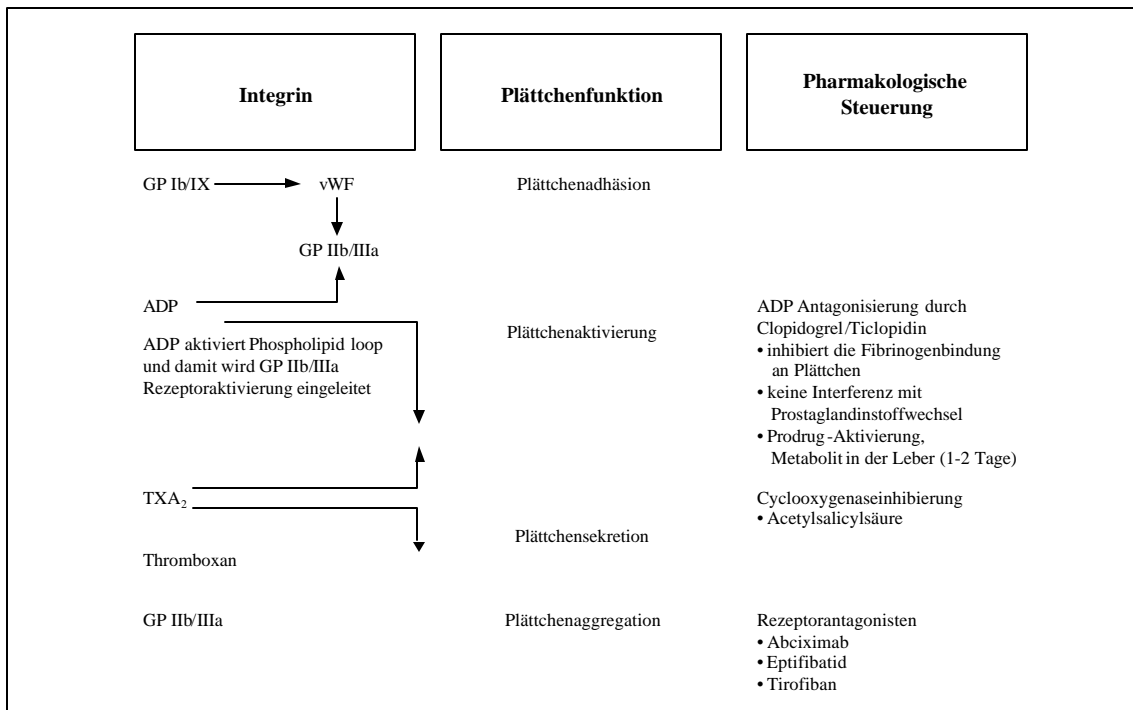


Abb. 1.4. Schema zur Interaktion bei Thrombozytenaktivierung

Iloprost, ein Prostaglandinderivat und potenter Thrombozytenaggregationshemmer, ist bereits in so niedrigen Konzentrationen hochwirksam, daß diese unerwünschten Wirkungen praktisch nicht auftreten. Neben der Hemmung der Thrombozytenfunktionen (Adhäsion, Aggregation und Sekretion) inhibiert Iloprost auch andere thrombinvermittelte Reaktionen und zeigt mitogene Wirkung. Aufgrund dieses relativ breiten Wirkprofils hemmen bereits minimale systemisch verabreichte Mengen an Iloprost effektiv und auf vielfältige Weise die Okklusion von Gefäßen (28, 31, 75, 85, 88, 89, 104).

Neben den bisher erläuterten Problematiken und Therapieverfahren betreffend der Thrombogenität künstlicher Oberflächen liegt aufgrund der verbreiteten Anwendung implantierter Materialien ein weiterer Ansatzpunkt in der Prävention der durch Fremdkörperimplantation ausgelösten Infektionen. Gerade bei immer häufiger auftretenden multiresistenten Keimen und aufgrund der Erkrankungen multimorbider Patienten sehr eingeschränkten Therapiemöglichkeiten ist eine wirksame Antibiose äußerst schwierig geworden, so daß der Prophylaxe von Infektionen inklusive deren oft schwerwiegenden Folgen ein wichtiger Stellenwert zukommt.

In der Pathogenese dieser Infektionen existieren viele Möglichkeiten der Kontamination der künstlichen Oberflächen mit Bakterien. Vermeidbare Ursachen sind unsachgemäße Sterilisierung oder die Mißachtung hygienischer Grundprinzipien bei der Applikation von Biomaterialien. Ein Problem dagegen stellt insbesondere bei Venenverweilkathetern die Deszension von Hautkeimen in die Blutbahn dar. Die wohl bedeutendste Ursache liegt in der hämatogenen Keimbesiedelung, bei der die Bakterien aus unbekanntem septischen Herden oder dem Darm der Patienten stammen (5, 24). Über sehr komplexe Mechanismen, die bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, adhären die Keime an der Oberfläche der Biomaterialien (26, 71, 74, 77). Ausgelöst durch die thrombogene Oberfläche der Biomaterialien wie Katheter, Gefäß- oder Endoprothesen wird Thrombin aktiviert, welches, wie bereits beschrieben, eine Vielzahl von Reaktionen triggert und katalysiert. Unter anderem fördert es die Fibrinbildung und -polymerisation, in dessen Gegenwart eine verstärkte Bakterienadhäsion an den Kunstoberflächen als gesichert gilt. Desweiteren kann durch die Beteiligung von Thrombin (und somit von Fibrinablagerungen) auch die Beobachtung, daß fremdkörperassoziierte Thrombosen und Infektionen oft gleichzeitig auftreten, erklärt werden (72).

Etablierte Verfahren wie die systemische Antibiotikatherapie sind oft nicht ausreichend wirksam, kupieren frühzeitige Symptome einer Infektion und weisen organtoxische Nebenwirkungen auf, so daß bei einer fremdkörperassoziierten Infektion die Entfernung des Implantates als ultima ratio gelten kann (5, 26, 27, 37, 74).

Strategien zur Vermeidung von Komplikationen wie Thrombosen oder Infektionen nach Blutkontakt mit künstlichen Oberflächen haben deshalb an Bedeutung gewonnen und bestehen derzeit in der Synthese antithrombogener Kunststoffe, der Modifikation bewährter Materialien mit chemischer Fixierung von Pharmaka und in der Anwendung des „local drug delivery“ in Form von Beschichtungen etablierter Biomaterialien mit resorbierbaren Arzneistoffträgern, in die blutgerinnungshemmende oder antibiotische Medikamente eingearbeitet sind (4, 5, 24, 29, 37, 74, 86, 95).

Am Beispiel von Stents konnte gezeigt werden, daß alleine die Oberflächenmodifikation mittels Polieren des Metalls im Vergleich zu unpolierten Stentoberflächen eine signifikante Reduktion des Thrombusgewichtes, der Fibrinauflagerung und der neointimalen Hyperplasie, nicht aber der Thrombozytenadhäsion induziert (83). Auch die Synthese neuartiger Kunststoffe und die chemische Fixierung von Antikoagulanzen mit beispielsweise Heparin oder Phosphatidylcholin auf bewährten Biomaterialien verbessern die Hämokompatibilität. Nachgewiesen ist eine signifikant reduzierte Anlagerung adhäsiver Proteine und somit eine Verbesserung der Thrombogenität von Oberflächen. Diese Materialien konnten aber die Restenoserate nicht verbessern (21, 23, 40, 49, 84, 91). Folglich stellen diese Verfahren einen wichtigen Fortschritt in der Entwicklung antithrombogener Oberflächen dar, können aber das Problem der Hämokompatibilität nicht befriedigend lösen, da die Induktion der plasmatischen Gerinnung lediglich reduziert, nicht aber vollständig aufgehoben werden kann (7, 55).

Deshalb hat in den letzten Jahren das Prinzip des „local drug delivery“ zur Verbesserung antithrombogener und antiinfektiver Eigenschaften von Biomaterialien an Bedeutung gewonnen und großes Interesse geweckt. Durch eine Beschichtung der künstlichen Oberflächen mit degradierbaren Arzneistoffträgern, die meist selbst schon die Adhäsion von Blutbestandteilen und Bakterien reduzieren, in Kombination mit eingearbeiteten Pharmaka, können lokal hohe Konzentrationen an Wirksubstanzen erreicht werden, während die systemischen Konzentrationen und das damit verbundene Risiko auftretender Nebenwirkungen gering bleiben (7, 62, 66, 90). Das Zusammenspiel von Arzneistoffträger mit diversen eingearbei-

teten Medikamenten soll eine Imitation der körpereigenen Schutzfunktion des Endothels bewirken, lokal auf künstlichen Oberflächen die Ablagerung von Blutbestandteilen und Keimen verhindern, die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung, die Aggregation und den Zerfall der Thrombozyten unterbinden, um so thrombembolische oder infektiöse Ereignisse wirksam zu verhindern helfen (29, 37, 72, 95).

In unserer Arbeitsgruppe entwickelte Beschichtungen basieren auf der Verwendung eines niedermolekularen Milchsäurepolymers (Polylaktid R 203) als Arzneistoffträger. Polylaktide zerfallen durch Hydrolyse und sind in der klinischen Anwendung in Form von Naht- und Osteosynthesematerial etabliert. Darin eingearbeitet werden ein direkter, selektiver Thrombininhibitor (Hirudin) zur Hemmung der plasmatischen Blutgerinnung und ein Prostaglandinderivat (Iloprost) zur Hemmung der Plättchenaggregation. In vorangegangenen Arbeiten konnte bewiesen werden, daß diese Kombination von hochwirksamen Arzneistoffen mit der resorbierbaren Trägersubstanz neue Wege zur Herstellung antithrombogener und antiinfektiver Biomaterialien ermöglicht (32, 87).

Hypothese der vorliegenden Arbeit:

Handelsübliche PTFE-Gefäßprothesen und Koronarstents aus Metall wurden mit einem degradierbaren Polylaktid und eingearbeiteten Arzneistoffen beschichtet, um folgende Fragen abzuklären: es sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Freisetzung der Arzneistoffe von der Menge des Trägers abhängig ist, bzw. von der Konzentration der Arzneistoffe beeinflusst wird. Weiter war es Aufgabe, die Degradierung des Polylaktidträgers zu untersuchen und die antiinfektiven Eigenschaften der Beschichtungen nach Bakterienkontakt mit mikrobiologischen Verfahren abzuklären.

2. Material und Methoden

2.1. Beschichtungstechnologie

2.1.1. Arzneistoffträger

Als Arzneistoffträger für die Beschichtung wird ein auf der Basis von Polymilchsäure synthetisch hergestellter aliphatischer Polyester verwendet. Hierbei handelt es sich um ein racemisches Poly-D,L-Laktid mit einem Molekulargewicht von 29.500 Dalton und der chemischen Struktur $[C_3H_4O_2]_n$, das unter dem Handelsnamen „Resomer R 203 Poly-D,L-lactid“ (abgekürzt R 203) von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma KG bezogen wird.

2.1.2. Arzneistoffe

Als Arzneistoffe werden antikoagulative Wirksubstanzen in die Beschichtung eingearbeitet.

2.1.2.1. Polyethylenglycol (PEG)-Hirudin

Knoll AG, Ludwigshafen

PEG-Hirudin, ein potenter Thrombinhemmer der Firma Knoll AG, Ludwigshafen, liegt uns in sterilen Abfüllungen als Lyophilisat vor (50 mg).

2.1.2.2. Rekombinantes (r)-Hirudin

Handelsname "Refludan", Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH,
Bad Soden/Ts.

Als weiteres Antikoagulum und Thrombinhemmer wird r-Hirudin (Wirkstoff Lepirudin) verwendet. r-Hirudin beziehen wir von der Firma Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, Bad Soden/Ts. als Trockensubstanz in Flaschen zu je 50 mg Lepirudin als steriles Lyophilisat.

2.1.2.3. Iloprost

Handelsname "Ilomedin", Schering AG, Berlin

Ein von der Schering AG, Berlin, als Reinsubstanz zur Verfügung gestelltes Prostaglandin-derivat und potenter Thrombozytenaggregationshemmer; auch unter dem Handelsnamen "Ilomedin" in 0,5 ml Ampullen zu je 50 µg Wirkstoff bei Schering zu beziehen.

2.1.3. Lösungsmittel

Als organisches Lösungsmittel wird Chloroform von der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

2.1.4. Biomaterialien zur Beschichtung

2.1.4.1. Metallröhrchen

Hierbei handelt es sich um Stahlzylinder, die aus Vorstufen bei der Herstellung von Stents gewonnen werden.

2.1.4.2. Gefäßprothesen

Firma Gore, W.L. Gore & Associates, Inc. Flagstaff/Arizona

Verwendet werden handelsübliche Gefäßprothesen der Firma Gore (W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff/Arizona) mit einem Innendurchmesser von 4 mm. Die uns zur Verfügung gestellten Exemplare eignen sich nur für experimentelle Versuche, da die Gefäßprothesen nicht sterilisiert geliefert werden.

Herstellerangaben der verwendeten Gefäßprothesen:

4.0 mm inner diameter, 30 µm internodal distance, nonreinforced, thin walled GORE-TEX® expanded PTFE tubing.

2.1.5. Materialien und Geräte zur aseptischen Beschichtung von Biomaterialien

Für die aseptische Beschichtung von Biomaterialien werden folgende Materialien und Geräte benötigt:

2.1.5.1. Materialien

- sterile Schutzkleidung (Kittel, Handschuhe, Mundschutz, OP-Hauben, Schutzbrillen)
- sterile Abdecktücher
- sterile 10 ml Glasreagenzgläser mit geschliffenem Hals und Verschlussstopfen
- sterile Glasröhrchen (Länge 4 cm, Innendurchmesser 0,8 cm) mit sterilem Teflonstöpsel
- steriler Reagenzglasständer
- sterile 10 ml Einmalspritzen und großlumige lange Kanülen (z.B. 20G)
- sterile Spitz-Pinzetten
- Glaspipette 10 ml
- Peleusball
- steriler Medikamentenspatel
- sterile Eppendorfpipetten mit passenden sterilen Pipettenspitzen
- Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm
(Lösungsmittelresistente Filter der Firma Sartorius, Minisart SRP 25)
- sterile Plastikreagenzgläser mit Stöpsel zum Transport der Biomaterialien
- Trockeneis in geeignetem Behältnis
- sterile Papierfolie
- Einschweißpapier zum sterilen Verpacken

2.1.5.2. Geräte

- geeichte Präzisionswaage
- Arbeitsplatz mit Luftabzughaube
- Sterilraum mit lamina-air-flow-Bedingungen (< 100 sterile Partikel/m³ Luft)
- Trockenschrank
- Exsikkator
- Folienschweißgerät zum Verschweißen der Sterilverpackungen

2.1.6. Arbeitsanweisung zur Durchführung von Beschichtungen

2.1.6.1. Vorbereitende Arbeiten

Die Gefäßprothesen bzw. Stahlzylinder werden in 1 cm lange Stücke geschnitten, in Chloroform gewaschen, getrocknet, in Papierfolie eingeschweißt und beschriftet. Die so vorbereiteten Materialien werden zur Sterilisation gegeben.

2.1.6.2. Herstellen der Beschichtungslösung

Sämtliche Arbeiten erfolgen mit den unter 2.1.5. genannten Materialien und Geräten.

Die entsprechende Menge des Polylaktids R 203 wird auf einer Präzisionswaage abgewogen und in ein verschließbares Glasreagenzgefäß gefüllt, um dann unter dem Abzug arbeitend in Chloroform gelöst zu werden. Zu diesem Lösungsgemisch wird nun, je nach gewünschter Konzentration, ein bestimmtes Volumen Iloprost hinzupipettiert. Unter aseptischen Bedingungen zieht man die noch unsterile Lösung in eine 10 ml Einmalspritze auf und filtert sie portionsweise durch einen Sterilfilter mit der Porengröße 0,2 µm in das Hirudin-Gefäß ab. Durch vorsichtiges Schwenken des Hirudin-Fläschchens wird eine vollständige Lösung bzw. Suspension des Lyophilisates erreicht. Zuletzt erfolgt mittels einer großlumigen Kanüle und einer sterilen Einmalspritze ein aseptisches Umfüllen der jetzt sterilen Lösung in ein steriles, verschließbares Reagenzglas, um einem Verdampfen des Chloroforms vorzubeugen.

2.1.6.3. Methodik der aseptischen Beschichtung von Biomaterialien

Das Prinzip bei der Beschichtung von Biomaterialien besteht im Eintauchen des Biomaterials in die Beschichtungslösung und anschließenden Abdampfen des Lösungsmittels.

Um die Verdampfungsoberfläche des Chloroforms möglichst gering zu halten, wird ein Teil der Beschichtungslösung in ein konisches, 4 cm hohes Glasgefäß mit einem Innendurchmesser von 0,8 cm gefüllt, welches mit einem Teflonstöpsel verschlossen wird. Dieses mit der Stammlösung gefüllte Gefäß wird nun auf Trockeneis gekühlt, so daß auch beim Öffnen des Glases kein Lösungsmittel abdampfen kann, was eine Konzentrationsänderung der Beschichtungslösung zur Folge hätte. Pro Arbeitsgang wird eine sterilisierte Gefäßprothese (Innendurchmesser 4 mm, Länge 1 cm) in die Beschichtungslösung eingetaucht, so daß die Prothese

vollständig in der Lösung schwimmt und komplett durchtränkt wird. Anschließend entnimmt man mit einer Pinzette die Gefäßprothese aus dem Glasröhrchen, wobei darauf zu achten ist, daß das Biomaterial nur am äußersten Rand mit möglichst geringer Auflagefläche berührt wird. Um ein gleichmäßiges Abdampfen des Lösungsmittels zu erzielen, wird mit langsam kreisenden Bewegungen unter dem Abzug gewartet, bis das Chloroform vollständig abgedampft ist. Dieses Vorgehen der Beschichtung wird bei jedem Biomaterial ein zweites Mal wiederholt, damit die Gleichmäßigkeit der Beschichtung optimiert wird und auch die Auflageflächen der Pinzette mit beschichtet werden können. Anschließend werden die Gefäßprothesen aseptisch verpackt, eingeschweißt, mit Trockenmittel in der äußeren Ummantelung versehen und in einer luftdichten Verpackung bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Analoges Vorgehen erfolgt für die Beschichtung der Stahlröhrchen.

2.2. Mikrobiologische Adhäsionsversuche

Die Durchführung der mikrobiologischen Versuche erfolgte in den Labors des Institutes für medizinische Mikrobiologie und Hygiene und in der Klinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar.*

Um die Anhaftung und das Wachstum von *Staphylokokkus epidermidis* auf Biomaterialien mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften (unbeschichtet und mit verschiedenen Beschichtungen) zu quantifizieren, werden die zu untersuchenden Biomaterialien in einer Bakteriensuspension inkubiert, nach einer definierten Zeit aus der Lösung herausgenommen und gewaschen. Auf diese Weise verbleiben nur fest adhärierende Bakterien auf den Biomaterialien und können nun über einfache mikrobiologische (Abklatschpräparate) und radioaktive Verfahren (^3H -Markierung von *Staphylokokkus epidermidis*) bestimmt werden.

2.2.1. Materialien, Nährmedien und Geräte

Für die mikrobiologischen Adhäsionsversuche benötigt man folgende Utensilien:

* Besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Dana Milatovic, die mir bei diesen Arbeiten mit wertvollen Anregungen zur Seite stand.

2.2.1.1. Materialien

- Staphylokokkus epidermidis BK108 (am Vortag frisch überimpft)
- standardisierte Vergleichslösung "Mac Farland 0,5"
- ³H-Thymidin (Tritium)
- Szintigraphieflüssigkeit
- sterilisierte Erlmeierkolben (100 ml)
- isotone Kochsalzlösung
- photometergeeignete Reagenzgläser
- Plastikreagenzgläser
- Szintigraphieröhrchen
- Glaspipetten in verschiedenen Größen
- Plastikösen
- Pinzetten
- Kleenex-Tücher

2.2.1.2. Nährmedien

- Blutagarplatten (Columbia Agar mit 5% Schafsblut)
- Bouillon: BBL enriched Thioglycollate Medium
- aus laboreigener Herstellung: Müller-Hinton-Bouillon

In der Regel wurden die Medien hierfür von der Firma Becton Dickinson Mikrobiology Europe aus Frankreich bezogen.

2.2.1.3. Geräte

- Photometer
- Zentrifuge
- Brutschrank
- Bunsenbrenner
- Shaker
- β-Counter

2.2.2. Methodik zum Abrollversuch

Beim Abrollversuch, einem semiquantitativen Verfahren, wird die Adhäsion lebender Bakterien mittels Abrollen des Probematerials auf Agarplatten untersucht. Da sich hierfür vor allem feste Materialien eignen, werden Metallröhrchen aus Stahl, gewonnen aus Vorstufen bei der Stentherstellung, verwendet.

Am Vortag des Versuches frisch überimpfter *Staphylokokkus epidermidis* des Serotyps BK108 wird in isotoner Kochsalzlösung suspendiert und auf dem Shaker so lange vermischt, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Diese wird anhand ihrer Extinktion mit einer standardisierten Vergleichssuspension (Mac Farland 0,5) im Photometer abgeglichen. Abhängig von der Bakteriengröße erhält man z.B. für Staphylokokken eine Ausgangssuspension mit der Konzentration von etwa $1,5 \times 10^8$ KBE/ml. Anschließendes Verdünnen im Verhältnis 1:10 mit isotoner Kochsalzlösung ermöglicht den Gewinn eines größeren Volumens an Inkubationslösung. Die dabei resultierende Bakterienkonzentration wird in einer Verdünnungsreihe bestimmt und beträgt im Mittel $2,2 \times 10^6$ KBE/ml.

Jeweils drei Metallröhrchen mit der gleichen Beschichtung werden nun in 5 ml der Einsaatlösung für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wieder aus der Bakterienlösung herausgenommen und gewaschen. Dazu werden die Probestückchen in ein Reagenzglas mit 5 ml isotoner Kochsalzlösung gegeben und auf dem Shaker für ca. 15 Sek. aufgeschüttelt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die Biomaterialien insgesamt fünf Mal gewaschen wurden. Um zu kontrollieren, ob durch diesen Waschvorgang alle nicht-adhärierenden Bakterien entfernt wurden, wird aus der letzten Spülflüssigkeit eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Nach dem Abgießen der letzten Waschflüssigkeit folgt ein vorsichtiges Abtupfen der Metallröhrchen mit einem Kleenex-Tuch, so daß auf der Oberfläche keine Wassertropfen mehr sichtbar sind. Mit einer abgeflamnten Pinzette wird jeweils ein Metallröhrchen in fünf Bahnen auf einer Agarplatte ausgerollt, welche anschließend einen Tag lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert wird. Auch die Probestückchen werden in einer Thioglykolat-Bouillon unter gleichen Bedingungen inkubiert, um zu kontrollieren, ob alle anhaftenden Bakterien beim Abrollen gelöst und auf die Agarplatte übertragen wurden.

Nach etwa 24 Stunden Bebrütung im Wärmeschrank werden die auf den Nährmedien gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt. Aufgrund der gleichen Behandlung aller Probe-

stückchen können die resultierenden Daten untereinander verglichen werden. Da aber nicht davon ausgegangen werden kann, daß sich beim Waschen und Abrollen exakt die gleiche Anzahl Bakterien von den Materialien gelöst hat, sind die Ergebnisse untereinander semiquantitativ zu vergleichen.

2.2.3. Methode des Adhäsionsversuches mit radioaktiv markierten Bakterien

In einem weiteren Versuch soll die bakterielle Adhäsion mittels radioaktiv markierter Staphylokokken untersucht werden.

Dazu werden Kolonien von Staphylokokkus epidermidis BK108 in einer Lösung, bestehend aus 10 ml Müller-Hinton-Bouillon und 20 µl ³H-Thymidin, suspendiert, über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet und auf diese Weise radioaktiv markiert. Die Bakterienlösung, die nach der Wachstumszeit der Staphylokokken von überschüssigem Tritium gereinigt werden muß, wird hierfür zunächst bei 2000 g über 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und die Bakterienlösung in 5 ml isotoner Kochsalzlösung resuspendiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die Suspension drei Mal zentrifugiert wurde. Analog dem Abrollversuch erfolgt durch Verdünnung der Bakterien suspension mit isotoner Kochsalzlösung und Abgleichen der Extinktion im Photometer gegen eine Standardlösung die Herstellung der Einsaat. Wieder werden je drei Metallröhrchen mit jeweils der gleichen Beschichtung in 5 ml Inkubationslösung für 2 h bei 37°C im Brutschrank infiziert. Durch eine Verdünnungsreihe wird die Keimzahl der Inkubationslösung ermittelt und zudem die entsprechende Radioaktivität im β-Counter gemessen.

Es folgt ein fünfmaliger Waschvorgang, wie im Abrollversuch beschrieben. Aus der letzten Waschflüssigkeit wird zur Kontrolle, ob die nicht fest anhaftenden Bakterien weitgehend entfernt wurden, eine Probe entnommen, deren Radioaktivität im β-Counter bestimmt wird.

Die Flüssigkeitsreste auf den Metallröhrchen werden vorsichtig abgetupft und die Probe-stückchen jeweils einzeln in mit Szintigraphieflüssigkeit angereicherte Spezialröhrchen gegeben. Nun kann die Anzahl der Bakterien, die noch an den Biomaterialien haften, indirekt über die Radioaktivität im β-Counter quantitativ bestimmt werden. Anzumerken ist hierbei allerdings, daß über die Messung der Radioaktivität im Gegensatz zum Abrollversuch alle adhätierenden Bakterien erfaßt werden, also auch diejenigen, die bereits abgestorben sind.

2.3. Abbau des Trägers und Freisetzung der eingearbeiteten Wirkstoffe

2.3.1. Materialien und Geräte

2.3.1.1. Materialien

- isotone Kochsalzlösung
- sterile 12 ml Plastikreagenzgläser mit Stöpsel
- sterile Glaspipetten
- Peleusball
- sterile Eppendorfpipetten mit passenden Pipettenspitzen
- sterile Eppendorfcups
- steriles Stahlgitter, in kleine Teile geschnitten

2.3.1.2. Geräte

- steriler Reagenzglasständer
- steriler Rütteltisch
- Arbeitsplatz mit Luftabzughaube
- Trockenschrank
- Exsikkator
- geeichte Präzisionswaage

2.3.2. Elutionsversuch

Mit Hilfe eines Elutionsversuches soll die in-vitro Freisetzung der in die Beschichtung eingearbeiteten Arzneistoffe analysiert werden. Verglichen werden folgende Beschichtungen:

- 400 mg R 203/6 ml Chloroform
(wird im weiteren Text als „hohe Polylaktidkonzentration“ bezeichnet)
- 400 mg R 203/6 ml Chloroform mit 1% PEG-Hirudin und 1% Iloprost
- 400 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% PEG-Hirudin und 1% Iloprost
- 400 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% PEG-Hirudin und 2% Iloprost
- 400 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% r-Hirudin und 1% Iloprost
- 400 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% r-Hirudin und 2% Iloprost
- 100 mg R 203/6 ml Chloroform
(wird im weiteren Text als „niedrige Polylaktidkonzentration“ bezeichnet)
- 100 mg R 203/6 ml Chloroform mit 1% PEG-Hirudin und 1% Iloprost
- 100 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% PEG-Hirudin und 1% Iloprost
- 100 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% PEG-Hirudin und 2% Iloprost
- 100 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% r-Hirudin und 1% Iloprost
- 100 mg R 203/6 ml Chloroform mit 5% r-Hirudin und 2% Iloprost

Dazu werden jeweils 14 GORE-TEX[®]-Gefäßprothesen mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Länge von 1 cm unter aseptischen Bedingungen mit der gleichen Beschichtung überzogen.

Damit die Gefäßprothesen während des Versuches vollständig in der Elutionsflüssigkeit eingetaucht sind, werden sie durch in kleine Stücke zerteiltes Maschendrahtgitter aus rostfreiem Stahl in 12 ml Plastikreagenzgläsern so fixiert, daß sie nach Zugabe von 10 ml isotoner Kochsalzlösung noch komplett mit Elutionsflüssigkeit bedeckt sind. Um während des Versuches eine konstante homogene Durchmischung der Lösungen zu gewährleisten, werden die Reagenzgläser in einem Reagenzglasständer auf einem Rütteltisch vorsichtig bewegt.

Zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 10 Minuten, 1 Stunde, 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 10 Tage, 30 Tage und 90 Tage werden jeweils 100 µl Elutionsflüssigkeit entnommen und bei mindestens -20°C tiefgefroren. Mittels Eichkurven für Hirudin und Iloprost können nun die jeweiligen Konzentrationen der Arzneistoffe zu den entsprechenden Entnahmezeitpunkten der Proben bestimmt werden. Es ist darauf zu achten, daß das pro Probenentnahme um 100 µl reduzierte Gesamtvolumen der Elutionsflüssigkeit bei der Berechnung der Konzentrationen berücksichtigt wird. Nach Abschluß des Elutionsversuches

am 90. Tag werden die Gefäßprothesen im Wärmeschrank bei 37°C über 3 Tage getrocknet und anschließend gewogen.

Parallel dazu werden in einem zweiten Versuch Gefäßprothesen zur Analyse des freigesetzten Polylaktids R 203 eluiert. Der Unterschied zum oben dargestellten Verfahren liegt in der Probenentnahme: pro Entnahmezeitpunkt werden die kompletten Gefäßprothesen aus der Elutionsflüssigkeit entfernt, im Wärmeschrank bei 37°C über 3 Tage getrocknet, gewogen und luftdicht verpackt im Exsikkator bis zur Analytik mittels inhärenter Viskosität trocken aufbewahrt.

2.3.3. Inhärente Viskosität

Die Messung der inhärenten Viskosität erfolgte bei Boehringer Ingelheim Pharma KG.

2.4. Gerinnungsanalytische Untersuchungen

2.4.1. Ecarinzeitbestimmung nach der Methode von Nowak

Zur Quantifizierung der Hirudin-Konzentrationen wird die Ecarinzeitbestimmung nach der Methode von Nowak eingesetzt. Diese Methode wurde von der AG "Pharmakologische Hämostaseologie" der Medizinischen Fakultät der Universität Jena unter Prof. Nowak entwickelt. Die Bestimmungen wurden in dem Gerinnungslabor von Prof. Dr. med. Job Harenberg, Fakultät für klinische Medizin der Universität Heidelberg in Mannheim freundlicherweise durchgeführt, da in diesem Labor ein nach der GLP validiertes Testverfahren vorlag.

2.4.2. Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation wie von BORN beschrieben, ist eine quantitative Bestimmung der Aggregation, beruhend auf der turbidimetrischen Bestimmung von Zellsuspensionen, die wir zum Nachweis der Aktivierung und Quantifizierung von Iloprost verwenden. Gemessen wird die prozentuale Lichtdurchlässigkeit von plättchenreichem bzw. plättchenarmem Plasma vor und nach der Aggregation. Durch Zugabe von Kollagen als Induktor wird die Aggregation ausgelöst und die optische Dichte des Plasmas als physikalisches Korrelat des Aggregations-

verhaltens der Thrombozyten in einer Zeit/Transmissions-Kurve durch den Computer dargestellt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wird, beginnend mit einer Iloprost-Ausgangslösung in einer Konzentration von 100 ng/ml, mit isotoner Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe vorbereitet. Jeweils 5 µl dieser Verdünnungslösung werden dann zu 295 µl plättchenreichem Humanplasma (PRP) hinzupipettiert und die durch Kollagen induzierte maximale Thrombozytenaggregation sowie der maximale Gradient mit dem APACK-Gerät ermittelt.

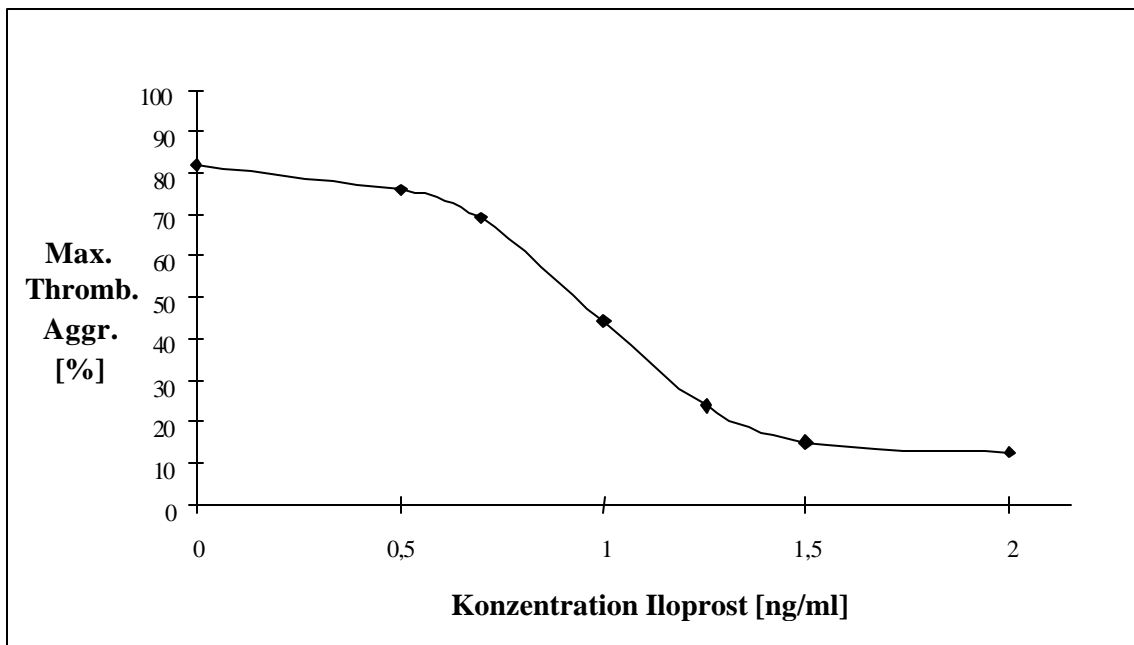


Abb. 2.1. Kollageninduzierte Aggregation von Thrombozyten in Abhängigkeit von der Iloprostkonzentration [ng/ml]

Mit dieser Eichkurve wird für jeden Zeitpunkt die entsprechende Konzentration an Iloprost in der Elutionsprobe bestimmt. Zu diesem Vorgehen wurde ein GLP-Protokoll erstellt, welches als Thrombozytenaggregationsgerät das Modell APACK (Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer) der Firma Labor vorsieht. Das Kollagen aus Kalbshaut bezogen wir von der Firma *mölab*.

3. Ergebnisteil

3.1. Beschichtungsmassen

Um die bei der Beschichtung mit dem Arzneistoffträger aufbrachten Pharmakamengen direkt zu ermitteln, wurden die Gefäßprothesen jeweils vor und nach der Behandlung auf einer Präzisionswaage gewogen. Ein Problem zeigte sich darin, daß die Biomaterialien durch die Beschichtung elektrostatisch aufgeladen wurden und wir mit 1 cm langen GORE-TEX[®]-Gefäßprothesen mit einem Durchmesser von 4 mm im Bereich eines sehr niedrigen Ausgangsgewichtes mit einem entsprechend großen Wägefehler lagen. Deshalb war besonders darauf zu achten, daß die Präzisionswaage und das beschichtete Biomaterial vor dem Wiegevorgang statisch entladen wurden.

Der Einfachheit halber haben wir jeweils 10 Gefäßprothesen ausschließlich mit dem Polylaktid R 203 in den verschiedenen Ausgangskonzentrationen beschichtet und über die jeweils bekannten prozentualen Konzentrationen der eingearbeiteten Pharmaka das Endgewicht der gesamten Beschichtungsmasse interpoliert.

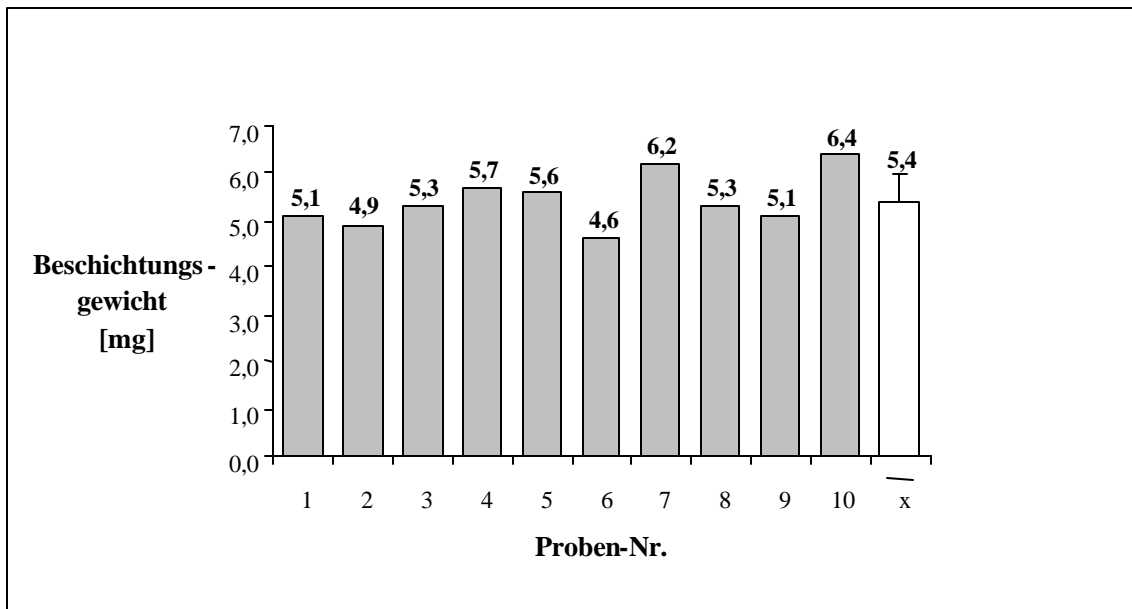


Abb. 3.1.1. Gewichtszunahme von 1 cm langen GORE-TEX[®]-Gefäßprothesen (\varnothing 4 mm), beschichtet mit einer hohen Polylaktidkonzentration

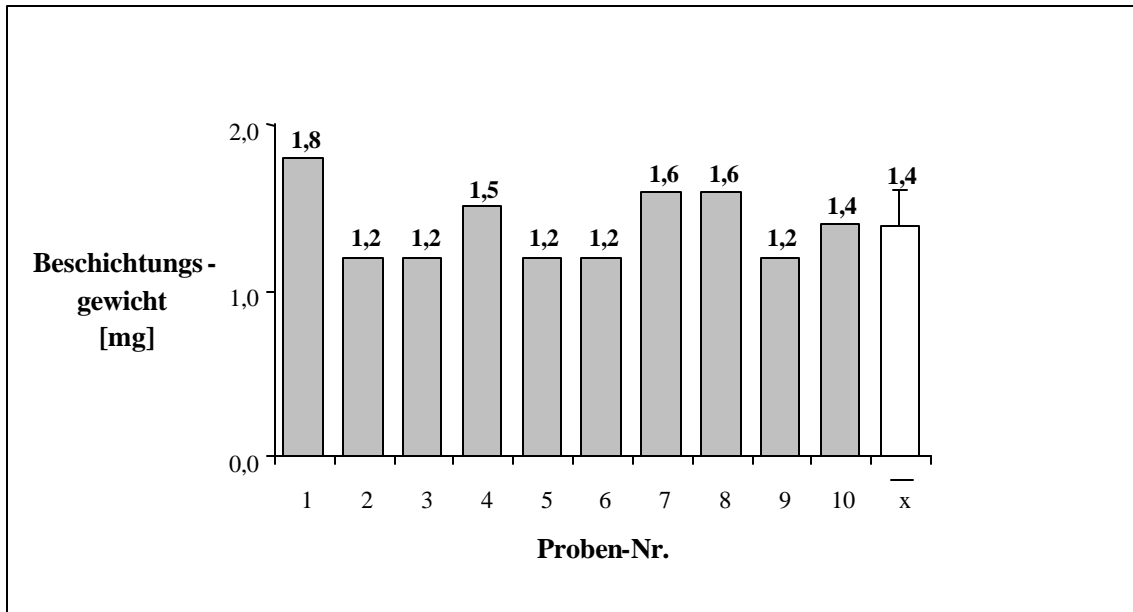


Abb. 3.1.2. Gewichtszunahme von 1 cm langen GORE-TEX[®]-Gefäßprothesen (\varnothing 4 mm), beschichtet mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration

Nach dem Beschichten und anschließenden Trocknen zeigte sich bei einer Polylaktidkonzentration von 400 mg/6 ml Chloroform pro Zentimeter Gefäßprothesenlänge eine mittlere Gewichtszunahme von 5,4 mg bei einer Standardabweichung von 0,56 mg. Ausgehend von diesem Wert errechnet sich bei einem 5%igen Hirudinanteil ein Gewicht von 270 μ g. Desweiteren betragen die jeweiligen Iloprostanteile 54 μ g in der 1%igen Lösung und 108 μ g in der 2%igen Lösung.

Analog dazu können die absoluten Pharmakamengen bei einer Beschichtungslösung mit R 203 in einer Konzentration von 100 mg/6 ml Chloroform interpoliert werden. Bei einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 1,4 mg pro Zentimeter Gefäßprothesenlänge und einer Standardabweichung von 0,22 mg erhält man für einen Anteil von 5% Hirudin eine Gewichtszunahme von 70 μ g. Für den Iloprostanteil errechnet sich für die Konzentrationen von 1% Iloprost ein Gewichtsanteil von 14 μ g sowie bei 2% Iloprost ein Gewichtsanteil von 28 μ g.

3.2. Abbau des Trägers und Freisetzung der eingearbeiteten Wirkstoffe

Die Gefäßprothesen wurden wie unter 2.1.6. beschrieben aseptisch beschichtet. Anhand eines Elutionsversuches (vgl. 2.3.2.) sollte die Degradierung des Arzneistoffträgers (R 203) sowie die Freisetzung der eingearbeiteten Pharmaka PEG-Hirudin bzw. r-Hirudin und Iloprost über einen Zeitraum von 90 Tagen untersucht werden.

3.2.1. Abbau des Polylaktids R 203

Das Verfahren der inhärenten Viskosität dient zur semiquantitativen Analyse des Polylaktids R 203. Anhand des Molekulargewichts der Trägersubstanz können Rückschlüsse auf die freigesetzten Mengen von R 203 gezogen werden. *

Pro Entnahmezeitpunkt wurden jeweils die kompletten Gefäßprothesen (n=7) aus der Elutionsflüssigkeit entfernt, im Wärmeschrank getrocknet, gewogen und anschließend dem Verfahren zur Bestimmung der inhärenten Viskosität unterzogen.

Dabei zeigen die Gefäßprothesen vor Versuchsbeginn eine inhärente Viskosität von 0,24 dl/g und zum Entnahmezeitpunkt 90 Tage eine inhärente Viskosität von 0,25 dl/g. Das Polymer R 203 unterliegt damit über dem gesamten Zeitraum der Elution keinerlei Abbauverhalten.

* Diese Daten wurden uns freundlicherweise von Boehringer Ingelheim Pharma KG (Herr Dr. Harald Liedtke) zur Verfügung gestellt.

3.2.2. Freisetzung von Hirudin

Die Quantifizierung der eluierten Hirudinfractionen erfolgte mittels Ecarinzeitbestimmung nach der Methode von Nowak.*

Bei einer 1%igen PEG-Hirudinlösung erhalten wir in den Elutionsproben zu jedem Zeitpunkt der Elution dem Kontrollwert identische Ecarinzeiten, unabhängig von der Konzentration der Beschichtung. Somit sind die freigesetzten Hirudinnmengen zu gering, um in diesem Konzentrationsbereich nachgewiesen werden zu können.

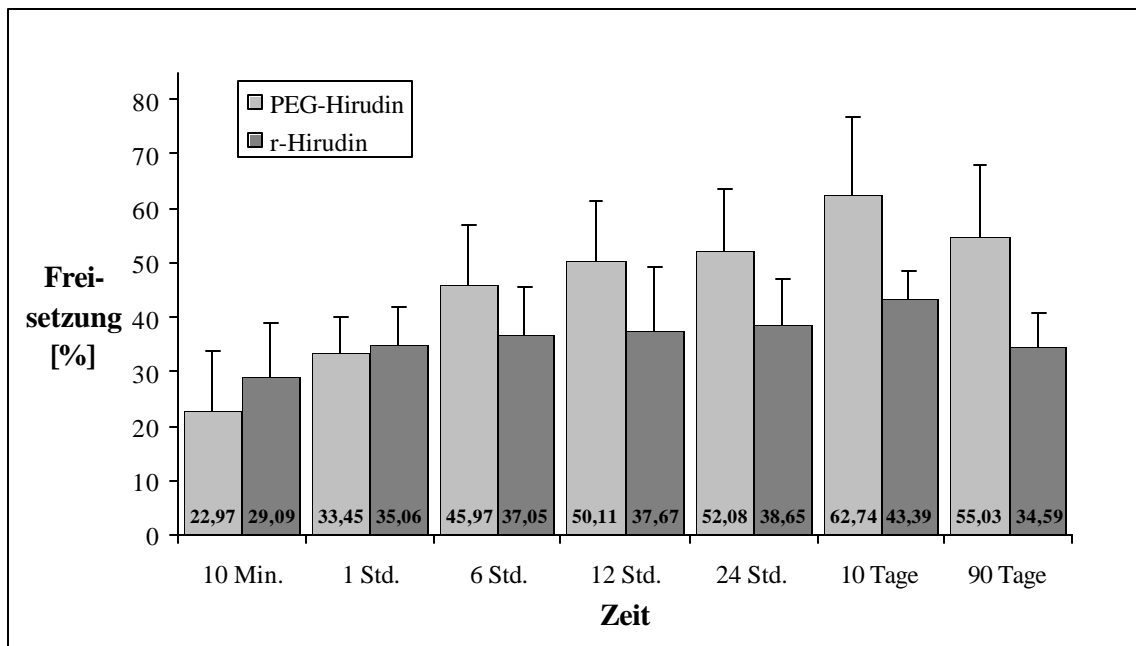


Abb. 3.2.2.1. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer hohen Polyaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 1% Iloprost enthält

Ein initial steiler Anstieg bis zu einer Freisetzung von 50% des PEG-Hirudins zeigt sich innerhalb der ersten 24 Stunden. In der Folge ist nur noch eine geringe weitere Elution zu messen. Ähnlich verhält sich die Freisetzung von r-Hirudin. Hier ist allerdings ein initiales Freisetzungsverhalten bis 35% innerhalb der ersten Stunde nach Versuchsbeginn zu verzeichnen. Im Anschluß daran wird r-Hirudin innerhalb der 90 Tage bis maximal 40% kontinuierlich ansteigend in der Elutionsflüssigkeit nachgewiesen.

* Die Analysen wurden unter der Leitung von Prof. Dr. med. Job Harenberg in der Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg durchgeführt.

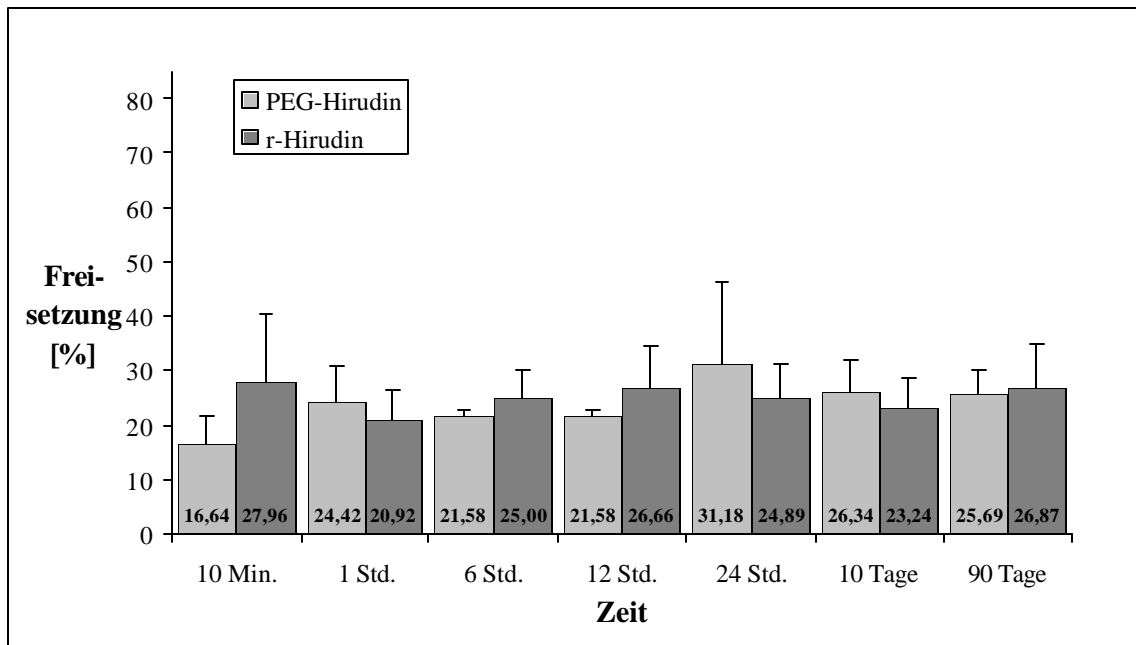


Abb. 3.2.2.2. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 1% Iloprost enthält

Dagegen bleiben der prozentuale Abbau von PEG- als auch von r-Hirudin bei sonst ebenfalls analogen Hirudin/Iloprost-Verhältnissen, allerdings mit einer niedrigen Ausgangskonzentration des Polylaktids R 203, während des gesamten Elutionszeitraumes konstant und pendeln sich jeweils bei einem Wert von 25% Freisetzung der Gesamtmenge ein. Offensichtlich bewegen sich die freigesetzten Hirudinnmengen aus der niedrigen Polylaktidkonzentration an der Nachweisgrenze und wurden mittels Ecarinzeitbestimmung nicht vollständig erfaßt.

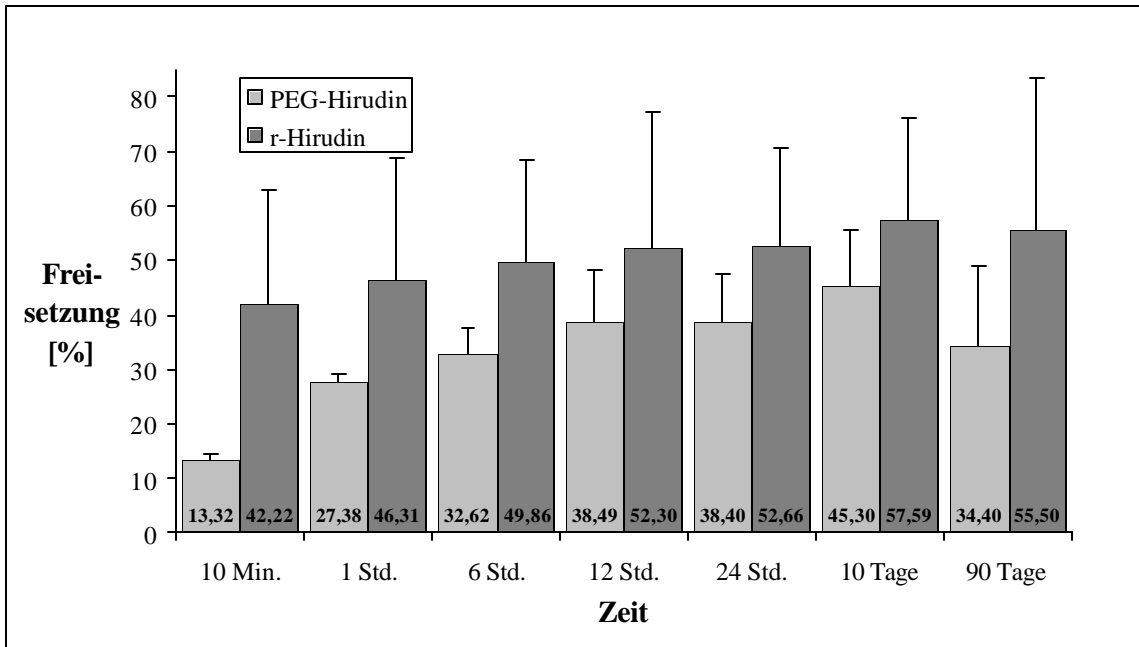


Abb. 3.2.2.3. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer hohen Poly-laktidkonzentration, die 5% Hirudin und 2% Iloprost enthält

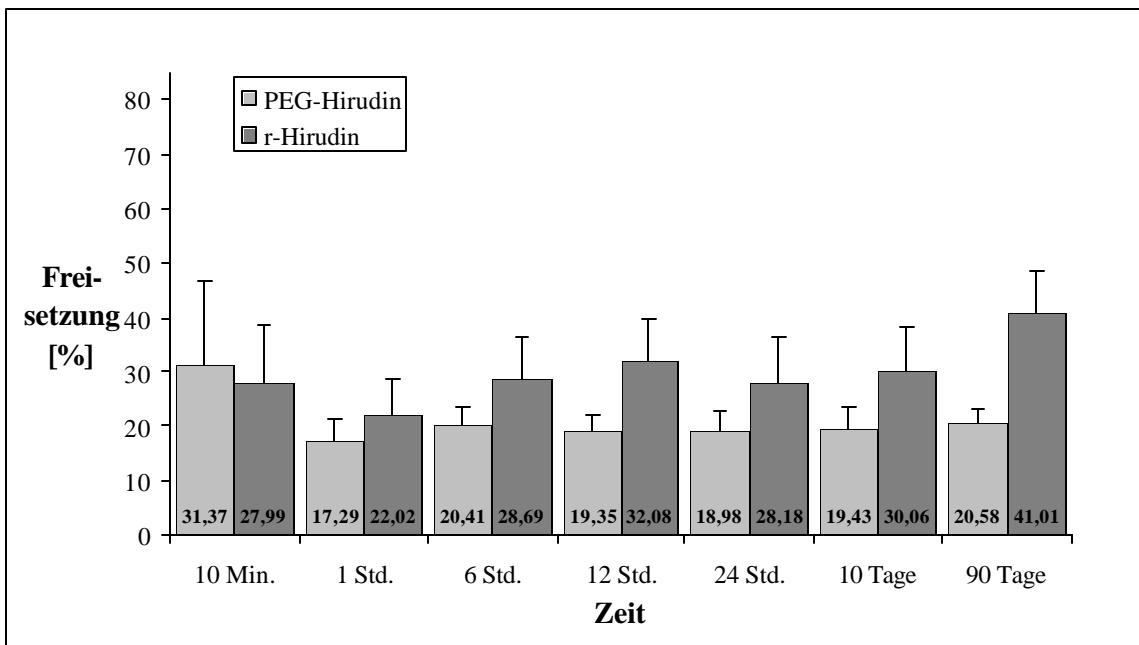


Abb. 3.2.2.4. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Poly-laktidkonzentration, die 5% Hirudin und 2% Iloprost enthält

Werden die Beschichtungen mit einer eingearbeiteten Konzentration von 2% Iloprost eluiert, so zeigt sich ein erstaunliches Resultat: unabhängig von der Konzentration der Arzneistoff-träger wird mehr r-Hirudin als PEG-Hirudin eluiert.

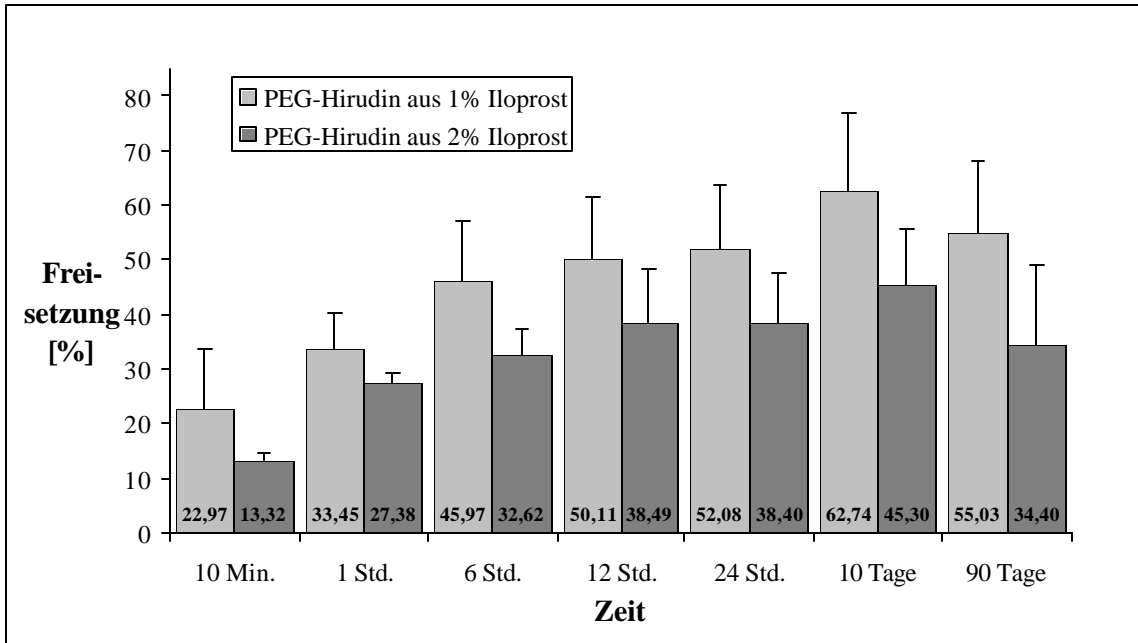


Abb. 3.2.2.5. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprost-konzentration aus einer Beschichtung mit einer hohen Polylaktid-konzentration, die 5% PEG-Hirudin enthält

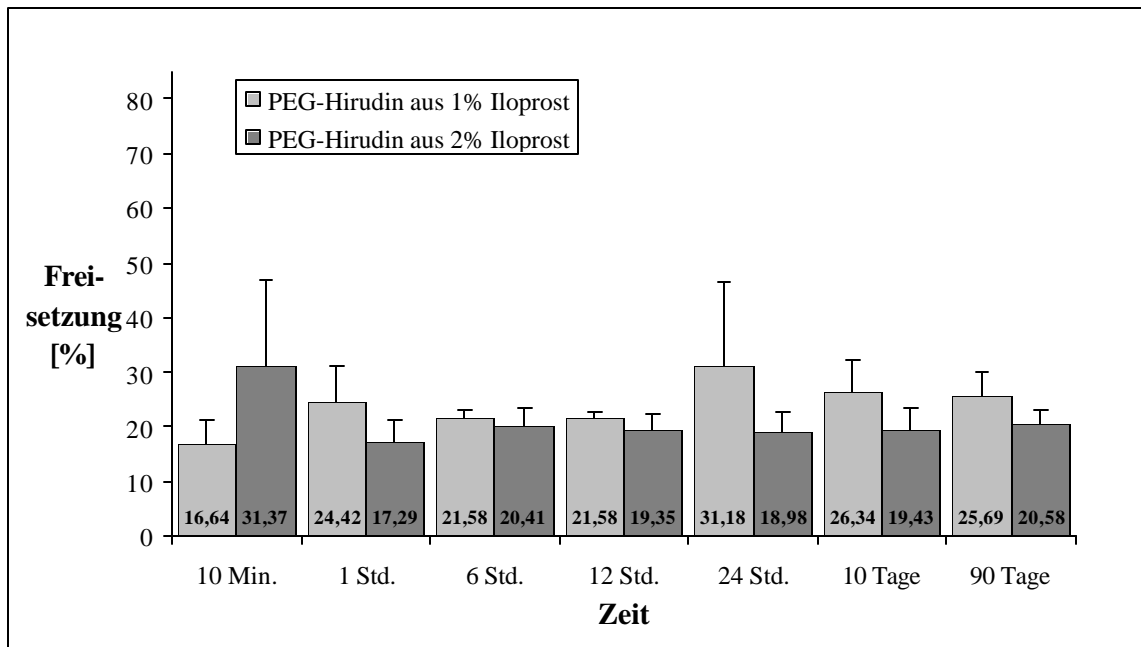


Abb. 3.2.2.6. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% PEG-Hirudin enthält

Bei Beschichtungen, die 5% PEG-Hirudin und einen variierenden Iloprostanteil (1% oder 2%) enthalten, verlaufen die gemessenen Elutionen für beide Beschichtungskonzentrationen annähernd parallel. Die Beschichtungen mit dem höheren Iloprostanteil zeigen ein im Mittel um 10-20% geringeres Freisetzungsverhalten als die entsprechenden Kombinationen mit nur 1% Iloprost. Die initiale Elution des eingearbeiteten Hirudins bis zu 50% bei 1% Iloprost bzw. 40% bei 2% Iloprost innerhalb der ersten 24 Stunden wird vor allem bei der höheren Polylaktidkonzentration deutlich sichtbar.

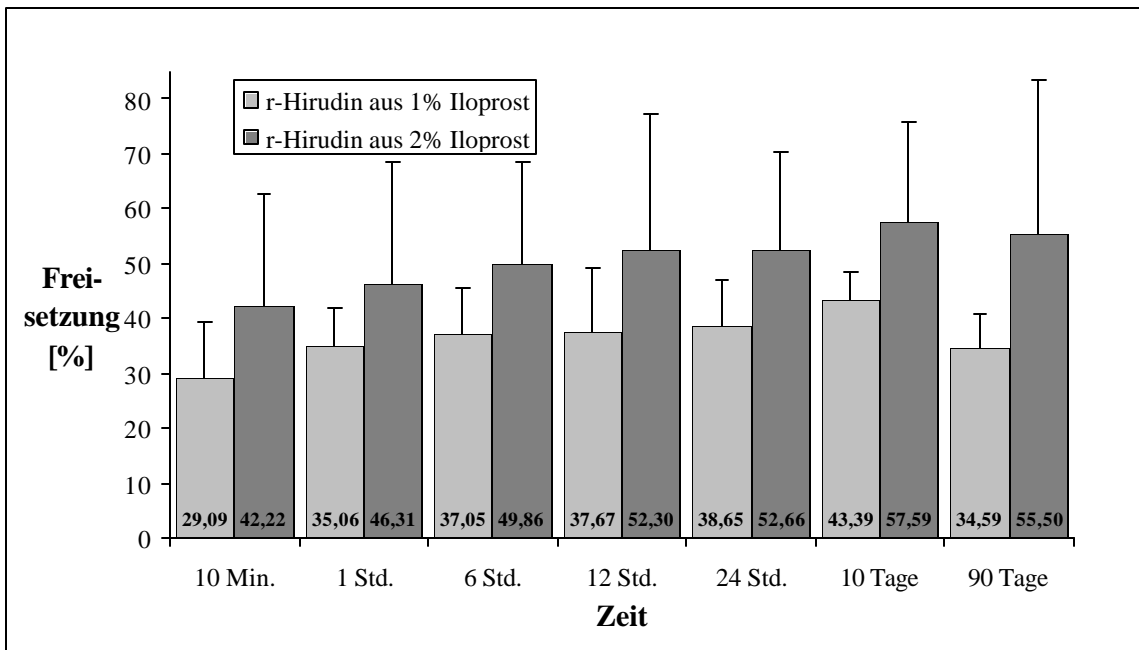


Abb. 3.2.2.7. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer hohen Polylaktidkonzentration, die 5% r-Hirudin enthält

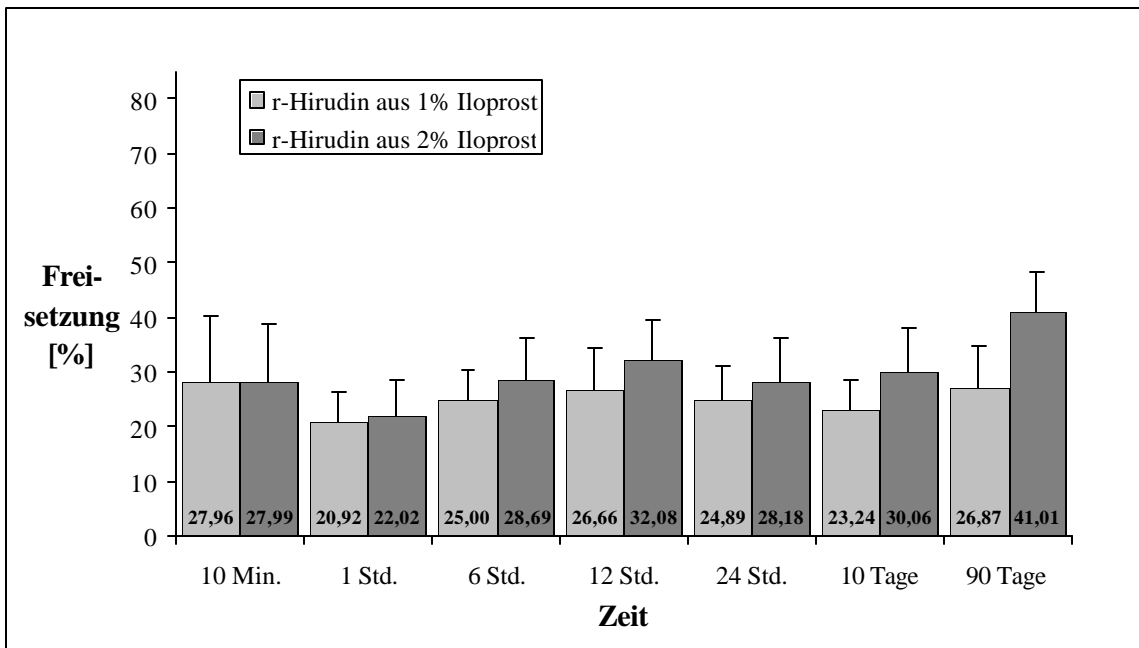


Abb. 3.2.2.8. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% r-Hirudin enthält

Nach Einarbeitung von 5% r-Hirudin in Beschichtungen, die 1% oder 2% Iloprost enthalten, zeigt sich ein genau umgekehrtes Verhalten: aus der Beschichtung mit dem höheren Iloprostanteil (2%) wird r-Hirudin im Durchschnitt um 10-20% vermehrt freigesetzt als aus einer entsprechenden Beschichtung mit nur 1% Iloprost. Es zeigt sich für r-Hirudin eine stetigere Freisetzung als im Vergleich zu den entsprechenden PEG-Hirudin-Kombinationen, der initiale Peak in der Freisetzung von r-Hirudin wurde mit der ersten Probenentnahme nach 10 Minuten nicht mehr erfaßt.

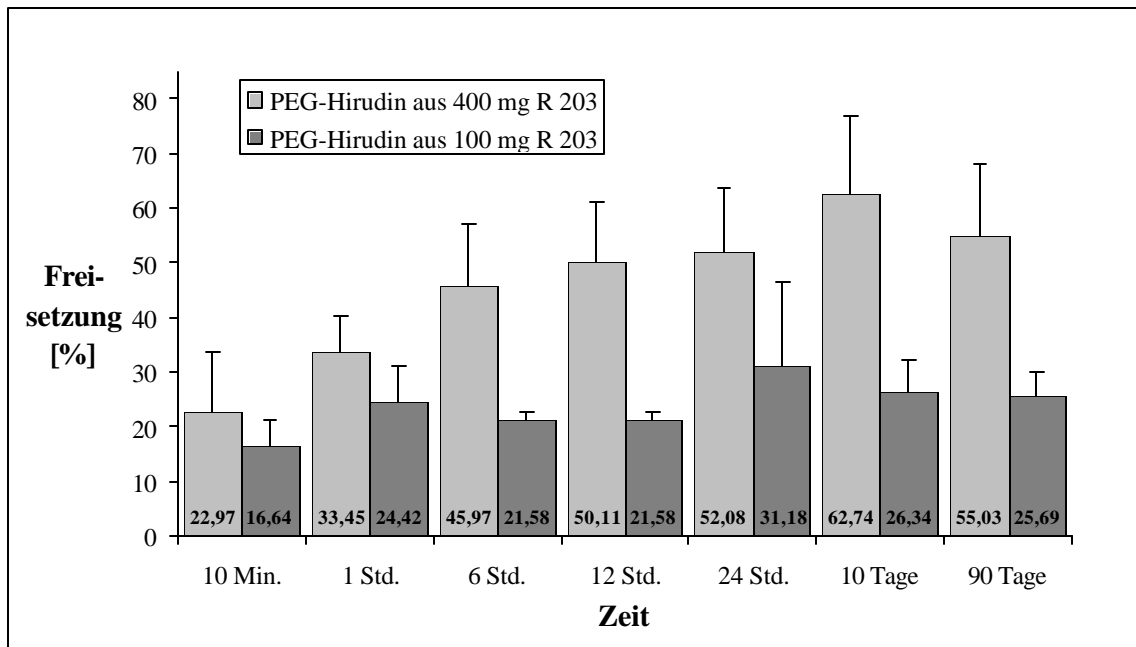


Abb. 3.2.2.9. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polyaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% PEG-Hirudin und 1% Iloprost enthält

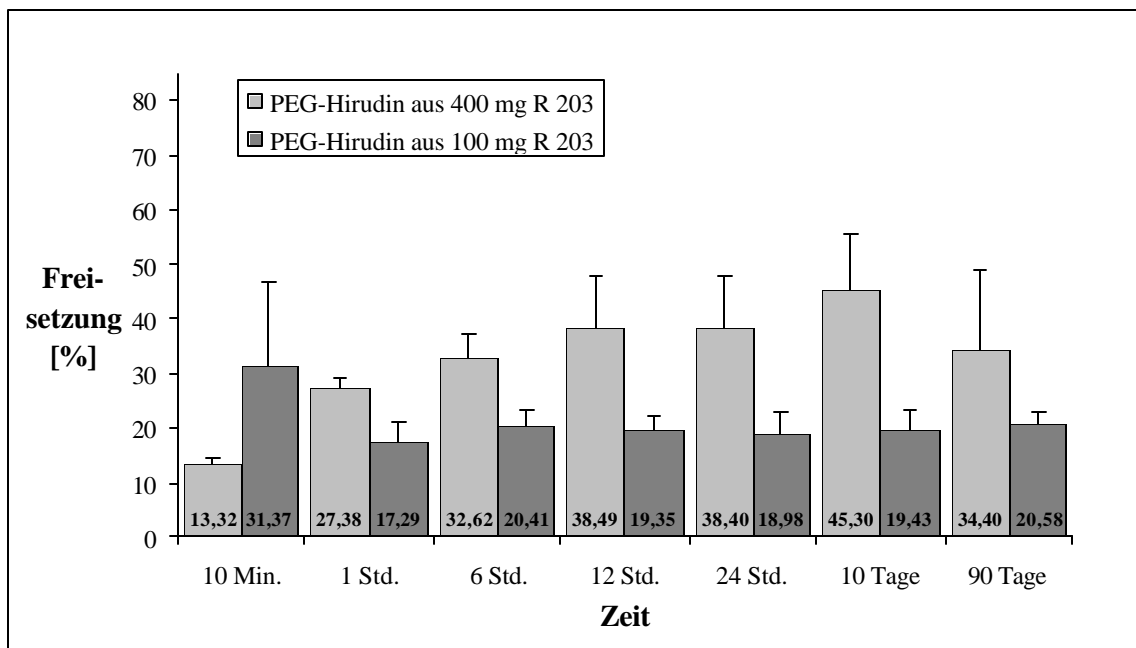


Abb. 3.2.2.10. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% PEG-Hirudin und 2% Iloprost enthält

Werden nun Beschichtungen mit 5% PEG-Hirudin, 1% Iloprost und einer hohen bzw. niedrigen Polylaktidkonzentration verglichen, so wird deutlich, daß von der höheren Polylaktidkonzentration innerhalb von 12 Stunden 50% des PEG-Hirudins freigesetzt werden. Ähnlich verhalten sich die entsprechenden Beschichtungen mit einem Iloprostanteil von 2%.

Bei der Quantifizierung der Beschichtungen mit geringer Polylaktidkonzentration hinsichtlich PEG-Hirudinfreisetzung muß leider festgestellt werden, daß die freigesetzten PEG-Hirudinemengen mit den uns zur Verfügung stehenden Meßverfahren nicht bestimmbar sind.

Es ist festzustellen, daß das eingearbeitete 5% PEG-Hirudin aus einer Beschichtung mit einem 2%igen Iloprostanteil bei vergleichbaren Polylaktidkonzentrationen weniger freigesetzt wird als bei den Beschichtungen, die 1% Iloprost enthalten.

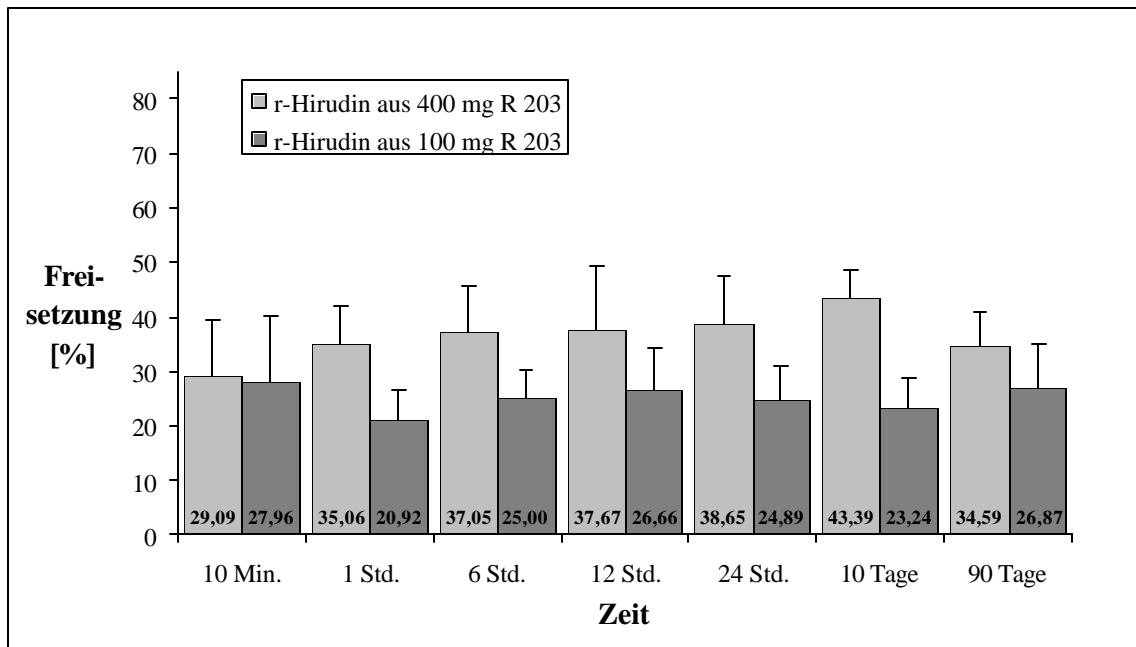


Abb. 3.2.2.11. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% r-Hirudin und 1% Iloprost enthält

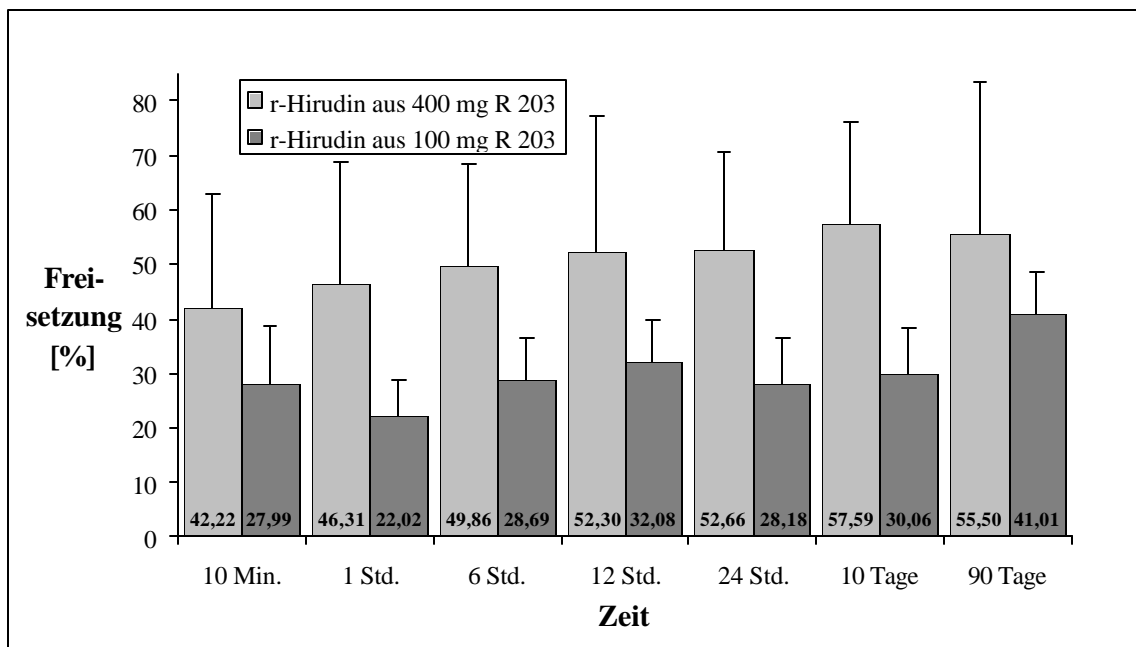


Abb. 3.2.2.12. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% r-Hirudin und 2% Iloprost enthält

Beschichtungen mit einer hohen bzw. niedrigen Polyaktidmenge verhalten sich hinsichtlich der r-Hirudinfreisetzung anders. Das prozentuale Elutionsverhalten ist bei eingearbeiteten 2% Iloprost um ca. 15-20% höher als bei der entsprechenden 1%igen Beschichtung. Bereits zur ersten Probenentnahme nach 10 Minuten werden etwa 30-40% der Gesamtmenge an r-Hirudin eluiert. Im weiteren Kurvenverlauf zeigt sich bis zum Ende des Elutionsversuches am 90. Tag ein stetiger, aber minimal ausgeprägter Anstieg der Freisetzung, so daß das Freisetzungsniveau in den r-Hirudinbeschichtungen stabil bleibt und über die Dauer des Versuches konstant gehalten werden kann.

Auch für r-Hirudin gilt bei Beschichtungen mit der niedrigen Polyaktidmenge, daß die von uns verwendete Meßmethode nicht in der Lage ist, die geringen tatsächlichen Hirudinkonzentrationen in den Elutionsproben zu bestimmen.

3.2.3. Freisetzung von Iloprost

Zur Bestimmung der Freisetzung von Iloprost wird anhand der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation eine Eichkurve erstellt und an dieser für jeden ermittelten Aggregationszeitpunkt die entsprechende Iloprostkonzentration abgelesen.

Es ist bekannt, daß das Prostaglandinderivat Iloprost bereits in sehr niedrigen Konzentrationen [ng/ml] hochwirksam ist. Mit den verwendeten GORE-TEX[®]-Gefäßprothesen bei einem Innendurchmesser von 4 mm haben wir trotz einer Länge von nur einem Zentimeter eine im Verhältnis relativ große Oberfläche und somit auch eine hohe Beschichtungsmasse erreicht. Die entsprechend eingearbeitete Iloprostmenge liegt somit im µg-Bereich. Aufgrund der enormen Schwankungen in den von uns hergestellten Verdünnungsreihen war es unmöglich, für die Elutionsproben pro Entnahmezeitpunkt einen einheitlichen Verdünnungsfaktor zu bestimmen. Folglich hätten wir für jede Probenentnahme den entsprechenden Verdünnungsfaktor experimentell bestimmen müssen. Da Aufwand und vor allem Verbrauch der Testreagenzien, insbesondere des plättchenreichen Plasmas, hierfür nicht tragbar waren, verzichteten wir auf die Bestimmung von Iloprost in den Eluat.

3.3. Adhäsion und Wachstum von Bakterien an Biomaterialien

Die mikrobiologischen Versuche wurden durchgeführt, um, wie unter 2.2. beschrieben, die Anhaftung und das Wachstum von *Staphylokokkus epidermidis* auf Biomaterialien mit verschiedenen beschichteten Oberflächen zu untersuchen. Hierbei ist nochmal hervorzuheben, daß im Abrollversuch, einem einfachen mikrobiologischen Abklatschpräparat, die Keime mittels ihrer Koloniebildung auf Agarplatten quantifiziert werden und deshalb nur lebensfähige Bakterien erfaßt werden können. Dagegen werden in dem Verfahren mit radioaktiv markierten Bakterien alle fest adhätierenden Keime, also lebende und bereits abgestorbene, indirekt anhand ihrer Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

Anzumerken ist zudem, daß sämtliche Beschichtungen, die in den mikrobiologischen Versuchen verwendet werden, auf einer hohen Polylaktidkonzentration, also 400 mg R 203/6 ml Chloroform, basieren.

3.3.1. Abrollversuch

		KBE/Agarplatte		
		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Einsaat (1 ml)		$0,70 \times 10^6$	$3,27 \times 10^6$	$2,63 \times 10^6$
Beschichtung	unbeschichtet	>> 700	>> 700	575 (550-600)
	R 203	450 (400-500)	583 (500-650)	390 (380-400)
	R 203 + 5% PEG-Hirudin + 1% Iloprost	140 (60-240)	295 (237-370)	190 (180-200)

Tab. 3.3.1.1. Anhaftung von lebenden *Staph. epidermidis* an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung (in Klammern wird jeweils der niedrigste und der höchste Wert angegeben)

Pro Versuch wurden jeweils zwei bis drei Stahlröhrchen mit der gleichen Beschichtung überzogen. Die Einsaatlösungen wurden jeden Tag neu hergestellt, so daß diese hinsichtlich

der Anzahl ihrer Bakterienkolonien enorme Schwankungen aufweisen. Folglich sind die gewachsenen Kolonienzahlen untereinander nur semiquantitativ zu vergleichen.

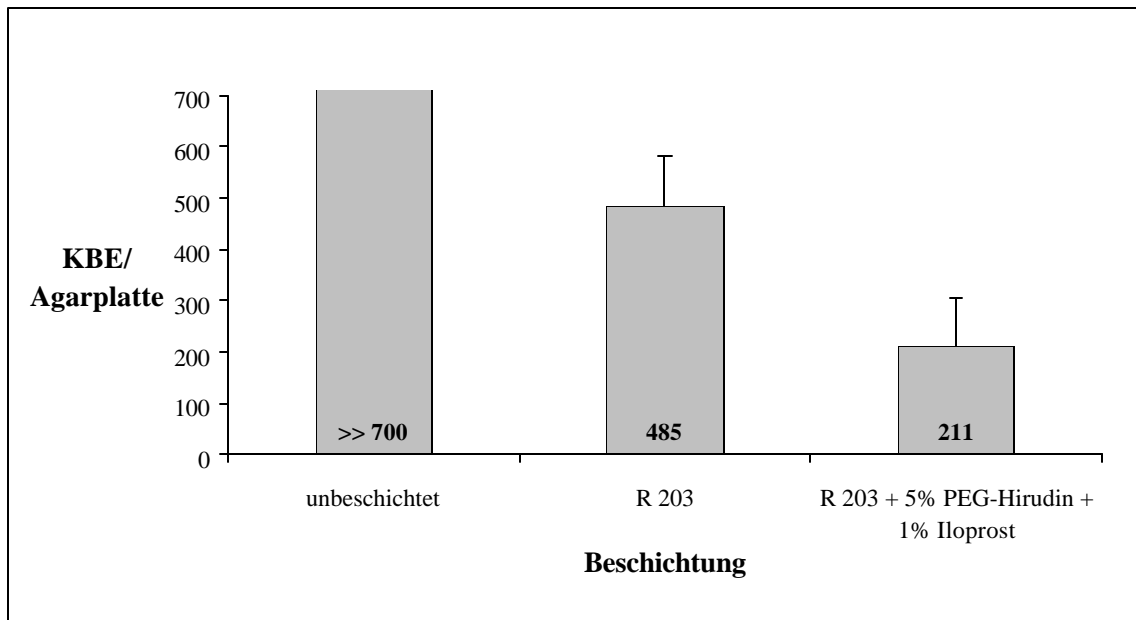


Abb. 3.3.1.1. Anhaftung von lebenden *Staph. epidermidis* an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung

Betrachtet man trotz der unterschiedlichen Einsaaten in den Abrollversuchen die Mittelwerte der jeweiligen Versuchstage untereinander, so wird dennoch ein eindeutiger Trend sichtbar. Die Beschichtung mit R 203 weist im Vergleich zu unbeschichteten Stahlröhrchen eine deutliche Reduktion der anhaftenden Staphylokokken auf. Weiter vermindert die Beschichtung bestehend aus R 203, 5% PEG-Hirudin und 1% Iloprost, verglichen mit der Adhäsion an ausschließlich mit R 203 beschichteten Stahlröhrchen, die adhärierende Keimzahl nochmal um etwa 50%.



Abb. 3.3.1.2. Agarplatten mit Staphylokokkus epidermidis aus dem Abrollversuch

3.3.2. Adhäsionsversuch mit radioaktiv markierten Bakterien

		1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch	4. Versuch
Einsaat (1 ml) [KBE/Agarplatte]		$16,47 \times 10^5$	$0,33 \times 10^5$	$3,70 \times 10^5$	$5,67 \times 10^5$
Beschichtung [cpm]	unbeschichtet	403 (472-334)	325 (257-379)	320 (217-501)	512 (337-813)
	R 203	197 (142-251)	336 (225-408)	551 (465-684)	388 (251-560)
	R 203 + 5% PEG- Hirudin + 1% Iloprost	35 (28-43)	124 (64-204)	44 (30-62)	60 (51-69)

Tab. 3.3.2.1. Anhaftung von ^3H -markierten Staph. epidermidis an Stahlröhrchen (n=2 bzw. 3) in Abhängigkeit von der Beschichtung (in Klammern wird jeweils der niedrigste und der höchste Wert angegeben)

Im Adhäsionsversuch mit radioaktiv markierten Bakterien wurde analog dem Abrollversuch die Einsaatlösung jeden Tag neu gezüchtet, so daß auch hier aufgrund der Schwankungen hinsichtlich der Anzahl der mit Tritium markierten Bakterienkolonien die resultierenden Ergebnisse semiquantitativ zu betrachten sind.

Um die adhärierenden Bakterien an Stahlröhrchen, deren Oberflächen mit verschiedenen Arzneistoffkombinationen beschichteten sind, untereinander besser vergleichen zu können, wurden die an unbeschichteten Materialien anhaftenden Bakterien gleich 100% gesetzt. Die Ergebnisse des 3. Versuchstages wurden bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt, da es sich hierbei offensichtlich um „Ausreißer“ handelt.

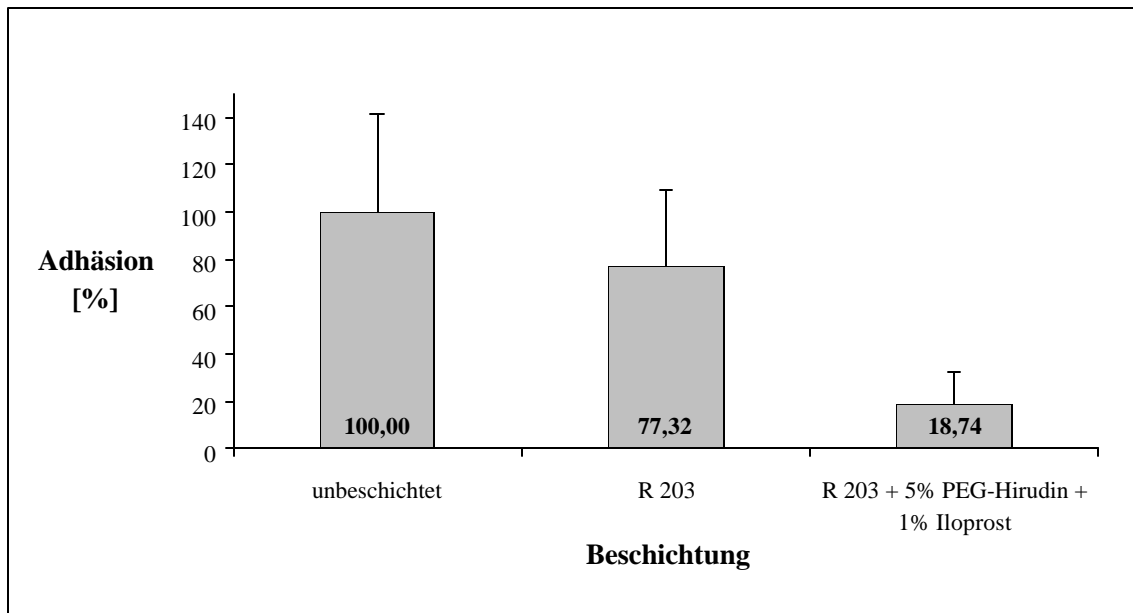


Abb. 3.3.2.1. Anhaftung von ³H-markierten Staph. epidermidis an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung

Die Beschichtung mit dem Polylaktid zeigt gegenüber der unbeschichteten Oberfläche eine um 22,68% reduzierte Bakterienadhäsion. Desweiteren vermindert die Kombination aus R 203, 5% PEG-Hirudin und 1% Iloprost um 81,26% deutlich die Anhaftung der Staphylokokken.

4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation hat sich eingehend mit der Freisetzung der in eine bestehende antithrombogene Beschichtung eingearbeiteten Arzneistoffe sowie der Degradierung des resorbierbaren Trägers beschäftigt. Außerdem sollten die gleichzeitig möglichen anti-infektiven Eigenschaften und Potentiale untersucht und quantifiziert werden.

Als Arzneistoffträger der Beschichtung diene hierfür das resorbierbare Poly-D,L-Laktid R 203, welches sich bereits in vorangegangenen Arbeiten bewährt hat (32, 87). Es zeigt hervorragende Biokompatibilität, und diese Stoffgruppen besitzen in Form von Naht- oder Osteosynthesematerial sowie auch als Arzneistoffträger ein breites, zwischenzeitlich etabliertes Anwendungsspektrum in der Medizin. Polylaktide hemmen die Adhäsion von Proteinen und gelten für den Organismus als nebenwirkungsarm und gut verträglich. Die Polymere werden hydrolytisch zu Milchsäure abgebaut und im Zitratzyklus vollständig metabolisiert, ohne toxische, anaphylaktische oder immunologische Reaktionen hervorzurufen (6, 39, 52).

Darin eingearbeitet wurden das Prostaglandinderivat Iloprost als Thrombozytenaggregationshemmer und die potenten Thrombinhemmer PEG- bzw. r-Hirudin, welche sich in dem organischen Lösungsmittel Chloroform als feine Suspension gleichmäßig verteilen bzw. lösen.

Anhand eines Elutionsmodells konnte das Freisetzungs- und Degradierungsverhalten der Medikamente und des Trägerstoffes in isotoner Kochsalzlösung untersucht werden. Die Elution erfolgte über 90 Tage bei Raumtemperatur unter lamina-air-flow-Bedingungen und kontinuierlicher Zirkulation der Proben auf einem Rütteltisch, um einen physiologischen Blutfluß zu simulieren.

Zur Bestimmung der degradierten Mengen des Polylaktids R 203 diene das Verfahren der inhärenten Viskosität, wobei sich der Arzneistoffträger über dem gesamten Untersuchungszeitraum als stabil erwies und keinerlei Abbauverhalten unterlag. Da in vorangegangenen Arbeiten (32, 87) mittels anderer Analytik, sonst aber unter analogen Versuchsbedingungen, bei einer Temperatur von 37°C nach 90 Tagen ein 10%iger Abbau von R 203 nachweisen ließ, ist der Zerfall des Polylaktids vermutlich temperaturabhängig.

Hirudin, dessen Freisetzung mittels einem gängigen gerinnungsanalytischen Verfahren, der Ecarinzeitbestimmung nach Nowak, bestimmt wurde, zeigte je nach verwendetem Derivat (PEG- bzw. r-Hirudin) und eingearbeiteter Iloprostmenge unterschiedliches Freisetzungsverhalten. Unabhängig von der Ausgangskonzentration des Arzneistoffträgers zeigten sich Beschichtungslösungen mit 1% Hirudin als zu gering, um in diesem Konzentrationsbereich mit unserer Analytik nachgewiesen werden zu können. Auch bei niedrigen Polyaktidkonzentrationen mit 5% Hirudin stellte sich dieses Problem: die freigesetzten Hirudinmengen bewegten sich offensichtlich an der Nachweisgrenze, wurden mittels Ecarinzeitbestimmung nicht vollständig erfaßt und waren folglich mit dieser Bestimmungsmethode nicht aussagekräftig.

Beschichtungen auf Basis einer hohen Polyaktidkonzentration mit eingearbeitetem 5% Hirudin und einem Iloprostanteil von 1% ergaben einen initialen Freisetzungsspeak von 50% PEG-Hirudin innerhalb der ersten 24 Stunden bzw. 35% r-Hirudin innerhalb der ersten Stunde. Die weitere Freisetzung erfolgte stetig bis zum Versuchsende nach 90 Tagen. Somit wurde PEG-Hirudin in Kombination mit 1% Iloprost schneller freigesetzt als r-Hirudin in entsprechenden Beschichtungen. Die Erklärung hierfür liegt in den Eigenschaften einer größeren Lipophilie durch die ausgekuppelte Polyethylenglycolgruppe: nach Kontakt mit Wasser ändert PEG seine Oberfläche, wird glatter und hydrophiler. Dieser Effekt ist umso deutlicher, je höher die Konzentration und das Molekulargewicht des verwendeten PEG sind (40). Folglich ist PEG-Hirudin hydrophiler als r-Hirudin und geht im Elutionsversuch schneller in die Elutionsflüssigkeit (isotone Kochsalzlösung) über.

Betrachtet man dagegen das Freisetzungsverhalten der Arzneistoffe aus den Beschichtungen bei einer hohen Polyaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 2% Iloprost enthielten, so zeigte sich bei PEG-Hirudin ein initialer Anstieg bis zu 38% Freisetzung innerhalb der ersten 12 Stunden. r-Hirudin ging dagegen so schnell in die Elutionsflüssigkeit über, daß die initiale Freisetzung mit der ersten Probenentnahme nach 10 Minuten nicht mehr erfaßt wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits über 40% des eingearbeiteten r-Hirudins eluiert. Die weitere Freisetzung erfolgte dann für beide Hirudinpräparate kontinuierlich. So waren bis 90 Tage nach Versuchsbeginn 34% PEG-Hirudin und 55% r-Hirudin in der Elutionsflüssigkeit nachweisbar.

Desweiteren ist bei der Freisetzung auch der lipophile Iloprostanteil zu berücksichtigen. Mit steigendem Iloprostanteil zeigte sich deutlich der Einfluß des Prostaglandinderivates auf das Freisetzungsverhalten der eingearbeiteten Hirudinpräparate. So wurde PEG-Hirudin in Kombination mit einem niedrigeren Iloprostanteil prozentual um 10-20% schneller eluiert als in Beschichtungen mit einem höheren Iloprostanteil; r-Hirudin verhielt sich dagegen umgekehrt und wurde in Kombination mit 1% Iloprost um 10-20% weniger freigesetzt als mit entsprechendem 2%igem Iloprostanteil.

Vermutlich tritt Iloprost als lipophile Substanz in höheren Konzentrationen in Wechselwirkung mit der PEG-Gruppe des Hirudins und inaktiviert auf diesem Weg die hydrophilen Eigenschaften von Hirudin als Protein. Dabei wird das Gesamtmolekül lipophiler und in isotoner Kochsalzlösung weniger eluiert. Offensichtlich besteht ein inverser Effekt zwischen Lipophilie und Hydrophilie. So konnte beim hydrophilen r-Hirudin gezeigt werden, daß mit steigendem Iloprostanteil eine bessere Verfügbarkeit in wässrigen Lösungen besteht.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, das Elutionsverhalten von Iloprost in den verschiedenen Konzentrationsanteilen zu kennen. In der vorliegenden Dissertation war die Analytik der Freisetzung von Iloprost in den Eluatn mittels kollageninduzierter Thrombozytenaggregation geplant, jedoch wurde aufgrund der bereits unter 3.2.3. geschilderten Problematik in Hinsicht auf den Aufwand und den enormen Verbrauch von Testreagenzien auf die Bestimmung der Iloprostfraktion verzichtet. In nachfolgenden Arbeiten könnte dieses Problem unter Verwendung geringerer Beschichtungsmassen umgangen werden, beispielsweise durch Beschichten von Koronarstents mit unterschiedlichen Iloprostkonzentrationen.

Eine weitere Aufgabe dieser Dissertation bestand in der Untersuchung der antiinfektiven Eigenschaften der von uns durchgeführten Beschichtungen. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß bereits Beschichtungen mit Polylaktid R 203 ohne Zugabe von Antikoagulanzen signifikant die Blutkompatibilität verbessern. Nach Einarbeitung von Hirudin und Iloprost konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Diese Ergebnisse lassen sich auf die antiinfektiven Eigenschaften übertragen, was die Resultate der vorliegenden Arbeit mit einfachen mikrobiologischen Abklatschpräparaten (Abrollversuch) belegen. Auch in weitergehenden radioaktiven Versuchen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die alleinige Beschichtung von Koronarstents mit dem Polylaktid R 203 zeigte bereits eine deutliche Reduzierung der Adhäsion von lebenden Staphylokokkenstämmen.

Auch diese Ergebnisse ließen sich im radioaktiven Versuchsaufbau weitgehend bestätigen. Da hierbei jedoch durch die mikrobizide Wirkung des Polylaktids bereits abgetötete Bakterien, die am beschichteten Implantat haften, mit erfaßt wurden, zeigte sich lediglich eine Abnahme der Bakterienadhäsion von 22,68%.

Die antiinfektiven Eigenschaften wurden nach Einarbeitung von Hirudin und Iloprost in den Polylaktidträger verstärkt. Bereits im Abrollversuch verminderte sich die Anzahl der auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien um gut 50% im Vergleich mit ausschließlich polylaktidbeschichteten Materialien. Auch durch Messung der Radioaktivität im β -Counter von tritiummarkierten Staphylokokken zeigte sich eine Verminderung der Bakterienadhäsion um gut 81% im Vergleich zu unbeschichteten Materialien.

Folglich stellt eine Beschichtung von Biomaterialien mit dem Polylaktid R 203 eine gute Möglichkeit dar, die Blutkompatibilität zu verbessern und gleichzeitig auch die Materialien mit antiinfektiven Eigenschaften zu versehen. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Oberflächenstruktur und der damit verminderten Thrombogenität und herabgesetzten Bakterienadhäsion erhält man bei einer Beschichtungskombination aus Hirudin und Iloprost auf der Basis des Arzneistoffträgers Polylaktid R 203.

Offensichtlich bewirkt diese Kombination aus hochwirksamen Arzneistoffen eine potente Hemmung der zur Aktivierung von zellulären und plasmaständigen Reaktionen führenden Mechanismen, insbesondere der Aktivierung von Thrombin. Thrombin, welches ohne Zweifel eine Schlüsselrolle bei der Entstehung eines Gerinnsels einnimmt, besitzt neben den bereits in der Einleitung beschriebenen Eigenschaften weitere zelluläre Effekte, die inflammatorische Prozesse induzieren, aber auch zur Regeneration bei Gefäßverletzungen führen können. Es übt mitogene Wirkung auf Fibroblasten und Makrophagen aus und ist für chemotaktische Prozesse verantwortlich (10). Außerdem fördert Thrombin die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie den „platelet-derived growth factor“ (PDGF), agiert als Stimulus für die Hyperproliferation der „smooth muscle cells“ an den Gefäßen und gilt damit als wesentlicher Induktor bei der Entstehung von Restenosen implantierter Stents bzw. der Intimahyperplasie an der Anastomose (6, 14, 30, 55, 97, 105).

Bedingt durch seine verschiedenen Oberflächenbereiche kann Thrombin mit jeweils sehr hoher Spezifität an einer Vielzahl von Wechselwirkungen bei der Thrombosenentstehung

agieren (10, 97). Gleichzeitig bieten diese multiplen Eigenschaften zahllose Angriffsmöglichkeiten der medikamentösen Interaktion, um einer durch medizinische Eingriffe wie beispielsweise der PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) oder durch Bioimplantate provozierten Gerinnungsaktivierung vorzubeugen. Mit den in unsere Beschichtungslösung eingearbeiteten Arzneistoffen und den jeweils unterschiedlichen Angriffspunkten dieser Medikamente im Gerinnungssystem ist dies hervorragend gelungen.

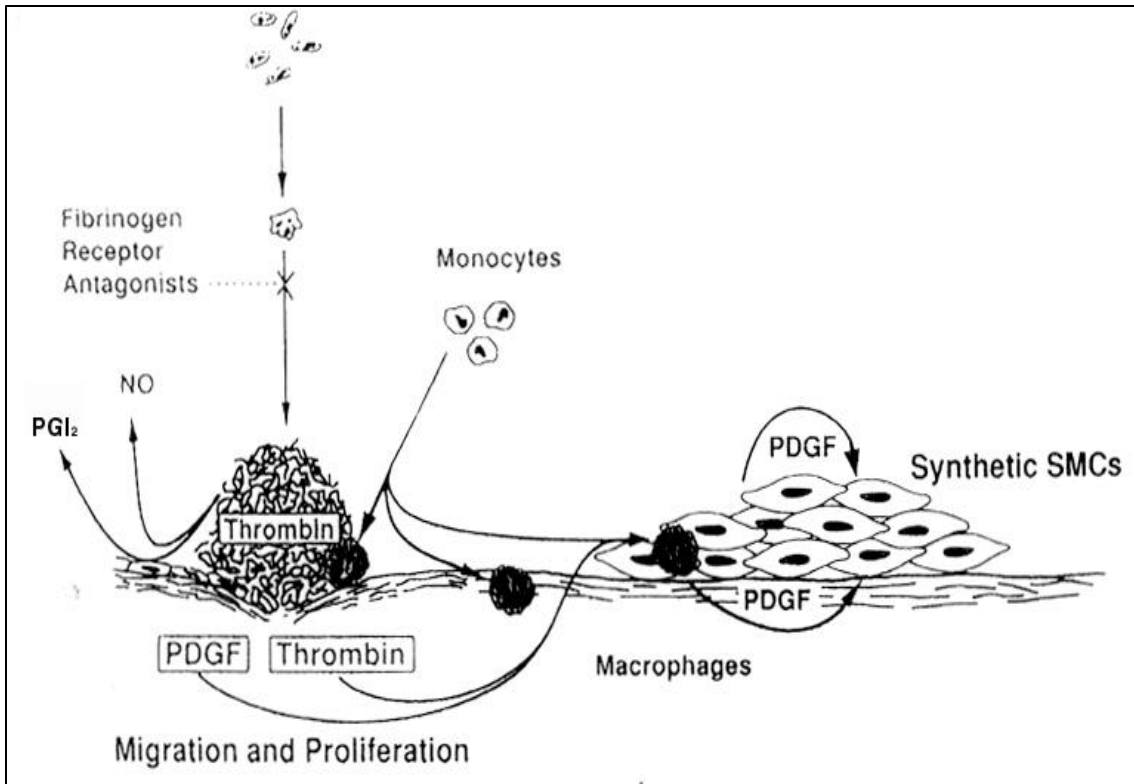


Abb. 4.1. Mechanismen der neointimalen Bildung nach Gefäßwandverletzung (43)

So wird durch die Inhibierung von Thrombin mittels Hirudin der positive Feedback-Mechanismus der Prothrombinaktivierung, der wiederum zu einer beschleunigten Bildung weiteren Thrombins führen würde, unterbrochen. Dies gilt auch für die thrombininduzierte Plättchenaggregation. Weiter werden amplifizierende Freisetzungsreaktionen je nach Wirkungsspiegel des Hirudins verlangsamt oder vollständig unterbunden. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem Heparin besteht darin, daß Hirudin in antithrombotisch wirksamer Dosierung den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren hemmt und auch bei Patienten mit Antithrombin III-Mangel, bei thrombozytären Defekten und vor allem bei Thrombozytopenie wirksam eingesetzt wird. Ein Nachteil der Anwendung dieses selektiven Thrombininhibitors

liegt allerdings in der fehlenden Antagonisierungsmöglichkeit, da derzeit noch kein wirksames Antidot gegen Hirudin bekannt ist. Außerdem kann Hirudin als schwaches Immunogen wirken und weist eine nur geringe therapeutische Breite auf (6, 36, 42, 44, 54, 64, 97).

Modellversuche belegen, daß besonders das gentechnologisch hergestellte Hirudin (rH) geeignet ist, thrombotische Gefäßverschlüsse zu verhindern. An arteriosklerotisch stenosierten Koronararterien kommt es häufig trotz Lumenerweiterung mittels PTCA durch noch vorhandene Plaques an der Gefäßwand zur lokalen Thrombinaktivierung. Thrombin in den Plaques kann durch Heparin nur schwer inhibiert werden, was zur weiteren Okklusion der Gefäße führen kann. Hirudin, welches gezielt lokal gebildetes Thrombin direkt hemmt, verhindert diesen Effekt. Desweiteren werden die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Plättchen, wie den PDGF, und somit die Hyperproliferation der „smooth muscle cells“ unterbunden, was die Restenose von Gefäßen erheblich reduziert bzw. verhindert (6, 15, 30, 44, 66, 97). Bei Patienten mit extrakorporaler Kreislaufzirkulation, wie z.B. bei Herzoperationen insbesondere durch extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO - extracorporeal membrane oxygenation) oder Hämodialyse, konnte eine reduzierte Gerinnung beobachtet werden, was neben der hohen Wirksamkeit und guten Verträglichkeit von rekombinantem Hirudin seine Anwendung befürwortet (64, 100).

Iloprost besitzt dagegen ein relativ breites Wirkprofil und ist bereits in minimalen Konzentrationen hochwirksam. Es unterbindet neben der Hemmung der Thrombozytenfunktionen u.a. die Freisetzung von PDGF und das Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen, verhindert die Leukozytenadhäsion und inhibiert durch bisher unbekannte Mechanismen die Adhäsion und Chemotaxis der Neutrophilen, was seine Anwendung gegenüber den Cyclooxygenasehemmern weit überlegen macht. Insbesondere in der Prävention und Therapie von durch Fremdmaterialien induzierten Stenosen bzw. Restenosen, deren Entstehung durch Verabreichung von Iloprost verhindert werden kann, wird die klinische Relevanz dieses Prostaglandinderivates in der modernen Medizin deutlich (28, 31, 75, 85, 88, 89, 104).

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt von Iloprost zeigt sich bei der Blutzirkulation im extrakorporalen Kreislauf: durch die Hemmung der vorwiegend durch Thrombin vermittelten Thrombozytenfunktionen können die Plättchen auch extrakorporal nicht an den verwendeten Kathetern oder Membranen aktiviert werden, Gerinnungsproteine adhären nicht und

bleiben inaktiviert, Gerinnungsfaktoren werden nicht verbraucht. Zusätzlich können aufgrund der gehemmten Leukozyteninteraktion keine inflammatorischen Reaktionen induziert werden, eine Aktivierung der Hämostase mit folgender Thrombusformation unterbleibt (13, 31, 53, 85, 88).

Durch das Prinzip des „local drug delivery“ war es möglich, auf den Biomaterialien mittels Freisetzung lokal hoher Arzneistoffkonzentrationen eine Imitation des körpereigenen Endothels zu bewirken, wobei durch die niedrigen systemischen Konzentrationen Nebenwirkungen der eingearbeiteten Medikamente ausblieben. Dabei konnte durch den synergistischen Effekt des selektiven Thrombininhibitors mit dem Prostaglandinderivat die Ablagerung von Blutbestandteilen und Keimen auf den künstlichen Oberflächen wirksam unterbunden werden. Weder zelluläre, noch plasmaständige Reaktionen, die in der Bildung eines Thrombus oder vorwiegend bei Koronarstents in der Bildung einer Restenose münden, konnten so getriggert oder ausgelöst werden.

Dies eröffnet ein erweitertes Anwendungsspektrum in der Medizin. Patienten mit Kurzzeitimplantaten, wie beispielsweise zentralvenösen Kathetern, kann mit diesem Verfahren eine systemische Antikoagulation erspart bleiben. Desweiteren können durch die gleichzeitig bestehende antiinfektive Wirkkomponente der Beschichtung septische Ereignisse reduziert bzw. verhindert werden. Somit wird die Komplikationsrate nach Implantation von Biomaterialien auf ein Minimum reduziert, was eine Anwendung insbesondere bei Implantaten mit lebenslanger Verweildauer im Organismus (Herzklappen, Stents, Gefäßprothesen etc.) befürwortet.

Die von uns gewählte Medikamentenkombination ist in der Lage, die mitogenen Eigenschaften der smooth muscle cells zu inhibieren. Hirudin wirkt direkt auf Thrombin und verhindert somit die Migration und Proliferation der smooth muscle cells. Gleiche Eigenschaften hat auch Iloprost als Antagonist von PDGF.

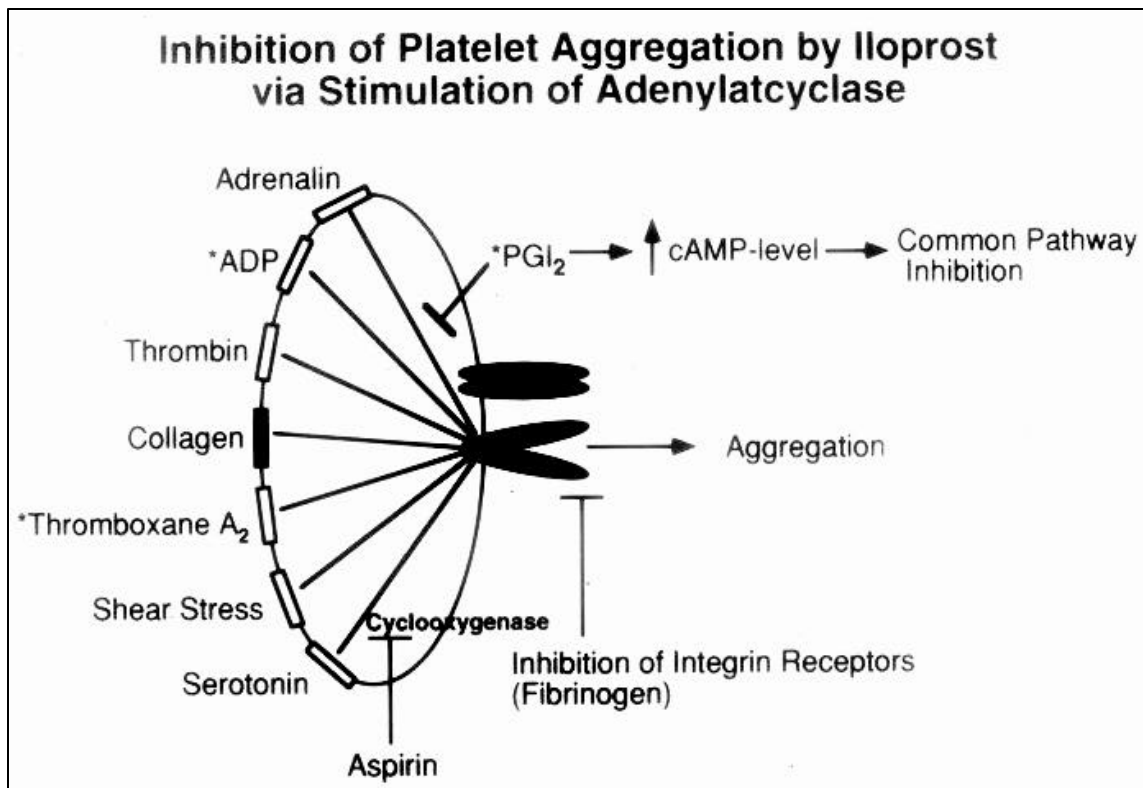


Abb. 4.2. Wirkung von Iloprost als „common pathway inhibitor“

Neuere Einsatzmöglichkeiten dieser Technologie liegen u.a. in der Einarbeitung von Antibiotika in Beschichtungen auf Osteosynthesematerial. Erste Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, daß dabei vor Ort postoperative Komplikationen in Form von Infektionen positiv beeinflusst werden können. Weiter werden durch Zusatz von Wachstumsfaktoren in die Beschichtung ossäre Funktionen verbessert, beispielsweise die Frakturheilung beschleunigt. Eine Anwendungsoption, die künftig insbesondere in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, der Orthopädie oder der Unfallchirurgie zu tragen kommen wird.

Folglich kann die Ausrüstung von Biomaterialien im Rahmen der antithrombogenen und antiinfektiven Beschichtung auch auf andere Materialien mit neuen Einsatzmöglichkeiten übertragen werden. Eine Zukunftsperspektive, die vermutlich schon in absehbarer Zeit in der Medizin einen revolutionären Einzug halten wird.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation wurde mit folgenden Aufgabenstellungen betraut:

zum einen sollten gängige Biomaterialien wie Gefäßprothesen auf der Basis von PTFE mit einer antithrombogenen Oberfläche ausgerüstet werden, um dann die Freisetzung von Antikoagulanzen und die Degradierung des resorbierbaren Polymilchsäureträgers zu bestimmen; desweiteren sollten die antiinfektiven Eigenschaften dieser antithrombogenen Beschichtung untersucht und quantifiziert werden.

Es wurden Gefäßprothesen mit dem Träger R 203 (niedermolekulares Polyaktid), Hirudin und Iloprost beschichtet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Verfügbarkeit der Arzneistoffe mittels eines Elutionsmodells und anschließenden gerinnungsanalytischen Untersuchungen gewonnen. Dabei erwies sich der resorbierbare Arzneistoffträger als stabil und unterlag über dem gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen keinerlei Abbauverhalten. Die Freisetzung von Hirudin aus der Beschichtung erfolgte konzentrations- und derivatabhängig (r-Hirudin / PEG-Hirudin) sowie je nach eingearbeitetem Anteil des lipophilen Prostaglandinderivates verschieden.

Hirudin aus 5%igen Beschichtungsmodifikationen auf Basis einer hohen Polyaktidkonzentration wurde mit einem initialen Peak freigesetzt. Die weitere Elution bis zum Versuchsende erfolgte kontinuierlich. Dabei wurde PEG-Hirudin in Kombination mit einem 1%igen Iloprostanteil schneller eluiert als r-Hirudin, wohingegen sich bei einer Beschichtungslösung mit einer Konzentration von 2% Iloprost ein umgekehrter Effekt zeigte: hier wurde r-Hirudin schneller freigesetzt als PEG-Hirudin. Auf die Bestimmung des Elutionsverhaltens von Iloprost mußte aufgrund analytischer Schwierigkeiten verzichtet werden, da die vorliegende Methode bei hohen Kosten nur semiquantitative Ergebnisse lieferte.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde mit mikrobiologischen Abklatschpräparaten und radioaktiven Markierungsversuchen die Anhaftung und das Wachstumsverhalten von *Staphylokokkus epidermidis* auf antithrombogen ausgerüsteten Oberflächen untersucht. Dabei reduzierte bereits eine Beschichtung mit dem resorbierbaren Arzneistoffträger die Adhäsion der Keime auf den Biomaterialien. Nach Zugabe von Hirudin und Iloprost konnte dieser Effekt deutlich verstärkt werden. Offensichtlich wird die Adhäsion der Bakterien durch die Oberflächenbeschaffenheit der Materialien und weiter durch die synergistische kontinuier-

liche Freisetzung der Arzneistoffe beeinflusst, wobei der dabei zu Grunde liegende Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden konnte.

Die Ausrüstung von Biomaterialien mit einer antithrombogenen Oberflächenbeschichtung stellt folglich einen effektiven und vielversprechenden Ansatz dar, die hämokompatiblen Eigenschaften der Implantate zu optimieren und somit eine Reduktion thrombembolischer Ereignisse zu erzielen. Gleichzeitig kann aufgrund bestehender antiinfektiver Eigenschaften der Beschichtung eine verminderte Keimadhäsion auf den Oberflächen der Biomaterialien erreicht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR (1993)
Effect of hirudin on platelet deposition to an artificial surface during low-stress shear flow of whole blood
Biomaterials 14: 865-870
2. Alt E, Seliger C (1998)
Antithrombotic stent coatings: hirudin/iloprost combination
Semin Intervent Cardiol 3: 177-183
3. An YH, Friedman RJ (1998)
Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces
J Biomed Mater Res 43: 338-348
4. Aronson D, Bloomgarden Z, Rayfield EJ (1996)
Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients
J Am Coll Cardiol 27: 528-535
5. Bach A (1995)
Prävention von Infektionen durch zentralvenöse Katheter mittels einer Antibiotika- oder Antiseptika-Beschichtung
Hyg Med 20: 191-204
6. Badimon L, Meyer BJ, Badimon JJ (1994)
Thrombin in arterial thrombosis
Haemostasis 24: 69-80
7. Bailey SR (1997)
Local drug delivery: current applications
Prog Cardiovasc Dis 40:183-204

8. Bailey SR (1996)
Mechanisms of delivery and local drug delivery technologies
Semin Intervent Cardiol 1: 17-23

9. Bode C, Nordt TK, Kübler W (1996)
Antikoagulation nach intrakoronarer Stentimplantation
Herz 21: 60-63

10. Bode W, Stubbs MT (1995)
Die Raumstruktur des Thrombins: ein Wegweiser zu seinen vielfältigen Funktionen
Hämostaseologie 15: 1-13

11. Bone RC (1992)
Modulators of coagulation – a critical appraisal of their role in sepsis
Arch Intern Med 152: 1381-1389

12. Born GVR (1962)
Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets
J Physiol 162: 67-68

13. Breddin HK (1996)
Prostacyclin und seine Analoga – Therapeutische Erfahrungen und neue Entwicklungen
In: Prostacyclin aktuell
Hrsg: Schering AG. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2

14. Buchwald AB, Hammerschmidt S, Stevens J, Göring J, Nebendahl K, Unterberg C (1996)
Inhibition of neointimal proliferation after coronary angioplasty by low -molecular-weight heparin (clivarine) and polyethyleneglycol-hirudin
J Cardiovasc Pharmacol 28: 481-487

15. Buchwald AB, Sandrock D, Unterberg C, Ebbecke M, Nebendahl K, Lüders S, Munz DL, Wiegand V (1993)
Platelet and fibrin deposition on coronary stents in minipigs: effect of hirudin versus heparin
J Am Coll Cardiol 21: 249-254

16. Buján J, García-Honduvilla N, Contreras L, Gimeno MJ, Escudero C, Bellón JM, San-Román J (1998)
Coating PTFE vascular prostheses with a fibroblastic matrix improves cell retention when subjected to blood flow
J Biomed Mater Res 39: 32-39
17. Callas D, Fareed J (1995)
Comparative pharmacology of site directed antithrombin agents. Implication in drug development
Thromb Haemost 74: 473-481
18. Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R (1994)
Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model
J Am Coll Cardiol 24: 1398-1405
19. Chang CC, Lieberman SM, Moghe PV (1999)
Leukocyte spreading behavior on vascular biomaterial surfaces: consequences of chemoattractant stimulation
Biomaterials 20: 273-281
20. Cheesbrough JS, Finch RG, Burden RP (1986)
A prospective study of the mechanisms of infection associated with hemodialysis catheters
J Infect Dis 154: 579-589
21. Coghlan A (1995)
Heart attacks are given the slip
New Scientist 148: 22
22. Collier BS (1997)
GPIIb/IIIa antagonists: pathophysiologic and therapeutic insights from studies of c7E3 Fab
Thromb Haemost 78: 730-735

23. Cumberland DC, Gunn J, Malik N, Holt CM (1998)
Biomimicry 1: PC
Semin Intervent Cardiol 3: 149-150
24. Darouiche RO (1999)
Prevention of vascular catheter-related infections
Neth J Med 55: 92-99
25. Darouiche RO, Raad II, Heard SO, Thornby JI, Wenker OC, Gabrielli A, Berg J, Khardori N, Hanna H, Hachem R, Harris RL, Mayhall G (1999)
A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters
N Engl J Med 340: 1-8
26. Dickinson GM, Bisno AL (1989)
Infections associated with indwelling devices:
concepts of pathogenesis; infections associated with intravascular devices
Antimicrob Agents Chemother 33: 597-601
27. DiTizio V, Ferguson GW, Mittelman MW, Khoury AE, Bruce AW, DiCosmo F (1998)
A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters
Biomaterials 19: 1877-1884
28. El-Gamal BAB, Pfliegler G, Crawford N (1992)
Effect of platelet encapsulated iloprost on platelet aggregation and adhesion to collagen
and injured blood vessels in vitro
Thromb Haemost 68: 606-614
29. Eloy R, Belleville J (1990)
Biomaterial-blood interactions
In: Concise encyclopedia of medical and dental materials
Eds: Williams D, Cahn RW, Bever MB. Oxford, New York, Beijing, Frankfurt,
São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: Pergamon Press, 74-85

30. Fenton JW (1995)
Thrombin functions and antithrombotic intervention
Thromb Haemost 74: 493-498
31. Fisher CA, Kappa JR, Sinha AK, Cottrell ED, Reiser HJ, Addonizio VP (1987)
Comparison of equimolar concentrations of iloprost, prostacyclin, and prostaglandin E₁
on human platelet function
J Lab Clin Med 109: 184-190
32. Förster C (1999)
Hämokompatible Biomaterialien durch eine biodegradierbare Arzneimittelbeschichtung
Dissertation an der Technischen Universität München
33. Franson TR, Sheth NK, Rose HD, Sohnle PG (1984)
Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters
J Clin Microbiol 20: 500-505
34. Friedrich P, Reininger AJ (1995)
Occlusive thrombus formation on indwelling catheters:
in vitro investigation and computational analysis
Thromb Haemost 73: 66-72
35. Frimerman A, Welch PJ, Jin X, Eigler N, Yei S, Forrester J, Honda H, Makkar R,
Barber J, Litvack F (1999)
Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme to proliferating cell nuclear antigen
reduces stent-induced stenosis in a porcine coronary model
Circulation 99: 697-703
36. Greinacher A, Janssens U, Berg G, Böck M, Kwasny H, Kemkes-Matthes B, Eichler P,
Völpel H, Pötzsch B, Luz M (1999)
Lepirudin (recombinant hirudin) for parenteral anticoagulation in patients with heparin-
induced thrombocytopenia
Circulation 100: 587-593

37. Cristina AG, Naylor PT (1996)
Implant-associated infection
In: Biomaterials science - an introduction to materials in medicine
Eds: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. San Diego, London, Boston,
New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 205-214
38. Guggenbichler JP, Böswald M, Lugauer S, Bechert T, Krall T (1998)
Infektionen von intravasalen Kathetern
Klinikerzt 7+8/27: 197-202
39. Hall JD, Rittgers SE, Schmidt SP (1994)
Effect of controlled local acetylsalicylic acid release on in vitro platelet adhesion to
vascular grafts
J Biomater Appl 8: 361-384
40. Han DK, Park KD, Hubbell JA, Kim YH (1998)
Surface characteristics and biocompatibility of lactide-based poly(ethylene glycol)
scaffolds for tissue engineering
J Biomater Sci Polymer Edn 9: 667-680
41. Hanson SR, Harker LA (1996)
Blood coagulation and blood-materials interactions
In: Biomaterials science - an introduction to materials in medicine
Eds: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. San Diego, London, Boston,
New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 193-199
42. Harker LA, Hanson SR, Kelly AB (1995)
Antithrombotic benefits and hemorrhagic risks of direct thrombin antagonists
Thromb Haemost 74: 464-472
43. Harker LA, Hanson SR, Kelly AB (1997)
Antithrombotic strategies targeting thrombin activities, thrombin receptors and
thrombin generation
Thromb Haemost 78: 736-741

44. Hauptmann J, Brüggener E, Markwardt F (1987)
Effect of heparin, hirudin, and a synthetic thrombin inhibitor on antithrombin III in thrombin-induced disseminated intravascular coagulation in rats
Haemostasis 17: 321-328
45. Hehrlein C, Gollan C, Dönges K, Metz J, Riessen R, Fehsenfeld P, von Hodenberg E, Kübler W (1995)
Low-dose radioactive endovascular stents prevent smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits
Circulation 92: 1570-1575
46. Herrmann R, Schmidmaier G, Märkl B, Resch A, Hähnel I, Stemberger A, Alt E (1999)
Antithrombogenic coating of stents using a biodegradable drug delivery technology
Thromb Haemost 82: 51-57
47. Holgers KM, Ljungh Å (1999)
Cell surface characteristics of microbiological isolates from human percutaneous titanium implants in the head and neck
Biomaterials 20: 1319-1326
48. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M (1995)
Rezidivstenose nach Koronarangioplastie
Z Kardiol 84: 5-21
49. Ishihara K, Iwasaki Y (1998)
Reduced protein adsorption on novel phospholipid polymers
J Biomater Appl 13: 111-127
50. Kaiser B, Paintz M, Noßmann S, Bacher P, Fareed J (1999)
A single daily administration of PEG-hirudin strongly reduces proliferation of vascular smooth muscle cells in vivo in the rat carotid artery
Ann Hematol 78: A36

51. Kitano T, Yutani Y, Shimazu A, Yano I, Ohashi H, Yamano Y (1996)
The role of physicochemical properties of biomaterials and bacterial cell adhesion
in vitro
Int J Artif Organs 19: 353-358

52. Kohn J, Langer R
Bioresorbable and bioerodible materials
In: Biomaterials science - an introduction to materials in medicine
Eds: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. San Diego, London, Boston,
New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 64-73

53. Korn RL, Fisher CA, Stenach N, Jeevanandam V, Addonizio VP (1993)
Iloprost reduces procoagulant activity in the extracorporeal circuit
J Surg Research 55: 433-440

54. Krakau I (1999)
Antithrombotische Therapie bei Koronarintervention
In: Das Herzkatheterbuch - diagnostische und interventionelle Kathetertechniken
Hrsg: Krakau I. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 299-304

55. Kritz H, Sinzinger H (1996)
Pharmacological prevention of myointimal hyperplasia (restenosis) following angioplasty
Gefäßchirurgie 1: 3-14

56. Küttler T (1995)
Spezielle Pharmakologie
Neckarsulm, Lübeck, Ulm: Jungjohann Verlag

57. Kuiper KJ, Robinson KA, Chronos NAF, Cui J, Palmer SJ, Nordrehaug JE (1998)
Phosphorylcholine-coated metallic stents in rabbit iliac and porcine coronary arteries
Scand Cardiovasc J 32: 261-268

58. Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, Hoopes TG, Farb A, Nott SH, Fischell RE, Fischell DR, Virmani R, Fischell TA (1996)
Inhibition of neointimal proliferation with low -dose irradiation from a β -particle-emitting stent
Circulation 93: 529-536
59. Laster J, Silver D (1988)
Heparin-coated catheters and heparin-induced thrombocytopenia
J Vasc Surg 7: 667-672
60. Lee LV (1995)
Initial experience with hirudin and streptokinase in acute myocardial infarction: results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 6 trial
Am J Cardiol 75: 7-13
61. Lersch C, Paschalidis M, Theiss W (1999)
Tiefe Venenthrombosen durch zentralvenöse Katheter
VASA 28: 71-78
62. Markou CP, Lutostansky EM, Ku DN, Hanson SR (1998)
A novel method for efficient drug delivery
Ann Biomed Eng 26: 502-511
63. Markovitz JH, Roubin GS, Parks JM (1995)
Platelet activation and restenosis following intracoronary stenting
In: Abstracts from the 68th scientific sessions
Circulation 93: A414
64. Markwardt F (1989)
Hirudin als Antikoagulans: ein Comeback
Die Gelben Hefte XXIX: 163-170

65. Mazur W, Ali NM, Raizner AE, French BA (1994)
Coronary restenosis and gene therapy
Tex Heart Inst J 21: 104-111

66. Meyer BJ, Fernández-Ortiz A, Mailhac A, Falk E, Badimon L, Michael AD, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ (1994)
Local delivery of r-hirudin by a double-balloon perfusion catheter prevents mural thrombosis and minimizes platelet deposition after angioplasty
Circulation 90: 2474-2480

67. Meyer H (1999)
Systeme zur anti-infektiösen Beschichtung von Biomaterialien
Dissertation an der Technischen Universität München

68. Milder F (1999)
Device-related nosocomial infection
Med Device Technol 10: 34-39

69. Muehrcke DD, McCarthy PM, Kottke-Marchant K, Harasaki H, Pierre-Yared J, Borsh JA, Ogella DA, Cosgrove DM (1996)
Biocompatibility of heparin-coated extracorporeal bypass circuits:
a randomized, masked clinical trial
J Thorac Cardiovasc Surg 112: 472-483

70. Mulvihill JN, Davies JA, Toti F, Freyssinet JM, Cazenave JP (1989)
Thrombin stimulated platelet accumulation on protein coated glass capillaries:
role of adhesive platelet α -granule proteins
Thromb Haemost 62: 989-995

71. Neu TR, Marshall KC (1990)
Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces
J Biomater Appl 5: 107-133

72. Park KD, Kim YS, Han DK, Kim YH, Lee EHB, Suh H, Choi KS (1998)
Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces
Biomaterials 19: 851-859
73. Pavesio A, Renier D, Cassinelli C, Morra M (1997)
Anti-adhesive surfaces through hyaluronan coatings
Med Device Technol 8: 20-27
74. Peters G (1998)
Adherence and proliferation of bacteria on artificial surfaces
In: Perspectives in antiinfective therapy
Eds: Jackson G, Schlumberger HD, Zeiler H. Wiesbaden: F. Vieweg & Sohn, 329-338
75. Pfliegler G, El-Gamal B, Badimon JJ, Badimon L, Crawford N (1994)
Inhibition of platelet recruitment to arterial lesions by predeposition of platelets containing encapsulated iloprost
Thromb Haemost 72: 604-610
76. Preissner KT, Müller-Berghaus G (1986)
Molekulare Wechselwirkungen zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolysesystem
Hämostasologie 6: 67-81
77. Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G (1998)
Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy
Proc Natl Acad Sci USA 95: 11059-11064
78. Reuter HD (1998)
Grundlagen und Praxis der Thrombozytenfunktionsdiagnostik
Köln: Science Data Supply

79. Rollason G, Sefton MV (1992)
Measurement of the rate of thrombin production in human plasma in contact with different materials
J Biomed Mater Res 26: 675-693
80. Rubens FD, Weitz JI, Brash JL, Kinlough-Rathbone RL (1993)
The effect of antithrombin III-independent thrombin inhibitors and heparin on fibrin accretion onto fibrin-coated polyethylene
Thromb Haemost 69: 130-134
81. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D (1999)
Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of staphylococcus epidermidis in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model
Infect Immun 67: 2627-2632
82. Sawa H, Vinogradsky B, Guala A, Fujii S (1995)
Genetically engineered endothelial cells:
increased surface fibrinolysis and potential adaptation to endovascular stenting
In: Abstracts from the 68th scientific sessions
Circulation 93: A2564
83. De Scheerder I, Verbeken E, Van Humbeeck J (1998)
Metallic surface modification
Semin Intervent Cardiol 3: 139-144
84. De Scheerder IK, Wang K, Wilczek KL, Meuleman D, Piessens JH (1995)
Heparin coating of metallic coronary stents decrease their thrombogenicity but does not decrease neointimal hyperplasia
In: Abstracts from the 68th scientific sessions
Circulation 93: A2563

85. Schenk JF (1996)
Iloprost: Rückblick, Status quo, und Ausblick
In: Prostacyclin aktuell
Hrsg: Schering AG. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 3-6
86. Schierholz JM, Rump AFE, Pulverer G, Beuth J (1998)
Anti-infective catheters: novel strategies to prevent nosocomial infections in oncology
Anticancer Res; 18: 3629-3638
87. Schmidmaier G (1999)
Entwicklung einer antithrombogenen Beschichtung von Biomaterialien
Dissertation an der Technischen Universität München
88. Schrör K (1996)
Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Prostacyclin und seinen Analoga
In: Prostacyclin aktuell
Hrsg: Schering AG. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 11-12
89. Schrör K (1997)
Prostacyclin (prostaglandin I₂) and atherosclerosis
In: The endothelium in clinical practice – source and target of novel therapies
Eds: Rubanyi GM, Dzau VJ. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 1-44
90. Scott NA, Nunes GL, King 3rd SB, Harker LA, Hanson SR (1994)
Local delivery of an antithrombin inhibits platelet-dependent thrombosis
Circulation 90: 1951-1955
91. Sefton MV (1990)
Heparinized materials
In: Concise encyclopedia of medical and dental materials
Eds: Williams D, Cahn RW, Bever MB. Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo: Pergamon Press Toronto, 219-221

92. Shepard AD, Gelfand JA, Callow AD, O'Donnell TF (1984)
Complement activation by synthetic vascular prostheses
J Vasc Surg 1: 829-838

93. Shiba E, Lindon JN, Kushner L, Matsueda GR, Hawiger J, Kloczewiak M, Kudryk B, Salzman EW (1991)
Antibody-detectable changes in fibrinogen adsorption affecting platelet activation on polymer surfaces
Am J Physiol 260: C965-C974

94. Spilezewski KL, Anderson JM, Schaap RN, Solomon DD (1988)
In vivo biocompatibility of catheter materials
Biomaterials 9: 253-256

95. Stemberger A, Schmidmaier G, Förster C, Alt E, Kohn J, Calatzis A (1997)
New antithrombin agents: potential for coating biomaterials used in cardiopulmonary bypass
In: New anticoagulants for the cardiovascular patient
Ed: Pifarré R. Philadelphia: Hanleys & Belfus Med. Pub, 377-386

96. Topol EJ, Fuster V, Harrington RA, Califf RM, Kleiman NS, Kereiakes DJ, Cohen M, Chapekis A, Gold HK, Tannenbaum MA, Rao AK, Debowey D, Schwartz D, Henis M, Chesebro J (1994)
Recombinant hirudin for unstable angina pectoris
Circulation 89: 1557-1566

97. Turpie AGG, Weitz JI, Hirsh J (1995)
Advances in antithrombotic therapy: novel agents
Thromb Haemost 74: 565-571

98. Vaudaux P, Yasuda H, Velazco MI, Huggler E, Ratti I, Waldvogel FA, Lew DP, Proctor RA (1990)
Role of host and bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces
J Biomater Appl 5: 134-153
99. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Palmer SJ, Wang C, Cipolla GD, King 3rd SB (1995)
Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries
Circulation 92: 1383-1386
100. Webb AR, Mythen MG, Jacobson D, Mackie IJ (1995)
Maintaining blood flow in the extracorporeal circuit: haemostasis and anticoagulation
Intensive Care Med 21: 84-93
101. Weiss C, Jelkmann W (1993)
Blut und Blutkreislauf
In: Physiologie des Menschen
Hrsg: Schmidt RF, Thews G. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag, 421-460
102. White BP, Sullivan AT, Lumley P (1994)
Prevention of intra-coronary thrombosis in the anaesthetised dog:
the importance of thromboxane A₂ and thrombin
Thromb Haemost 71: 366-374
103. Zoldhelyi P, Webster MWI, Fuster V, Grill DE, Gaspar D, Edwards SJ, Cabot CF, Chesebro JH (1993)
Recombinant hirudin in patients with chronic, stable coronary artery disease
Circulation 88: 2015-2022

104. Zucker TP, Bönisch D, Hasse A, Grosser T, Weber AA, Schrör K (1998)
Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of
prostaglandin E₁ in coronary artery smooth muscle cells
Eur J Pharmacol 345: 213-220
105. Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber AA, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K (1998)
Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated
by thromboxane A₂ and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA
Circulation 97: 589-595
106. Zwaal RFA, Hemker HC (1982)
Blood cell membranes and haemostasis
Haemostasis 11: 12-39

7. Abbildungen und Tabellen

	Seite
Abb. 1.1. Interaktion zellulärer und plasmaständiger Blutkomponenten mit Biomaterialien.....	2
Abb. 1.2. Entstehung eines Thrombus (43)	3
Abb. 1.3. Schemata zur Inhibierung von Faktor Xa und Thrombin	4
Abb. 1.4. Schema zur Interaktion bei Thrombozytenaktivierung.....	6
Abb. 2.1. Kollageninduzierte Aggregation von Thrombozyten in Abhängigkeit von der Iloprostkonzentration [ng/ml]	21
Abb. 3.1.1. Gewichtszunahme von 1 cm langen GORE-TEX [®] -Gefäßprothesen (Ø 4 mm), beschichtet mit einer hohen Polylaktidkonzentration.....	22
Abb. 3.1.2. Gewichtszunahme von 1 cm langen GORE-TEX [®] -Gefäßprothesen (Ø 4 mm), beschichtet mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration.....	23
Abb. 3.2.2.1. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer hohen Polylaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 1% Iloprost enthält	25
Abb. 3.2.2.2. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 1% Iloprost enthält	26
Abb. 3.2.2.3. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer hohen Polylaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 2% Iloprost enthält	27
Abb. 3.2.2.4. Freisetzung von Hirudin aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% Hirudin und 2% Iloprost enthält	27
Abb. 3.2.2.5. Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer hohen Polylaktidkonzentration, die 5% PEG-Hirudin enthält	28

Abb. 3.2.2.6.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% PEG-Hirudin enthält	29
Abb. 3.2.2.7.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer hohen Polylaktidkonzentration, die 5% r-Hirudin enthält	30
Abb. 3.2.2.8.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Iloprostkonzentration aus einer Beschichtung mit einer niedrigen Polylaktidkonzentration, die 5% r-Hirudin enthält	30
Abb. 3.2.2.9.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% PEG-Hirudin und 1% Iloprost enthält	31
Abb. 3.2.2.10.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% PEG-Hirudin und 2% Iloprost enthält	32
Abb. 3.2.2.11.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% r-Hirudin und 1% Iloprost enthält	33
Abb. 3.2.2.12.	Freisetzung von Hirudin in Abhängigkeit von der eingearbeiteten Polylaktidkonzentration aus einer Beschichtung, die 5% r-Hirudin und 2% Iloprost enthält	33
Abb. 3.3.1.1.	Anhaftung von lebenden Staph. epidermidis an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung.....	37
Abb. 3.3.1.2.	Agarplatten mit Staphylokokkus epidermidis aus dem Abrollversuch.....	38
Abb. 3.3.2.1.	Anhaftung von ³ H-markierten Staph. epidermidis an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung.....	39

Abb. 4.1.	Mechanismen der neointimalen Bildung nach Gefäßwandverletzung (43).....	44
Abb. 4.2.	Wirkung von Iloprost als „common pathway inhibitor“.....	47
Tab. 3.3.1.1.	Anhaftung von lebenden Staph. epidermidis an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung.....	36
Tab. 3.3.2.1.	Anhaftung von ³ H-markierten Staph. epidermidis an Stahlröhrchen in Abhängigkeit von der Beschichtung.....	38

8. Danksagung

Danken möchte ich dem Direktor des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München,

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher,

unter dessen Leitung ich meine wissenschaftlichen Arbeiten durchführen durfte.

Mein Respekt und ganz herzlicher Dank gilt

Herrn apl. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Axel W. Stemberger

vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, der mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Arbeit hervorragend betreute und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, so daß eine zügige und reibungslose Fertigstellung dieser Arbeit gewährleistet war.

Desweiteren gilt mein Dank folgenden Personen:

Frau apl. Prof. Dr. Silvia Haas,

Frau Prof. Dr. Dana Milatovic,

Herrn Prof. Dr. med. Job Harenberg,

Herrn Dr. Harald Liedtke,

Herrn Dr. Gerhard Schmidmaier

sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Onkologie, des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und der Klinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München.

Auch für die Unterstützung und ausnahmslose Geduld seitens meiner Familie und meiner Freunde während der letzten Jahre möchte ich mich auf diesem Wege herzlichst bedanken.

Siegrun Mebus