

Entwicklung einer biodegradierbaren Harnleiterschiene –

**In-vitro Analytik von Poly(D,L-Lactid) als Homo- und
Copolymer, Formgebungs-Technologie,
Oberflächenmodifizierung und tierexperimentelle Untersuchung
im Schaf-Modell**

**Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation**

Vorgelegt von

Friedrich Hölzl

aus
Göttingen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. G. Jakse

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. W. Jahnen-Dechent

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2001

Inhalt:

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der inneren Harnleiterschienung	1
1.1.1	Geschichte	1
1.1.2	Indikationen zur inneren Harnleiterschienung	2
1.1.3	Methodik	3
1.1.4	Komplikationen und Nachteile	4
1.2	Vorteile biodegradierbarer, kurzer Harnleiterschienen	7
1.3	Stand der Literatur	8
1.4	Herstellungsverfahren	12
1.4.1	Formgebung.....	12
1.4.2	Oberflächenmodifizierung.....	12
1.5	Ziele	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Verwendete Kunststoffe, Verarbeitung und Untersuchung.....	15
2.1.1	Polymere.....	15
2.1.2	Herstellung der Polymerfolien.....	16
2.1.3	Oberflächenmodifizierung.....	16
2.1.3.1	Argon-Plasmabehandlung.....	16
2.1.3.2	Plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation	16
2.1.4	Kontaktwinkelmessung	18
2.1.5	Degradierung der Polymerfolien in PBS.....	18
2.2	Zellbiologische Untersuchungen	19
2.2.1	Zellen und deren Kulturbedingungen	19
2.2.2	Adhäsionstest	20
2.2.3	Zytotoxizitätsstudien	21
2.2.3.1	Extraktherstellung (Prüfmedium) für die indirekten Tests	21
2.2.3.2	Zellmorphologische Untersuchungen	22
2.2.3.3	Zellproliferationstest (BrdU)	22
2.2.3.4	Vitalitätstest mit EB und FDA.....	24
2.2.3.5	Mitochondrien-Aktivität, XTT-Test	25
2.3	Herstellungstechnik der Harnleiterschiene	26
2.3.1	Gasbeladungsverfahren (CESP-Verfahren)	26
2.3.1.1	Grundlagen	26
2.3.1.2	Maschinentchnik	26
2.3.1.3	Formgebendes Werkzeug	27
2.3.1.4	Herstellungsbedingungen für die Harnleiterschiene	27
2.3.2	Oberflächenmodifizierung des Stents.....	28
2.4	Degradierung der Stents in humanem Urin	29
2.5	Tierversuch	29
2.5.1	Versuchstiere und deren Haltung	29
2.5.2	Operative Stentimplantation	30
2.5.2.1	Vorbereitung	30
2.5.2.2	Operation	30
2.5.3	Verlaufskontrollen	32
2.5.4	Tötung und Sektion der Tiere	32

3	Ergebnisse	33
3.1	Zellbiologische Untersuchungen	33
3.1.1	Adhäsionstest	33
3.1.2	Zytotoxizitätsstudien	34
3.1.2.1	Zellmorphologische Untersuchungen	34
3.1.2.2	Zellproliferationstest (BrdU)	36
3.1.2.3	Vitalitätstest mit EB und FDA	37
3.1.2.4	Mitochondrienaktivität, XTT-Test	39
3.1.3	Degradierung der Polymerfolien in PBS	42
3.1.4	Kontaktwinkelmessung	43
3.2	Degradierung der Stents in humanem Urin	44
3.3	Tierversuch	45
3.3.1	Labor	45
3.3.2	Sonographie	48
3.3.3	Sektionsbefunde	49
3.3.4	Histologie	51
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	65
6	Anhang	66
6.1	Tabelle 1: Adhäsion	66
6.2	Tabelle 2: XTT-Test im indirekten Kontakt für RT-112	66
6.3	Tabelle 3: XTT-Test im direkten Kontakt für RT-112	68
6.4	Tabelle 4: BrdU-Test im indirekten Kontakt für RT-112	70
6.5	Tabelle 5: XTT-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen	71
6.6	Tabelle 6: BrdU-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen	72
6.7	Tabelle 7: Kontaktwinkel mit und ohne Oberflächenmodifizierung	73
6.8	Tabelle 8: Kontaktwinkelmessungen im Verlaufe des Abbaus	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Danksagung	80
9	Lebenslauf	81

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der inneren Harnleiterschienung

1.1.1 Geschichte

Kunststoffkatheter, deren proximales Ende im Nierenbecken und deren distales Ende in der Blase liegen, kamen erstmalig 1966 in Deutschland (SCHMITZ¹) und 1967 in den USA (ZIMSKIND²) zum Einsatz. Es handelte sich hier um einfache Schläuche. Früh stellte man jedoch fest, daß das vorrangige Problem dieser simplen Geometrie die starke Beeinträchtigung des Urinflusses war. Jeder Stent weist um 40 – 50% schlechtere Flußeigenschaften auf, als ein identischer Stent mit kleinen Wandperforationen (MARDIS³ et al.). Gelangt Urin zwischen Katheter und Harnleiter, findet er nicht mehr in das Stentlumen zurück und muß durch peristaltische Wellen den engen Raum außerhalb der Harnleiterschiene bis in die Blase passieren. Dabei werden derartig hohe Drücke aufgebaut, daß es beim Vorliegen einer relativ frischen Ureteranastomose zur Extravasation von Urin kommen kann, auch wenn die Anastomose eigentlich dicht ist (FINNEY⁴ et HOPKINS). Daher modifizierte MARMAR⁵ 1970 den ZIMSKIND-Stent, indem er ihm zahlreiche seitliche Löcher zufügte, die das Zurückfließen des Urins in das Stentlumen ermöglichen.

Erst jetzt wurde die Materialfrage immer häufiger diskutiert. SCHMITZ verwendete damals Polyvinylchlorid (PVC) in einer Stärke von 8 bis 10 Charrière. Das 1980 von TÖLLE⁶ eingeführte Polyurethan (PUR) und Silikon (ZIMSKIND) waren wesentlich weicher als PVC und neigten wegen ihrer deutlich glatteren Oberfläche weniger zur Inkrustation (WEISSBACH⁷). Silikon ist ein Polymer, das aus Silizium-Sauerstoffketten aufgebaut ist. Es ist weicher als PUR und auch mechanisch weniger widerstandsfähig. Silikon erfüllt zwar am ehesten die Forderungen, die an alloplastisches Material mit Urinkontakt gestellt werden, hat aber im Vergleich zu PVC den Nachteil, daß es bei gleicher Charrière - Zahl ein bis zu 43% kleineres Lumen aufweist, da aufgrund der geringen Stabilität das Material dicker sein muß (SCHÜLLER⁸).

Durch den Einsatz dieser flexibleren Schienen stellte sich jedoch das Problem der Fixierung. Die PVC-Katheter waren so starr, daß sie keiner Befestigung bedurften. Die Silikonschienen von ZIMSKIND waren aber der Eigenperistaltik des Ureters nicht gewachsen und dislozierten mit großer Häufigkeit. So entwickelte GIBBONS⁹ 1976 eine Ureterschiene, die in ihrem

mittleren Abschnitt mit zahlreichen Silikonflossen versehen war. Das distale Ende formte er zu einem Flansching aus.

MC COULLOUGH¹⁰ führte 1974 erstmals einen Katheter ein, der am im Pyelon liegenden Ende mit einem Einrolleffekt (pig tail) ausgestattet war.

Der Durchbruch gelang FINNEY¹¹ 1978 . Er formte einen Doppel-J-Stent mit einem proximalen und distalen J-förmigen Ende. MARDIS¹² et al. überarbeiteten diese Geometrie 1979 zu einem Doppel-pig-tail-Katheter (Einrolleffekt am proximalen und distalen Ende). Diese Formen haben sich für die länger dauernde innere Harnleiterschienung heute durchgesetzt. Ebenfalls werden indikationsabhängig Harnleitersplinte oder Ureterenkatheter ohne pig tail benutzt, die zur Sicherung an einem gleichzeitig liegenden transurethralen Harnblasendauerkatheter fixiert werden können.

Als Material kommt heute überwiegend Silikon zur Anwendung. Außerdem setzt man Polyurethan - Katheter und solche aus anderen synthetischen Polymeren ein (z.B. PVC oder Polyethylen).

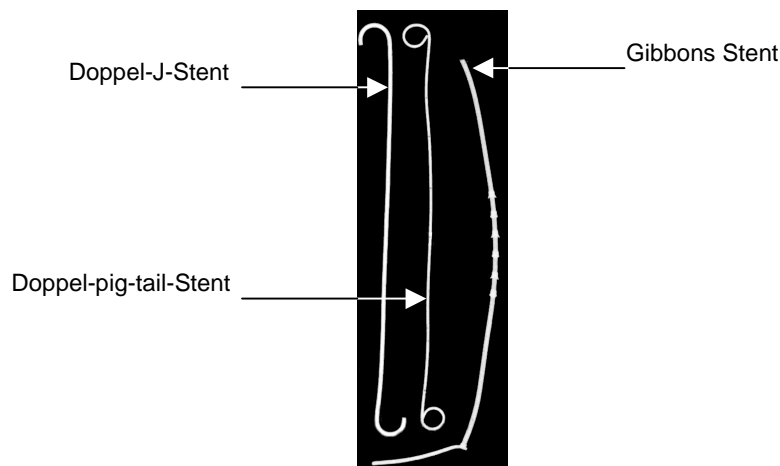


Abbildung 1: Verschiedene Stents

1.1.2 Indikationen zur inneren Harnleiterschienung

Innere Harnleiterschienen werden eingesetzt, um bei drohenden oder manifesten Harnabflußstörungen den Urinfluß von der Niere zur Blase aufrecht zu erhalten oder wiederherzustellen. Bei vielen Operationen im Rahmen der Stein- und Tumorchirurgie, aber auch bei angeborenen Fehlbildungen im Bereich des Nierenbeckens und des Harnleiters ist die vorübergehende Einlage einer Ureterschiene ebenfalls erforderlich. Der Harnleiterstent

nach operativen Eingriffen im oberen Harntrakt schient die Anastomose und verhindert eine Urinextravasation. Außerdem bleiben gute Abflußverhältnisse gewährleistet, da die Gefahr einer Obstruktion durch ein postoperativ auftretendes Mukosaödem im Operationsbereich gebannt wird (TÖLLE^{13,14}, SMITH¹⁵).

Experimentellen Charakter hat der Versuch, Ureterstents als Leitschiene für den Harnleiterersatz zu plazieren. Nach LANG¹⁶ hat der Stent den Effekt, als Wachstumsschiene für das Urothel bei einem Defekt zu dienen und einer Strikture vorzubeugen. Das zeigten auch Versuche von BERGMAN¹⁷ et al. am Hund.

Eine weitere Indikation ist die protektive Einlage eines Ureterstents vor der extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie. Größere Steine (etwa ab 25 mm) verursachen nach der Steinertrümmerung durch die Masse an anfallenden Fragmenten häufig eine Ureterobstruktion, so daß auxilläre Maßnahmen wie z.B. eine perkutane Nephrostomie nötig werden. Durch die Schienung des Harnleiters können die nach der ESWL auftretenden Komplikationen auf ein Minimum beschränkt werden (SCHÜLLER⁸).

1.1.3 Methodik

Ureterschienen können retrograd, antegrad, aber auch intraoperativ plaziert werden. Das retrograde Vorgehen erfolgt über ein Zystoskop. Zuvor sollten, soweit nicht schon geschehen, Art und Grad der Obstruktion durch eine retrograde Pyelographie bestimmt werden. Dann wird ein Führungsdraht in den Ureter eingeschoben und mit diesem die Engstelle passiert. Nun kann ein Katheter über den Draht eingelegt werden. Eine abschließende radiologische Kontrolle bestätigt die korrekte Lage des Ureterkatheters. Das antegrade Vorgehen verlangt zunächst die perkutane Punktion des Nierenbeckens und erfolgt alternativ zur retrograden Einführung der Schiene, wenn diese nicht gelingt. Indikationen für die antegrade Methode sind gegeben bei Patienten mit kompletter Dehiszenz des Ureters, Ureterfisteln, deren Richtung ein retrogrades Vorschieben verbieten, stark erweiterten, torquierten oder strikturierten Ureteren. Auch hier erleichtert die Zuhilfenahme eines Führungsdrahtes das Einlegen der Harnleiterschiene (CAMPBELLS¹⁸).

In der Regel benutzt man Doppel-J-Katheter, die in Nierenbecken und Blase durch jeweils einen pig tail in der korrekten Lage gehalten werden.

Normalerweise sollten Harnleiterschienen spätestens nach vier bis acht Wochen wegen ihrer

Inkrustationstendenz entfernt oder gewechselt werden. Die Entfernung erfolgt dann endoskopisch.

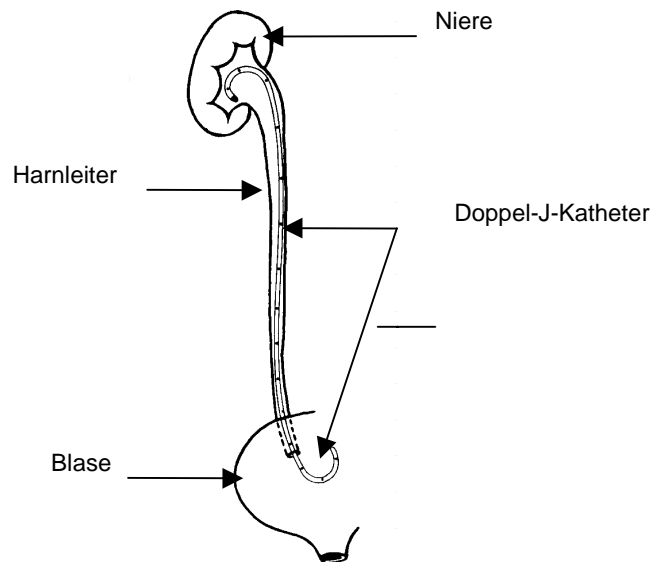


Abbildung 2: Korrekte Lage eines Doppel-J-Katheters

1.1.4 Komplikationen und Nachteile

Die Komplikationsrate bei der Verwendung von DJ-Stents einschließlich der möglichen Folgen der Entfernung liegt bei 11% (DE PETRICONI¹⁹ et al.).

Ein wichtiger Nachteil aller inneren Harnleiterschienen ist die Notwendigkeit eines erneuten Eingriffs, der erforderlich wird, um die Schiene zystoskopisch zu entfernen. Hier besteht immer das Risiko einer Verletzung und Infektion.

Aufgrund der durchgehenden Verbindung zwischen Niere und Blase kann es bei Patienten mit Ureterendoprothesen zu einem vesiko-ureteralen Reflux kommen. MOSLI²⁰ et al. untersuchten 30 Patienten mit D-J-Kathetern auf einen solchen Reflux. 19 von 30 (63%) der Probanden zeigten zystographisch einen vesiko-ureteralen Reflux in der Füllungsphase. Während der Blasenentleerung, die auf natürlichem Wege erfolgte, konnte in 24 Fällen (80%) ein Hochsteigen des Urins in den Ureter nachgewiesen werden. Hier bestand bei immerhin 20 Patienten ein höhergradiger Reflux bis in den oberen Harnleiter und in das Hohlsystem der Niere.

Der alleinige leichte Reflux kann als klinisch wenig bedeutend angesehen werden

(SCHÜLLER⁸), er begünstigt jedoch das Aszendieren potentieller Harnwegsinfekte. MARTOV²¹ et al. beziffern die Inzidenz refluxbedingter Pyelonephritiden nach Uretersteinlage mit 6,6%.

Ein ausgeprägter Reflux hingegen vermag die Niere nachhaltig zu schädigen. EL-DEEN²² et al. untersuchten geschlechte, refluxive Kaninchenharnleiter. Sie stellten fest, daß die nach einer Woche aufgetretene Hydronephrose bei sofortiger Stententfernung reversibel war. Nach drei Wochen Stentliegedauer jedoch zeigte sich die Hydronephrose durch den schienenbedingten Reflux progredient. Hier kam es in 2 von 18 Fällen sogar zum Verlust der Nierenfunktion durch Druckschädigung. Als histopathologisch signifikant ergaben sich dilatierte Tubuli, entzündliche Infiltration von Niere und Ureter, Mukosaulzerationen und Hypertrophie der Uretermuskulatur.

Durch die übliche Schienung des gesamten Harnleiters kann es also zu irreversiblen Nierenschädigungen und Veränderungen des Ureters auf ganzer Strecke kommen.

Neben dem ohnehin in der Mehrzahl der Fälle bestehenden Reflux nach Stenteinlage, dessen Ursache in der direkten Verbindung zwischen Niere und Blase begründet ist, verschlechtern sich die Abflußverhältnisse abhängig vom Durchmesser des Katheters zusätzlich. Eine von BURGOS-REVILLA²³ et al. durchgeführte Studie beschrieb das hydrodynamische Verhalten endourologischer Katheter an Nephroureterozystektomie-Präparaten vom Schwein. Dabei ergaben sich signifikante Flußbeeinträchtigungen. Bei den verwendeten 5Ch-, 6Ch- und 7Ch-Kathetern reduzierte sich der Flow um 83%, 61% und 58%.

Als weitere seltene Komplikation wird gelegentlich von Rupturen der Schienen berichtet. Das betrifft vor allem die weniger flexiblen Materialien wie PVC oder PUR, wenn sie über einen längeren Zeitraum liegen bleiben. Ein Bruch der heute überwiegend verwendeten Silikon-DJ-Katheter wurde in den letzten Jahren lediglich in zwei Fällen beschrieben (WITJES²⁴, REMBRINK²⁵ et al.).

Häufiger findet man eine Dislokation der Stents. Diese tritt in etwa 3% der Fälle auf (EL KHADER²⁶ et al., SMEDLEY²⁷ et al.). Die Retraktion in den Ureter gilt als gefürchtet, da es sehr aufwendig ist, den Katheter wieder zu bergen. Die Häufigkeit dieser Komplikation beschrieb TÖLLE²⁸ mit 5 von 1500. Hierbei hatten alle fünf Patienten Prothesen, die nicht mit Pigtails ausgestattet waren. Bei zwei Patienten mußte die Schiene operativ entfernt werden.

Da die Stents bis in die Blase gelegt werden, verursacht der Fremdkörper gelegentlich eine Reizung des Trigonum vesicae mit Harndranggefühl, das sich bis zur Urge-Inkontinenzsymptomatik steigern kann, so daß ein sofortiges Entfernen der Schiene nötig wird.

Das wohl wichtigste Problem der gängigen Materialien im Einsatz als Ureterstent ist das Phänomen der Inkrustation. Dabei kommt es zu einer Verkalkung der Schiene bevorzugt mit Magnesium-Ammonium-Phosphat und Calcium-Phosphat, also Struvit und Hydroxyapatit. Das Resultat kann eine vollständige Obstruktion des Katheters sein.

TUNNEY²⁹ et al. beschrieben das Inkrustationsverhalten der beiden gängigsten Langzeitstentmaterialien *in vitro*. Sie durchströmten Silikon- und PUR-Stents sechs Wochen lang mit künstlichem Urin bei einer Temperatur von 37 °C im MRD (Modified Robbins Device). Dabei wird ein 42 cm langer Acrylblock mit einem Lumen von 2x10 mm mit künstlichem Urin durchströmt. Der Block verfügt über 25 regelmäßig angeordnete Löcher, in die an Stöpseln fixierte Materialproben eingebracht werden.

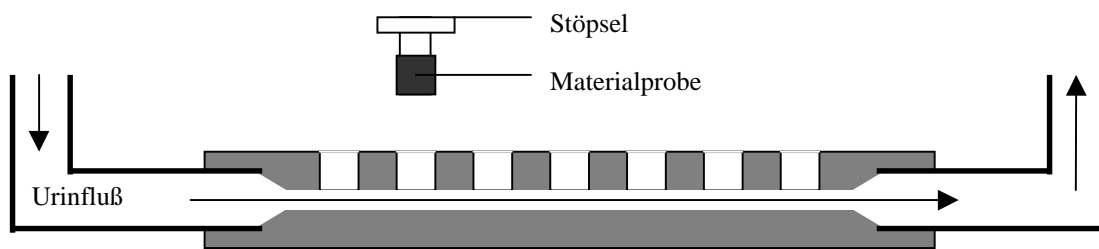


Abbildung 3: Modified Robbins Device (MRD) nach TUNNEY

Im Falle des PUR zeigte sich nach Ablauf der sechs Wochen eine dicke Ablagerungsschicht auf dem Material. Es handelte sich vor allem um Hydroxyapatit und (etwas weniger) Struvit. Die Silikonstents boten hinsichtlich des Inkrustationsverhaltens deutlich bessere Ergebnisse. Ihre Oberfläche war lediglich mit einer nicht geschlossenen Ablagerungsdecke versehen.

KEANE³⁰ et al. beschäftigten sich ebenfalls mit diesem Thema. Sie beobachteten 40 Patienten nach PUR-Stenteinlage. Insgesamt wiesen 58% der Schienen nach einer Liegedauer von 2 bis 36 Wochen Verkalkungen auf. Bei den länger als 25 Wochen einliegenden Kathetern waren 75% betroffen. Der größte Risikofaktor für die Inkrustation des Stents war eine bestehende Urolithiasis. So zeigten 14 von 19 Harnleiterschienen bei Patienten mit bekanntem Steinleiden entsprechende Veränderungen. Zusätzlich konnte dargestellt werden, daß ein Zusammenhang zwischen Inkrustation und mikrobiologischem Bewuchs besteht. Bei 11 der 40 (28%) Patienten konnte ein mikrobieller Biofilm auf dem Stent beobachtet werden. Acht

dieser Patienten wiesen zusätzlich eine Inkrustation der Schiene auf. Mikrobiologisch handelte es sich in 5 Fällen um Enterokokken, zweimal ließ sich *Staphylococcus aureus* nachweisen.

1.2 Vorteile biodegradierbarer, kurzer Harnleiterschienen

Angesichts der oben beschriebenen Nachteile und Probleme bei der Verwendung der herkömmlichen Harnleiterschienen ist es das Ziel der vorliegenden Untersuchung, einen bioresorbierbaren, kurzen und biokompatiblen Stent zu entwickeln. Die Schiene soll bioresorbierbar sein, um den bisher nötigen Eingriff zur Entfernung entfallen zu lassen. Die Geometrie umfaßt eine nur 3 bis 4 cm lange Prothese, um nicht den ganzen Harnleiterschienen zu müssen, wie es zur Zeit üblich ist. Damit soll dem vesiko-ureteralen Reflux vorgebeugt und verhindert werden, daß es auf ganzer Strecke möglicherweise zu irreversiblen Ureterveränderungen kommt.

Durch gezielte Oberflächenmodifizierung soll eine organspezifische Biokompatibilität hinsichtlich spezieller urothelialer Zellkulturen erreicht werden.

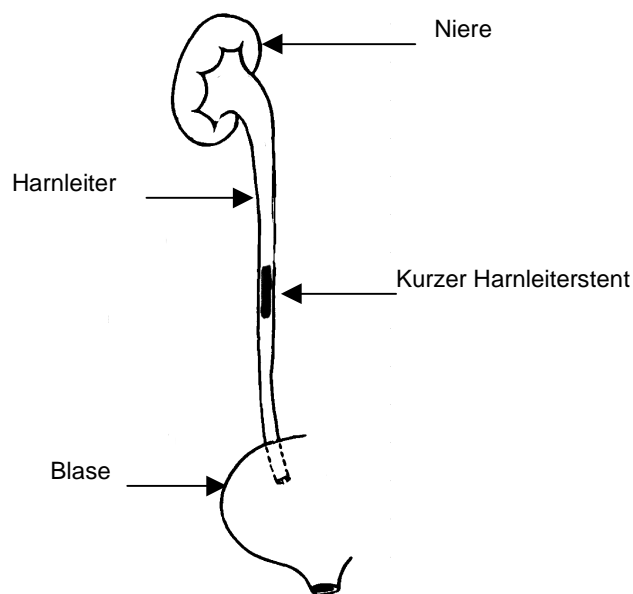


Abbildung 4: Der geplante Stent im Harnleiter

1.3 Stand der Literatur

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Ansätze verfolgt, ein geeignetes Material zur Rekonstruktion oder Schienung im Bereich der ableitenden Harnwege zu finden. Hier können grob drei Materialkonzepte unterschieden werden:

	Material	Zielsetzung	Autor
1	allogenes Material	Blasenrekonstruktion	Yoo ³¹ (1997)
2	biodegradierbares Material	-Ureterersatz mit Poly-L-Lactid	Bergman ¹⁷ (1978)
		-pH-abhängig resorbierbarer Ureterstent	Schlick ³² (1997)
		-Urethrastent aus a) PLLA und DL-Lactid b) PDLLA und PGA	Kemppainen ³³ (1993) Pétas ³⁴ (1997)
3	Urothelbeschichtete, biodegradierbare Materialien	Implantate mit hoher Biokompatibilität	Atala ³⁵ (1992)

Die wichtigsten Untersuchungen mit den oben beschriebenen Materialien und Zielsetzungen werden im Folgenden näher beschrieben:

YOO³¹ et al. suchten ein geeignetes Material zur Rekonstruktion im Urogenitaltrakt. Sie versuchten, bei Hunden unter Verwendung allogener Submukosapräparate eine Blasenaugmentation durchzuführen. Die Submukosa wurde aus Harnblasen von Hunden isoliert und in PBS mit 10% Cefazolin über 6 bis 12 Monate bei 4°C aufbewahrt und anschließend 24h lang mit UV-Licht bestrahlt, so daß ein nicht-immunogenes Kollagengerüst bestehen blieb. Daraus wurden zehn 4 x 5 cm große Segmente geschnitten und fünf davon mit Urothel- und Muskelzellen beschichtet, die aus Blasenteilresektaten von weiteren Hunden kultiviert wurden. Die Blasenkapazität dieser Tiere war durch die Resektion um 50% reduziert worden, um anschließend mit Hilfe von 5 zellbesiedelten und 5 zellfreien allogenen Submukosa-Präparaten eine Blasenaugmentation vorzunehmen. Bei keinem Hund traten Komplikationen auf. Nach zwei bzw. drei Monaten wurden die Tiere zystographiert und anschließend geopfert. Alle Blasen waren im Zystogramm normal konfiguriert. Einen signifikanten Unterschied zwischen der Verwendung zellbesiedelter und zellfreier Submukosa stellte man bei der Kapazität der auf oben beschriebenen Wege identisch augmentierten

Blasen fest. So vergrößerte sich das Fassungsvermögen im Falle der zellbeschichteten Präparate um 99%. Diese Blasen hatten also wieder ihre ursprüngliche Größe erreicht. Bei der Augmentation unter Zuhilfenahme des zellfreien Materials gleicher Größe erzielte man eine Vergrößerung des Organs um nur 30%. Histologisch boten alle zehn Blasen ein vollständig urothelialisiertes Lumen, umgeben von regelrechter Submukosa und Muskelschicht. Die Muskulatur wurde bei den zellbesiedelten Implantaten als kräftiger beschrieben. Die Studie legt dar, daß sich die implantierten allogenen Submukosa-Präparate auch ohne die Beimpfung mit Urothel- oder Muskelzellen zu einer relativ normalen Blasenwand entwickeln. Hier ergaben sich aber Probleme mit dem geringen Kapazitätsgewinn, da sich das Implantat im Laufe der Zeit kontrahiert. Die Verwendung von zellbeladenen Submukosateilstücken bewirkt hingegen die Bildung eines histologisch und funktionell nicht von dem der nativen Blase zu unterscheidenden Gewebes.

Eine Gruppe um BERGMAN¹⁷ ersetzte etwa 4 cm lange Uretersegmente an sechs Hunden durch Poly-L-Lactid-Röhrchen. Auch hier handelte es sich um ein biodegradierbares Material. Alle Hunde zeigten unmittelbar postoperativ ein normales Ausscheidungsurogramm und im gesamten Verlauf traten keine Infektionen auf, obwohl auf eine Antibiose verzichtet wurde. In sämtlichen Fällen wuchs zwar eine neue Mukosa um das gesamte 4 cm lange Implantat, diese war aber leicht von dem umgebenden Bindegewebe zu separieren. Bei vier der sechs Tiere kam es nach spätestens acht Monaten zu schwerwiegenden Obstruktionen mit zum Teil gravierenden Nierenschäden durch den groben Zerfall des Polymers. Lediglich zwei Hunde zeigten nach acht Monaten ein normales Ausscheidungsurogramm und keinerlei Hydronephrose.

Die Studie legt dar, daß es grundsätzlich möglich ist, über eine solche Wachstumsschiene eine Mukosaneubildung zu erreichen und die normale Ureterfunktion zu gewährleisten. Ein aperistaltisches Uretersegment führt nicht zwingend zu einer Stauungsniere. Das gewählte Material erwies sich jedoch als wenig geeignet. Es löste sich zwar auf, zerfiel aber in relativ große Fragmente, die in vier von sechs Fällen für eine mehr oder weniger ausgeprägte Obstruktion des Harnleiters mit entsprechenden Konsequenzen für die Niere verantwortlich waren.

SCHLICK³² untersuchte zwei von ihm nicht näher beschriebene Kunststoffe, die er als G 100X-15LB und G 100X-20LB bezeichnete, hinsichtlich ihrer pH-abhängigen Resorbierbarkeit in künstlichem Urin. Seine Überlegung war, einen Ureterstent zu

entwickeln, der dem üblicherweise sauren Urin (pH 5-6) widersteht, sich nach Alkalisieren des Harns jedoch auflöst, so daß sich der Zeitpunkt der Entfernung (bzw. Auflösung) frei wählen läßt. Er beobachtete seine beiden Kunststoffe 30 Tage lang bei Raumtemperatur in künstlichem Urin mit pH 5.2 , 6.7 und 7.9. Beide Materialien blieben bei pH 5,2 unverändert. Bei pH 7,9 war bereits nach 24h der Beginn einer Auflösung deutlich sichtbar. Das Resultat war jedoch keine vollständige Lösung der Kunststoffe, sondern es entstand eine feine Suspension, in der er vereinzelt Fragmente ausmachen konnte, die er bei G 100X-20LB als kleiner beschrieb. Nach 48h waren die kompletten Proben resorbiert.

Bei kritischer Würdigung der vorliegenden Studie muß an dieser Stelle angemerkt werden, daß der Autor auf jegliche quantitative Untersuchung der Abbaubarkeit des Materials verzichtete. Außerdem erfolgten keine Kontrollen des pH-Wertes der entsprechenden Lösungen während der Inkubation. Möglicherweise ändert sich dieser durch die Degradierung der Kunststoffe. Die Verwendung eines Puffers wird nicht erwähnt. Zusätzlich wäre eine nähere Beschreibung von G 100X-15LB und G 100X-20LB wünschenswert.

KEMPPAINEN³³ et al. beschrieben Poly(L-Lactid) (PLLA) als biodegradierbares Material im Einsatz als *Urethra*-Stent. Der spiralförmige PLLA-Stent wurde mit D,L-Lactid beschichtet. D,L-Lactid ist ebenfalls degradierbar und löst sich wesentlich schneller auf als PLLA. Dieser Stent wurde acht Kaninchen in die Harnröhre implantiert, nachdem diese urethrotomiert worden waren. Nach drei Monaten zeigte sich *makroskopisch* bei allen Tieren an der Urethrotomie-Lokalisation eine vollständige Integration in die Harnröhrenwand. Es bestand hier kein Anhalt für eine Entzündung, Erosion oder intraluminale Verkrustung. Nach sechs Monaten war der ganze Stent mit Epithel bedeckt. Das Lumen erschien weiterhin frei. Sechs Monate später setzte der Abbau des Stents an der Urethrotomiestelle ein. Auch zu diesem Zeitpunkt fehlte jeglicher Nachweis einer Obstruktion. Histologisch konnte man nur in den ersten drei Monaten leichte Erosionen und eine mäßige Granulozyteninfiltration darstellen.

In einem ähnlichen Experiment implantierten PÉTAS³⁴ et al. Hunden bioresorbierbare Stents nach Nd:YAG-Laser-Behandlung der Vorsteherdrüse in die prostatistische Harnröhre. Als Material verwendeten sie Poly(D,L-Lactid) (PDLLA) und Polyglycolid (PGA). Beide Polymere wurden ohne Komplikationen vollständig resorbiert. PGA löst sich *in vivo* in 3-4 Wochen auf, PDLLA wird in 3-6 Monaten abgebaut. Bei den PDLLA-Tieren fand man teilweise nach 3 Monaten viele kleine Fragmente in der Blase, die jedoch in keinem Fall zu einer Obstruktion führten. Eine differenzierte, material-spezifische Beurteilung histopatho-

logischer Effekte ist aufgrund der gleichzeitig durchgeführten Laser-Behandlung hier schlecht möglich.

ATALA³⁵ et al. versuchten durch Beschichtung eines biodegradierbaren Polymers mit Urothelzellen eine Biokompatibilität und verbesserte epitheliale Reparaturprozesse zu erreichen. Sie gewannen das Zellmaterial von Kaninchen, indem sie deren Harnblasen entfernten, mit gepufferter Kollagenase-Lösung füllten und verschlossen. Die so präparierten Organe wurden ein bis vier Tage inkubiert. Daraus gewann man eine Zellsuspension, mit der Filme aus Polyglycolsäure, einem synthetischen Polymer aus Hydroxylacetat, beschichtet wurden. Diese Filme wurden Nacktmäusen subkutan, retroperitoneal und in das Omentum implantiert. Die Implantate wurden nach 5, 10, 20 und 30 Tagen wieder explantiert. Sowohl bei den beschichteten, als auch bei den unbeschichteten Polymerimplantaten der Kontrollgruppe war bereits nach 5 Tagen eine deutliche Gefäßinjektion sichtbar, die man mit dem gewählten Polymer in Zusammenhang brachte. Mit zunehmender Verweildauer nahm die Dicke der Urothelschicht auf dem Trägermaterial zu, man konnte jedoch auf immer weniger Implantaten Urothel identifizieren. So fanden sich nach 5 Tagen auf 8 von 9 Implantaten einzelne Urothelzellen, nach 10 Tagen nur noch auf 6 von 10 Implantaten. Dafür bestand hier bereits eine geschlossene Epithelschicht. Nach 20 Tagen war in 8 von 22 Fällen sogar eine deutliche Mehrschichtigkeit nachweisbar. Am 30. Tag waren lediglich in 29% Urothelien überhaupt erkennbar, diese waren jedoch alle mehrschichtig angeordnet, wiesen allerdings zum Teil schon eindeutige Zeichen des Zelltodes auf. Diese Studie zeigt die grundsätzliche Durchführbarkeit einer Beschichtung biodegradierbarer Materialien mit Urothelzellen, welche nach der Implantation sogar proliferieren können. Probleme ergeben sich durch die Überlebensfähigkeit und –dauer dieser Zellen.

1.4 Herstellungsverfahren

1.4.1 Formgebung

Zur Zeit werden resorbierbare Polymere vor allem durch die Formgebungsverfahren des Spritzgießens und der Extrusion verarbeitet. Beim Spritzgießen plastifiziert man die pulver- oder granulatförmige Formmasse in einem beheizten Schneckenkolben und preßt sie mit hohem Druck in die formgebende Höhlung des Spritzgießwerkzeuges. Nachteilig ist, daß die Polymere bei diesem Vorgang einer starken thermischen und mechanischen Belastung ausgesetzt werden. Ein Molekulargewichtsabbau ist die Folge. Weiterhin schließt sich so die Möglichkeit aus, temperatursensitive Additive zu inkorporieren.

Eine Methode, die eine materialschonende Formgebung und das Zufügen biologisch aktiver Substanzen erlaubt, ist das Gasbeladungsverfahren. Es beruht auf der Plastifizierung von amorphen Polymeren durch die Beladung mit CO₂ bei hohem Druck. Die zur Gestaltung notwendige Viskositätserniedrigung wird nicht durch eine Temperaturerhöhung, sondern vor allem durch das Lösen von Gas in der polymeren Matrix herbeigeführt. Die Formgebung mittels einer Preß- oder Einspritzvorrichtung wird dann möglich (MICHAELI³⁶ et al). Daneben ist im Rahmen des Gasbeladungsverfahrens ein Aufschäumen des Polymerpulvers in einer formgebenden Kavität durchführbar (Formschäumen, siehe 2.3.1.1). Diese Technik führt zur Bildung einer mikrozellulären Schaumstruktur, so daß ein gleichmäßiges Auflösen des Materials gefördert wird. Zusätzlich ist aufgrund der Mikroporosität ein Einwachsen von Urothel in den Stent möglich. Dadurch werden einerseits Wachstums- und Regenerationsvorgänge begünstigt und andererseits wird einer Migration der Schiene oder einzelner Fragmente nach vorzeitiger Resorption der Fixationsnähte vorgebeugt (RITTER³⁷).

1.4.2 Oberflächenmodifizierung

Entscheidend für die Biokompatibilität eines Implantates ist eine organadaptierte Oberfläche. Um diese zu erreichen wird die plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation eingesetzt. Hier ist zunächst eine Plasmabehandlung des Kunststoffes notwendig. Unter dem Begriff Plasma versteht man angeregtes Gas (hier: Argon). Plasma enthält Neutralteilchen, Radikale, Ionen, Elektronen und angeregte Atome. Der zu modifizierende Kunststoff wird diesem Plasma

ausgesetzt und auf seiner Oberfläche entstehen Radikale durch homolytische Bindungsspaltung von Polymerketten. Während der anschließenden Luftexposition des Materials reagieren die erzeugten Radikale mit Sauerstoff zu Peroxid ab (SHI³⁸ et al).

Bei der Pfropfcopolymerisation wird plasmabehandeltes Material in eine Monomerlösung gegeben und thermisch oder durch UV-Licht-initiiert eine radikalische Polymerisation durchgeführt. Durch die geeignete Energiezufuhr lassen sich die Peroxide weitgehend selektiv aufbrechen und binden das zugegebene Monomer, so daß ein dünner Polymerfilm auf der zu modifizierenden Oberfläche entsteht. Durch Variation der Monomere ist es realisierbar, verschiedene funktionelle Gruppen auf der Oberfläche zu etablieren. So sind die unterschiedlichsten Beschichtungen denkbar, bis hin zur Auftragung pharmakologisch wirksamer Substanzen oder Wachstumsfaktoren (ROOS³⁹).

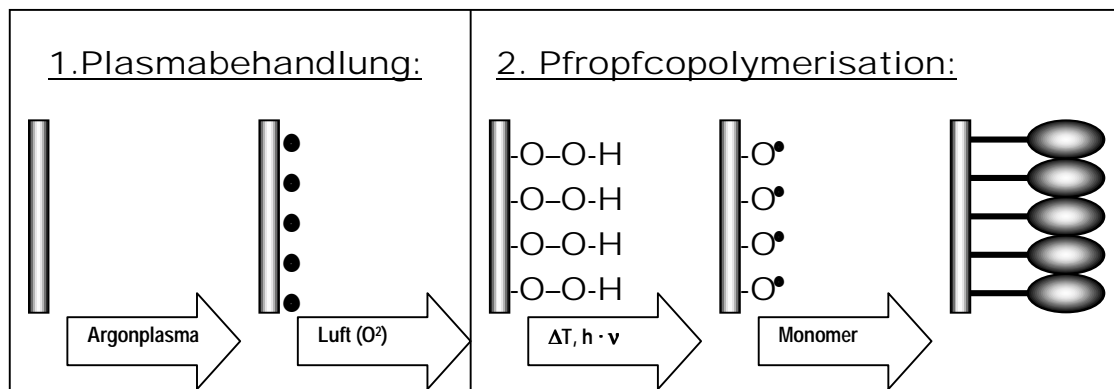


Abbildung 5: plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation nach ROOS

1.5 Ziele

Das Versuchsvorhaben hat zum Ziel, eine kurzstreckige, bioresorbierbare Ureterschleife zu entwickeln und diese mit einer geeigneten Oberfläche zu versehen. Die bereits erwähnten Nachteile der herkömmlichen Stents, die ja den gesamten Harnleiter schienen, sollen durch die neue Geometrie wegfallen. Besonders wichtig scheint zu sein, daß durch die kurzstreckige Schienung der vesiko-ureterale Reflux verschwindet oder klinisch unbedeutend wird und so Druckschäden der Nieren vermieden werden können. Die Bioresorbierbarkeit macht einen erneuten Eingriff zum Entfernen der Schleife überflüssig.

Ein bedeutender Punkt ist die Herstellungstechnik derartiger Endoprothesen. Hierzu wird das oben beschriebene Gasbeladungsverfahren zum Einsatz kommen. Es erlaubt zum einen auf einfache Weise die Realisierung einer Mikroporosität, zum anderen ist aufgrund der niedrigen Prozeßtemperatur die Einarbeitung temperatursensitiver Wirkstoffe möglich.

Durch geeignete Oberflächenmodifizierung durch die plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation soll die Oberfläche so gestaltet werden, daß ein biokompatibler, organadaptierter Stent entsteht. Hier kommen verschiedene Monomere zum Einsatz. Die Überprüfung der Oberflächenmodifizierung erfolgt mittels Kontaktwinkelmessung nach der captive-bubble-Methode.

Die geplanten Arbeiten für die Ureterschleife erstrecken sich von der Materialauswahl über die Entwicklung eines Fertigungsverfahrens bis hin zu einer *in vitro*-Testung, bei der Abbauverhalten, Biokompatibilität und Zytotoxizität, sowie Zelladhäsion an RT-112 Urothelzellen und humanen Urothel-Primärkulturen untersucht werden.

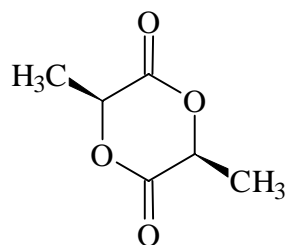
Schließlich wird der Stent im tierexperimentellen Einsatz an Schafen auf seine *in vivo* – Tauglichkeit geprüft.

2 Material und Methoden

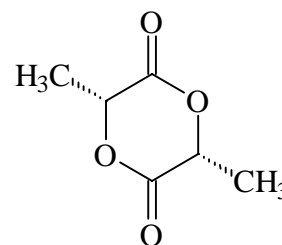
2.1 Verwendete Kunststoffe, Verarbeitung und Untersuchung

2.1.1 Polymere

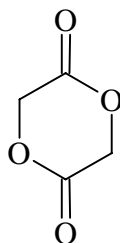
Zur Anwendung kam das biodegradierbare synthetische Homopolymer Poly(D,L-Lactid) (PDLLA) und die Copolymere Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) (PDLLA-co-Gly) und Poly(D,L-Lactid-co-Trimethylencarbonat) (PDLLA-co-TMC), die alle unter dem Handelsnamen Resomer® von der Fa. Boehringer (Ingelheim, Deutschland) als Granulat bezogen wurden. Resomer® wird durch Polykondensation von Hydroxycarbonsäuren oder durch ringöffnende Polymerisation von Lactonen erhalten. So werden PDLLA aus racemischem D,L-Lactid und die Copolymere aus einer Mischung von D,L-Lactid und Glycolid bzw. Trimethylencarbonat (TMC) hergestellt. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der hydrolytische Abbau zu Milch- bzw. Glycolsäure. Diese Substanzen werden vom Organismus metabolisiert und ausgeschieden (BOEHRINGER⁴⁰).



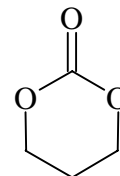
L,L-Lactid



D,D-Lactid



Glycolid



**Trimethylen-
carbonat**

Abbildung 6: Strukturformeln

2.1.2 Herstellung der Polymerfolien

Zunächst wurden die oben genannten Polymere mit einer Konzentration von 100 g/l in Chloroform gelöst und diese Lösung anschließend in waagrecht ausgerichtete mit Polytetrafluorethylen (PTFE) beschichtete Kavitäten mit einer Größe von 200 – 400 cm² gegossen. Die Menge der Polymerlösung pro Fläche betrug ca. 0,25 ml/cm². Im Folgenden ließ man das Lösungsmittel unter einem lösungsmittelbeständigen Staubschutz über 24h bei Raumtemperatur verdampfen. Um etwaige Lösungsmittelreste zu eliminieren, erfolgte über Nacht eine Lagerung im Vakuumtrockenschrank.

2.1.3 Oberflächenmodifizierung

2.1.3.1 Argon-Plasmabehandlung

Der gemeinsame initiale Schritt der Oberflächenmodifizierung ist die Argon-Plasmabehandlung, die mit der Mikrowellen-Versuchsanlage Hexagon (Technics Plasma, Kirchheim, Deutschland) durchgeführt wurde. Die Polymerproben wurden in der Mitte der Reaktorkammer plziert. Vor jeder Behandlung wurde die Kammer auf einen Druck von ca. 10⁻² mbar evakuiert und der Druck anschließend mittels einer Hochvakuumpumpe weiter auf ca. 10⁻⁵ mbar reduziert. Nach dreimaligem Fluten und Evakuieren mit Argon wurde ein kontinuierlicher Gasfluß von 17 ml/min eingestellt. Die Leistung des Mikrowellen-Generators lag bei 300 W. Die Plasmabehandlungsdauer wurde ab dem Zündzeitpunkt des Plasmas gemessen und betrug bei der Argonplasmabehandlung 30 sec.

2.1.3.2 Plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation

Die der Argon-Plasmabehandlung unterzogenen Polymerproben wurden nach einer Luftexposition von 1 – 2,5 h weiterverarbeitet. Die Pfropfcopolymerisation erfolgte unter Stickstoffatmosphäre. Hierbei wurden die Proben mit einem Excimer-Gerät von Heraeus, (Hanau, Deutschland) mit monochromatischer UV-Strahlung der Wellenlänge $\lambda=308$ nm bestrahlt. Eine gute Durchmischung und Erkennung einer Viskositätserhöhung konnte durch leichtes Schwenken der Polymerisationslösung erzielt werden.

Die maximale Behandlungsdauer wurde bei einer offenkundigen Erhöhung der Viskosität erreicht.

Zur Pfcopolymerisation wurden folgende Monomere verwendet:

- frisch destillierte Acrylsäure der Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)
- frisch destilliertes 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), der Fa. Fluka (Buchs, Schweiz)
- Oligo(ethylenoxid)monomethacrylat (OEOMA) der Fa. Aldrich (Steinheim, Deutschland)

- Im Falle der **Acrylsäure** wurden plasmabehandelte Polymerproben (ca. 160 cm²) jeweils zu 100 ml einer Lösung von Acrylsäure in entionisiertem Wasser (20% , v/v) gegeben.
- Für die **HEMA**-Pfcopolymerisation wurden ebenfalls ca. 160 cm² Polymerproben zu 100 ml einer Monomerlösung gegeben. Diese Lösung (20%, v/v) bestand aus 75 ml entionisiertem Wasser, 5 ml Methanol und 20 ml HEMA.
- Vor der **OEOMA**-Behandlung mußte das Monomer in Methanol (1/1, w/v) gelöst und durch Säulen über DEHIBIT der Fa. Polysciences (Warrington, USA) vom Inhibitor Hydrochinonmonomethylether befreit werden. Es wurden nun 160 cm² große Polymerproben zu 100 ml einer OEOMA-Lösung gegeben. Für OEOMA (n=5) wurde die Lösung (25%,v/v) aus 55 ml entionisiertem Wasser, 20 ml Methanol und 25 ml Monomer hergestellt. Bei OEOMA (n=10) bestand diese aus 50 ml entionisiertem Wasser, 20 ml Methanol und 30 ml Monomer (30% ,v/v).

	HEMA	Acrylsäure	OEOMA n=5	OEOMA n=10
Entionis. H ₂ O	75 ml	80 ml	55 ml	50 ml
Methanol	5 ml	————	20 ml	20 ml
Monomer	20 ml	20 ml	25 ml	30 ml
	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

Alle Proben wurden anschließend mit UV-Licht bestrahlt und die Polymerisation unter leichtem Schwenken bis zu einer Viskositätserhöhung der Polymerlösung durchgeführt. Hierbei betrug die maximale Bestrahlungsdauer für HEMA, OEOMA (n=5) und OEOMA (n=10) 20 min, die durchschnittliche Behandlungsdauer 15 min. Für Acrylsäure lagen diese Zeiten bei 5 bzw. 2,5 min.

Zur Entfernung von gebildetem Homopolymer wurden alle Proben sofort anschließend

gespült. Dies erfolgte bei HEMA, OEOMA (n=5) und OEOMA (n=10) 4 mal über einen Zeitraum von 30 min und nochmals über 16 h mit Methanol in entionisiertem Wasser (25%,v/v). Acrylsäure beschichtete Proben wurden 8 mal über 15 min und über 16 h in entionisiertem Wasser ohne Methanol gespült.

Schließlich wurden alle Proben über Nacht im Vakuum getrocknet.

2.1.4 Kontaktwinkelmessung

Zur Oberflächencharakterisierung kam die Kontaktwinkelmessung zum Einsatz. Sie wurde nach der *captive-bubble-Methode* an einem Goniometermikroskop G-23 der Fa. Krüss (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zur Bestimmung des Kontaktwinkels wurden ca. 4cm² große Polymerproben mit doppelseitigem Klebeband auf einem Objekträger fixiert und mit der Probenseite nach unten in ein mit entionisiertem Wasser gefülltes Gefäß auf zwei Sockel gelegt. Mit Hilfe des Goniometermikroskopes konnte nun der Winkel zwischen Polymeroberfläche und Luftblasen, die mittels einer Mikroliterbürette mit einem Volumen von 0,5 – 1,0 µl unter die Probe gebracht wurden, ermittelt werden. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur und mit je 10 Luftblasen/Probe.

2.1.5 Degradierung der Polymerfolien in PBS

Die Untersuchungen zum hydrolytischen Abbauverhalten der verwendeten Polymere erfolgte bei 37°C, um den physiologischen Verhältnissen möglichst nahe zu kommen. Die Polymerfolien wurden in einem PBS-Puffer (Sigma, St Louis, USA) (pH 7,4) mit Zusatz von Natriumazid (0,02%, w/v) inkubiert. Das Natriumazid verhindert ein unerwünschtes Bakterienwachstum. Jeweils 100 mg Polymerfolien wurden in 100 ml der Pufferlösung in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt. Ein Austausch des Puffermediums erfolgte für PDLLA und PDLLA-co-TMC nach jeweils 7 Tagen, im Falle des PDLLA-co-Gly täglich. An festgelegten Versuchsendpunkten wurde das verbliebene Polymer dem Puffer entnommen bzw. abfiltriert, dreimalig kurz und dann über 1 h in entionisiertem Wasser gewaschen, um etwaige Salzreste zu entfernen. Nach dem Trocknen im Vakuum über Nacht wurde der Gewichtsverlust gravimetrisch bestimmt. Anschließend wurde erneut eine Oberflächenuntersuchung mittels Kontaktwinkelmessung durchgeführt.

2.2 Zellbiologische Untersuchungen

2.2.1 Zellen und deren Kulturbedingungen

Die *in-vitro*-Studien wurden mit immortalisierten RT-112-Zellen (humanes Urothelkarzinom) und humanen Urothelprimärkulturen aus dem Harnleiter durchgeführt.

Die Kultur der **RT-112-Zellen** erfolgte in handelsüblichen Kulturflaschen mit dem Universalmedium RPMI-1640 (Bio Whittaker, Vervier, Belgien). Dem Medium wurden 10% fetales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben. Die Zellen wurden nun bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für das Passagieren wurde Trypsin/EDTA (0,25%) verwendet.

Zur Aufarbeitung der **urothelialen Primärkulturen** wurden Gewebeproben aus Operationspräparaten von humanem Harnleiter in 3 x 3 mm große Stücke separiert und mit der Urothelseite nach unten auf den Boden einer adaptierten Kulturflasche der Fa. Saarstedt (Nümbrecht, Deutschland) aufgebracht. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Spezial-Medium benetzt. Hier wurde ein REGM-BulletKit (REGM=Renal Epithelial Cell Growth Medium; Bio Whittaker, Vervier, Belgien) eingesetzt.

- REGM-BulletKit enthält:
- 1.) REBM-Medium (Renal Epithelial Cell Basal Medium)
 - 2.) Folgende Zusatzstoffe: - hEGF (Wachstumsfaktor)
 - Insulin
 - Hydrokortison
 - FBS (fetales Rinderserum)
 - Epinephrin
 - Trijodthyronin
 - Transferrin
 - Gentamicin
 - Amphotericin-B

Die Zellen wurden nun bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 24 h wurden weitere 15 ml Medium aufgefüllt und solange kultiviert, bis Urothelzellen aus dem Gewebe herauswuchsen. Nach der Entnahme der Gewebestücke wurden die Zellen weitergezüchtet.

Für das Passagieren wurde Trypsin/EDTA (0,25%) verwendet.

Anschließend wurde eine Typisierung mit indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Hier wurde als Primärantikörper Anti-Cytokeratin 18 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) benutzt. Außerdem wurde eine Kontrolle auf möglichen Fibroblasten-Bewuchs mit Anti-Vimentin als Primärantikörper durchgeführt. In beiden Fällen diente Anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert (DAKO, Hamburg, Deutschland) als Sekundärantikörper. Als Kontrolle der Typisierungsverfahren wurden für Anti-Cytokeratin 18 bzw. Anti-Vimentin RT-112-Urothelzellen bzw. L-929-Mausfibroblasten getestet.

2.2.2 Adhäsionstest

Zunächst ließ man die zu testenden Polymere 24 h in PBS quellen. Die Polymerfolien wurden nun auf Objektträgern fixiert und mit Zellen in einer Dichte von 80000/ml besiedelt, um anschließend 16 h lang inkubiert zu werden. Es erfolgte dann eine Ethidiumbromid- oder DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid). Für die Färbung mit Ethidiumbromid wurden die Proben zunächst 20 min in 3,7% Formalin fixiert und danach mit PBS gespült. Jetzt wurde der Objektträger mit 50µl einer Lösung von Ethidiumbromid in physiologischer Kochsalzlösung (0,5%) in 10 ml PBS über 2 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Fixierung wird die Membranintegrität der Zelle verletzt. Dadurch färbt sich die gesamte Zelle in der Fluoreszenzmikroskopie rot. Bei der DAPI-Färbung wurden die Präparate nach Spülen mit PBS und mit DAPI-Methanol-Gemisch (25 µl DAPI-Stammlösung + 10ml Methanol) über 15 min in DAPI-Methanol-Gemisch bei 37°C gefärbt und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an DNA und bildet blau fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. DAPI wird von den Zellen sehr rasch aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Abschließend erfolgte nach beiden Färbungen eine quantitative Bestimmung der besiedelten Fläche unter Zuhilfenahme des Bildverarbeitungsgerätes Quantimet 600 S. Als Kontrolle wurde eine Probe Biofolie der Fa. Heraeus (Hanau, Deutschland) mitgeführt.

2.2.3 Zytotoxizitätsstudien

Die Untersuchungen wurden im **direkten** Kontakt und im **indirekten** Kontakt durchgeführt. Im direkten Kontakt werden die Zellen dem zu prüfenden Polymer unmittelbar ausgesetzt, im indirekten Kontakt dagegen in einer Polymerlösung inkubiert.

⇒ In allen **direkten** Tests wurden grundsätzlich folgende Kontrollen mitgeführt:

- Negativ-Kontrolle: Biofilm von Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Positiv-Kontrolle : toxische Folie von Rehau (Rehau, Deutschland)

⇒ In allen **indirekten** Tests wurden grundsätzlich folgende Kontrollen mitgeführt:

- Negativ-Kontrolle: reines Zellkulturmedium
- Positiv-Kontrolle : Medium mit Zusatz von 10% Ethanol (sicher toxisch)

2.2.3.1 Extrakterstellung (Prüfmedium) für die indirekten Tests

Zunächst wurden die Materialproben oder Kontrollen mit einer Schere oder einem Skalpell zugeschnitten und anschließend sterilisiert. Dann wurden acht Materialstreifen mit einer Größe von 1 x 2,5cm in eine Glasfärbeküvette gegeben und diese im Falle einer Prüfung von RT-112-Zellen mit 15,5 ml entionisiertem Wasser gefüllt. Für eine geplante anschließende Testung der urothelialen Primärkulturen wurde anstelle des entionisierten Wassers 20 ml REBM-Medium verwendet. Nach Versiegelung der Küvetten mit Parafilm und erfolgter Inkubation über 72h bei 37 °C wurde der Extraktlösung für die Arbeiten an RT-112-Zellen 10fach konzentriertes RMPI-Medium im Verhältnis 9:1 (v/v) und 646µl 7,5%ige sterile NaHCO₃-Lösung zugegeben.

Anschließend wurde der pH-Wert der jeweiligen Lösungen auf pH=7,4 eingestellt. Danach erfolgte eine Filtration. Für die Testung der RT-112-Zellen wurden schließlich 10% fetales Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Sollten Urothel-Primärkulturen geprüft werden, so wurde das Prüfmedium durch Zugabe der oben erwähnten Zusatzstoffe aus dem REGM-BulletKit hergestellt. Für beide Kulturen betrug das endgültige Mischungsverhältnis der Prüfmedien 2 cm² Polymerprobe/ml Medium.

2.2.3.2 Zellmorphologische Untersuchungen

Zur Beurteilung der Zellmorphologie nach direktem Kontakt mit dem zu untersuchenden Polymer wurde eine entsprechende Probe auf einem Objektträger fixiert. Anpassend an die individuelle Wachstumskurve der Zellkulturen wurden die jeweiligen Zellen in einer unterschiedlichen Dichte auf die Objektträger gegeben, damit gewährleistet ist, daß sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Deshalb wurden die RT-112-Zellen in einer Dichte von 50000/ml, die Zellen der urothelialen Primärkultur dagegen in einer Dichte von 80000/ml ausgesät und 24 h unter den oben genannten Kulturbedingungen inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 3,7% Formalin 20 min fixiert und danach in entionisiertem Wasser über 5 min gespült. Für die 10 min dauernde Färbung kam eine Hämalaun-Fertiglösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Anwendung. Die Proben wurden nun 20 min unter fließendem Wasser gespült, um dann an der Luft zu trocknen. Es schloß sich eine Bewertung nach den üblichen zellmorphologischen Kriterien unter dem Durchlichtmikroskop an.

Um die Morphologie der Zellen nach indirektem Kontakt zu beurteilen, wurde zunächst eine Extraktlösung aus Polymerfolie in entionisiertem Wasser bzw. REBM-Medium angesetzt und über 72 h bei 37°C inkubiert und daraus das Prüfmedium hergestellt (siehe 2.2.3.1). Die Zellen wurden auf Objektträgern mit Flexiperm (12 Wells) in einer Dichte von 30000/ml (RT-112) bzw. 50000/ml (Primärkultur) ausgesät und unter den entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert (100µl Medium/Well). Das Medium wurde nun gegen das Prüfmedium ausgetauscht. Es folgte eine erneute Inkubation über 24 h. Die Färbung wurde analog dem Vorgehen im direkten Kontakt durchgeführt.

2.2.3.3 Zellproliferationstest (BrdU)

Zur Untersuchung der Zellproliferation nach direktem Kontakt wurden Polymerproben auf einem Objektträger fixiert und mit Zellen in einer Dichte von 50000/ml besiedelt. Danach wurde die Probe 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 10 ml Medium/Objektträger inkubiert. Für die folgende Prüfung wurde ein BrdU-Labeling-and-Detection-Kit der Fa. Boehringer (Mannheim, Deutschland) verwendet. Nun wurden 1,0 ml BrdU-Lösung, bestehend aus 10 µl BrdU-Labeling-Reagent in 990 µl sterilem Kulturmedium (= 100µmol/l BrdU), pro Objektträger an 10,0 ml Medium pipettiert und 15 – 60 min bei 37°C im Brutschrank

inkubiert. In dieser Zeit wird BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Danach wurde das Labeling-Reagent vorsichtig abgesaugt und die Objektträger dreimal in PBS gewaschen. Nun erfolgte die Fixation der Zellen mit einem Fixationspuffer (70%iges Ethanol in 50 mmol/l Glycin-Puffer, pH 2,0) über 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, gefolgt von dreimaligem Waschen der Objektträger in PBS. Die Materialprobe bzw. Kontrolle wurde mit Anti-BrdU-Arbeitslösung überschichtet und 30 min bei 37°C inkubiert. Diese Arbeitslösung besteht aus Anti-BrdU-Lösung (monoklonaler Maus-Antikörper; Klon BMC 9318, IgG1) und Tris-Puffer (66mmol/l, MgCl 0,66 mmol/l, Mercaptoethanol 1mmol/l) im Verhältnis 1:10. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit PBS wurden die Materialproben bzw. Kontrollen mit Anti-Maus-Ig-Fluorescein-Arbeitslösung überschichtet und wieder 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Diese Arbeitslösung wurde aus Anti-Maus-Ig-Fluorescein-Stammlösung mit PBS im Verhältnis 1:10 hergestellt. Es folgte wieder die dreimalige Waschung mit PBS und schließlich das Eindecken mit DAKO-Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen. Abschließend wurden die Proben im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle hinsichtlich Anzahl und Qualität der markierten Zellkerne beurteilt.

Für die indirekte Kontaktstudie kam der kolorimetrische BrdU-Test zur Anwendung. Hier benötigte man zunächst wieder eine Extraktlösung, die aus Polymerfolien in entionisiertem Wasser bzw. REBM-Medium angesetzt und wie oben beschrieben zu einem Prüfmedium weiterverarbeitet wurde (siehe 2.2.3.1). Die jeweiligen Zellen wurden nun in 96-Well-Platten in einer Dichte von 30000/ml angesiedelt (100 μl Kulturmedium/Well). Diese Zellen wurden 24 h bei 37°C unter Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und gegen das Prüfmedium ausgetauscht. Nach erneuten 24 h Inkubationszeit wurden 10 μl BrdU-Lösung (100 $\mu\text{mol/l}$, s.o.) jedem Well zugefügt. Während der zweistündigen Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird das BrdU anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Dann wurde das Medium gegen 200 μl FixDenat-Lösung/Well ausgetauscht. FixDenat denaturiert die DNA und ermöglicht das Angreifen der Antikörper, die das inkorporierte BrdU detektieren sollen. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte von der Fixierlösung befreit und vorsichtig auf Zellstoff getrocknet. Nun wurden 100 μl Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung/Well pipettiert. Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung enthält monoklonale Maus-Antikörper (Klon BMG 6H8, Fab-Fragmente, Peroxidase-konjugiert) und ist der primäre Antikörper gegen BrdU. Nach 90 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die freien Antikörper durch drei Waschschrte mit 200 μl PBS entfernt und anschließend diese Waschlösung durch 100 μl Substratlösung/Well ersetzt. Die

gebrauchsfertige Lösung enthält Tetramethylbenzidin (TMB). Die an den BrdU-Anti-BrdU-Komplex gekoppelte Peroxidase setzt das Substrat TMB zu einem Farbstoff um. Die Substratreaktion wurde nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch Zugabe von 25 μ l 1mmol/l H₂SO₄ gestoppt. Den Abschluß dieser Untersuchung bildete die Bestimmung der Extinktion mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda=690$ nm).

2.2.3.4 Vitalitätstest mit EB und FDA

Zur Vitalitätsprüfung im direkten Kontakt wurden Polymerproben auf einem Objektträger fixiert und mit Zellen in einer Dichte von 50000/ml besiedelt. Es folgte eine Inkubation über 24 h unter den entsprechenden Kulturbedingungen. Anschließend wurden pro 10 ml Medium je 50 μ l FDA (Fluoreceindiacetat, 0,5 %, w/v in Aceton) und 50 μ l EB (Ethidiumbromid, 0,05% w/v in 0,9% NaCl) zugegeben und die Präparate nach vorsichtigem Mischen 3 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Proben eingedeckt. Schließlich schloß die Beurteilung der Zellen mit dem Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzfilter die Untersuchung ab.

FDA wird intrazellulär enzymatisch zu Fluorescein umgesetzt und färbt das Zytoplasma vitaler Zellen grün. Die DNS toter Zellen reichert durch die herabgesetzte Membranintegrität EB an, so daß hier die Kerne rot gefärbt werden (NETUSCHIL⁴¹).

Die Vitalitätsprüfung im indirekten Kontakt erfolgte nach der Herstellung des Prüfmediums durch dreitägige Inkubation einer Extraktlösung, die aus Polymerproben in entionisiertem Wasser bzw. REBM-Medium angesetzt wurde (siehe 2.2.3.1). Es wurden dann Zellen in einer Dichte von 30000/ml auf Objektträger mit 12 Wells in Quadriperms ausgesät und diese 24 h unter den entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium durch das Prüfmedium ersetzt und erneut 24 h inkubiert. Dann wurde wie oben beschrieben mit je 50 μ l FDA und EB pro 10 ml Medium gefärbt und ausgewertet.

2.2.3.5 Mitochondrien-Aktivität, XTT-Test

Die mitochondriale Aktivität der Zellen nach direktem Kontakt mit dem zu prüfenden Polymer wurde mit dem XTT-Test erfaßt. Hier kam ein XTT-Proliferation-Kit der Fa. Boehringer (Mannheim, Deutschland) zur Anwendung. Die Polymerproben wurden zunächst in Kontaktkammern eingespannt, mit Zellen in einer Dichte von 50000/ml besiedelt und über 24 h bei entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert. Dann wurden pro 100µl Medium 50µl XTT-Reagenz zugefügt, angesetzt aus 5,0 ml XTT-Labeling-Reagent mit 0,1 ml Electron – coupling-Reagent (siehe Herstellerangaben). Nach einer Inkubationszeit von 2 h unter Kulturbedingungen wurde das Medium in 96-Wells-Platten umpipettiert und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm am ELISA-Reader bestimmt. Dieser Test basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT in einen roten Azofarbstoff durch metabolisch aktive Zellen.

Auch hier erfolgte die Prüfung möglicher Einflüsse auf den Metabolismus der Zellen durch die Polymere im indirekten Kontakt. Dazu wurde ein Prüfmedium durch Inkubation einer Extraktlösung aus Polymerfilm in entionisiertem Wasser bzw. REBM-Medium über 72 h bei 37°C hergestellt (siehe 2.2.3.1). Zellen wurden in 96-Wells-Platten in einer Dichte von 30000/ml ausgesät und mit 100 µl entsprechendem Kulturmedium/Well 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen das oben beschriebene Prüfmedium ausgetauscht und erneut 24 h inkubiert. Nach Hinzufügen von 50 µl XTT-Reagenz/Well (siehe oben, direkter Test) vollzog sich die Auswertung nach 2 h Inkubationszeit am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm. Die optische Dichte der Proben wurde mit den Werten der Positiv- und Negativkontrolle verglichen.

2.3 Herstellungstechnik der Harnleiterschiene

2.3.1 Gasbeladungsverfahren (CESP-Verfahren)

2.3.1.1 Grundlagen

Das CESP-Verfahren (Controlled Expansion of Saturated Polymers) beruht auf dem Lösen von Gas (CO₂) in der polymeren Matrix unter hohem Druck. Die dadurch bewirkte Viskositätserniedrigung des Kunststoffes führt zu einer Formbarkeit bereits bei Temperaturen im Bereich der Körperwärme. In der zweiten Phase des Prozesses kommt es zu einer Druckentlastung und damit zu einer Übersättigung des Kunststoffes an CO₂. Diffusion führt nun zur Entgasung des Polymers. Eine ausreichend schnelle Druckentlastung läßt der Diffusion nicht genügend Zeit, das Gas über die Oberfläche der plastifizierten Kunststoffmasse abzuführen. Es erfolgt eine Zellnukleierung, die jedoch durch das gleichzeitige Erstarren des Materials infolge der raschen Temperaturabnahme gestoppt wird, so daß viele kleine Zellen entstehen. Die daraus resultierenden Vorteile wurden in 1.4.1. näher beschrieben.

Kohlendioxid eignet sich hier besonders, da es neben guten Löseeigenschaften und einer chemischen Beständigkeit auch eine hervorragende medizinische Verträglichkeit bietet (RITTER³⁷).

Die gewünschte Form erhält das Material, indem es pulverförmig in das Werkzeug gegeben wird und anschließend in der oben beschriebenen Weise im Druckbehälter der Gasbeladungsanlage zu der durch die Kavität vorgegebenen Geometrie aufgeschäumt wird. Für die Stentproduktion wurde ausschließlich das Material PDLLA-co-TMC verwendet, da es sich in den Vorversuchen als besonders geeignet erwiesen hatte.

2.3.1.2 Maschinenteknik

Die am Institut für Kunststoffverarbeitung (IKV) in Industrie und Handwerk der RWTH Aachen entwickelte Hochdruckbegasungsanlage besteht aus einem Druckbehälter, einer Druckerhöhungseinheit (Kolbenmembranpumpe), der Temperierung und Steuerung. Das CO₂ wird aus Vorratsflaschen über die Druckerhöhungseinheit in den Hochdruckbereich geleitet. Hierbei ist eine Kompression des Gases auf Drücke bis zu 250 bar möglich. Den

erforderlichen Arbeitsraum im Hochdruckbereich bildet der wassertemperierte Autoklav mit Druck- und Temperatursensorik. Durch die Wassertemperierung können Temperaturen von 10°C bis 140°C gewählt werden.

2.3.1.3 Formgebendes Werkzeug

Das eingesetzte Werkzeug wurde aus Stahl angefertigt. Es verfügt über eine zylindrische Kavität mit einem Durchmesser von 2,6 mm bei einer Höhe von 5 cm. Ein zentral ausgerichteter zylindrischer Dorn mit einem Durchmesser von 2 mm dient der Ausformung des Lumens. Im Interesse einer guten Entformbarkeit ist das Werkzeug zweifach teilbar und mit einer 40 µm starken antiadhäsiven Kunststoffbeschichtung auf Tetrafluorethylenbasis versehen. Die derartig hergestellten Schienen haben einen Durchmesser von 8 Charrière.

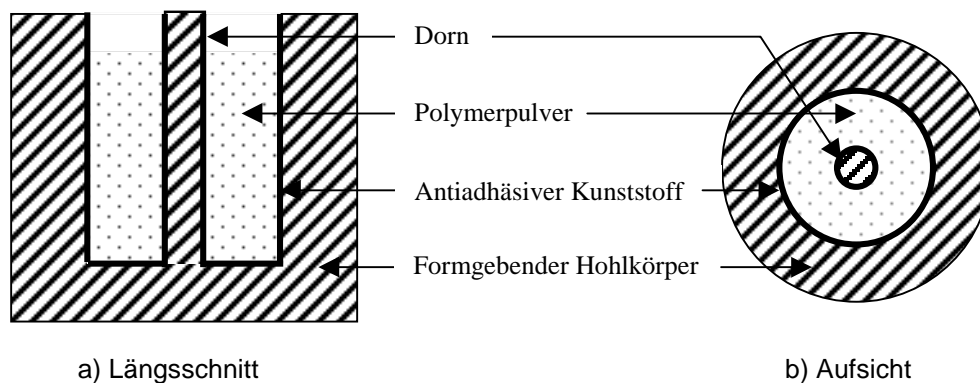


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Werkzeuges

2.3.1.4 Herstellungsbedingungen für die Harnleiterschiene

Die Kavität des formgebenden Werkzeuges (siehe oben) wurde mit etwa 70 mg Polymerpulver befüllt, so daß sich letztendlich eine Schaumdichte von ca. 0,6 g/cm³ ergibt. Zum Formschäumen wurde das Werkzeug anschließend in den Druckbehälter der Hochdruckbegasungsanlage gestellt und das CESP-Verfahren in der oben beschriebenen Art und Weise durchgeführt. Dabei wurde eine Temperatur von 37°C gewählt. Der maximale Druck in der Druckkammer betrug 130 bar.

2.3.2 Oberflächenmodifizierung des Stents

Die PDLLA-co-TMC–Stents wurden durch die plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation weiterverarbeitet (Prinzip siehe 1.4.2). Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche kam als Monomer nur HEMA zum Einsatz. Die Argonplasmabehandlung vollzog sich in gleicher Weise wie im Falle der Polymerfolien (siehe 2.1.3.1). Nach 2 h Luftexposition wurden die Materialproben der Pfropfcopolymerisation (siehe 2.1.3.2) zugeführt. Diese erfolgte hier jedoch nicht durch UV-Licht-initiierte Spaltung der durch die Plasmabehandlung entstandenen Peroxide, sondern thermisch. Eine UV-Licht-Bestrahlung wäre sinnlos, da der Stent auch intraluminal behandelt werden soll.

Die Materialproben wurden in ein Gefäß gegeben und mit einer HEMA-Lösung überschichtet. Diese Lösung setzte sich aus 3 ml HEMA (10%,v/v) und 27ml entionisiertem Wasser zusammen. Nach der Plazierung des Gefäßes auf dem Schwenktisch des Inkubators (Polymax 1040, Heidolph) wurden die Proben über einen Zeitraum von 18 h bei einer Temperatur von 34°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) inkubiert.

Zur Entfernung von gebildetem Homopolymer wurden alle Stents sofort anschließend gespült. Dies erfolgte 4 mal über 30 min und nochmals über 16 h in entionisiertem Wasser. Schließlich wurden alle Schienen über Nacht im Vakuumtrockenschrank getrocknet und einer γ -Sterilisierung zugeführt. Zuvor wurden alle Stents auf eine einheitliche Länge von 3 cm gekürzt und mit einer feinen Schere unregelmäßig mit mehreren kleinen Löchern versehen.



Abbildung 8: Prototyp einer biodegradierbaren, kurzen Ureterschiene

2.4 Degradierung der Stents in humanem Urin

Das Abbauverhalten der PDLLA-co-TMC-HEMA-Harnleiterschienen wurde in humanem Urin untersucht. Die Proben wurden in ein luftdicht verschlossenes Gefäß in sterilen humanen Urin gesunder Probanden gegeben. Die Lagerung des Gefäßes im Versuchsverlauf erfolgte im Wasserbad, dessen Temperatur mittels einer regelbaren Heizplatte mit Thermostat konstant bei 37°C gehalten wurde. Der Urin wurde täglich gewechselt. Wöchentliche gravimetrische Kontrollen nach einer streng eingehaltenen Lufttrocknungszeit von jeweils 3 Stunden dienten der Dokumentation der Gewichtsveränderungen.

2.5 Tierversuch

2.5.1 Versuchstiere und deren Haltung

Die experimentelle Erprobung des Stents am Tier ist für die endgültige Beurteilbarkeit hinsichtlich der für den Einsatz am Menschen erforderlichen Eigenschaften unerlässlich. Als geeignetes Versuchstier wurde das Schaf ausgewählt. Zum einen kommen die physiologischen Verhältnisse des Urogenitaltraktes denen des Menschen sehr nahe, zum anderen konnte von einer guten Handhabung während der Operation und in der postoperativen Betreuung ausgegangen werden. Die Größe des Schafes bietet sowohl übersichtliche Verhältnisse während der operativen Platzierung der Schiene, als auch eine relativ problemlose Betreuung und Verlaufskontrolle, zu der die regelmäßige Entnahme von Blut und Katheterurin, sowie Ultraschalluntersuchungen gehören. Jedes kleinere Tier hätte allein die technische Durchführbarkeit der Operation unmöglich gemacht. Außerdem wäre eine deutlich kleinere Stentgeometrie nötig gewesen. Hier hätten sich Probleme bei der Fertigung ergeben. Darüber hinaus hätten bereits kleinste Fragmente der sich auflösenden Schiene zu schwerwiegenden Obstruktionen des Harnleiters führen können.

Es wurden ausschließlich weibliche Tiere operiert, da sich bei diesen im Gegensatz zu männlichen Tieren die transurethrale Gewinnung von Katheterurin deutlich einfacher gestaltet.

Aus den oben genannten Gründen wurde der Tierversuch mit 6 ausgewachsenen Merino-Mix-Schafen durchgeführt. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 78,3 kg. Das durchschnittliche Alter lag bei 2,5 Jahren. Alle Tiere entstammten einer Freilandhaltung. Da nur weibliche Tiere verwendet wurden, mußte in allen Fällen zuvor eine Gravidität sicher

ausgeschlossen werden. Daher wurden nur Schafe eingesetzt, die nach dem letzten Ablammen in Einzelhaltung oder mit ausschließlich gleichgeschlechtlichen Artgenossen untergebracht waren.

Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn eingehend von Tierärzten auf etwaige Erkrankungen untersucht.

Aufgrund der sozialen Anforderungen der Schafe wurde allen Tieren eine Gruppenhaltung gewährleistet. Wasser und Nahrung standen ad libitum zur Verfügung. Es wurde mit Heu und einem speziellen Kraftfutter für Schafe gefüttert.

Die Gruppe stand in einem etwa 15 m² großen Raum, der mit Stroh ausgelegt war und jeweils 12 Stunden lang beleuchtet und verdunkelt wurde. Die Temperatur lag zwischen 20°C und 24°C.

2.5.2 Operative Stentimplantation

2.5.2.1 Vorbereitung

Die Schafe wurden nach einer Nahrungskarenz von 24 h mit 1 ml Atropinum sulfuricum solutum[®] 1% (WDT, Hannover, Deutschland) i.m. und 0,5 ml Rompun[®] 2% (Bayer, Leverkusen, Deutschland) i.m. vorbereitet. Den sedierten Tieren wurde ein venöser Zugang gelegt und über diesen 4-5 ml Narcoren[®] (Rhône Merieux, Laupheim, Deutschland) in NaCl 0.9% (1/1,v/v) gegeben. Die so narkotisierten Tiere wurden im Operationsbereich geschoren. Dann wurde eine Magensonde eingeführt. Anschließend wurde mit einem Endotrachealtubus (ID: 8,5 mm) oral intubiert. Die Schafe wurden nun mit einem Gasgemisch aus O₂ und N₂O (1 : 3) und 1% Halothan beatmet.

2.5.2.2 Operation

Zunächst erfolgte eine Lagerung in Rückenlage. Dann wurde eine ausgiebige Hautdesinfektion mit Braunollösung durchgeführt und das Operationsfeld steril abgedeckt.

Nach medianer Laparotomie wurde der Darm mobilisiert und der Musculus psoas, die Harnblase und die großen Gefäße dargestellt. Nach Aufsuchen des distalen Harnleiters wurde dieser angezügelt und subtotal quer durchtrennt, so daß lediglich die hintere Ureterwand stehen blieb. Der sterile, 6-7 Charrière große und 3 cm lange PDLLA-co-TMC-Stent wurde eingeführt (Abb. 9) und proximal der Anastomose mit einer 4/0 PDS-Naht fixiert. Schließlich

wurde die Anastomose mit einem 4/0 Dexon-Faden in Einzelknopftechnik verschlossen (Abb. 10) und zur Lokalisation der selbst nicht röntgendichten Schiene mit einem Metallclip im periureteralen Bindegewebe markiert. Daraufhin fand eine Kontrolle auf Bluttrockenheit statt und die Laparotomie wurde zweischichtig in Einzelknopftechnik mit einer 2/0 Dexon-Naht geschlossen. Dann erfolgte ein Einzelknopf-Hautverschluß mit 1/0 Dexon und das Aufnähen einer Kompresse über der Hautnaht.

Postoperativ bekamen die Tiere jeweils 10 ml Borgal und Novalgin i.v. Dann wurden die Schafe nach Ausleitung der Narkose mit reinem Sauerstoff extubiert, in den Stall transportiert und der venöse Zugang gezogen.



Abbildung 9: Der PDLA-co-TMC-HEMA-Stent wird proximal der Ureterotomie in den Harnleiter eingeführt.

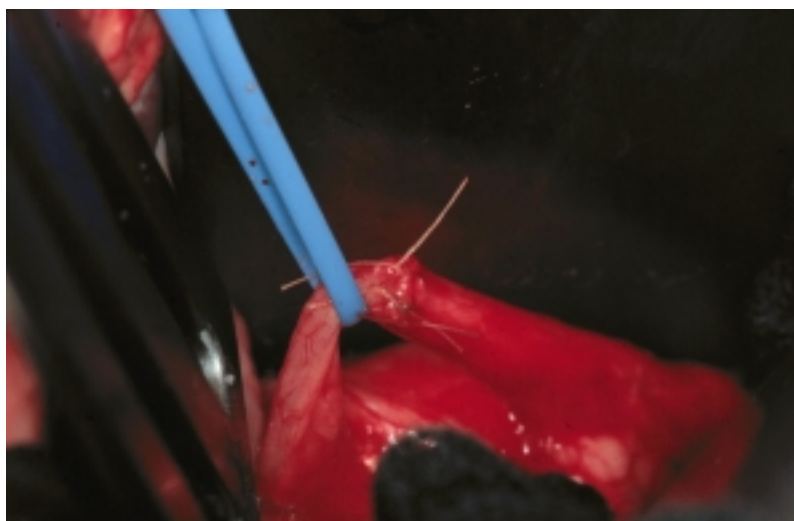


Abbildung 10: Die Ureterotomie wird mit 4/0 Dexon Einzelknopfnähten verschlossen

2.5.3 Verlaufskontrollen

Alle Tiere bekamen bis zum einschließlich 5. postoperativen Tag eine Antibiose (Borgal®, Hoechst Roussel, Wiesbaden, Deutschland) und eine bedarfsgerechte Schmerzmedikation (Novaminsulfon®, Albrecht, Aulendorf, Deutschland). 10 ml Borgal® s.c. wurden dabei täglich injiziert. 10 ml Novaminsulfon® i.m. erhielten die Schafe täglich, bis sie schmerzfrei erschienen. Die über der Hautnaht aufgenähten Kompressen wurden am 5. postoperativen Tag entfernt und die Wundheilung regelmäßig kontrolliert.

Die untenstehenden Maßnahmen erfolgten alle acht Tage:

Zur Blutgewinnung wurden die Tiere venös punktiert und die **Blutproben** anschließend umfangreich ausgewertet.

Eine **transurethrale Harnblasenkatheterisierung** diente dem sicheren Ausschluß möglicher Harnwegsinfekte. Dazu wurden die Schafe von einer Hilfsperson in Rückenlage gebracht und fixiert. Dann wurde das äußere Genitale sorgfältig mit einem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert und unter Zuhilfenahme eines sterilen Einmalkatheters der Urin gewonnen. Die Proben wurde mikrobiologisch untersucht.

Eine **Ultraschalluntersuchung** gab Aufschluß über etwaige Veränderungen der Nieren. Insbesondere wurde auf Stauungszeichen geachtet. Zur besseren Verlaufsdokumentation wurden Größe und Parenchymstärke der Nieren regelmäßig vermessen.

2.5.4 Tötung und Sektion der Tiere

Die Schafe wurden mit 1,5 ml Rompun® 2% (Bayer, Leverkusen, Deutschland) i.m. sediert und anschließend mit 20 ml Narcoren® (Rhone Merieux, Laupheim, Deutschland) i.v. eingeschläfert. In der Folge wurden die toten Schafe seziiert und Niere und Harnleiter der Implantationsseite einschließlich Harnblase freipräpariert, in einem Stück entnommen und begutachtet. Dann wurde die Ureteranastomose je 2 cm proximal und distal vom übrigen Harnleiter abgesetzt und in 4 %igem Formalin fixiert.

3 Ergebnisse

3.1 Zellbiologische Untersuchungen

3.1.1 Adhäsionstest

Der Adhäsionstest wurde mit RT-112-Zellen durchgeführt. Es erfolgten mehrere Einzelmessungen bei denen die von RT-112-Zellen besiedelte Fläche der Folien aus verschiedenen Materialien unter Zuhilfenahme des Bildverarbeitungsgerätes Quantimet 600 S bestimmt wurde. Die einzelnen Meßwerte wurden relativ zur Biofolie (100%) gesetzt. Die Ergebnisse nach Ethidiumbromidfärbung von RT-112-Zellen auf verschiedenen Polymeren, Copolymeren und Oberflächenmodifizierungen sind in Abb. 11 dargestellt. Es zeigt sich, daß sich die Anzahl adhärenter Zellen auf den Basismaterialien PDLLA und PDLLA-co-Gly nicht signifikant voneinander unterscheidet (62% und 61%). Im Vergleich dazu ist der Anteil der auf PDLLA-co-TMC haftenden Zellen im Durchschnitt auf 46% reduziert. Eine besonders deutliche Minimierung der Adhäsion kann durch Oberflächenmodifizierung von PDLLA mit HEMA oder OEOMA erreicht werden. Die Pfropfcopolymerisation des PDLLA mit HEMA verringert die Größe der mit RT-112-Zellen besiedelten Fläche auf etwa 30% des Wertes, der für natives PDLLA ermittelt wird (siehe auch Anhang, Tabelle 1).

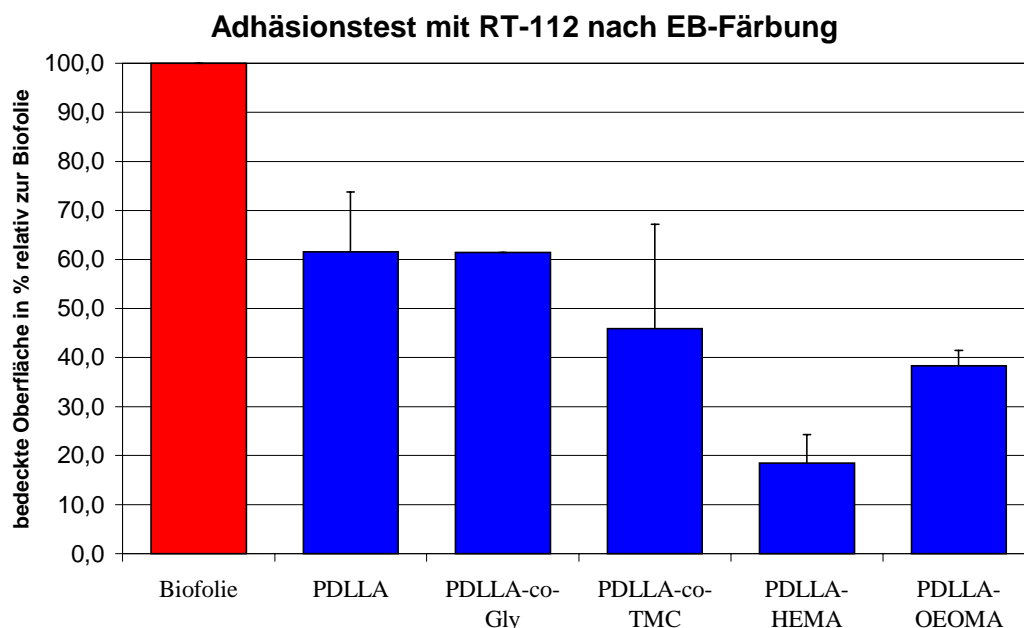


Abbildung 11: Adhäsionstest nach Ethidiumbromid-Färbung mit RT-112

Auch in der Fluoreszenzmikroskopie nach DAPI-Färbung läßt sich nach subjektiver Beurteilung der besiedelten Fläche nachvollziehen, daß eine Reduktion der Zelladhäsion durch Oberflächenmodifizierung mit HEMA erreicht wird. Abb. 12 zeigt den direkten Vergleich von unbehandeltem PDLLA mit PDLLA-HEMA. Durch die DAPI-Färbung entstehen stark blau fluoreszierende Zellkerne, deren Verteilung ebenfalls mit dem Bildverarbeitungsgerät Quantimet 600 S untersucht wurde. Hier ergibt sich, wie nach der Ethidiumbromidfärbung, eine Reduktion der besiedelten Fläche nach HEMA-Behandlung auf etwa 40% im Vergleich zum nicht modifizierten PDLLA.

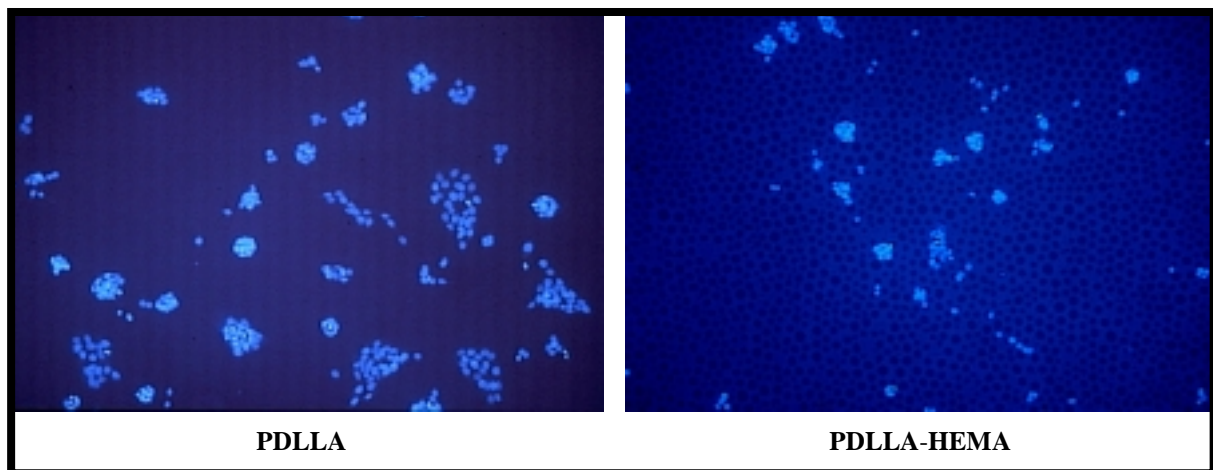


Abbildung 12: Adhäsionstest nach DAPI-Färbung mit RT-112 (Vergrößerung 5x)

3.1.2 Zytotoxizitätsstudien

3.1.2.1 Zellmorphologische Untersuchungen

Die zusätzliche Untersuchung der Morphologie adhärenter Zellen auf den verschiedenen Polymerproben im direkter Kontakt erfolgte nach der Inkubation mit einer Zellsuspension über 24 h und anschließender Fixation. Die fixierten RT-112-Zellen wurden nach Färbung mit Hämalaun anhand ihres äußeren Erscheinungsbildes bewertet (Struktur von Zellkern und Zytoplasma, Zellausbreitung etc.). Keine der untersuchten Oberflächen zeigt morphologische Anzeichen von Zytotoxizität. Deutlich erkennbar ist die gute Zellausbreitung und die fast vollständige Konfluenz der Zellen auf der PDLLA-Oberfläche, wie sie auch die Negativkontrolle (Glas) sowie die Polymere PDLLA-co-Gly und PDLLA-co-TMC aufweisen. Im Gegensatz dazu bietet die PDLLA-HEMA-Oberfläche nach 24 h Inkubation

eine geringere Zellzahl. Zusätzlich sind viele abgekugelte Zellen zu erkennen oder Zellen, deren Zytoplasma nicht vollständig ausgebreitet war. Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen zur Zelladhäsion. Die Untersuchung der Zellmorphologie der RT-112-Zellen nach indirektem Kontakt ergibt ebenfalls keinen Hinweis auf Veränderungen durch die getesteten Materialien (Abb. 13). Auch hier erfolgte die Beurteilung der Zellen nach den üblichen zellmorphologischen Kriterien.

An Primärkulturen wurde lediglich im indirekten Kontakt getestet. Die Hämalanfärbung nach Inkubation der Zellen in mit Polymerextrakt angereichertem Medium erbringt für alle untersuchten Proben (PDLLA, PDLLA-co-TMC, PDLLA-HEMA und PDLLA-OEOMA) eine intakte, physiologische Zellmorphologie.

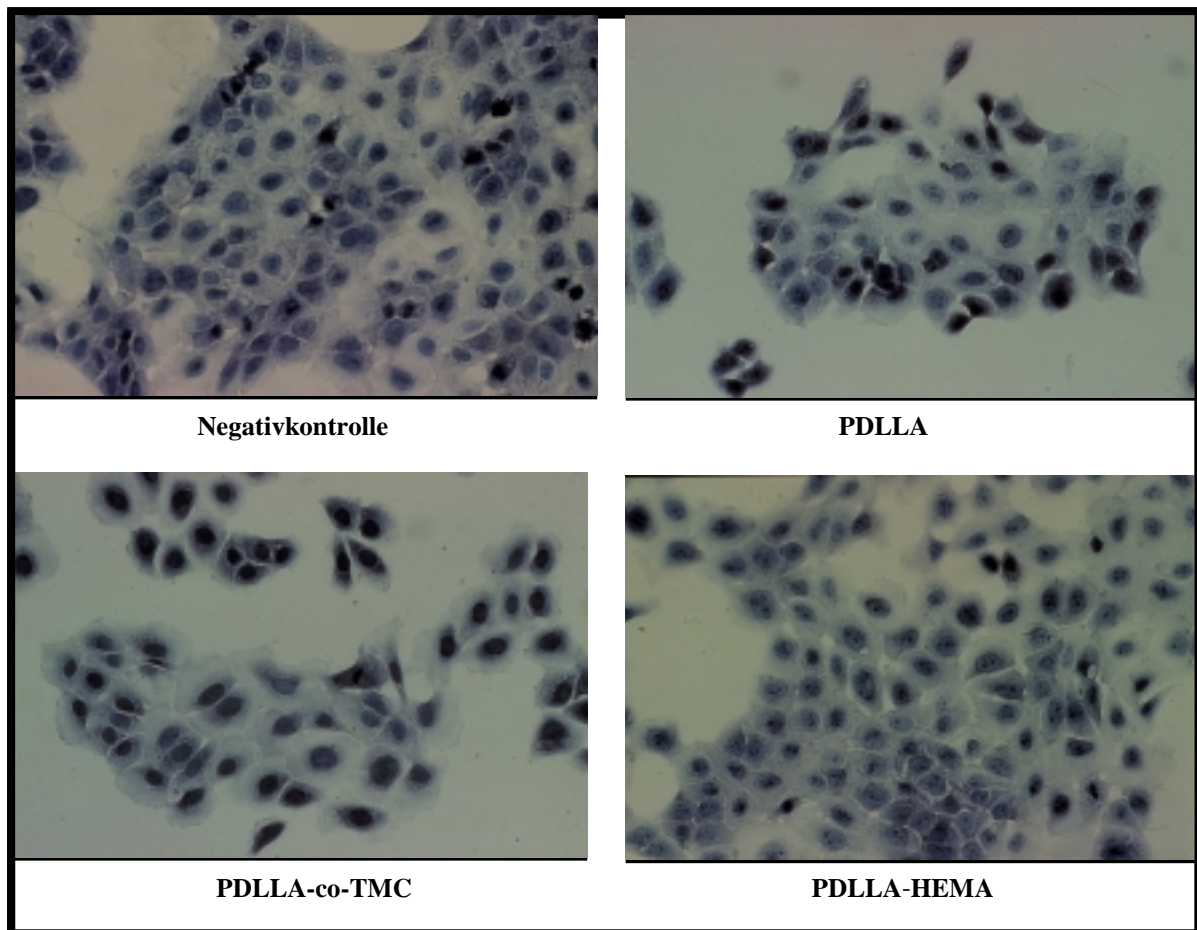


Abbildung 13: Morphologie von RT-112 nach indirektem Kontakt (Vergrößerung 20x, Hämalan)

3.1.2.2 Zellproliferationstest (BrdU)

Die proliferative Kapazität der Zellen wurde nur nach indirektem Materialkontakt untersucht. Der hierzu verwendete kolorimetrische BrdU-Test beruht auf dem Einbau von BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridin) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen. Nach Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers wird am entstandenen Komplex ein Farbstoff umgesetzt, so daß sich über die Veränderung der Extinktion die Zellproliferationsrate bestimmen läßt. In einem Durchgang wurden für verschiedene Materialien jeweils mehrere Extinktionen gemessen. Die Ergebnisse wurden jeweils relativ zum Mittelwert der Negativkontrolle (entspricht 100%) der entsprechenden Untersuchung in Prozent gesetzt und diese Werte gemittelt. Abb. 14 veranschaulicht die Ergebnisse des BrdU-Tests im indirekten Kontakt für Primärkulturen. Untersucht wurden nur PDLLA, PDLLA-HEMA und PDLLA-OEOMA. Es zeigt sich, daß diese drei Materialien im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der die Zellen in reinem Medium inkubiert wurden, keinen hemmenden Einfluß auf das Proliferationsverhalten aufweisen. Für PDLLA ergibt sich in Relation zur Negativkontrolle sogar ein Wert von 110%, für die Oberflächenmodifizierung mit HEMA bzw. OEOMA werden Mittelwerte von 103% bzw. 105% gemessen. Im Gegensatz dazu wird die Proliferation im Falle der Positivkontrolle durch den Zusatz von 10% Ethanol zum Medium um etwa die Hälfte reduziert (siehe auch Anhang, Tabelle 6).

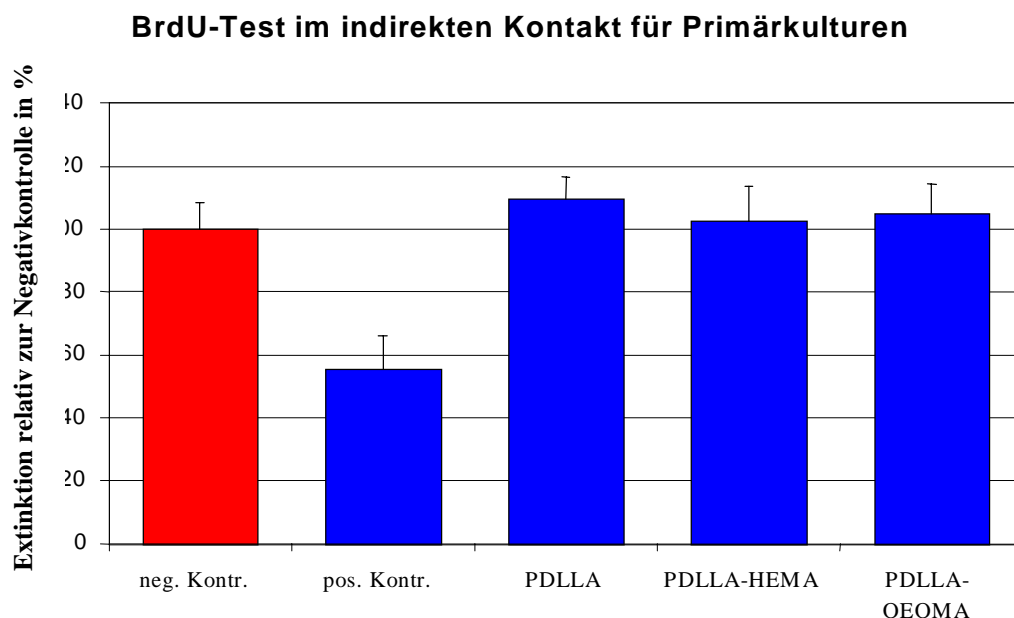


Abbildung 14: BrdU-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen

Der BrdU-Test wurde auch mit RT-112-Zellen durchgeführt. Hier kann ebenfalls kein hemmender Einfluß auf die Proliferation der Zellen durch die untersuchten Kunststoffe ausgemacht werden. Es zeigt sich, daß die Proliferationskapazität durch Inkubation in Medium mit Zusatz von verschiedenen Polymerextrakten deutlich vergrößert wird. Im Vergleich zur Negativkontrolle ergeben sich für PDLLA, PDLLA-co-TMC, PDLLA-co-Gly und PDLLA-HEMA Mittelwerte von 131%, 149%, 141% und 132% (Abb. 15). Lediglich mit OEOMA modifiziertes PDLLA bewirkt keinen fördernden Einfluß auf Proliferation der RT-112-Zellen. Hier liegt der Mittelwert der einzelnen Extinktionen exakt so hoch wie bei der Inkubation in reinem Medium. Auch im BrdU-Test nach indirektem Kontakt für RT-112-Zellen reduziert sich die gemessene Extinktion nach Zugabe von 10% Ethanol zum Medium (Positivkontrolle) im Mittel um etwa die Hälfte (siehe auch Anhang, Tabelle 4).

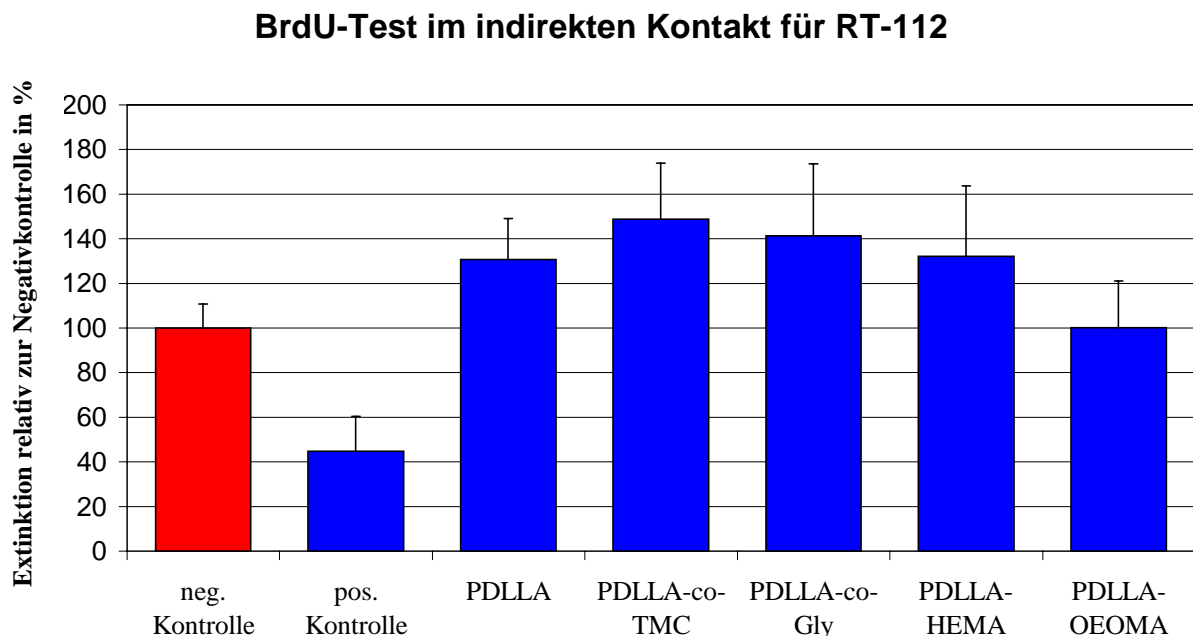


Abbildung 15: BrdU-Test im indirekten Kontakt für RT-112

3.1.2.3 Vitalitätstest mit EB und FDA

Der Vitalitätstest wurde mit RT-112-Zellen im direkten und indirekten Kontakt, für Primärkulturen nur im indirekten Kontakt durchgeführt. Zur Beurteilung der Membranintegrität erfolgte eine Färbung der vitalen Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EB). Während das Zytoplasma intakter Zellen durch Aufnahme von FDA grün fluoresziert, führt die Erhöhung der

Membranpermeabilität geschädigter Zellen zur einer (im Vergleich zu vitalen Zellen) stark beschleunigten Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA der Zellen und damit zu einer roten Fluoreszenz der Kerne dieser Zellen.

Die Färbung der RT-112-Zellen nach direktem Kontakt zeigt im Ergebnis für keine der untersuchten Polymeroberflächen (PDLLA, PDLLA-co-TMC, PDLLA-co-Gly und PDLLA-HEMA) einen toxischen Einfluß. Alle Zellen sind vital. Deutlich zu erkennen ist auch hier die verringerte Zellzahl und verminderte Zellausbreitung auf der PDLLA-HEMA-Oberfläche. Das Erscheinungsbild der verschiedenen Oberflächen korreliert mit den Ergebnissen zur Zellmorphologie.

Die entsprechende Färbung der RT-112-Zellen nach indirektem Materialkontakt erbringt mikroskopisch ebenfalls ausschließlich eine Grünfluoreszenz. In keinem Fall lassen sich rot fluoreszierende und damit in ihrer Membranintegrität geschädigte Zellen detektieren. Die Studie im indirekten Kontakt wurde mit PDLLA, PDLLA-co-TMC, PDLLA-co-Gly, PDLLA-HEMA und PDLLA-OEOMA durchgeführt.

Die Vitalitätsprüfung an Primärkulturen erfolgte nur nach indirektem Kontakt. Untersucht wurde das Polymer PDLLA und das Copolymer PDLLA-co-TMC, sowie mit HEMA und OEOMA modifiziertes PDLLA. Bei allen Materialien finden sich etwa gleichermaßen ausgeprägt vereinzelt gelb bis gelb-orange farbige Zellkerne bei zum Teil spärlich angefärbtem Zytoplasma. Insgesamt prägt jedoch eine starke Grünfluoreszenz das mikroskopische Bild und beweist das Vorherrschen vitaler Zellen. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Inkubation in reinem Medium) ist hinsichtlich der Anzahl geschädigter Zellen für alle Proben kein Unterschied auszumachen, so daß nicht Einflüsse der Kunststoffe, sondern die komplizierte Anzucht der Primärkulturen selbst für den Umstand verantwortlich sind, daß vereinzelt in ihrer Vitalität eingeschränkte Zellen gefunden wurden. Ein Beispiel für ernsthafte Zytotoxizität gibt die Positivkontrolle. Hier fehlt jegliche zytoplasmatische Färbung und die Kerne erscheinen ausnahmslos rot-orange fluoreszierend (Abb. 16).

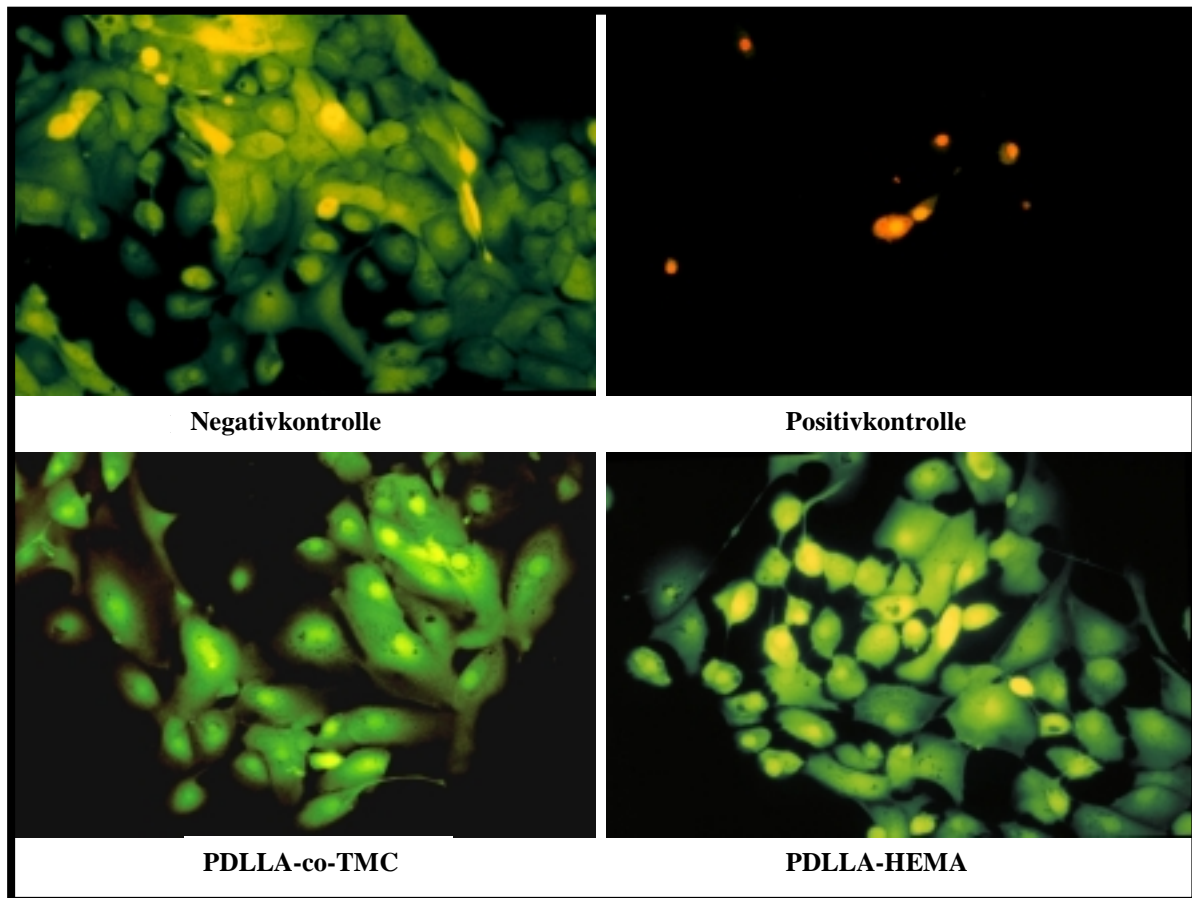


Abbildung 16: Vitalitätstest mit EB und FAD an Primärkulturen im indirekten Kontakt (20x)

3.1.2.4 Mitochondrienaktivität, XTT-Test

Der XTT-Test basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses XTT in einen roten Farbstoff durch metabolisch aktive Zellen. Der Umfang dieser Aktivität läßt sich photometrisch objektivieren. Es erfolgten mehrere Durchgänge mit verschiedenen Materialproben und einer Negativ- und Positivkontrolle. Pro Material und Kontrolle wurden in einem Testdurchgang jeweils mehrere Extinktionen gemessen, die einzelnen Werte relativ zum Mittelwert der entsprechenden Negativkontrolle in Prozent gesetzt und dann aus allen Daten ein Mittelwert pro Kunststoff gebildet.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse des XTT-Tests mit RT-112-Zellen nach indirektem Kontakt mit den zu prüfenden Materialien. Alle untersuchten Kunststoffe sind ohne Einfluß auf die mitochondriale Aktivität der Zellen. Für PDLLA, PDLLA-co-TMC, PDLLA-co-Gly, PDLLA-HEMA und PDLLA-OEOMA werden Werte von 111%, 118%, 113%, 107% und

99% relativ zur Negativkontrolle gemessen. Erwartungsgemäß reduziert die Zugabe von 10% Ethanol zum Medium im Falle der Positivkontrolle die gemessene Extinktion deutlich (auf 42%) im Vergleich zur Inkubation in reinem Medium (siehe auch Anhang, Tabelle 2).

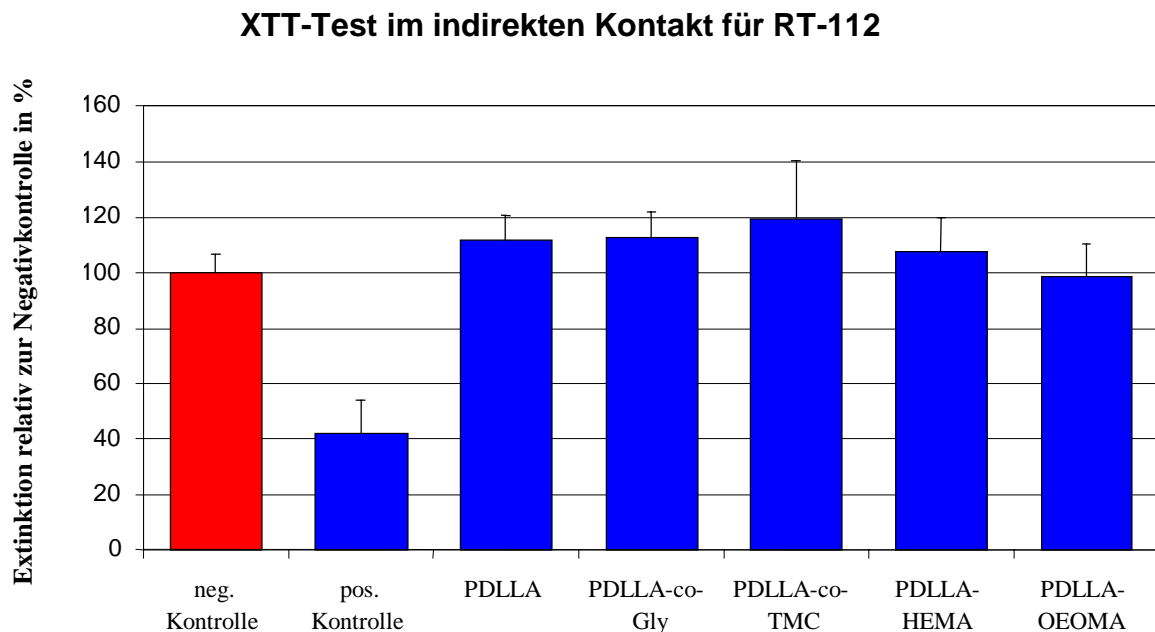


Abbildung 17: XTT-Test für RT-112 im indirekten Kontakt

Die Mitochondrienaktivität wurde mit RT-112-Zellen ebenfalls im direkten Kontakt durchgeführt. Hier ergibt sich ein ausgeprägter Einfluss durch das Ethanol. Für die Positivkontrolle liegt die mittlere Extinktion bei lediglich 19%. Auch für die Materialproben werden niedrigere Mittelwerte gefunden als in der indirekten Kontaktstudie. Die Mittelwerte für PDLLA, PDLLA-co-Gly, PDLLA-HEMA und PDLLA-OEOMA bewegen sich zwischen 81% und 92% in Relation zur Negativkontrolle. Die mittlere Extinktion bei auf PDLLA-co-TMC-Folien gezüchteten Zellen ist auf lediglich 68% reduziert (Abb. 18). Die wesentlich stärkere Einflußnahme auf die metabolische Aktivität durch die Ethanolzugabe (Positivkontrolle) im Vergleich zur Untersuchung nach indirektem Kontakt relativiert jedoch diesen Umstand, so daß auch hier nicht von einer Zytotoxizität der untersuchten Materialproben ausgegangen werden kann (siehe auch Anhang, Tabelle 3).

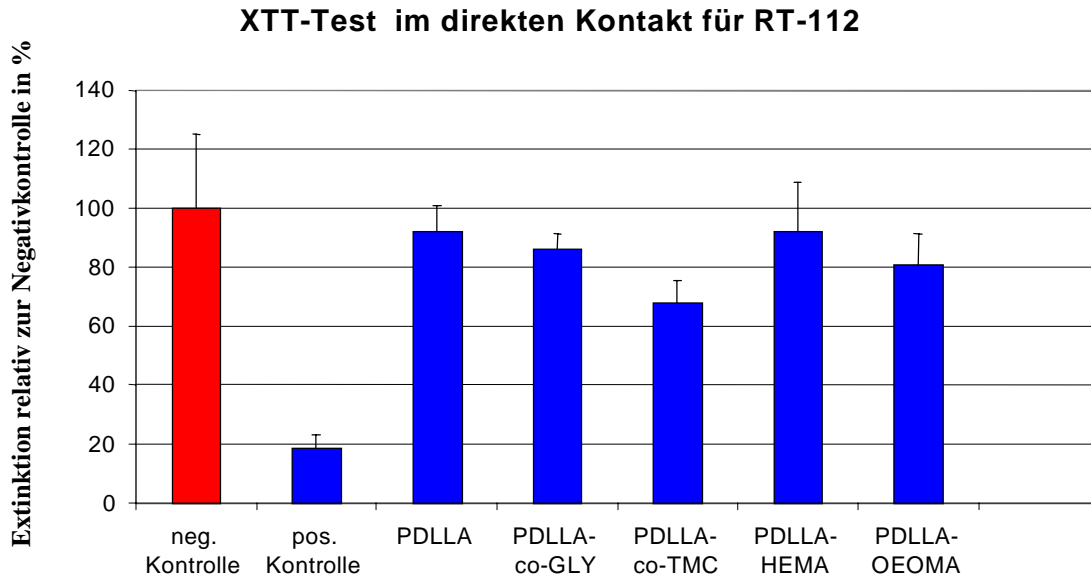


Abbildung 18: XTT-Test für RT-112 in direkten Kontakt

An Primärkulturen wurden die Kunststoffe mit dem XTT-Test nur im indirekten Kontakt geprüft. In diesem Test ergeben sich für PDLLA, PDLLA-co-Gly und PDLLA-HEMA mit 99%, 109% und 125% wieder Mittelwerte von deutlich über 100%. Lediglich die Oberflächenmodifizierung von PDLLA mit OEOMA hemmt die Mitochondrienaktivität. In diesem Fall beträgt der Mittelwert nur 89%. Doch auch hier liegt noch kein ernsthafter Einfluß auf den Metabolismus der Zellen vor. Für die Positivkontrolle wird eine durchschnittliche Extinktion von 40% im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen (Abb. 19, siehe auch Anhang, Tabelle 5).

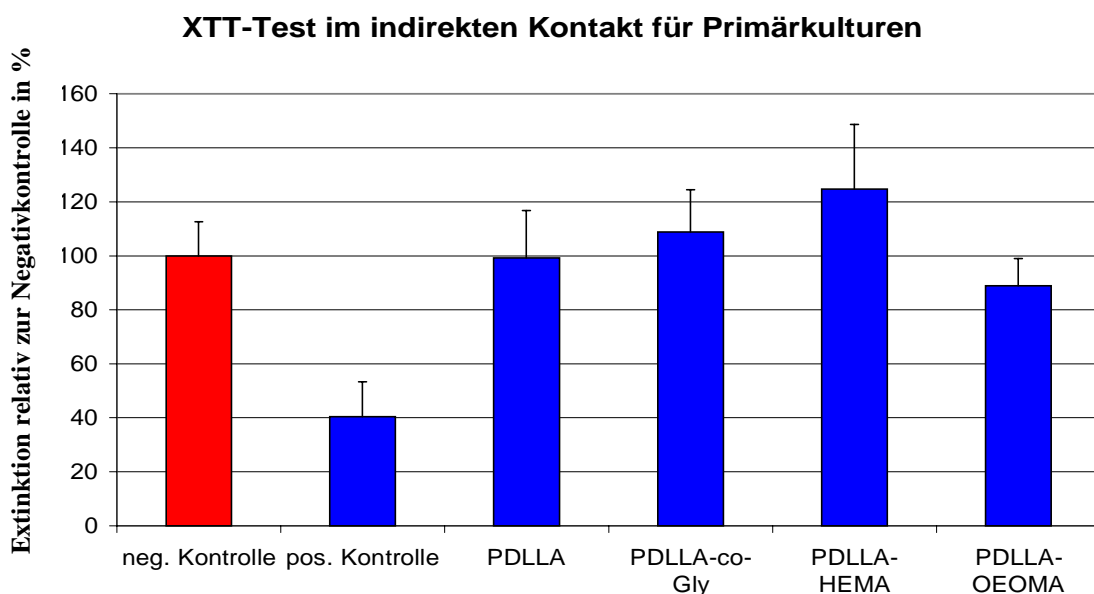


Abbildung 19: XTT-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen

3.1.3 Degradierung der Polymerfolien in PBS

Zur Bestimmung des Abbauverhaltens *in vitro* wurde ein Phosphatpuffer (PBS) als Puffermedium gewählt. Der verwendete Puffer erfüllt die Forderungen nach einer dem physiologischen Milieu entsprechenden Umgebung (pH 7,4; physiologische Ionenstärke). Zur Verhinderung von Effekten durch Bakterienwachstum, insbesondere bei längeren Abbauezeiten, wurden dem Puffermedium 200 mg/l Natriumazid zugesetzt. Das Abbauverhalten der Polymere wurde entsprechend der Körpertemperatur bei 37°C überprüft. Zu beachten ist, daß durch den Versuchsaufbau ausschließlich die hydrolytische Degradation nachvollzogen wird. Die Wirksamkeit weiterer Einflüsse *in vivo*, wie die enzymatische Degradation oder der Einfluß phagozytierender Zellen, wird durch den Versuchsaufbau nicht erfaßt.

Abbildung 20 veranschaulicht den Gewichtsverlust von PDLLA, PDLLA-co-TMC und PDLLA-co-Gly bei 37°C in PBS.

Das Abbauverhalten zeigt zunächst für alle untersuchten Polymere ein Absinken der zurückbleibenden Masse nach einem Tag von ca. 5%. Während das PDLLA-co-Gly schon nach 10 Tagen einen Gewichtsverlust von fast 60% und einen damit einhergehenden Verlust an Formintegrität aufweist, zeigen PDLLA und PDLLA-co-TMC bis zu einem Zeitraum von 30 Tagen kaum Anzeichen für einen substanziellen Gewichtsverlust. Das hydrolytische Abbauverhalten der Polymere PDLLA und PDLLA-co-TMC erweist sich auch im übrigen Verlauf als weitestgehend vergleichbar. Der Gewichtsverlust des PDLLA-co-TMC ist jedoch gut sichtbar verzögert, so daß am 75. Tag, etwa 15 Tage später als für PDLLA, die Hälfte des Materials degradiert ist.

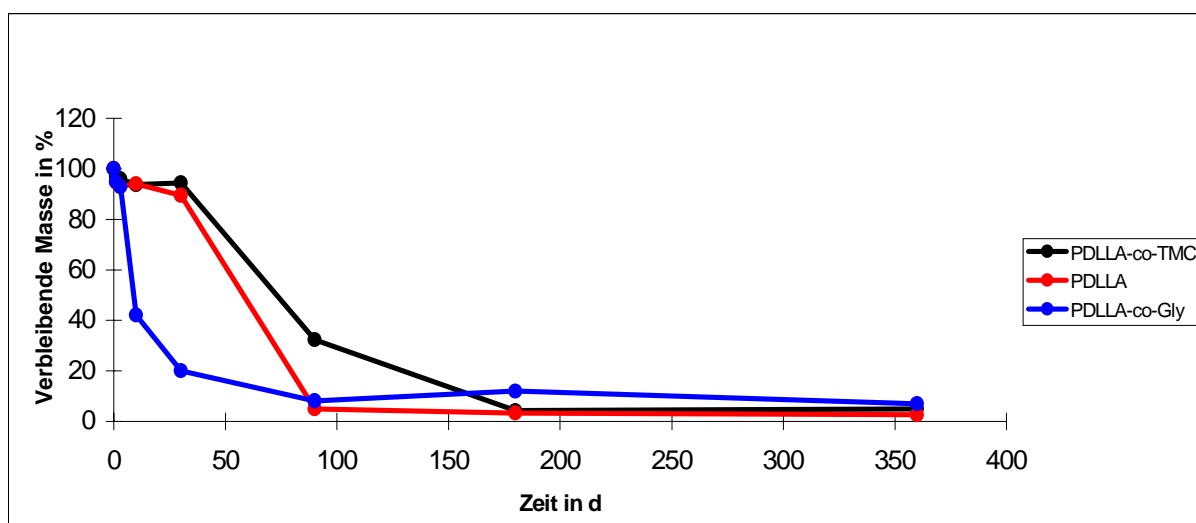


Abbildung 20: Gewichtsverlust von PDLLA, PDLLA-co-TMC und PDLLA-co-Gly in PBS bei 37°C

3.1.4 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessungen wurden nach der captive-bubble-Methode durchgeführt. Sie dienen der Charakterisierung der Oberflächen der untersuchten Materialien. Für natives PDLLA wird ein mittlerer Kontaktwinkel von 67,5 Grad gemessen. Durch die plasmainduzierte Pfropfcopolymerisation des PDLLA mit HEMA oder OEOMA kann der Kontaktwinkel signifikant reduziert werden. Für PDLLA-HEMA und PDLLA-OEOMA ergeben sich durchschnittliche Werte von 17,0 bzw. 21,4 Grad (Abb. 21, siehe auch Anhang, Tabelle 7). Die Ergebnisse lassen auf eine deutlich homogenere Oberfläche nach der Modifizierung schließen. Dies korreliert mit den Befunden des Adhäsionstests.

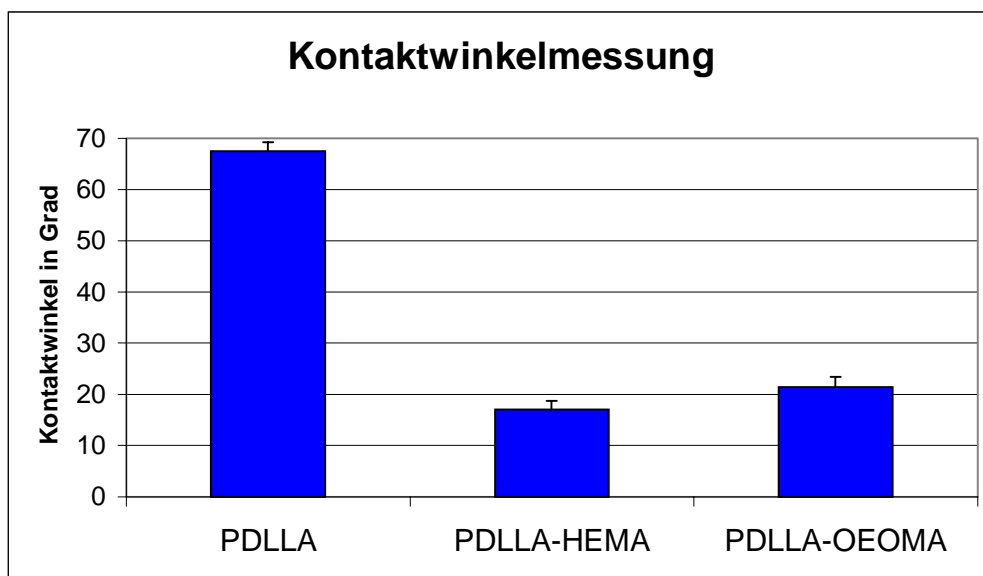


Abbildung 21: Änderung des Kontaktwinkels von PDLLA-Oberflächen durch Pfropfcopolymerisation

Das Verfahren erlaubt aufgrund der zuverlässigen Charakterisierung der Oberflächen auch die Prüfung der Beständigkeit einer Oberflächenmodifizierung. Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurde PDLLA-HEMA bei 37°C in PBS gelagert und nach jeweils 0, 3, 10 und 30 Tagen eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt. In dieser Untersuchung kann festgestellt werden, daß die Modifizierung über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen stabil bleibt. Der am Versuchsbeginn gemessene Winkel von 18,8 Grad vergrößert sich bis zum dritten Tag nur minimal auf 21,3 Grad und bleibt dann bis zum Versuchsende am 30. Tag nahezu konstant (Abb. 22, siehe auch Anhang, Tabelle 8).

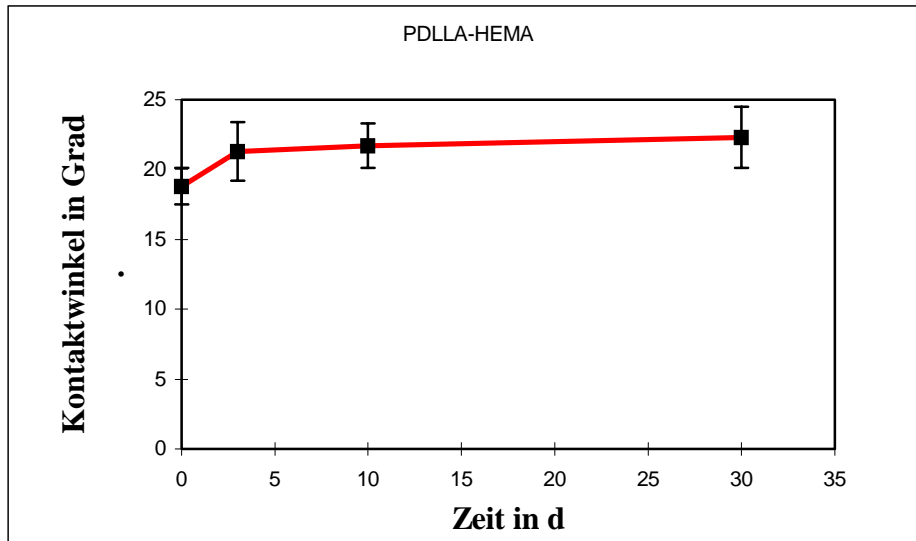


Abbildung 22: Veränderung des Kontaktwinkels von PDLLA-HEMA während der Lagerung in PBS bei 37 °C

3.2 Degradierung der Stents in humanem Urin

Es wurden drei unterschiedlich große PDLLA-co-TMC-HEMA-Stent-Proben mit einem Ausgangsgewicht von 0,0103g, 0,0562g und 0,0098g untersucht. Die Mittelwerte sind in Abb. 23 im Zeitverlauf aufgetragen. Dabei entspricht das Gewicht der Proben vor Versuchsbeginn einem Wert von 100%. Initial läßt sich eine mäßige Gewichtszunahme bis zur zweiten Woche verzeichnen. Im Mittel vergrößert sich das Gewicht nach zwei Wochen um 3,2%. Maximal wird ein Anstieg um 6,8% gemessen. In den folgenden Wochen reduziert sich das Gewicht, so daß erstmals nach 4 Wochen ein Massenverlust im Vergleich zum Ausgangsgewicht verzeichnet werden kann. Es wird ein Durchschnittsgewicht der Proben von 97,3% ermittelt. In der sechsten Woche erreicht die Gewichtskurve einen zweiten Gipfel. Es wird der höchste Durchschnittswert mit 102,7% notiert. In einem Fall liegt die absolute Gewichtszunahme bei 6,8 %. Im bis dahin vergangen Zeitraum werden keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Proben festgestellt. Sowohl Form und Farbe, als auch Konsistenz der Stents erscheinen unverändert. In der siebten Woche wird keine gravimetrische Kontrolle durchgeführt. Auch in der achten Woche werden die Proben nicht mehr gewogen, da sie zunehmend einen gelartigen Zustand annehmen und nach neun Wochen schließlich zu einer homogenen, breiartigen Masse degradiert sind. Durch bloßes Schwenken des Probengefäßes lassen sie sich im Urin ohne sichtbare Fragmente lösen.

Abbau der Stents in humanem Urin bei 37 °C

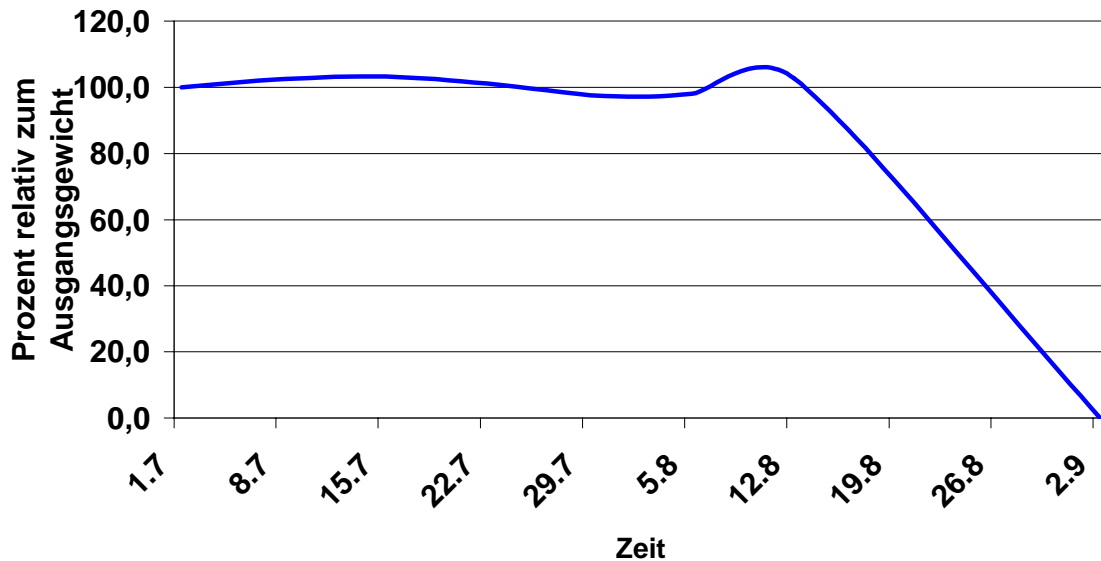


Abbildung 23: Durchschnittliches Gewicht der Stents beim Abbau in humanem Urin

3.3 Tierversuch

Es wurden insgesamt 7 Tiere operiert. In fünf Fällen erfolgte eine Stent-Implantation, zwei Schafe wurden nach analoger Operation ohne Stent-Einlage als Kontrolltiere mitgeführt. Alle Schafe sind unmittelbar postoperativ unauffällig und auch die Wundheilung gestaltet sich komplikationslos. Die fünf Tiere mit implantiertem PDLLA-co-TMC-HEMA-Stent wurden nach 3 (2 Tiere), 6, 12 und 19 Wochen getötet, die Kontrolltiere nach 6 und 9 Wochen.

3.3.1 Labor

Für alle Tiere ergeben die wöchentlich durchgeführten Kontrolluntersuchungen keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen von Blut oder Urin. Es findet sich kein Hinweis auf eine Infektion oder Entzündung. Der für Schafe geltende obere Grenzwert von 6200 Leukozyten/ μ l Blut wird nie überschritten. Ein wichtiger Aspekt ist die Bestimmung der Retentionsparameter Harnstoff und Creatinin im Blut. Im Falle des Creatinins werden bei keinem Tier je Werte oberhalb der Norm (130 μ mol/l) ermittelt. Es ergibt sich ein geringer Unterschied zwischen den bei Tieren mit Stent und bei Tieren ohne Schiene erhobenen Daten. Nach Implantation einer Schiene bewegen sich die Werte zwischen 85 und 121 μ mol/l (als minimal und maximal gefundene Meßwerte) bei einem Durchschnitt von 100 μ mol/l. Im

Gegensatz dazu schwankt die Creatininkonzentration im Blut der Tiere ohne Stent zwischen minimal 94 und maximal 130 $\mu\text{mol/l}$. Hier liegt der Durchschnitt bei 112 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 24).

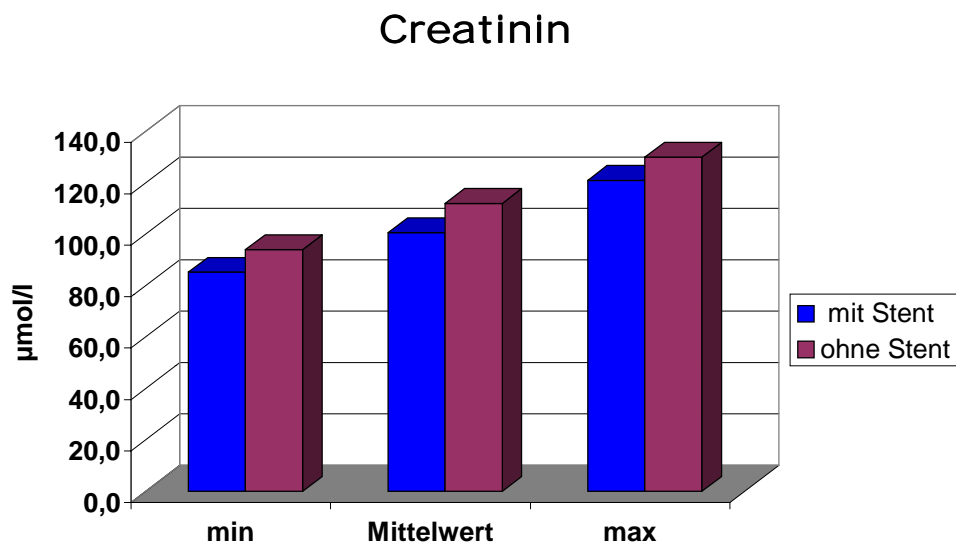


Abbildung 24: Creatininkonzentration im Blut

Bei der Untersuchung der Harnstoffkonzentration im Blut ergeben sich ähnliche Verhältnisse. Hier befinden sich jedoch alle Meßwerte oberhalb der allgemein gültigen Grenze von 5 mmol/l . Da jedoch bei allen Tieren auch präoperativ bereits entsprechende Konzentrationen ermittelt werden, wird von rassespezifischen Unterschieden ausgegangen und allein der Vergleich präoperativ/postoperativ zur Interpretation der Meßergebnisse herangezogen.

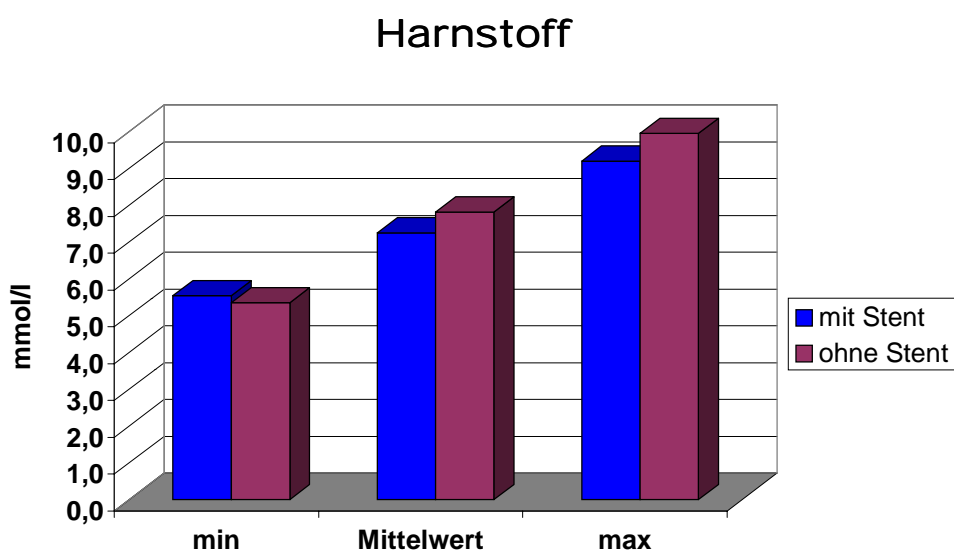


Abbildung 25: Harnstoffkonzentration im Blut

Nach Stenteinlage ergeben sich Meßwerte von 85mmol/l bis 121mmol/l bei einem Mittelwert von 100mmol/l. Insbesondere der Mittelwert liegt bei Tieren ohne Harnleiterschiene geringgradig höher mit etwa 112 mmol/l (Abb. 25). Zur Beurteilung der Daten werden die erhobenen Werte im Zeitverlauf beobachtet (Abb. 26). Die Harnstoffkonzentrationen bewegen sich bis auf eine Ausnahme (Kontrolltier 291 w) stets im Bereich der präoperativ ermittelten Werte, so daß von physiologischen Befunden ausgegangen werden kann.

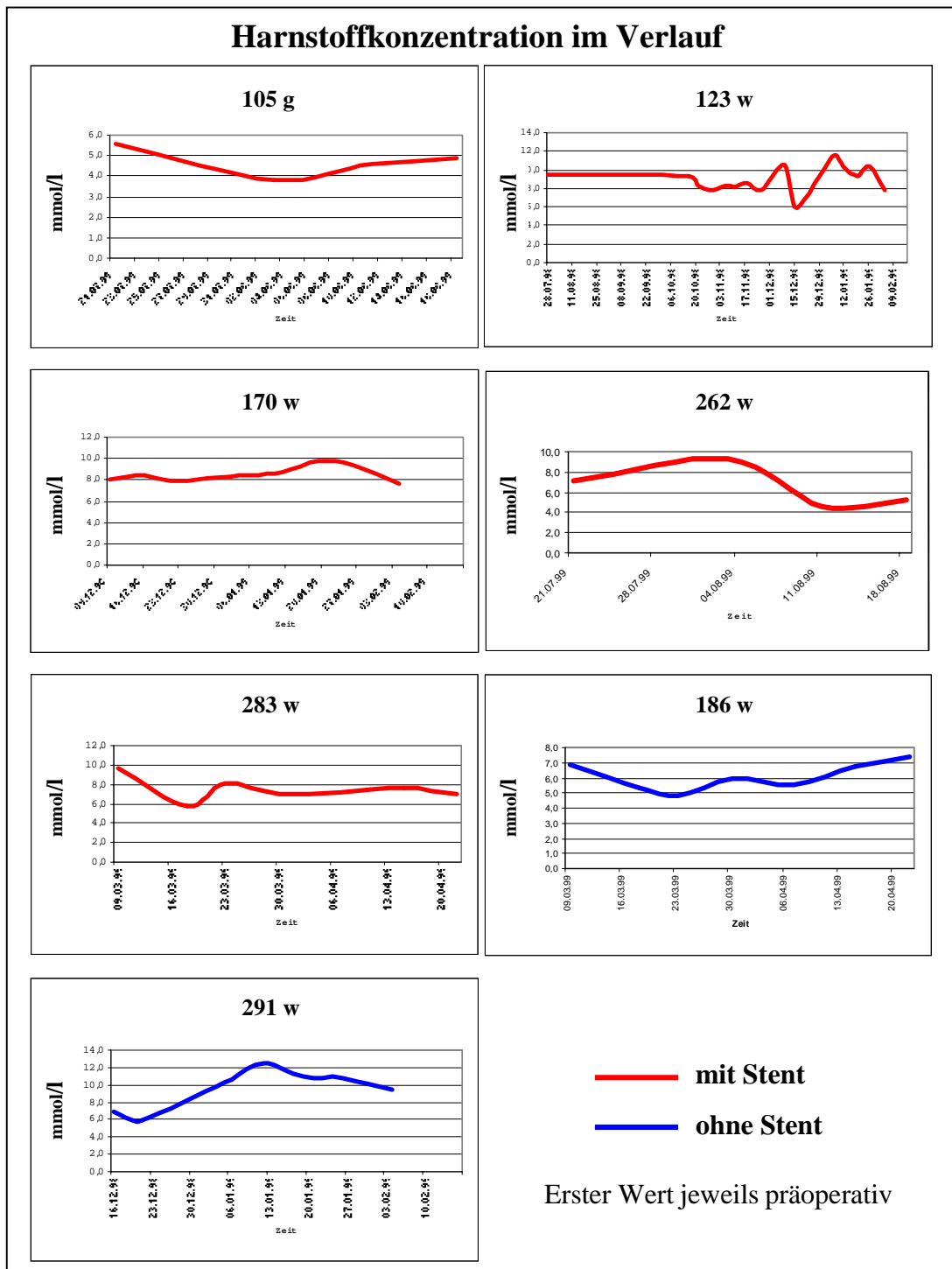


Abbildung 26: Harnstoffkonzentration - Verlaufskurven

Die mikrobiologischen Untersuchungen des wöchentlich gewonnenen Katheterurins sind ausnahmslos unauffällig. Auch die Kontrollen mittels handelsüblicher Teststreifen erbringen stets physiologische Befunde. Im Harnsediment können bei allen Tieren in den ersten zwei postoperativen Wochen vereinzelt Erythrozyten nachgewiesen werden. Es finden sich keine lichtmikroskopisch sichtbaren Fragmente der Stents. Der pH-Wert des Schaf-Urins bewegt sich zwischen 7,5 und 8,5 und verändert sich im Verlaufe des Versuches beim einzelnen Tier nur unwesentlich.

3.3.2 Sonographie

Bei allen fünf Tieren mit Stent sind die Ultraschalluntersuchungen der Nieren über den gesamten Versuchszeitraum unauffällig (Abb. 29). Die Vermessung von Längs- und Querdurchmesser sowie Parenchyndicke der Nieren ergibt keine auffälligen Veränderungen im Laufe der Zeit. Die geringen Schwankungen sind meßtechnisch bedingt (Abb. 27).

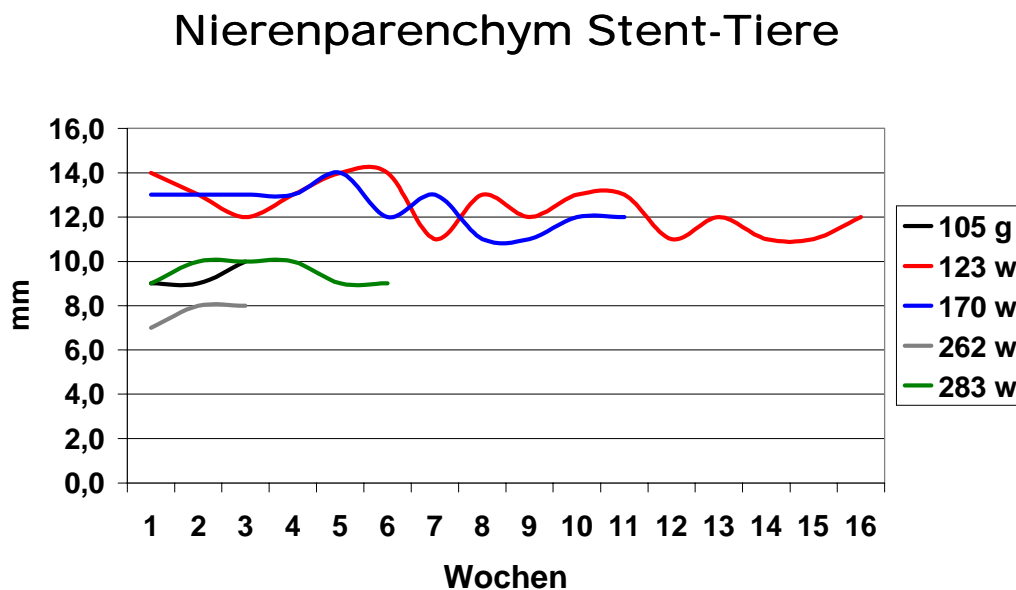


Abbildung 27: Nierenparenchymstärke nach Stentimplantation

Aus der Gruppe der zwei Kontrolltiere erscheint Schaf 186 w ebenfalls sonographisch unauffällig. Es besteht kein Anhalt für einen etwaigen Harnstau. Schaf 291 w dagegen entwickelt schon in der ersten postoperativen Woche eine Dilatation des Nierenhohlsystems mit deutlich progressiver Tendenz, so daß bei diesem Tier erstmals wenige Tage vor der planmäßigen Tötung auch eine ausgeprägte Erweiterung des proximalen Harnleiter im Ultraschallbild dargestellt werden kann (Abb. 29). Die Parenchymstärke der Niere auf der operierten Seite halbiert sich im Verlaufe der Zeit von 14 mm auf 7 mm (Abb. 28).

Nierenparenchym Kontrolltiere

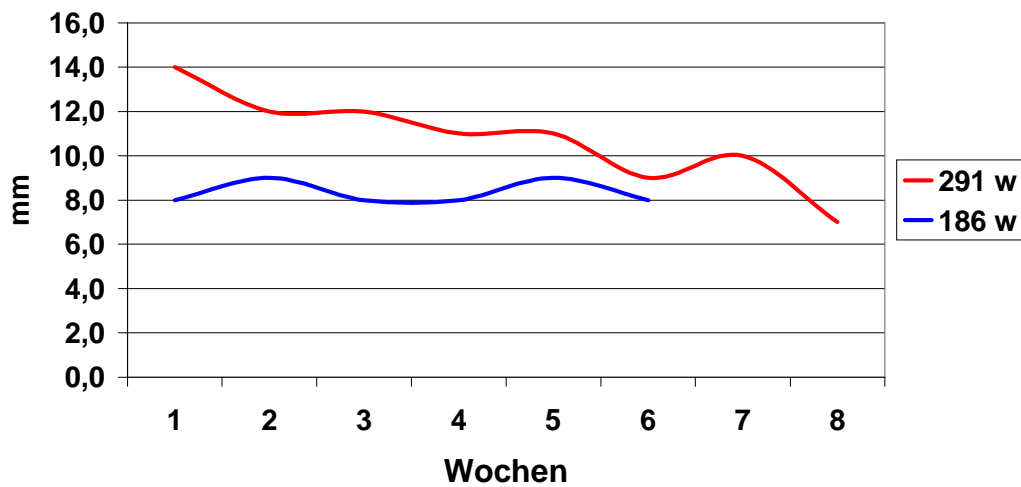


Abbildung 28: Nierenparenchymstärke der Kontrolltiere

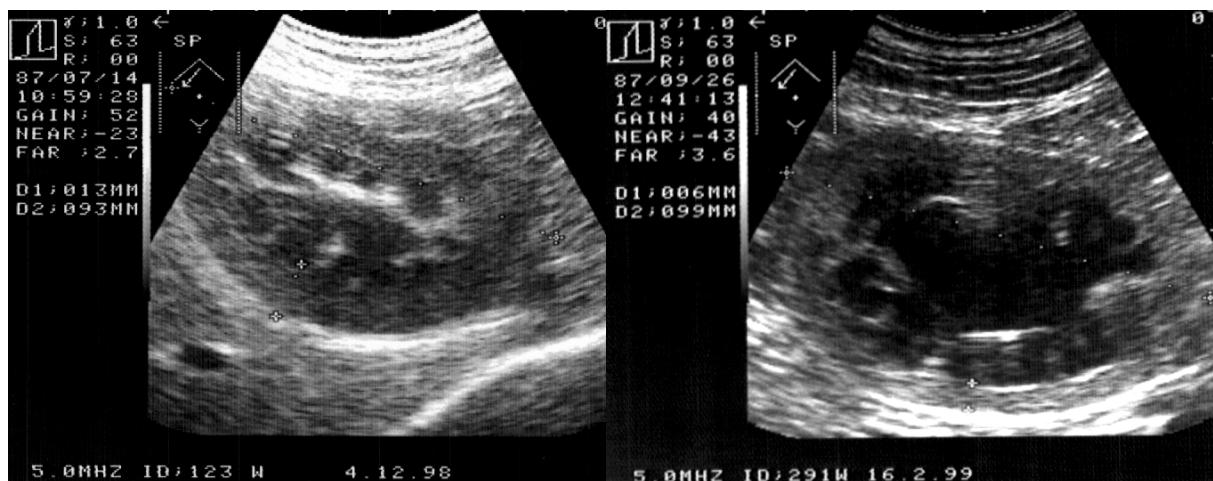


Abbildung 29: Vergleichende Nephrosonographie: links nach Stent-Implantation, rechts ohne Stent

3.3.3 Sektionsbefunde

Bei der Sektion der Schafe lassen sich die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen verifizieren. Makroskopisch bieten die Harnleiter der fünf mit Schienen versehenen Schafe nach der Sektion nach 3 (2 Tiere), 6, 12 und 19 Wochen keinerlei pathologische Veränderungen. Es findet sich jeweils eine gut verheilte Ureterotomie. Proximal der Narbe bestehen keine Hinweise auf einen Stau des oberen Harntraktes (Abb. 30). Bei der Begutachtung der Nieren auf der operierten Seite können ebenfalls keine Auffälligkeiten ausgemacht werden. Verglichen mit der jeweils kontralateralen Niere sind Größe und Parenchymstärke unverändert.

Bei keinem Tier sind Reste der Schiene vorhanden. Auch in der Blase werden keine Fragmente des Stents entdeckt.

Im Vergleich zu den Tieren mit einliegendem Harnleiterstent zeigt das erste Kontrolltier (Schaf 291 w) deutlich abweichende Befunde. Hier findet sich nach der Tötung nach 9 Wochen ein ausgeprägter Kalibersprung des Ureters im Bereich der Ureterotomie aufgrund einer Strikturen im operierten Uretersegment. Der Harnleiter ist proximal der Anastomose etwa kleinfingerstark erweitert (Abb. 31 links). Die entsprechende Niere ist im Vergleich zur kontralateralen Niere deutlich vergrößert, der Parenchymsaum abgeflacht und das Hohlsystem dilatiert. Das zweite Kontrolltier (Schaf 186 w) wird in der 6. postoperativen Woche seziiert. Es zeigt sich auch hier eine deutliche Dilatation des Harnleiters proximal der Anastomose (Abb. 31 rechts). Hier erscheint die Niere jedoch unauffällig.

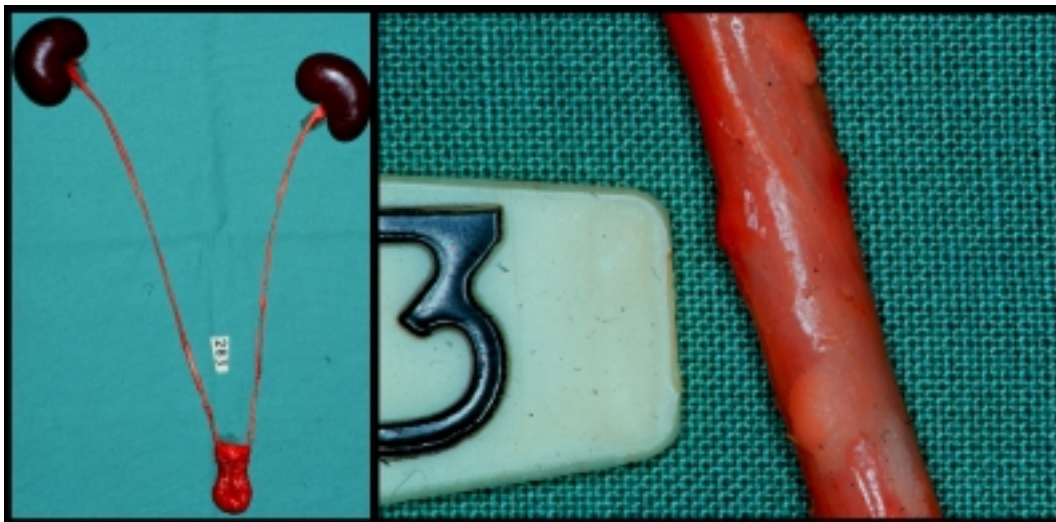


Abbildung 30: Schaf 283 w 6 Wochen nach Ureterotomie mit implantierter Schiene. Links komplettes Sektionspräparat, rechts Ausschnittsvergrößerung der Harnleiteranastomose.

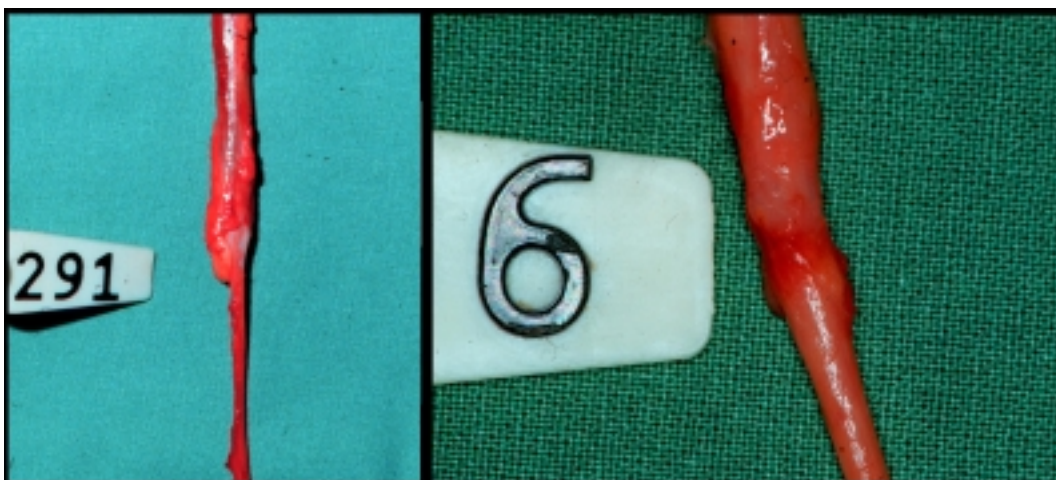


Abbildung 31: Ureteranastomosen der Kontrolltiere, links 291 w 9 Wochen nach der Ureterotomie, rechts 186 w nach 6 postoperativen Wochen.

3.3.4 Histologie

Die histopathologische Untersuchung ergibt in allen Fällen nach Stenteinlage ein regelrechtes Urothel im nicht gedehnten Ursprungszustand mit intakter Deckzellschicht proximal und distal der Anastomose, so daß auch im mikroskopischen Bild eine Dilatation des Harnleiters ausgeschlossen werden kann. Das Urothel stellt sich lichtmikroskopisch regelrecht hoch aufgebaut mit komplett erhaltener Deckzellschicht dar (Abb. 32 links). Auch der Anastomosenbereich ist bereits reif reepithelialisiert. Zytomorphologisch zeigen die Urothelien weder in den basalen noch in den apikalen Schichten eine persistierende Zellaktivierung mit vergrößertem Kern oder verschobener Kern-Plasma-Relation. Somit ergibt sich kein Hinweis auf einen die Zellregeneration beeinflussenden oder etwa toxischen Effekt durch die Stents.

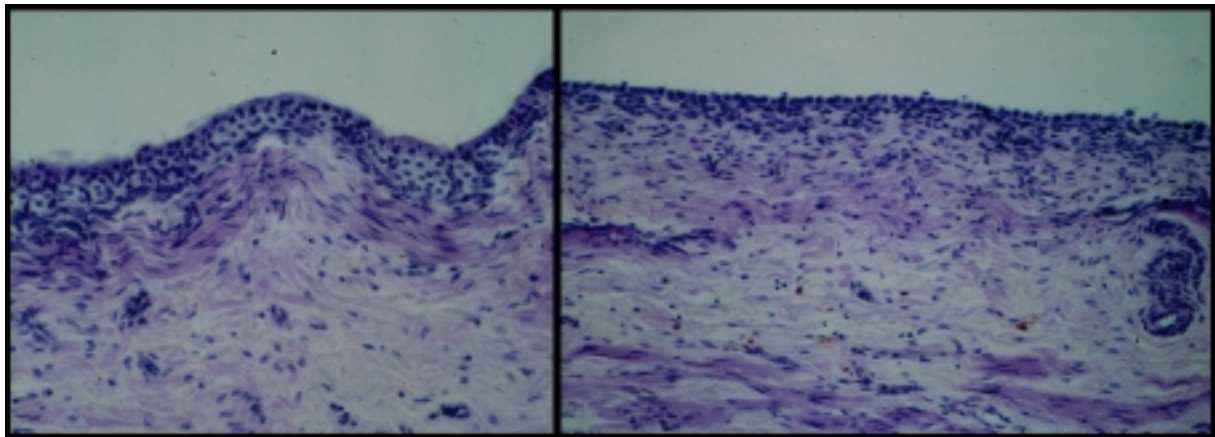


Abbildung 32: Urothel proximal der Anastomose in der HE-Färbung. Links nach Stentkontakt, rechts ungeschientes Urothel.

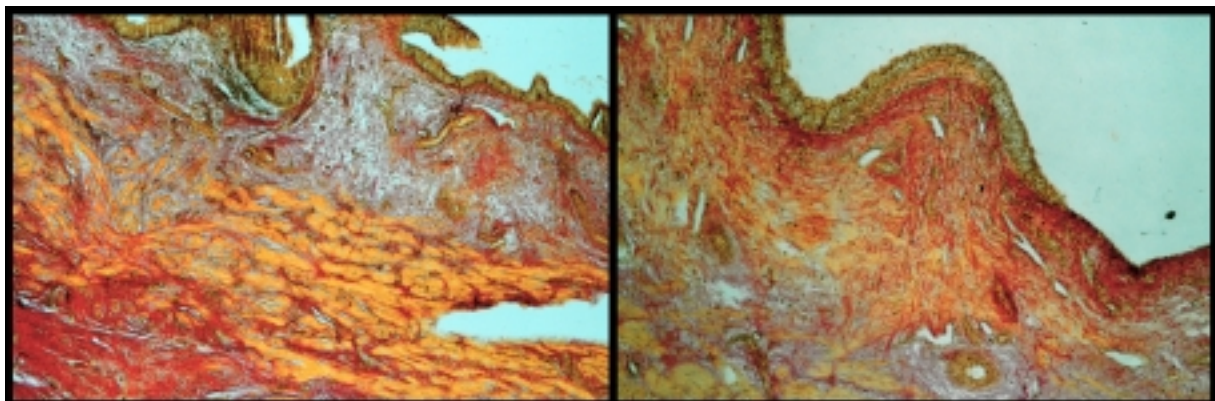


Abbildung 33: Anastomosenbereich in der EvG-Färbung. Links nach geschienter Ureterotomie, rechts ungeschient (100fach).

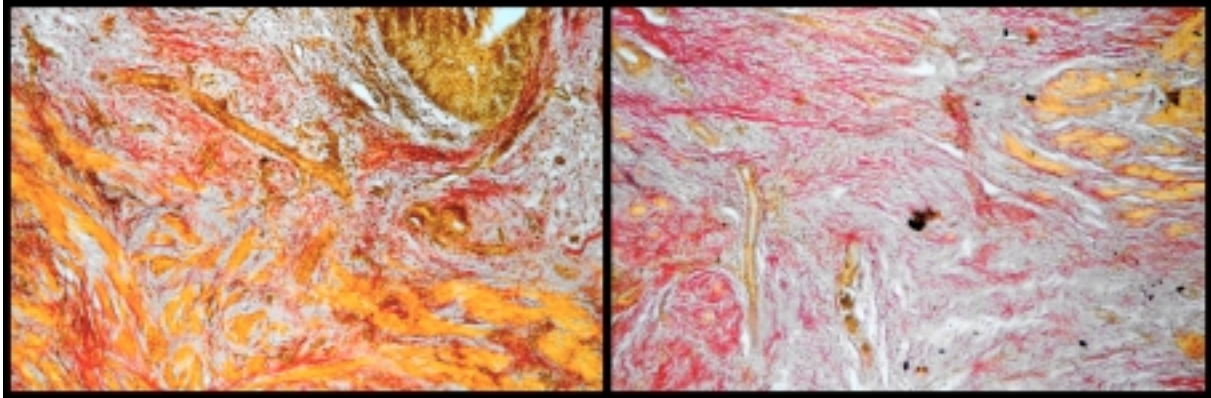


Abbildung 34: Anastomosenbereich in der EvG-Färbung. Ausschnittsvergrößerung der Muskelschicht. Links nach Stentimplantation, rechts ungeschiente Ureterotomie.

Im Bereich der Ureterotomie zeigen sich eine geringe Vernarbung in der Ureterwand und eine minimale, eher reparative entzündliche Begleitreaktion, welche aber in gleichem Ausmaß auch bei den ungeschienten Kontrolltieren anzutreffen ist. Die Muskelschicht nach geschienter Ureterotomie erscheint gut regeneriert und weist wesentlich weniger narbiges Bindegewebe auf, als im Falle der ungeschienten Anastomosen (Abb. 33 und Abb. 34). Die Kontinuität der glatten Muskulatur in der Ureterwand bei den geschienten Tieren zeigt nur eine sehr kurze Unterbrechung (Abb. 33 und 34 links). Im Gegensatz hierzu findet sich im Falle der ungeschienten Anastomosen eine breite, kollagenfaserreich durchbaute Vernarbung (Abb. 33 und 34 rechts). Vor allem bei Kontrolltier 291 w wird eine ausgeprägte Hypertrophie der Muskelschicht im proximalen Harnleiter gesehen.

Neben den oben genannten histopathologischen Befunden im direkten Bereich der Ureterotomie ist bei beiden Kontrolltieren proximal der Anastomose das Urothel im Sinne einer Dilatation des Ureters deutlich abgeflacht und die Deckzellschicht unvollständig (Abb. 32 und 33 rechts). Histopathologisch läßt der Befund einer unvollständigen oder sogar komplett fehlenden Deckzellschicht zudem auf einen schädigenden Effekt durch den verlangsamten Harnabfluß schließen.

4 Diskussion

Gegenwärtig nimmt die Zahl wissenschaftlicher Studien zu biodegradierbaren Materialien stark zu. Gerade im Bereich der Medizin scheint eine große Indikationspalette zu bestehen. Schwerpunktmäßig werden synthetische Polymere wie aliphatische Polyester und Polycarbonate untersucht. Von ihnen wird angenommen, daß am Abbau ausschließlich hydrolytische Prozesse beteiligt sind. Damit sollen Degradation *in vitro* und *in vivo* vergleichbar sein. Zusätzlich gelten die nicht-enzymatisch degradierbaren synthetischen Polymere als weniger immunogen und in höherem Maße biokompatibel, als (nur oder auch) enzymatisch abgebaute natürliche Polymere. Schließlich besteht die Möglichkeit synthetische Materialien durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse hinsichtlich der Material- und Degradierungseigenschaften bedarfsgerecht anzupassen (HAYASHI⁴²).

In diese Gruppe der synthetischen Polymere gehören beispielsweise Poly(α -hydroxy)säuren wie Polyglykolsäure (PGA) oder Polylactide wie PDLLA, Polycaprolactone (PCL), Polyorthoester (POE), Polyanhydride (PA) und andere, wie zum Beispiel Trimethylencarbonat (TMC).

Speziell für Polylactide wird derzeit ein breites Einsatzspektrum untersucht. PDLLA kam versuchsweise bereits als Wachstumsschiene für durchtrennte periphere Nerven, in der Traumatologie zur internen Fixation von Knochenbrüchen und zur Fixation von Kreuzband-Autografts am Knochen (GIARDINO⁴³ et al., LIN⁴⁴ et al., TAMS⁴⁵ et al.). Speziell in der Unfallchirurgie werden Polylactide aufgrund ihres langsamen Abbaus eingesetzt. Entsprechend unserer Degradationsanalysen mit kompakten Polymerfolien dauert hier der vollständige Abbau mindestens 1 Jahr. Im Falle der Kreuzbandschrauben wurden PLLA, PDLLA und PDLLA-co-Glycolid am Menschen eingesetzt. Während große Fragmente des PLLA noch nach 20 Monaten nachzuweisen waren, fanden sich nach 10 bis 14 Monaten keine Reste der PDLLA- oder PDLLA-co-Glycolid-Schrauben. Arthroskopisch ergaben sich keine Hinweise auf eine Fremdkörperreaktion des mit den Schrauben in Kontakt getretenen Gewebes (STAHELIN⁴⁶ et al.).

Für den langsamen Abbau des PDLLA und die hohe Biokompatibilität spricht auch eine weitere Studie, die PDLLA/PLLA als Implantate zur Fixation von distalen Femurosteotomien an der Ratte untersuchte. Nach 1, 3, 6, 12, 24, 36 und 48 Wochen gab es histopathologisch keinen Anhalt für eine Entzündung oder andere pathologische Befunde am Knochen. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes von 48 Wochen waren die Implantate noch deutlich

sichtbar (MAJOLA⁴⁷ et al.).

Eine weitere Anwendung, die die ausgeprägte Biokompatibilität der Polylactide unterstreicht, ist die Verwendung von PDLA-co-Gly als temporäres Substrat zur Implantation von Pigmentepithelzellen der Retina (HADLOCK⁴⁸ et al.). Nach 8 Tagen in-vitro-Kultur konnten ausgedehnte Areale histologisch gesunder und unauffälliger Zellen auf den Polymerfolien gefunden werden (GIORDANO⁴⁹ et al.).

Ähnliche Versuche wurden erfolgreich mit Hepatozyten, Knorpelzellen und verschiedenen anderen Zellpopulationen durchgeführt (CIMA⁵⁰ et al., FREED⁵¹ et al., VACANTI⁵² et al.).

Auch in der Urologie wurden und werden biodegradierbare Implantate vor allem im Einsatz als Harnröhrenstent untersucht. Das Hauptaugenmerk ist dabei auf die Behandlung und Vermeidung von Strikturen gerichtet. Die therapeutische Harnröhrenschlitzung führt in 40 – 75% der Fälle zum Rezidiv innerhalb von 2 Jahren und jede weitere operative Intervention erhöht das Risiko (HOLM-NIELSEN⁵³ et al., PITKÄMÄKI⁵⁴ et al.). Zur Anwendung kommen heute Metallschienen, die nach 4-6 Monaten vollständig in die Harnröhrenwand eingewachsen sind und dort, wenn keine Komplikationen auftreten verbleiben. Mögliche unerwünschte Folgen der Implantation eines solchen Metallstents sind Nachtropfen des Urins nach der Miktion und Schmerzen. Schließlich kann eine Hypertrophie des Urothels das Lumen des Stents einengen oder völlig verschließen. Die Explantation ist oft sehr aufwendig (ASHKEN⁵⁵ et al., MILROY⁵⁶ et al.). Neben den genannten Komplikationen erfolgt in 5% der Fälle eine Dislokation der Schiene. Vor dem Hintergrund dieser Nachteile wird die Implantation eines Stents in die Urethra lediglich für Hochrisikopatienten als Alternative zum operativen Vorgehen vorgeschlagen (GÖPEL⁵⁷ et al.).

Es ist naheliegend, einen solchen Harnröhrenstent aus einem biodegradierbaren Material zu fertigen. Gefordert wird hier eine hohe Rigidität, um der Druckbelastung durch das umgebende Gewebe standzuhalten. Ferner muß ein solcher Stent einige Monate erhalten bleiben, um einem Rezidiv vorzubeugen.

Die diesbezügliche Eignung von Polylactiden zeigten KEMPPAINEN³³ et al. Sie beschrieben Poly(L-Lactid) (PLLA) als biodegradierbares Material im Einsatz als Urethra-Stent. Dieser Stent wurde acht Kaninchen in die Harnröhre implantiert. Nach sechs Monaten war der ganze Stent mit Epithel bedeckt. Das Lumen erschien weiterhin frei. Sechs Monate später setzte der Abbau des Stents ein. Histologisch konnte man nur in den ersten drei Monaten leichte Erosionen und eine mäßige Granulozyteninfiltration darstellen.

Inzwischen wurde der von KEMPPAINEN³³ vorgeschlagene PLLA-Stent auch beim

Menschen versuchsweise implantiert. Bis zu 12 Monate nach Einlage der Schiene nach Urethrotomie bei Harnröhrenstriktur wurden regelmäßig mikrobiologische Untersuchungen des Urins und Urethroskopien durchgeführt. Alle 22 Patienten konnten ihre Blase ab dem ersten postoperativen Tag gut entleeren. 10 Patienten entwickelten eine Striktur an anderer Stelle in der Harnröhre und 2 Patienten erkrankten an einem Harnwegsinfekt. Nach 12 Monaten waren alle Schienen vollständig degradiert (ISOTALO⁵⁸ et al.).

ISOTALO⁵⁹ et al. entwickelten dieses Materialkonzept weiter, indem sie den PLLA-Spiral-Stent mit einer ϵ -Caprolacton/PDLLA-Oberfläche versahen, die ihm eine Selbstexpansion bei Temperaturen über 32°C ermöglicht. Der Gedanke war, daß eine solche Schiene nicht mit einem Faden fixiert werden muß, sondern sich nach dem zystoskopischen Einführen in die Urethra durch Zunahme des Durchmessers selbst am Ort der Implantation hält. Die Biokompatibilität dieser Stents wurde an T-Zell-Leukämie-Zellen untersucht. Studien zur Zellproliferation nach 24, 48 und 96 stündiger Inkubation der Zellen mit Materialkontakt ließen keinen Einfluß auf das Zellwachstum im Vergleich zur Inkubation in reinem Medium erkennen.

Dieser Stent wurde inzwischen bereits in vivo untersucht. Nach Implantation in die Harnröhre von 15 Kaninchen fand sich nach 6 Monaten in keinem Fall ein Hinweis auf chronisch entzündliche Veränderungen oder Fremdkörperreaktionen (ISOTALO⁶⁰ et al.).

Im Bereich des Harnleiters wird das Einsatzgebiet der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Ureterschienen nicht in der Behandlung oder palliativen Überbrückung von Strikturen gesehen, sondern in der postoperativen Schienung in der Harnleiterchirurgie. Der Stent soll die Anastomose schienen und Obstruktionen durch ein mögliches postoperatives Mukosaödem verhindern. Weiter soll er einer Extravasation vorbeugen und möglicherweise als Wachstumsschiene eine gute Regeneration der Wandschichten des Ureters unterstützen. Diese Aufgaben erfüllt zur Zeit der DJ-Stent, der nach operativen Eingriffen am Ureter in aller Regel eingelegt wird und nach ein bis zwei Woche entfernt werden kann.

Die Implantation einer kurzen, biodegradierbaren Harnleiterschienen bietet eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zur herkömmlichen Doppel-J-Einlage. Aufgrund der Tatsache, daß nicht die Blase mit dem Nierenbecken direkt verbunden wird, sondern lediglich die Anastomose geschieht wird, kommt es nicht zu einem vesikorenalen Reflux. Die Inzidenz eines solchen Reflux nach DJ-Einlage beziffert MOSLI²⁰ mit 63-80%. Die Gefahren des Reflux liegen in der Keimaszension bis hin zur Pyelonephritis, die MARTOV²¹ bei immerhin 6,6% der Patienten mit einliegendem DJ-Stent ermittelte. Eine weitere Komplikation ist die Dislokation, da die Stents üblicherweise nicht mit einem Faden gesichert werden. EL

KHADER²⁶ et al. und SMEDLEY²⁷ et al. fanden übereinstimmend Dislokationsraten von 3% bei 91 bzw. 168 untersuchten Patienten.

Zusätzlich kann der bis in die Blase reichende DJ-Stent dort zu einer Reizung des Trigonum vesicae mit Harndranggefühl führen, das sich bis zur Urgeinkontinenz steigern kann. Schließlich ist ein in allen Fällen nötiges Übel die Notwendigkeit der endoskopischen Entfernung des Stents. Die Biodegradierbarkeit erübrigt einen solchen Zweiteingriff. Es besteht eine breite Indikationspalette, die die operative Versorgung jeglicher Kontinuitätsunterbrechung des Ureters einschließt, also auch die Ureteroneozystostomie, ureterointestinale Anastomosen und die Pyeloplastik.

Nach den oben beschriebenen Indikationen und der in solchen Fällen üblichen Verweildauer eines konventionellen DJ-Stents wird deutlich, daß dauerhafte Rigidität und ein verzögerter Abbau der Schiene über mehrere Monate, wie etwa beim Einsatz als Harnröhrenstent, im Falle der Anwendung als postoperative Ureterschiene nicht gefordert werden. Hier darf und soll die Degradation deutlich früher abgeschlossen sein. Deshalb ist das in der Urethra regelmäßig und mit Erfolg zum Einsatz gekommene PLLA aufgrund der deutlich protrahierten Abbaukinetik weniger geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Poly(D,L-Lactid) (PDLLA), Poly(D,L-Lactid)-co-Glycolid (PDLLA-co-Gly), ein Copolymer aus PDLLA und PGA und Poly(D,L-Lactid)-co-Trimethylencarbonat (PDLLA-co-TMC) untersucht. Die hohe Biokompatibilität dieser Polymere gegenüber verschiedenen Geweben wurde von anderen Autoren bereits beschrieben (siehe oben). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Verträglichkeit der verwendeten Materialien konnten zeigen, daß auch die Inkubation von Urothelzellen (RT-112) auf PDLLA, PDLLA-co-TMC und PDLLA-co-Gly ohne morphologisch Veränderungen der Zellen möglich ist. Auch die Studien zur Proliferation (BrdU-Test), Vitalität (FDA/EB) und Mitochondrienaktivität (XTT-Test) beweisen, daß die untersuchten Polymere gegenüber Urothelzellen (RT-112 und humane Urothelprimärkulturen) keinerlei toxische oder hemmende Effekte aufweisen. Vielmehr erscheint die Proliferationskapazität der RT-112-Zellen nach indirektem Materialkontakt sogar im Vergleich zur Inkubation in reinem Medium gesteigert. Es kann spekuliert werden, daß so möglicherweise z.B. die Wundheilung und die Regeneration nach Implantation derartiger Polymere positiv beeinflusst werden. Schließlich ergab sich in der vorliegenden Arbeit nach histologischer Untersuchung der Ureteranastomosen, daß diejenigen, die mit PDLLA-co-TMC-HEMA-Stents geschient worden waren, nicht nur ein völlig intaktes, regelrecht aufgebautes Urothel aufwiesen, sondern auch gegenüber den ungeschienten Anastomosen

eine deutlich weniger mit narbigem Bindegewebe durchsetzte Uretermuskulatur im Bereich der Ureterotomie zeigten.

Die hohe Biokompatibilität als wichtigste Voraussetzung zur erfolgreichen Implantation eines synthetischen Polymers in den Körper im Falle der Polylactide und ihrer Copolymere wurde bereits mehrfach für verschiedene Gewebe beschrieben und konnte in der vorliegenden Studie auch für Urothelzellen nachgewiesen werden. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien. Das Abbauverhalten der unterschiedlichen Polymere und Copolymere war das nächste zur Materialauswahl für die Harnleiterschiene herangezogene Kriterium.

Die Wahl fiel auf PDLLA, da intrinsisch amorphes PDLLA im Gegensatz zu teilkristallinem Poly(L-Lactid) (PLLA) schneller degradiert. Aufgrund der geringeren mechanischen Festigkeit von PDLLA ist dieses vor allem für nicht lasttragende Implantate in Betracht zu ziehen (RUFFIEUX⁶¹).

Das Copolymer PDLLA-co-Gly erschien ebenfalls geeignet, da auch hier die Abbauphase und die mechanische Steifigkeit der jeweiligen Homopolymere durch die Verwendung des Copolymers im Sinne einer höheren Flexibilität und eines schnelleren Abbaus begünstigt werden. Der hochkristalline Charakter des PGA geht in der Mischung mit PDLLA verloren. Diese morphologische Veränderung führt zu einer verstärkten Hydrolyse. Daher degradiert das Copolymer zügiger und homogener, als die jeweiligen Homopolymere (HAYASHI⁴²).

Schließlich wurde in die vorliegende Untersuchung mit TMC als Anteil im Copolymer PDLLA-co-TMC ein Material aufgenommen, das sich durch einen deutlich verzögerten Abbau auszeichnet.

Die Degradierungsversuche der vorliegenden Arbeit von Polymer-Folien in PBS bei einem pH-Wert von 7,4 bei 37°C zeigten, daß sich die drei verschiedenen Basismaterialien tatsächlich bei gleichen Versuchsbedingungen unterschiedlich auflösten. Der rasche Gewichtsverlust des PDLLA-co-Gly um etwa 60% nach schon 10 Tagen erschien zu früh einzusetzen. Eine Harnleiterschiene, die nach einem operativem Eingriff am Ureter diesen schienen und vor narbenbedingten Strikturen bewahren soll, sollte mindestens über zwei Wochen ihre volle Stabilität aufrecht erhalten, dann jedoch zügig abgebaut werden, ohne allerdings in gröbere Fragmente zu zerfallen, die den Ureter okkludieren könnten. Daher war PDLLA-co-TMC zur Herstellung der Harnleiterschiene besser geeignet. Es verhielt sich etwa wie PDLLA, degradierte jedoch etwas langsamer. Beide Polymere ließen am 30. Tag noch keinen Gewichtsverlust erkennen und begannen erst dann, sich aufzulösen. Bei allen drei Materialien dauerte es fast ein Jahr, bis die Folien vollständig abgebaut waren.

Die Abbaustudien der fertigen PDLLA-co-TMC-Stents in humanem Urin bei ebenfalls 37°C zeigten jedoch völlig andere Ergebnisse. Im Vergleich zu den Folien in PBS waren die Schienen im Urin schon nach 9 Wochen vollständig degradiert. In der ersten und zweiten Woche hatten die Stents sogar an Gewicht zugenommen, dann bis zur vierten Woche wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht, um schließlich in der sechsten Woche noch einmal an Masse zu gewinnen. Erst dann lösten sie sich innerhalb von drei Wochen völlig auf.

Diese deutliche Diskrepanz in der Abbaukinetik von Stents in Urin und Folien in PBS bei jeweils gleicher Temperatur und annähernd gleichem pH-Wert erscheint zunächst unverständlich, da der Abbau streng hydrolytisch erfolgt (siehe oben) und auch keine möglichen Interaktionen mit umgebendem Gewebe oder phagozytierenden Zellen zu erwarten waren, da es sich ausschließlich um sterilen Urin als Inkubationsmedium handelte. Eine Erklärung bietet eine Arbeit von LU⁶² et al. aus dem Jahre 1999. Sie untersuchten PDLLA-co-Gly und verglichen dabei das Abbauverhalten unterschiedlich dicker Polymerfolien (5-10µm und 85-100µm) in PBS. Dabei stellten sie fest, daß sich dickere Folien schneller abbauten als dünnere. Nach 10 Wochen war das Gewicht der dünnen Folien um 35,6% gesunken. Im selben Zeitraum reduzierte sich das Gewicht der dicken Folien um 71,1%. Erklärt wird dieser Umstand mit der Annahme, daß autokatalytische Prozesse im Inneren der Folien im Falle einer größeren Dicke besser greifen können. Abbauprodukte des Materials verbleiben im Zentrum der Folie, lösen sich in eindringendem Wasser und katalysieren die Degradierung. Da das Wasser jedoch Voraussetzung für die Hydrolyse im Inneren der Folie ist, vergrößert sich initial das Gewicht der Proben durch das aufgenommene Wasser. Nun setzt die Hydrolyse ein und es kommt zur Akkumulation von Carboxyl-Gruppen, die ihrerseits immer unvollständiger abdiffundieren können, da sich der Abbau und damit die ihre Freisetzung innerhalb der Folie immer mehr autokatalytisch induzieren, während diese Selbstbeschleunigung des Abbauprozesses an der Oberfläche kaum eine Rolle spielt, da hier die relevanten Abbauprodukte ins Medium übergehen und sich stark verdünnen. Die Probe wird dadurch immer poröser und kann dann plötzlich wieder viel Wasser aufnehmen, wenn auch die Oberfläche ausreichend zerstört ist. So erklärt sich die erneute Gewichtszunahme im Abbauersuch in Urin. Jetzt ist das Material in der Lage sich sehr zügig aufzulösen, da in die entstandenen Poren ausreichend Wasser eindringen kann und trotzdem das System noch soweit geschlossen ist, daß die katalytisch aktiven Carboxyl-Gruppen in ausreichendem Maße vorhanden bleiben (PARK⁶³).

Vor dem Hintergrund dieser Ansichten läßt sich annehmen, daß das in der vorliegenden Studie zum Einsatz gebrachte CESP- Verfahren zur Herstellung der

Harnleiterschienen zu einem Endprodukt führt, das sich aufgrund der resultierenden Mikroporosität des Materials durch eine zusätzlich verkürzte Abbauezeit auszeichnet.

Schließlich wird angenommen, daß die γ -Sterilisation der Stents durch Verkürzung der Polymerketten die Degradation fördert. ZHANG et al. fanden ebenfalls einen beschleunigten Abbau nach γ -Sterilisation für Vicryl-Fäden (Copolymer aus Lactid und Glycolid) (ZHANG⁶⁴ et al.). Die Effekte der Bestrahlung sind dosis-abhängig. MONTANARI et al. sterilisierten Poly(L-Lactid-co-Glycolid) mit Dosen von 5, 15 und 25 kGy. Bei 25 kGy betrug der Molekulargewichtsverlust bereits 10% unmittelbar nach der Bestrahlung. Dann war jedoch aufgrund des sehr zügigen Abbaus des Materials kein Unterschied hinsichtlich der Degradierung zwischen γ -sterilisierten und nativen Proben auszumachen (MONTANARI⁶⁵ et al.).

Auch SEBERT⁶⁶ et al. beschreiben einen beschleunigten Abbau von Hydroxypropylmethylcellulose nach γ -Sterilisation. Der Haupteffekt der γ -Sterilisation ist die Depolymerisation. Die Sekundärstruktur des Materials wird durch oxidative Degradation und Kettenbrüche stark beeinflußt und der Abbauprozess sofort induziert, so daß auch schon während der Lagerung die Degradation schneller abläuft, als bei nicht radierten Proben (RIES⁶⁷ et al., MASSON⁶⁸ et al.). Die Primärstruktur bleibt nahezu unverändert, so daß chemische Eigenschaften erhalten bleiben (SEBERT⁶⁷ et al.). Diese sind beispielsweise von Bedeutung, wenn biodegradierbare Polymere mit pharmakologisch aktiven Substanzen beladen werden, um diese kontrolliert abzugeben. Zu berücksichtigen ist in solchen Fällen eine deutliche Beschleunigung der Freisetzung, die ebenfalls als Indiz für die durch die Bestrahlung induzierte erhöhte Abbaugeschwindigkeit anzusehen ist (ALLEMAN^{69, 70} et al.)

In der vorliegenden Studie wurden die Polymerfolien vor der Degradationsanalyse nicht γ -sterilisiert. Hier wurde Natriumacid zur Hemmung des Bakterienwachstums verwendet. Die in humanem Urin inkubierten Stents und die im Tierversuch eingesetzten Schienen wurden jedoch der γ -Sterilisation zugeführt und mit 25 kGy sterilisiert. Zusätzlich wurden die Stents durch das CESP-Verfahren aufgeschäumt. Die durchaus erwünschte massive Beschleunigung des Abbaus der fertigen Stents im Vergleich mit den Polymerfolien als eine Summe der oben beschriebenen Effekte der beiden Verfahren läßt sich nicht anteilig auf Sterilisations- oder Formgebungseinflüsse zurückführen.

Im Vergleich zur Degradationsanalyse in humanem Urin erfolgte der Abbau der Schienen im Tiermodell jedoch noch schneller. Möglicherweise spielt doch neben dem bislang angenommenen hydrolytischen Abbau die enzymatische Degradation eine Rolle. Ferner ist zu

berücksichtigen, daß es sich beim Abbauversuch in humanem Urin um ein statisches Modell handelte. Der kontinuierliche Urinfluß im Harnleiter der Versuchstiere wurde nicht simuliert. In keinem Fall konnten in der Sektion Residuen der Stents gefunden werden. Dabei betrug die kürzeste Standzeit drei Wochen. Es ist daher davon auszugehen, daß die Degradation der eingesetzten Harnleiterschienen in vivo bereits nach drei Wochen abgeschlossen ist. Der zur Sicherung der Stents angebrachte PDS-Faden war nach drei und sechs Wochen noch völlig intakt. Es findet sich kein Anhalt für die Annahme eines akzidentellen in-toto-Abganges der Schienen. Die Dislokation der Schienen erscheint zudem sehr unwahrscheinlich, da sie der Harnleiterwand eng anliegen. Außerdem fanden sich im Rahmen der Sektion ausnahmslos sehr geringe Durchmesser der Ureter-Ostien in der Blase. Der Versuch, eine solche Ostiumpassage eines Stents am Sektionspräparat durchzuführen, gelang nur mühsam. Schließlich blieb die Suche nach Fragmenten oder der ganzen Schiene in der Blase und im Harnleiter distal der Anastomose erfolglos. Auch im Harnsediment und bei makroskopischer Betrachtung des Katheterurins fanden sich in keinem Fall Fragmente des Stents.

Als lösbares Problem erwies sich damit die Tatsache, daß es durch unregelmäßigen Abbau biodegradierbarer Polymere zum Abgang größerer Fragmente kommen kann und diese den englumigen Harnleiter okkludieren. BERGMAN¹⁷ et al. ersetzten etwa 4 cm lange Uretersegmente an sechs Hunden durch Poly-L-Lactid-Röhrchen. Bei vier der sechs Tiere kam es nach spätestens acht Monaten zu schwerwiegenden Obstruktionen mit zum Teil gravierenden Nierenschäden durch den groben Zerfall des Polymers. Lediglich zwei Hunde zeigten nach acht Monaten ein normales Ausscheidungsurogramm.

Durch den Einsatz des CESP-Verfahrens bieten die in der vorliegenden Studie verwendeten Harnleiterschienen eine Schaumstruktur, die aufgrund der vergrößerten Oberfläche ein gleichmäßiges Auflösen fördert. Außerdem wurde das Copolymer PDLLA-co-TMC verwendet, das sich in der Degradationsanalyse durch einen sehr kontrollierten Abbau im Vergleich zu anderen Polymeren und Copolymeren auszeichnete. Initial behält das Material im Vergleich zu den anderen untersuchten Polymeren seine Stabilität länger aufrecht, löst sich dann aber zügig und gleichmäßig auf.

Dabei ist jedoch zu beachten, daß die rasche Degradation von Lactiden zu einer lokalen nichtinfektiösen Entzündung durch die hohe Konzentration saurer Abbauprodukte führen kann (BÖSTMANN⁷¹ et al.). In der vorliegenden Untersuchung konnten derartige Befunde bei den Versuchstieren in keinem Fall nachvollzogen werden.

Ein weiterer Umstand, der die Entstehung einer lokalen Entzündung begünstigt, ist eine hohe Zelladhäsion. Inkrustation, Bakterienadhäsion und Zelladhäsion sind interferierende Prozesse. Außerdem soll die Schiene nicht, wie bei der Verwendung als Urethrastent, in das umgebende Gewebe einwachsen und intraluminal epithelialisieren. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, die Adhäsionspotenz des Basismaterials weitestgehend zu reduzieren. Eine geeignete Oberflächenmodifizierung vermag dies wirkungsvoll umzusetzen. Es konnte gezeigt werden, daß die durch die plasmainduzierte Pfropfkopolymerisation mit HEMA oder OEOMA beschichteten Basismaterialien eine signifikant niedrigere Zelladhäsion aufwiesen, als die unbehandelten Proben. Dabei erschien HEMA gegenüber OEOMA deutlich überlegen. Im Vergleich zum unbehandelten PDLA reduzierte sich die Größe der mit Urothelzellen besiedelten Oberfläche von PDLA-HEMA-Folien um etwa 70%. Auch hinsichtlich der Biokompatibilität erwiesen sich HEMA und OEOMA in zellmorphologischen Untersuchungen, BrdU-Test, XTT-Test und Vitalitätsfärbung gegenüber Urothelzellen als unbedenklich.

HEMA ist ein Methacrylat und wird seit über 10 Jahren erfolgreich in der Augenheilkunde als Material für weiche Kontaktlinsen eingesetzt. Gerade bei einer solchen Art der Anwendung muß der Kunststoff in hohem Maß antiadhäsiv gegenüber Bakterien, Pilzen und Proteinen sein. Eine hohe Gewebeverträglichkeit über Jahre und Jahrzehnte wird darüber hinaus gefordert.

In den letzten Jahre wurde HEMA verstärkt auch als Werkstoff für intraoculäre Linsen untersucht. JOO⁷² et al. analysierten Biokompatibilität und Adhäsionspotenz von HEMA-Intraocularlinsen gegenüber Makrophagen und L929-Fibroblasten und Granulozyten in vitro. Im Vergleich zu Poly(Methylmethacrylat)-Linsen (PMMA) und Silikonlinsen fanden sie einen signifikant geringeren Bewuchs der geprüften Linsen mit Fibroblasten, Granulozyten und Makrophagen auf der HEMA-Linse. PMMA und Silikon stimulieren Granulozyten, hohe Mengen an Sauerstoffradikalen freizusetzen, während HEMA in dieser Hinsicht nahezu inaktiv ist. Die Hydrophilie des HEMA reduziert die Zelladhäsion und verhindert die Aktivierung von Granulozyten.

Auch beim Versuch, HEMA-Proben in die vordere Kammer des Chinchilla-Auges zu implantieren, fanden sich nach sechs Monaten keine pathologischen Veränderungen an Iris oder Ziliarkörper (SMETANA⁷³ et al.). Die Studien unterstreichen die in der vorliegenden Arbeit auch gegenüber Urothelzellen demonstrierte hohe Verträglichkeit von HEMA. Auch der antiadhäsive Effekt konnten bestätigt werden. Bei Kontaktlinsen dient er vor allem der Vermeidung von Bakterien- und Proteinanhaftung. Im Falle von

Intraocularlinsen steht die geringe Adhäsion gegenüber nach Katarakt-Operation verbliebenen Linsenepithel-Zellen im Vordergrund. Diese Zellen können die neue Kunstlinse überwuchern und einen Zweiteingriff erforderlich machen. HUMPHRY⁷⁴ et al. stellten dar, daß HEMA-Linsen in vitro im Vergleich zu anderen Materialien kaum mit Rinder- oder Schweinelinsenepithel überwuchert wurde.

Ähnliche Ergebnisse fanden auch CUNANAN⁷⁵ et al. bei der Inkubation von Linsenepithelzellen des Kaninchens auf Silikon, HEMA, PMMA und Polytetrafluorethylen (PTFE). Es wird angenommen, daß ein Zusammenhang zwischen der freien Energie der Grenzflächen und der Zelladhäsion besteht.

Aufgrund seiner antiadhäsiven Eigenschaft und guten Verträglichkeit befindet sich HEMA bereits im klinischen Einsatz in der Augenheilkunde und Zahnmedizin. Vergleichende Studien hinsichtlich der Zelladhäsion von nativen und HEMA-oberflächenmodifizierten Polylactiden sind in der Literatur bislang nicht beschrieben worden und wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erstmals durchgeführt. Es konnten signifikante Effekte durch die HEMA-Behandlung des PDLLA dargestellt werden.

Die plasmainduzierte Pfropfkopolymerisation als Verfahren zur Aufbringung des HEMA auf das Polylactid-Gerüst führt zu einem stabilen Monomermantel. Unmittelbar nach der Pfropfkopolymerisation änderte sich der mittels captive-bubble-Methode gemessene Kontaktwinkel der PDLLA-HEMA-Oberfläche auf im Mittel 18,5°. Im Vergleich dazu betrug der Kontaktwinkel von nativem PDLLA durchschnittlich 67,5°. Die nur sehr langsam degradierbare Oberflächenbeschichtung blieb während des Abbaus bis kurz vor dem vollständigen Auflösen der Proben bestehen. Der Kontaktwinkel des PDLLA-HEMA änderte sich innerhalb von 30 Tagen nur unwesentlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß sich die aufgrund der Materialstudien zur Stentherstellung ausgewählte Kombination aus dem Copolymer PDLLA-co-TMC in Verbindung mit einer Oberflächenmodifizierung mit HEMA zur postoperativen Harnleiterschienung im Tiermodell eignet. Es wurde bereits erwähnt, daß der Stent sich in vitro und in vivo als in hohem Maße biokompatibel zeigte. Auch nach klinischen Gesichtspunkten war die Anwendung erfolgreich. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die beide sonographisch eine Harnstauungsniere auf der operierten Seite zeigten, ergab die Nephrosonographie für alle Schafe mit einliegendem Harnleiterstent ausnahmslos unauffällige Befunde. In der Sektion fanden sich nach Stenteinlage makroskopisch gut verheilte Anastomosen. Demgegenüber zeigten beide Kontrolltiere eine deutliche

Strikatur des Harnleiters mit einer Dilatation des proximalen Anteils. Auch die wöchentlichen Blut- und Urinkontrollen gaben keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen. In der histopathologischen Untersuchung der geschienten Anastomosen fanden sich im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant besser regenerierte Wandschichten. Insbesondere die funktionell wichtige Muskelschicht erschien kaum narbig durchsetzt. Der PDLLA-co-TMC-HEMA-Stent bietet eine kontrollierte Abbaukinetik, so daß lokale Gewebeschädigungen durch hohe Konzentration von Abbauprodukten verhindert werden, die Schiene ihre Stabilität ausreichend lange aufrechterhält und das Risiko einer Okklusion des Harnleiters durch Fragmente entfällt. Durch die Formgebung mittels CESP-Verfahren und die daraus resultierende Schaumstruktur der fertigen Harnleiterschiene wird der Degradationsprozess zusätzlich verbessert. Da wir im Rahmen der Sektion bei keinem Schaf Residuen der Schiene ausmachen konnten, kann davon ausgegangen werden, daß die Degradation in vivo bereits nach 3 Wochen abgeschlossen ist.

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung am Patienten sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Das Materialkonzept scheint geeignet zu sein. Komplikationen hinsichtlich der Gewebeverträglichkeit im humanen Ureter, auch im Sinne von Spätfolgen, sind nicht zu erwarten.

Ein wichtiger Schritt vor einer möglichen Serientauglichkeit ist die Inkorporation von röntgendichtem Material, um ein schnelles und sicheres Lokalisieren der Schiene zu ermöglichen. Einen vielversprechenden Ansatz bieten ISOTALO⁷⁶ et al. Sie fügten PDLLA- und PGA-Stents 23% Bariumsulfat zu. Diese Stents implantierten sie 30 männlichen Kaninchen in die Rückenmuskulatur und in die Harnröhre. Schnell degradierbares PGA wurde gewählt, um mögliche Langzeitfolgen des verbliebenen Bariumsulfates zu erkennen. Alle Proben waren postoperativ deutlich auf dem Röntgenbild zu erkennen. Das PGA war nach einem Monat abgebaut, PDLLA nach sechs Monaten. Der Degradationsprozeß war also erwartungsgemäß für beide Materialien beschleunigt. Das aus den PGA-Stents frei gewordene Bariumsulfat konnte nach sechs Monaten nicht mehr nachgewiesen werden. In allen Fällen gab es auch in der histologischen Untersuchung der mit den Proben in Kontakt getretenen Gewebe keinen Anhalt für pathologische Veränderungen durch das Bariumsulfat.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten PDLLA-co-TMC-HEMA-Stents zeichnen sich jedoch ohnehin durch eine sehr kurze Abbauzeit aus, so daß die Zeitspanne, in der die Stents ihre Geometrie vollständig behalten sollen, nur wenig verkürzt werden darf. Wie einflußreich die Beimischung von Bariumsulfat, das in der oben zitierten Arbeit nahezu ein Viertel der

Gesamtmasse der Stents einnahm, auf die Abbaukinetik der Schienen im konkreten Fall ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

Mit der Zielsetzung eine biodegradierbare Harnleiterschleife zu entwickeln, wurden verschiedene Polylactide untersucht und mit einer organadaptierten Oberfläche versehen. Zur Formgebung kam das neuartige CESP-Verfahren zum Einsatz (Controlled Expansion of Saturated Polymers), bei dem das Polymerpulver in einer Kavität nicht, wie in der Kunststoffverarbeitung sonst üblich durch Wärme, sondern durch Aufschäumen unter hohem Gas-Druck geformt wird. Im Rahmen der Materialauswahl wurden die synthetischen, hydrolytisch biodegradierbaren Homo- und Copolymere Poly(D,L-Lactid) (PDLLA), Poly(D,L-Lactid-co-Trimethylencarbonat) (PDLLA-co-TMC), Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) (PDLLA-co-Gly), allesamt Derivate der Milch- bzw. Glycolsäure und Oberflächenmodifizierungen mit Hydroxyethylmethacrylat HEMA und Oligoethylenoxidmonomethacrylat (OEOMA) hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und Zelladhäsion analysiert. Methacrylate zeichnen sich insbesondere durch minimierte Protein- und Zelladhäsion aus und erzeugen ebenfalls bei der Degradation nichttoxische Produkte. Es zeigte sich eine Biokompatibilität der Materialien und eine deutliche Reduktion der Zelladhäsion nach HEMA-Beschichtung. Ein 3 cm langer und 7 Charrière messender Prototyp der Schleife wurde aus PDLLA-co-TMC mit Hilfe des CESP-Verfahrens hergestellt und durch die Pfropfkopolymerisation mit einer HEMA-Oberfläche versehen. Im Tierexperiment wurde dieser Stent unilateral nach Ureterotomie in den distalen Harnleiter von Schafen implantiert. Die wöchentlich durchgeführten Blut- und Urinkontrollen, sowie Ultraschalluntersuchungen waren über den gesamten Versuchszeitraum ebenso wie die abschließende Sektion unauffällig. Histologisch fand sich ein regelrechtes Urothel ohne jegliche Veränderung durch den Kontakt mit dem Stent und eine gute Regeneration aller Wandschichten im Bereich der Anastomose.

6 Anhang

6.1 Tabelle 1: Adhäsion

TEST Ethidiumbromid	Biofolie	%	PDLLA	%	PDLLA- co-Gly	%	PDLLA- co-TMC	%	PDLLA- HEMA	%	PDLLA- OEOMA	%
1	43,23	100	19,50	45			10,6	25			17,9	41
2	14,47	100	9,21	64			9,73	67				
3	9,29	100	7,43	80					1,53	16		
4	14,98	100	7,78	52					3,95	26	5,29	35
5	15,93	100	10,74	67	9,79	61			1,99	12		
Mittelwert:	19,58	100	10,93	62	9,79	61	10,17	46	2,49	18	11,60	38
Standardab.	12,05	0	4,44	12	0	0	0,44	21	1,05	5,8	6,31	3
n=	5	5	5	5	1	1	2	2	3	3	2	2

Tabelle 1: Adhäsionstest mit RT-112 nach Ethidiumbromidfärbung

6.2 Tabelle 2: XTT-Test im indirekten Kontakt für RT-112

Indirekter Kontakt	Negativ kontrolle	%	Positiv kontrolle	%	PDLLA	%	PDLLA- co-Gly	%	PDLLA- co-TMC	%	PDLLA- HEMA	%	PDLLA- OEOMA	%
XTT-Test	0,7	103	0,232	34			0,796	117	0,88	130				
1	0,707	104	0,221	33			0,828	122	0,848	125				
	0,581	86	0,232	34			0,767	113	0,9	132				
	0,684	101	0,229	34			0,834	123	0,77	113				
	0,669	98	0,229	34			0,8	118	0,75	110				
	0,629	93	0,229	34			0,799	118	1,282	189				
	0,633	93	0,247	36			0,836	123	0,853	126				
	0,696	102	0,236	35			0,863	127	0,999	147				
	0,696	102	0,239	35			0,796	117	0,869	128				
	0,81	119	0,23	34			0,757	111	0,767	113				
	0,716	105	0,222	33			0,755	111	0,812	120				
	0,632	93	0,234	34			0,718	106	0,749	110				
							0,768	113	0,799	118				
							0,636	94	0,721	106				
							0,644	95	0,655	96				
							0,714	105	1,434	211				
							0,787	116	1,014	149				
							0,782	115	1,12	165				
							0,862	127	0,924	136				
							0,768	113	0,997	147				
							0,807	119	1,008	148				
							0,84	124						
							0,79	116						
							0,746	110						
Mittelwert:	0,679	100	0,232	34			0,779	115	0,912	134				
XTT-Test	1,957	111	0,86	49			2,175	123			2,078	118	2,119	120

2	1,835	104	0,651	37			1,865	106			2,006	114	1,886	107
	1,783	101	0,413	23			1,752	99			1,917	108	1,879	106
	1,762	100	0,47	27			1,821	103			1,864	105	1,856	105
	1,665	94	0,532	30			1,902	108			1,972	112	1,85	105
	1,719	97	0,513	29			1,897	107			1,891	107	1,799	102
	1,684	95	0,464	26			1,905	108			2,049	116	1,713	97
	1,712	97	0,424	24			1,778	101			2	113	1,711	97
	1,732	98	0,383	22			1,781	101			1,956	111	1,76	100
	1,738	98	0,393	22			1,853	105			1,892	107	1,848	105
	1,766	100	0,42	24			1,896	107			1,996	113	1,733	98
	1,852	105	0,438	25			1,915	108			1,867	106	1,754	99
Mittelwert:	1,767	100	0,497	28			1,878	106			1,957	111	1,826	103
XTT-Test	1,526	113	0,659	49					1,477	109				
3	1,499	111	0,584	43					1,524	113				
	1,391	103	0,575	43					1,51	112				
	1,384	103	0,572	42					1,522	113				
	1,282	95	0,625	46					1,626	121				
	1,294	96	0,631	47					1,585	118				
	1,347	100	0,595	44					1,628	121				
	1,264	94	0,562	42					1,585	118				
	1,245	92	0,545	40					1,514	112				
	1,246	92	0,542	40					1,499	111				
	1,327	98	0,466	35					1,505	112				
	1,382	102	0,558	41					1,527	113				
Mittelwert:	1,349	100	0,576	43					1,542	114				
XTT-Test	0,937	97	0,786	81	0,926	96	1,143	118	1,111	115	1,101	114		
4	1,058	110	0,242	25	0,96	99	1,138	118	1,108	115	1,11	115		
	1,091	113	0,321	33	1,14	118	1,159	120	1,103	114	1,171	121		
	1,092	113	0,26	27	1,019	105	1,255	130	1,257	130	1,273	132		
	0,986	102	0,611	63	1,215	126	1,273	132	1,017	105	1,208	125		
	0,982	102	0,421	44	1,147	119	1,23	127	1,145	119	1,144	118		
	0,896	93	0,256	26	1,122	116	1,252	130	1,108	115	1,038	107		
	1,015	105	0,625	65	1,131	117	1,156	120	1,161	120	1,203	125		
	0,833	86	0,614	64	1,106	114	1,203	125	1,098	114	1,132	117		
	0,874	90	0,421	44	1,155	120	1,111	115	1,066	110	1,003	104		
	0,924	96	0,595	62	1,071	111	1,092	113	1,176	122	1,166	121		
	0,905	94	0,541	56	1,103	114	1,161	120	1,176	122	1,173	121		
Mittelwert:	0,966	100	0,474	49	1,091	113	1,181	122	1,127	117	1,144	118		
XTT-Test	1,167	106	0,735	67									1,102	100
5	1,191	108	0,498	45									1,096	99
	1,2	109	0,543	49									1,298	118
	1,167	106	0,677	61									1,375	124
	1,185	107	0,578	52									1,284	116
	1,035	94	0,593	54									1,244	113
	1,045	95	0,544	49									1,224	111
	1,006	91	0,444	40									1,184	107
	1,053	95	0,611	55									1,039	94

	1,072	97	0,377	34									1,039	94
	1,043	94	0,546	49									1,036	94
	1,089	99	0,642	58									1,094	99
Mittelwert:	1,104	100	0,566	51									1,168	106
XTT-Test	1,075	103	0,422	40	1,051	101	1,137	109	1,036	99	0,94	90		
6	1,072	103	0,404	39	1,109	106	1,09	104	0,996	95	0,975	93		
	1,069	102	0,389	37	1,154	110	1,152	110	1,074	103	0,892	85		
	1,119	107	0,392	38	1,175	112	1,105	106	1,058	101	0,977	94		
	1,036	99	0,385	37	1,208	116	1,129	108	1,027	98	1,042	100		
	1,036	99	0,365	35	1,454	139	0,925	89	0,954	91	0,93	89		
	1	96	0,357	34	1,064	102	1,136	109	1,032	99	1,017	97		
	0,977	94	0,331	32	1,168	112	1,146	110	1,078	103	0,963	92		
	0,943	90	0,354	34	1,1	105	1,084	104	1,072	103	0,979	94		
	1,111	106	0,405	39	1,036	99	1,159	111	1,084	104	1,116	107		
	0,999	96	0,411	39	1,157	111	1,108	106	1,019	98	0,936	90		
	1,1	105	0,337	32	1,117	107	1,091	104	1,092	105	0,882	84		
Mittelwert:	1,045	100	0,379	36	1,149	110	1,105	106	1,044	100	0,971	93		
XTT-Test	0,124	103	0,078	65									0,121	100
7	0,114	95	0,073	60									0,112	93
	0,13	108	0,076	63									0,108	90
	0,139	115	0,062	51									0,109	90
	0,117	97	0,055	45									0,104	86
	0,118	98	0,057	47									0,105	87
	0,117	97	0,074	61									0,087	72
	0,115	95	0,062	51									0,1	83
	0,124	103	0,057	47									0,098	81
	0,115	95	0,053	44									0,097	80
	0,113	94	0,051	42									0,108	90
	0,119	99	0,065	54									0,108	90
Mittelwert:	0,12	100	0,063	53									0,104	87
Mittelwert														
gesamt:	1,004	100	0,398	42	1,12	111	1,144	113	1,118	119	1,357	107	1,033	99
n=	84	84	84	84	24	24	60	60	57	57	36	36	36	36
Standardab.	0,483	6,6	0,198	12	0,098	9,4	0,408	9,3	0,262	21	0,435	12	0,715	11

Tabelle 2: XTT-Test im indirekten Kontakt für RT-112

6.3 Tabelle 3: XTT-Test im direkten Kontakt für RT-112

Direkter Kontakt	Negativ-Kontrolle	%	Positiv-Kontrolle	%	PDLLA	%	PDLLA-co-Gly	%	PDLLA-co-TMC	%	PDLLA-HEMA	%	PDLLA-OEOMA	%
XTT-Test	0,585	118	0,119	24	0,458	93	0,464	94	0,356	72	0,28	57		
1	0,736	149	0,116	23	0,489	99	0,409	83	0,343	69	0,336	68		
	0,708	143	0,12	24	0,493	100	0,449	91	0,345	70	0,4	81		
	0,727	147	0,111	22	0,532	108	0,449	91	0,365	74	0,514	104		

	0,598	121	0,112	23	0,502	102	0,398	81	0,368	75	0,503	102		
	0,182	37	0,113	23	0,496	100	0,441	89	0,369	75	0,619	125		
	0,257	52	0,127	26	0,476	96	0,429	87	0,39	79	0,375	76		
	0,489	99	0,124	25	0,483	98	0,387	78	0,387	78				
	0,34	69	0,113	23	0,479	97	0,395	80	0,387	78				
	0,316	64	0,111	22										
			0,121	25										
			0,113	23										
Mittelwert:	0,494	100	0,117	24	0,49	99	0,425	86	0,368	74	0,432	88		
XTT-Test	0,831	97	0,08	9									0,556	65
2	0,868	102	0,091	11									0,751	88
	0,838	98	0,149	17									0,66	77
	0,853	100	0,14	16									0,589	69
	0,872	102	0,143	17									0,839	98
	0,879	103	0,143	17									0,812	95
	0,844	99	0,145	17									0,655	77
	0,849	99	0,147	17									0,659	77
			0,15	18									0,724	85
Mittelwert:	0,854	100	0,132	15									0,694	81
XTT-Test	1,005	105	0,164	17	0,711	74			0,609	64	0,774	81		
3	1,095	114	0,167	17	0,808	84			0,559	58	0,827	86		
	0,858	90	0,179	19	0,844	88			0,544	57	0,953	100		
	0,992	104	0,163	17	0,828	87			0,536	56	0,938	98		
	0,962	101	0,157	16	0,715	75			0,57	60	0,942	98		
	0,823	86	0,162	17	0,896	94			0,576	60	0,898	94		
	0,963	101	0,173	18	0,841	88			0,612	64	0,933	98		
			0,167	17	0,793	83			0,594	62	1,057	110		
			0,167	17	0,85	89			0,636	66				
Mittelwert:	0,957	100	0,167	17	0,81	85			0,582	61	0,915	96		
XTT-Test	1,113	89	0,164	13									1,081	86
4	1,474	118	0,147	12									1,066	85
	1,549	124	0,151	12									1,021	81
	0,881	70	0,144	11									0,739	59
													1,096	87
Mittelwert:	1,254	100	0,152	12									1,001	80
Mittelwert														
gesamt:	0,809	100	0,138	19	0,65	92	0,425	86	0,475	68	0,69	92	0,803	81
n=	29	29	34	34	18	18	9	9	18	18	15	15	14	14
Standardab.	0,304	25	0,025	4,4	0,166	8,9	0,026	5	0,11	8	0,259	17	0,182	11

Tabelle 3: XTT-Test im direkten Kontakt für RT-112

6.4 Tabelle 4: BrdU-Test im indirekten Kontakt für RT-112

Indirekter Kontakt	Negativ-Kontrolle	%	Positiv-Kontrolle	%	PDLLA	%	PDLLA-co-TMC	%	PDLLA-co-Gly	%	PDLLA-HEMA	%	PDLLA-OEOMA	%
BrdU-Test	0,331	100	0,135	41					0,398	120	0,341	103	0,362	110
1	0,397	120	0,152	46					0,484	146	0,542	164	0,483	146
	0,361	109	0,172	52					0,42	127	0,463	140	0,389	118
	0,331	100	0,152	46					0,378	114	0,4	121	0,316	95
	0,363	110	0,146	44					0,333	101	0,372	113	0,314	95
	0,329	100	0,143	43					0,314	95	0,372	113	0,268	81
	0,328	99	0,17	51					0,301	91	0,341	103	0,291	88
	0,323	98	0,143	43					0,265	80	0,343	104	0,248	75
	0,33	100	0,153	46					0,267	81	0,288	87	0,256	77
	0,328	99	0,154	47					0,269	81	0,315	95	0,263	79
	0,306	93	0,148	45					0,227	69	0,271	82	0,213	64
	0,24	73	0,139	42					0,211	64	0,204	61	0,209	63
Mittelwert:	0,331	100	0,151	46					0,322	97	0,354	107	0,301	91
BrdU-Test	0,4	101	0,18	46	0,517	131	0,618	157	0,717	182	0,598	152		
2	0,403	102	0,16	41	0,556	141	0,598	152	0,766	194	0,569	144		
	0,389	99	0,163	41	0,474	120	0,487	124	0,684	173	0,661	168		
	0,438	111	0,154	39	0,465	118	0,534	135	0,753	191	0,641	163		
	0,426	108	0,285	72	0,541	137	0,487	124	0,69	175	0,606	154		
	0,349	89	0,156	40	0,512	130	0,497	126	0,718	182	0,616	156		
	0,407	103	0,177	45	0,45	114	0,482	122	0,601	152	0,597	151		
	0,364	92			0,436	111	0,55	140	0,564	143	0,578	147		
	0,345	88			0,459	116			0,635	161	0,629	160		
	0,378	96			0,459	116			0,643	163	0,594	151		
	0,432	110			0,67	170					0,654	166		
	0,4	101			0,642	163					0,694	176		
Mittelwert:	0,394	100	0,182	46	0,515	131	0,532	135	0,677	172	0,62	157		
BrdU-Test	0,608	121	0,234	47									0,679	135
3	0,464	92	0,414	82									0,564	112
	0,444	88	0,499	99									0,66	131
	0,494	98	0,359	71									0,597	119
	0,478	95	0,193	38									0,557	111
	0,631	125	0,168	33									0,522	104
	0,524	104	0,194	39									0,546	109
	0,485	96											0,54	107
	0,481	96											0,47	93
	0,49	97											0,534	106
	0,469	93											0,465	92
	0,468	93											0,473	94
Mittelwert:	0,503	100	0,294	59									0,551	109
BrdU-Test	0,675	115	0,371	63			0,966	164	0,962	163				
4	0,684	116	0,2	34			0,88	149	1,058	180				
	0,584	99	0,193	33			0,942	160	0,763	130				
	0,72	122	0,18	31			0,618	105	0,864	147				

	0,605	103	0,196	33			0,991	168	0,928	158				
	0,512	87	0,192	33			0,74	126	0,909	154				
	0,47	80	0,173	29			0,836	142	0,956	162				
	0,514	87	0,13	22			0,8	136	0,82	139				
	0,539	92	0,134	23			0,69	117	0,858	146				
	0,61	104	0,18	31			0,642	109	0,772	131				
	0,565	96					0,941	160	0,776	132				
							0,853	145	0,786	133				
							0,884	150	0,957	163				
							1,184	201	1,036	176				
							1,099	187	0,844	143				
							1,057	179	0,881	150				
							1,085	184	0,92	156				
							1,072	182	0,935	159				
							1,012	172	0,912	155				
									0,831	141				
									0,967	164				
									0,845	143				
									0,796	135				
									0,877	149				
Mittelwerte	0,589	100	0,195	33			0,91	155	0,886	150				
Mittelwert														
gesamt:	0,451	100	0,197	44	0,515	131	0,798	149	0,693	141	0,487	132	0,426	100
Standardab	0,111	11	0,083	15	0,073	18	0,219	25	0,247	32	0,148	32	0,144	20,8
n=	47	47	36	36	12	12	27	27	46	46	24	24	24	24

Tabelle 4: BrdU-Test im indirekten Kontakt für RT-112

6.5 Tabelle 5: XTT-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen

Indirekter Kontakt	Negativ-Kontrolle	%	Positiv-Kontrolle	%	PDLLA	%	PDLLA-co-Gly	%	PDLLA-HEMA	%	PDLLA-OEOMA	%
XTT-Test	0,21	104	0,035	18	0,181	90			0,18	90	0,163	81
1	0,16	80	0,03	15	0,142	71			0,2	100	0,181	90
	0,175	87	0,072	36	0,162	81			0,169	84	0,205	102
	0,213	106	0,06	30	0,141	70			0,202	100	0,183	91
	0,221	110	0,07	35	0,191	95			0,192	96	0,197	98
	0,199	99	0,057	29	0,169	84			0,201	100	0,201	100
	0,203	101	0,084	42	0,129	64			0,186	93	0,196	98
	0,195	97	0,087	43	0,14	70			0,156	78	0,169	84
	0,215	107	0,075	37	0,173	86			0,196	98	0,175	87
	0,219	109	0,055	28	0,151	75			0,202	100	0,134	67
			0,07	35	0,178	89			0,234	116	0,161	80
Mittelwert:	0,201	100	0,064	32	0,16	80			0,193	96	0,179	89
XTT-Test	0,235	88	0,151	56	0,301	113	0,21	78	0,372	139		
2	0,285	107	0,161	60	0,246	92	0,244	91	0,384	144		
	0,312	117	0,175	65	0,333	125	0,247	92	0,296	111		
	0,318	119	0,103	38	0,274	102	0,282	105	0,316	118		

	0,311	116	0,145	54	0,311	116	0,297	111	0,39	146		
	0,29	108	0,126	47	0,277	104	0,328	123	0,328	123		
	0,215	80	0,13	49	0,281	105	0,29	108	0,377	141		
	0,23	86	0,114	43	0,309	116	0,239	89	0,389	146		
	0,211	79	0,129	48	0,299	112	0,253	9	0,336	126		
					0,304	114	0,331	124	0,333	125		
					0,382	143	0,305	114	0,409	153		
					0,301	113	0,35	131	0,429	160		
					0,272	102	0,328	123	0,399	149		
					0,307	115	0,297	111	0,357	134		
					0,268	100	0,257	96	0,359	134		
					0,286	107	0,289	108	0,334	125		
					0,304	114	0,236	88	0,384	144		
					0,284	106	0,341	128	0,377	141		
					0,265	99	0,362	135	0,369	138		
					0,259	97	0,335	125	0,42	157		
					0,29	108	0,291	109	0,395	148		
									0,437	163		
Mittelwert:	0,267	100	0,137	51	0,293	110	0,291	109	0,372	139		
Mittelwert												
gesamt:	0,232	100	0,096	40	0,247	99	0,291	109	0,312	125	0,179	89
Standardab.	0,046	13	0,041	13	0,068	18	0,042	15	0,09	24	0,02	10
n=	19	19	20	20	32	32	21	21	33	33	11	11

Tabelle 5: XTT-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen

6.6 Tabelle 6: BrdU-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen

Indirekter Kontakt	Negativ-Kontrolle	%	Positiv-Kontrolle	%	PDLLA	%	PDLLA-HEMA	%	PDLLA-OEOMA	%
BrdU-Test	0,492	105	0,28	60	0,533	114	0,542	116	0,479	103
	0,418	89	0,316	68	0,57	122	0,446	95	0,514	110
	0,441	94	0,264	56	0,524	112	0,417	89	0,498	107
	0,419	90	0,361	77	0,482	103	0,509	109	0,518	111
	0,43	92	0,197	42	0,525	112	0,527	113	0,585	125
	0,468	100	0,28	60	0,504	108	0,44	94	0,51	109
	0,513	110	0,254	54	0,527	113	0,584	125	0,457	98
	0,437	94	0,217	46	0,492	105	0,45	96	0,495	106
	0,474	101	0,197	42	0,449	96	0,432	92	0,447	96
	0,541	116	0,218	47			0,469	100	0,483	103
	0,507	108					0,458	98	0,407	87
Mittelwert:	0,467	100	0,258	55	0,511	110	0,479	103	0,490	105
Standardab.	0,039	8,5	0,050	11	0,032	7	0,050	11	0,043	9,3
n=	11	11	10	10	9	9	11	11	11	11

Tabelle 6: BrdU-Test im indirekten Kontakt für Primärkulturen

6.7 *Tabelle 7: Kontaktwinkel mit und ohne Oberflächenmodifizierung*

Probe	Kontaktwinkel in Grad	Standardabweichung	n=
PDLLA	67,5	1,74	10
PDLLA-HEMA	17,0	1,77	10
PDLLA-OEOMA	21,4	2,00	20

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessungen ohne bzw. nach erfolgter Pfropfcopolymerisation

6.8 *Tabelle 8: Kontaktwinkelmessungen im Verlaufe des Abbaus*

Zeit/d	PDLLA-AAC	Standardab.	PDLLA-HEMA	Standardab.
0	20,7	1,6	18,8	1,3
3	19,7	2,2	21,3	2,1
10	20,6	2	21,7	1,6
30	21,8	1,7	22,3	2,2

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessung im Verlaufe des Abbaus (n=10)

7 Literaturverzeichnis

-
- ¹ Schmitz W, Hegemann G: Zur konservativen Behandlung von Harnleiterstrikturen unter besonderer Berücksichtigung gynäkologischer Grundleiden. *Urologe A* 5 (1966) 251
 - ² Zimskind PD, Fetter TR, Wilkerson JL: Clinical use of long-term indwelling silicone rubber ureteral splints inserted cystoscopically. *J Urol* 97 (1967) 840
 - ³ Mardis HK, Kammandel H, Hepperlen TW: Drainage efficiency of self-retained internal ureteral stent catheters. (Abst. 590) Proc. 75th Ann Meeting Am Urol Assoc (1980)
 - ⁴ Finney RP, Hopkins SC in: Pryor JP: *Urological prostheses, appliances and catheters*, Springer Verlag (1991) 33
 - ⁵ Marmor JL: The management of ureteral obstruction with silicone rubber splint catheters. *J Urol* 104 (1970) 385
 - ⁶ Tölle E, Kleinhans G: Die konservative Therapie von Harnleiterverletzungen in der Abdominalchirurgie. *Chir Praxis* 27 (1980) 417
 - ⁷ Weißbach L, Lienow R, Gebhardt M, Bastian HP: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener Natur- und Kunststoffe nach Urineinwirkung in vitro. *Urologe (A)* 18 (1979) 175
 - ⁸ Schüller J, Hofstetter AG: *Endourologie*, Georg Thieme Verlag, 1988
 - ⁹ Gibbons RP, Correa jr. RJ, Cummings K, Mason TJ: Experience with indwelling ureteral stent catheters. *J Urol* 115 (1976) 22
 - ¹⁰ McCoullough DJ: Shepherds crook self retaining ureteral catheter. *Urol Letters Club* 32 (1974) 54
 - ¹¹ Finney RP: Experience with new double J ureteral catheter stent. *J Urol* 120 (1978) 678
 - ¹² Mardis HK, Hepperlen TW, Kammandel H: Double pigtail ureteral stent. *Urology* 14 (1979) 23
 - ¹³ Tölle E: Die Indikation zur inneren Ureter-Schienung. *Kliniker* 10 (1981) 1214
 - ¹⁴ Tölle E: Indikationen zur Einsetzung einer Ureterendoprothese. *Fortschr Med* 103 (1985) 343
 - ¹⁵ Smith, Castañeda Zuñiga, Bronson: *Endourology, Principles and Practice*. Georg Thieme Verlag (1980)
 - ¹⁶ Lang EK: Antegrade ureteral stenting for dehiscence, strictures and fistulae. *Am J Radiol* 143 (1984) 795

-
- ¹⁷ Bergman S, Javadpour N, Wade C, Terril R: Biodegradable ureteral grafts in dogs. *Invest Urol* Vol. 16, No. 1 (1978) 48
- ¹⁸ Carter HB: Instrumentation and Endoscopy. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ: *Campbell's Urology*. WB Saunders Company 7.Auflage (1998) 159
- ¹⁹ de Petriconi R, Egghardt G, Frohneberg D, Hautmann R: Double-J ureteral catheter: a method without complications. *J Urol (Paris)* 93(5) (1987) 259
- ²⁰ Mosli HA, Farsi HMA, Al-Zimaity MF, Saleh TR, Al-Zamzami MM: Vesikoureteral reflux in patients with double pigtail stents. *J Urol* 146 (1991) 966
- ²¹ Martov AG, Zenkov SS, Chepurov AK, Mazo EB, Pokrovskii SK: The hazards and complications of internal drainage of the upper urinary tract. *Urol Nefrol Mosk* 1 (1995) 29
- ²² El-Deen ME, Khalaf I, Rahim FA: Effect of internal ureteral stenting of normal ureter on the upper urinary tract. *J Endourol* 7(5) (1993) 399
- ²³ Burgos Revilla FJ, Saez Garrido JC, Vallejo Herrador J, Lovaco Castellano F, del Hoyo Campos J: Hydrodynamic behavior of endourologic catheters. *Arch Esp Urol* 48(6) (1995) 627
- ²⁴ Witjes JA: Breakage of a silicone double pigtail ureteral stent as a long-term complication. *J Urol* 150 (1993) 1898
- ²⁵ Rembrink K, Goepel M, Meyer-Schwickerath M: The forgotten double J stent. Case report of a multifractured ureter stent. *Urol Int* 49(2) (1992) 119
- ²⁶ el Khader K, Koutani A, Tazi K, Iben Attya A, Hachimi M, Lakrissa A: Internal drainage by double J ureteral stents. 91 cases. *Ann Urol (Paris)* 30(5) (1996) 235
- ²⁷ Smedley FH, Rimmer J, Taube M, Edwards L: 168 double J (pigtail) ureteric catheter insertions: a retrospective review. *Ann R Coll Surg Engl* Nov 70(6) (1988) 377
- ²⁸ Tölle E: *Habilitationsschrift*, Münster (1982)
- ²⁹ Tunney MM, Keane PF, Gorman SP: Assessment of urinary tract biomaterial encrustation using a Modified Robbins Device continuous flow model. *J. Biomedical Materials Research* 38(2) (1997) 87
- ³⁰ Keane PF, Bonner MC, Johnston SR, Zafar A, Gorman SP: Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo. *Br J Urol*. 73 (1994) 687
- ³¹ Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A: Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 51 (1998) 221
- ³² Schlick RW, Planz K: Potentially useful materials for biodegradable ureteric stents. *Br J Urol*. 80 (1997) 908

-
- ³³ Kemppainen E, Talja M, Riihelä M, Pohjonen T, Törmälä P, Alfthan O: A bioresorbable urethral stent. *Urol Res* 21 (1993) 235
- ³⁴ Pétas A, Kärkkäinen P, Talja M, Taari K, Laato M, Välimaa T, Törmälä P: Effects of biodegradable self-reinforced polyglycolic acid, poly-DL-lactid acid and stainless-steel spiral stents on uroepithelium after Nd:YAG laser irradiation of the canine prostate. *Br J Urol* 80 (1997) 903
- ³⁵ Atala A, Vacanti JP, Peters CA, Mandell J, Retik AB, Freeman MR: Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol* 148 (1992) 658
- ³⁶ Michaeli W, Knothe J, Pfannschmidt O, Seibt S: Modifikation von Bauteil- und Verarbeitungseigenschaften von Kunststoffen durch feste und gasförmige Zuschlagstoffe. *GAK* 7 (1996) 568
- ³⁷ Ritter C: unveröffentlichte Diplomarbeit am Institut für Kunststoffverarbeitung (IKV) in Industrie und Handwerk der RWTH Aachen (1997)
- ³⁸ Shi MK, Christoud J, Holl Y, Clouet F: *Pure Appl Chem* A 30 (1993) 219
- ³⁹ Roos A: Kovalente Immobilisierung von Urokinase an oberflächenfunktionalisiertes Poly (D,L-lactid) für den Einsatz als bioresorbierbarer Intrakoronarstent. Unveröffentlichte Diplomarbeit am Institut für Textilchemie und Makromolekulare Chemie an der RWTH Aachen (1998)
- ⁴⁰ Produktinformation der Firma Boehringer, Ingelheim, Deutschland
- ⁴¹ Netuschil L: Vitalfluoreszenzfärbung mit FDA/EB in der Zellkulturtechnik. *Zahnärztl Implantol IV* (1988) 246
- ⁴² Hayashi T: Biodegradable polymers for biomedical uses. *Prog Polym Sci* 19 (1994) 663
- ⁴³ Giardino R, Fini M, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, Rocca M: Polylactide bioabsorbable polymers for guided tissue regeneration. *J Trauma* 47(2) (1999) 303
- ⁴⁴ Lin FH, Chen TM, Lin CP, Lee CJ: The merit of sintered PDLA/TCP composites in management of bone fracture internal fixation. *Artif Organs* 23(2) (1999) 186
- ⁴⁵ Tams J, Joziassé CA, Bos RR, Rozema FR, Grijpma DW, Pennings AJ: High-impact poly(L/D-lactide) for fracture fixation: in vitro degradation and animal pilot study. *Biomaterials* 16(18) (1995) 1409
- ⁴⁶ Stahelin AC, Weiler A, Rufenacht H, Hoffmann R, Geissmann A, Feinstein R: Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: a report of six cases. *Arthroscopy* 13(2) (1997) 238
- ⁴⁷ Majola A, Vainionpää S, Vihtonen K, Mero M, Vasenius J, Tormala P, Rokkanen P: Absorption, biocompatibility, and fixation properties of polylactic acid in bone tissue: an experimental study in rats. *Clin Orthop* 268 (1991) 260

-
- ⁴⁸ Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, McLaughlin BJ: Ocular Cell Monolayers Cultured on Biodegradable Substrates. *Tissue Eng* (3) (1999) 187
- ⁴⁹ Giordano GG, Thomson RC, Ishaug SL, Mikos AG, Cumber S, Garcia CA, Lahiri-Munir D: Retinal pigment epithelium cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 34(1) (1997) 87
- ⁵⁰ Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R: Hepatocyte culture on biodegradable polymeric substrates. *Biotechnol Bioeng* 38 (1991) 145
- ⁵¹ Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R: Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 25 (1991) 11
- ⁵² Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vacanti MP, Mooney D, Schloo B, Vacanti JP: Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 25 (1993) 1019
- ⁵³ Holm-Nielsen A, Shulz A, Möller-Pedersen V: Direct vision internal urethrotomy: a critical review of 365 operations. *Br J Urol* 56 (1991) 308
- ⁵⁴ Pitkämäki KK, Tammela TLJ, Kontturi MJ: Recurrence of urethral stricture and late results after optical urethrotomy: comparison of strictures caused by toxic latex catheters and other causes. *Scand J Urol Nephrol* 26 (1992) 327
- ⁵⁵ Ashken MH, Coulange C, Milroy E, Sarramon J: European experiences with the urethral Wallstent for urethral strictures. *Eur Urol* 19 (1991) 181
- ⁵⁶ Milroy E, Cooper J, Wallsten H, Chapple R, Eldin A, Seddon A: A new treatment for urethral strictures. *Lancet* I (1988) 1424
- ⁵⁷ Goepel M, Senge A, Otto T, Ruebben H: Long-term results of wall stent implantation in benign prostatic hyperplasia and high risk status. *Urologe A* 36(2) (1997) 151
- ⁵⁸ Isotalo T, Tammela TL, Talja M, Valimaa T, Tormala P: A bioabsorbable self-expandable, self-reinforced poly-L-lactic acid urethral stent for recurrent urethral strictures: a preliminary report. *J Urol* 160(6 Pt 1) (1998) 2033
- ⁵⁹ Isotalo T, Talja M, Tammela TL, Tormala P, Paasimaa S, Andersson L: Cytotoxicity testing of a new caprolactone-coated self-expanding bioabsorbable self-reinforced poly-L-lactic acid urethral stent. *Urol Res* 27(2) (1999) 149
- ⁶⁰ Isotalo T, Halasz A, Talja M, Tammela TL, Paasimaa S, Tormala P: Tissue biocompatibility of a new caprolactone-coated self-reinforced self-expandable poly-L-lactic acid bioabsorbable urethral stent. *J Endourol* 13(7) (1999) 525
- ⁶¹ Kurt Ruffieux: Degradables Osteosynthesesystem aus Polylactid für die maxillofaciale Chirurgie. Ein Beitrag zur Werkstoff- und Prozessentwicklung. Dissertation, ETH Zürich (1997)

-
- ⁶² Lu L, García CA, Mikos AG: In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co- glycolic acid) films *J Biomed Mater Res* 46(2) (1999) 236
- ⁶³ Park TG: Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials*. 16(15) (1995) 1123
- ⁶⁴ Zhang L, Chu CC, Loh IH: Effect of a combined gamma irradiation and Parylene plasma treatment on the hydrolytic degradation of synthetic biodegradable sutures. *J Biomed Mater Res* 27(11) (1993) 1425
- ⁶⁵ Montanari L, Costantini M, Signoretti EC, Valvo L, Santucci M, Bartolomei M, Fattibene P, Onori S, Faucitano A, Conti B, Genta I: Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-Glycolide) microspheres. *J Controlled Release* 4 56(1-3) (1998) 219
- ⁶⁶ Sebert P, Andrianoff N, Rollet, M: Effect of gamma irradiation on hydroxypropyl-methylcellulose powders: consequences on physical, rheological and pharmacotechnical properties. *Int J Pharm* 99 (1993) 37
- ⁶⁷ Ries MD, Weaver K, Rose RM, Gunther J, Sauer W, Beals N: Fatigue strength of polyethylene after sterilization by gamma irradiation or ethylene oxide. *Clin Orthop* 333 (1996) 87
- ⁶⁸ Masson V, Maurin F, Fessi H, Devissaguet JP: Influence of sterilization processes on poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. 18(4) (1997) 327
- ⁶⁹ Alleman E, Gurny R, Doelker E: Drug loaded nanoparticles. Preparation, methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* 39(5) (1993) 173
- ⁷⁰ Alleman E, Leroux J, Gurny R, Doelker E: in vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles, produced by a salting out procedure. *Pharm Res*, 10(12) (1993) 1732
- ⁷¹ Böstmann OM: Absorbable implants for the fixation of fractures. *J Bone Joint Surg* 73 (1991) 148
- ⁷² Joo CK, Kim JH: Compatibility of intraocular lenses with blood and connective tissue cells measured by cellular deposition and inflammatory response in vitro. *J Cataract Refract Surg* 18(3) (1992) 240
- ⁷³ Smetana K Jr, Sulc J, Krcova Z, Pitrova S: Intraocular biocompatibility of hydroxyethyl methacrylate and methacrylic acid copolymer/partially hydrolyzed poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mater Res* 21(10) (1987) 1247
- ⁷⁴ Humphry RC, Ball SP, Brammall JE, Conn SJ, Rich WJ: Lens epithelial cells adhere less to HEMA than to PMMA intraocular lenses. *Eye* 5 (Pt 1) (1991) 66
- ⁷⁵ Cunanan CM, Tarboux NM, Knight PM: Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion. *J Cataract Refract Surg* 17(6) (1991) 767

⁷⁶ Isotalo T, Alarakkola E, Talja M, Tammela LJ, Välimaa T, Törmälä P: Biocompatibility Testing of a new bioabsorbable X-Ray positive SR-PLA 96/4 urethral stent. J Urol 162 (1999) 1764

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Gerhard Jakse für die freundliche Überlassung des Themas.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern Dr. med. dent. Fritz Hölzl und Dr. med. dent. Brigitte Hölzl meine Dankbarkeit für die vielfältige und unermüdliche Unterstützung während des Studiums und der Erstellung dieser Dissertation aussprechen.

In besonderem Umfang gebührt mein Dank Herrn Dr. med. Andreas Brauers, der mich bei der Fertigung dieser Arbeit mit größtem Engagement und hervorragender fachlicher und wissenschaftlicher Kompetenz betreut hat und darüber hinaus auch einflußreiche Vertrauensperson bei der Planung meiner klinischen und wissenschaftlichen Weiterentwicklung war und ist.

Weiter danke ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. vet. Werner Küpper und den Mitarbeitern seiner Abteilung für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche. Hier gilt mein Dank insbesondere Frau Nina Wrede und Frau Petra Bongers, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Frau Dr. med. Edith Manegold für die freundliche Unterstützung bei den histopathologischen Untersuchungen und bei Herrn Oliver Pfannschmidt und Herrn Andreas Roos für die Beratung in materialkundlichen Fragen, sowie bei Frau Alexandra Förster für ihre Arbeiten im Rahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen.

Mein großer Dank gilt auch meiner Großmutter Frau Marga Amian, die diese Arbeit mehrfach akribisch auf inhaltliche Ungereimtheiten und stilistische und orthographische Fehler geprüft hat.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Friedrich Hölzl
Geburtsdatum: 16.11.1972
Geburtsort: Göttingen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Konfession: katholisch
Vater: Dr. med. dent. Fritz Hölzl
Mutter: Dr. med. dent. Brigitte Hölzl, geb. Amian
Geschwister: Christian Hölzl (Zahnarzt)
Sebastian Hölzl (Jurastudent)

Schulbildung:

8/1979-6/1983 Gemeinschaftsgrundschule Süchteln
8/1983-7/1991 Humanistisches Gymnasium Viersen (1991 aufgelöst)
7/1991-6/1992 Städtisches Gymnasium Alt-Viersen (Abitur)

Bundeswehr:

01.10.92- 31.12.92 Grundausbildung zum Fernschreiber bei der Luftwaffe
11. Kompanie Luftwaffenausbildungsregiment 3 in Roth
01.01.93-30.09.93 Fernschreiber im Fernmeldesektor 113 Fernmelderegiment 11 in Kalkar

Studium:

1993-1997 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1997-2000 RWTH-Aachen

04. September 1996 Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf
28. August 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf
13. September 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Aachen
13. November 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Aachen

Praktisches Jahr:

25.10.99-11.02.00 Urologische Klinik der RWTH Aachen
(Prof. Dr. med. G. Jakse)
14.02.00-04.06.00 Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik der RWTH-Aachen
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. V. Schumpelick)
05.06.00-11.08.00 Medizinische Klinik III der RWTH Aachen
(Prof. Dr. med. Dipl.-Biochem. S. Matern)

Seit Januar 2001 Beschäftigung als Arzt im Praktikum in der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der RWTH-Aachen (Prof. Dr. med. Dr. h.c. V. Schumpelick).

Mündliche Dissertationsprüfung am 28. Mai 2001