

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie  
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des  
Universitätsklinikums Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Kühnl

IN VITRO BIOKOMPATIBILITÄTSANALYSEN INTRAKORONARER STENTS  
MIT "DIAMOND-LIKE-CARBON" - BESCHICHTUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der  
Universität Hamburg vorgelegt

von  
Nick Spindler  
aus Frankfurt/ Main

Hamburg 2007

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 09. Februar 2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg am:

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: PD Dr. med. K. Gutensohn

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Kühnl

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. med. R. Köster

**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis:

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	9
1.1 Ziele der Arbeit	10
1.2 Durchflußzytometrie	11
1.2.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie	11
1.2.2 Monoklonale Antikörper	14
1.2.3 Fluorochrome	14
1.3 Thrombozyten	16
1.3.1 Morphologie und deren Änderung durch Aktivierung	16
1.3.2 Primärhämostase	17
1.3.3 Thrombusformation	19
1.3.4 Antigene von Thrombozyten	20
1.3.4.1 Glykoprotein IIb-IIIa	20
1.3.4.2 Glykoprotein Ib-V-IX	21
1.3.4.3 CD62p (P-Selektin, GMP-140)	21
1.3.4.4 CD63 (GP53)	22
1.4 Analyseverfahren	22
1.4.1 Zellkultur	22
1.4.2 Videomorphometrie	23
1.4.3 Rasterelektronenmikroskopie ( <i>scanning electron microscopy</i> )	24
1.4.4 Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse ( <i>energy dispersive x-ray analysis</i> )	24
1.4.5 Atomabsorptionsmassenspektrometrie ( <i>atomic absorption spectrometry</i> )	26

1.4.6	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie ( <i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i> )	28
1.5	Interventionelle Kardiologie	29
1.5.1	Percutane transluminale Koronarangioplastie	29
1.5.2	Stent-Implantation	31
2	MATERIAL UND METHODEN	34
2.1	Spenderpopulation	34
2.2	Blutentnahme, Vorbereitung und Plasmapherese des plättchenreichen Plasmas (PRP)	34
2.3	Das <i>in vitro</i> -Modell	35
2.4	Durchflußzytometrische Analyse	36
2.5	Zellkultur	38
2.5.1	Untersuchung des Wachstums von glatten Muskelzellen	38
2.5.2	Kulturen mit Endothelzellen	39
2.6	Videomorphometrie	40
2.7	Rasterelektronenmikroskopie ( <i>scanning electron microscopy</i> )	41
2.8	Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse ( <i>energy dispersive x-ray analysis</i> )	41
2.9	Atomabsorptionsmassenspektrometrie ( <i>atomic absorption spectrometry</i> )	42
2.10	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie ( <i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i> )	44
2.11	<i>Diamond-like carbon</i> beschichtete intrakoronare Stents	45
2.12	Statistik	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Durchflußzytometrie und Lichtmikroskopie	46

3.2	Zellkultur: von glatten Muskelzellen und Endothelzellen	49
3.3	Videomorphometrie	50
3.4	Rasterelektronenmikroskopie ( <i>scanning electron microscopy</i> )	50
3.5	Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse ( <i>energy dispersive x-ray analysis</i> )	52
3.6	Atomabsorptionsmassenspektrometrie ( <i>atomic absorption spectrometry</i> )	52
3.7	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie ( <i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i> )	53
4	DISKUSSION	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	DANKSAGUNG	72
8	ANHANG	73
8.1	Übersicht der Abbildungen	73
8.2	Übersicht der Tabellen	74
9	LEBENS LAUF	75
10	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	76

## Abkürzungsverzeichnis

Atm	Atmosphären
AAS	<i>Atomic adsorption spectrometry</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAPI	Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DLC	<i>Diamond-like carbon</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s modified Eagels Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	<i>Energy dispersive X-ray analysis</i>
ELAM	<i>Endothelia-leukocyte adhesion molecule</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>Human embryonal kidney cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IgG	Immunglobulin der G-Klasse
LAMP	saure Hydrolase
mAK	monoklonale Antikörper
MCFI	<i>Mean channel fluorescence intensity</i>
MGG	May-Grünwald-Giemsa Färbung
ML	Myeloblast
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert

Pa	Pascal
PBS	Phosphatpuffer
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PE-CY5	Phycoerythrin-Cyanine 5
PMN	Polymorphnuclear neutrophils
PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
PPP	<i>Platelet poor plasma</i>
PPT	Parts per trillion
PRP	<i>Platelet rich plasma</i>
PTCA	Percutan transluminal coronary angioplasty
PVC	Polyvinylchlorid
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RGD	Arginin, Glycin, Glutamat Sequenz in der $\gamma$ -Kette des Fibrinogens
SCCS	<i>Surface-connected canalicular system</i>
SD	Standard deviation
SE	Sekundärelektronen
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SMC	<i>Smooth muscle cells</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor

# 1 Einleitung

Die Implantation intrakoronarer Stents in Verbindung mit der seit langem etablierten perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) wird zunehmend als Therapieform in der interventionellen Kardiologie eingesetzt.[1] Es hat sich gezeigt, daß diese Behandlungsmethode nicht nur in einer Optimierung der sofortigen Ergebnisse des Dilatationsverfahrens resultierte, sondern auch die klinischen Langzeitergebnisse von verschiedenen Patientengruppen verbesserte.[2-5]

Die kontinuierliche Weiterentwicklung von Stents in den letzten Jahren hat mit zu diesem Erfolg beigetragen und den vermehrten Einsatz dieser Bioprothesen ermöglicht. Dennoch ist die Behandlung mit Nebenwirkungen assoziiert, von denen die subakute Okklusion, vor allem aber Restenosen die wesentlichen limitierenden Faktoren darstellen.[3, 4, 6-8] Diese häufig bedrohlichen Begleiterscheinungen werden multifaktoriell ausgelöst. Ein wesentlicher Kausalzusammenhang ist in der Aktivierung von Blutzellen zu sehen, besonders in der von Leukozyten und Thrombozyten. Wesentlich wird die Aktivierung durch Scherkräfte (*shear forces*) und durch den Kontakt mit verschiedenen Biomaterialien bzw. Fremdoberflächen hervorgerufen.[9, 10] Ferner wurde auch diskutiert, daß Metallionen die Aktivierung von Thrombozyten und anderen Zellen induzieren können.[11, 12]

Aus diesem Grund wurden verschiedene medizinische Neuerungen eingeführt, die, ebenso wie auch technische Verbesserungen der interventionellen kardiologischen Therapie, durch intravaskulären Ultraschall gesteuertes Stenting oder die Hochdruckimplantationstechniken wichtige Fortschritte bei der Verringerung der Stent-abhängigen Thrombosen und Stent-Restenosen darstellen.[1, 7, 12, 13] Ferner konnten die Ergebnisse weiter verbessert werden durch Veränderungen des Designs der Stents, veränderte Materialien und Oberflächenstrukturen, aber auch durch neue Oberflächen-Beschichtungen.[12, 14, 15] Eine dieser Substanzen, die eingesetzt werden kann, um Stents innen und außen mit einer Schutzschicht zu überziehen, ist

das *diamond-like carbon* (DLC), einem inerten, relativ amorphen Hydrogenpolymer.[16, 17]

## 1.1 Ziele der Arbeit

Um die Hypothese zu untersuchen, daß Metallionen eine Plättchenaktivierung induzieren, und daß dieser Prozeß durch eine DLC-Beschichtung der Stents vermindert werden kann, wurde ein Profil der biologischen Verträglichkeit von *diamond-like carbon-coated* Stents erstellt. Hierzu wurden hochsensitive Labortechniken angewandt: Die Durchflußzytometrie, um Antigene und damit verbundene Veränderungen auf den Thrombozyten zu analysieren, die Atomabsorptions- (AAS) sowie Massenspektroskopie (ICP-MS) um die Ionenabgabe (Emission) des Metallstents festzuhalten.[18-20]

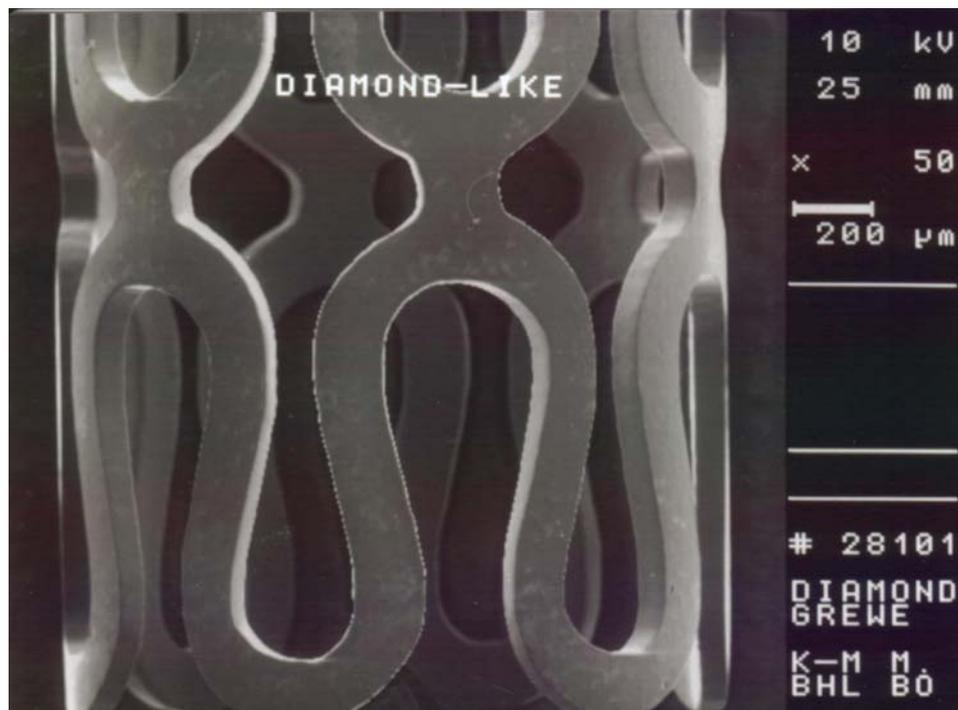


Abbildung 1: DLC-beschichteter Stent in 50facher Vergrößerung (mit freundlicher Genehmigung von Dr. P.H. Grewe; Abteilung für Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinik Bergmannsheil, Bochum)

Die durchflußzytometrische Untersuchung wurde angewandt um die Aktivierung von Thrombozyten, anhand ihrer Strukturantigene CD41a, CD42b, und ihrer Aktivierungsantigene CD62p und CD63, festzustellen. Weiterhin wurden in Zellkulturen evaluiert, in wieweit sich die Beschichtung der Stents auf die Proliferation von Zellen auswirkt. Um die Struktur der Stents in originale und auch in expandiertem Zustand zu untersuchen, wurden diese mittels Rasterelektronenmikroskopie, Videomorphometrie und der energiedispersiven Röntgen-Mikroanalyse untersucht.

## 1.2 Durchflußzytometrie

### 1.2.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie

Durchflußzytometer sind optoelektronische Meßgeräte, die in der Lage sind verschiedene optische Signale, wie Lichtstreuung oder Fluoreszenz, die beim Zusammentreffen von Meßereignissen mit Laserlicht auftreten, zu detektieren und zu verarbeiten. Nachdem das erste Durchflußzytometer 1965 von Coulter entwickelt worden ist, bei dem allerdings nur der Parameter Zellgröße bestimmt werden konnte, ist man heute in der Lage bis zu 6 Parameter gleichzeitig zu erfassen und bis zu 10.000 Zellen pro Sekunde zu untersuchen.

In der Durchflußzytometrie können allerdings nur Zellen untersucht werden, die in einer Suspension vorliegen. Besonders gut eignen sich Zellen aus peripherem Blut (z.B. Leukozyten, Thrombozyten), Knochenmark oder eine Lavage. Aber auch Zellen aus Gewebsverbänden können isoliert und nach Einbringen in eine Suspension untersucht werden. Um Zellen erkennen zu können, müssen diese vorher markiert werden. Durch Inkubation dieser Zellen mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern (mAK), stöchiometrischen Farbstoffen zur DNA- oder RNA-Erkennung, aber auch durch membrangängige, fluoreszierende Enzymfarbstoffe können sie im Durchflußzytometer sichtbar gemacht werden.[21]

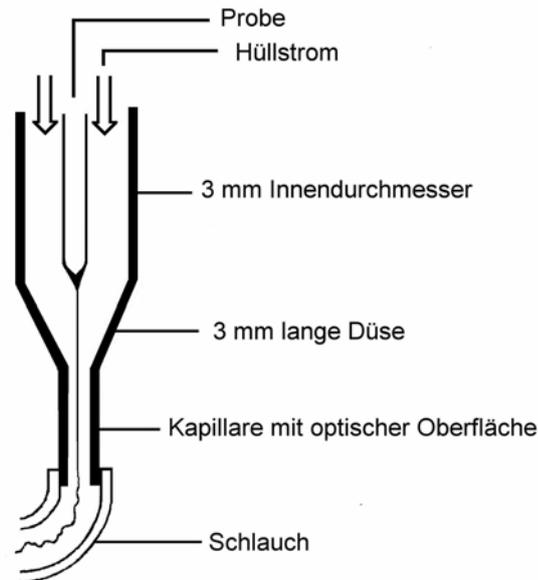


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Durchflusszelle (modifiziert nach einer Vorlage aus: *GIT Labor Medizin* 7-8/ 1992)

Die Suspension wird in eine Küvette gebracht, von wo aus sie durch eine Pumpvorrichtung in ein Schlauchsystem weitergeleitet wird. Von dort aus wird die Zellsuspension in einen das Schlauchsystem umgebenden, schnell fließenden Mantelstrom eingebracht. Von dem Mantelstrom erfaßt, werden die zu untersuchenden Zellen mitgerissen und genau in der Mitte des Meßzentrums fokussiert (siehe Abbildung 2). Gleichzeitig werden sie voneinander separiert und hintereinander so aufgereiht, daß ein optimaler Kontakt mit dem Laserlicht für jede einzelne Zelle gewährleistet ist. Durch den Kontakt der Zellen mit dem Laserlicht kommt es dann zu charakteristischen Lichtstreuungen.

Ein Teil des Lichtes wird geradeaus gestreut (*forward scatter*, FSC) und damit die Zellgröße definiert. Dieses so gestreute Licht wird durch ein System von optischen Filter, Spiegeln und Linsen geleitet, bevor es auf einen Detektor trifft, der es danach an eine Lichtverstärkerröhre (PMT) weiterleitet (siehe Abbildung 3).

Der weitere Teil des Laserlichtes wird in einem 90°-Winkel abgelenkt. Auch die so erhaltenen Strahlen treffen auf ein optisches Filter- und Linsensystem, bevor

sie bei unterschiedlichen Wellenlängen abgeleitet werden. Dabei können sowohl das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), das auf die innere Struktur der Zelle wie zum Beispiel die Granularität hinweist, als auch bis zu vier weitere Parameter detektiert werden.

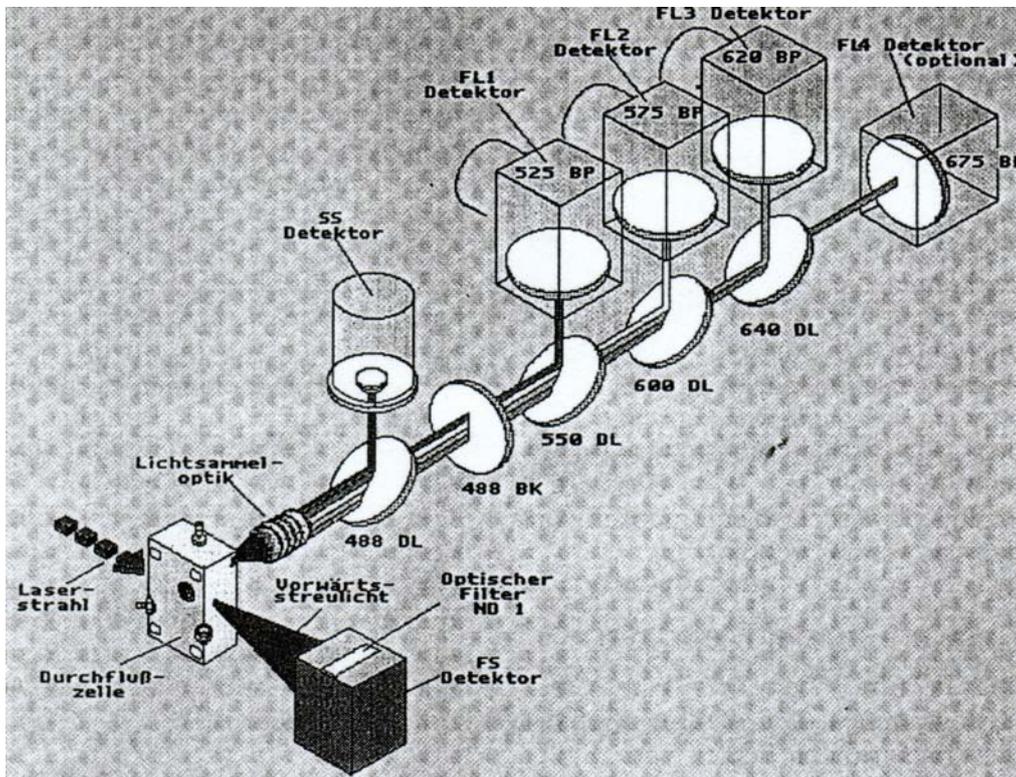


Abbildung 3: Strahlengang von Laser- und Fluoreszenzlicht in einem Durchflußzytometer mit Detektoren für das Fluoreszenz- und für das Laserstreulicht. (modifiziert nach einer Vorlage von Gutensohn, K. aus MTA 9. 15-18 (1994))

Nacheinander werden jeweils die Strahlen detektiert, deren Wellenlänge mit der spezifischen Wellenlänge des jeweiligen dichroitischen Spiegels oder Filters übereinstimmt. In unserem Modell bei  $\lambda$  488 nm der SSC, welcher die gleiche Wellenlänge  $\lambda$  hat wie die des Argonlasers. Aber auch bei einer Wellenlänge von  $\lambda$  550 nm,  $\lambda$  600 nm,  $\lambda$  640 nm und  $\lambda$  675 nm werden die speziellen Strahlen ab und auf Detektoren weitergeleitet, von wo aus das primäre Signal verstärkt wird. Danach laufen die elektrischen Impulse über einen weiteren

Verstärker in einen Computer, in dem sie digitalisiert und verarbeitet werden.[22, 23]

Die Durchflußzytometrie ermöglicht es, tausende einzelner Partikel oder Zellen und deren Antigene in kürzester Zeit sehr spezifisch und hochsensitiv auf verschiedene Parameter hin zu untersuchen.[24]

### 1.2.2 Monoklonale Antikörper

Die ursprüngliche Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) wurde von Georg Köhler und Cesar Milstein entwickelt, die später den Nobelpreis für diese Entdeckung erhielten. Ihnen gelang es, Antikörper von nur einem Lymphozytenklon mit genau definierter Spezifität und Affinität der Epitope herzustellen. Diese Methode beruht auf der Immortalisierung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen durch Hybridisierung, also Verschmelzung des genetischen Materials, mit Myelomzellen. Für unterschiedliche diagnostische und therapeutische Zwecke können in Zellkulturen mAK für bestimmte Epitope hergestellt werden.[25] In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper verwendet, die die Epitope von CD41a (GP IIb-IIIa), CD42b (GP Ib-V-IX), CD62p (P-Selektin) und CD63 (GP53) erkennen und binden.

### 1.2.3 Fluorochrome

Um gebundene Antikörper auf der Zelloberfläche sichtbar zu machen, muß man sie mit fluoreszierenden Farbstoffen, sogenannte Fluorochromen, konjugieren. Durch die Energie, die mittels des Lasers auf die Antikörper und die gebundenen Fluorochrome trifft, werden Elektronen des Farbstoffes aus Orbitalen niedrigerer Schalen auf Orbitale höherer Schalen gehoben. Die überschüssige Energie, die diese Teilchen nun besitzen, muß wieder abgegeben werden, da der so erreichte Zustand metastabil ist. Das geschieht,

indem sie durch Abgabe von Photonen auf ihr Ausgangsniveau zurückkehren. Die dabei frei werdende Energie wird als fluoreszierendes Licht wahrgenommen.[26]

In der Durchflußzytometrie bedeutet dies, daß durch den Laser Elektronen von den Fluorochromen, die mit den mAK verbunden sind, in der Durchflußzelle angeregt werden, die gewonnene Energie dann aber wieder durch Lichtabgabe freigesetzt wird. Dieses Licht wird in dem optischen Bereich des Durchflußzytometers detektiert, in digitale Signale umgewandelt und schließlich verstärkt.

Die gängigsten Fluorochrome zeichnen sich besonders dadurch aus, daß sie alle bei einer Wellenlänge von  $\lambda$  488 nm angeregt werden, welche die selbe Wellenlänge der in der Durchflußzytometrie bevorzugt verwendeten Argonlaser ist. Die Wellenlänge des Emissionsspektrums ist aber wegen Energieverlustes in Folge von Wärmeabgabe langwelliger und liegt zwischen  $\lambda$  500 nm und 700 nm. Diese Differenz zwischen Emissions- und Absorptionsspektrum nennt man *stokes-shift*.[26] Auch müssen sich die Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe voneinander unterscheiden, so daß man sie bei simultaner Detektion getrennt voneinander untersuchen kann. Die Bandbreite des emittierten Lichtes kann sich jedoch überlappen. Das heißt, daß z.B. ein grüner Farbstoff einen Teil des Lichtes auf den Detektor für andere Fluorochrome ausstrahlt, weswegen es einer elektronischen Korrektur, einer sogenannten Kompensation, bedarf.[27]

Häufig in Gebrauch stehende Fluorochrome sind das Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), aber auch Tandemkonjugate wie Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE-CY5) oder PE-Texas Red werden häufig verwendet. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda$  488 nm können alle diese Farbstoffe angeregt werden und emittieren gleichzeitig Signale, die vom Durchflußzytometer detektierbar sind. Für die Tandemkonjugate gilt, daß das PE-Molekül nach Anregung durch den Laser seine Energie auf den zweiten gebundenen Farbstoff weiterleitet, der sich dann, da er in einem langwelligeren Bereich als PE liegt, besser von den anderen verwendeten Farbstoffen unterscheiden läßt.[28]

## 1.3 Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kernlose, scheibenförmige Zytoplasmafragmente von Megakaryozyten mit einem Durchmesser von 2-5  $\mu\text{m}$ . Sie entstehen dadurch, daß Megakaryozyten im Knochenmark Teile des Zytosols abschnüren. Aus einem Megakaryozyt können sich ca. 1.000 – 3.000 Thrombozyten bilden. Die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut liegt zwischen 150 und 300 Blutplättchen/nl Blut. Um sich mit Energie zu versorgen, besitzen sie Mitochondrien, sowie im Zytosol lokalisierte Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs. Dadurch sind sie in der Lage, die nötigen enzymatischen Schritte des Citratzyklus und der Elektronentransport-Phosphorylierung durchzuführen, wobei die Glykolyse teilweise durch Glukoseaufnahme aus der Umgebung, hauptsächlich aber aus den eigenen Speichern gespeist wird.

Die so gewonnene Energie wird dazu verwendet, die Struktur der Thrombozyten, die plasmatischen Vorgänge und die Speicherung von verschiedenen Substanzen, wie biogener Amine (Serotonin) und Katecholamine, aufrechtzuerhalten. Die durchschnittliche Lebenszeit der Thrombozyten beträgt 8-10 Tage. Gegen Ende dieser Zeitspanne nimmt die physiologische Funktionsfähigkeit stark ab und sie werden sequestriert.[29]

### 1.3.1 Morphologie und deren Änderung durch Aktivierung

Jedes Plättchen gliedert sich in ein Hyalomer, eine periphere Zone, und in ein Granulomer, eine zentrale dichte Zone mit azurophilen Granula. Das Hyalomer bildet bei Aktivierung filopodienartige Fortsätze, die der Oberfläche des Thrombozyten eine unregelmäßige Gestalt verleihen. Charakteristisch ist ein Kanalsystem, das aus Invaginationen der Plättchenmembran hervorgeht und mit der Umgebung in offener Verbindung steht. Hierüber können bei Sekretion Inhaltsstoffe der Granula in das Blut abgegeben werden. Randständige Bündel von Mikrotubuli und netzförmige Filamente sowie viele Aktinfilamente, die an

der Membran verankert sind, tragen dazu bei, daß die diskoide Form der Thrombozyten aufrechterhalten wird. Sie spielen auch bei dem *shape change* der Plättchen eine wichtige Rolle. Dem Plasmalemm liegt außen noch eine 150-200 nm dicke Schicht von Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen auf. Diese besitzen Rezeptorfunktion und haben eine wichtige Bedeutung für die Wechselwirkung der Plättchen mit Kollagen, Fibrinogen und Thrombin.

Das dichtere Granulomer besitzt verschiedene, von einer Membran umgebene Granula. Man unterscheidet drei Formen: Die *dense tubuli*, die dem endoplasmatischen Retikulum entsprechen, besitzen  $Ca^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ -ATPasen, die dichten Granula (*dense Granula*), in denen ATP, ADP, GTP, GDP, sowie Kalzium und Serotonin enthalten sind, sowie die  $\alpha$ -Granula, die verschiedenen Plasmaproteine wie Fibrinogen, Faktor V, Faktor VII, Albumin, Antiplasmin, Kallikrein und Thrombospondin, aber auch plättchenspezifische Proteine wie von Willebrand-Faktor (vWF), Plättchenfaktor 4, *platelet derived growth factor* (PDGF), GMP-140 und  $\beta$ -Thromboglobulin enthalten. In den ebenfalls vorhandenen Lysosomen befinden sich vor allem saure Hydrolasen, LAMP-1, LAMP-2 und GP53.[30]

Der *shape change* des Thrombozyten ist anfangs reversibel, bis es zu einer Ausschüttung von Inhaltstoffen aus dem Granulomer, der Degranulation, kommt. Formwandel von einem Diskozyt in einen Sphärozyt, bei dem sich die Membran fingerartig ausstülpt, sowie die Aggregation sind dann irreversibel.

### 1.3.2 Primärhämostase

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten besteht in der Primärhämostase. Sie ist der erste Schritt in der Blutgerinnung und findet in den ersten zwei Sekunden statt, so daß ein unkontrolliertes Bluten verhindert wird und es zu einem Schließen der Wunde kommt. Unter physiologischen Umständen werden Gefäße von einer Endothelschicht ausgekleidet. Kommt es durch Verletzung zu einer Freilegung des Subendothels, und somit auch zu einer Exposition von

Kollagen, wirkt sich das auf den Thrombozyt als Adhäsions- und aktivierender Stimulus aus.[31]

An die nun freigelegten Kollagenfibrillen im Subendothel kann sich der Thrombozyt mit Hilfe eines auf seiner Oberfläche exponierten Kollagenrezeptors, dem GP Ia-IIa anheften. Unterstützt wird er durch den von-Willebrand-Rezeptor, dem GP Ib-V-IX, der ebenfalls auf der Thrombozytenoberfläche zu finden ist. Dieser Rezeptor schafft weitere Brücken zwischen dem Kollagen und den Thrombozyten, indem er den von-Willebrand-Faktor, der von den Endothelzellen an das Subendothel abgegeben wird, als Bindeglied nutzt. Trotz der hohen Scherkräfte in der Blutbahn bleibt diese Verbindung stabil.[32]

Durch die Adhäsion kommt zu einer Sekretion von Inhaltstoffen der Thrombozyten. ADP, Kalzium, Adrenalin und Serotonin werden aus den *dense* Granula freigegeben. Die Lysosomen sezernieren Endoglykosidasen, Heparin-spaltendes Enzym und CD63. Aus den  $\alpha$ -Granula wird vWF, Plättchenfaktor 4, PDGF sowie P-Selektin freigesetzt.[33] Die Thrombozyten haben auf ihrer Membran für die aus den  $\alpha$ -Granula sezernierten Substanzen Rezeptoren, die über *second-messenger*-Mechanismen die Konzentration von Kalzium in den Plättchen erhöhen und einen *shape change* durch Aktivierung des Aktinomyosins induzieren. Weiterhin wird eine Freisetzung der Phospholipase  $A_2$  ausgelöst, die wiederum über Arachidonsäure Thromboxan  $A_2$  bildet, das wiederum aktivierend auf die Thrombozyten wirken kann. Man erhält eine positive Rückkopplung, die eine Beschleunigung der Prozesse mit sich bringt.

Durch den *shape change* kommt es aber auch zu einer Exposition und Veränderung eines neue Proteins, GP IIb-IIIa, sowie von negativ geladenen Phospholipidgruppen an der Außenseite der Membran. Durch die Konformationsänderung kommt es zu einer Bindung zwischen Fibrinogen, das mit einer RGD-Sequenz ausgestattet ist, und dem GP IIb-IIIa. Wichtig ist, daß der Rezeptor nur nach Aktivierung der intrazellulären Botenstoffe die RGD-Domäne, die eine Sequenz der Aminosäuren Arginin, Glycin und Glutamat ist und auf der  $\gamma$ -Kette des Fibrinogens lokalisiert ist, erkennen kann.[29] Außer dem Fibrinogen haben auch noch der vWF, Vitronektin, Thrombospondin, Laminin, Kollagen und andere adhäsive Proteine eine RGD-Domäne. Da Fibrinogen mehrere Bindungsstellen hat, kann es auch mit mehreren

Thrombozyten eine Bindung eingehen. Es kommt zur Bildung des weißen Thrombus.[34]

### 1.3.3 Thrombusformation

In dem weißen Thrombus, dem Fibrinnetz, verfangen sich nun Erythrozyten. Es entsteht durch den *shape change* der Thrombozyten ein Aktivatorkomplex, der mit verschiedenen Faktoren der Gerinnungskaskade (wie z.B. IIa, V, Xa) sowie mit Kalzium als Bindeglied einen Komplex bildet. Diese Bindung wird hauptsächlich durch spezifische Proteine ausgelöst, die eine  $\gamma$ -Carboxy-Glutaminsäure besitzen und somit eine stark negativ geladene Oberfläche haben. Weiterhin besitzen Faktor IX und VII sowie Protein C und Protein S solche Gruppen. Gleichzeitig wird die Gerinnungskaskade eingeleitet, wodurch schließlich Fibrinmonomere zu einem Fibrinpolymer fest verbunden werden.[34] Allgemein bestehen Thromben vor allem aus Blutzellen und Fibrin. Man muß allerdings zwischen arteriellen und venösen Thromben unterscheiden. Während venöse Thromben hauptsächlich in Gebieten mit geringem Blutfluß vorkommen und mehr aus Erythrozyten und Fibrin zusammengesetzt sind, besteht der arterielle Thrombus aus Blutplättchen und Fibrin und wird durch hohe *shear forces* (Scherkräfte) induziert, wie es bei stenosierten Gefäßen durch den beeinträchtigten Blutfluß oder durch Veränderungen der Wandstruktur der Gefäße der Fall ist.[35]

Nach Heilung des Gewebes muß der Thrombus abgebaut werden. Durch die Sekretionsprodukte der Thrombozyten wird eine Diapedese der Leukozyten ausgelöst. Diese wandern in den Thrombus ein und bauen ihn durch Enzyme ab. Thromben können aber auch als sogenannte murale Thromben überdauern, sich lösen und eine Embolie verursachen oder auch einen kompletten Verschuß des Gefäßes nach sich ziehen, wobei ein alter muraler Thrombus immer wieder eine Neubildung nach sich ziehen kann.[36]

### 1.3.4 Antigene von Thrombozyten

Auf der Oberfläche von Thrombozyten findet man verschiedene Antigene wie CD41a und CD42b, die ständig exprimiert sind. Es gibt aber auch Antigene, die intrazellulär gespeichert sind und erst nach Aktivierung der Blutplättchen auf die Außenseite durch das *surface-connected canalicular system* (SCCS) transloziert werden. Sie sind also nur auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten zu finden. Zu diesen Antigenen gehören CD62p und CD63.

In dem nun folgenden Abschnitt werden wesentliche thrombozytären Antigene beschrieben und ihre Funktion erklärt.

#### 1.3.4.1 Glykoprotein IIb-IIIa

Der größte Teil der Glykoproteine IIb-IIIa ist als integrales Membranprotein auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert. Nur ein kleiner Teil dieses GP ist in den  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen und im *surface connected canalicular system* (SCCS) zu finden. Das GP IIb-IIIa ist ein nicht kovalent gebundener Heterodimerkomplex, der aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht. Der intakte Aufbau des GP IIb-IIIa ist für eine ungestörte Hämostase unabdingbar, da Defekte in unterschiedlichen Krankheiten z. B. dem Glanzmann-Naegeli-Syndrom, einer autosomal rezessiv vererbten Krankheit, resultieren können. Dabei können entweder ein oder beide Teile des Rezeptors betroffen sein. Es kommt auf Grund von ATP-Mangel in den Thrombozyten, auf Grund von Störungen in der Glykolyse zu einer ungenügenden Aggregation und einer verlängerten Blutungszeit.[29]

Auf einen Aktivierungsreiz hin kann es zu einer Translokation kommen, so daß intrazellulär gespeichertes GP noch zusätzlich auf die Membranoberfläche gebracht wird. Weiterhin findet eine strukturelle Veränderung der Epitope statt. Es kommt zur Aktivierung der Liganden und der Rezeptor-abhängigen

Bindungsstellen. Das aktivierte GP IIb-IIIa stellt eine Bindungsstelle für Moleküle mit RGD-Domäne, wie Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin zur Verfügung, so dass eine Aggregation induziert werden kann.

#### 1.3.4.2 Glykoprotein Ib-V-IX

Das Glykoprotein Ib-V-IX ist ein weiteres integrales Membranprotein der Thrombozyten. Er ist ein heterodimerer Komplex der die Adhäsion von Plättchen an das im Subendothel freiliegende Kollagen vermittelt. Der vWF, der als "Brückenelement" dient, bindet an die  $\alpha$ -Einheit des GP Ib und garantiert so eine feste Struktur. Selbst die hohen Scherkräfte, die in den Gefäßen vorkommen, können eine Adhäsion nicht verhindern. Dadurch kommt es zu einer festen Verankerung des Thrombozyten am Kollagen.

Ein Fehlen des GP Ib-V-IX führt zum Bernard-Soulier-Syndrom, bei dem die Thrombozyten gar nicht oder nur vermindert an das Subendothel der verletzten Gefäßwand adhären können.[37]

#### 1.3.4.3 CD62p (P-Selektin, GMP-140)

CD62p ist ein Protein, das in den  $\alpha$ -Granula gespeichert ist, und erst während des Sekretionsvorgangs, nachdem die Membran der  $\alpha$ -Granula mit *dem surface connected canalicular system* (SCCS) oder mit der Thrombozytenmembran direkt verbunden ist, auf die äußere Seite der Membran transportiert wird. Einen adäquaten Reiz dafür könnten Thrombin, ADP oder Adrenalin liefern. Jedoch können auch Scherkräfte, sowie der Kontakt der Thrombozyten mit Fremdmaterial Auslöser für die Expression von CD62p sein.

Da CD62p nur auf der Oberfläche aktivierter Blutplättchen exprimiert ist, kann es als Aktivierungsmarker angesehen werden. Weiterhin spielt es aber auch eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, besonders mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten.[38]

#### 1.3.4.4 CD63 (GP53)

CD63 definiert ein Glykoprotein, das lysosomal im nicht aktivierten Thrombozyten gespeichert ist. Nach Aktivierung der Plättchen kommt es zur Fusion der Lysosomen mit der Membran des *surface connected canalicular system* (SCCS) oder der Thrombozyten, worauf CD63 auf der Außenseite der Plättchenmembran exprimiert wird. Die genaue Aufgabe von CD63 ist bis jetzt noch nicht erforscht; das Antigen kann aber wie CD62p als Aktivierungsmarker angesehen werden, da die Anzahl der Glykoproteine auf der Außenseite der Membran nur nach Aktivierung erhöht ist.[39]

### 1.4 Analyseverfahren

#### 1.4.1 Zellkultur

Eine Zellkultur bezeichnet das Wachstum von nicht in Gewebe geordneten Zellen *in vitro*. Dazu werden in unserem Versuch die Gewebsfragmente aus *post mortem* gewonnenem Gefäßmaterial in eine hydrolytische Lösung gegeben, so daß sich der interzelluläre Bestand auflöst und die Zellen voneinander separiert werden. Danach werden sie mit Nährmedium durchspült, zentrifugiert, in frische Lösung aufgenommen und in eine Röhrchenkultur pipettiert. Die Zellen sinken auf den Boden und haften dort an. Da die meisten tierischen und humanen Zellen nicht wie Bakterien in Suspension überleben können, müssen sie eine geeignete Oberfläche zum Anheften vorfinden. Wenn ein geeignetes Kulturmedium dargeboten wird, bilden sich Primärkulturen aus. Durch Zellteilung wachsen sie radial um die ursprünglich eingesetzten Zellen herum, so daß ein einschichtiger Zellrasen (*Monolayer*) entsteht. Durch die Kontakthemmung und die begrenzten Teilungsraten der Zellen endet das Wachstum nach einer gewissen Zeit von selbst. Zellen können nach Vermehrung von der Oberfläche abgelöst werden und verdünnt subkultiviert werden. Es entstehen sogenannte Passagen, die über lange Zeit am Leben erhalten werden können.

Zellen und Gewebefragmente können in Kulturen auch außerhalb des Organismus, *in vitro*, am Leben erhalten werden, sich vermehren und für sie charakteristische Funktionen ausführen. Unter planmäßig aufgestellten und ständig kontrollierten Bedingungen können somit Untersuchungen direkt an den Zellen durchgeführt werden. Dazu gehören z.B. die spezifischen Analysen von sich differenzierenden Zellen oder ihrer biologischen Wechselwirkungen. Im Gegensatz zu ausgereiften adulten Zellen, die schnell absterben, lassen sich juvenile Zellen, z.B. aus embryonalem Gewebe, *in vitro* besser züchten. Für die Kultivierung muß ein optimales Milieu, das die ursprünglichen *in vivo*-Bedingungen weitgehend nachahmt, geschaffen werden. Dazu gehören unter anderem ein optimaler pH-Wert, eine konstante Temperatur, die Versorgung mit Nährstoffen, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen.[40]

#### 1.4.2 Videomorphometrie

Die video-unterstützten morphometrischen Untersuchungen der Stents erfolgten mittels eines computerunterstützten Bildanalyse-Systems. Die Hardware besteht aus einer 10 Megahertz-80287-Prozessor-Kontrolleinheit mit angeschlossenen Bildmonitor sowie einem Digitalisierungs-Tablett und Cursor. Die Bildaufnahme und -registrierung erfolgt mit einer Schwarz-Weiß-CCD Kamera sowie einer Kamera-Steuereinheit. Unter Zuhilfenahme eines Makrozoom-Aufsatzes konnten 7,875 fach bis zu 40 fach-Vergrößerungen erzielt werden.

Die Messungen erfolgen anhand digitalisierter Monitorbilder nach vorhergehender Dreipunkt-Kalibrierung. Die Kalibrierung dient zur Definition der Skalierung der Meßfläche. Dabei wurde eine mit Hilfe des Cursors abgefahrenen Strecke auf der X- und Y-Achse von 1000 µm jeweils intern eine bestimmte Anzahl von Pixeln zugeordnet wird.

An Hand von Markierungen, die in dem gespeicherten Bild gesetzt werden, werden alle gewünschten Parameter errechnet, indem die nach der Kalibrierung intern gespeicherte Skalierung der einzelnen Pixelfläche mit der Anzahl der

markierten Pixel multipliziert wird.[41]

#### 1.4.3 Rasterelektronenmikroskopie (*scanning electron microscopy*)

Die seit 1965 im Gebrauch stehenden Rasterelektronenmikroskope dienen der Abbildung von Oberflächen. Die Vorteile der Elektronenmikroskopie liegen in der hohen Auflösung (bis zu 0,15 nm), der großen Tiefenschärfe und der damit verbundenen Analyse von Mikroelementen.

Der Elektronenstrahl wird von einer geheizten Kathode aus Wolframdraht erzeugt, die im "Kopf" des Mikroskops sitzt. Die von der Kathode emittierten Elektronen werden in der unter Hochvakuum stehenden Röhre durch Spannung beschleunigt. Diese Spannung liegt an der unter der Kathode liegenden Anodenplatte an, die in der Mitte eine Öffnung aufweist, durch welches nun die beschleunigten Elektronen hindurch treten können. Dabei bilden Sie einen schlanken Strahl. Dieser wird dann durch drei Kondensorlinsen mit Hilfe elektromagnetischer Felder moduliert und auf das zu untersuchende Objekt geworfen. Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Oberfläche des Präparates durch diesen sehr eng gebündelten, primären Elektronenstrahl Zeile für Zeile abgelesen. Die von den Elektronenstrahlen getroffenen Punkte der Oberfläche entsenden energieärmere Sekundärelektronen (SE), welche von einem Kollektor gesammelt werden. Mit diesen Signalen wird die Helligkeit eines Monitors moduliert, auf dem ein Bild synchron mit dem vom Primärstrahl abgelesenen Objekt erstellt wird. Durch die hohe Auflösung und die plastische Darstellung können dreidimensionale Analysen von Oberflächen ermöglicht werden.[42]

#### 1.4.4 Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse (*energy dispersive x-ray analysis*)

Die energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse (EDX) ist ein klassisches Verfahren, das zur Analyse der chemische Zusammensetzung oberflächennaher Bereiche von Festkörpern oder zur Charakterisierung von dünnen Schichten eingesetzt wird. Die Informationstiefe liegt im  $\mu\text{m}$ -Bereich und damit wesentlich höher als bei den elektronen- und massenspektrometrischen Verfahren, mit denen nur im nm-Bereich gearbeitet werden kann. Es ist somit möglich geworden, kleinste Veränderungen eines Materials, wie z.B. Inhomogenitäten bei Beschichtungen bzw. Materialermüdung nach Beanspruchung, zu manifestieren.

Um eine energiedispersive Röntgenanalyse durchführen zu können, wird ein Gerät zur Erzeugung eines Elektronenstrahles benötigt. Ein solches Gerät stellt in diesem Fall das Rasterelektronenmikroskop dar. Dadurch kann die Elementverteilung auf der Probenoberfläche mit hoher Ortsauflösung abgebildet werden.

Nach Auftreffen eines fein fokussierten Primärelektronenstrahls auf die Probe werden Sekundärelektronen (SE) aus den getroffenen Atomen herausgeschlagen. Es kommt zur Ionisation. Da die Strahlen nicht nur die Oberfläche berühren, sondern auch in die Tiefe dringen kommt es auch dort zu ionisierenden Effekten. Jedoch werden sie auf Grund ihrer Tiefe von anderen Atomen absorbiert. Ihre SE haben nicht genug Energie, um ein relevantes Signal bis zu den Detektoren zu schicken. Die Primärelektronen stoßen Elektronen aus kernnahen Schalen der Probenatome heraus. In die entstandenen Lücken fallen Elektronen aus weiter vom Atomkern entfernt liegenden Elektronenschalen. Die Energiedifferenz zwischen den beiden hierbei beteiligten Elektronenschalen wird als Röntgenstrahlung emittiert. Da ihre Energie der Verlustenergie entspricht, kann jedem Element ein charakteristisches Röntgenspektrum zugeordnet werden.

Anhand der Spektral-Linien, die im Röntgenspektrum enthalten sind, kann die Elementzusammensetzung der Probe identifiziert werden und über die Intensität ihrer Spektrallinien quantitative Aussagen über das Element getroffen werden.[43]

### 1.4.5 Atomabsorptions-Massenspektrophotometrie (*atomic adsorption spectrometry*)

Die Atomabsorptions-Massenspektrophotometrie (AAS) erlaubt es, thermisch schwer anregbare Metalle, wie zum Beispiel Blei, Zink und Quecksilber, in Konzentrationen von wenigen  $\mu\text{g/L}$  bis hin in den  $\text{mg/L}$ -Bereich zu messen.

Die klassische Atomisierungseinrichtung ist die Flamme. Wie in Abbildung 4 gezeigt, wird die zu bestimmende Probe in ein Gemisch aus Brenngas und Oxidans eingebracht und in eine Mischkammer weitergeleitet. Dort wird das Gemisch in ein Aerosol umgewandelt, welches an einem Brennkopf entzündet wird. Die gelösten Stoffe werden dadurch in ihre einzelnen Atome aufgespalten.

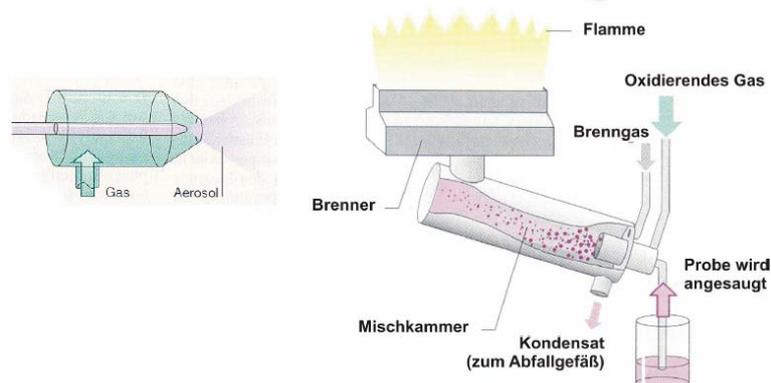


Abbildung 4: Aerosolbildung im AAS (modifiziert nach einer Vorlage aus: Taschenatlas der Analytik (Schwendt))[102]

Für die photometrischen Messungen dient eine Hohlkathodenlampe als Lichtquelle. Wie in Abbildung 5 dargestellt, werden die Strahlen durch Filter oder einen Monochromator so moduliert, daß nur Strahlen einer bestimmten Wellenlänge oder eines engen Wellenlängenbereiches ausgesandt werden. Jedes Atom ist nur für die Strahlen einer bestimmten Wellenlänge sensibel und absorbiert nur in dieser charakteristischen Wellenlänge. Nach Kontakt der

Lichtstrahlen mit den Atomen werden deren Elektronen durch die neu zugeführte Energie in einen angeregten, höheren Zustand versetzt. Bei Rückkehr auf ihre ursprünglich niedrigere Bahn wird die überschüssige Energie in Form von Resonanzstrahlen freigesetzt. Durch bestimmte Messanordnung kann jedoch zwischen den Strahlen der Hohlkathodenlampe und der störenden, von den Atomen emittierten, Resonanzenergie differenziert werden.

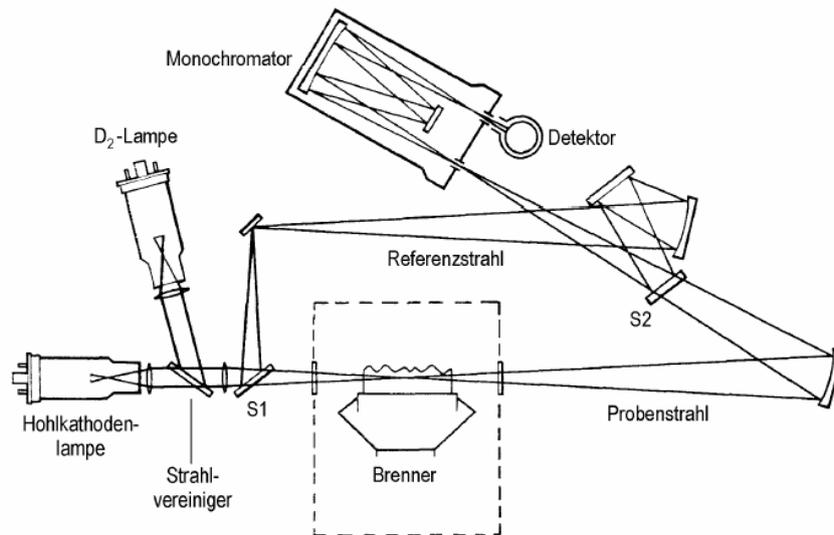


Abbildung 5: Versuchsanordnung eines AAS (modifiziert nach einer zur Verfügung gestellten Vorlage der Fa. Perkin Elmer)

Je mehr Atome in der zu messenden Lösung vorhanden sind, desto mehr Anregungsstrahlung wird absorbiert. Die Absorption der Anregungsstrahlung ist in einem bestimmten Bereich der Konzentration des zu bestimmenden Elementes proportional. Die Lichtabsorption der Atome lässt sich aber nicht direkt messen. Allerdings kann die Intensität der abgegebenen, für ein bestimmtes Element spezifisch modulierten Strahlen der Kathodenlampe,  $I_0$ , und die Intensität der durchgelassenen, nicht resorbierten Strahlen des modulierten Lichtes,  $I$ , gemessen werden. Da die Transmission keine direkte Proportionalität angibt, wird die Extinktion, die die Lichtschwächung repräsentiert, als Meßgröße herangezogen. So kann an Hand der Intensität der

Lichtschwächung einer charakteristischen Wellenlänge auf die Konzentration von den dafür sensiblen Atomen geschlossen werden.[44]

#### 1.4.6 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*)

Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) ist eine Meßtechnik, die mit hoher Geschwindigkeit verschiedene Elemente analysieren kann. Das ICP-MS besteht aus einer Ionenquelle, dem Plasma und dem Massenspektrometer (MS), das die freigesetzten Ionen detektiert. Dabei können sowohl quantitative als auch qualitative Messungen der meisten Elementen des Periodensystems durchgeführt werden, wobei die Ergebnisse sehr genau in ng/l bis ppt angegeben werden.

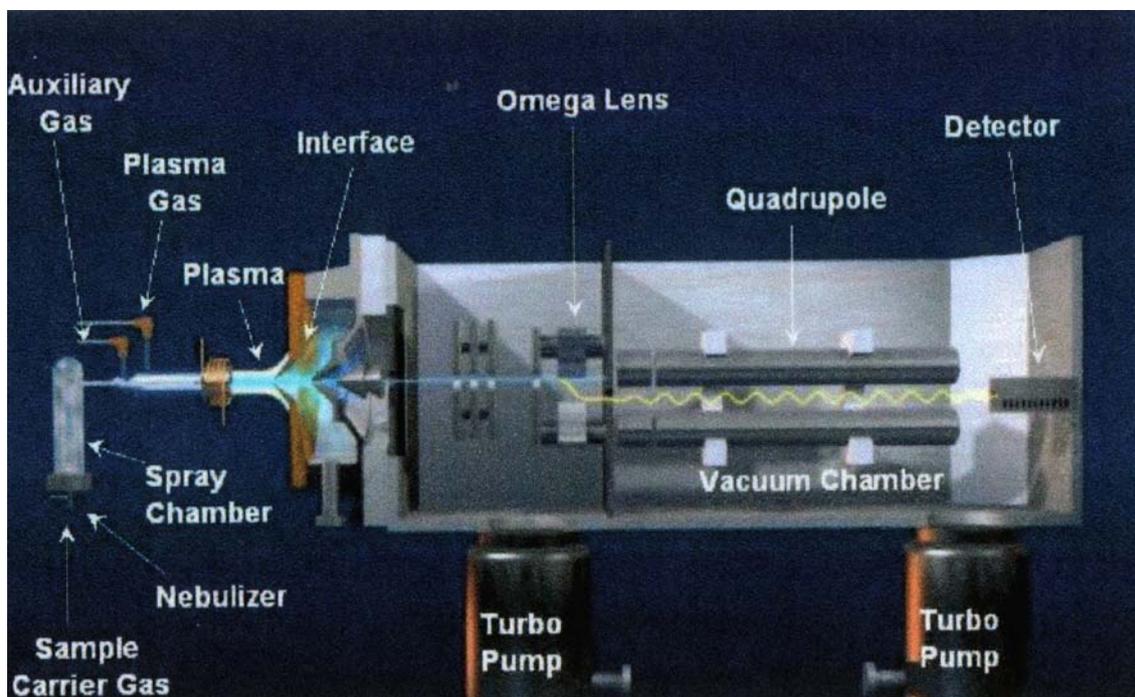


Abbildung 6: Versuchsanordnung eines ICP-MS [45]

Wie die Untersuchungsanordnung in Abbildung 6 zeigt, wird die zu testende Probe durch eine Pumpe angesaugt und von dort zu einem Zerstäuber gebracht, der das Aerosol herstellt. Im folgenden Kompartiment wird das Aerosol in die Plasmaphase überführt und untersucht. Durch eine Reihe von konzentrisch angeordneten Quarzröhren wird nun Argongas hinzugefügt. Der Lichtstrahl ist in der Mitte einer Spirale, durch welche die Energie hindurchgeht, fokussiert. Durch das sehr dichte Feld der Argonatome kollidieren sie miteinander, wodurch ein energiereiches Plasma erzeugt wird. Während die im Aerosol vorliegende Probe in das Plasma fließt, wird sie gleichzeitig wieder aus dem Verbund mit dem Aerosol getrennt. Bei einer durchschnittlichen Temperatur des Plasmas von ca. 6.000°K bis 10.000°K kommt es gleichzeitig zur Ionenbildung. Die so erzeugten Ionen werden aus dem Plasmaverbund gelöst und in ein Hochvakuum von  $10^{-4}$  Pa geschleust, in dem sich das Massenspektrometer befindet. Das Vakuum wird durch verschiedene Pumpensysteme aufrechterhalten.

Die zu untersuchenden Ionen können dann durch zwei Öffnungen austreten und werden durch mehrere Linsen fokussiert und in einen Masseanalysator geleitet, in dem die Ionen nach Ihrer Ladung oder Ihrer Masse aufgetrennt werden. Durch eine Kombination von unterschiedlich angelegten Spannungen werden die entsprechenden Ionen abgetrennt, von einem Elektronenverstärker gemessen und ihrer Masse nach geordnet.

Das generierte Massenspektrum ist sehr einfach gehalten. Jedem Isotop eines Elementes ist eine spezielle Stelle auf der X-Achse entsprechend ihrer Masse angeordnet. Auf der Y-Achse wird die Menge der Ionen angezeigt.[45]

## 1.5 Interventionelle Kardiologie

### 1.5.1 Perkutane transluminale Koronarangioplastie

Das heute bekannte Verfahren der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) basiert auf der Technik, die Dotter und Judkins

1964 entwickelt haben, um arteriosklerotische Veränderungen der Blut-Gefäße minimal-invasiv zu therapieren. Aber erst 13 Jahre später hatten die Durchmesser der Katheter eine Größe, die es möglich gemacht hat, auch die Koronar-Arterien zu behandeln. Erstmals gelang dies 1977 A. Grünzig in der Schweiz.[46]

In Deutschland werden jedes Jahr mehr als 100.000 Patienten mit einer PTCA behandelt. Indikationen sind v.a. verengte oder stenosierte Herzkranzgefäße auf Grund von arteriosklerotischen Plaques, die nicht medikamentös abgetragen werden können.

Bei der PTCA wird ein Führungskatheter über einen örtlich betäubten Zugang durch die A. femoralis, A. carotis oder auch A. axillaris retrograd in die Koronararterien vorgeschoben. Nachdem der Ballon am Ort der Stenose angekommen ist, wird er bis zu einer Minute mit einem Druck von ca. 8 Atm geweitet. Dadurch werden die verformbaren Plaques an die Gefäßwände gedrückt. Hierdurch kommt es zu einer schnellen Erweiterung des Lumens.[47] Bei einer primären Erfolgsrate von 90% kommt es bei 30-40% der Patienten später selbst unter unmittelbarer medikamentöser Behandlung chemisch zu einer Restenose. Die PTCA kann aber auch Ursache für weitere periphere Komplikationen sein. So kann es zu

- Arterienperforationen der Punktionsstelle
- Hämatomen
- arteriellen Blutungen aus der Punktionsstelle
- Kontrastmittelreaktionen
- Hypotonie
- Pseudoaneurysmata

kommen.

Weitere Komplikationen können Myokardinfarkt, Spasmen der Koronararterien, Gefäßperforationen sowie akute thrombotische Okklusionen sein.[46, 48]

## 1.5.2 Stent-Implantation

Zur Vermeidung von Restenosen und eines erneuten Verschlusses von Arterien nach einer Angioplastie wurde eine Gefäßprothese entwickelt, die eine mechanische Unterstützung liefern soll. Diese Prothese, auch Stent genannt, besteht aus einem verformbaren Metall-Draht-Schlauch der, aufgesetzt auf einen Ballonkatheter, in die Arterie mit eingeführt wird. Der Zugang kann an ganz unterschiedlichen Stellen gelegt werden. Die am häufigsten benutzten Arterien sind die A. femoralis, A. carotis oder A. axillaris, da von dort ein Eindringen in die Herzkranzgefäße über die beiden Ostien in der Aorta ascendens am besten möglich ist. Wenn der Stent an der Stenose plaziert ist, wird er durch den Ballon aufgedehnt, bis er eng an der Wand anliegt.[49] Die ersten Koronarstents wurden 1986 in Lausanne von U. Sigward, J. Puel in Toulouse und von P. Serruys in Rotterdam implantiert. Sie benutzten damals einen selbstexpandierenden, koronaren Wallstent.[50]

Seitdem wurden die Stents hinsichtlich ihres Designs, der Materialbeschaffenheit und ihrer Zusammensetzung sowie ihrer Handhabung stetig weiterentwickelt. Man unterscheidet selbstexpandierende und ballondilatierte Stents. Der Wallstent, den die oben genannten Gruppen 1986 implantiert haben, dehnte sich so lange auf, bis ein Gleichgewicht von Gefäßwandrückstellkraft und Stent erreicht war. Die ballondilatierbaren Stents unterscheiden sich hauptsächlich hinsichtlich des Aufbaus des Drahtgeflechtes, durch den sie eine große Stabilität erreichen. Die wichtigsten Vertreter sind der Wiktor-Stent, Palmaz-Schatz-Stent, Gianturco-Roubin-Stent und der weiterentwickelte Gianturco-Roubin-II-Stent.

Der Wiktor-Stent ist ein ballonexpandierbarer Stent, der aus einem einzelnen, losen Tantal-Kabel besteht, das in sinusoidalen Wellen geformt ist und von einer helikalen Spirale umgeben ist. Durch die Helix ist gesichert, daß es zu keiner Metall-Metall Berührung kommt, wodurch Korrosion und Scher-Stress auftreten würden. Durch das spezielle Design, verbunden mit dem geringen endothelialen Kontakt, der unter 10% liegt, und den elektrochemischen Charakteristiken von Tantal soll eine gute Vorbeugung gegen Thrombusformationen gewährleistet werden.[51, 54] Dagegen ist der Palmaz-

Schatz-Stent ein aus kontinuierlichen Maschen bestehender Stent, der aus rostfreiem Stahl hergestellt wird. Der Stent besteht aus Segmenten, die durch ein Gelenk miteinander verbunden sind. Dadurch ist ein erhöhtes Maß an Flexibilität sowohl beim Transport, aber auch bei der Implantation des Stents gesichert. Nachdem der Stent mit 8-10 Atm aufgedehnt wurde, ist ein weiteres umplatzen nicht mehr möglich.[52, 54] Der Gianturco-Stent besteht aus interdigitierenden, spiralförmig angeordnet aus gewelltem, rostfreiem Stahl bestehenden, ca. 0,015 mm starken Filamenten.[53] Der Strecker-Stent ist eine Kabel-Maschen-Röhre, bestehend aus einem einzigen Tantal-Filament von 0,07 mm Stärke. Das Tantal ist in eine Serie von locker angeordneten Loops eingebunden, so daß der Stent eine hohe Flexibilität sowohl in radialer, aber auch in longitudinaler Achse bekommt. Durch die Anzahl der Maschen definiert dieser Stent den Diameter bei höchster Expansion. Je mehr Maschen, desto größer das endgültige Lumen.

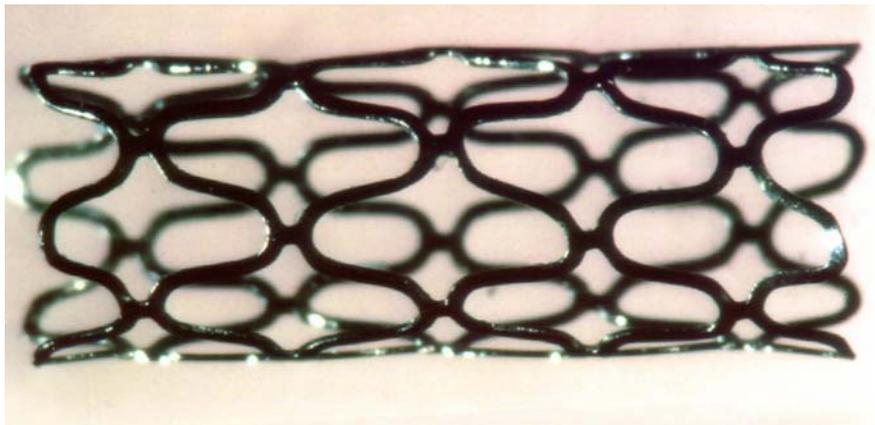


Abbildung 7: Palmaz-Schatz Stent (Originallänge 3 mm) (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. P.H. Grewe; Abteilung für Kardiologie und Angiologie Universitätsklinik Bergmannsheil, Bochum)

Indikationen für das Setzen eines Stents können akute Gefäßokklusionen, Präventionen von Restenosen, sowie verschiedene arterielle Verschlüsse z.B. der Ostien, Bifurkationen oder restenosierte Läsionen sein. Aber auch ein unzureichender Erfolg einer PTCA kann ein Grund für das Einsetzen eines koronaren Stents sein.[54] Die möglichen Nebenwirkungen sind weitgehend die

selben wie nach einer PTCA. Obwohl Spasmen, Infektionen und Entzündungsreaktionen nach Implantation eines Stents relativ selten auftreten, sind die thrombogenen Eigenschaften und die daraus resultierenden Thrombosen für den Patienten ein Risiko. Durch unterschiedliche Medikation kann dem zwar entgegengewirkt werden, die zu Grunde liegende Ursache ist damit jedoch nicht beseitigt. Dennoch ist es durch Stents gelungen die Restenoserate zu vermindern, die Blutungskomplikationen zu verringern, die primäre Konstitution des Patienten durch das schnelle Gewährleisten eines großen Lumens und des damit verbundenen besseren Blutflusses zu verbessern und auch den Krankenhausaufenthalt zu verkürzen. Außerdem tragen diese Vorteile auch noch zu einer erheblichen Kostenersparnis bei.[55]

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Spenderpopulation

Vor Beginn dieser Studie wurde das Protokoll von der Ethikkommission genehmigt. Von allen Blutspendern wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt. Elf gesunde Spender, die Nichtraucher waren, wurden aus dem Pool der Dauer-Blutspender der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) ausgewählt. In den letzten 4 Wochen vor Beginn der Studie hatten sie keine Medikamente eingenommen, und wurden angewiesen, sich vor der ersten Blutentnahme sowie der anschließenden Plasmapherese keiner stärkeren physischen Anstrengung zu unterziehen.

### 2.2 Blutentnahme, Vorbereitung und Plasmapherese des plättchenreichen Plasmas

Die Blutproben wurden den Probanden mittels einer 16G Nadel zwischen 8<sup>00</sup> und 10<sup>00</sup> Uhr morgens entnommen. Insgesamt 75 ml venöses Blut wurden aus einer nicht gestauten, antekubitalen Vene mit Hilfe eines *ready-to-use* Röhrchens (Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland) entnommen. Die ersten 3 ml wurden, um bereits aktivierte Thrombozyten von der Verwendung auszuschließen, verworfen. Das Blut wurde mit 3,8% Natriumzitrat gemischt. Direkt nach der Entnahme wurden die Proben für 10 Min. bei 300 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang erfolgte bei Raumtemperatur (20° C ± 2° C). Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde das plättchenreiche Plasma (PRP) abgehoben und der Rest für weitere 10 Min. bei Raumtemperatur und 2500 x g zentrifugiert, um plättchenarmes Plasma herzustellen (PPP). Die Proben wurden dann mit Hilfe eines Coulter-Zellzählgerätes STKR<sup>®</sup> (Beckmann-

Coulter, Miami, FL, USA) auf eine Konzentration von 250 Thrombozyten/ nl eingestellt.

Für die Analyse mit der Massenspektroskopie (ICP-MS) und der Atomabsorptions-Massenspektrometrie (AAS) wurde AB-Plasma verwendet, das mittels Plasmapherese mit einer Ein-Nadel-Technik gewonnen wurde (Haemonetics, Braintree, MA, USA).[56]

## 2.3 Das *in vitro*-Modell

Die *in vitro*-Untersuchungen der Stents wurden in einem Schlauchsystem durchgeführt (siehe Abbildung 7).[57] Dieses System bestand aus Polyvinylchlorid (PVC) (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) mit einer Länge von 82 cm. Der nicht expandierte Stent wurde auf einen herkömmlichen, nicht aufgeblasenen, polyäthylenhaltigen, perkutanen Angioplastie-Ballonkatheter (Boston Scientific, Watertown, MA, USA) aufgesetzt und in das tubuläre System eingeführt. Danach wurde der Stent mit einem Druck von 8 Atm. auf einen endgültigen Durchmesser von 3 mm aufgedehnt.

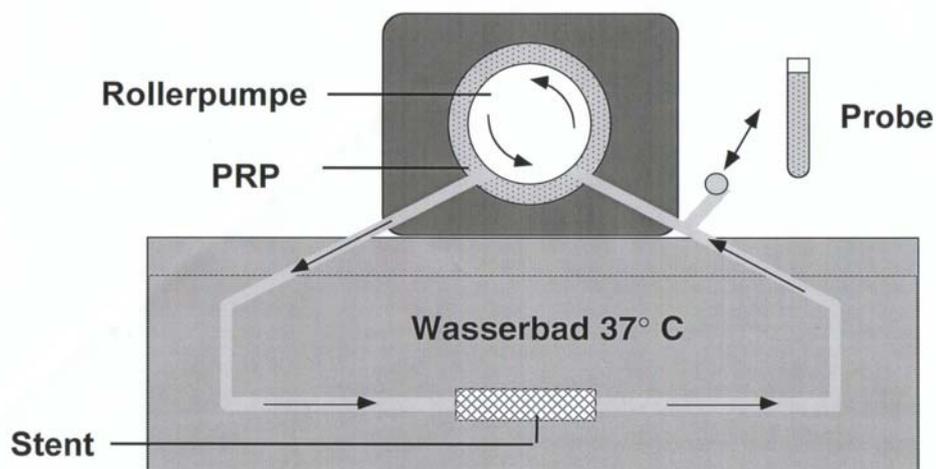


Abbildung 8: *In-vitro* Schlauchsystem

Direkt nachdem das PRP hergestellt worden war, wurden 6 ml entnommen und in das Schlauchsystem über einen Dreiwege-Hahn eingefüllt. Das PRP wurde dann mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf eine physiologische Kalziumkonzentration rekalkifiziert. Mittels einer Rollerpumpe (Ismatec, Zürich, Schweiz), wurde das Plasma mit einer Geschwindigkeit von 10 Umdrehungen pro Min. durch das geschlossene System zirkuliert. Dadurch erhielten wir eine Flußrate von 8 ml/ Min. bei einer Geschwindigkeit von 2 cm/s. Bei den Untersuchungen wurde die Temperatur mit Hilfe eines Wasserbads konstant auf 37°C gehalten. Bei jedem Versuch haben wir mit drei parallelen Systemen gearbeitet. In einem System war ein DLC-beschichteter Stent, im zweiten ein unbeschichteter Stent platziert. Das dritte, parallele System war leer (kein Stent) und diente so als Kontrollsystem. Dadurch wurde ein Vergleich unter denselben Untersuchungsbedingung gewährleistet.

## 2.4 Durchflußzytometrische Analyse

Bei den durchflußzytometrischen Untersuchungen haben wir monoklonale Antikörper (mAK) vom IgG-Typ verwendet, die direkt mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) konjugiert waren. Bei allen Analysen wurde sichergestellt, daß die mAK nach vorher erfolgter Titration in einer gesättigten Konzentration vorlagen, so daß alle exprimierten Stellen der Blutzellen markiert werden konnten. Bei den Versuchen wurde CD41a (GP IIb-IIIa), CD42b (GP Ib-V-IX; GP Ib- $\alpha$  Kette), CD62p (P-Selektin) und CD63 (GP53) eingesetzt; Ein IgG mAK wurde als unspezifische Isotyp-Kontrolle eingesetzt (Coulter-Immunotech, Hamburg, Deutschland). Alle mAK stammten von Coulter-Immunotech.

Aliquots des PRP wurden vorsichtig über den Dreiwege-Hahn in einem Intervall von 2 Min. (also 0, 2, 4, 6, 8, 10 Min.) aus dem Schlauchsystem entnommen. Zu den vorbestimmten Zeitpunkten wurden von den so erhaltenen Proben je 100 $\mu$ l PRP sofort in ein Röhrchen (Greiner, Hamburg, Deutschland) umgefüllt. Die Probe wurde durch einen 0,15 M Phosphatpuffer (PBS, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) sofort fixiert. Die Fixationslösung bestand aus 0,2%

w/v Glyoxal (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,4% w/v Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland).[58] Danach wurden sie 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt, der 0,2% w/v Glycin (Serva, Heidelberg, Deutschland) enthielt, und so stabilisiert. Zu den Proben wurden dann die mAK hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur (20°C;  $\pm 2^\circ\text{C}$ ) für 30 Min. Danach wurden die Proben einmal mit PBS (Gibco BRL) gewaschen, und in 1ml PBS resuspendiert. Dadurch war es möglich, sie bei einer Temperatur von +4°C bis zu 3 Stunden vor der Durchflußzytometrie aufzubewahren.

Alle Proben wurden anschließend an einem FACScan<sup>®</sup>-Zytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) analysiert. Um die Präzision des Zytometers zu sichern, wurden täglich fluoreszierende Beads gemessen (CaliBRITE<sup>™</sup>, Becton Dickinson). Auch die Kompensation des Zytometers wurde täglich überprüft (CaliBRITE<sup>™</sup>, Becton Dickinson). Um Zelltrümmer und elektronisches Rauschen auszuschließen, wurde der *threshold* im *forward scatter* (FSC) gesetzt. Die Plättchen konnten dann auf Grund ihrer charakteristischen FSC- und *side scatter* (SSC) -Streuung identifiziert werden. Die Fluoreszenz wurde logarithmisch dargestellt. Die erstellten List-Mode-Daten wurden gesammelt und mit der CellQuest<sup>®</sup>-Software (Becton Dickinson) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden dann in arbiträren Einheiten als *mean channel fluorescence intensity* (MCFI) dargestellt. Als spezifisches Ergebnis wurde eine MCFI gewertet, die höher als die der Isotopenkontrolle lag. Den endgültigen Wert erhielt man dabei durch Abzug der MCFI der Kontrollen (unspezifische MCFI) von den Ergebnissen der spezifischen MCFI.[59]

Nach jedem Experiment wurden die Stents aus dem Röhrensystem entnommen und lichtmikroskopisch untersucht (Zeiss, Jena). Um die Plättchen, die sich an der Oberfläche angeheftet hatten zu untersuchen, wurden sie mit MGG-Lösung (May-Grünwald Giemsa; Merck, Darmstadt) angefärbt.

## 2.5 Zellkultur

### 2.5.1 Untersuchung des Wachstums von glatten Muskelzellen

Die Gewebeproben wurden, wie in Quelle [60] beschrieben, entnommen. Aus den Proben wurden glatte Muskelzellen wie folgt gewonnen: nachdem Teile der Adventitia separiert waren, wurden sie mit 1 mg/ml Kollagenase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Endothelzellen wurden nun entfernt und die Gewebeprobe mit einem Skalpell zerstückelt und für weitere 2 Stunden in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) bei einer Temperatur von 37°C in folgender enzymatisch aktiven Lösung inkubiert: 0,2 mg/ml Elastase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), 1,8 mg/ml Kollagenase (Worthington CLS III, Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1mg/ml Soja Glycin Trypsin-Inhibitor. Die so isolierten Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit einer Schicht von Dulbecco´s modifiziertem *Eagle´s Medium* (DMEM, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland), der mit HEPES (25 mM, pH 7,4, Gibco BRL) abgepuffert war, gelagert. Weiterhin kam zusätzlich 10%iges fetales Kälberserum (Gibco BRL) sowie Antibiotika (100 U/ml Penicillin und 100 µm/ml Streptomycin; Boehringer, Mannheim, Deutschland) hinzu. Um Subkulturen dieser Zellen anzulegen, wurden Monolayer erst in eine Lösung mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gebracht, und anschließend in eine Lösung aus 0,2%igem trypsinhaltigem (Gibco, BRL) mit Kalzium- und Magnesium-freien Phosphatpuffer (PBS, Gibco, BRL).

Für die immunologische Bestimmung von glatten Muskelzellen, wurden diese auf einem Objektträger (Costar, Fernwald, Deutschland) pipettiert, und in Methanol (Sigma, Deutschland) 6 Min. lang bei -20° C fixiert. Die indirekte Fluoreszenzfärbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es folgte die Zugabe von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch das  $\alpha$ -Aktin von glatten Muskelzellen erkennen, gefolgt von einem sekundären mAK, der direkt mit

FITC konjugiert war (Boehringer, Mannheim). Die nukleare Gegenfärbung erfolgte mit 4,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI, Serva, Heidelberg, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,1 g/ml in PBS (Gibco BRL) für 20 Min. bei 37°C. Fluoreszenzmikroskopisch (IMT2, Olympus, Hamburg) konnte man dann SMC erkennen, die eine positive Reaktion mit dem  $\alpha$ -Aktin zeigten.

Die glatten Muskelzellen wurden in Triplets in eine Platte mit 24 Vertiefungen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit einer Dichte von  $10^4$  Zellen/Loch ausgesät, und in DMEM inkubiert, das 10%iges fetales Kälberserum (FCS (Gibco, BRL)) enthielt; 24 Stunden später wurden die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37°C in DMEM mit 0,5% FCS inkubiert. Danach wurden DLC-Stents der Kultur hinzugefügt. Das Wachstum der glatten Muskelzellen wie auch der Kulturen in denen unbeschichtete Stents plziert waren, wurde mittels DMEM, welches 10% FCS enthielt, stimuliert. Die Anzahl der Zellen wurde nach 3, 5, und 7 Tagen in einem automatischen Zählautomaten (CASY II, Schärfe System, Reutlingen) gemessen.[61]

## 2.5.2 Kulturen mit Endothelzellen

*Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) wurden enzymatisch mit einer 0,1%igen Kollagenaselösung (Sigma) gewonnen.[62] Anschließend wurden sie in einem Medium (M199, Gibco BRL) inkubiert, welches 20% fetales Kälberserum (FCS; Gibco, BRL) enthielt, weiterhin 50 mg/ml der Suspension mit den gewachsenen endothelialen Zellen (Sigma), 30 IU/ml Kalzium-Heparin (Nattermann, Köln), 80 IU/ml Penicillin (Boehringer Mannheim), 80 mg/ml Streptomycin (Boehringer Mannheim), 2,2 mg/ml Natrium-Bikarbonat (Gibco BRL) und 240 mg/ml L-Glutamin (Gibco BRL). Die Kulturen (Nunc) wurden dann mit 4 mg/cm<sup>2</sup> humanem Fibronectin vorbeschichtet, dann in einer Atmosphäre, bestehend aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>, bei 37°C inkubiert. Die Reinheit der HUVEC wurde durch die charakteristische „cobblestone morphology“ durch Untersuchungen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop (IMT2, Olympus) bestätigt. Die Markierung des Faktor VIII-Antigens wurde mittels eines Immunfluoreszenz-Mikroskops (IMT2, Olympus) analysiert. Wenn

keine Markierung für  $\alpha$ -Aktin gefunden wurde, schloß man daraus auf die Abwesenheit von glatten Muskelzellen. Kulturen, die mehr als 0,5% glatter Muskelzellen enthielten, wurden verworfen. Zellen wurden dann durch Behandlung mit Trypsin-EDTA (0.5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA; Gibco BRL) in der Kultur gelöst.

HUVEC wurden im Dreifachansatz in Vertiefungen von vorgefertigten Platten pipettiert mit einer Dichte von  $10^4$  Zellen/well. Danach wurden sie wie oben beschrieben in Kulturen gezüchtet. DLC-Stents wurden den Kulturen zugefügt und das Wachstum von HUVEC darauf folgend mit einem Medium stimuliert, das 20% FSC enthielt. An den Tagen 3, 5 und 7 wurden nach Fixierung durch Trypsin-EDTA die Zellanzahl in einem CASY II Zählautomaten (Schärfe System) gemessen.

Zur Analyse der Toxizität von Stents wurden  $10^4$  glatte Muskelzellen und HUVECs in Platten mit 24 Vertiefungen wie oben beschrieben kultiviert. Die Toxizität der Stents auf die Zellen wurde durch Trypanblau (0,5 % in 0,85 % Lösung) manifestiert und am 3., 5. und 7. Tag untersucht.

## 2.6 Videomorphometrie

Die morphometrischen Analysen der Stents wurden mittels eines Video-unterstützten Morphometers erstellt (VIDAS, Kontron, Deutschland). Gemessen wurden die noch nicht expandierten Stents, wie auch Stents nachdem sie durch einen Ballon mit 12 Atm. Druck auf 3 mm Durchmesser aufgedehnt worden waren. Vor jeder Messung wurde noch eine Drei-Punkt-Kalibration durchgeführt. Die Analysen selbst wurden mit Hilfe von digitalen Videofenstern (CCD Kamera AVT-BC2, AVT, Horn, Deutschland) und einer 20-fachen Vergrößerung (Wild-Mikroskop, Wild, Heerbrugg, Deutschland) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Oberfläche wurde mit Hilfe eines Cursors die Metalloberfläche abgetastet und die erhaltenen Pixel der beschriebenen Areale mit einem, bei der Kalibrierung errechneten, Referenzwert multipliziert. Zur

zweidimensionalen Längen- und Oberflächenermittlung wurde der Stent aufgeschnitten und mit einem expandierten Ballon flach ausgerollt (Speedy Plus PTCA-Ballon, 3,0 mm, Schneider Europa, Deutschland). Länge, Durchmesser und die Metalloberfläche von allen Abschnitten der Stents wurden daraufhin gemessen und in morphometrischen Einheiten angegeben.

## 2.7 Rasterelektronenmikroskopie (*scanning electron microscop*)

Um eine exaktere Analyse des Designs der Stents zu erhalten, wurden Untersuchungen mit einem Rasterelektronmikroskop (DSM 940, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Um eine iatrogene Kontamination und Veränderungen der Oberfläche zu vermeiden, wurden die Stents ohne Kontakt mit biologischem- oder Fremdmaterial den anschließenden Untersuchungen weitergegeben. Diese Messungen wurden unter Vakuum ( $10^{-3}$  Pa bis  $10^{-5}$  Pa) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Struktur der Stents wurde sowohl vor als auch nach der Dilatation durch einen Speedy Plus-Ballonkatheter analysiert, wobei der Druck, mit dem der Ballon aufgeblasen wurde, 12 Atm betrug. Chemische Elemente der Oberfläche wurden mit einer 200-fachen Vergrößerung, die Oberflächenstruktur mit einer 1000-fachen Multiplikation dargestellt. Die Expansion der Stents wurde in der originalen, noch sterilen, Verpackung durchgeführt.

## 2.8 Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse (*energy dispersive x-ray analysis*)

Um Informationen über die DLC-beschichteten Stents zu bekommen, wurde auf eine Mikroanalyse mittels Röntgenstrahlen zurückgegriffen, bei denen die gleichen "Standardbedingungen" vorlagen wie bei den SEM-Untersuchungen. Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, eine semiquantitative Analyse von

Elementen der Metallegierung und der Beschichtung selbst zu erstellen. Durch die rückwärtige Bestrahlung der Stents kam es zu einem Zusammenstoß der Elektronen mit der Oberfläche und Gammaquanten wurden freigesetzt. Die bei der SEM freigesetzte, charakteristische Röntgenstrahlung wurde benutzt, um eine semiquantitative Analyse der Oberflächenelemente durchzuführen und die Probenpartikel nicht zu zerstören. Die Messung erfolgte an einem Oxford-Link-Analyser (Oxford Instruments, Wiesbaden, Deutschland) mit einem Berillium-Detektions-Set. Wegen der hohen Freisetzung von Röntgenstrahlen und der sehr begrenzten Detektionsrate (Wellenlänge  $<1\text{keV}$  (NaK-Strahlung)), konnten Elemente mit einer Massenzahl, die kleiner war als 11 (Kohlenstoff), nicht mehr erkannt werden.

## 2.9 Atomabsorptionsmassenspektrometrie (*atomic absorption spectrometry*)

Nach der Plasmapherese wurde das humane Plasma bei einer Temperatur zwischen  $+2^{\circ}\text{C}$  und  $+4^{\circ}\text{C}$  in einem temperierten Raum für Blutkonserven gelagert. Für die Atomabsorptions- (AAS) und die Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) wurden jeweils 8 ml Plasma in 12 Plastikbehältnisse (Hain Diagnostika, Nehren, Deutschland) gefüllt. In die Küvetten wurden jeweils 6 beschichtete (DLC) und 6 unbeschichtete Stents gelegt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Heraeus, Hanau, Deutschland). Alle Proben wurden mehrmals pro Tag vorsichtig gemischt um einen optimalen Kontakt von Stent und Plasma herzustellen. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden dann jeweils 2 ml des Plasmas aus den Proben entnommen und daran die Freisetzung von Nickel-, Chrom-, Mangan- und Molybdän-Ionen untersucht. Um einen Referenzwert bzw. einen Nullwert zu erhalten, wurden die gleichen Untersuchungen an unbehandeltem Plasma durchgeführt. Sie wurden später auch als Basiswerte für die Endberechnungen herbeigezogen.

Für die Untersuchungen der Atomfreisetzung wurde ein Elmer Zeeman 5100PC Spektrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) benutzt, der mit einem HGA-600

Graphit-Röhrenbeschleuniger und einem AS-60 Autosampler (Perkin-Elmer) bestückt war. Damit wurden die Nickel- und Chrom-Analysen durchgeführt.[63, 64] Die Wellenlänge des Instruments lag bei  $\lambda$  232 nm bei der Nickeluntersuchung und bei  $\lambda$  357,9 nm bei der Chromanalyse. Die Schlitzöffnung betrug 0,2 nm bei Nickel bzw. 0,7 nm bei Chrom. Die Lichtquelle wurde auf 25 mA eingestellt; für die Atomisierung wurde eine beschichtete Graphitröhre (Perkin Elmer) benutzt. Die unterschiedlichen Temperaturstufen sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) angegeben.

Tabelle 1: Grund- und Temperatureinstellungen für die Untersuchung von Nickel- und Chromionen mittels der AAS (Atomabsorption)

<b>Nickel</b>						
Stufe	1	2	3	4	5	6
Temperatur (°C)	80	120	1400	2500	2600	
Anlaufzeit/sec	10	30	30	0	1	
Verweildauer/sec	10	30	20	5	5	
Interne Gasflußrate ml/Min.	300	300	300	10	300	

<b>Chrom</b>						
Stufe	1	2	3	4	5	6
Temperatur (°C)	80	120	900	1200	2500	2600
Anlaufzeit/sec	10	40	10	1	0	1
Verweildauer/sec	10	30	20	20	5	5
Interne Gasflußrate ml/Min.	300	300	110	110	20	300

Um die Matrixindifferenzen zu minimieren wurde für die Beurteilung von Nickel und Chrom eine Standard-Additionsmethode herbeigezogen. Als Reagenz wurde eine Lösung, bestehend aus destilliertem Wasser (Easypure RF, Barnstead Thermolne, Dubuque, Iowa, USA) und 1 ml/l Nitrit (Merck) benutzt. Gleiche Teile der Standardlösung und Nickelstandard (20 ng/ml und 40 ng/ml;

Riedel de Häen, Hannover) wurden in Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg) mit den Proben vermischt. Bei den Chromproben wurde der Chromstandard (20 ng/ml und 40 ng/ml; Riedel de Häen) verwendet. Nach der Zentrifugation wurden die Proben in Doppelbestimmung analysiert. Mit Hilfe einer Software (Perkin-Elmer) wurde eine Kalibrationskurve der Proben erstellt, mit der die Konzentration der abgegebenen Nickel- und Chrom-Ionen errechnet werden konnte.

## 2.10 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*)

Molybdän und Mangan sind gleichzeitig mit einem HP 4500 ICP-MS (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Deutschland) untersucht worden. Auch bei der ICP-MS-Analyse wurden gleiche Teile der Referenzlösung, des Standards und der Proben in Plastikküvetten (Hain Diagnostika) pipettiert. Als interner Standard wurden noch 10 µl Rhodium (10 µg/ml) und 2 ml Nitrit 65% (Merck) zu jeder Probe gegeben. Nach 15 Min. Inkubation, wurden weitere 6 ml des destillierten Wassers dazugegeben. Die so erhaltenen Proben wurden zentrifugiert und in den Autosampler (Hewlett Packard) gestellt. Die Standardkonzentrationen (Riedel de Häen) für Mangan lagen bei 25 ng/ml und 50 ng/ml und für Molybdän bei 5 ng/ml und 10 ng/ml. Die ICP-MS-Einstellungen waren: 1250 W; Durchflußrate des Plasmagases (Argon) war 15,0 l/min, Flußrate des Trägergases (Argon) 1,22 l/min und Mischgas (Argon) 0,1 l/min; Alle 2 Min. wurden Proben entnommen; die Rate der Wiederholungen lag bei zwei. Die Ionenlinsen wurden dabei genau auf eine Masse von 7,89 und 205 eingestellt.

## 2.11 *Diamond-like carbon* beschichtete intrakoronare Stents

Stents aus rostfreiem Stahl (316L) waren mittels einer hochfrequenten, chemischen Dampfstrahlmethode mit einem *diamond-like carbon* beschichtet worden (Phytis L.D.A., Funchal, Portugal). Diese Schicht hatte eine Dicke von ca. 70 nm und überzog die Innen- und Außenfläche des Stents (Diamant AS 9). Vor der Beschichtung wurde der Stent elektronisch gereinigt. Die noch nicht expandierten Stents hatten eine Länge von 8,6 mm und bestanden aus 4 DLC-beschichteten Stahlschleifen, sog. Loops, die durch eine Brückenstruktur zusammengefügt waren. Die normale Dicke der Stentwand betrug  $60\mu\text{m} \pm 10\%$ .

## 2.12 Statistik

Die Software-Programme Statview<sup>®</sup> 4,5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, USA) Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Redmond, WA, USA) und SPSS<sup>®</sup> (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) wurden für die statistischen Analysen verwendet. Der Datenvergleich während der Durchflußzytometrie, ASS und ICP-MS wurde mittels des Friedman-Tests analysiert. Die Ergebnisse der MCFI- und die Prozentwerte der AK-spezifischen, positiven Ergebnisse der Durchflußzytometrie, der ASS- und des ICP-MS Messung werden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  SD angegeben. Datenvergleiche in Bezug auf AAS- und ICP-MS Ergebnisse wurden post-hoc mittels des Wilcoxon-2-Proben-Tests berechnet. Ansonsten wurde der t-Test für andere Vergleiche verwendet. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Durchflußzytometrie und Lichtmikroskopie

In Vorexperimenten war das Schlauchsystem als Auslöser für eine eventuelle Aktivierung der Plättchen untersucht worden; da dies nicht der Fall war, konnte dies in der Arbeit ausgeschlossen werden.[65] Auch in der vorliegenden Studie konnten keine nennenswerten Änderungen bei Struktur- oder aktivierungsabhängigen Antigenen in den Kontrollsystemen festgestellt werden ( $p=0,6$  für CD41a;  $p=0,1$  für CD42b;  $p=0,9$  für CD62p und  $p=0,8$  für CD63). Ebenso konnten keine Mikropartikel nachgewiesen werden.

Untersuchungen der Stents zeigten keine Veränderungen der MCFI für die Strukturantigene CD41a und CD42b. Die MCFI von nicht beschichteten und auch von DLC-beschichteten Stents änderte sich während der Zirkulation nicht ( $p=0,6$  für CD41a und  $p=0,1$  für CD42b; siehe auch Tabelle 2).

Tabelle 2: Durchflußzytometrische Analyse von Strukturantigenen der Thrombozyten

<b>Zeit</b>	<b>ohne Stent</b>	<b>unbesch. Stent</b>	<b>DLC-Stent</b>	<b>ohne Stent</b>	<b>unbesch. Stent</b>	<b>DLC-Stent</b>
	<b>CD41a</b>	<b>CD41a</b>	<b>CD41a</b>	<b>CD42b</b>	<b>CD42b</b>	<b>CD42b</b>
<b>0. Min.</b>	1176,4 ± 67,2	1139,1 ± 82,6	1133,8 ± 116,6	332,1 ± 8,9	335,2 ± 30,6	324,8 ± 11,0
<b>2. Min.</b>	1155,0 ± 75,4	1142,0 ± 83,1	1132,8 ± 66,0	337,7 ± 13,9	347,6 ± 51,6	328,2 ± 10,2
<b>4. Min.</b>	1160,0 ± 68,5	1148,2 ± 97,8	1137,4 ± 60,6	324,1 ± 4,6	338,1 ± 41,1	336,6 ± 35,7
<b>6. Min.</b>	1173,3 ± 89,9	1147,1 ± 95,7	1156,0 ± 74,7	329,0 ± 14,9	333,8 ± 40,8	324,6 ± 52,2
<b>8. Min.</b>	1195,6 ± 65,6	1141,7 ± 85,8	1149,1 ± 37,2	336,8 ± 22,8	336,1 ± 40,7	331,6 ± 44,9
<b>10. Min.</b>	1173,4 ± 49,4	1136,1 ± 95,6	1104,6 ± 104,9	334,2 ± 13,8	341,5 ± 39,2	333,4 ± 43,4

Die durchflußzytometrischen Messungen zeigen, daß weder in den Systemen mit den unbeschichteten, noch in denen mit DLC-Stents oder in denen ohne Stent maßgebliche Veränderungen der Strukturantigene CD41a und CD42b. Die Ergebnisse sind im MCFI gemessen und als Mittelwert ± 1 SD angegeben.

Im Gegensatz dazu veränderte sich die Fluoreszenzintensität für die aktivierungsabhängigen Antigene CD62p und CD63 bei unbeschichteten Stents signifikant. Die Analyse von CD62p zeigte einen Anstieg der MCFI von  $13,3 \pm 1,4$  bei 0 Minuten auf  $54,7 \pm 6,2$  bei Minute 10 ( $p < 0,05$ ). CD63 stieg von  $13,3 \pm 0,8$  MCFI auf  $43,2 \pm 4,0$  MCFI an ( $p < 0,05$ ). Obwohl es auch bei den DLC-beschichteten Stents bei den Antigenen CD62p und CD63 zu einem Anstieg

kam, lag dieser um ein vielfaches niedriger als bei den Stents ohne die DLC-Beschichtung (CD 62p und CD63  $p < 0,05$  bei Minute 10 gegenüber der 0. Minute; siehe auch Tabelle 3).

Tabelle 3: Durchflußzytometrische Analyse der aktivierungsabhängigen Antigene von Thrombozyten

<b>Zeit</b>	<b>ohne Stent</b>	<b>unbesch. Stent</b>	<b>DLC Stent</b>	<b>ohne Stent</b>	<b>unbesch. Stent</b>	<b>DLC Stent</b>
<b>Min.</b>	<b>CD62p</b>	<b>CD62p</b>	<b>CD62p</b>	<b>CD63</b>	<b>CD63</b>	<b>CD63</b>
<b>0. Min.</b>	13,9 ± 1,7	13,3 ± 1,4	12,8 ± 1,1	13,7 ± 1,2	13,3 ± 0,8	13,1 ± 1,0
<b>2. Min.</b>	13,8 ± 1,0	19,8 ± 4,4	18,2 ± 2,1	13,5 ± 1,8	17,7 ± 1,7	15,1 ± 1,0
<b>4. Min.</b>	14,0 ± 1,4	27,8 ± 3,5	23,2 ± 1,8	14,0 ± 1,3	21,2 ± 1,9	18,7 ± 0,7
<b>6. Min.</b>	13,4 ± 1,5	33,5 ± 4,6	27,6 ± 2,7	13,5 ± 1,9	26,0 ± 2,0	21,9 ± 1,2
<b>8. Min.</b>	13,8 ± 1,6	40,4 ± 4,0	32,5 ± 2,6	13,8 ± 2,4	31,6 ± 2,1	25,1 ± 1,3
<b>10. Min.</b>	13,6 ± 1,5	54,7 ± 6,2	38,9 ± 4,7	13,8 ± 1,6	43,2 ± 4,0	31,2 ± 2,3

Während das plättchenreiche Plasma in dem *in vitro*-System zirkulierte, kam es zu einer Aktivierung der Thrombozyten. In dem System ohne Stents konnte keine Änderung der MCFI von CD62p und CD63 festgestellt werden. In dem System, in dem sich die unbeschichteten Stents befanden, konnte man allerdings eine signifikante Erhöhung feststellen. Im Vergleich dazu war der Anstieg der MCFI in den Systemen mit DLC beschichteten Stents um ein

vielfaches niedriger. Die Ergebnisse sind im MCFI gemessen und als Mittelwert  $\pm 1$  SD angegeben.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Stents zeigte nach Durchführung der Versuche, daß mehr Plättchen an der Oberfläche der unbeschichteten Stents adhärten als bei denen, die eine DLC-Beschichtung aufwiesen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein die fanden, daß bei Oberflächen, die mit einer chemischen Hochdruck-Diamant-Beschichtung versehen waren, es zu einer geringen Adhäsion, wie auch zu einer verminderten Aktivierung von Zellen kam.[17] Die lichtmikroskopischen Feststellungen sind zwar schwer zu quantifizieren; Man kann, da das Anheften an Materialien hauptsächlich auf aktivierte Thrombozyten zurückzuführen ist, jedoch folgern, daß die Menge an aktivierten Plättchen in der Suspension, bei der 316L Metallstents verwendet wurden, höher gewesen sein muß, als bei den DLC-beschichteten Stents.

### 3.2 Zellkultur: von glatten Muskelzellen und Endothelzellen

Die Vermehrungsrate der glatten Muskelzellen in den Kulturen mit DLC-Stents zeigte keinen grundlegenden Unterschied zu den Kontrollkulturen. Die Anzahl der SMC am 7. Tag lag bei  $7,1 \pm 0,7 \times 10^4$  Zellen und in der Kontrollkultur bei  $7,6 \pm 0,7 \times 10^4$  Zellen ( $p=0,65$ ). Die Vitalität, nachgewiesen durch Trypanblau-Färbung, lag bei 98% sowohl bei den beschichteten, als auch bei den unbeschichteten Stents. Die Proliferation von *HUVEC*-Endothelzellen bei DLC-beschichteten Stents unterschied sich nicht signifikant von der unbeschichteter Stents. Die *HUVEC*-Anzahl in Kulturen mit einem DLC-Stent lag am 7. Tag bei  $7,4 \pm 1,2 \times 10^4$  Zellen und bei der Kontrolle bei  $8,1 \pm 1,2 \times 10^4$  Zellen ( $p=0,37$ ). Die Zellvitalität lag hier bei 99%, sowohl bei DLC- als auch bei unbeschichteten Stents. Daraus kann geschlossen werden, daß das Zellwachstum von Endothelzellen, wie auch von glatten Muskelzellen von einem DLC-beschichteten Stent nicht beeinflusst wird. Außerdem konnten keine toxischen

Einflüsse durch die Beschichtung auf die untersuchten Zellen nachgewiesen werden.

### 3.3 *Videomorphometrie*

Die Videomorphometrie der DLC-beschichteten Stents zeigte eine Gesamtlänge der Stents von 8,78 mm in nicht expandierter Form und 8,19 mm nach der Ballondilatation. Die Länge des Hauptsegments - vom Ursprung an gemessen - betrug 1,19 mm vor und 1,32 mm nach Expansion, in der Mitte 1,44 mm bzw. 1,32 mm. Das Überbrückungssegment maß 0,12 mm bzw. 0,14 mm. Der äußere Durchmesser betrug 1,54 mm, in gedehnter Form 3,07 mm.

### 3.4 *Rasterelektronenmikroskopie (scanning electron microscopy)*

Unter Verwendung einer 200-fachen Vergrößerung konnte mit Hilfe des Elektronenmikroskops eine Oberflächenbetrachtung jeder einzelnen Strebe des Stents gewährleistet werden. Weitere Strukturanalysen zeigten 6 gedrehte Ringe, so wie aufeinander gesteckte Spiralen. Die Höhe jedes Ringes maß 80,6 µm und hatte eine Weite von 154,6 µm. Diese Hauptsegmente waren durch 6 Streben miteinander verbunden. Jede davon hatte eine Länge von 144,0 µm. Die Oberflächenbetrachtungen zeigten, daß diese sehr glatt waren und an allen Filamenten abgerundete Ecken hatten.

Die Stents waren mit einer Beschichtung von 1 nm Dicke überzogen, wobei diese an einigen Stellen etwas differierte. Obwohl der lumenale Teil der Stents in den meisten Teilen voll beschichtet war, konnte man einige kleine Stellen finden, an denen die Oberflächenbeschichtung dünner und die metallene Struktur der Stents leichter erkennbar war. Diese Areale machten ca. 20 % der luminalen Beschichtung aus.

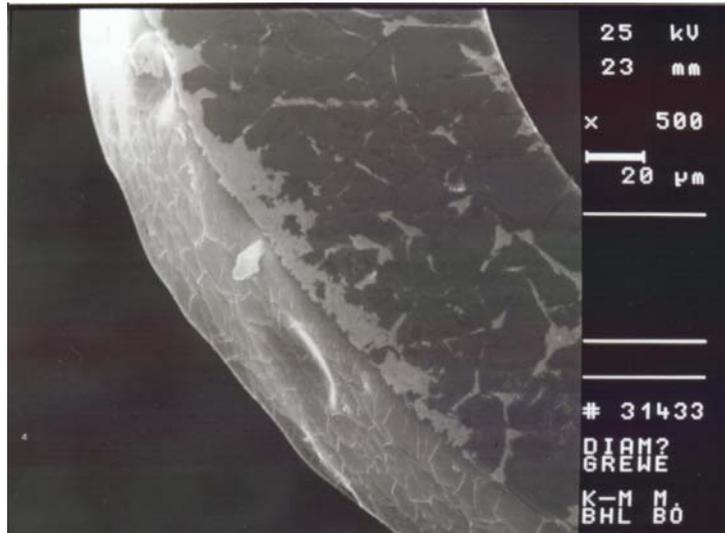


Abbildung 9: Darstellung der glatten Oberfläche eines DLC-beschichteten Stents in 500facher Vergrößerung (mit freundlicher Genehmigung von Dr. P.H. Grewe; Abteilung für Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinik Bergmannsheil, Bochum)

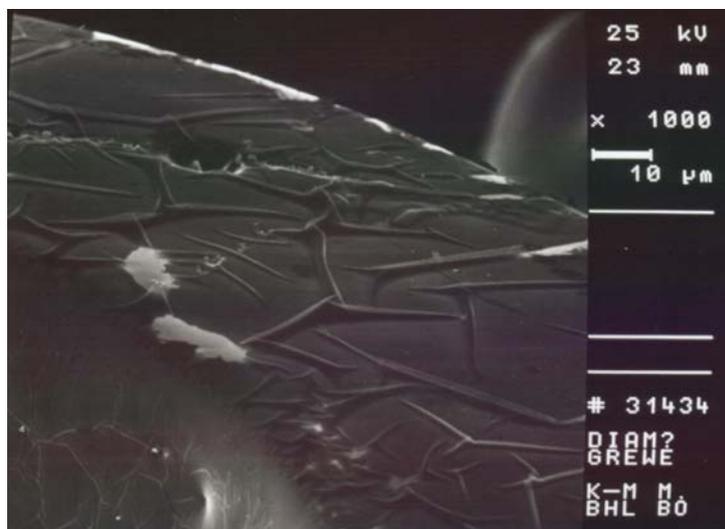


Abbildung 10: 1.000fache Vergrößerung eines beschichteten Stents mit kleinen, dünner beschichteten Arealen. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. P.H. Grewe; Abteilung für Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinik Bergmannsheil, Bochum)

### 3.5 Energiedispersive Röntgen-Mikroanalyse (*energy dispersive x-ray analysis*)

Bei der semiquantitativen Röntgenanalyse zeigte sich, daß die elementare Zusammensetzung der Metallegierung zu 65,1 % aus Eisen, 19,8 % Chrom, 12,0 % Nickel und 0,003 % Schwefel bestand. Diese Zusammensetzung ist charakteristisch für rostfreien 316L-Stahl. Die EDX-Ergebnisse waren bei beschichteten und unbeschichteten Stents deshalb gleich, da mit dieser Analyse nur Atome erfaßt werden können, die eine höhere Massenzahl als 6 haben.

### 3.6 Atomabsorptions-Massenspektrometrie (*atomic adsorption spectrometry*)

Die Genauigkeit der Interassay-Präzision für Nickel und Chrom lag bei 12,9 % und 4,7 %, während die Präzision des Intra-Assays bei 4,7 % und 7,9 % lag. Der Grenzwert der Erkennung lag für Nickel bei 0,9 ng/ml und für Chrom bei 0,3 ng/ml. Für Mangan und Molybdän betrug die Inter-Assay-Genauigkeit 1,9 % und 3,7 % ICP-MS Analyse, die der Intra-Assay-Präzision 7,9 % und 4,4 %. Die Erkennungsgrenze für Mangan und Molybdän lag bei 0,5 ng/ml bzw. 0,2 ng/ml. Die Hintergrundgeräusche bei AAS und ICP-MS lagen unter 10 Ereignissen pro Sekunde.

Bei der AAS-Analyse von Nickel- und Chromionen konnte über einen Zeitraum von 96 Stunden die Freisetzung hoher Mengen dieser Ionen bei den nicht beschichteten Stents festgestellt werden. Bei Nickel lag die Ionenabgabe bei  $100,7 \pm 72,0$  ng/8ml humanen Plasmas nach 24 Stunden ( $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert), und bei  $29,4 \pm 29,5$  ng/8ml nach 96 Stunden ( $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert). Bei Chrom lag die Freisetzung bei jeweils  $26,1 \pm 18,2$  ng/8ml nach 24 Stunden und  $17,0 \pm 16,0$  ng/8ml nach 96 Stunden ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu konnten bei den DLC-beschichteten Stents nur

sehr geringe Konzentrationen freigesetzter Nickel- und Chrom-Ionen nachgewiesen werden ( $p < 0,05$  im Vergleich zu nicht beschichteten Stents für Nickel und Chrom an allen Tagen; siehe Tabelle 4). Die Meßwerte zeigen hohe Werte bei den nichtbeschichteten Stents; bei den DLC-Stents wurden hingegen nur geringe Mengen von Nickel und unwesentliche Mengen von Chrom freigesetzt.

Tabelle 4: Ergebnisse der AAS für Nickel- und Chromionen.

<b>Zeit</b>	<b>Nickel unbeschichte t</b>	<b>Nickel DLC-Coat</b>	<b>Chrom unbeschichte t</b>	<b>Chrom DLC-Coat</b>
24 h	100,7 ± 72,0	14,3 ± 3,7	26,1 ± 18,2	1,5 ± 0,5
48 h	62,8 ± 48,0	15,0 ± 8,5	42,2 ± 33,8	1,4 ± 0,5
72 h	39,9 ± 38,6	12,2 ± 3,7	26,0 ± 25,9	1,5 ± 0,3
96 h	29,4 ± 29,5	7,1 ± 4,4	17,0 ± 16,0	1,4 ± 0,3

Die Mengen der Nickel- und Chromionen, die während der Lagerung von Stents in Plasma über einen Zeitraum von 96 Stunden abgegeben wurden, sind als Mittelwert ± 1 SD (n=6) dargestellt und beziehen sich auf Meßwerte in ng/8ml Plasma.

### 3.7 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*)

Ähnliche Eindrücke wurden bei den ICP-MS-Untersuchungen erzielt. Hohe Konzentrationen von Molybdän und Mangan wurden über alle Tage hinweg von den nicht beschichteten Stents freigesetzt ( $p < 0,05$  im Vergleich zum

Ausgangswert), während nur geringe Mengen dieser Ionen bei den DLC-beschichteten Stents gemessen werden konnten ( $p = 0,1$  für Molybdän und  $p = 0,4$  für Mangan verglichen mit deren Ausgangswert; siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Massenspektroskopische Analyse (ICP-MS) der Freisetzung von Mangan- und Molybdänionen.

<b>Zeit</b>	<b>Mangan unbeschichte t</b>	<b>Mangan DLC-Coat</b>	<b>Molybdän unbeschichte t</b>	<b>Molybdän DLC-Coat</b>
<b>24 h</b>	13,5 ± 6,1	1,3 ± 0,3	27,1 ± 11,0	2,9 ± 1,9
<b>48 h</b>	11,4 ± 5,0	0,9 ± 0,8	26,9 ± 12,4	3,5 ± 3,1
<b>72 h</b>	8,3 ± 3,9	1,7 ± 0,5	23,0 ± 8,9	3,2 ± 1,5
<b>96 h</b>	4,2 ± 1,9	1,4 ± 0,5	18,7 ± 3,7	2,4 ± 0,9

Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen die niedrigen Mengen freigesetzter Ionen bei DLC-beschichteten Stents. Im Gegensatz dazu wurden bei unbeschichteten Stents hohe Mengen an Molybdän- und Manganionen freigesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm 1$  SD ( $n=6$ ) dargestellt und beziehen sich auf Meßwerte in ng/8ml Plasma.

## 4

## Diskussion

Bisher wurden mehrere Versuche unternommen, um die Biokompatibilität intrakoronarer Stents zu verbessern und die Aktivierung von Thrombozyten herabzusetzen.[15] In dieser Studie wurde ein Profil über die *in-vitro* Bioverträglichkeit von Stents erstellt, die mit *diamond-like carbon* (DLC) beschichtet sind.

*Diamond-like carbon* ist eine chemisch sehr reaktionsträge, extrem harte und impermeable Beschichtung eines Hydrogenkarbonat-Gases.[16] Chemische sowie elektrische Widerstandsfähigkeit, aber auch ein niedriger Reibungskoeffizient und Wasserundurchdringlichkeit sind weitere Vorteile dieser für die biomedizinische Anwendung geeignete Substanz.[66] Die biologische Verträglichkeit von DLC wurde schon in verschiedenen Tests untersucht und nachgewiesen. *In vitro*-Tests an Fibroblasten von Mäusen zeigten, daß es durch die Verwendung von DLC zu keiner Zellschädigung kommt.[16, 67] Ähnliche Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe Parker et al. erarbeitet. Sie konnten *in vitro* an Mäusefibroblasten nachweisen, daß DLC auf diese Zellen nicht toxisch wirkt, sondern daß ein normales Wachstum stattfindet.[68] Lu et al. zeigten, daß DLC weder einen toxischen Effekt auf menschliche, embryonale Nierenzellen, HEK 293-Zellen, oder hämatopoetische ML-1-Myeloblasten hat.[66] Die Ergebnisse unserer Studie stehen im Einklang mit den oben genannten Erkenntnissen. Auch unsere *in vitro*-Untersuchungen zeigten weder einen toxischen noch einen wachstumsbehindernden Effekt von DLC auf glatte Muskelzellen aus Gefäßen oder endothelialen Zellen. Die Tatsache, daß es durch DLC zu keiner Veränderung der Zellproliferation der Endothelschicht kam, ist ein Hinweis auf die "weiche Endothelisierung", also die Einbettung von Stents in die Gefäßwände. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die Vorbeugung von Stent-induzierten Thrombosen und Restenosen innerhalb der Stentlumina.[69]

Die Labortechniken, die bis heute für die meisten Versuche von Biomaterialien herangezogen wurden, haben immer eine Zellsuspension als Ganzes untersucht. Es ist jedoch die einzelne Zelle, die auf einen gegebenen Stimulus

reagiert. Eine Technik, die alle Möglichkeiten implementiert, um einzelne Zellen zu untersuchen, ist die Durchflußzytometrie.[18, 70] Durch diese hochsensitive Multiparameter-technik ist es möglich geworden, zelluläre Antigene und deren Veränderungen, die durch den Kontakt mit biologischen Materialien induziert werden, zu analysieren.[71] Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, daß diese Methode auch bei *in vitro*-Versuchen für Stents eingesetzt werden kann.[65] In Untersuchungen konnten wir bei der Messung der Strukturantigene CD42b (GPIb-V-IX) und CD41a (GPIIb-IIIa) weder eine Veränderung der Antigenexpression in den Kontroll-Schlauchsystemen, also den *in vitro*-Systemen ohne Stents, noch in den Systemen nachweisen, in denen sich entweder ein unbeschichteter oder ein DLC-beschichteter Stent befand. Weiterhin konnte auch keine Plättchenaktivierung in den Kontrollsystemen festgestellt werden: Ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz-Expression von CD62p (P-Selektin) und CD63 war allerdings in den Systemen festzustellen, in denen sich unbeschichtete 316L Stahl-Stents befanden.

CD62p und CD63 sind zwei Antigene, die eine Aktivierung von Thrombozyten anzeigen. Es sind Glykoproteine, die, nachdem das Plättchen von bestimmten Stimuli aktiviert worden ist, aus intrazellulären Kompartimenten, bei CD62p aus den  $\alpha$ - und bei CD63 aus den lysosomalen Granula, an die Zelloberfläche transloziert werden. Dies geschieht nach erfolgtem Stimulus durch Sekretion über das Oberflächen-verbundene Kanalsystem (*surface connecting canalicular system*). Durch dieses werden die Antigene auf die äußere Zelloberfläche der aktivierten Thrombozyten geschleust und dort exprimiert. Hier können sie dann später mit mAK markiert und durchflußzytometrisch detektiert werden.[72, 73]

Thrombozyten reagieren sehr sensibel auf verschiedene Stimuli, durch die sie auch aktiviert werden können. Deshalb eignet sich die Messung der Thrombozytenaktivierung auch als Mittel, um die Verträglichkeit von neuen Biomaterialien und Instrumenten zu untersuchen.[9, 65, 74] Die Ursache für den Anstieg der Expression von Antigenen, die nur bei Aktivierung nachweisbar ist, liegt unter anderem im Kontakt des Blutes mit der nicht-biologischen Metalloberfläche.[9, 10] Aber auch durch Scherkräfte, Unterschiede der Fließbedingungen in der Nähe der Stents, sowie Turbulenzen an den nicht-

biologischen Metalldrähten der Stents, also durch den nicht endothelialen Kontakt, können Veränderungen der Thrombozytenantigene erfolgen. Meist kommt es dabei zu einer Aktivierung der Plättchen und zu damit verbundenen, erhöhten thrombotischen Potentialen.[9, 75]

Unsere durchflußzytometrischen Analysen haben ergeben, daß im Vergleich zu den nicht beschichteten 316L-Stahlstents, die DLC-Stents eine signifikant niedrigere Plättchenaktivierung nach sich ziehen. Dies ist deshalb von Bedeutung, weil durch die Aktivierung bestimmte Wachstumsfaktoren freigesetzt werden können, z.B. der *platelet-derived growth factor*, oder der *basic fibroblast growth factor*. Sie wirken vor allem als Trigger bei der Entstehung von Restenosen.[76, 77] Diese Faktoren sind Mitogene und üben einen pharmakologischen Einfluß auf die glatte Gefäßmuskulatur aus. Weiterhin steigern Sie auch noch die Syntheserate von Matrixproteinen. Sowohl Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen, als auch die Synthese der Matrix sind pathophysiologische Vorgänge, die direkten Einfluß auf die Restenose haben können.[76, 77] Daher ist es anzustreben, die Thrombozytenaktivierung und die daran gekoppelte Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu minimieren oder zu inhibieren. Dies kann bei Stents durch eine Beschichtung der Oberfläche erreicht werden.

DLC-Beschichtungen sind für ihre besonders weiche Oberfläche bekannt, so daß Scherkräfte, die an der Kontaktzone zwischen Blut und Biomaterial entstehen, deutlich verringert werden. Verglichen mit anderen Stentmodellen zeigten die Ergebnisse unserer elektronenmikroskopischen Analysen der DLC-beschichteten Stents eine sehr glatte Oberfläche mit homogenen, rund geformten Streben.[78] Auch ließ sich durch die morphometrischen Videoanalysen die sehr homogene Expansion der Stents nachweisen. Ebenso ließen sich keine Überexpansionen der Stents nachweisen, wie sie manchmal in Gebieten arterieller Wandverletzungen *in vivo* vorkommen. Die Oberflächenstruktur und das Expansionsverhalten dieser Stents hat daher möglicherweise eine Reduktion der Scherkräfte und der konsekutiven Aktivierung der Plättchen im *in vitro*-Modell mitbewirkt.

Die Tatsache, daß der Unterschied zwischen den Stents (316L stainless steel  $\pm$  DLC) nur in der Oberflächenbeschichtung zu liegen scheint, liefert noch keine Erklärung für die niedrigere Aktivierung der Thrombozyten bei den DLC-beschichteten Stents. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Stents mittels der Röntgenmikroanalyse untersucht.[79] Hierbei konnten nur kleine Areale der zugrundeliegenden Nickel-Chrom-Legierung entdeckt werden. Die Carbon-Bestandteile konnten mit dieser Technik allerdings nicht nachgewiesen werden, da mittels dieses Verfahrens nur Atome erkannt werden können, die eine höhere Massenzahl als 11 besitzen. Bei der elektronenoptischen Untersuchung der Stentareale durch das Rasterelektronenmikroskop konnte dennoch eine nahezu komplette DLC-Beschichtung der inneren, aber auch der äußeren Oberfläche der Stents festgestellt werden. Nur minimale Oberflächen-Areale zeigten eine Verminderung der DLC-Schichtdicke.[79]

Vor ca. 40 Jahren hat man herausgefunden, daß Oberflächen von Biomaterialien mit Carbon beschichtet werden können.[80] In Analogie zu dieser Technik wurde auch der DLC-Stent in unserer Studie beschichtet. Dazu wurde ein chemisches Verfahren gewählt, das die Beschichtung mittels Dampf aufträgt. Diese Methode konnte so modifiziert werden, daß es möglich wurde, sowohl die innere, als auch die äußere Oberfläche des Stents mit der DLC-Schicht zu überziehen. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu den meisten kommerziell erhältlichen Stentmodellen, die häufig nur auf der Außenseite eine Beschichtung tragen. Zusätzlich haben viele Stents nur eine unvollkommene Beschichtung. Man spricht dann von sog. "schwarzen Löchern".[52] In diesem Fall fehlen die protektiven Eigenschaften in diesen Bereichen, wodurch ein direkter Kontakt zwischen Blut und dem Biomaterial ermöglicht wird, und so die erwähnten Nebenwirkungen induziert werden können. Wenn diese Stents während der Expansion in die arterielle Wand gedrückt werden, interagieren sie mit den Endothelzellen und den glatten Muskelzellen der Gefäßwand der Arterien. Die innere Oberfläche der Stents, der diese bioverträgliche Beschichtung fehlt, tritt mit dem Blut und den anderen Blutbestandteilen in Kontakt.

Alle diese Charakteristika, das Fehlen bzw. die nicht vollständig vorhandene Beschichtung der Stents, resultieren in einer erhöhten Interaktion des Blutes mit

den Bioprothesen. Wie bereits erwähnt, war die Thrombozytenaktivierung, die mittels durchflußzytometrischer Verfahren untersucht worden ist, bei den *in-vitro*-Versuchen, die unter identischen experimentellen Bedingungen stattfanden, mit den nicht-beschichteten Stents signifikant höher als bei Versuchen mit DLC-beschichteten Stents. Der Aktivierungsprozeß der Plättchen wird wahrscheinlich auch durch sehr geringe Konzentrationen von Metallionen getriggert.[11] Deshalb gingen wir von der Hypothese aus, daß ungleich mehr Metallionen von dem Stent abgegeben werden, wenn keine Beschichtung vorliegt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, setzten wir die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) ein. Diese Technik gestattet die simultane Detektion von Mangan- und Molybdänionen. Die ICP-MS-Methode ist eine Multielement-Technik mit breitem dynamischen Spielraum, niedrigem Hintergrund und exzellenter Signalstabilität. Aufgrund von Matrixinterferenzen war es nicht möglich, Nickel- oder Chromionen mit der ICP-MS Methode zu detektieren. Hierfür wurde die Atomabsorptionsspektrophotometrie eingesetzt. Diese sind zur Zeit die geeignetsten Methoden für eine quantitative Erfassung von Ionen mit höchster Spezifität und Selektivität. Die Ergebnisse unserer Analysen zeigten eine signifikante Abgabe von Metallionen bei nicht-beschichteten Stents. Die Ionen, die wir analysiert haben - Chrom, Mangan, Molybdän und Nickel - stellen Komponenten der 316L-Stahlstents dar. Die Ionenabgabe folgte dabei einer abnehmenden Tendenz während der vier-tägigen Untersuchung. Dieser Effekt wurde wahrscheinlich durch die Sättigung oder Modifikation der Stentoberfläche ausgelöst, zum Beispiel durch Proteinadsorption oder durch Ablagerungen von Plasmabestandteilen auf dem Metall. Im Gegensatz zu den 316L-Stents konnte bei den DLC-beschichteten Stents keine bzw. nur eine geringe Abgabe dieser Metallionen gemessen werden.

Einer der Hauptursachen für das Scheitern von Metallimplantaten ist die Korrosion.[16] Die Gruppe von Fergusson, aber auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß verschiedene Metallarten nach einer Implantation zu einem bestimmten Grad korrodieren.[81, 82] Außerdem konnte Fergusson herausfinden, daß, wenn es zu einer lokalen Anhäufung eines Elements in der Umgebung eines Implantats kommt, dieser Prozeß auch stattgefunden hätte, wenn das Element in der Legierung des Implantats enthalten gewesen

wäre.[81] Klein und Kollegen demonstrierten, daß sogar eine kleine Menge von Metallionen häufig verwendeter Legierungen bei Prothesen die Zelladhäsion und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1, ELAM-1 und GMP-140 (P-Selektin) innerhalb weniger Minuten steigert.[11] Eine erhöhte Expression dieser Liganden wurde auch von anderen Gruppen festgestellt.[83] Diese Moleküle, die zu der Familie der Selektine und Immunglobuline gehören, sind wichtige Bestandteile für die Adhäsionsprozesse von Thrombozyten und Leukozyten mit den Gefäßendothelien.[84] Nach deren Expression auf der Zelloberfläche binden sie über NH<sub>2</sub>-terminale, Lektin-ähnliche Domänen des Selektins mit ihren zugehörigen Rezeptoren, die aus spezifischen Kohlenhydratketten aufgebaut sind, mit Leuko- oder Thrombozyten. Normalerweise interagieren während dieses Vorganges vor allem polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) und Monozyten mit der aktivierten endothelialen Zelloberfläche.[85] Die aktivierten Granulo- und Monozyten beeinflussen wiederum die Integrität der Plasmamembran, aktivieren die Zellen der Membran und führen so zur Bildung weiterer Bindungsstellen für Zellen, wodurch in Folge pathophysiologische Prozesse, wie Entzündungen und Thrombosen hervorgerufen werden.[85] Das thrombogene Potential wird dabei durch Metallionen und aufgrund einer Reduktion der Fließgeschwindigkeit des Blutes in betroffenen Arealen, weiter erhöht. Das konnte jedenfalls für Nickelionen in einer Tierstudie gezeigt werden, bei der schon geringe Mengen dieses Elements zu einer Vasokonstriktion in Arterien eines Hundeherzens führten, welche durch einen verstärkten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand hervorgerufen wurde.[86]

Patienten, bei denen eine Koronarangioplastie oder eine Stent-Implantation durchgeführt wurde, haben ein erhöhtes Risiko für eine Reokklusion oder Restenose der Gefäße, wenn Thrombozyten eine erhöhte Menge an aktivierungsabhängigen Antigenen exprimieren.[87, 88] Die Aktivierung der Plättchen wird vorwiegend durch Scherkräfte und den Kontakt von Blut mit dem Biomaterial hervorgerufen, zu dem wahrscheinlich auch der Einfluß von Metallionen zu zählen ist. Bei nicht oder nicht vollständig beschichteten Stents kommt es auf Grund der vergrößerten Angriffsfläche zu einer erhöhten Abgabe von Ionen. Dieser Effekt wurde von Woodman und Kollegen festgestellt, die zeigen konnten, daß die Konzentration an freigesetzten Nickel- und

Chromionen von der Größe der Metalloberfläche abhängt.[89] Der Einfluß der Metallionen auf ihre Umgebung war daher um so größer, je näher sich die Zellen an dem Stent befanden. Lux und Zeisler konnten Konzentrationsgradienten für einzelne Metallkomponenten erstellen, die in Abhängigkeit zur Entfernung zum Implantat standen.[90] Zu dem gleichen Ergebnis kamen Neuling et al., die zeigen konnten, daß der Gradient für die Abgabe von Metallionen progredient mit der Entfernung von der Schicht, die dem Implantat direkt aufliegt, in die Peripherie hin abnimmt.[91] Von den untersuchten Antigenen spielte dabei das P-Selektin die größte Rolle. Mit diesem Antigen ist auch die Zunahme einer wachsenden thrombotischen Gefährdung assoziiert.[87, 88, 92, 93] In Folge der Zunahme dieses Liganden kann es zu einer erhöhten Plättchen-Endothel- und Plättchen-Leukozytenadhäsion kommen. Konsekutiv könnte dieser Prozess einen Anstieg der Thrombosen nach sich ziehen.[94-97]

*In vivo* könnte die erhöhte Expression von P-Selektin auch ein wichtiger Trigger für Restenosen darstellen. Metallionen können auch zu einer Aktivierung von Leukozyten führen und dadurch entzündliche Prozesse in den umgebenden Geweben zur Folge haben.[84, 85] Die Beteiligung von P-Selektin in entzündlichen Prozessen und ischämischen Verletzungen ist bekannt.[84, 98] Die sich daraus ergebende Entzündung kann in Folge zu einer Infiltration von Entzündungszellen und einer damit verbundenen Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren führen. Hierdurch kann es zu einer Überreaktion mit einem verstärkten Proliferationsverhalten im umgebenden Gewebe kommen.[99, 100] Diese Reaktion wiederum konnte den Prozeß der Restenose mit erklären.

Die direkte Projektion von *in vitro*-Studien auf *in vivo*-Bedingungen ist immer nur begrenzt möglich. Es gibt natürlich immer mehrere Faktoren, die zelluläre und nicht-zelluläre Komponenten des Blutes in einer künstlichen Umgebung beeinflussen, wobei man nicht alle möglichen Interaktionen berücksichtigen kann. Dennoch konnten die unterschiedlichen Antigenexpressionen zwischen DLC-beschichteten und nicht-beschichteten Stents klar dargelegt werden. In Bezug auf die Durchflußzytometrie, wird durch den ausgewählten Zeitrahmen nur eine relativ kurze Testperiode reflektiert, während der Stent *in vivo* über

einen wesentlich längeren Zeitraum implantiert bleibt. Dennoch konnte verdeutlicht werden, daß Stents grundsätzlich ein thrombogenes Potential besitzen. Dieser Prozeß der Aktivierung von Thrombozyten kann dann *in vivo* über mehrere Wochen anhalten; dies wurde durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen.[87] In Bezug auf die AAS- und die ICP-MS-Analysen stellt der Einsatz von humanem Plasma eine gewisse Einschränkung des Versuchsaufbaus dar. Wesentliche, zur Korrosion führende Faktoren fehlten: sowohl der pH als auch die O<sub>2</sub>-Konzentration waren nicht physiologisch; außerdem fehlten einige organische Kationen.[91] Daraus kann man jedoch schlußfolgern, daß die Abgabe von Metallionen *in vivo* noch höher sein muß als in unserem *in vitro*-Versuch gezeigt werden konnte. Auf der anderen Seite lagen die Stents während unserer Studie statisch in Versuchsküvetten, während sie unter klinischen Bedingungen unter einer höheren physischen Beanspruchung stehen. Deshalb könnten *in vivo* die Bindung zwischen Ionen und Serumproteinen, wie auch die Formation der organo-metallischen Komplexen, die Aufnahme von Ionen durch Blutzellen (wie z.B. von Nickel durch Erythrozyten) reduzieren, da der Blutfluß zu einer schnelleren Verdünnung oder Entfernung der Ionen führt.[89]

Intrakoronare Stents haben thrombogene Eigenschaften. Die wesentlichen verfahrenslimitierenden Faktoren dieser Bioprothesen, subakute Thrombosen und Restenosen, können bis heute noch nicht vollständig verhindert werden. Die Weiterentwicklung der biologischen Verträglichkeit solcher Implantate ist deshalb eine wichtige Herausforderung.[1, 101] Wir konnten in dieser *in vitro*-Studie zeigen, daß die Beschichtung eines Stents mit einer DLC-Beschichtung die Thrombozytenaktivierung deutlich reduziert und dadurch das thrombogene Potential der Stents verringert. Weiterhin kommt es durch diese Beschichtung zu einer verminderten Abgabe von Metallionen der Stents, die sowohl zu einer Plättchenaktivierung, zur Trombusformation oder entzündlichen Prozessen beitragen können. Die Beschichtung von Stents mit *diamond-like carbon* verbessert die biologische Verträglichkeit, die wiederum die Inzidenz von subakuten Thrombosen und Restenosen herabsetzen kann.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Effekt einer DLC-Beschichtung (*diamond like carbon*) koronarer Stents in einer *in vitro*-Studie durchflußzytometrisch untersucht. Ferner wurden die beschichteten Stents auf ihre Thrombogenität, ihre Zelltoxizität und auf eine mögliche Induktion der Zellproliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen untersucht. Außerdem wurde die Ionenemission der Stents analysiert. Die Mangan- und Molybdänfreisetzung wurde durch die Methode der Massenspektroskopie untersucht, die Nickel- und Chromionen-Emission mittels Atomabsorption. Schließlich wurden die Oberflächen der Stents auf ihre Struktur hin elektronenmikroskopisch untersucht.

Durchflußzytometrisch konnten keine Veränderungen der Strukturantigene CD41a und CD42b bei Thrombozyten gemessen werden. Die Analyse der Antigene CD62p und CD63, die erst nach einer Aktivierung der Thrombozyten exprimiert werden, zeigte eine signifikante Veränderung bei den unbeschichteten Stents. Die Werte der DLC-beschichteten Stents bei CD62p und CD63 lagen weit unter denen der unbeschichteten Stents.

Bei den Analysen der Atomabsorption haben wir festgestellt, daß bei den DLC-Stents minimale Mengen von Ionen freigesetzt wurden. Diese waren aber im Vergleich mit der signifikant höheren Ionenfreisetzung bei den nichtbeschichteten Stents vernachlässigbar. Zelltoxizität konnte in den *in vitro*-Kulturen ebenso wenig festgestellt werden, wie ein erhöhtes Proliferationsverhalten von Endothel- und glatten Muskelzellen. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte zudem noch die sehr glatte Oberflächenstruktur der DLC-beschichteten Stents dargestellt werden.

Diese *in vitro*-Analysen zeigen, daß die DLC-Beschichtung von intrakoronaren Stents die Aktivierung der Thrombozyten deutlich vermindert. Außerdem ist bei DLC-Stents die Emission von Ionen, die eine zusätzliche Aktivierung von Thrombozyten nach sich ziehen kann, herabgesetzt. Dadurch wird das thrombogene Potential der Stents deutlich reduziert.

1. Bittl, J., *Advances in coronary angioplasty*. N Engl J Med, 1996. **335**: 1290-1302.
2. Sigward, U., Puel, J., Mirkovitch, V., et al., *Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty*. N Engl J Med, 1987. **316**: 701-706.
3. Serruys, P., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., et al., *A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease*. N Engl J Med, 1994. **331**: 489-495.
4. Fischman, D., Leon, M., Baim, D., et al., *A randomized comparison of coronary stent-placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease*. N Engl J Med, 1994. **331**: 496-501.
5. Macaya, C., Serruys, P., Ruygrok, P., et al., *Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: one-year clinical follow-up of Benestent trial*. J Am Coll Cardiol, 1997. 255-261.
6. Courier, J. und D. Faxon, *Restenosis after percutaneous coronary angioplasty*. J Am Coll Cardiol, 1995. **25**: 516-520.
7. Mak, K., Belli, G., Ellis, S., et al., *Subacute stent thrombosis: evolving issues and current concepts*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**: 494-503.
8. Bittl, J., *Subacute stent occlusion: thrombus horribilis*. J Am Coll Cardiol, 1996. **28**: 368-370.
9. Haycox, C. und B. Ratner, *In vitro platelets interactions in whole human blood exposed to biomaterial surfaces: insights in blood compatibility*. J Biomed Mater Res, 1993. **27**: 1181-1193.
10. Courtney, J., Lamba, N., Sundaram, S., et al., *Biomaterials for blood contacting applications*. Biomaterials, 1994. **15**: 737-744.
11. Klein, C., Nieder, P., Wagner, M., et al., *The role of metal corrosion in inflammatory processes: induction of adhesion molecules by heavy metal ions*. J Pathophysiology, 1994. **5**: 789-807.
12. Ruygrok, P. und P. Serruys, *From concept to custom*. Circulation, 1996. **94**: 882-890.

13. Colombo, A., Hall, P., Nakamura, S., *et al.*, *Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance*. *Circulation*, 1995. **91**: 1667-1688.
14. Roger, C. und E. Edelman, *Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis*. *Circulation*, 1995. **91**: S. 2995-3001.
15. Bailey, S., *Coating of endovascular stents*, in *Textbook of interventional cardiology*, E. Topol, Editor. 1994, WB Saunders: Philadelphia. p. 754-765.
16. Thompson, L., Law, F., Rushton, N., *et al.*, *Biocompatibility of diamond-like carbon coating*. *Biomaterials*, 1991. **12**: 37-40.
17. Tang, L., Tsai, C., Gerberich, W., *et al.*, *Biocompatibility of chemical-vapour-deposited diamond*. *Biomaterials*, 1995. **16**: 483-488.
18. Shattil, J., M. Cunningham, und J. Hoxie , *Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies*. *Blood*, 1987. **70**: 307-315.
19. Radziuk, B., Rödel, G., Stenz, H., *et al.*, *Spectrometer system for simultaneous multi-element electrothermal atomic absorption spectrometry using line sources and Zeelman-effect background correction*. *JAAS*, 1995. **10**: 127-136.
20. Fang, Z. und B. Welz, *Optimisation of experimental parameters for flow injection flame atomic absorption spectrometry*. *J Anal At Spectrom*, 1989. **4**: 83-89.
21. Schmitz, G. und G. Rothe, *Anwendung der Durchflußzytometrie in der Klinischen Zelldiagnostik*. DGKC Mitteilungen, 1993. **24**: 1-14.
22. Eckhard, R., *Durchflußzytometrie, eine Methode zur schnellen Analyse großer Zellzahlen*. GIT Labor Medizin, 1992. **7-8**: 281-284.
23. Eckhard, R., *Grundlagen der Durchflußzytometrie, Problemerkennung und Bewältigung*. MTA, 1994. **12**: 992-994.
24. Raffael, A., *Einführung in die analytische Durchflußzytometrie*. Bedienungsanleitung der Firma Becton Dickinson für FACScan., 1987. **1**: S. 1-21.
25. Löffler, G., *Monoklonale Antikörper*, in: Löffler, G. und P. Petrides in *Biochemie*. 1998, Springer: Berlin. S. 1077-1078.

26. Longbardi Givan, A., *Seeing the light: lasers, fluorochromes and filters.*, in *Flow cytometry; First principles*, Longbardi Givan, A., Editor. 1992, Wiley-Liss: New York. p. 55-74.
27. Kleine, H.-D. und M. Freund, *Monoklonale Antikörper und Immunmarkierung*. 1998, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin: Rostock.
28. Waggoner A, Ernst, L., Chen, C.-H., Rechtenwald, D., *PE-CY5. A new fluorescent antibody label for three-color flow cytometry with a single laser*. Ann NY Acad Sci, 1993. **667**: 185-193.
29. Petrides, P., *Blut*, Löffler G. und P. Petrides in: *Biochemie* 1998, Springer: Berlin. S. 882-947.
30. Junqueira, L.C. und J. Carneiro. *Blut*, in: *Histologie*. Vol. 4. 1996, Heidelberg: Springer. S. 323-325.
31. Baumgartner, H. und R. Muggli, *Adhesion and aggregation: morphologic demonstration, quantitation in-vivo and in-vitro*. In : Gordon J. (Hrsg.) *Platelets in biology and pathology*. Elsevier Science Publishers, 1976: S. 23-60.
32. Ruggeri, Z., *The role of von Willebrand' factor and fibrinogen in the initiation of platelet adhesion to thrombogenic surfaces*. Thromb Haemost, 1995. **74**: 460-463.
33. Dreger, P. und N. Schmitz, *Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen*, in *Transfusionsmedizin*, Mueller-Eckhardt. C., Editor. 1995, Springer. S. 427-434.
34. Weiss, C. und W. Jelkmann, *Blutstillung-Blutgerinnung*, in *Physiologie des Menschen*, R. Schmidt und G. Thews, Hrsg. 1997, Springer: Berlin. S. 427-434.
35. Hauptmann, B., *Fluidynamische Interpretation der Thrombusmorphologie und deren Entstehung in stenosierten arteriellen Gefäßen*. Cor Vas, 1992. **8**: 10-12.
36. Hirsh, J., Salzman, E., Marder, V., et al., *Pathogenesis of thrombosis: overview of the thrombotic process and it's therapy*, in *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice.*, R. Colman, et al., Editors. 1987, J.P. Lippincott: Philadelphia. p. 1063-1072.

37. Sakariassen, K., Nievelstein, P., Coller, B., *et al.*, *The Role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium*. Br J Haematol, 1986. **63**: 681-691.
38. Cerletti, C. und V. Evangelista, *Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes, role of cathepsin G and P-Selectin*. Thromb Haemost, 1995. **4**: 218-223.
39. Metzelaar, M. und H. Clevers, *Lysosomal membrane glycoproteins in platelets*. Thromb Haemost, 1992. **68**: 378-382.
40. Junquera, L. und J. Carneiro, *Gewebevorbehandlung*, in: *Histologie*. Vol. 4. 1996, Heidelberg: Springer. S. 12-14.
41. Deneke, T., Grewe, P.H., Marchraoui A., *et al.*, *Histomorphometrische und histomorphologische Befunde nach postmortaler Stentimplantation mit unterschiedlichem Expansionsdruck*. Z Kardiol, 1997. **86**(3).
42. Junquera L, und J. Carneiro, *Elektronenmikroskopie.*, in: *Histologie*, J. Carneiro, Junquera L, Editor. 1996, Springer: Berlin. S. 10-12.
43. [www.uni-kl.de/IFOS/EDX.htm](http://www.uni-kl.de/IFOS/EDX.htm), Zugriff am 15.02.2001.
44. Herrmann, R., *Analytische Chemie*. Vol. 1. 1965. S. 212.
45. [www.chem.agilent.com/cag/products/icpmstec.html](http://www.chem.agilent.com/cag/products/icpmstec.html), Zugriff am 30.03.2000.
46. [www.cardiologe.de/patient/therapie/invasiv/balldilatation.html](http://www.cardiologe.de/patient/therapie/invasiv/balldilatation.html), Zugriff am 08.04.2001.
47. Neuhaus, K.-L., *Was leistet die Ballondilatation?* Gesundheits-Forschungsdienst, 1996. **2**.
48. Doros, G., Cowley, M., Simpson, J., *et al.*, *Percutaneous transluminal coronary angioplasty: report of complications from the National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) PTCA registry*. Circulation, 1983. **67**: S. 723-730.
49. Strecker, E., Romaniuk, P., Schneider, B., *et al.*, *Perkutan implantierbare, durch Ballon aufdehnbare Gefäßprothesen*. DMW, 1988. **14**: 538-542.
50. Serruys, P., Strauss, B., de Feyter, P., *The wallstent, a self-expanding stent*. J. Invasive Cardiology. 1991. **3**(3): 127-34.
51. De Jaeggere, P., Serruys, P., Bertrand, M., *et al.*, *Wiktor stent implantation in patients with restenosis following balloon angioplasty of a native coronary stent*. Am J Cardiol, 1992. **69**: 598-602.

52. Grewe, P., Machraoui, A., Deneke, T., *et al.*, *Strukturanalyse von 16 verschiedenen Koronarstentsystemen*. Z Kardiol, 1997. **89**: 990-999.
53. Walker, C. und S. Stagg III, *Coronary stents: Review of recent developments*. Z Kardiol, 1995. **142**: 25-32.
54. Siegward, U., *Coronary stents*. Z Kardiol, 1995. **84**: 65-77.
55. Topol, E., *Coronary-artery stenting - Gauging, gorging, gouging*. N Engl J Med, 1998. **23**: 1702-1704.
56. AABB, *Standards for Blood Bank and Transfusion Service: In: Standards Committee of the American Association of Blood Banks. 18th ed.*, 1998, American Association of Blood Banks: Arlington, VA, USA.
57. Beythien, C., Terres, W., Hamm, C., *et al.*, *In vitro model to test the thrombogenicity of coronary stents*. Thromb Res, 1994. **75**: 581-590.
58. Ruf, A. und H. Patscheke, *Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression*. Semin Thromb Hemost, 1995. **21**: 146-151.
59. Michelson, A., *Flow cytometry: a clinical test of platelet function*. Blood, 1996. **87**: 4925-4936.
60. Köster, R., Windstetter, U., Überfuhr, P., *et al.*, *Enhanced migratory activity of vascular smooth muscle cells with high expression of platelet-derived growth factor A and B*. Angiology, 1995. **46**: 99-106.
61. Ross, R., *The smooth cell: II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers*. J Cell Biol, 1972. **50**: 172-186.
62. Jaffe, E., Nachman, R., Becker, C., *et al.*, *Culture of human endothelial cells derived from human umbilical veins: identification by morphologic and immunological criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**: 2745-2756.
63. Angerer, J. und K. Schaller, *Chromium in whole blood, plasma and erythrocytes. Analyses of hazardous substances in biological materials. 3rd. ed.*, in *Deutsche Forschungsgemeinschaft*. 1991.
64. Angerer, J. und K. Schaller, *Nickel in blood. Analyses of hazardous substances in biological materials. 3rd ed.*, in: *Deutsche Forschungsgemeinschaft*. 1991.
65. Gutensohn, K., Beythien, C., Bau, J., *et al.*, *Flow cytometric analysis of coronary stent-induced alterations of platelet antigens in an in vitro model*. Thromb Res, 1997. **86**: 49-56.

66. Lu, L., Jones, M. und R. Wu, *Diamond-like carbon as biological compatible material for cell culture and medical application*. Biomed Mater Eng, 1993. **3**: 223-228.
67. Bocchiotti, G., Verna, G., Fracalviere, M., et al., *Carbo-film covered prostheses in plastic surgery: preliminary observations*. Plast Reconstr Surg, 1993. **91**: 80-90.
68. Parker, T., Perker, K., McColl, I., et al., *Biocompatibility of low temperature diamond-like carbon films: a transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytotoxicity study*. Diamon Related Mater, 1994. **3**: 1120-1123.
69. Asahara, T., Bauters, C., Pastore, C., et al., *Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery*. Circulation, 1995. **91**: 2793-2801.
70. Shapiro, H., *Practical Flow Cytometry*. 3rd ed. 1994, New York: Wiley-Liss.
71. Gutensohn, K. und P. Kühnl, *The role of flow cytometry in improving biocompatibility in transfusion medicine*. Transfus Sci, 1998. **19**(1): 17-25.
72. McEver, R. und M. Martin, *A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only on activated platelets*. J Biol Chem, 1984. **259**: 9799-9804.
73. Nieuwenhuis, H., van Oosterhout, J., Rozemuller, E., et al., *Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation*. Circulation, 1987. **70**: 838-845.
74. Ratner, B., *The blood compatibility catastrophe*. J Biomed Mat Res, 1993. **27**: 283-287.
75. Hellums, J. und R. Hardwick, *Response of platelets to shear stress: a review.*, in *The Rheology of Blood, Blood Vessels and Associated Tissues.*, D. Gross and N. Hwang, Editors. 1981. p. 160-183.
76. Ip, J., Fuster, V., Israel, D., et al., *The role of platelets, thrombin, and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty*. J Am Cardiol, 1991. **17**: 77B-88B.

77. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **326**: 801-809.
78. Grewe, P., Machraoui, A., Deneke, T., et al., *Strukturanalyse von 16 verschiedenen Koronarstentsystemen*. Z Kardiologie, 1997. **86**: 990-999.
79. Russ, J., Baerwald, G. und W. Mc Millian, *Routine of second generation windowless detector for energy-dispersive ultralight element x-ray analysis*. X-Ray Spectrum, 1976. **5**: 212-222.
80. Spitsyn, B., Bouilov, L. und B. Derjaguin, *Vapor growth of diamond on diamond and other surfaces*. J Cryst Growth, 1981. **52**: 219-226.
81. Ferguson, A., Laing, P. und E. Hodge, *The ionization of metal implants in living tissue*. J Bone JT Surg, 1960. **42A**: 77-90.
82. Greene, N. und D. Jones, *Corrosion of surgical implants*. J Mater, 1966. **1**: 345-353.
83. Wilder, O., Lipkow, T. und J. Knop, *Increased expression of ICAM-1, P-Selectin and VCAM-1 by cultured human endothelial cells upon exposure to haptens*. Exp Dermatol, 1991. **1**: 191-198.
84. Alblida, S., Smith, C. und P. Ward, *Adhesion molecules and inflammatory injuries*. FASEB J, 1994. **8**: 504-512.
85. Klein, C., Köhler, H. und C. Kirkpatrick, *Increased adhesion and activation of polymorphonuclear neutrophil granulocytes to endothelial cells under heavy metal exposure in vitro*. Pathobiology, 1994. **62**: 90-98.
86. Koller, A., Rubanyi, G., Ligeti, L., et al., *Effect of verapamil and phenoxybenzamine on nickle-induced coronary vasoconstriction in the anesthetized dog*. Acta Physiol Acad Sci Hung, 1982. **59**: 287-290.
87. Gawaz, M., Neumann, F., Ott, I., et al., *Platelet activation and coronary implantation: effect of antithrombotic therapy*. Circulation, 1996. **94**: 279-285.
88. Inoue, T., Sakai, Y., Fujito, T., et al., *Expression of activation dependent platelet membrane proteins after coronary stenting: a comparison with balloon angioplasty*. Circulation, 1996. **94**: 1518.
89. Woodman, J., Black, J. und S. Jiminez, *Isolation of serum protein organometallic corrosion products from 316 LSS and HS-21 in vitro and in vivo*. J Biomed Mater Res, 1984. **18**: 99-114.
90. Lux, F. und R. Zeissler, *Investigations of the corrosive deposition of components of metal implants and of the behavior of biological trace*

- elements in metallic tissue by means of instrumental multi-elemental activation analysis.* J Radioanal Chem, 1974. **19**: 289-297.
91. Reuling, N., Wisser, W., Jung, A., *et al.*, *Release and detection of dental corrosion products in vivo: development of an experimental model in rabbits.* J Biomed Mater Res, 1990. **24**: 979-991.
  92. Tschoeppe, N., Schultheiß, H., Kolarov, P., *et al.*, *Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA.* Circulation, 1993. **88**: 37-42.
  93. Itoh, T., Nakai, K., Ono, M., *et al.*, *Can the risk of acute cardiac events in acute coronary syndrome be indicated by the platelet membrane activation marker P-Selectin?* Coron Artery Dis, 1995: 645-650.
  94. Ginsberg, M., Loftus, J. und E. Plow, *Cytoadhesins, integrins and platelets.* Thromb Haemost, 1988. **59**: 1-6.
  95. Del Maschio, A., Dejana, E. und G. Bazzoni, *Bidirectional modulation of platelet and polymorphnuclear leukocyte activities.* Ann Hematol, 1993. **67**: 23-31.
  96. Hamburger, S. und R. McEver, *GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils.* Blood, 1990. **75**: 550-554.
  97. Rinder, C., Bonan, J., Rinder, H., *et al.*, *Cardiopulmonary bypass induces leucocyte-platelet adhesion.* Blood, 1992. **79**: 1201-1205.
  98. Weyrich, A., Ma, X., Lefer, D., *et al.*, *In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia reperfusion injury.* J Clin Invest, 1994. **91**: 2620-2629.
  99. Zians, N., Millre, K. und J. Anderson, *In vitro and in vivo interaction of cells with biomaterials.* Biomaterials, 1988. **9**: 5-13.
  100. Worward, S. und T. Salthouse, *Tissue response to implants and its evaluation by light microscopy.* In: *Handbook of biomaterial evaluation: scientific, technical and clinical testing of implant materials.*, V. Rectum, Editor. 1986, MacMillan Publication Company: New York. p. 367-378.
  101. Lemaitre, D., Barber, A. und M. Mullen, *Interventional cardiology: The Cowen Report.* 1996.
  102. Schwedt, G., Schreiber, J., *Taschenatlas der Analytik.* Thieme 1996.

Zum Schluß meiner Arbeit möchte ich allen, die bei der Verwirklichung meiner Dissertation geholfen und mich unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Heutzutage ist es nicht leicht, eine wissenschaftliche Fragestellung zu finden, die interessant, gleichzeitig aber auch aktuell und realisierbar ist. Deshalb möchte ich mich besonders bei dem Direktor der Abteilung, Herrn Prof. Dr. P. Kühnl, nicht nur für die Möglichkeit ein so herausforderndes Thema in seiner Abteilung bearbeiten zu dürfen, sondern auch für seine immerwährende, interessierte Begleitung meiner Arbeit bedanken.

Die professionelle und geduldige Unterstützung meines Doktorvaters, Herrn PD Dr. med. K. Gutensohn, hat vielfach dazu beigetragen, daß dieses Projekt so gut realisiert werden konnte. Für die stetige Hilfe sowie für die sich ergebenden Möglichkeiten und Herausforderungen in diesem so weitreichenden Teilgebiet der Medizin möchte ich mich noch einmal besonders bedanken.

Für die Durchführung der Analysen mittels Atomabsorptions-Massenspektrometrie und der energiedispersiven Röntgen-Mikroanalyse möchte ich mich bei dem Labor Dres. Fenner und Partner in Hamburg, sowie der Analysen mittels Videomorphometrie und der Elektronenmikroskopie bei Dr. P.H. Grewe, aus der Abteilung für Kardiologie und Angiologie der Universität Bergmannsheil in Bochum, bedanken.

Weiterhin möchte ich es nicht versäumen, die bereitwillige Hilfe von Frau Dr. J. Bau sowie von Dr. K. Padmanban, wissenschaftliche Mitarbeiter am Klinikum HH-Eppendorf, hier anzuführen.

Für die freundliche Betreuung durch das MTLA-Team der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf möchte ich mich bedanken. Ich wurde schnell in die experimentelle Labortätigkeit eingeführt. Dies hat zu einem guten Gelingen meiner Arbeit maßgeblich beigetragen.

## 8 Anhang

### 8.1 Übersicht der Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: DLC-beschichteter Stent in 50facher Vergrößerung	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Durchflusszelle	12
Abbildung 3: Strahlengang von Laser- und Fluoreszenzlicht in einem Durchflußzytometer	13
Abbildung 4: Aerosolbildung im AAS	26
Abbildung 5: Versuchsanordnung eines AAS	27
Abbildung 6: Versuchsanordnung eines ICP-MS	28
Abbildung 7: Palmaz-Schatz Stent	32
Abbildung 8: In-vitro Schlauchsystem	35
Abbildung 9: Darstellung der glatten Oberfläche eines DLC-beschichteten Stents in 500facher Vergrößerung	51
Abbildung 10: 1.000fache Vergrößerung eines beschichteten Stents mit kleinen, dünner beschichteten Arealen.	51

## 8.2 Übersicht der Tabellen

		Seite
Tabelle 1:	Grund- und Temperatureinstellungen für Nickel und Chrom bei der AAS (Atomabsorption)	43
Tabelle 2:	Durchflußzytometrische Analyse von Strukturantigenen der Thrombozyten	47
Tabelle 3:	Durchflußzytometrische Analyse der aktivierungsabhängigen Antigene von Thrombozyten	48
Tabelle 4:	Atomabsorptionsspektroskopische Werte der Nickel- und Chromionen-Abgabe.	53
Tabelle 5:	Massenspektroskopische Analyse der Freisetzung von Mangan- und Molybdän-Ionen.	54

Persönliche Daten

Name, Vorname	Spindler, Nick
Geburtsdatum	20.04.1976
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Eltern	Dr. med. Frank Paul Friedrich Spindler Dr. med. dent. Bettina Spindler-Kruel, geb. Kruel

<u>Schulbildung</u>	Grundschule	Theodor Heuss-Schule, Bad Soden/ Ts. 1982 - 1986
	Gymnasium	Bischof Neumann-Schule, Königstein 1986 - 1993
		Suffield Academy, Suffield, CT, USA 1993 - 1994
		Bischof Neumann-Schule, Königstein 1994 - 1996
		Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife 1996

<u>Universität</u>	Semmelweis-Universität für Medizinische Wissenschaften, Budapest (Ungarn) September 1996 - September 1999 01.09.1999 Ärztliche Vorprüfung WS 1999/2000 Wechsel an die Technische Universität München (klinische Semester) 28.08.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
--------------------	---

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den .16.12.2004

Nick Spindler