
Untersuchung von Abbauprozessen an bioresorbierbaren Implantatmaterialien

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Kelim Vano Herrera
M. Sc., Licenciado en Química

geboren am 01.07.1974 in Valencia, Venezuela

2015

Referentin: Prof. Dr. Carla Vogt

Korreferentin: Prof. Dr. Regine Willumeit-Römer

Tag der Promotion: 21.10.2015

***„Wer den Hafen nicht kennt, in den er segeln will,
für den ist kein Wind der richtige“***

Lucius Annaeus Seneca (4 v. Chr. – 65 n. Chr.)

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Analytische Chemie am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. Der Inhalt dieser Dissertation wurde während eines von mir geleiteten und über drei Jahre dauernden Forschungsprojekts erarbeitet, welches von Medizinprodukten-Herstellern beauftragt und zusätzlich durch die Kooperation unterschiedlicher Institute ermöglicht wurde.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt Frau PROF. DR. CARLA VOGT für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas, für die kontinuierliche Betreuung und Unterstützung, für die kritischen Anmerkungen und Fachdiskussionen sowie für die Geduld, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Frau PROF. DR. REGINE WILLUMEIT-RÖMER danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ferner möchte ich mich bei Herrn PROF. DR. PETER BEHRENS für sein Engagement als Vorsitzender der Promotionskommission bedanken.

Bei einer der beteiligten Firmen bedanke ich mich für Bereitstellung der Proben zur Untersuchung des Abbauprozesses von Poly(L-lactid) auf beschichteten Metallstents.

Zudem danke ich Herrn MICHAEL STEKKER von der Firma MeKo Laserstrahl-Materialbearbeitungen e. K. für Bereitstellung der Proben zur Vergleichsstudie medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau DR. ANNA MISIUN für unsere anregenden Diskussionen über Polymerwerkstoffe, für die konstruktive Kritik und Verbesserungsvorschläge, sowie für die wertvolle Motivation vor allem in der letzten Phase der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn DR. JÜRGEN VOGT von der Abteilung Nukleare Festkörperphysik des Instituts für Experimentelle Physik II der Universität Leipzig für die freundliche Durchführung der PIXE/RBS-Messungen an der Hochenergie-Ionen-Nanosonde LIPSION.

Für die Unterstützung bei den DSC-Messungen bedanke ich mich bei Frau DR. ANNA MISIUN und Herrn KEVIN KRAUSE von der Abteilung Elastomerchemie des Deutschen Instituts für Kautschuktechnologie e. V. (DIK).

Herrn GEORG PLATZ und Herrn DR. MARC D. K. KIEKE danke ich für die Hilfsbereitschaft bei den XRD-Messungen. Ebenso bin ich Frau CLAUDIA SCHULZE dankbar für die Hilfsbereitschaft bei den Messungen an dem Elementaranalysator.

Großer Dank gebührt Herrn TAREK MOHAMED und Frau GILA MILLAN-DINGLER für die sorgfältige sprachliche Korrektur des Manuskriptes und viele hilfreiche Bemerkungen. Eure Hilfe war von unschätzbarem Wert.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises ANALYTIK bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre und die freundliche Zusammenarbeit.

También quiero agradecer enormemente a la señora NUBIA STELLA KITTEL, por tu apoyo y amistad incondicional, por estar siempre allí. Muchísimas gracias Stelilla por esos sabios consejos en el momento preciso.

A mis hermanos: SHEILA, TAIRO y GEIRA. Y especialmente a mis padres: WEITECH y NANCY, quienes a pesar de la distancia no dejan de brindarme su confianza y apoyo incondicional en éste y cada uno de mis proyectos. Todos ustedes me inspiran a ser mejor cada día y me dan la fuerza necesaria para afrontar la vida con alegría y para emprender nuevos retos con optimismo. Estoy infinitamente agradecido de tenerlos. ¡Los quiero un montón!

Por otra parte, quiero agradecer también a todas aquellas personas que, aún en la distancia, me brindaron su apoyo a través de palabras de aliento, oraciones o consejos. ¡A todos ustedes muchísimas gracias!

Alle, die bisher nicht namentlich genannt wurden, können sicher sein, dass auch ihnen meine aufrichtige Dankbarkeit gilt.

Hannover, im Mai 2015

Kelim Vano Herrera

Kurzfassung

Bioresorbierbare Materialien sind derzeit, aufgrund ihrer Abbaubarkeit, für die Medizintechnik von großem Interesse, insbesondere Materialien, die potenziell das gewünschte Anforderungsprofil optimal erfüllen können und sich damit für den Einsatz als Implantatwerkstoff qualifizieren. Bei der Untersuchung des Abbauverhaltens von Implantatmaterialien werden in erster Linie *in vitro* Experimente durchgeführt. Anschließend folgt eine Phase, in der das untersuchte Material im Tiermodell getestet wird. Hierfür sind geeignete und leistungsfähige, analytische Methoden bzw. Strategien erforderlich, mit denen die am Ende gewonnenen histologischen Präparate selektiv untersucht werden können.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung und Anwendung einer neuen analytischen Methode zur Untersuchung des zeitabhängigen Abbaus von Poly(L-lactid) auf beschichteten permanenten Metallstents, die im Tiermodell eingesetzt worden waren. Des Weiteren wurden Mg-SEE-Stent-Systeme (unbeschichtet und medikamentenbeschichtet) hinsichtlich ihrer Wirkung auf das umliegende Arterien Gewebe sowie die Auswirkung der Freisetzung zweier Wirkstoffe (Paclitaxel bzw. Sirolimus) eines medikamentenfreisetzenden Stents (DES) auf die zelluläre Proliferation mit einer Alternative, zu der heute klassische Färbemethode, miteinander verglichen.

Dafür wurden histologische Präparate untersucht, die mit Hilfe unterschiedlicher kardiovaskulärer Stent-Systeme (unbeschichtete, passiv beschichtete und -aktiv-medikamentenbeschichtete Metallstents) in Schweinearterien implantiert worden waren.

Die Untersuchung umfasste zwei Aspekte. Zuerst musste eine neue analytische Methode unter Einsatz der Mikro-Raman-Spektroskopie entwickelt werden, um den zeitabhängigen Abbau von Poly(L-lactid) auf beschichteten permanenten Metallstents quantitativ charakterisieren zu können.

In einem zweiten Schritt wurde Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission (μ -PIXE) als alternative Methode für den Vergleich dreier bioresorbierbarer Metallstent-Systeme auf Mg-SEE-Basis, mit und ohne Medikamentenbeschichtung, eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit

induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-QMS) als zusätzliche Methode angewendet, um die aus den biodegradierbaren Mg-SEE-Stent-Systemen degradierten Spurengehalte an Neodym in der Umgebung des Implantats nachzuweisen und zu quantifizieren.

Die mit Mikro-Raman-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die entwickelte analytische Methode einerseits für die quantitative Charakterisierung von biologisch abbaubaren Poly(*L*-lactid) und andererseits für den Nachweis, dass der Abbau von Poly(*L*-lactid) durch eine hydrolytische Degradation über den Bulkerosionsmechanismus erfolgt, geeignet war.

Die röntgenemissionsspektroskopische Bewertung der Auswirkung medikamentenfreisetzungender Stent-Systeme lieferte vergleichbare Ergebnisse wie die klassische histologische Färbemethode mit lichtmikroskopischer Detektion. Die Anwendung von Paclitaxel oder Sirolimus in einem medikamentenfreisetzenden Stent-System inhibierte die neointimale Hyperplasie und führte zu einer Abnahme der In-Stent-Stenose (ISS). Darüber hinaus wurde auch bestätigt, dass sich eine inhomogene Calciumphosphat-Phase um den Stent herum gebildet hat. Die Anwendung von LA-ICP-MS bewies, dass vier Wochen nach der Implantation des biodegradierbaren Mg-SEE-Stents der Gehalt an Neodym in dem umgebenden Arterienewebe unter $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ lag.

Schlagwörter: Implantatmaterialien, Abbaubarkeit, Stent, BMS, DES, Poly(*L*-lactid), Paclitaxel, Sirolimus, In-Stent-Stenose

Abstract

Bio-absorbable materials are currently of great interest to medical technology due to their degradability, especially materials which have the potentials to meet optimally with the desired profile of requirements, and thus qualify for use as implant material. Firstly, *in vitro* experiments are carried out in order to investigate the degradation behavior of implant materials. Subsequently, the examined material is then tested in animal models. For this purpose, appropriate and powerful analytic methods and strategies are required in order to selectively investigate the histological samples obtained.

The aim of this doctoral thesis was the development and application of a new analytical method to study the time-dependent degradation of poly (*L*-lactide) coated on permanent metal stents that had been tested in animal experiments. Furthermore, Mg-REE-stent systems (uncoated and drug-coated) were compared with one another with respect to their effects on the surrounding arterial tissue and their effects on the release of two drugs (Paclitaxel and Sirolimus) of a drug-eluting stents (DES) on cellular proliferation with an alternative to today classical staining method.

For this purpose, histological samples that had been implanted in the arteries of pigs with the help of various cardiovascular stent systems (uncoated, coated passive and drug-coated metal stents) were examined.

Two aspects were involved in this study. Firstly, a new analytical method using micro-Raman spectroscopy had to be developed in order to quantitatively characterize the time-dependent degradation of poly (*L*-lactide) on permanent coated metal stents.

Secondly, micro-particle induced X-ray emission was used as an alternative method for the comparison of three metal bioresorbable stent systems based on Mg-REE-Alloy, with and without drug coating. Furthermore, laser ablation inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry (LA-ICP-QMS) was used as an additional method to detect and quantify the released neodymium traces from the biodegradable Mg-REE-stent systems around the implant.

The results obtained from the micro-Raman spectroscopy showed that the developed analytical method was suitable for both the quantitative characterization of biodegradable poly (*L*-lactide) and for the verification of the fact that the degradation of poly (*L*-lactide) through hydrolytic degradation occurs through bulk erosion mechanism.

X-ray emission spectroscopic evaluation of the impact of drug-eluting stent systems yielded comparable results as the classical histological staining methods with light microscopic detection. The use of Paclitaxel or Sirolimus in a drug-eluting stent system inhibited the neointimal hyperplasia and led to a decrease in the in-stent stenosis (ISS). In addition, it was also confirmed that an inhomogeneous calcium phosphate phase had been formed around the stent. The use of LA-ICP-MS revealed that the content of neodymium in the surrounding arterial tissue after four weeks of biodegradable Mg-REE-stent implantation was less than $3.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Keywords: implant materials, degradability, Stent, BMS, DES, poly (*L*-lactide), Paclitaxel, Sirolimus, In-stent-stenosis

Resumen

En la actualidad los materiales biorreabsorbibles son de gran interés para la tecnología médica debido a su degradabilidad. Estos materiales podrían cumplir de manera óptima con el perfil de los requisitos deseados y de esta manera calificar para su uso como material de implantes. En el estudio del comportamiento de la degradación de los materiales de implante se llevan a cabo en primer lugar experimentos *in vitro*. Posteriormente, el material estudiado se prueba en modelos con animales, para lo cual se necesitan métodos y estrategias analíticas, adecuadas y potentes, que permitan que las placas obtenidas de las preparaciones histológicas, de los estudios en animales, se puedan estudiar de forma selectiva.

El objetivo de esta tesis doctoral fue el desarrollo y la aplicación de un nuevo método analítico para estudiar la degradación, en función del tiempo, del ácido poli (*L*-láctico) sobre estents metálicos permanentes revestidos que habían sido utilizados en un modelo animal. También se compararon sistemas de estents basados en una aleación de Magnesio-Tierras Raras (sin recubrir y recubiertos con fármacos) con respecto a su efecto sobre el tejido arterial circundante, y el efecto de la liberación de dos fármacos (Paclitaxel y Sirolimus), de estents liberadores de fármacos (DES), sobre la proliferación celular.

Para alcanzar los objetivos propuestos, se investigaron las preparaciones histológicas en las que habían sido implantados diversos sistemas de estents cardiovascular (estents metálicos sin revestir, con revestimiento pasivo y con revestimiento farmacoactivo) en arterias porcinas.

El estudio incluyó dos aspectos. En primer lugar, se desarrolló un nuevo método analítico utilizando la espectroscopía micro-Raman con el fin de caracterizar cuantitativamente la degradación, en función del tiempo, del ácido poli (*L*-láctico) sobre estents metálicos permanentes revestidos.

Posteriormente, se utilizó micro-emisión de rayos X inducida por partículas (μ -PIXE), como un método alternativo al método clásico de tinción, para la comparación de tres sistemas de estents biodegradables basados en una aleación de Magnesio-Tierras Raras, con y sin recubrimiento farmacoactivo. Adicionalmente, se utilizó ablación con láser acoplado con espectrometría de masas de tipo

cuadrupolo con plasma acoplado inductivamente (LA-ICP-QMS) como método adicional para detectar y cuantificar en los alrededores del implante las trazas del neodimio degradado de los sistemas de estents de metal biodegradable.

Los resultados obtenidos con espectroscopía micro-Raman mostraron que el método analítico desarrollado era adecuado, por una parte, para la caracterización cuantitativa del ácido poli (*L*-láctico) biodegradable y, por otra parte, para demostrar que la degradación del ácido poli (*L*-láctico) ocurrió por medio de una degradación hidrolítica a través del mecanismo de erosión en masas.

La evaluación del impacto de los sistemas de estents liberadores de fármacos por medio de la espectroscopía de emisión de rayos X dio resultados comparables con el método clásico de microscopía óptica con tinción. El uso de Paclitaxel o Sirolimus en un sistema de estent liberador de fármaco inhibió la hiperplasia neointimal y condujo a una disminución de la estenosis intrastent (ISS). Además, se confirmó también que una fase de fosfato de calcio no homogénea se formó alrededor del estent. El uso de LA-ICP-MS mostró que cuatro semanas después de la implantación de los estents basados en la aleación de Magnesio-Tierras Raras, el contenido de neodimio en los tejidos circundantes fue de menos de $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Palabras clave: material de implantes, degradabilidad, estent, BMS, DES, ácido poli (*L*-láctico), Paclitaxel, Sirolimus, estenosis intrastent

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	v
Kurzfassung	vii
Abstract	ix
Resumen	xi
Inhaltsverzeichnis	xiii
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Bioresorbierbare Implantatmaterialien	5
2.1 Einleitung.....	5
2.2 Bioresorbierbare Polymere	7
2.2.1 Polylactid	7
2.2.2 Polylactid-co-Glycolid	8
2.2.3 Abbaumechanismus	9
2.3 Bioresorbierbare Metalle	10
2.3.1 Magnesium und Mg-Legierungen	12
2.3.2 Abbaumechanismus	13
3 Stents als kardiovaskuläre Implantate	15
3.1 Einleitung.....	15
3.2 Koronarstenttypen	17

3.3 Restenose nach Stent-Implantation	23
3.4 Anforderungen an koronare Stents.....	26
4 Analyseverfahren zur Untersuchung des Abbauverhaltens von Implantatmaterialien.....	27
4.1 Einleitung.....	27
4.2 Charakterisierung von Implantatwerkstoffen vor der Testung.....	29
4.2.1 Mikro-Röntgenfluoreszenzanalyse (μ -RFA)	29
4.2.1.1 Das Prinzip	29
4.2.1.2 Durchführung	30
4.2.2 Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)	30
4.2.2.1 Das Prinzip	30
4.2.2.2 Durchführung	31
4.2.3 Röntgenbeugung (XRD).....	32
4.2.3.1 Das Prinzip	32
4.2.3.2 Durchführung	32
4.2.4 Dynamische Differenzialkalorimetrie (DSC).....	33
4.2.4.1 Das Prinzip	33
4.2.4.2 Durchführung	34
4.2.5 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)	34
4.2.5.1 Das Prinzip	34
4.2.5.2 Durchführung	35
4.3 Charakterisierung des biologischen Abbaus eines Implantatwerkstoffes nach der Testung.....	35
4.3.1 Mikro-Raman-Spektroskopie (μ -RS)	36
4.3.1.1 Das Prinzip	36

4.3.1.2 Durchführung	38
4.3.2 Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission (μ -PIXE)	39
4.3.2.1 Das Prinzip	39
4.3.2.2 Durchführung	40
4.3.3 Lichtmikroskopie (LM)	41
4.3.3.1 Das Prinzip	41
4.3.3.2 Durchführung	41
4.3.4 Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-QMS)	42
4.3.4.1 Das Prinzip	42
4.3.4.2 Durchführung	42
4.4 Weitere Charakterisierung	46
4.4.1 Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes mittels Verbrennungsanalyse (VA)	47
4.4.1.1 Das Prinzip	47
4.4.1.2 Durchführung	47
4.4.2 Bestimmung des tatsächlichen Elementgehaltes der Neodym-Arbeitsreferenzen- materialien mittels ICP-OES	48
5 Untersuchung des zeitabhängigen Abbaus von Poly(L-lactid) auf beschichteten Metallstents ...	51
5.1 Untersuchte Proben	51
5.2 Charakterisierung der Stent-Komponenten und des Einbettungsmaterials	53
5.2.1 Zusammensetzung der Legierung	53
5.2.2 Polymere Bestandteile	55
5.2.2.1 Kristallinität	55
5.2.2.2 Thermische Eigenschaften	56
5.2.2.3 Charakteristische Raman-Spektren	57

5.3 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchung des Abbauprozesses einer Poly(L-lactid)-Beschichtung eines metallischen koronaren Stents	60
5.3.1 Optimierung der experimentellen Randbedingungen für die Raman-spektroskopische Untersuchungen von PLA in einer PMMA-Matrix.....	60
5.3.1.1 Auswahl der Anregungswellenlänge	61
5.3.1.2 Auswahl der Laserleistung.....	62
5.3.1.3 Auswahl der spektralen Auflösung.....	64
5.3.2 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Polylactid-Beschichtung eines metallischen koronaren Stents	66
5.3.2.1 Auswahl der Herstellungsverfahren für polymere Mischsysteme	67
5.3.2.2 Einfluss der Molmasse und Kristallinität von PLA auf die Raman-Intensität	68
5.3.2.3 Herstellung der als Arbeitsreferenzmaterialien verwendeten PLA/PMMA-Polymerblends.....	74
5.3.2.4 Thermische Charakterisierung der Arbeitsreferenzmaterialien	75
5.3.2.5 Quantifizierungsstrategie	77
5.3.2.6 Kalibrationsmodell.....	79
5.3.2.7 Nachweis- und Bestimmungsgrenze	84
5.3.2.8 Richtigkeit und Präzision	84
5.3.2.9 Anwendungsbeispiel	86
5.3.3 Untersuchung zum Degradationsverhalten von Poly(L-lactid)	87
5.3.3.1 Bestimmung des PLA-Gehaltes eines mit Poly(L-lactid) beschichteten metallischen koronaren Stents.....	88
5.3.3.2 Degradationsgrad und Abbauverhalten von Poly(L-lactid)	93
6 Vergleichsstudie medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme.....	95
6.1 Untersuchte Proben.....	96
6.2 Charakterisierung der Komponenten und der Mg-SEE-Stent-Systeme.....	98

6.2.1 Metallische Bestandteile	99
6.2.2 Organische Bestandteile.....	100
6.2.2.1 Schwingungsspektroskopische Charakterisierung.....	100
6.2.2.2 Thermische Eigenschaften von PLGA als Arzneistoffträger	103
6.2.3 Medikamentenfreisetzende Mg-SEE-Stent-Systeme	104
6.3 Mikro-röntgenemissionsspektroskopische Untersuchung medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme	107
6.3.1 Qualitativer Vergleich medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme	107
6.3.2 Quantifizierung von S, Ca, P, Dy, Nd, Zn und Zr.....	120
6.3.2.1 Biominalisierte Region.....	120
6.3.2.2 Gebewebereich	122
6.3.3 Histomorphometrische Analyse der Neointima-Dicke mittels μ -PIXE	125
6.4 Festkörperspektrometrische Untersuchung von Neodym-Spuren in Koronararterien nach einer Mg-SEE-Stent-Implantation mittels ns-LA-ICP-QMS.....	129
6.4.1 Charakterisierung der Neodym-haltigen Festkörper-Arbeitsreferenzmaterialien mittels ICP-OES.....	131
6.4.2 Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes mittels Verbrennungsanalyse (VA)	131
6.4.3 Bestimmung des Neodymgehalts in den Koronararterien mittels ns-LA-ICP-QMS.....	132
7 Zusammenfassung und Ausblick	135
A Anhang.....	139
A.1 Bestimmungen mit CCD-ICP-Emissionspektrometers	140
A.2 Bestimmung des PLA-Gehaltes eines mit Poly(L-lactid) beschichteten metallischen koronaren Stents mittel μ -RS	141
A.3 Identifizierung von entstandenene Ca-/ P-Verbindungen bei der pathologische Kalzifizierung des Stent-Streben.....	145

A.4 Histomorphometrische Analyse vier Wochen nach Implantation eines Mg-SEE-Stent-Systems am Hausschwein	146
A.5 Charakterisierung der Feststoff-Arbeitsreferenzmaterialien auf Acrylatbasis zur Bestimmung der Neodym-Konzentrationen in Koronararterien	147
B Symbole und Abkürzungen.....	149
C Medizinische Fachbegriffe	155
Literaturverzeichnung.....	159
Publikationen und Konferenzbeiträge	175
Lebenslauf	177

Einleitung und Zielsetzung

Laut Statistischem Bundesamt ^[1-3] war die häufigste Todesursache in den letzten drei Jahren in Deutschland eine Erkrankung des Kreislaufsystems. Eine chronische ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz bilden hierbei die Ursache für nahezu 40 % aller Todesfälle. Diese Bilanz führt zu größerer Sensibilität in allen großen Gebieten der Kardiologie und motiviert Mediziner und Forscher, das aktuelle diagnostische Verfahren und die Therapie zu verbessern sowie neue Behandlungsmethoden zu entwickeln. Neben einer medikamentösen Therapie stellt die operative Behandlung wie z. B. eine Implantatbasierte Therapie einen wichtigen Teil der medizinischen Behandlung der unter Herz-Kreislauf-Erkrankungen leidenden Patienten dar. Die Erfolge in der interventionellen Therapie sind maßgeblich dem Einsatz von koronaren Endoprothesen zu verdanken. ^[4]

Eine führende Technik zur Therapie koronarer Herzerkrankungen ist die vaskuläre Stent-Implantation. Sie gehört zu den wichtigsten perkutanen Revaskularisationsverfahren zur Behandlung von Verengungen der Koronargefäße und von Verschlüssen. ^[4,5]

Darüber hinaus wurde die kontinuierliche Verbesserung der Interventionsergebnisse durch die Modifizierung der Implantationstechnik sowie durch eine

stetige Materialoptimierung erzielt ^[4]. Derzeit wird für die Herstellung von Implantaten eine Vielzahl von Materialien verwendet, sowohl natürliche als auch synthetische. Dabei werden alle Werkstoffhauptgruppen wie Metalle, Keramiken, Polymere und Komposite berücksichtigt. Allerdings gewinnt in den letzten Jahren die Entwicklung neuartiger, resorbierbarer Biomaterialien immer mehr an Bedeutung. ^[6-11] Bioresorbierbare Materialien werden auch bei der Herstellung von Trägersystemen für eine Deposition und kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen sowie in der vaskulären Chirurgie für Stents eingesetzt ^[9,12-17]. Der große Vorteil biodegradierbarer Materialien ist, dass sie sich im Körper nach der Erfüllung ihrer Funktion völlig auflösen können ^[18].

Die Anwendung bioresorbierbarer Stents hat den Vorteil, chronische Fremdkörperreaktion und das Risiko einer späten Stent-Thrombose sowie eine sekundäre Gefäßoperation im ehemals gestenteten Bereich zu vermeiden ^[14,16,17]. Darüber hinaus spielen diese bioresorbierbaren Implantate in der Kinderkardiologie eine erhebliche Rolle, weil sie den Wachstumsprozess der pädiatrischen Patienten ermöglichen und eventuell keine chirurgische Entfernung benötigt wird ^[14].

Das Abbauverhalten eines bioresorbierbaren Materials ist als eine der wichtigsten Eigenschaften zu berücksichtigen. Wünschenswert dabei ist, dass das Material kontinuierlich abgebaut und im Weiteren durch das umgebende Empfängergewebe ersetzt wird. Ein unerwünschter Abbau könnte dagegen die strukturelle Integrität des Materials beeinträchtigen oder zu einer Freisetzung von Metallionen oder Abbauprodukten und Verunreinigungen führen, die eine nachteilige Auswirkung auf das Empfängergewebe wie entzündliche oder allergische Reaktionen oder toxische Wirkungen hervorrufen können. ^[19] In beiden Fällen ist die Untersuchung von Abbauprozessen an bioresorbierbaren Materialien von größter Bedeutung, damit ein Material sich für den Einsatz als Implantatwerkstoff, der nach der optimalen Erfüllung der mechanischen und biologischen Anforderungsprofile mit einer kontrollierten Geschwindigkeit in nicht toxische Produkte über natürliche Wege *in vivo* abgebaut wird, qualifizieren kann.

Die Kontrolle der Geschwindigkeit erfordert z. B. den Nachweis und die Quantifizierung entweder der beteiligten Substanzen oder der abgebauten Produkte. Da sich der Abbauprozess eines Stents im μm -Bereich abspielt, sind geeignete und leistungsfähige, analytische Methoden bzw. Strategien erforderlich, mit denen die

am Ende gewonnenen histologischen Präparate von tierexperimentellen Studien selektiv untersucht werden können.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Entwicklung und Anwendung einer neuen analytischen Methode zur Untersuchung des zeitabhängigen Abbaus von Poly(*L*-lactid) auf beschichteten permanenten Metallstents, die im Tiermodell eingesetzt worden waren. Des Weiteren sollen Mg-SEE-Stent-Systeme (unbeschichtet und medikamentenbeschichtet) hinsichtlich ihrer Wirkung auf das umliegende Arterien Gewebe sowie die Auswirkung der Freisetzung zweier Wirkstoffe (Paclitaxel bzw. Sirolimus) eines medikamentenfreisetzenden Stents (DES) auf die zelluläre Proliferation mit einer Alternative, zu der heute klassischen Färbemethode, miteinander verglichen werden.

Auf der Suche nach geeigneten Verfahren sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit unterschiedliche kardiovaskuläre Stent-Systeme - unbeschichtete, passiv beschichtete und (aktiv) medikamentenbeschichtete Metallstents - untersucht werden, die in Schweinearterien implantiert worden waren. Zu Beginn sollen die Implantatwerkstoffe bzw. die Rohkomponenten sowie die Stent-Systeme mittels verschiedener Analysenverfahren charakterisiert werden. Zur quantitativen Charakterisierung von *L*-PLA soll eine neue Methode unter Einsatz der Mikro-Raman Spektroskopie entwickelt werden, um den in der Umgebung des metallischen Implantates vorliegenden Restgehalt an *L*-PLA mit einer Ortsauflösung im unteren Mikrometerbereich identifizieren und quantifizieren zu können. Neben der Optimierung der experimentellen Randbedingungen sollen hierfür geeignete, homogene Polymere Mischungen als Referenzmaterialien hergestellt und charakterisiert werden. Zum Vergleich der Wirkung des Implantat auf das umliegende Arterien Gewebe und der Auswirkung der zellulären Proliferation zweier medikamentenfreisetzender Stent-Systeme (DES) mit antiproliferativen Wirkstoffen (Paclitaxel bzw. Sirolimus) gegenüber unbeschichtetem Metallstent (BMS) soll die Oberfläche sowie die Umgebung des Mg-SEE-Stents vier Wochen nach Implantationsdauer durch Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission (μ -PIXE) erfasst werden. Dazu soll eine histomorphometrische Analyse der Neointima-Dicke mittels der röntgenemissionsspektroskopischen Methode und der klassischen histologischen Färbemethode mit lichtmikroskopischer Detektion durchgeführt und miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollen die aus den

biodegradierbaren Mg-SEE-Stent-Systemen freigesetzten Neodym-Spuren in der Umgebung des Implantats untersucht werden.

Kurz zusammengefasst lässt sich die vorliegende Dissertation wie folgt gliedern: Der Grundlagenteil beinhaltet einen kurzen Überblick über die Klassifizierung von Biomaterialien, bioresorbierbarer metallischer Werkstoffe und Polymermaterialien sowie deren Abbaumechanismen (Kapitel 2). Danach folgt eine kurze Beschreibung der wesentlichen Aspekte, die für das Verständnis der medizinischen Anwendungen eines kardiovaskulären Stents erforderlich sind (Kapitel 3). Neben einer Beschreibung von Analyseverfahren, die zur Untersuchung und Charakterisierung von Implantatwerkstoffen eingesetzt werden können, werden die theoretische Grundlage und die Methodik der in dieser Arbeit angewendeten Techniken sowie die Beschreibung der Probenvorbereitung, Arbeitsbedingungen und Analysestrategien erörtert (Kapitel 4). Der erste Teil des Ergebnis- und Diskussionskapitels (Kapitel 5) erfasst die Entwicklung einer neuen Methode zur quantitativen Charakterisierung von biodegradierbarem Poly(L-lactid) auf einem permanenten metallischen koronaren Stent. Der Vergleich der Wirkung des Abbaus eines Mg-SEE-Stent-Systems sowie die Auswirkung der Freisetzung zweier Wirkstoffe (Paclitaxel bzw. Sirolimus) eines medikamentenfreisetzenden Stents (DES) wird im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils (Kapitel 6) vorgestellt und diskutiert. Abschließend werden die wichtigsten Punkte der hier vorgelegten Dissertation zusammengefasst und ihre Bedeutung für die Weiterentwicklung und Anwendung im Bereich der Materialforschung gewürdigt (Kapitel 7).

Bioresorbierbare Implantatmaterialien

Dieses Kapitel liefert einen umfassenden Überblick über bioresorbierbare Materialien und Werkstoffe für medizinische Anwendungen. Nach einer kurzen Beschreibung der Klassifizierung von Biomaterialien wird hier auf bioresorbierbare Polymermaterialien und metallische Werkstoffe sowie auf die Abbaumechanismen eingegangen.

2.1 Einleitung

D. F. Williams ^[20] definiert „Biomaterial“ im Jahr 2009 als *„A biomaterial is a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure, in human or veterinary medicine“*.

Für den Einsatz eines Biomaterials in einer speziellen biomedizinischen Anwendung sind folgende Eigenschaften erforderlich: Biokompatibilität, Biofunktionalität, Verarbeitbarkeit, Sterilisierbarkeit, Anpassbarkeit an den Implantationsort sowie Lagerfähigkeit ^[9]. Daher müssen, je nach Anforderungsprofil, die mechanischen, chemischen und biologischen Eigenschaften vorab getestet werden.

Heutzutage gibt es eine Vielfalt von Biomaterialien, die für die Medizintechnik bzw. Implantate verwendet werden können. Sie können in verschiedene Gruppen, je nach Stoffklasse, Struktur oder Material-Gewebe-Interaktion, eingeteilt werden (siehe Abbildung 2.1), wobei ein Biomaterial einer oder auch mehreren Klassen zugeordnet sein kann. [9,15,21]

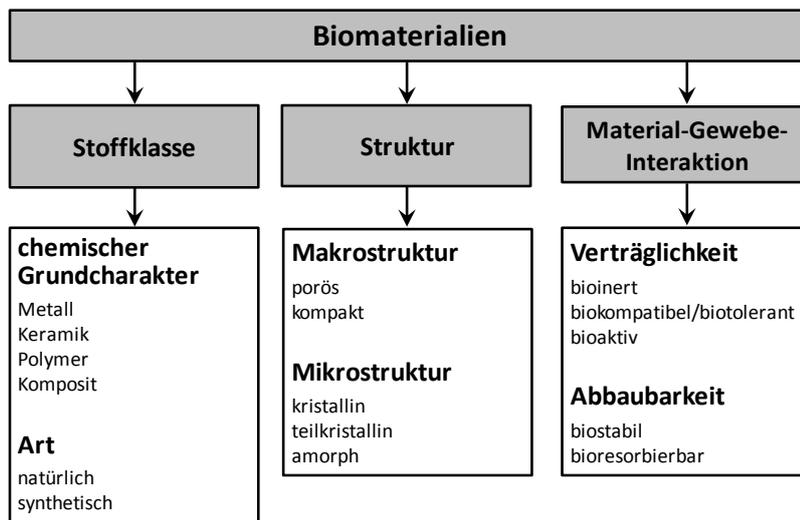


Abbildung 2.1: Schematische Klassifizierung von Biomaterialien.

Obwohl Biomaterialien mehreren Klassen zugeordnet sind (siehe Abbildung 2.1), ist die Klassifizierung nach Implantat-Gewebe-Interaktionen für die Medizintechnik von besonders großer Bedeutung, weil es das biologische Verhalten des Materials im Körper definiert. Dieses kann in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Nach biologischer Verträglichkeit: (1) bioinerte Materialien, bei denen nach einer Implantation sowohl keine chemischen und/oder biologischen Wechselwirkungen zwischen dem Implantat und dem Empfängergewebe als auch keine Freisetzung von toxischen Substanzen aus dem Werkstoff auftreten; [9,21] (2) biokompatible bzw. biotolerante Materialien, die in der Einsatzzeit zu keiner Zersetzung, Zell-Veränderung und toxischen Wirkung führen können. Das Implantat wird mit einer Bindegewebsschicht umkapselt; [9,15] und (3) bioaktive Materialien, welche eine Adhäsion vom Empfängergewebe an der Grenzflächen zum Implantat mit positiven Interaktionen ermöglicht [9,21].

Nach biologischer Abbaubarkeit: (1) biostabile Materialien, welche einer biologischen Degradation widerstehen und ihre Eigenschaften *in situ* erhalten

können, ^[22] und (2) bioresorbierbare Materialien, die sich im Körper ohne Freisetzung von toxischen Substanzen auflösen und als Grundlage zur Neubildung für das Empfängergewebe genutzt werden können ^[9,21].

2.2 Bioresorbierbare Polymere

Diese Materialien wurden ursprünglich für biomedizinische und pharmazeutische Verwendungen für temporäre oder wiederholte Anwendung so entwickelt, dass das Material mit einer kontrollierten Geschwindigkeit in nicht toxische Produkte über natürliche Wege *in vivo* abgebaut werden kann. Heutzutage werden sie immer noch in der Chirurgie vor allem als temporäre strukturelle Unterstützung, in der Pharmazie als Trägerwerkstoffe für kontrollierte, therapeutische Systeme, sowie für neue Ansätze für die regenerative Medizin und das *Tissue Engineering* eingesetzt. ^[9,11,23] Bioresorbierbare Polymere können bezüglich des Ursprungs in zwei Kategorien eingeteilt werden: sie sind entweder natürliche oder synthetische Polymere. Natürliche Polymere wie Cellulose, Alginate, Kollagen, PHB, PHV, Chitin und Chitosan wurden für medizinische Anwendungen getestet. Synthetische Kunststoffe, wie aliphatische Polyester (PLA, PGA, PLGA, PHA, PCL), Polyanhydride, Polyorthoester und Polyvinylalkohol, sind in der Biomedizin einsetzbar. ^[9,11,15,23] Aufgrund der großen Anzahl von biodegradierbaren Polymeren, die derzeit im medizinischen Bereich untersucht werden oder bereits anwendbar sind, werden anschließend nur die zwei bioresorbierbaren Polyester (PLA und PLGA), die eine bedeutende Rolle für diese Arbeit spielen, diskutiert.

2.2.1 Polylactid

Polylactid (engl. *polylactic acid*, PLA) oder auch Polymilchsäure ist eine der Poly(α -hydroxysäuren) oder auch ein thermoplastisches Polyester (siehe Abbildung 2.2), das aus nachwachsenden Rohstoffen wie z. B. Stärke hergestellt wird. PLA und deren entsprechende Copolymere zusammen mit dem einfachsten linearen Polyester Polyglycolid (engl. *polyglycolic acid*, PGA) gehören zu den bioresorbierbaren Polyestern, die eine Zulassung der FDA (*Food and Drug Administration*) für bestimmte klinische Anwendungen besitzen und in den letzten Jahrzehnten wegen ihrer Abbaubarkeit, guten Biokompatibilität und sehr niedrigen

Toxizität sowie relativ starken mechanischen Eigenschaften umfangreich untersucht wurden. PLA kann in drei stereochemischen Formen existieren: Poly(L-lactid) [L-PLA], Poly(D-lactid) [D-PLA] und Poly(D,L-lactid) [D,L-PLA]. PLA wird durch Hydrolyse der Esterbindungen zur Milchsäure und in die entsprechenden Oligomere abgebaut (siehe Abschnitt 2.2.3) und die Freisetzung dieses primären Abbauproduktes (Milchsäure) wird anschließend im Citrat-Zyklus zu H₂O und CO₂ metabolisiert. [24-27] Weitere detaillierte Informationen zu dem Polylactid sind der Literatur [24-26] zu entnehmen.

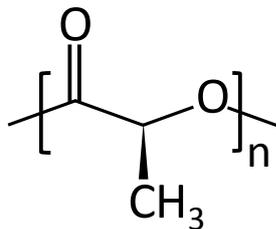


Abbildung 2.2: Chemische Strukturformel von Polylactid (n = Anzahl Milchsäure-Einheiten).

2.2.2 Polylactid-co-Glycolid

Polylactid-co-Glycolid (engl. *poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA) ist ein Copolymer, das auf der Basis von Milch- und Glykolsäure entsteht (siehe Abbildung 2.3). Dieses synthetische Copolymer wurde sowohl von der FDA als auch von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl. *European Medicines Agency*, EMA) für verschiedene Anwendungen in der Humanmedizin zugelassen. PLGA wird durch Hydrolyse abgebaut (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Abbauprodukte sind die Monomere Milchsäure und Glykolsäure, die anschließend über den Citrat-Zyklus zu den Endprodukten H₂O und CO₂ weiter abgebaut werden. Außerdem wird Glykolsäure auch über die Nieren ausgeschieden. Da diese Abbauprodukte von PLGA - Milchsäure und Glykolsäure - im Körper normalerweise vorhanden sind, zeigt PLGA eine sehr gute Biokompatibilität und besitzt eine geringe Toxizität für die Anwendung als Arzneistoffträger oder als Biomaterial. [28,29]

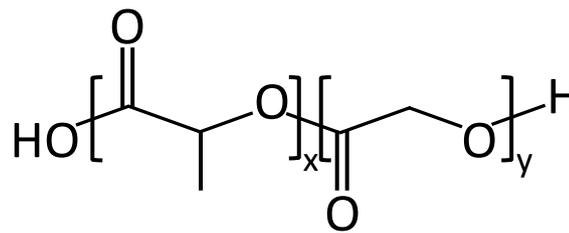


Abbildung 2.3: Chemische Strukturformel von Polylactid-co-Glycolid (x = Anzahl Milchsäure-Einheiten; y = Anzahl Glykolsäure-Einheiten).

2.2.3 Abbaumechanismus

Im Allgemeinen ist der Abbau eines Polymers ein Prozess, bei dem die Polymerketten zu Oligomeren und Monomeren aufgespalten werden und somit das Molekulargewicht des Polymers sinkt. Polymere können durch eine Vielzahl von Mechanismen, wie zum Beispiel thermische, mechanische und Photodegradation abgebaut werden. Die häufigsten Arten des Abbaus *in vivo* sind entweder hydrolytisch oder enzymatisch. Eine hydrolytische Degradation erfolgt bei Polymeren wie z. B. Polyanhydriden, Polyorthoestern und Poly(α -hydroxysäuren) sowie bei Thioether-Ester-Verbindungen (gebildet von Additionsreaktionen zwischen ungesättigten Acrylaten und Thiolen), während nur einige synthetische Polymere wie z. B. amorphes *L*-PLA sowie amorphes oder teilkristallines Poly- ϵ -Caprolacton für einen enzymatischen Abbau anfällig sind. [6] Die Degradation hängt dabei sowohl von intrinsischen Materialeigenschaften wie Zusammensetzung, Reaktivität, Hydrophilie, Molekulargewicht, Kristallinität, Molekularstruktur und Morphologie als auch von externen Faktoren wie z. B. Temperatur, pH-Wert, Medium, Belastung und Materialgröße ab [25,26,30]. Darüber hinaus kann der Degradationsmodus in drei qualitative Kategorien eingeteilt werden (siehe Abbildung 2.4) [24,26,30,31]:

- A. Oberflächenerosion: tritt auf, wenn die Eindringgeschwindigkeit von Wasser oder von Enzymen in das Polymermaterial geringer als die Umwandlungsgeschwindigkeit des Polymers in lösliche Fragmente ist und folglich eine Verringerung der Materialdicke erfolgt (siehe Abbildung 2.4a).
- B. Bulkerosion: im Gegensatz zur Oberflächenerosion tritt sie auf, wenn die Eindringgeschwindigkeit von Wasser oder von Enzymen in das Polymermaterial

schneller als die Umwandlungsgeschwindigkeit des Polymers in lösliche Fragmente ist und eine Aufspaltung kovalenter Bindungen in dem gesamten Polymermaterial mit einer Verringerung des Molekulargewichts des Polymers stattfindet (siehe Abbildung 2.4b).

- C. Bulkerosion mit Autokatalyse: ist der Bulkerosion zunächst ähnlich, es wird aber angenommen, dass: (1) die wasserlöslichen Abbauprodukte nicht aus dem Polymermaterial entweichen und daher in der Mitte des Polymers eingeschlossen sind, (2) die sauren Abbauprodukte die Degradation katalysieren und somit der Abbau mehr in der Mitte des Polymers stattfindet, während sich eine relativ wenig abgebaute Außenhaut an der Oberfläche bildet (siehe Abbildung 2.4c).

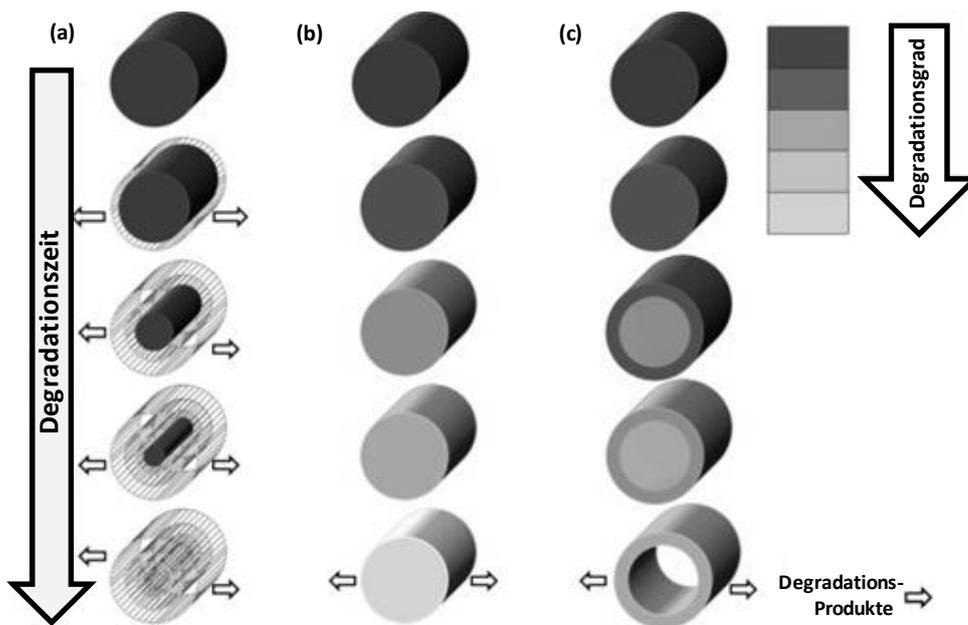


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Degradationsmodi von abbaubaren Polymeren: a) Oberflächenerosion, b) Bulkerosion, c) Bulkerosion mit Autokatalyse (Modifiziert nach Woodruff und Hutmacher ^[31]).

2.3 Bioresorbierbare Metalle

Metallische Werkstoffe spielen eine wesentliche Rolle in der biomedizinischen Anwendung als Biomaterial für Implantate. Aus langen klinischen Erfahrungen müssen metallische Implantatwerkstoffe ausreichende mechanische Festigkeit,

Korrosionsbeständigkeit mit minimaler Implantatschädigung sowie biologische Kompatibilität aufweisen und deshalb werden in der Medizintechnik hauptsächlich noch rostfreie Stähle, Kobalt-Basislegierungen sowie Titan und Titanlegierungen eingesetzt. ^[9] Aber die meisten Anwendungen solcher metallischer Systeme basieren auf der Annahme, dass das Implantat während seiner gesamten Lebensdauer im Körper des Patienten bleibt oder dass es nach der Heilung chirurgisch entfernt werden muss. ^[6] Allerdings ist bei der Verwendung von z. B. Knochenbruchplatten als temporäre Hilfsstützen zur Gewebeheilung oder von kardiovaskulären Stents bei pädiatrischen Patienten, deren Wachstum noch nicht abgeschlossen ist, eine dauerhafte Stützfunktion nicht notwendig und deshalb kann in beiden Fällen ein bioresorbierbares Material als Alternative in Betracht gezogen werden. ^[6,14] Aus diesem Grund besteht, wie die aktuelle Literatur ^[7,8] berichtet, ein zunehmendes Interesse an der Anwendung von bioresorbierbaren Metallen in medizinischer Forschung und Entwicklung, obwohl Jahrzehnte in die Entwicklung zur Minimierung der Korrosion von metallischen Biomaterialien investiert wurde.

Bioabbaubare Metalle (BM) können bezüglich der verwendeten Materialien in drei Kategorien eingeteilt werden ^[7]:

- A. Bioabbaubare reine Metalle: dazu gehören die Materialien, die aus einem einzigen Metall mit Verunreinigungen unterhalb der kommerziellen Toleranzgrenzen bestehen. Der Korrosionsgrad wird hauptsächlich durch die enthaltenen Spuren an Verunreinigungen definiert. ^[7] Metalle wie Mg, Fe, Zn, W und Mn wurden als potentielle Elemente zu diesem Zweck untersucht ^[7,32].
- B. Bioabbaubare Legierungen: zu dieser Gruppe gehören die metallischen Werkstoffe, die aus einem oder mehreren Legierungselementen bestehen und verschiedene Mikrostrukturen aufweisen, sowie metallische Gläser, die über eine amorphe Struktur verfügen. Die entsprechenden Legierungselemente sollen vor allem biotolerant sein. ^[7] Hierfür wurden Mg-, Fe- und Zn-Legierungen sowie metallische Gläser auf Mg-, Ca-, Sr- und Zn-Basis verwendet ^[7,8].
- C. Bioabbaubare Metall-Matrix-Komposite: hierunter versteht man Komposite, deren Hauptkomponente ein Metall bzw. eine Legierung ist und deren Bestandteile biologisch abbaubar sind. Beispiele dafür sind Komposite wie Mg-Keramik auf Calciumphosphat-Basis, Mg-Bioglas, Mg-ZnO, Mg-Ca, Fe-W, Fe-Kohlenstoffnanoröhren und Fe-Fe₂O₃. ^[7]

2.3.1 Magnesium und Mg-Legierungen

Mg ist ein essentielles Element für den menschlichen Körper und spielt eine wesentliche funktionale Rolle in biologischen Systemen [32]. Die Anwendung von Magnesium als Implantat begann im Jahr 1878 [33]. Magnesium und seine Legierungen werden in wässriger bzw. physiologischer Umgebung mittels elektrochemischer Reaktionen mit einer Neigung zu schneller Korrosion abgebaut, die zu übermäßiger Wasserstoffproduktion und zu einem vorzeitigen Verlust der mechanischen Festigkeit führen, wodurch eine Anwendungsbeschränkung in der Biomedizin folgte. Allerdings ermöglichten die Fortschritte in den Legierungstechniken, Oberflächenbehandlungen und Oberflächenbearbeitungen das Abbauverhalten und die mechanischen Eigenschaften des Werkstoffes zu kontrollieren und verbessern. [34]

Für medizinische Anwendungen wurden verschiedene Magnesiumlegierungen untersucht. Essentielle Elemente (Ca, Sr, Zn oder Si), geringe toxische Elemente (Sn oder Zr) sowie weitere Elemente (Al, Y oder Seltene Erden Elemente, SEE) wurden eingesetzt, um Magnesium zu legieren. Legierungselemente wie Calcium oder Strontium können die Mikrostruktur von Magnesium verfeinern sowie die Festigkeit und die Kriech Eigenschaften bei erhöhten Temperaturen aufgrund der Ausbildung von thermisch stabilen intermetallischen Phasen verbessern. Zink trägt zu einer Steigerung der Zugfestigkeit und Zugdehnung bei, während Silizium das effektivste Legierungselement ist, um die Streckgrenze und Zugfestigkeit des reinen Magnesiums zu verbessern. Das Legierungssystem Mg-Sn zeigt höhere Streckgrenzen, Zugfestigkeiten und Dehnungen als Mg im reinem Gußzustand. Zirkonium ist als ein leistungsfähiges Kornfeinungsmittel für Mg-Legierungen bekannt. Dieses Element wird üblicherweise in Legierungen, die Zn, SEE, Y und Th enthalten, verwendet und kann nicht in Verbindung mit Al und Mn verwendet werden, da diese stabile Verbindungen mit Zr bilden. Aluminium ist das am häufigsten verwendete Legierungselement für Mg-Legierungen. Es verbessert die Zugfestigkeit binärer Mg-Al-Legierungen. Mg-Al-Zn- und Mg-Al-Mn-Legierungssysteme werden gewöhnlich als Materialmodelle verwendet, um den Korrosionsmechanismus von Mg-Legierungen zu untersuchen. Wegen der Neurotoxizität von Aluminium sind Mg-Al-Basis-Legierungen nicht als Kandidaten für biomedizinische Anwendungen geeignet. Seltene Erden Elemente (SEE) werden in der Regel mit Magnesium legiert, um die Hochtemperaturfestigkeit und

Kriechbeständigkeit zu verbessern. Alle SEE können komplexe intermetallische Phasen mit Magnesium bilden. Unter Berücksichtigung der Löslichkeit des Legierungselementes in Magnesium lassen sie sich in zwei Kategorien unterteilen: (1) hohe Löslichkeits-Gruppe (Y, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb und Lu) und (2) begrenzte Löslichkeits-Gruppe (Nd, La, Ce, Pr, Sm und Eu). Vorteilhaft ist, dass die mechanischen und Abbaueigenschaften von Magnesium über einen weiten Bereich durch die Zugabe von einem einzigen SEE angepasst werden kann. [7,8,32,35]

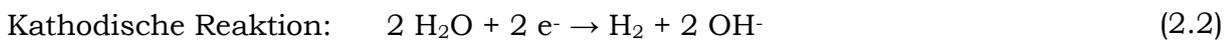
Wie zahlreiche Untersuchungen belegen, ist Magnesium derzeit ein attraktives Metall, das als bioresorbierbares Material zur Herstellung von orthopädischen oder vaskulären Implantaten eingesetzt werden kann, weil es eine bekannte Biokompatibilität und geeignete mechanische Eigenschaften aufweist. [7,8,13,34–38] Die Hauptvorteile von Magnesiumlegierungen als temporäre Biomaterialien sind ihre guten mechanischen Eigenschaften und Biokompatibilität. Magnesium und Magnesiumlegierungen sind besondere Leichtmetalle mit einer Dichte im Bereich von 1,74 bis 2,0 g·cm⁻³ (vergleichbar mit der Dichte von Knochen: 1,8-2,1 g·cm⁻³) und einem Elastizitätsmodul von 41-45 GPa (nahe derjenigen des kortikalen Knochen: 5-23 GPa). Magnesium ist beteiligt am menschlichen Stoffwechsel, es ist das vierthäufigste Kation im menschlichen Körper und ein Cofaktor für viele Enzyme. Magnesium stabilisiert die Struktur von DNA und RNA. Dieses Element hat eine mangelhafte Korrosionsbeständigkeit in Chloridhaltiger physiologischer Umgebung, und kann somit als ein biologisch abbaubares Metall verwendet werden. [36]

Neben der Optimierung der Eigenschaften von Magnesium z. B. durch Legieren, werden auch unterschiedliche Verfahren wie Oberflächenmodifikation, Wärmebehandlung, plasma-elektrolytische Oxidation (PEO), Phosphatierungs-Behandlung, Elektrotauch- und Polymerbeschichtung angewendet, um die Korrosionsrate von Magnesium zu verlangsamen bzw. die Biokompatibilität zu verbessern [7,34,36,37,39].

2.3.2 Abbaumechanismus

In Kontakt mit wässrigem Medium werden die metallischen Biomaterialien durch Korrosion abgebaut. Die Korrosion erfolgt, wenn elektrochemische Reaktionen auf

einer metallischen Oberfläche in wässrigen Elektrolyten mit Entstehung von Oxiden, Hydroxiden, Wasserstoffgasen oder anderen Verbindungen stattfinden. Wenn dieser Vorgang in einem physiologischen Medium (fast neutraler pH-Wert) abläuft, beinhaltet er eine anodische Auflösung des Metalls durch Oxidation (siehe Gleichung 2.1) und eine kathodische Produktentstehung (siehe Gleichung 2.4) durch Reduktion von Wasser zu Wasserstoff (siehe Gleichung 2.2) oder des aufgelösten Sauerstoffes (siehe Gleichung 2.3): [6,7]



Das biologische Abbauverhalten metallischer Materialien ist, wie *Zheng et al* [7] berichten, abhängig von Faktoren wie der Konzentration und Art anorganischer Ionen in den physiologischen Medien, dem pH-Wert des Mediums, der Anwesenheit von organischen Molekülen wie z. B. Proteinen oder Aminosäuren, des aufgelösten Sauerstoffes in den physiologischen Medien und der mechanischen Belastung je nach anatomischer Lokalisation des Materials.

Stents als kardiovaskuläre Implantate

In diesem Kapitel werden wesentliche Aspekte, die für die Beurteilung des Einsatzes von kardiovaskulären Stents relevant sind, vorgestellt. Nach einer kurzen Einleitung über Stents wird auf die aktuellen verschiedenen Stent-Systeme eingegangen. Im Folgenden wird die Restenose als das größte Problem der interventionellen Kardiologie erläutert. Im Anschluss wird auch ein kurzer Überblick über die anspruchsvollen Anforderungen, die die koronaren Stents als Implantat erfüllen sollten, gegeben.

3.1 Einleitung

Die intrakoronare Stentimplantation ist die führende Technik zur Therapie der koronaren Herzerkrankungen geworden ^[5] und gehört zu den perkutanen Revaskularisationsverfahren, die zur Behandlung von Verengungen der Koronargefäße (Koronarstenosen) und Verschlüssen zur Verfügung stehen ^[4,40]. Stents als Platzhalter verhindern vor allem die akute Gefäßrückstellung (*Recoil*) und senken somit effektiv die Restenoserate. ^[16] Bei einem Stent (auch als Gefäßwandstütze, Gefäßstütze oder Gefäßstent bezeichnet) handelt es sich um ein kleines Gittergerüst in Röhrenform (siehe Abbildung 3.1), das als dilatativ wirkendes Rekanalisationssystem in eine Gefäßwand einheilt ^[41]. Aufgrund ihres

Designs sind die Stents sehr flexibel und haben unterschiedliche Längen von 8 bis 38 mm sowie unterschiedliche Durchmesser von 2 bis 5 mm [42]. Die Länge des Stents ist abhängig von der Länge des stenosierten Gefäßabschnitts [43].

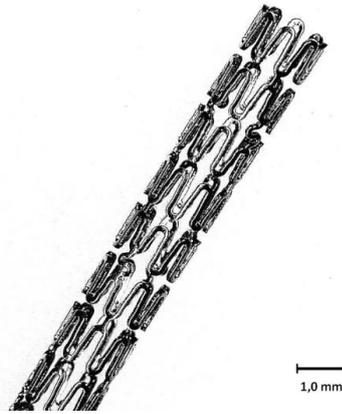


Abbildung 3.1: Bioresorbierbarer metallischer Stent (Firma MeKo Laserstrahl-Materialbearbeitungen e. K., Sarstedt/Hannover).

In der Regel ist ein Stent auf einem Ballonkatheter montiert und wird nach Positionierung und Inflation des Ballons in das stenosierte (verengte) Koronargefäß expandiert (siehe Abbildung 3.2). Dieses Behandlungsverfahren ist in der Medizin als perkutane Koronarintervention (engl. *Percutaneous Coronary Intervention*, PCI) aber auch als Stentangioplastie bekannt [43–45]. Koronare Stents sind nach der Applikationsart in das Gefäßsystem in zwei Varianten verfügbar. Der ballonexpandierbare Stent ist bereits auf einem Ballonkatheter vormontiert. Die Stentapplikation, also Dilatation und Stentabwurf, erfolgt hier in einem Schritt. Der selbstexpandierende Stent, der aus speziellen Metall-Legierungen (meistens aus einer Formgedächtnislegierung wie Nitinol) gefertigt ist, nimmt bei Körpertemperatur seinen definierten Durchmesser selbst ein [46].

Die Anforderungen, die die koronaren Stents als Implantatwerkstoffe erfüllen müssen, sind: hohe Bruchdehnung, niedrige Dehngrenze, ein hohes E-Modul, geringe Kriechneigung, hohe Dauerfestigkeit sowie hohe Korrosionsbeständigkeit (sofern diese nicht als resorbierbares Material-Implantat genutzt wird), gute Röntgenabsorption und nichtmagnetische Eigenschaften für die Anwendung der Magnetresonanztomographie. Außerdem müssen die koronaren Stents, wie alle Implantate, körperverträglich und sterilisierbar sein. [47]

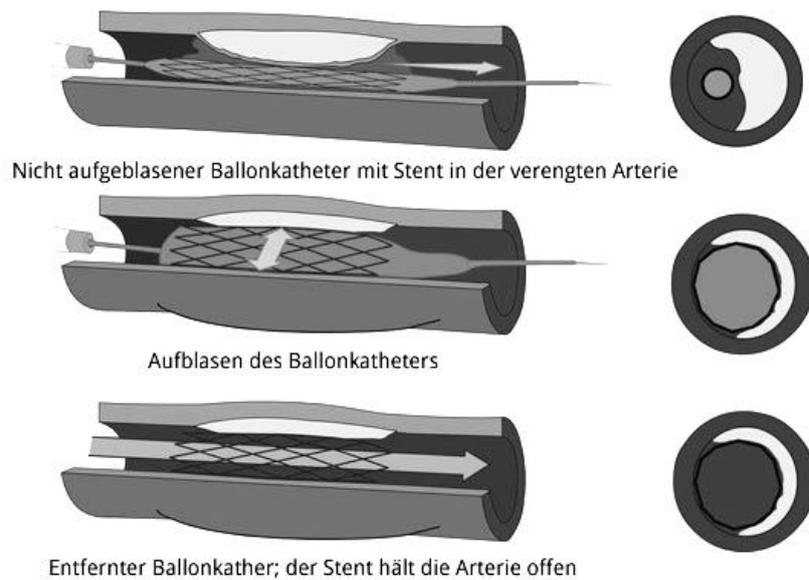


Abbildung 3.2: Erweiterung des stenosierten (verengten) Blutgefäßes durch Ballondilatation und Einlage eines Stents (Stentangioplastie).^[48]

3.2 Koronarstenttypen

Seit der Einführung der Stent-Technologie wurden zahlreiche Stent-Systeme entwickelt, die sich hinsichtlich Aufbau, Applikationsart und Material unterscheiden^[43]. Entsprechend ihrem Aufbau ist es möglich, einige Grundformen zu unterscheiden^[49]:

- *slotted tube Stent* (ein Metallrohr mit ausgestanzter Gitterstruktur, rautenförmige Masche),
- modularer Stent (kronenförmige Module),
- Hybriddesign (multizellulär),
- helikales Design (mäander-förmig helikale Zellen),
- multizelluläres Design (komplett wabenförmiges Design), und
- *Coil Stent* (spiralförmig), der in der interventionellen Kardiologie keine Rolle mehr spielt.

Nach der Applikationsart wird unterschieden zwischen ballonexpandierbaren Stents und selbstexpandierenden Stents^[46,49] (siehe Abschnitt 3.1). Bezüglich der verwendeten Materialien (siehe Abbildung 3.3) können die Koronarstents in vier Kategorien eingeteilt werden: unbeschichteter Metallstent, beschichteter Metallstent, bioabbaubarer Stent und medikamentenfreisetzender Stent^[13].

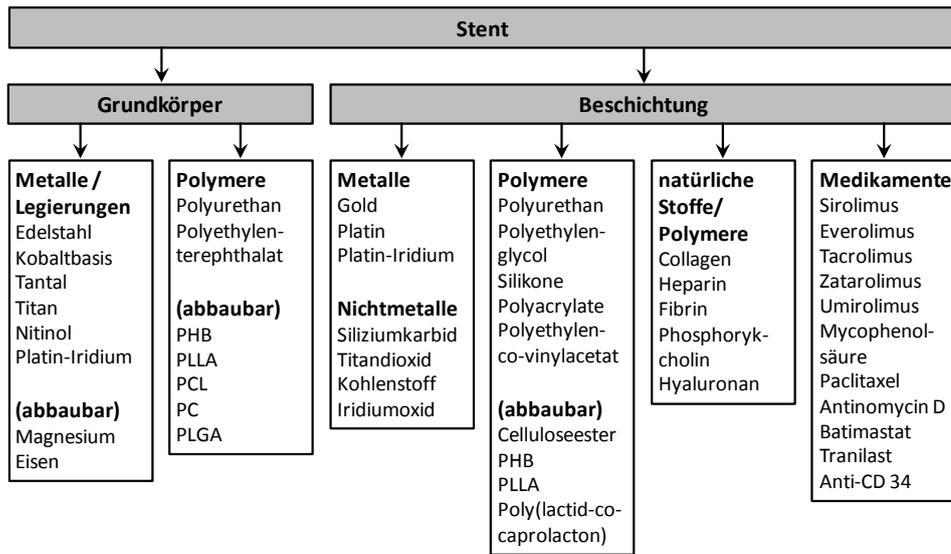


Abbildung 3.3: Grundkörper und Beschichtung von Stents (Modifiziert nach *Erbel et al.* [50]).

Jeder einzelne Koronarstenttyp wird im Folgenden kurz beschreiben:

A. Unbeschichteter Metallstent (engl. *Bare Metal Stent*, BMS)

Im Allgemeinen bilden Grundkörper ohne Beschichtung, die aus Metall hergestellt werden, die Plattform.

Metalle sind aufgrund der günstigen Kombination der mechanischen Eigenschaften Festigkeit und Zähigkeit sehr gut für Implantate geeignet, wenn sie auch biokompatibel sind. Aus diesem Grund werden koronare Stents fast ausschließlich aus metallischen Materialien hergestellt [4], wobei vor allem Edelstahl (316L), Kobalt-Chrom-Legierungen (L605), Tantal (Ta), Titan (Ti), Nitinol (Ni-Ti) und Platin-Iridium-Legierungen (Pt-Ir) verwendet werden [13,50].

B. Beschichteter Metallstent (engl. *Coated Metal Stent*)

Da neben den mechanischen Eigenschaften der Werkstoffe insbesondere deren Biokompatibilität von Interesse ist, und da die chemischen und biologischen Eigenschaften ausschließlich von der Oberfläche der Stents abhängen, lassen sich die Oberflächen durch Randschichtbeeinflussung oder Beschichtungen auch dahingehend modifizieren, dass sie die gewünschte Biokompatibilität erreichen [4]. Aus diesem Grund werden heute eine Reihe von Materialien verwendet, um Beschichtungen für metallische Stents aufzubringen [4,13,50]:

- Metalle (Gold, Platin, Platin-Iridium),
- Nichtmetalle/Keramiken (amorphes Siliziumkarbid, Titandioxid, diamantähnlicher oder pyrolytischer Kohlenstoff, Iridiumoxid),
- Polymere (Polyurethan, Polyethylenglycol, Silikone, Polyacrylate, Polyethylen-co-vinylacetat, Celluloseester, Polyhydroxybuttersäure [PHB], Poly(L-lactid) [L-PLA], Poly(lactid-co-caprolacton)),
- Natürliche Stoffe/Polymere (Collagen, Heparin, Fibrin, Phosphorylcholin und Hyaluronan),

Die Polymere werden sowohl als Beschichtungsmaterial als auch als Grundkörper verwendet, während anorganische Materialien (Metall/Nichtmetall) und natürliche Stoffe/Polymere ausschließlich als Beschichtungsmaterialien verwendet werden ^[13]. Darüber hinaus spielen die organischen, polymeren Beschichtungen, welche abbaubar sind, eine wichtige Rolle, weil sie nicht im Körper verbleiben und als Arzneistoffträger verwendet werden können, um bestimmte Medikamente kontinuierlich freizusetzen ^[4] (Medikamente als Aktivbeschichtung siehe Abschnitt D).

C. Bioabbaubarer Stent

Vor dem Hintergrund, dass koronare Stents in den Arterien wohl nur bis zur Ausheilung der intervenierten Läsion benötigt werden, wurden bioabbaubare Gefäßstents entwickelt. ^[5] Darüber hinaus bietet sich ihr Einsatz insbesondere in der Kinderkardiologie an: Zum Einen ermöglichen sie den Wachstumsprozess des pädiatrischen Patienten, zum anderen kann durch den Einsatz biodegradierbarer Stents unter Umständen eine chirurgische Entfernung vermieden werden ^[14]. Deswegen gewinnen biodegradierbare Stents, neben permanenten Stents aus Metall bzw. Metall-Legierung sowie aus Polymeren wie z. B. Polyethylenterephthalat oder Polyurethan, immer mehr an Bedeutung ^[9,13,50].

Mg-Legierungen und reines Fe wurden bisher für die Herstellung biologisch abbaubarer Koronarstents verwendet ^[13,50] (siehe Abschnitt 2.3). Der biologische Abbau schließt die Oxidation von Fe zu Ferro- und Ferriionen in biologischen Medien ein, während in der physiologischen Umgebung Magnesium in Magnesiumhydroxyd, Magnesiumchlorid und Wasserstoffgas korrodiert wird ^[13].

Statt Metallen bzw. Metall-Legierungen können auch abbaubare Polymere für Stents verwendet werden, im kardiovaskulären Bereich biodegradierbare Polymere wie Polyhydroxybuttersäure (PHB), hochkristallines Poly(L-lactid) [L-PLA], Polycaprolacton (PCL), Polycarbonat (PC) und Polylactid-co-Glycolid (PLGA) [9,13,14,50,51]. Kunststoffe kommen aber, bedingt durch ihre vergleichsweise geringe mechanische Festigkeit, bisher nur selten als Werkstoff für koronare Stents zum Einsatz [9].

D. Medikamentenfreisetzender Stent (engl. *Drug eluting Stent*, DES)

Die Optimierung der Architektur und der mechanischen Eigenschaften der Stents hat zu einer Abnahme der Restenoserate, dem größten Problem der interventionellen Kardiologie (siehe Abschnitt 3.3), geführt. Mit dem technologischen Konzept der Wirkstofffreisetzung bleibt zudem ein weiterer vielversprechender Weg, um eine Restenoserisiko nach der Koronarintervention zu minimieren [13].

Anfangs wurden Beschichtungen verwendet, um die Biokompatibilität des Stents zu verbessern. Später wurden kontrolliert medikamentenfreisetzende Stentsysteme entwickelt, um die neointimale Hyperplasie zu hemmen [13,50]. Derzeit dient die aktive Beschichtung eines Stents nicht nur der Inhibition der zellulären Proliferation an der Stentoberfläche, sondern auch der Prävention der In-Stent-Restenose [52]. Die Techniken, die zur Beladung von Arzneimitteln auf einem Stent eingesetzt werden, können in drei Haupttypen eingeteilt werden [13]:

- Anbringen des Medikamentes direkt auf die Metalloberfläche,
- Beladung des Wirkstoffes in die Poren des porösen Metallstents, und
- Einbringen des Arzneimittels in ein Polymer, das dann als Beschichtungsmaterial des Stents verwendet wird.

Eine Vielzahl von Substanzen (siehe Abbildung 3.4) sind als Mittel für die Hemmung der Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen einsetzbar [50]:

- Paclitaxel (Taxane) und abgewandelte Substanzen,
- Sirolimus (Rapamycin) und Sirolimus-Analoga (Everolimus, Zotarolimus und Umirolimus, auch als Biolimus A9 genannt),
- Tacrolimus, und
- Pimecrolimus.

Auch andere Wirkstoffe wurden als Beschichtung getestet: Mycophenolsäure und Tranilast (Immunmodulatoren) [50,52] sowie Anti-CD34-Antikörper (Re-Endothelialisierungssubstanz) [50]. Neben diesen Substanzen sind auch weitere Medikamente wie Actinomycin D, Batimastat, Dexamethason und 17- β -Östradiol getestet worden, allerdings ohne dass eine wirksame Hemmung der Neointimaproliferation und eine Reduktion der Restenoserate festgestellt wurde [50]. Im Laufe der letzten Jahre hat aber das Interesse an einem Wirksamkeitsvergleich und Nutzen-Risiko-Verhältnis von medikamentenfreisetzenden Stents (DES) zugenommen, vor allem an solchen, die mit Paclitaxel, Sirolimus und Analoga beladen worden sind [10,53–64].

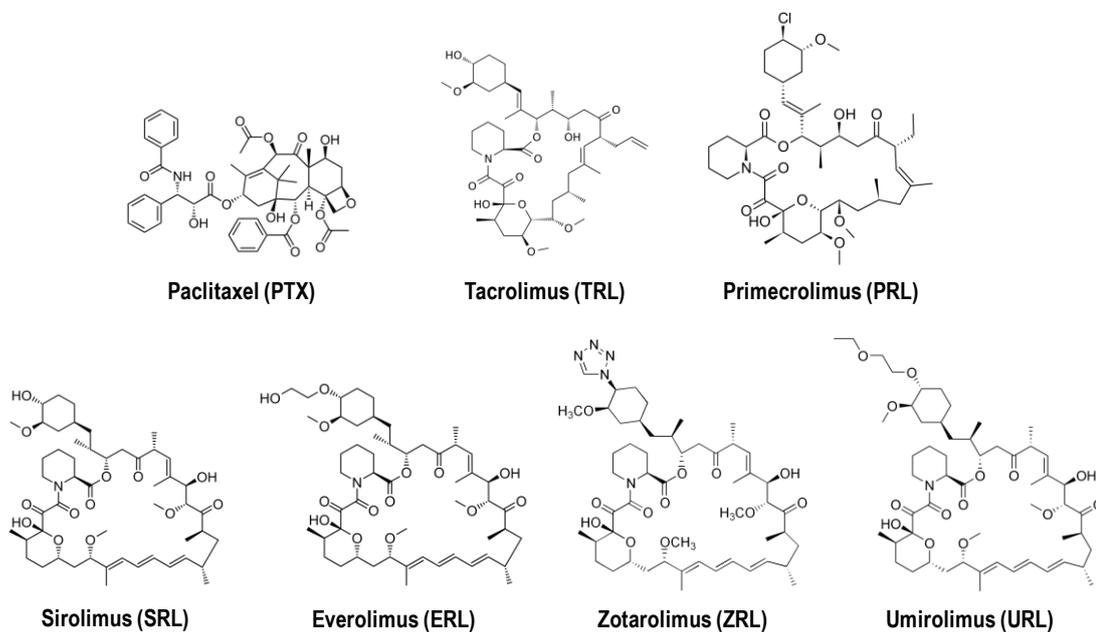


Abbildung 3.4: Darstellung der chemischen Struktur der antiproliferativen und immunsuppressiven Substanzen, die bei der DES-Technologie verwendet werden.

Paclitaxel ist ein Extrakt aus der Rinde von *Taxus brevifolia*, einer langsam wachsenden immergrünen Pflanze im Pazifik [50]. Dieser Arzneistoff gehört zu den Taxanen, die eine potente, antiproliferative Wirkung besitzen und in der Krebstherapie eingesetzt werden [65]. Paclitaxel bindet spezifisch an die β -Untereinheit des Protein-Tubulins mit Bildung abnorm stabiler Komplexe. Damit entwickelt sich entweder vor der mitotischen Teilung in der G₂-Phase oder während der Mitose in der M-Phase ein irreversibler Stopp im Zellzyklus (siehe Abbildung 3.5), so dass das Zellwachstum blockiert wird [13,50,65–70]. Darüber hinaus besitzt Paclitaxel zytotoxische Effekte, weil es Apoptose (programmierten Zelltod)

herbeiführt [13,50,71–73]. Literaturdaten [65,68,74–76] belegen aber, dass dies von der Dosierung abhängig ist. Im Tiermodell konnte die Effektivität von Paclitaxel bei der Reduzierung der Neointimabildung in einem Beobachtungszeitraum zwischen 1 - 6 Monaten nachgewiesen werden. Fibrin verblieb allerdings bis zu 6 Monate um die Stent-Streben herum und die glatten Muskelzellen und Endothelzellen waren nur spärlich vorhanden [77]. Klinisch wurde die Paclitaxel-Freisetzung an Stents in unterschiedlichen Studien geprüft und in den Ergebnissen zeigt sich eine Restenoserate um 5 % bei einer subakuten Thromboserate in der Größenordnung von 1 % pro Jahr [50].

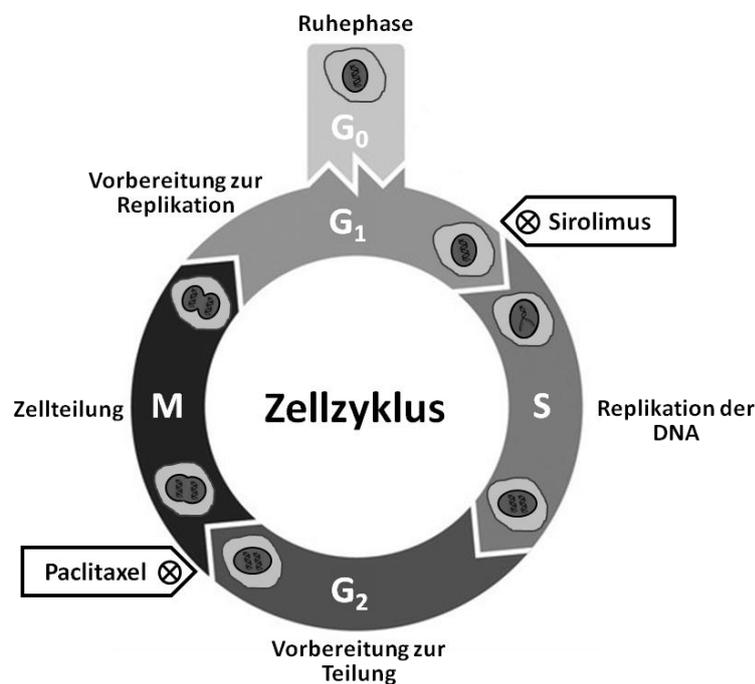


Abbildung 3.5: Darstellung des Zellzyklus mit den Wirkungsprofilen von Paclitaxel und Sirolimus. M: Mitosephase, S: Synthese-Phase, G₀: Ruhephase (keine Synthese-Phase), G₁: Prä-Synthese-Phase (1. Wachstumsphase), G₂: Post-Synthese-Phase (2. Wachstumsphase). (Modifiziert nach *vfa* [78] und *Erbel et al* [50]).

Sirolimus gehört zu den Makrolid-Antibiotika (Arzneimittel zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten) und wurde 1975 aus dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* isoliert, der in der Gegend von Rapa Nui (Osterinsel) gefunden wurde. [50,79] Sirolimus inhibiert die Proteinkinase mTOR (Abk. für engl. *mammalian Target of Rapamycin*) und führt zu einer Verhinderung der Progression des Zellzyklus zwischen der G₁-Phase (Zellwanderung) und der S-Phase (DNA-Replikation) (siehe Abbildung 3.5). Der Wirkstoff bringt immunosuppressive und antiproliferative Effekte hervor. Die Wirkung beruht dabei vor allem auf einer

Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten (auch T-Zellen genannt). [50,66,79–81] Sirolimus hat auch im Tiermodell gezeigt, dass 28 Tage nach der Implantation eine signifikante Reduktion der Neointimabildung mit größerer Persistenz von Fibrin erfolgt, aber der Grad der Endothelialisierung (Einheilung) war mit dem von BMS vergleichbar [77]. Klinische Studien zeigten, dass auch nach Verwendung von mit Sirolimus-beschichteten Stents Restenosen auftreten und die Rate an definitiven Stentthrombosen extrem niedrig bleibt und auch nach 6 Jahren noch im Bereich von unter 1 % pro Jahr liegt [50].

Ein Vergleich der kritischen Parameter für Sirolimus und Paclitaxel, die mit Restenose und unerwünschten vaskulären Ereignissen assoziiert werden, ist in Tabelle 3.1 aufgeführt (nach *Wessely et al.* [82]).

Tabelle 3.1: Kritische Parameter assoziiert mit Restenose und unerwünschten vaskulären Ereignissen für Sirolimus und Paclitaxel nach *Wessely et al.* [82]

Parameter	Sirolimus	Paclitaxel
Inhibition der GMZ-Proliferation	++	++
Inhibition der GMZ-Migration	++	+
Inhibition der EZ-Proliferation	++	++
Immunsuppressive Eigenschaften	++	(+/-) ^b
Pro-apoptotische Effekte	(+) ^a	++
Therapeutischer Bereich	breit	eng
Verteilung in die Gefäßwand	Gleichverteilung	Akkumulation (Adventitia)
Restenose-Muster	fokal	diffus (50 %)
Auswirkung auf spät auftretenden Lumenverlust	++	+

^a im therapeutischen Dosisbereich besteht keine spürbare pro-apoptotische Wirkung auf vaskuläre glatte Muskelzellen.

^b Paclitaxel ist kein klassisches Immunsuppressivum und seine minderwertigen immunsuppressiven Eigenschaften können durch Ergebnisse in präklinischen Tiermodellen zumindest teilweise erklärt werden.
GMZ: glatte Muskelzellen, EZ: Endothelzellen

3.3 Restenose nach Stent-Implantation

Mit der Einführung der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (engl. *Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, PTCA*) begann 1977 eine neue Phase der modernen Kardiologie. Dieses Verfahren führte zwar durchaus zu einigen Erfolgen, doch kommt es bei 25 – 50 % der Patienten innerhalb von 2 – 12 Monaten

zu einer Wiederverengung der Arterie, einer sogenannten Restenose [70,83]. Später, seit Mitte der 90iger Jahre nach Einführung der koronaren Stents, stellt die Stentimplantation die wichtigste Verbesserung bei der katheterinterventionellen Behandlung der koronaren Herzerkrankung dar [84,85]. Dieses neue Revaskularisationsverfahren sollte das Problem der Restenose verhindern und nachfolgende Studien haben die Überlegenheit der Stentimplantate gegenüber der alleinigen Angioplastie gezeigt [83]. Neben den akuten thrombotischen Komplikationen (Gerinnselbildung) sowie den inflammatorischen Reaktionen und trotz enormer Fortschritte bleibt in der interventionellen Kardiologie die Entwicklung einer In-Stent-Restenose (ISR) nach einer Stentimplantation das wichtigste Problem, weil sich noch bei 15 – 30 % der behandelten Patienten nach einer Stentimplantation eine Restenose bildet [43,65,70,83–85]. Die Restenose wird überwiegend durch eine Intimaverdickung verursacht [44].

Wie die Abbildung 3.6 zeigt, gliedern sich die Arterien in drei Schichten: *Intima*, *Media* und *Adventitia*. Innen befindet sich die *Tunica intima* oder *Intima*, die aus dem Gefäßendothel und einer dünnen Schicht kollagener und elastischer Fasern besteht. Das Endothel ist mit der darunter liegenden *Lamina elastica interna* verbunden. In der Mitte liegt die *Tunica media* oder *Media*, die verantwortlich für die mechanischen Eigenschaften des Gefäßes ist und aus glatten Gefäßmuskelzellen (engl. *Vascular Smooth Muscle Cells*, VSMC), Kollagen und elastischen Fasern besteht. Die außen liegende *Tunica adventitia* oder *Adventitia* besteht hauptsächlich aus Kollagen. [86]

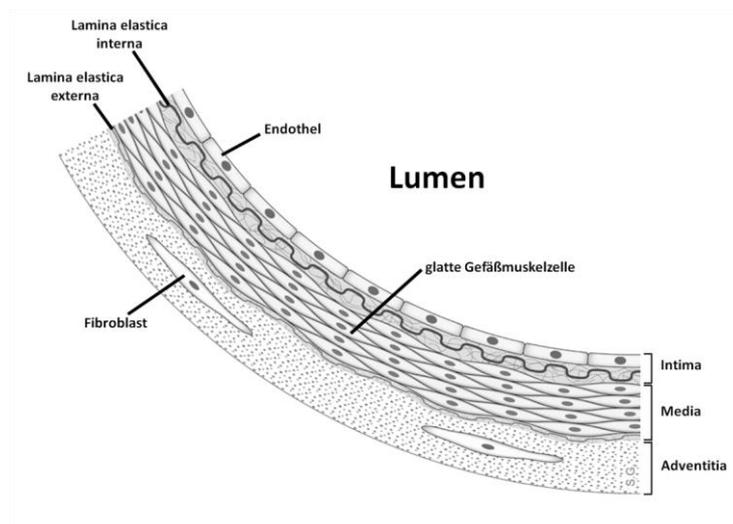


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des anatomischen Aufbaus einer Gefäßwand der Arterien (Modifiziert nach *Ghesquiere* [87]).

Wird ein Stent in ein sonst gesundes Gefäß implantiert, spricht man von In-Stent-Stenose (ISS), statt In-Stent-Restenose (ISR) [88]. Nach einer Stentimplantation entwickelt sich die In-Stent-Restenose als Höhepunkt einer komplexen Reihe von zellulären und molekularen Ereignissen (siehe Abbildung 3.7). Sie wird durch die Verletzung einer Gefäßwand (die Schädigung des Endothels und häufig Einrisse der Intima, siehe Abbildung 3.6) initiiert, welche während der Rekonstruktion stattfindet. Das Ausmaß der Reaktion auf die Schädigung ist variabel, jedoch meist proportional zur Größe der ursprünglichen Verletzung. Die biologischen Mechanismen der Entstehung einer Restenose sind elastische Rückstellkräfte, Thrombosierung, Umbauprozesse (Remodellierung), neointimale Hyperplasie und die Auflösung der Entzündung. [65,89,90] Viele Autoren [43,46,50,65,85,89–94] sind sich einig, dass eine Intimahyperplasie, die hauptsächlich auf die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media zurückzuführen ist, zur Restenose führt. Durch Intimahyperplasie bildet sich, durch Proliferation und Migration glatter Gefäßmukelzellen (GMZ) neues Gewebe, das als „Neointima“ bezeichnet wird.

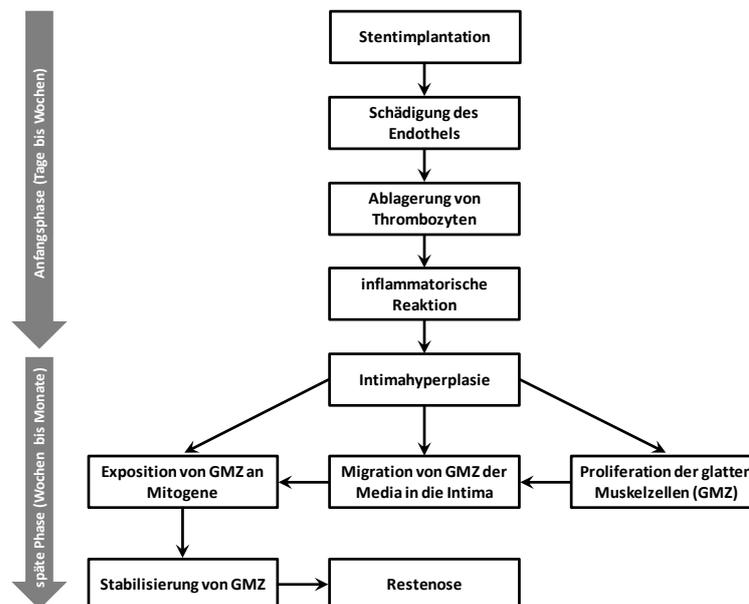


Abbildung 3.7: Reaktion der Gefäßwand nach der Stentimplantation (modifiziert nach Kibos *et al.* [90]).

Nach Identifizierung der übermäßigen Proliferation von glatten Gefäßmuskulzellen (GMZ) als wesentliches Merkmal der experimentellen und klinischen neointimalen Hyperplasie nach Angioplastie konnten antiproliferative Strategien entwickelt werden [65], Ergebnisse zahlreicher Tierstudien haben bereits gezeigt, dass diese pathologischen Prozesse verhindert werden können. So begann mit dem

Aufkommen von medikamentenfreisetzenden Stents (DES) vor fast zehn Jahren eine neue Ära in der interventionellen Kardiologie, die eine lokale Dosis antiproliferativer Medikamente liefern können [70].

3.4 Anforderungen an koronare Stents

Stents sind implantierbare Medizinprodukte, die im Körper verbleiben. Sie müssen deshalb eine Reihe von Anforderungen erfüllen, um sich für die klinische Anwendung zu qualifizieren.

Seit 1995 sind Vorschriften für Medizinprodukte im Medizinproduktegesetz (MPG) sowie unterschiedliche Verordnungen zusammengefasst. Die Einteilung der vielfältigen in der Medizin eingesetzten Produkte werden im Wesentlichen durch drei EU-Richtlinien geregelt [45]:

- Aktive implantierbare medizinische Geräte (90/385/EWG),
- Medizinprodukte (93/42/EWG) und
- In-vitro-Diagnostika (98/79/EG).

Im Sinne der Richtlinie 93/42/EWG [95] sind koronare Stents Medizinprodukte der höchsten Risikoklasse (Klasse III), deswegen müssen sie klinisch geprüft werden. Aber für eine sichere und zuverlässige klinische Anwendung ist es notwendig, dass koronare Stents nicht nur die physikalischen und physikalisch-mechanischen Anforderungen gemäß DIN EN ISO 25539-2 [96] erfüllen, sondern auch ihre Biokompatibilität muss gewährleistet sein. Um diese notwendige Körperverträglichkeit (Biokompatibilität) zu bewerten, werden *in-vitro*- und *in-vivo*-Tests durchgeführt. Die Norm DIN EN ISO 10993 [97] (eine ISO-Normenreihe von Richtlinien: ISO 10993-1 bis ISO 10993-20) bietet ein Rahmenmodell für die Planung der Beurteilung der biologischen Auswirkungen von Medizinprodukten oder Werkstoffen. Dazu gehören unter anderem die Bewertung der Toxizität, der Wechselwirkung mit Blut, von lokalen Effekten, herauslösbarer Bestandteile sowie ein qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten nach der Implantation. Als anerkanntes und ausreichendes Tiermodell, um Stent-Systeme zu bewerten, werden häufig porcine Arterien verwendet, weil die Schweine-Koronararterie in ihrer Struktur und Physiologie dem menschlichen Koronargefäß sehr ähnlich ist [98].

Analyseverfahren zur Untersuchung des Abbauverhaltens von Implantatmaterialien

Eine kurze Beschreibung der Analyseverfahren und ihre entsprechenden experimentellen Anwendungen, die eine wichtige Bedeutung in dieser Arbeit spielen, bietet dieses Kapitel. Hierzu wird in erster Linie ein Überblick über die analytischen Verfahren vorgestellt, welche auf dem Gebiet der Material- und Implantatforschung zur Untersuchung und Charakterisierung von Implantatmaterialien verwendet werden können, und erklärt, wie die Umsetzung im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde.

4.1 Einleitung

Im Allgemeinen sind Implantate körperfremde Materialien, die im Rahmen einer Operation in einen Körper eingebracht werden, um kurz- oder längerfristig bestimmte Körperfunktionen zu substituieren. Stents (siehe Kapitel 3) sind Implantate, die zur Behandlung von Verengungen der Koronargefäße verwendet werden und wie alle Implantate müssen sie hohe medizinische Anforderungen erfüllen, bevor sie beim Menschen angewendet werden können. Diese Anforderungen umfassen sowohl die physikalischen und physikalisch-mechanischen Voraussetzungen als auch die notwendigen Untersuchungen der Biokompatibilität und Biofunktionalität, die mit Hilfe von sogenannten *in vivo*

oder *in vitro* Studien erfolgen können. Eigens dafür kommt die Norm DIN EN ISO 10993 [97] am häufigsten zum Einsatz. Aber ein wichtiger Schritt, um Implantate bzw. Implantatmaterialien und ihr Abbauverhalten zu untersuchen, ist die Anwendung geeigneter Analyseverfahren, die zur Lösung entsprechender analytischer Problemstellung herangezogen werden können. Dabei kommen je nach Analyseprinzip, Art der Probe, Fragestellung, Zielsetzung und Begrenzungen und je nach dem jeweiligen Anwendungsbereich verschiedene Analysenmethoden zum Einsatz. Wichtig für die Auswahl der Analysenmethode sind auch Aspekte wie Selektivität, Empfindlichkeit, Auflösung und zu erwartende Störungen oder Fehlerquellen. Eine Übersicht der anwendbaren Analyseverfahren zur Untersuchung von Implantatwerkstoffen sowie die wichtigsten zu beantwortenden Fragestellungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Anwendbare Analyseverfahren zur Untersuchung von Implantatmaterialien

Analytische Probleme	Implantatwerkstoff		
	Metall/Legierung	Polymer	Keramik
Vor der Testung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>			
Chemische Struktur oder kristalline Phasen	XRD	NMR, MS, FTIR, Raman, XRD	XRD
Spurensubstanzen und Verunreinigungen	ICP-OES, ICP-MS	GC, HPLC, XRD, μ -RFA	ICP-OES, ICP-MS
Oberflächenmorphologie	REM, AFM	REM, AFM	REM, AFM
Oberflächenhomogenität und Verteilung von Wirkstoffen	REM-EDX, μ -RFA	μ -Raman, μ -FTIR	REM-EDX, μ -RFA
Zusammensetzung	ICP-OES, ICP-MS, μ -RFA, EDX	GPC, HPLC, Raman, FTIR, SIMS, XPS	ICP-OES, ICP-MS, μ -RFA, EDX
Nach der Testung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>			
Erklärung des Abbaumechanismus	μ -RFA, μ -PIXE, SR-RFA, μ -CT	μ -Raman, μ -FTIR, SIMS	μ -RFA, μ -PIXE, SR-RFA, μ -CT
Identifikation der Abbauprodukte	μ -Raman, μ -FTIR, SIMS, XPS, μ -PIXE, LA-ICP-MS, XRD, XANES, EXAFS	μ -Raman, μ -FTIR, SIMS, XPS, μ -PIXE, LA-ICP-MS, XRD, SIMS	μ -Raman, μ -FTIR, SIMS, XPS, μ -PIXE, LA-ICP-MS, XRD, XANES, EXAFS
Bestimmung der Elementgehalte im Gewebe	ICP-OES, ICP-MS, GF-AAS	ICP-MS*, LA-ICP-MS*	ICP-OES, ICP-MS, GF-AAS

* bestimmbar durch z. B. markierte Isotope

4.2 Charakterisierung von Implantatwerkstoffen vor der Testung

Wie in Abschnitt 3.2 des vorhergehenden Kapitels beschrieben wurde, besitzt ein Stent einen Grundkörper aus Metall oder aus einem Polymer, dessen Oberfläche entweder unbeschichtet bleibt oder mit Materialien wie Metall, Keramik, natürlichen und synthetischen Polymeren oder mit Medikamenten beschichtet werden kann. Eine Charakterisierung der Implantatwerkstoffe vor der Durchführung einer Testung ist erforderlich, um Vergleichsdaten für die Untersuchungen zu gewinnen, die Qualität der Werkstoffe beurteilen sowie die Wahrscheinlichkeit abschätzen zu können, welche und wie viele Abbauprodukte gebildet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mikro-Röntgenfluoreszenzspektroskopie und optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung eines metallischen Stent-Grundkörpers, Röntgenbeugung zur Charakterisierung der Polymerstruktur (Materialbeschichtung), Dynamische Differenzialkalorimetrie zur thermischen Charakterisierung des Polymermaterials sowie Schwingungsspektroskopie zur Identifizierung von organischen Molekülen (Polymere und Arzneimittel) benutzt.

4.2.1 Mikro-Röntgenfluoreszenzanalyse (μ -RFA)

4.2.1.1 Das Prinzip

Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass die Emission von sekundären, charakteristischen Röntgenstrahlen eines Materials, die durch Anregung von primären, energiereichen Röntgenstrahlen entstehen, gemessen wird. Dabei ist es möglich, Elemente in einer Mikrometer großen Probe zu identifizieren und zu quantifizieren. Die μ -RFA als zerstörungsfreies Verfahren bietet dazu eine Reihe von Vorteilen wie geringe Interferenz von Spektrallinien, Schnelligkeit sowie vereinfachte Probenvorbereitung. Außerdem ist es möglich, referenzprobenfreie quantitative Analyse durchzuführen. Aber dieses spektroskopische Verfahren ist stark von der Matrix abhängig, die die Empfindlichkeit bzw. die Genauigkeit der Messung beeinflussen kann, weil Absorptionsprozesse in der Probe stattfinden können. Aus diesem Grund benötigt das Röntgenverfahren bei einer quantitativen Bestimmung

der elementaren Zusammensetzung einer Probe eine Methode zur Kompensation dieser Matrixeffekte wie die Kalibrierung über externe/interne Standards oder die sogenannte Fundamentalparameter-Methode (theoretisches Korrekturmodell). Die Nachweisgrenzen des Verfahrens liegen im $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ -Bereich. [99–101]

4.2.1.2 Durchführung

Die Messungen der in dieser Arbeit untersuchten Probe, einer Stent-Legierung, erfolgten mit einem Mikro-Röntgenfluoreszenzspektrometer (*Eagle II μ -Probe*, EDAX Inc. Mahwah, USA). Das Spektrometer ist mit einer Rhodium-Anoden-Röntgenröhre als Anregungsquelle (Beschleunigungs-Spannung 10 – 40 keV, Filamentstrom 20 – 1000 μA) in Kombination mit einer Polykapillar-Röntgenoptik (X-Ray Optical Systems Inc., East Greenbush USA) zur Fokussierung der primären Röntgenstrahlung (Messfleck ca. 50 μm bei 5,9 keV) ausgestattet. Die sekundären Röntgenstrahlen der Probe wurden mit einem energiedispersiven Si-(Li)-Halbleiterdetektor (EDAX Inc., Mahwah, USA) registriert. Die Einstellung der Messparameter sowie die Auswertung erfolgten durch die Software *Vision 32* Version 4.00 (EDAX Inc., USA). Mithilfe des Fundamentalparametermodells wurden die quantitativen Analysen durchgeführt.

4.2.2 Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

4.2.2.1 Das Prinzip

Dieses analytische Verfahren, das auf der Messung der emittierten Strahlungsleistung bei der Rückkehr angeregter Spezies in den Grundzustand nach Anregung durch die thermische Energie einer hochfrequenzerhitzten induktiv gekoppelten Plasma-Quelle (ICP) basiert, wird heutzutage in erster Linie zur qualitativen und quantitativen Multielementanalyse einer Probe in Form einer wässrigen Lösung eingesetzt. Obwohl im ICP chemische Störungen und Matrixeffekte kaum eine Rolle spielen, können immer spektrale Interferenzen auftreten, die berücksichtigt werden müssen. Durch Plasmaanregung lassen sich viele Elemente im $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -Bereich oder darunter nachweisen. [99–101]

4.2.2.2 Durchführung

Um die Zusammensetzung einer Stent-Legierung auf Mg-SEE-Basis zu bestimmen, wurde mithilfe eines CCD-ICP-Emissionsspektrometers (*Spectro Arcos*, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve) analysiert. Die Einstellung der Messparameter, die in Tabelle A1.1 im Anhang dargestellt sind, sowie die Datenverarbeitung erfolgten über die Gerätesoftware *Smart Analyzer Vision* Version 4.02.0834 (Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve). Zur Vorbereitung der Proben wurden in 6,5 %iger HNO₃-Lösung (*subboiled*) zweimal je ca. 100 mg der originalen Stent-Legierung aufgelöst. Die quantitative Bestimmung der Elemente erfolgte an einer aufgelösten Probe nach Verdünnung (1:100 bis 1:200) über eine externe Kalibrierung mittels acht Standardlösungen, denen die entsprechenden Elemente in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurden (siehe Tabellen A1.2 und A1.3 im Anhang). Alle Lösungen wurden mit einer 2 %igen HNO₃-Lösung (*subboiled*) angesäuert. Die Konzentrationen in den Kalibrationslösungen wurden nach einer semiquantitativen Analyse so gewählt, dass die Gehalte der Proben im mittleren Bereich der Kalibriergeraden lagen. Für die Auswahl der elementspezifischen Spektrallinien wurden zur Quantifizierung je Element zwei empfindliche und störungsfreie Emissionslinien berücksichtigt (siehe Tabelle A1.3 im Anhang). Jede Lösung der Kalibrierstandards sowie der Proben wurde dreimal gemessen. Aus den Messwerten für jede Spektrallinie wurden mit Hilfe der Kalibriergeraden und unter Berücksichtigung der Verdünnung die Elementgehalte in den entsprechenden Proben sowie die dazugehörigen Messunsicherheiten berechnet. Die Ermittlung der Messunsicherheit (U) erfolgte nach QUAM^[102] mit einem Erweiterungsfaktor $k = 2$ (dies entspricht einem Vertrauensniveau von ungefähr 95 %). Das erhaltene Ergebnis war der Mittelwert aus der Auswertung von jeweils zwei ungestörten Messlinien. Weiterhin ist zu bemerken, dass während der Messungen eine Gerätedrift von 1,5 % nicht überschritten wurde. Aus diesem Grund war eine Driftkorrektur nicht erforderlich.

4.2.3 Röntgenbeugung (XRD)

4.2.3.1 Das Prinzip

Zur qualitativen Identifizierung kristalliner Verbindungen der Polymerwerkstoffe eignet sich die Röntgenbeugung oder Röntgenpulverdiffraktometrie (engl. *X-Ray Diffraction*, XRD). Da die Streuung eine der möglichen Wechselwirkungen von Röntgenstrahlung mit den Elektronen der Materie ist, nutzt dieses analytische Verfahren die elastische bzw. kohärente Streuung von Röntgenstrahlung, um eine Vielfalt wichtiger Informationen über die in einer festen Probe enthaltenen kristallinen Verbindungen zu liefern. Die Beugung von Röntgenstrahlung ist für eine bestimmte kristalline Substanz spezifisch, sodass jede kristalline Substanz ein einzigartiges Röntgenbeugungsmuster aufweist. Während kristalline Materialien scharfe Signale erzeugen, zeigen amorphe Werkstoffe und teilkristalline Werkstoffe keine oder nur sehr breite, nicht oder schlecht interpretierbare Signale und werden wie röntgenamorphe, glasartige Verbindungen von der Methode nicht erfasst. Linieninterferenzen treten bei Mischungen mit mehreren kristallinen Phasen auf. Informationen über die Probe (Herkunft und Elementzusammensetzung) können dabei für die Interpretation sehr hilfreich sein. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 1 und 5 Gew.-% je nach Kristallinität der einzelnen Phasen. ^[99–101,103]

4.2.3.2 Durchführung

Die Röntgen-Pulverdiffraktogramme der in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden bei Raumtemperatur auf einem Transmissionsdiffraktometer (*STADI-P*, STOE & Cie GmbH, Darmstadt) aufgenommen. Das System verwendete (111)-Gemonochromatisierte $\text{CuK}_{\alpha 1}$ -Strahlung mit der Wellenlänge von 0,154059 nm, die an einer Cu-Röntgenröhre bei einer Spannung von 40 kV und einem Strom von 30 mA erzeugt wurde. Die gebeugte Strahlung wurde mit einem linearen Detektor (*PSD*, *Position Sensitive Detector*) registriert. Die Beugungsmuster wurden im 2θ -Bereich von $5 - 70^\circ$ mit einer Schrittweite von $0,1^\circ$ und einer Belichtungszeit von 15 s pro Schritt gemessen. Alle erhaltenen Diffraktogramme wurden bezüglich der Intensität normiert. Die Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe der Software *STOE WinX^{POW}* Version 1.08 (STOE & Cie GmbH, Darmstadt).

4.2.4 Dynamische Differenzialkalorimetrie (DSC)

4.2.4.1 Das Prinzip

Aufgrund ihrer Schnelligkeit, Einfachheit und Verfügbarkeit wird die Dynamische Differenzialkalorimetrie (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) häufig zur Analyse der thermischen Eigenschaften von Polymerwerkstoffen eingesetzt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der temperaturabhängigen Messung der Wärmeflussdifferenz zwischen einer Probe und einer thermisch inerten Substanz als Referenz, die mit konstanter Geschwindigkeit in einer einzigen Heizeinheit aufgeheizt werden. Findet während der Messung ein wärmeverbrauchender oder wärmefreisetzender Umwandlungsprozess oder eine chemische Reaktion in der Probe statt, entsteht eine Differenz zwischen beiden Wärmeflüssen, welche gemessen wird. Damit können thermische Effekte eines Polymerwerkstoffes untersucht werden und die sich daraus ableitbaren Eigenschaften wie Schmelz-, Rekristallisations- und Glasübergangs-Temperatur sowie Kristallisationsgrad ermittelt werden. ^[99,104] Ein typisches DSC-Thermogramm eines teilkristallinen Polymers mit Glasübergang, exothermer Nachkristallisation, endothermer Schmelze und exothermer Zersetzung zeigt die folgende Abbildung 4.1.

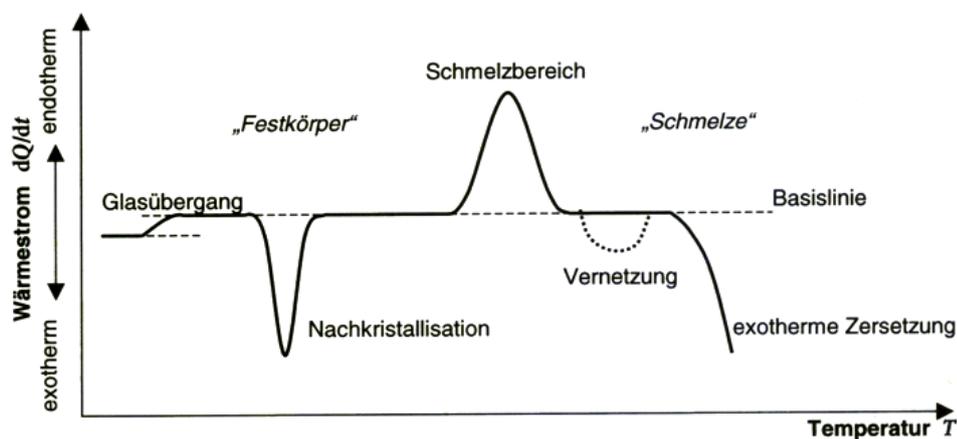


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer DSC-Kurve eines teilkristallinen Polymers mit einer Auswahl an möglichen Effekten mit Einfluss auf den Kurvenverlauf ^[104]

4.2.4.2 Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen der Polymer-Proben in einem dynamischen Differenzialkalorimeter (*DSC Modell 2920 MDSC V2.6A*, TA Instruments, USA) am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e. V. (DIK) durchgeführt. Der Wärmestrom und die Temperatur, die das Gerät ermittelte, wurden mit einem Iridium-Standard kalibriert. Mit einer Masse von etwa 6-8 mg wurden die Proben in einen Aluminiumtiegel eingewogen und bei einer konstanten Aufheiz-Geschwindigkeit von $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ mit einem Stickstoffstrom von $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde die Probe gemessen. Jede Probe wurde zweimal von -20 bis $150 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. -25 bis $280 \text{ }^\circ\text{C}$ gescannt. Die zweite Aufheizung wurde nach einer schnellen Abkühlung der Probe vorgenommen. Alle Proben wurden zweifach analysiert. Die Einstellung der Messparameter sowie die Auswertung erfolgten durch die Software *Universal Analysis Version 3.9A* (TA Instruments, USA). Die Glasübergangstemperatur T_g wurde durch die Mittelpunkt-Methode bei der zweiten Aufheizung nach DIN EN ISO 11357-2 [105] bestimmt. Die Bestimmungen der Schmelz- und Rekristallisationstemperaturen, T_m und T_k , erfolgten nach DIN EN ISO 11357-3 [106].

4.2.5 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)

4.2.5.1 Das Prinzip

Die Infrarotspektroskopie ist ein Verfahren, welches zusammen mit der Raman-Spektroskopie (RS) zur Schwingungsspektroskopie gehört. Beide Verfahren können insbesondere zur Identifizierung, Quantifizierung und strukturellen Charakterisierung einer Probe eingesetzt werden, und wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl zur Identifizierung organischer Substanzen (FTIR) als auch zur qualitativen und quantitativen Bestimmung molekularer Verbindungen (RS, siehe Abschnitt 4.3.1) eingesetzt.

Da durch Absorption von Infrarotstrahlung bestimmter Frequenzbereiche unterschiedliche mechanische Schwingungen von Atomen oder funktionellen Gruppen in einem Molekül angeregt werden, beruht die Infrarot-Spektroskopie auf der Messung der Lichtabsorption durch eine Probe normalerweise im Bereich von $2,5 - 14,9 \text{ } \mu\text{m}$ ($670 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), welche als ein IR-Spektrum aufgenommen wird. Eine Absorption der Energie findet jedoch nur statt, wenn im Molekül eine

Änderung des Dipolmoments infolge der Schwingungsvorgänge stattfindet. Das erhaltene Spektrum liefert Informationen über die entsprechenden Bindungen der untersuchten Moleküle. [99,100,107,108]

4.2.5.2 Durchführung

Die IR-Absorptionsspektren zur Charakterisierung von organischen Komponenten wurden unter Anwendung eines Fourier-Transformations-Infrarotspektrometers (*Tensor 27*, Bruker Optik GmbH, Ettlingen) aufgenommen. Das Messsystem besteht aus einem festen Körper als Strahlungsquelle (*Globar*, ein Stab aus Siliciumcarbid), einem *RockSolid®*-Interferometer, einem HeNe-Referenzlaser und einem pyroelektrischen Detektor (Deuteriertes Triglycinsulfat, DTGS). Die Software *OPUS* Version 5.0 (Bruker Optik GmbH, Deutschland) wurde für die Einstellung der Messparameter und für die Messungen einschließlich der Kompensation atmosphärischer Absorptionsbanden von Wasser oder Kohlendioxid verwendet. Zur Messung wurden ca. 1 mg der zuvor fein gemahlene Probe gemeinsam mit ca. 100 mg getrocknetem Kaliumbromid (FTIR grade, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Co., USA) in einem Achatmörser gut vermischt. Die erhaltene Mischung wurde mit Hilfe einer hydraulischen Presse (PerkinElmer, Inc., USA) bei 100 kN für 1 min gepresst. Jedes IR-Spektrum wurde bei Raumtemperatur gemessen und mit Hilfe eines Hintergrundspektrums des reinen KBr korrigiert.

4.3 Charakterisierung des biologischen Abbaus eines Implantatwerkstoffes nach der Testung

Da während einer *in vivo* Studie der Implantatwerkstoff in Kontakt mit einer realen biologischen Umgebung kommt, finden komplexe Abbauprozesse statt. In diesem Fall sind vielfältige Wechselwirkungen zwischen dem Implantatwerkstoff und dem umgebenden biologischen Medium möglich, die als Basis für die Bildung von Abbauprodukten durch chemische und biologische Prozesse dienen können. Aus diesem Grund ist der qualitative und quantitative Nachweis der Abbauprodukte ein wichtiger Schritt zur Beurteilung der Verträglichkeit sowie zum besseren Verständnis des Abbauprozesses und der chemischen Wechselwirkung zwischen dem Implantatwerkstoff und dem Empfängergewebe. Dafür wird die Anwendung

von anspruchsvollen analytischen Verfahren benötigt, die wertvolle Informationen für die Untersuchung von Implantatwerkstoffen, Geweben oder gelösten Stoffen und Substanzen bzw. Abbauprodukten liefern können. Um die Testergebnisse beurteilen zu können, sind geeignete analytische Verfahren notwendig, die vorzugsweise aus dem Bereich der Festkörperspektroskopie stammen sollten und die Charakterisierung fester Implantat-Reste oder Reaktionsprodukte und von Spurenkonzentrationen in Gewebe mit Ortsauflösung ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mikro-Raman Spektroskopie zur quantitativen Charakterisierung von Polylactid als passive Beschichtung eines permanenten Metallstents eingesetzt. Zur Untersuchung zweier medikamentenfreisetzender Stent-Systeme wurden Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission und Lichtmikroskopie verwendet, um die Wirkung des Abbaus des Mg-SEE-Stents und die Wirksamkeit von zwei Medikamenten zu bewerten. Zum Nachweis der aus dem metallischen Mg-SEE-Stent möglicherweise freigesetzten Spuren des Implantatmaterials wurde zur Untersuchung der Umgebung des Implantats die ns-Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma eingesetzt.

4.3.1 Mikro-Raman-Spektroskopie (μ -RS)

4.3.1.1 Das Prinzip

Wenn eine Probe mit monochromatischem Licht eines Lasers im sichtbaren oder nahen IR-Bereich bestrahlt wird und die Anregungswellenlänge deutlich außerhalb des Absorptionsbandes der Probe liegt, kommt es auf Grund der sich periodisch ändernden Feldstärke der elektromagnetischen Strahlung zu einer Schwingungsanregung über die Elektronenhülle. Somit findet ein Streueffekt statt, der als Raman-Effekt bekannt ist. Das emittierte Licht besteht aus inelastischer Streuung mit niederfrequenten Emissionen (*Stokes-Streuung*, *Stokes-Verschiebung* oder *Raman-Streuung*) und hochfrequenten Emissionen (*Anti-Stokes-Streuung* oder *Anti-Stokes-Verschiebung*) sowie aus elastisch gestreuter Strahlung mit der gleichen Frequenz wie der Anregungsstrahl (*Rayleigh-Streuung*). Die Voraussetzung für den Raman-Effekt ist die Änderung der Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingungsvorgänge. Bei der Raman-Spektroskopie werden meistens nur die

Streuanteile der inelastischen Streuung berücksichtigt. Die Anwendung der Technik zur Untersuchung biologischer Proben bietet Vorteile, da Untersuchungen von Proben in wässriger Lösung und/oder mit geringem Probenvolumen möglich sind, die Messungen empfindlich in Bezug auf Konformation und Umgebung sind und quantitative Anwendungen für Mischungen meist einfacher möglich sind, da eine geringere Wahrscheinlichkeit für Bandenüberlappungen im Vergleich zu IR-Spektroskopie vorliegt. Es können jedoch auch einige Probleme auftreten. So kommt es oft zur Überlagerung des Spektrums durch signifikante Fluoreszenz, es besteht die Gefahr einer Photozersetzung der Probe bei kurzwelligen Anregungsquellen und die relativen Bandenintensitäten sind von der Laserfrequenz abhängig. [99,100,107,108]

Laut der klassischen Theorie des Raman-Effektes ist die Intensität der Raman-Streuung abhängig von einem komplexen Ausdruck, der durch eine Anzahl von Faktoren bestimmt wird und viele von diesen Faktoren sind frequenzabhängig. Die Intensität der Raman-Streuung (I_R) wird definiert als: [109]

$$I_R \propto \nu^4 I_0 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2 \quad (4.1)$$

wobei: I_0 die Intensität des anregenden Lasers ist, N ist die Anzahl der streuenden Moleküle in einem bestimmten Zustand, ν die Frequenz des anregenden Lasers, α ist die Polarisierbarkeit der Moleküle, Q ist die Schwingungsamplitude der Moleküle und der Parameter $(\partial \alpha / \partial Q)$ ist die Polarisierbarkeitsänderung oder auch der Wirkungsquerschnitt der Raman-Streuung, der eine materialspezifische Konstante bei einer bestimmten Wellenlänge ist. Wenn der Wirkungsquerschnitt der Raman-Streuung $(\partial \alpha / \partial Q)$ sowie die einfallende Laserintensität (I_0) konstant bleiben, ist die Intensität der Raman-Bande (I_R) direkt proportional zur Probenkonzentration. Bei der Raman-Spektroskopie handelt es sich jedoch um ein Einzelstrahlverfahren, deshalb können Schwankungen in Anregungsquelle, Optik und Probe ein Problem sein und somit können die Raman-Spektren unvorhersehbare Verschiebungen der absoluten Intensität und der Basislinienstabilität zeigen. Von daher kann die absolute Raman-Intensität nicht direkt für eine quantitative Analyse verwendet werden. Um quantitative Informationen zu erhalten, können verschiedene Methoden verwendet werden: (1) ein interner Standard, der teilweise einige der unkontrollierten Schwankungen in den Messungen kompensieren kann oder (2) ein

Banden-Verhältnis des Analyten, welches gegen eine andere Komponente normalisiert wird, um diese Schwankungsquellen zu beseitigen. [109,110]

4.3.1.2 Durchführung

Unter Anwendung eines dispersiven Raman-Spektrometers (*SENTERRA*, Bruker Optik GmbH, Deutschland) wurden Raman-Spektren aufgenommen. Dieses System war mit einem Olympus Lichtmikroskop BX51, einem thermoelektrisch gekühlten Charge-Coupled Device (CCD)-Detektor (-70 °C, 1024×256 Pixel) und einem Spektrograph mit zwei Gittern auf dem Mikroskop montiert. Die *OPUS* Software Version 7.2 (Bruker Optik GmbH, Deutschland) wurde für die Einstellung der Messparameter, Messungen, Bearbeitung und Auswertung einschließlich der Grundlinienkorrektur und Bandenintegration verwendet. Das Gerät arbeitet mit drei verschiedenen Anregungswellenlängen, die in Tabelle 4.2 aufgeführt sind. Die Spektren wurden bei einer kontrollierten Temperatur von $(22 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Ein Olympus Mikroskopobjektiv LWD 50x (NA = 0,50) wurde verwendet. Eine tägliche Verifizierung der relativen Linienposition wurde durchgeführt, wobei als Referenzfrequenz der Phononen-Mode eines Silizium-Wafers bei $(521,5 \pm 0,5) \text{ cm}^{-1}$ genutzt wurde.

Tabelle 4.2: Verfügbare Anregungsquellen für die μ -RS.

Parameter	Lasertyp		
	2 ω Nd:YAG-Laser ^a	He-Ne-Laser ^b	Dioden-Laser
Emissionswellenlänge / nm	532	633	785
Ausgangsleistung ^c / mW	0,2 – 20	0,2 – 20	1 – 100
laterale Auflösung ^d / μm	0,6	0,8	1,0

^a entspricht einem frequenzverdoppelten diodengepumpten Laser mit Emission bei 532 nm. [111]

^b entspricht einem Gas-Laser mit Emission bei 632,8 nm unter Luft (He-Ne-Verhältnis: 5:1). [111]

^c einstellbar auf 1, 10, 25, 50 und 100 % der maximalen Ausgangsleistung.

^d maximal Auflösung ($r = 0,61 \cdot \lambda / \text{NA}$), erreichbar durch ein Mikroskopobjektiv von LWD 50x mit NA = 0,50. [112]

4.3.2 Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission (μ -PIXE)

4.3.2.1 Das Prinzip

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der energiedispersiven Detektion der von der Probe emittierten charakteristischen Röntgenstrahlung als Folge von Ionisation innerer Schalen, welche durch den Beschuss der Probe mit einem ausreichend hochenergetischen Ionenstrahl induziert wird [99,113,114]. Während dieser Prozesse finden auch elastische Stöße (Coulomb-Abstoßung) statt und somit werden die Teilchen zurückgestreut, wobei die Kollision der Teilchen mit den Atomkernen zu einem Energieverlust führt. Die Messung der Energieverteilung der rückgestreuten Teilchen ist als Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie (engl. *Rutherford Back-scattering Spectrometry*, RBS) bekannt und liefert die nötigen Informationen, um die Elementarzusammensetzung sowie Schichtdicken bestimmen zu können [99,113,115].

Die Anregung mit einem Ionenstrahl führt zu einer höheren Ionisierungsdichte als die Anregung mit Röntgenstrahlung bei der RFA, und damit zu einer höheren Empfindlichkeit sowie zu einer geringeren analysierten Probentiefe [114]. Der Ionenstrahl, dessen Durchmesser im Submikrometerbereich ($<100\ \mu\text{m}$) liegt, besteht aus Alpha- oder anderen subatomaren Teilchen wie Protonen oder Helium-Ionen. Die Empfindlichkeit der Methode liegt je nach Element zwischen 10 und $100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [99,113].

Generell entspricht die Probenvorbereitung für Ionenstrahlanalysen derjenigen für Röntgenverfahren mit Photonen- oder Elektronenanregung [114] und wenn es sich um feste biologische Proben handelt, sind keine vorhergehenden Vorbereitungen erforderlich, wobei die Probengröße eine Beschränkung sein kann. Aber biologische Proben, wie z. B. weiches Gewebe, müssen wegen ihres hohen Wassergehalts für die PIXE-Analyse hochvakuumfest präpariert werden, z. B. durch Cryo-Fixierung. [113,114] Auch ist es möglich, histologische Präparate problemlos zu untersuchen, indem das Gewebestück entwässert und in Paraffin oder Kunststoff eingebettet wird.

4.3.2.2 Durchführung

Die μ -PIXE/RBS-Messungen wurden an der Hochenergie-Ionen-Nanosonde LIPSION^[116] (Institut für Experimentelle Physik II der Universität Leipzig) durchgeführt. Das verwendete Ionenstrahl-System besteht aus einem 3,5 MV SingletronTM-Ionen-Beschleuniger (HVE – High Voltage Engineering Europa B.V., Niederlande) mit einer Ionennanosonde (MARC – Microanalytical Research Center, Universität Melbourne, Australien). Die Messungen wurden unter Verwendung einer Protonenenergie von 2,25 MeV, einem Strom zwischen 100 und 300 pA und einer akkumulierten Ladungsmenge von etwa 400 μ C pro Messung durchgeführt. Der Strahldurchmesser betrug etwa 1 μ m. Die charakteristischen Röntgenstrahlen zur Erzeugung der PIXE-Spektren wurden durch einen HPGe-Röntgendetektor vom Typ Ultra-LEGe-Serie GUL0110 mit einer typischen Energieauflösung von 144 eV bei 5,9 keV (*Ultra Low Energie Germanium Detector*, Canberra Industries Inc., USA) detektiert. Als RBS-Detektor wurde ein ringförmiger PIPS-Detektor vom Typ ANPD300-18-300RM mit einer typischen Energieauflösung von 20 keV bei 2,25 MeV H⁺ (*Passivated Implanted Planar Silicon Detector*, Canberra Industries Inc., USA) eingesetzt. Datenaufnahme und -visualisierung erfolgten mit den Programmen *Microprobe Data Acquisition System (Micro-DAS) v.1.2* bzw. *Micro Probe System (MPSys) v.4.0* (MARC – Microanalytical Research Center, Universität Melbourne, Australien). Die aufgenommenen PIXE-Röntgenspektren wurden mit Hilfe des *GeoPIXE II*-Programms von *Ryan*^[117] (CSIRO – Earth Science and Resource Engineering, Australien) ausgewertet. Für die Auswertung von RBS-Energiespektren wurde das leistungsfähige *RUMP*-Computerprogramm von *Doolittle*^[118] (Cornell University, USA) verwendet. Rutherford-Rückstreuungsspektrometrie-Messungen wurden parallel durchgeführt, um die Matrix-Zusammensetzung des untersuchten Bereiches (C-, O- und N-Anteile) zu erhalten sowie die akkumulierten Ladungen während der μ -PIXE-Messungen zu bestimmen. Dies war notwendig, um eine quantitative Analyse zu erzielen.

Um die Probengeometrie für eine μ -PIXE-Messung an die dafür nötigen Aluminium-Probenträger (17,5×13,0 mm) anzupassen, wurden die zu untersuchenden Proben (angefertigte histologische Paraffinblöcke gestenteter Koronararterien am Schweinmodell) mit einem Skalpell (*Cutfix*®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) geschnitten und der hintere Teil mit Siliciumcarbid-Schleifpapier (P320, Korngröße 46,2 μ m, Buehler an ITW Company, USA) bis etwa 5 mm Höhe abgeschliffen. Der

erhaltene Paraffin-Schnitt wurde mit Klebstoff auf dem Al-Träger fixiert. In Abbildung 4.2 ist die Querschnittsfläche einer paraffineingebetteten, gestenteten Koronararterie dargestellt.

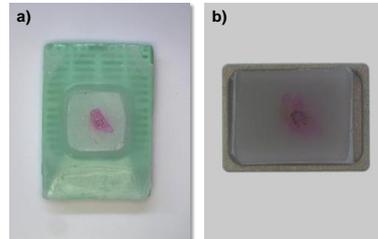


Abbildung 4.2: Lichtmikroskopische Aufnahme einer in Paraffin eingebetteten Probe vor und nach der Vorbereitung zur μ -PIXE-Messung: a) Original Paraffinblock b) Probe auf einem PIXE-Al-Träger. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a) 45,5×60,7 mm, 5x; b) 22,8×30,5 mm, 10x.

4.3.3 Lichtmikroskopie (LM)

4.3.3.1 Das Prinzip

Um in einem Objekt Details wie z. B. Länge, Tiefe und Struktur zu erkennen, dient ein Mikroskop als Sehhilfe zur vergrößernden Betrachtung und Abbildung von kleinen Gegenständen. Das Prinzip eines Mikroskops besteht aus zwei Abbildungsstufen: (1) Projektion, indem durch ein Objektiv ein vergrößertes und reelles Zwischenbild des beleuchteten Objektes erzeugt wird, und (2) Vergrößerung des Zwischenbildes, welches mit Hilfe eines Okulars vergrößert betrachtet wird. [119]

4.3.3.2 Durchführung

Zur histomorphometrischen Analyse der in Paraffin eingebetteten gestenteten Koronararterien, die mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt worden waren, wurde ein digitales Lichtmikroskop (*VHS-600D Generation II*, Keyence Corporation, Japan) verwendet, wobei die erhaltenen histologischen Bilder nach vorangegangener Justierung (Linearer Maßstab, Genauigkeit $\pm 2 \mu\text{m}$, Edmund Optics Inc., USA) mit der computergestützten Bildverarbeitung *ImageJ 1.48v* (National Institutes of Health, USA) ausgewertet wurden.

4.3.4 Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-QMS)

4.3.4.1 Das Prinzip

Ein sehr wichtiges Verfahren der direkten Festkörperanalytik, das Informationen zur Bestimmung der Spuren- und Ultrapurenelementkonzentrationen durch die Messung interessierender Isotopen liefern kann, ist die Laserablation-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-MS). Bei dieser Technik wird ein Laser zur Ablation eines kleinen Probenvolumens durch Bestrahlung verwendet. Die erzeugte Wolke verdampfter Probenteilchen wird anschließend mittels eines Gasstroms (z. B. He und/oder Ar) in einen Atomisator transportiert. Die abgetragenen Probenteilchen werden dort mit einer hochfrequenzerhitzten induktiv gekoppelten Plasma-Quelle (ICP) durch thermische Energie ionisiert. Die resultierenden Ionen werden gemäß ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) durch einen Quadrupol-Massenanalysator separiert und zur Umwandlung des Ionenstroms in ein auswertbares Signal mit Hilfe eines Detektors (z. B. ein Elektronenvervielfacher) registriert. [99–101]

4.3.4.2 Durchführung

Um eine Quantifizierung von Neodym-Spuren in realen Proben (in Paraffin eingebettete gestentete Koronararterien, die mit Mg-SEE-Stents implantiert worden waren) vorzunehmen, wurden die Messungen unter der Anwendung eines ns-Laser-Ablationssystems (*UP213 Universal Platform*, New Wave Research Inc., USA) und eines Massenspektrometers mit ICP (*Thermo Scientific XSERIES 2 ICP-MS*, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen) durchgeführt (siehe Abbildung 4.3). Das LA-System verwendet einen Nd:YAG Festkörper-Laser mit Emission bei 213 nm (Verfünffachung der Frequenz) und einer Pulsdauer von 3-5 ns. Zur Beobachtung der Probe ist das System mit einer CCD-Kamera auf einem Mikroskop montiert. Die Probenoberfläche lässt sich auf einem Probentisch in μm -Schritten in x-, y- und z-Richtung für die Ablation positionieren. Die Software *MEOLaser* Version 1.15.1.0 (New Wave Research Inc., USA) wurde für die Einstellung des Laser-Ablationssystems sowie der Messpositionen benutzt. Um die Messposition zu gewährleisten, wurde der Maßstab mit einem linearen Maßstab (Genauigkeit

$\pm 2 \mu\text{m}$, Edmund Optics Inc., USA) täglich justiert. Nach der Ablation mit den fokussierten Laserstrahlen wurden die verdampften Probenteilchen des zu untersuchenden Probenmaterials mit Helium als Trägergas in das ICP eingeleitet. Das sich anschließende MS war mit einem elektrischen Quadrupol-Massenfilter als Analysator und mit einem Elektronenvervielfacher (diskreten Dynoden) mit Konversionsdynode ausgestattet.



Abbildung 4.3: ns-LA-ICP-QMS-System.

Herstellung von Festkörper-Neodym-Standards

Zur Kalibrierung des Messsystems wurden acht Festkörper-Einzelementstandards auf Acrylatbasis mit einem jeweiligen Neodym-Massenanteil von 0, 1, 5, 15, 25, 35, 45 und $55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ hergestellt. Dies erfolgte auf Grundlage der Arbeit von *Schwartz* ^[120].

Vorbestimmte Mengen von zwei strahlenhärtenden Glanzlacken auf Acrylatbasis unterschiedlicher Viskosität (hochviskoser Glanzlack 54004, niederviskoser Glanzlack 4982700002, Schekolin AG, Liechtenstein) wurden mit dem silikonfreien Entschäumer BYK-1790 (ca. 0,5 Gew.-% bezogen auf die Gesamtformulierung) und mit dem Dispergieradditiv DISPERBYK-2155 (ca. 5 Gew.-% bezogen auf den Füllstoff) (BYK-Gardner GmbH, Geretsried) zusammen eingewogen und mit Hilfe eines Homogenisiersystems (*ULTRA-TURRAX® Tube Drive control*, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) bei einer Drehzahl von 2000 min^{-1} 3 min miteinander vermischt. Die Glanzlack-Mischung besteht aus 80 Gew.-% hochviskosem und

20 Gew.-% niederviskosem Glanzlack. Danach wurde der Polymermischung eine bestimmte Menge eines metallorganischen Komplexes (Neodym(III)-acetylacetonat-hydrat, 31,7 Gew.-% Nd, Sigma-Aldrich Co., USA) zugegeben und unter Verwendung des *ULTRA-TURRAX®*-Homogenisiersystems bei einer Drehzahl von 3000 min^{-1} 10 min vordispersiert. Die Polymermischung mit einem Nd-Gehalt von ca. $5000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wurde nach 10-minütiger Ultraschallbehandlung in einen 80 mL ZrO_2 -Mahlbecher mit 3 mm ZrO_2 -Mahlkugeln überführt und mit Hilfe einer Planetenmühle (*PULVERISETTE 6 classic line*, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) bei einer Drehzahl von 650 min^{-1} fein dispersiert. Um die Temperatur des Systems unterhalb $70 \text{ }^\circ\text{C}$ zu halten, wurde die Mischung 10 min dispersiert und 10 min pausiert, was einer effektiven Mahldauer von 60 min entspricht. Danach wurde ein Teil der erhaltenen Nd-haltigen Dispersion auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt und homogenisiert. Zur Verdünnung wurde eine Glanzlack-Mischung auf Acrylatbasis (80 Gew.-% hochviskoser und 20 Gew.-% niederviskoser Glanzlack) benutzt, die mit dem silikonfreien Entschäumer BYK-1790 und mit dem Antikrater- und Verlaufadditiv BYK-350 (je Additiv ca. 0,5 Gew.-% bezogen auf die Gesamtformulierung) (BYK-Gardner GmbH, Geretsried) zusammen eingewogen und mit Hilfe des *ULTRA-TURRAX®*-Homogenisiersystems bei einer Drehzahl von 2000 min^{-1} 3 min miteinander vermischt wurde. Anschließend wurden je $200 \mu\text{L}$ schaumfrei verdünnt. Die Nd-haltige Dispersion wurde in einen viereckigen Aluminium-Proben-träger ($12 \times 12 \times 2,0 \text{ mm}$) überführt und danach in einer Aushärtungskammer unter Argon-Atmosphäre für 5 min gelagert, bevor das Polymer mittels UV-Licht 20 min ausgehärtet wurde. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu gewährleisten, wurde die Oberfläche der Festkörper-Einzelementstandards mit zwei Siliciumcarbid-Nassschleifpapieren (Korngröße $15,3 \mu\text{m}$ -P1200- bzw. $8,4 \mu\text{m}$ -P2500-, Buehler an ITW Company, USA) bei einer Drehzahl von 300 min^{-1} 90 s an einem Schleif- und Poliergerät (*Phoenix® Beta*, Buehler an ITW Company, USA) geschliffen und zuletzt mit 2-Propanol (SeccoSolv®, Merck KGaA, Darmstadt) abgespült. Auf diese Weise ließen sich die Nd-haltigen Festkörper-Arbeitsreferenz-Materialien herstellen (siehe Abbildung 4.4).

Eine Charakterisierung der Neodym-haltigen Festkörper-Arbeitsreferenz-Materialien wurde vor der Verwendung durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2).

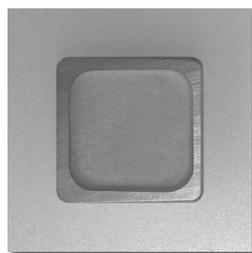


Abbildung 4.4: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Neodym-Arbeitsreferenzen-Materials. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 18,2×18,2 mm, 10x.

Randbedingungen

Auf der Grundlage der vorhergehenden Arbeiten von *Schwartz* [120] und *Thieleke* [121] wurden als Randbedingungen für die Untersuchung von Neodym in Koronararterien die folgenden, in Tabelle 4.3 aufgeführten Parameter, verwendet.

Tabelle 4.3: Arbeitsbedingungen für die Analysen mit ns-LA-ICP-QMS.

LA-System	
Laser-Typ	Nd:YAG (5 ω) ^a
Emissionswellenlänge / nm	213
Pulslänge / ns	3–5
Leistungsdichte / J·cm ⁻²	0,10 (70 %)
Pulsrate / Hz	10
Laserspotgröße / μ m	100
Ablationsmodus	Linie
Scangeschwindigkeit / μ m·s ⁻¹	10
Helium-Trägergasfluss / L·min ⁻¹	1,16
Vorspülzeit / s	30
Auswaschzeit / s	60
ICP-QMS	
Plasmaleistung / W	1400
Kühlgasfluss / L·min ⁻¹	12,86
Hilfsgasfluss / L·min ⁻¹	0,79
Ar-Zerstäubergasfluss / L·min ⁻¹	1,00
Peristaltische Pumpe / mL·min ⁻¹	0,70
Messzeit pro Isotop / ms	10
Scan-Modus	Peak Jump
Gemessene Isotope	¹³ C, ¹³⁹ La, ¹⁴⁶ Nd

^a entspricht einer Verfünffachung der Laser-Frequenz.

Um die Empfindlichkeit des ICP-QMS-Systems (Instrumentelle Drift) während der Messungen zu kontrollieren bzw. zu korrigieren, wurde eine Lanthan-Lösung ($2,0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, angesäuert mit einer 2 %igen HNO_3 -Lösung -*subboiled*-) kontinuierlich durch einen konzentrischen Quarz Zerstäuber (Meinhard-Typ) und eine Zyklon-Sprühkammer mit Hilfe des Zerstäubergases Argon eingeführt. Nach jeder Inbetriebnahme des ICP-QMS wurde mit einer Tuning-Lösung die Empfindlichkeit für ${}^7\text{Li}$, ${}^{115}\text{In}$, ${}^{208}\text{Pb}$ sowie die Oxid-Bildungsrate im Plasma durch die Messung des Verhältnisses ${}^{140}\text{Ce}{}^{16}\text{O}/{}^{140}\text{Ce}$ ($\leq 2 \%$) überprüft. Die Software *Qtegra ISDS* Version 2.4.1538.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) wurde für die Einstellung der Messparameter und die Durchführung der Messungen sowie für die Datenverarbeitung verwendet.

Homogenität der Arbeitsreferenzmaterial / Kalibrierbereich

Vor einer Erstellung der Kalibrierfunktion wurde jedes Arbeitsreferenzmaterial mit fünf parallelen kontinuierlichen Linienscans mit einer Länge von $600 \mu\text{m}$ und mit einem Abstand zwischen den Linien von $200 \mu\text{m}$ ablatiert und die Homogenität des Materials durch die relative Standardabweichung der ${}^{13}\text{C}$ - und ${}^{146}\text{Nd}$ -Messsignale (siehe Tabelle A5.4 im Anhang) überprüft. Aufgrund des begrenzten Volumens der Laserkammer (30 cm^3) erfolgte die Kalibrierung nur mit fünf Neodym-Arbeitsreferenzmaterialien für den folgenden Kalibrierbereich: $0 - 35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Dieser Kalibrierbereich wurde im Laufe vorhergehender Tests ermittelt.

4.4 Weitere Charakterisierung

Zur Untersuchung medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme war es erforderlich, die Charakterisierung sowohl des Empfängergewebes als auch der selbst hergestellten Referenzmaterialien vorzunehmen. Die dafür notwendigen Analysen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.4.1 Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes mittels Verbrennungsanalyse (VA)

4.4.1.1 Das Prinzip

Als Verbrennungsanalyse werden verschiedene Analysetechniken bezeichnet, die vor allem zur Bestimmung von leichten Elementen, wie Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff in organischen Verbindungen eingesetzt werden. Wie der Name andeutet, beruht das Verfahren darauf, dass die zu analysierenden Proben entweder in einem Pyrolysereaktor mit einem Katalysator oder in einem beheizten Ofen unter oxidierender Atmosphäre verbrannt werden. Die entstehenden Gase wie Wasser, Kohlenstoffdioxid, Stickstoff und Schwefeldioxid werden mit Hilfe einer Trägergaszufuhr entweder mit Wärmeleitfähigkeitdetektor oder mit Infrarotdetektor registriert. [99,101]

4.4.1.2 Durchführung

Unter Anwendung eines Kohlenstoff- und Schwefelanalysators (CS-2000, ELTRA GmbH, Haan) wurden die entsprechenden Proben analysiert. Dieses System ist mit einer Kombination von Induktions- und Widerstandsofen sowie mit Infrarotmesszellen als Detektionseinheit des Verbrennungsgases CO₂ ausgestattet. 10 – 80 mg der Probe (je nach Probe) wurden direkt in einen Verbrennungstiegel der entsprechenden Apparaturen eingewogen. Die vollständige Umsetzung des Kohlenstoffs in den Proben erfolgte in reinem Sauerstoffstrom bei einer Temperatur von 1350 °C. Vor den Messungen wurde der Analysator mit zwei zertifizierten Kohlenstoff-Kalibrationsstandards (59,4 % und 83,0 %, ELTRA GmbH, Haan) kalibriert. Unter den oben genannten Bedingungen wurde der Kohlenstoffgehalt der im Folgenden gelisteten Proben analysiert.

Gewebe-Proben

Die in Paraffin eingebetteten Koronararterien ohne Stent wurden mit Xylol (≥ 99 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) entparaffiniert, mit 2-Propanol (SeccoSolv®, Merck KGaA, Darmstadt) abgespült und zuletzt bei ungefähr 40 °C für 5 min getrocknet (siehe Abbildung 4.5a).

Einbettungsmaterial

Das Paraffin (Erstarrungspunkt 56-58 °C, Merck KGaA, Darmstadt) wurde zuerst klein geschnitten und dann der Kohlenstoffgehalt nach Einwaage direkt bestimmt (siehe Abbildung 4.5b).

Arbeitsreferenzmaterialien

Die mit Neodym dotierten Festkörper auf Acrylatbasis für die Kalibrierung des ns-LA-ICP-QMS wurden geschnitten (Schnittdicke bis 4 mm) und anschließend direkt gemessen (siehe Abbildung 4.5c).

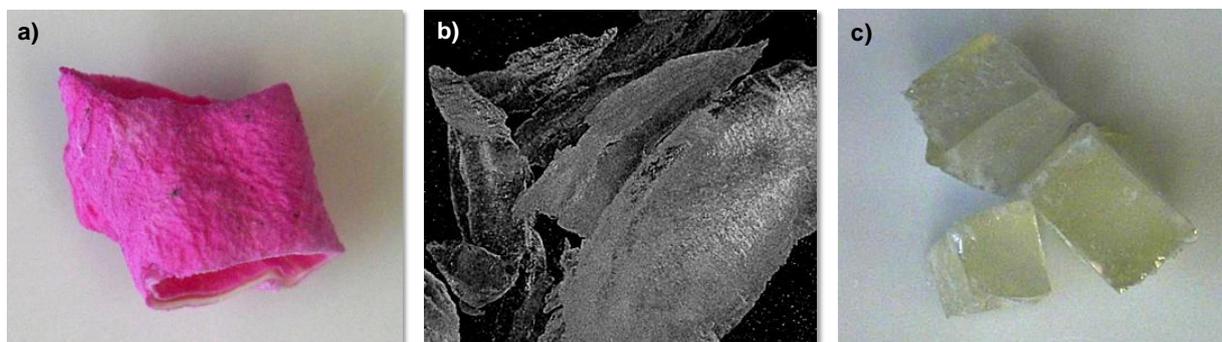


Abbildung 4.5: a) Koronararterie vom Schwein, b) Paraffin und c) Neodym-haltige Festkörper-Einzelementstandards auf Acrylatbasis. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 6,36×5,45 mm, 20x.

4.4.2 Bestimmung des tatsächlichen Elementgehaltes der Neodym-Arbeitsreferenzenmaterialien mittels ICP-OES

Um die Festkörper-Arbeitsreferenzmaterialien zu charakterisieren, wurde der tatsächliche Nd-Massenanteil mittels Optischer Emissionsspektroskopie (OES) mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP) quantifiziert (das wesentliche Prinzip des Analyseverfahrens wurde schon in Abschnitt 4.2.2 erwähnt).

Durchführung

Für die Ermittlung des Analytgehaltes wurden von den Neodym-dotierten Festkörpern auf Acrylatbasis mit einem Nominal-Massenanteil zwischen 1 und 55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ jeweils drei Proben der Massen 150-200 mg entnommen. Mit Hilfe eines Mikrowellenaufschlusses (*turboWAVE*, MLS GmbH, Leutkirch) wurde jede dieser Proben mit einer Aufschlusslösung (2,0 mL 65 %ige HNO_3 -*subboiled*- + 1,2 mL Reinstwasser [$0,054 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]) rückstandsfrei aufgelöst. Daneben wurden Aliquote sowohl von den verwendeten Chemikalien (konz. HNO_3 -*subboiled*- + Reinstwasser) als auch von einer zertifizierten Neodym-Standardlösung ($[1000,5 \pm 2] \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\rho = 1,011 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) zur Kontrolle bzw. zur Bestimmung der Wiederfindungsrate eingesetzt. Das entsprechende Mikrowellen-Temperaturprogramm ist in Tabelle A5.1 im Anhang aufgeführt. Nach dem Aufschluss der Neodym-dotierten Festkörpern auf Acrylatbasis wurden die erhaltenen Lösungen mit einer 2 %igen HNO_3 -Lösung (*subboiled*) auf etwa 25 g verdünnt.

Der Neodym-Massenanteil wurde mithilfe eines ICP-OES (*Spectro Arcos*, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve) (siehe Tabelle A1.1 im Anhang, Messparameter) analysiert. Die Einstellung der Messparameter sowie die Datenverarbeitung erfolgten durch die Software *Smart Analyzer Vision* Version 4.02.0834 (Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve).

Die Quantifizierung der mikrowellenbehandelten Proben erfolgte über externe Kalibration mittels fünf Standardlösungen, denen Neodym in unterschiedlichen Konzentrationen (zwischen 10 und 100 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) zugesetzt wurde. Alle Lösungen wurden mit einer 2 %igen HNO_3 -Lösung (*subboiled*) angesäuert. Die Konzentrationen der Standards wurden nach einer semiquantitativen Analyse so gewählt, dass die Gehalte der zu untersuchenden Proben im mittleren Bereich der Kalibriergeraden lagen. Drei empfindliche und störungsfreie Neodym-Emissionslinien wurde zur Quantifizierung berücksichtigt (siehe Tabelle A5.2 im Anhang). Jede Lösung der Kalibrierstandards sowie der Probe wurde dreimal gemessen. Aus den Messwerten für jede Neodym-Spektrallinie wurden mit Hilfe der Kalibriergeraden und unter Berücksichtigung der Verdünnung und der Wiederfindungsrate (WFR) der Neodymgehalt in den entsprechenden Proben sowie die dazugehörigen Messunsicherheiten berechnet. Die Ermittlung der Messunsicherheit (U) erfolgte nach QUAM ^[102] mit einem Erweiterungsfaktor $k = 2$

(dies entspricht einem Vertrauensniveau von ungefähr 95 %). Das erhaltene Ergebnis war der Mittelwert aus der Auswertung von jeweils drei ungestörten Messlinien. Während der Messungen wurde eine Gerätedrift von 1,5 % nicht überschritten, weshalb eine Driftkorrektur nicht erforderlich war.

Untersuchung des zeitabhängigen Abbaus von Poly(*L*-lactid) auf beschichteten Metallstents

Der erste Teil dieser Arbeit stellt die Entwicklung und die Anwendung einer neuen analytischen Methode unter Einsatz von Raman Spektroskopie für die quantitative Charakterisierung des zeitabhängige Abbaus einer passiven Beschichtung aus teilkristallinem, biodegradierbarem Poly(*L*-lactid) [*L*-PLA] auf einem permanenten metallischen koronaren Stent vor.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu untersuchen, inwieweit der Restgehalt von *L*-PLA auf beschichteten Metallstents, die in Schweinearterien implantiert und anschließend in einem zweiten Polymer (Polymethylmethacrylat, PMMA) eingebettet worden waren, identifiziert und quantifiziert werden kann. Hierfür wurde die Mikro-Raman Spektroskopie eingesetzt.

5.1 Untersuchte Proben

Als Proben wurden Querschnittspräparate gestenteter Schweine-Koronararterien nach Experimenten unterschiedlicher Dauer und Explantation untersucht. Die Metallstents bestanden aus einer nicht abbaubaren Kobalt-Chrom-Legierung, die eine Beschichtung aus biokompatiblen und biodegradierbarem Poly(*L*-lactid) mit einer relativ hohen Molmasse ($M_w = 650 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) aufwies. Als Einbettmaterial wurde biokompatibles Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet.

Die Stents wurden vor der Implantation mit einer PLA-Schicht von ca. 25 µm überzogen und nach der Explantation in PMMA eingebettet. In Abbildung 5.1 ist ein typischer Schnitt durch eine Stent-Strebe gezeigt.

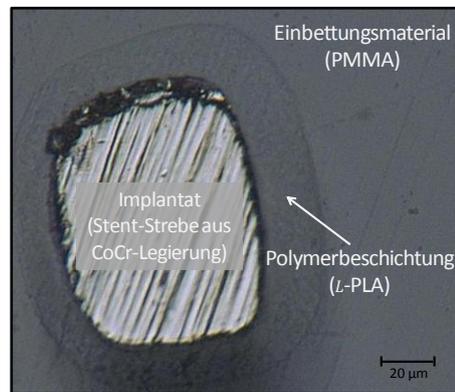


Abbildung 5.1: Lichtmikroskopische Detailaufnahme von einem Querschnitt durch eine Stent-Strebe. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 170×145 µm, 1000x.

Die Zusammenhänge zwischen Probe, Stentlokalisierung in den Koronararterien des Tierversuchs und der Verweildauer im tierischen Organismus sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Untersuchte Proben und verwendete Bezeichnung

Bezeichnung	Koronararterie	Implantationsdauer / Monat
P1.1	(Kontrollprobe)	0
P1.2	LCx	6
P1.3	LCx	
P1.4	LAD	
P1.5	LCx	12
P1.6	LAD	
P1.7	RCA	
P1.8	LCx	24
P1.9	RCA	
P1.10	LCx	36
P1.11	LAD	
P1.12	RCA	

LAD: Vorderwandkoronararterie, LCx: linke Circumflexarterie, RCA: rechte Koronararterie

5.2 Charakterisierung der Stent-Komponenten und des Einbettungsmaterials

Im nächsten Schritt wurden unterschiedliche analytische Methoden eingesetzt, um die Stent-Komponenten und das Einbettungsmaterial zu charakterisieren. Mit der Mikro-Röntgenfluoreszenzspektrometrie (μ -RFA) erfolgte die Bestimmung der Zusammensetzung des metallischen Stents. Das für die Beschichtung verwendete Polymer-Material (teilkristallin, mit relativer hoher Molmasse Poly(L-lactid)) und das Einbettmaterial (Polymethylmethacrylat) wurden nach ihren thermischen Eigenschaften und Kristallinität mittels Dynamischer Differenzialkalorimetrie (DSC) und Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) charakterisiert. Schließlich wurde auch die Mikro-Raman Spektroskopie (μ -RS) eingesetzt, um die charakteristischen Banden bzw. die chemische Bindungen der entsprechenden Polymere zu identifizieren.

5.2.1 Zusammensetzung der Legierung

Da die Eigenschaften einer Legierung in hohem Maße von ihrer Zusammensetzung abhängen ^[122] und die Komponenten unterschiedliche Legierungen bilden können ^[123], wurde untersucht, ob die Zusammensetzung der Stents dem Nominalwert entspricht. Die metallischen Streben der Kontrollprobe (Probe P1.1) wurden zuerst einer qualitativen Analyse unterzogen, bei der höher konzentrierte Legierungskomponenten nachgewiesen wurden.

In Abbildung 5.2 ist das von der μ -RFA erhaltene energiedispersive Röntgenfluoreszenz-Spektrum für den Stent dargestellt. Aus dem Spektrum lassen sich die Hauptbestandteile Kobalt, Chrom, Wolfram und Nickel neben Eisen und Mangan nachweisen. Darüber hinaus liegen einige Signale im Energie-Bereich zwischen 2,5-3,5 keV, die den Rhodium-Linien der Röntgenröhre des Geräts entsprechen und für die Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

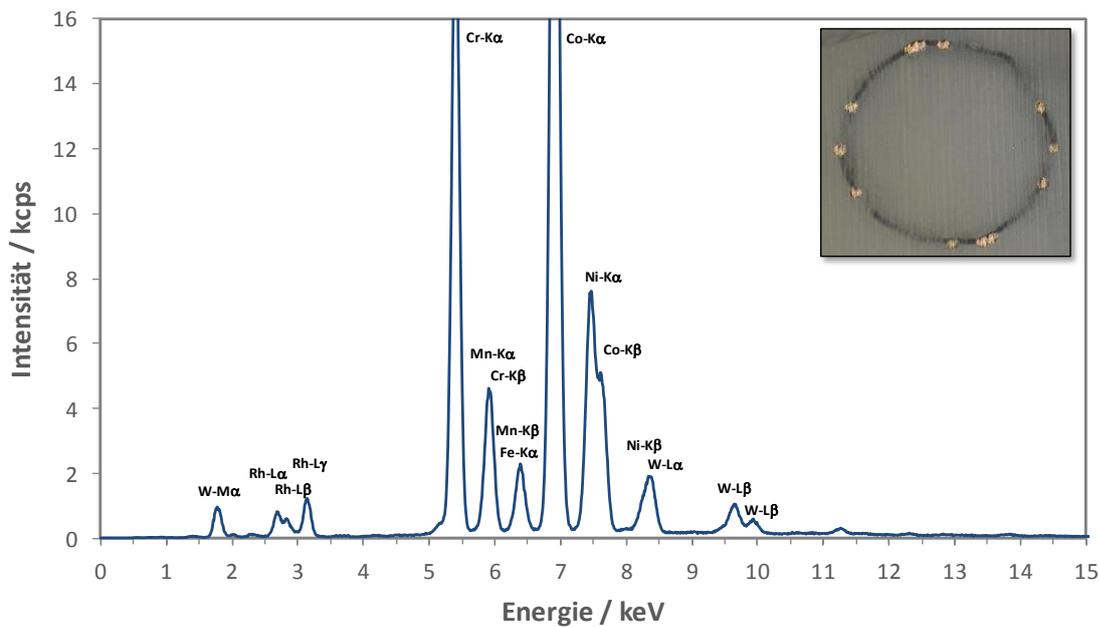


Abbildung 5.2: Energiedispersives Röntgenfluoreszenzspektrum des untersuchten Stents (Rh-Röntgenröhre, Leistung 40 kV / 125 μ A, unter moderatem Vakuum, Si(Li)-Detektor, Messzeit 250 s). Oben rechts: Lichtmikroskop-Aufnahme der untersuchten Probe. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 3,2 \times 2,5 mm, 50x.

Die anhand der Röntgenlinien qualitativ bestimmten metallischen Bestandteile der Kontrollprobe wurden quantitativ ausgewertet. Das erhaltene Ergebnis ist der Mittelwert aus der Auswertung von jeweils zehn zufällig ausgewählten Stellen auf den metallischen Streben der Probe. Die auf 100 % normierten quantitativen Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

Tabelle 5.2: Chemische Zusammensetzung des metallischen Stents.

Element	Massenanteil / Gew.-%	Nominal-Gehalt ^a / Gew.-%
Co	(50,2 \pm 0,3)	Rest
Cr	(19,4 \pm 0,1)	20 \pm 1
W	(15,1 \pm 0,1)	15 \pm 1
Ni	(11,0 \pm 0,1)	10 \pm 1
Fe	(2,27 \pm 0,01)	\leq 3
Mn	(2,00 \pm 0,01)	\leq 2

^a Angabe nach DIN ISO 5832-5 [124].

Die mittlere Zusammensetzung wurde der Kobalt-Chrom-Legierung L605 zugeordnet. Die ermittelten Werte liegen nahe an der Nominalzusammensetzung und sind in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Bereich.

5.2.2 Polymere Bestandteile

Da der Abbauprozess und die Eigenschaften eines biodegradierbaren Polymers im Allgemeinen abhängig von seiner Morphologie oder Kristallinität sowie seiner chemischen Strukturen sind ^[125] und insbesondere der Kristallinitätsgrad die hydrolytische Abbaukinetik beeinflusst ^[126], wurden in den folgenden Abschnitten 5.2.2.1 und 5.2.2.2 Kristallinität und thermische Eigenschaften untersucht. Als Untersuchungsmaterial wurden die Rohpolymere (pulverförmiges *L*-PLA, das vom Hersteller der Polymerbeschichtung verwendet wurde und Technovit[®] 9100 PMMA Pulver) analysiert.

5.2.2.1 Kristallinität

Das Röntgen-Pulverdiffraktogramm des Poly(*L*-lactid)s (siehe Abbildung 5.3) besitzt einen Reflex relativ hoher Intensität bei 16,6 °, gefolgt von einem zweiten Reflex bei 19,0 ° mit relativ niedriger Intensität. Zwischen 10 ° und 16 ° weist das Spektrum zwei Reflexe bei 12,4 ° und 14,7 ° auf. In dem Bereich zwischen 20 ° und 40 ° folgen viele Reflexe mit niedrigen Intensitäten. Darüber hinaus ist ein deutlicher Anstieg der Untergrundintensität im Intervall $5^\circ \leq 2\theta \leq 30^\circ$ zu sehen. Dies kann am röntgenamorphen Anteil (Domäne) im Polymer liegen, denn *L*-PLA ist ein teilkristallines Polymer, das aus kristallinen und amorphen Phasen besteht ^[24]. Die stärksten vier gemessenen Reflexe teilkristallines Poly(*L*-lactid)s entsprechen den Literaturangaben ^[127,128]. Das Beugungssignal beim Winkel von 16,6° entspricht dem (200)- oder (110)-Reflex, während dem Winkel-Wert von 19,0° der (203)-Reflex zuzuordnen ist. Dieses *L*-PLA-Beugungsmuster ist charakteristisch für eine orthorhombische Struktur ^[128-130].

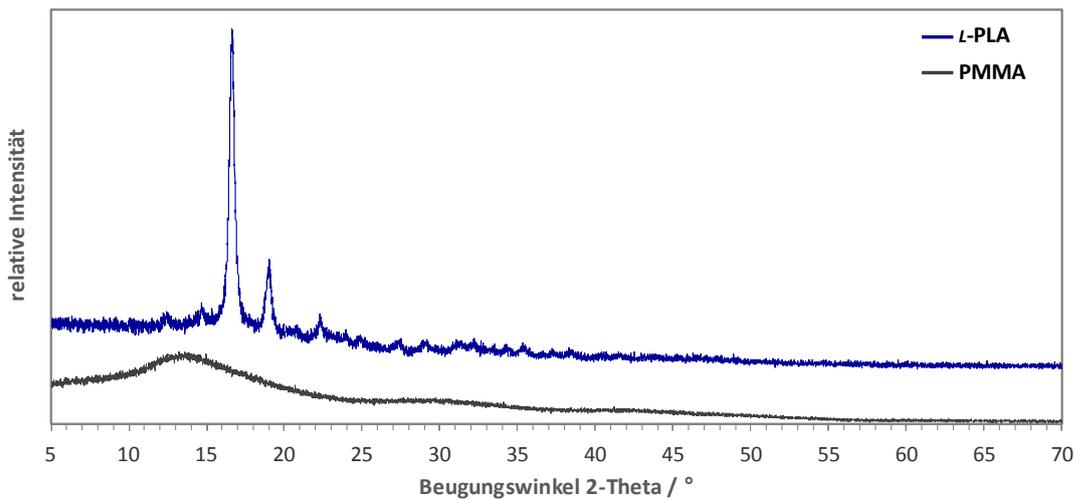


Abbildung 5.3: Röntgen-Pulverdiffraktogramme von Poly(L-lactid) mit einer relativ hohen Molmasse und Polymethylmethacrylat. (Cu-K α_1 mit $\lambda = 0,154060$ nm, Röhrenleistung: 40 kV / 30 mA, Transmissions-Modus, Aufnahmegeschwindigkeit: 0,4 °·min⁻¹).

Im Gegensatz zu *L*-PLA treten keine Beugungspeaks bei PMMA auf. Stattdessen sind drei flache Erhebungen im Diffraktogramm (sogenannte Glashügel, laut Literatur^[103]) bei den Beugungswinkel von ungefähr 14 °, 30 ° und 42 ° zu beobachten, was auf die amorphe Natur des PMMA hindeutet^[131-134].

5.2.2.2 Thermische Eigenschaften

In Abbildung 5.4 ist das DSC-Thermogramm von *L*-PLA und PMMA zu sehen. Das Diagramm zeigt eine typische Aufheizkurve eines teilkristallinen Polymers (*L*-PLA) und eines amorphen Polymers (PMMA). Die *L*-PLA-DSC-Kurve weist neben einer Glasübergangstemperatur (T_g) bei $(61,1 \pm 0,2)$ °C eine Rekristallisationstemperatur (T_k) bei $(121,7 \pm 0,9)$ °C und eine Schmelztemperatur (T_m) bei $(178,3 \pm 0,3)$ °C auf. Diese Werte liegen im erwarteten Bereichen [T_g : (50 – 70) °C; T_m : (170 - 190) °C; $T_g < T_k < T_m$]^[24,135]. Darüber hinaus zeigt PMMA wie erwartet aufgrund der amorphen Struktur keinen Schmelzpeak. Die Glasübergangstemperatur liegt bei $(95,5 \pm 0,2)$ °C und ist in Übereinstimmung mit dem entsprechenden Literatur-Wert [T_g : (95 – 106) °C]^[136].

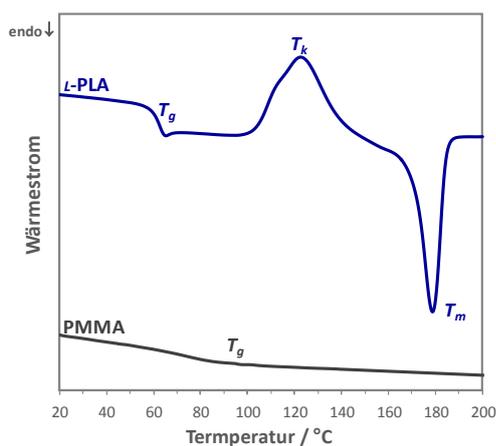


Abbildung 5.4: DSC-Thermogramme von Poly(L-lactid) mit einer relativ hohen Molmasse und Polymethylmethacrylat. T_g : Glasübergangstemperatur, T_k : Rekristallisations-Temperatur, T_m : Schmelztemperatur. (2. Aufheizung, Heizrate: 10 K·min⁻¹, Spülgas: N₂).

5.2.2.3 Charakteristische Raman-Spektren

Die Raman-Spektren von reinem L-PLA und PMMA mit den wichtigsten Banden sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Die zugeordneten molekularen Schwingungen sind in den Tabellen 5.3 und 5.4 aufgeführt.

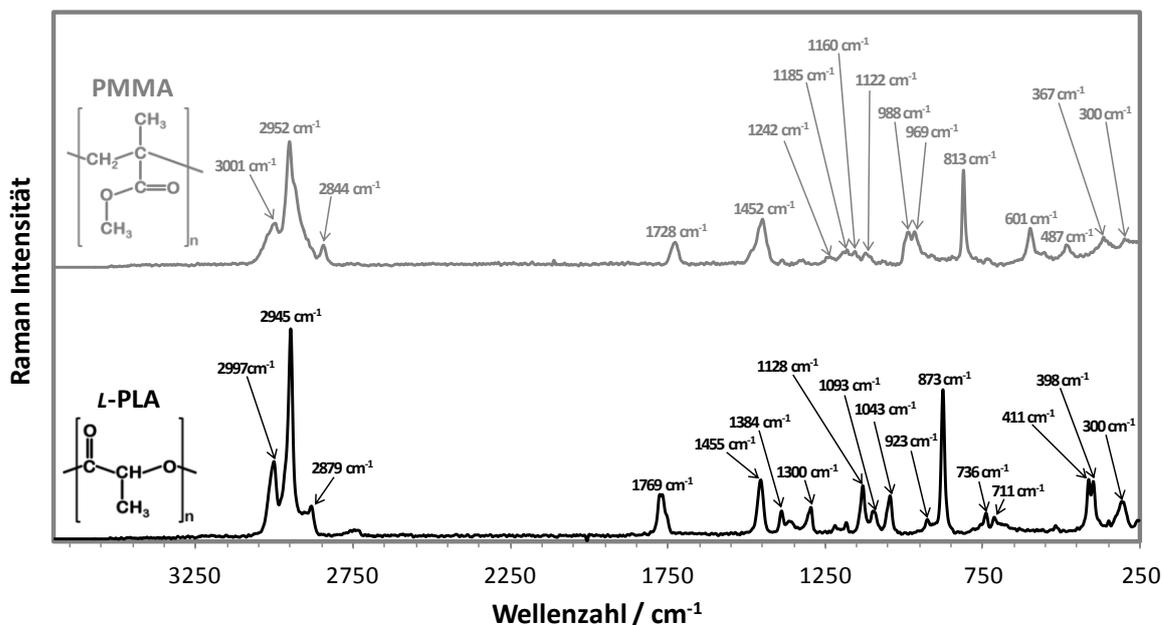


Abbildung 5.5: Charakteristische Raman-Spektren von Poly(L-lactid) und Polymethylmethacrylat bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm. (HeNe-Laser, Leistung: 5 mW, Messzeit: 10 s; Spektralaufösung: 4 cm⁻¹).

Charakteristische Banden im Bereich $3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ wurden als C–H-Valenzschwingungen der $-\text{CH}_3-$ und $-\text{CH}_2-$ -Gruppen identifiziert. Allerdings wurden die Hauptbanden im Bereich der Raman-Spektren unterhalb von 1800 cm^{-1} (siehe Abbildung 5.5) beobachtet. Die Bande mit der C=O-Streckschwingung von L-PLA erscheint bei 1769 cm^{-1} [24,137,138] und bei 1728 cm^{-1} für PMMA [139]; entsprechend werden die Banden im Bereich von 1500 bis 800 cm^{-1} überwiegend der $-\text{CH}_3-$, C–H-Deformationsschwingung und der C–O–C-Valenzschwingung zugeordnet. Die asymmetrische Deformationsschwingung der $-\text{CH}_3$ Gruppe beider Polymere wurde bei etwa 1450 cm^{-1} beobachtet [24,137–139]. Wie von *Kister et al.* [137,138] berichtet, und später von *Auras et al.* [24] bestätigt, ist die C–COO-Streckschwingung der Wiederholeinheiten von L-PLA verantwortlich für die sehr starke Bande bei 873 cm^{-1} , die sowohl teilkristallinen als auch amorphen Polymeren zugeordnet wird. Dagegen liegt die stärkste Bande für PMMA bei 813 cm^{-1} , sie wird der symmetrischen C–O–C-Deformationsschwingung zugeordnet [139]. Zusätzlich enthält das L-PLA-Spektrum im niederfrequenten Spektralbereich unterhalb von 800 cm^{-1} fünf Banden, die den verschiedenen C=O-, CCO- und COC-Deformationsschwingungen [24,137,138] entsprechen (siehe Tabelle 5.3). Die vier Banden im PMMA-Spektrum entsprechen den verschiedenen CCO-Deformationsschwingungen [139] (siehe Tabelle 5.4).

Aus Abbildung 5.5 ist auch ersichtlich, dass es möglich ist, die zwei Polymere spektral zu unterscheiden, da sie chemisch betrachtet unterschiedlich sind. Im C–H-Streckschwingungs-Bereich zwischen 3100 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} lassen sich L-PLA und PMMA nur wenig unterscheiden, zwei von den drei Banden überlagern sich, während der sehr kleine Unterschied der dritten Bande beider Polymere nicht signifikant ist. Im Bereich unterhalb von 1800 cm^{-1} zeigen die Spektren dagegen gut zu unterscheidende Banden. Diese Unterschiede liegen also in der Fingerprint-Region, in der sowohl L-PLA als auch PMMA starke Banden aufweisen: bei 873 cm^{-1} für L-PLA und bei 813 cm^{-1} für PMMA. Mithilfe dieser Banden können die zwei Polymere zuverlässig identifiziert werden.

Tabelle 5.3: Zuordnungen der Raman-Banden für L-PLA.

Wellenzahl / cm ⁻¹	Molekül/Gruppe	Schwingungsmode ^a
2997	-CH ₃	C-H antisymmetrische Streckschwingung
2945	-CH ₃	C-H symmetrische Streckschwingung
2879	-CH-	C-H symmetrische Streckschwingung
1769	-O-CO-	C=O Streckschwingung
1452	-CH ₃	C-H antisymmetrische Deformationsschwingung
1384	-CH ₃	C-H symmetrische Deformationsschwingung
1300	-CO-CH(CH ₃)-O-	CH Deformationsschwingung
1128	-CH ₃	CH ₃ Schaukelschwingung
1093	-CH(CH ₃)-O-CO-	COC symmetrische Streckschwingung
1043	-CH(CH ₃)-	C-CH ₃ Streckschwingung
923	-CH(CH ₃)-	C-C Streckschwingung + CH ₃ Schaukelschwingung
873	-CH(CH ₃)-O-CO-	C-COO Streckschwingung
736	-O-CO-	C=O <i>in-plane</i> Deformationsschwingung
711	-O-CO-	C=O <i>out-plane</i> Deformationsschwingung
411	-CO-CH(CH ₃)-O-	CCO Deformationsschwingung
398	-CO-CH(CH ₃)-O-	CCO Deformationsschwingung
300	-CH(CH ₃)-O-CO-	COC Deformationsschwingung

^a Zuordnung nach Literatur ^[24,137,138].

Tabelle 5.4: Zuordnungen der Raman-Banden für PMMA.

Wellenzahl / cm ⁻¹	Molekül/Gruppe	Schwingungsmode ^a
3001	-O-CH ₃ , -C-CH ₃	C-H antisymmetrische Streckschwingung
2952	-CH ₂ -, -O-CH ₃ , -C-CH ₃	C-H antisymmetrische Streckschwingung
2844	-O-CH ₃ , -C-CH ₃	C-H symmetrische Streckschwingung
1728	-C-COO-	C=O Streckschwingung
1452	-O-CH ₃ , C-CH ₃ , -CH ₂ -	C-H antisymmetrische Deformation
1242	-C-O-CO-	O-C antisymmetrische Streckschwingung
1185	-C-O-CO-	O-C antisymmetrische Streckschwingung
1160	-C-O-CO-	O-C antisymmetrische Streckschwingung
1122	C-CH ₃ / C-CH ₂ -	C-C Streckschwingung
988	-O-CH ₃	CH ₃ Schaukelschwingung
969	C-CH ₃	CH ₃ Schaukelschwingung
813	-CO-O-CH ₃	COC symmetrische Deformationsschwingung
601	-C-CO-O-	CCO symmetrische Deformationsschwingung
487	-C-CO-O-	CCO <i>out-of-plane</i> Drehschwingung
367	-C-CO-O-	CCO <i>in-plane</i> Deformationsschwingung
300	-C-CO-O-	CCO <i>in-plane</i> Deformationsschwingung

^a Zuordnung nach Literatur ^[139].

5.3 Mikro-Raman-spektroskopische Untersuchung des Abbauprozesses einer Poly(L-lactid)-Beschichtung eines metallischen koronaren Stents

Wie in Abschnitt 5.2.2.3 dargelegt wurde, unterscheiden sich die beiden Polymere in ihrer chemischen Struktur deutlich. Um diese Unterschiede der Polymere in der Gewebeprobe zu detektieren, wurden Raman-spektroskopische Untersuchungen an verschiedenen in PMMA eingebetteten L-PLA-beschichteten Koronarstents nach Experimenten unterschiedlicher Dauer und nach Explantation durchgeführt. Durch die Anwendung von Mikro-Raman-Spektroskopie als zerstörungsfreie und nichtinvasive Methode ließen sich die Proben ohne spezielle Probenbehandlung und mit einer lateralen Auflösung von wenigen Mikrometern spektroskopisch analysieren. Darüber hinaus konnte Poly(L-lactid) durch geeignete Wahl der Versuchsparameter sowie Anwendung angepasster Referenzmaterialien sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden. Die Herstellung von Referenzmaterialien einer PLA/PMMA-Mischung erfolgte durch das gemeinsame Ausfällen aus der Lösung. Die thermischen Eigenschaften der hergestellten Referenzmaterialien wurden mittels DSC charakterisiert.

5.3.1 Optimierung der experimentellen Randbedingungen für die Raman-spektroskopische Untersuchungen von PLA in einer PMMA-Matrix

Da die verschiedenen instrumentellen Parameter (Laserfrequenz, Laserleistung, Mikroskopobjektiv, Lochblende und Messzeit) einen großen Einfluss auf die Raman-Intensität ausüben^[109] (siehe Gleichung 4.1, Seite 37), wurden Vortests durchgeführt, um den bestmöglichen Kompromiss zwischen einer hohen Empfindlichkeit (hohes Signal-Rausch-Verhältnis) und minimaler Interferenz (Fluoreszenz, Absorption, Photodegradation) zu erzielen^[140,141].

Zur Reduzierung der Anzahl der verschiedenen Kombinationen aller instrumentellen Parameter wurden einige davon wie folgt festgelegt: Ein Mikroskopobjektiv von LWD 50x mit NA = 0,50 wurde ausgewählt und die Lochblende wurde auf 50x1000 µm eingestellt. Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen sowie die Messzeiten und die thermischen Belastungen der

Proben zu minimieren, wurde jedes Raman-Spektrum im Spektralbereich von 3600 bis 250 cm^{-1} für eine Integrationszeit von 2 s mit fünf Akkumulationen (Spektren-Mittelwertbildung) aufgenommen. Dies entspricht einer Messzeit von 10 s.

Für die Optimierung wurde ein histologisches Schnittpräparat aus der Kontrollprobe (Probe P1.1, siehe Tabelle 5.1) verwendet.

5.3.1.1 Auswahl der Anregungswellenlänge

Da die Intensität der Raman-Streuung sich mit der vierten Potenz der Frequenz ändert ^[109,142] (siehe Gleichung 4.1, Seite 37), spielt die Auswahl der Anregungswellenlänge eine wichtige Rolle. Daher wurden Spektren der Probe mit dem dispersiven Raman-Spektrometer (siehe Abschnitt 4.3.1.2) mit drei verschiedenen Laserquellen (532 nm, 633 nm und 785 nm) aufgenommen.

In Abbildung 5.6 sind die erhaltene Raman-Spektren der Test-Probe dargestellt, welche auf der gleichen Messposition mit den in Tabelle 4.2 (siehe Kapitel 4, Seite 38) gelisteten Laserquellen angeregt wurden.

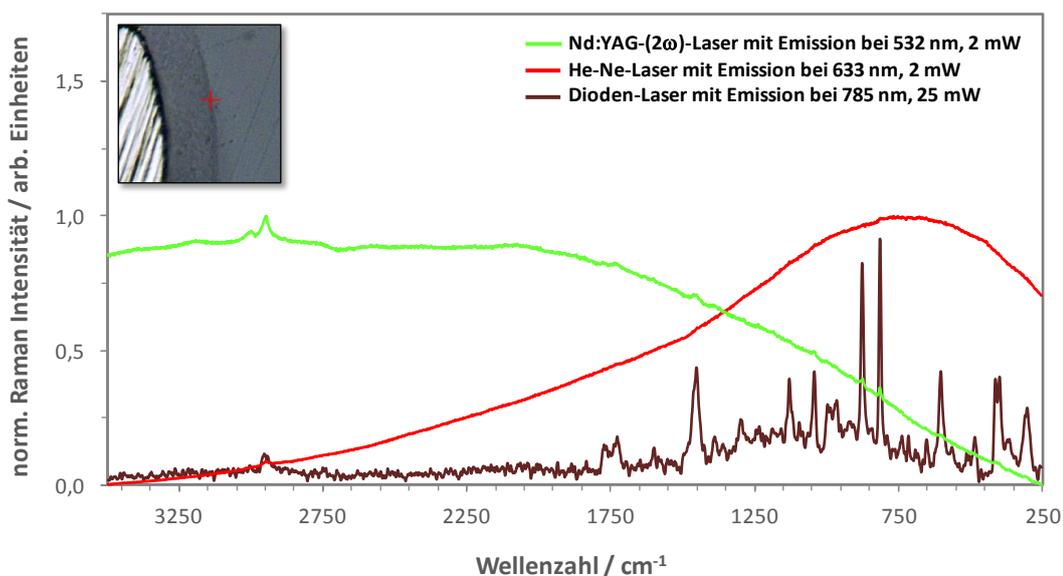


Abbildung 5.6: Vergleich der Raman-Spektren der untersuchten Probe bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen (Messzeit: 10 s, Spektralaufösung: 4 cm^{-1}). Oben links: eine lichtmikroskopische Aufnahme der untersuchten Probe mit der markierten Messposition. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: $77\times 75\text{ }\mu\text{m}$, 1000x.

Aus der Abbildung 5.6 wird deutlich, dass aufgrund der von der Probe erzeugten starken Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 532 und 633 nm eine Überlagerung des sehr stark ausgeprägten Fluoreszenzuntergrundes und dem Raman-Signal stattfindet. Wie zu erwarten war, tritt bei einer Anregungswellenlänge im emittierten Nahinfrarot-Spektralbereich bei 785 nm keine störende Fluoreszenz auf (siehe braunes Spektrum in Abbildung 5.6). Die Störung durch Fluoreszenz kann entweder von Verunreinigungen oder von der Probe selbst herrühren [143,144]. Nach Literaturangaben können ca. 95 % der Polymere wegen unlöschbarer Fluoreszenz mittels Raman Spektroskopie bei einer Anregung im sichtbaren Bereich nicht analysiert werden [110]. Verglichen mit der Fluoreszenz-Intensität ist die Intensität der Raman-Streuung sehr klein [145], weil die Quantenausbeute der Fluoreszenz als Konkurrenzprozess zum Raman-Effekt um etwa den Faktor 10^6 intensiver ist [141,143]. Diese Überlagerung von Fluoreszenz und Raman-Streustrahlung der gleichen Wellenlänge führt deshalb zur Verfälschung der Raman-Intensitäten und erhöht das Untergrundrauschen [145]. Laserquellen, die im blauen oder grünen Spektralbereich emittieren, haben einen Vorteil im Vergleich zu den anderen Quellen, da mit ihnen Raman-Linien erzeugt werden können, die intensiver als die bei gleicher Leistung mit einer Quelle höherer Wellenlänge angeregten Linien sind. [99] Demgegenüber stehen jedoch mögliche Probleme mit einer zunehmenden Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Fluoreszenz und unerwünschter photochemischer Reaktionen [146]. Nahinfrarotquellen haben im Vergleich zu den kurzen Wellenlängen zwei große Vorteile. Erstens können sie mit höherer Leistung betrieben werden, ohne eine Photozersetzung der Probe zu verursachen. Zweitens haben sie nicht genügend Energie, um in den meisten Molekülen eine signifikante Anzahl an fluoreszenz erzeugender, elektronisch angeregter Zustände zu besetzen. Daher tritt mit diesen Laser-Quellen keine Fluoreszenz auf oder eine, die eine geringe Intensität hat. Diodenlaser bei 785 nm und 830 nm reduzieren in den meisten Fällen die Fluoreszenz erheblich. [99]

5.3.1.2 Auswahl der Laserleistung

Das Raman-Signal ist proportional zur Leistung der Laserquelle, aber diese sollte unterhalb der thermischen Zersetzungsgrenze der Probe bleiben. Deshalb hängt die zulässige Laserleistung von der Laserwellenlänge und von den Probeneigenschaften (Absorption, Wärmeleitfähigkeit) ab [142]. Die Ausgangsleistung an der Probe, die zu

ausreichend intensiven Raman-Signalen innerhalb kurzer Messzeit (z. B. einige Sekunden) führt, sollte im Spektralbereich zwischen 400 nm und 600 nm bei einigen 10 mW und zwischen 600 nm und 800 nm bei bis zu einigen 100 mW liegen [147]. Um die optimale Laserleistung zu ermitteln, wurden Spektren der Test-Probe mit einem Dioden-Laser bei unterschiedlichen Ausgangsleistungen aufgenommen. Die erhaltenen Raman-Spektren sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Alle Aufnahmen wurden an der gleichen Messposition bei 785 nm Anregungswellenlänge erhalten.

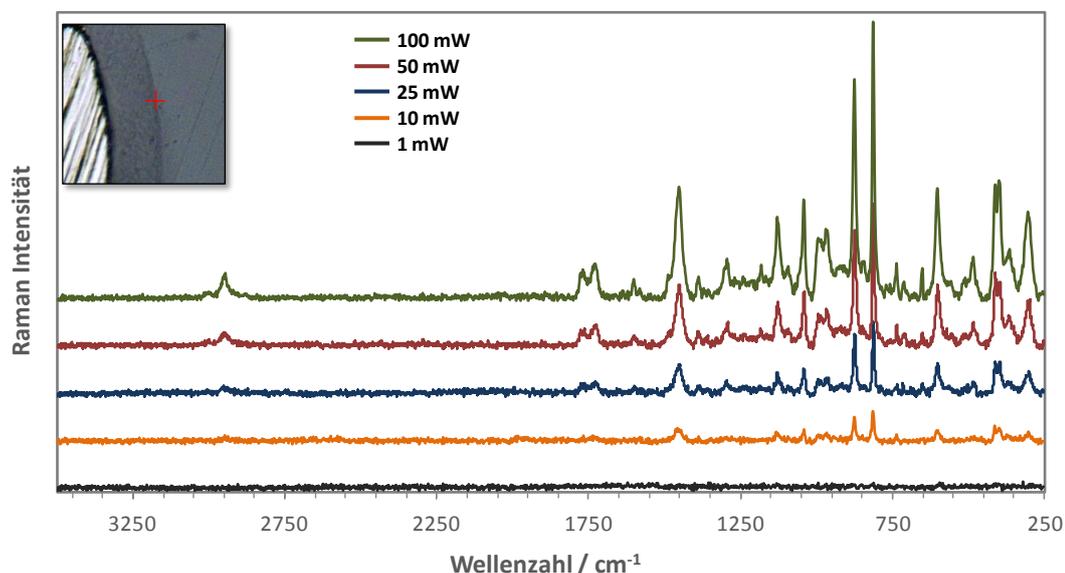


Abbildung 5.7: Vergleich der Raman-Spektren der Test-Probe bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm mit verschiedenen Ausgangsleistungen. (Dioden-Laser, Messzeit 10 s; spektrale Auflösung 4 cm^{-1}). Oben links: lichtmikroskopische Aufnahme der untersuchten Probe mit der markierten Messposition. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: $77 \times 75 \text{ }\mu\text{m}$, 1000x.

Aus der Abbildung 5.7 ist ersichtlich, dass im schwarzen Spektrum (Laserleistung 1 mW) keine Bande auftritt. Das bedeutet, dass die Anregungsintensität nicht groß genug ist, um die Probe anzuregen. Eine relativ niedrige Banden-Intensität weisen die Spektren auf, die mit den Ausgangsleistungen von 10 mW bzw. 25 mW aufgenommen wurden. Wie erwartet, werden bei einer höheren Anregungsintensität (50 mW bzw. 100 mW) deutlich intensivere Banden erhalten. Trotz Anregung mit intensiverer Laserleistung (100 mW) wurden unter dem Lichtmikroskop (VHS-600D Generation II, Keyence Corporation, Japan) weder thermische Zersetzung noch Oberflächenveränderungen auf dem bestrahlten Proben-Bereich beobachtet. Bei

einer Anregung mit 785 nm wird jedoch das Raman-Signal um einen Faktor von etwa 3,5 verringert (im Vergleich zu einer kurzen Anregungswellenlänge). Um dies zu kompensieren, wird typischerweise die Laserleistung erhöht ^[141]. Darüber hinaus sind in den Raman-Spektren auch charakteristische Banden im Wellenzahlbereich unterhalb 1800 cm⁻¹ deutlich zu sehen, während trotz des hohen Anteils an C-H-Bindungen in beiden Polymeren nur sehr schwache charakteristische Banden im C-H-Valenzschwingungs-Bereich um 2900 cm⁻¹ erkennbar sind. Das liegt daran, dass die Empfindlichkeit des CCD-Detektors im tiefen Rot-Bereich (bei etwa 1000 nm) sehr schwach ist. Somit wird eine Abschwächung der C-H-Banden bei der Vermessung mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm beobachtet ^[148]. In diesem Fall ist dies kein Problem, da die zwei Polymere PLA und PMMA im Bereich unterhalb von 1800 cm⁻¹ gut voneinander unterscheidbar sind (siehe Abschnitt 5.2.2.3).

5.3.1.3 Auswahl der spektralen Auflösung

Die spektrale Auflösung ist immer ein Kompromiss zwischen mehr Information bei einer großen spektralen Auflösung und einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis bei einer geringeren spektralen Auflösung ^[149]. Wichtig ist es, bei der Optimierung der Messparameter eine gute Auflösung mit einer kurzen Messzeit und dem bestmöglichen Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, wobei gleichzeitig eine hohe Signalintensität erzeugt werden soll.

Die Optimierung der spektralen Auflösung wurde unter Anwendung der bereits optimierten Parameter durch Messung von Spektren bei zwei unterschiedlichen Auflösungen vorgenommen. Eine Darstellung der beiden erhaltenen Spektren findet sich in Abbildung 5.8.

In Abbildung 5.8 ist deutlich zu sehen, dass die unterschiedlichen spektralen Auflösungen der Spektren zu unterschiedlichen Intensitäten des Raman-Signals (Signal-Rausch-Verhältnis) führen. Weiterhin zeigt sich die höhere spektrale Auflösung von 4 cm⁻¹ im Vergleich zu 12 cm⁻¹ anhand der CCO-Deformations-Schwingungs-Doppelbanden bei 398 cm⁻¹ und 411 cm⁻¹ (siehe Detail in Abbildung 5.8). Allerdings werden auch die stärksten Banden für PLA bei 873 cm⁻¹ und für PMMA bei 813 cm⁻¹ mit einer spektralen Auflösung von 12 cm⁻¹ noch aufgelöst. Auch mit der niedrigeren spektralen Auflösung wird daher die

gewünschte spektrale Information erhalten, wobei auch ein maximales Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wurde. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb eine spektrale Auflösung von 12 cm^{-1} ausgewählt.

Die im Rahmen der Optimierung erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

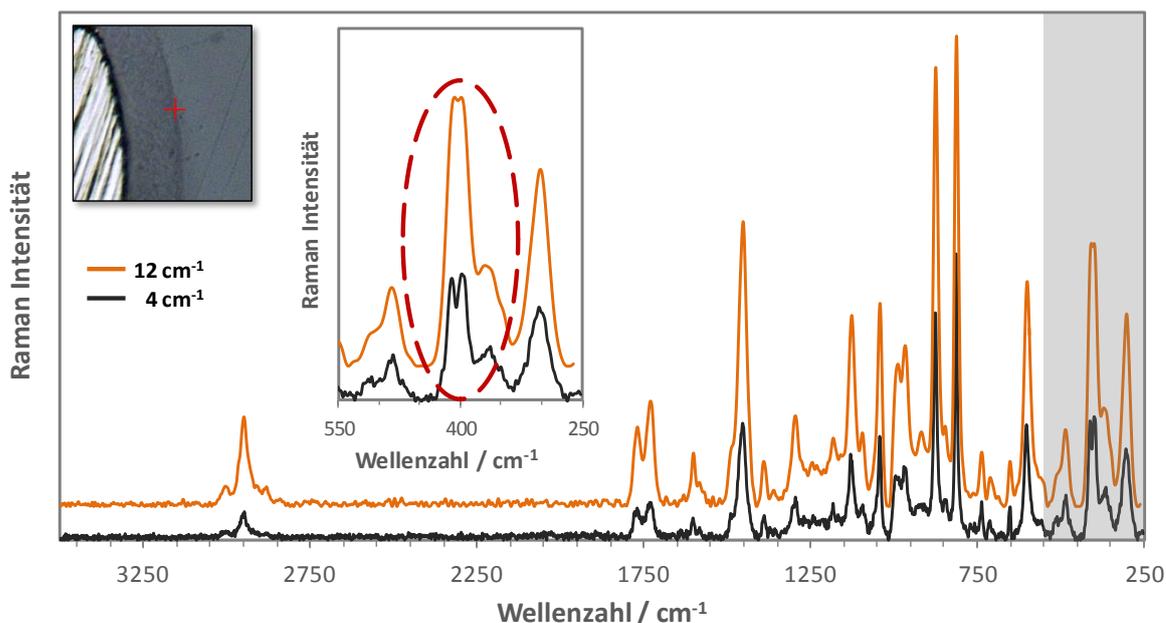


Abbildung 5.8: Vergleich der Raman-Spektren der untersuchten Test-Probe bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm mit zwei unterschiedlichen spektralen Auflösungen. Vergrößerung im Bereich $550\text{-}250\text{ cm}^{-1}$. (Laserleistung 100 mW, Messzeit 10 s). Oben links: lichtmikroskopische Aufnahme der Test-Probe mit der markierten Messposition. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: $77\times 75\text{ }\mu\text{m}$, 1000x.

Tabelle 5.5: Optimierte Parameter für die μ -Raman-spektroskopischen Untersuchungen von L-PLA in einer PMMA-Matrix.

Mikroskop	
Objektiv	LWD 50x (NA=0,50)
Lochblende	50x1000 μm
Raman-Spektrometer	
Anregungsquelle	Dioden-Laser
Emissionswellenlänge / nm	785
Laserleistung / mW	100
Spektrale Auflösung / cm^{-1}	12
Messzeit / s	10

5.3.2 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Polylactid-Beschichtung eines metallischen koronaren Stents

Für diese Arbeit ist die Bestimmung der noch vorhandenen *L*-PLA-Restbeschichtung in Abhängigkeit von der Verweildauer des Implantats und der Position in den Koronararterien von grundlegender Bedeutung, denn dadurch kann der chemische Abbaumechanismus des biodegradierbaren Polymers im Tiermodell bestätigt werden. Eine Quantifizierung des Polylactid-Restgehalts ist jedoch eine große analytische Herausforderung, weil:

- a. die Proben PLA-beschichtete Metallstents sind, die in einem zweiten Polymer PMMA eingebettet wurden. Das PMMA ist dadurch auch als Matrix in der aufgearbeiteten Probe verteilt, weil im Präparationsschritt die Flüssigkeit, die das Gewebe durchtränkte, durch das zum PMMA polymerisierende Methylmethacrylat ersetzt wurde [150,151]. Aus diesem Grund handelt es sich bei diesen Proben um eine komplexe Matrix.
- b. der Analyt *L*-PLA sich in einer Schicht mit einer Dicke im unterem μm -Bereich befindet und dadurch die Quantifizierung mit hoher Ortsauflösung vorgenommen werden muss.
- c. eine Quantifizierung von PLA die Herstellung von Referenzmaterialien (in diesem Fall Mischungen von PLA und PMMA) voraussetzt, die kommerziell nicht zur Verfügung stehen.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Aspekte wurden folgende Arbeitsschritte ausgeführt, um die analytischen Probleme zu lösen. Um die, aufgrund der komplexen Matrix notwendige, Selektivität zu erzielen, und die erforderliche Ortsauflösung zu erreichen, wurde die konfokale μ -RS eingesetzt, denn die charakteristischen Banden für den Analyt und das Einbettungsmaterial sind deutlich (selektiv) getrennt (siehe Abschnitt 5.2.2.3 und Abbildung 5.5, Verwendung der C–COO-Streckschwingung bei 873 cm^{-1} für PLA und der C–O–C symmetrischen Deformationsschwingung bei 813 cm^{-1} für PMMA). Mit dieser Methode treten für beide Polymere keine störenden Banden auf. Da während des Einbettungsprozesses das PMMA als Matrix in den aufzuarbeiteten Proben verteilt worden ist, kann das PMMA mit PLA gemischt werden und die resultierenden Blends können als Arbeitsreferenzmaterialien für die Quantifizierung eingesetzt werden. Hierfür muss ein geeignetes Herstellungsverfahren gefunden werden (siehe Abschnitt 5.3.2.1). Außerdem kann das PMMA-Signal als interner Standard zur

Korrektur der absoluten Raman-Intensität verwendet werden (wie in Abschnitt 4.3.1.1 erwähnt wurde).

Da der Analyt und das Einbettungsmaterial aus zwei unterschiedlichen Polymeren (PLA und PMMA) bestehen, wurden die Referenzmaterialien zur Quantifizierung von *L*-PLA auf der Basis einer Mischung dieser beiden Polymere (Polymerblend) hergestellt. Dadurch wird eine teilweise Matrixanpassung erreicht.

5.3.2.1 Auswahl der Herstellungsverfahren für polymere Mischsysteme

Laut Literatur^[152] kann das Verfahren zur Herstellung von Polymermaterialien, die Eigenschaften von zwei unterschiedlichen Polymeren vereinigen, grundsätzlich auf drei Wegen erfolgen: Mischung in der Schmelze, Mischung durch gemeinsames Ausfällen aus der Lösung und Mischen der Polymerkomponenten durch Copolymerisation. Obwohl diese drei genannten Verfahren normalerweise im Labor und auch im technischen Maßstab Anwendung finden^[153], werden zur Herstellung von PLA/PMMA-Blends bevorzugt die Verfahren „Mischung in der Schmelzen“ oder „Mischung durch gemeinsames Ausfällen aus Lösung“ verwendet. Beim direktesten Verfahren, dem Mischen der Polymere in der Schmelze, werden allerdings geeignete Homogenisierungsvorrichtungen benötigt (Walzen, Extruder oder Knetter^[152,154]), die nicht im Labor zu Verfügung standen.

Für den Fall der Mischung von amorphen oder teilkristallinen Polylactiden mit Polymethylmethacrylat können durch verschiedene Verfahren verschiedene Homogenitätsgrade erreicht werden^[155-157]. Es ist zu erwarten, dass PLA/PMMA-Blends aus teilkristallinem Poly(*L*-lactid) und amorphem Polymethylmethacrylat nur unter Einhaltung genau definierter Bedingungen mischbar sind^[158-162]. Jedoch zeigten einige Untersuchungen, dass mehrphasige Blends aus dieser Kombination erhalten werden und dass der Kristallinitätsgrad von *L*-PLA in den Polymerblends mit dem Anstieg des PMMA-Gehaltes sinkt. Dies deutet darauf hin, dass die Komponenten teilweise mischbar sind^[155,156,159,161]. Dagegen sind PLA/PMMA-Blends aus zwei amorphen Polymeren (*D,L*-PLA und PMMA) laut Literatur^[155,156] mischbar (einphasiges System), wenn das entsprechende Blend unter Ausfällen durch Zugabe eines Fällungsmittels erzeugt wurde.

Bei der Auswahl des Herstellungsverfahrens für den Polymerblend musste berücksichtigt werden, dass sowohl homogene Mischungen erreicht werden als auch eine Durchführung im Labor realisiert werden kann. Aus diesem Grund kam im Rahmen dieser Arbeit nur das gemeinsame Ausfällen aus der Lösung in Frage. Die Anwendung dieses Verfahrens ist für den vorliegenden Anwendungsfall (durch die Verwendung von zwei amorphen Polymeren) eingeschränkt, da das zu untersuchende *L*-PLA teilkristallin vorliegt. Ein zweites Problem besteht in der hohen Molmasse des teilkristallinen *L*-PLA und in der Mischbarkeit eines Polymerblends, die von der Molmasse der entsprechenden Polymerkomponenten abhängig ist [163–165]. Die Mischbarkeit in den Blends ist thermodynamisch wahrscheinlicher, wenn die Polymerkomponenten niedrige Molmasse besitzen [166], wodurch die Beweglichkeit der Ketten erhöht werden kann, was eine Zunahme der Mischungsentropie bedeutet [152,154].

5.3.2.2 Einfluss der Molmasse und Kristallinität von PLA auf die Raman-Intensität

Da die kristalline Struktur und die Molmasse der Polymerkomponenten einer Polymermischung (Polymerblend) eine entscheidende Rolle spielen, wurden PLA/PMMA-Blends hergestellt, um die Einfluss der Molmasse und der Kristallinität von PLA auf die Raman-Intensität zu untersuchen. Dafür wurden drei unterschiedlichen Polylactiden und ein Polymethylmethacrylat verwendet. Die verwendeten Polymere sind in Tabelle 5.6 aufgelistet, während die zur Charakterisierung der verwendeten Polymere genutzten Röntgen-Pulverdiffraktogramme, DSC-Thermogramme und Raman-Spektren der Polymere in den Abbildungen 5.9 bis 5.11 dargestellt sind.

Die Röntgen-Pulverdiffraktogramme in Abbildung 5.9 zeigen, dass beide teilkristallinen *L*-PLA deutliche Reflexe aufweisen (eine Zuordnung der Reflexe befindet sich in Abschnitt 5.2.2.1), während das *D,L*-PLA und das PMMA, wie erwartet, völlig röntgenamorph sind und im Diffraktogramm keine diskreten Reflexe zeigen. Dies wurde auch durch die DSC-Untersuchung bestätigt. Die Thermogramme der beiden *L*-PLA-Proben sind in der Abbildung 5.10 dargestellt und zeigen einen für teilkristalline Materialien typischen Verlauf [104,167]. Die Kurven zeigen eine Glasübergangsstufe, eine exotherme Rekristallisation und einen endothermen

Schmelztemperaturbereich der Kristallite. Die *D,L*-PLA- und PMMA-DSC-Kurven zeigen dagegen das Thermogramm eines amorphen, thermoplastischen Kunststoffes [104,167]. Hier ist nur eine Glasübergangstufe detektierbar.

Tabelle 5.6: Überblick ausgewählter Eigenschaften der verwendeten Polymere sowie der entsprechenden Hersteller.

Eigenschaft	<i>L</i> -PLA	<i>L</i> -PLA	<i>D,L</i> -PLA	PMMA
Struktur	teilkristallin	teilkristallin	amorph	amorph
Molmasse ^a , M_w / $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$	650	120	16,3	120
Tg / °C	(61,1 ± 0,7)	(66,0 ± 0,1)	(39,6 ± 0,7)	(99,7 ± 0,7)
Tm / °C	(178,3 ± 0,3)	(177,5 ± 0,2)	-	-
Inhärente Viskosität ^{a,b} / $\text{dL}\cdot\text{g}^{-1}$	≥ 7	1,0	0,20	0,20
Hersteller	Boehringer Ingelheim	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich

^a Herstellerangabe.

^b 0,1 % in CHCl_3 bei 25 °C.

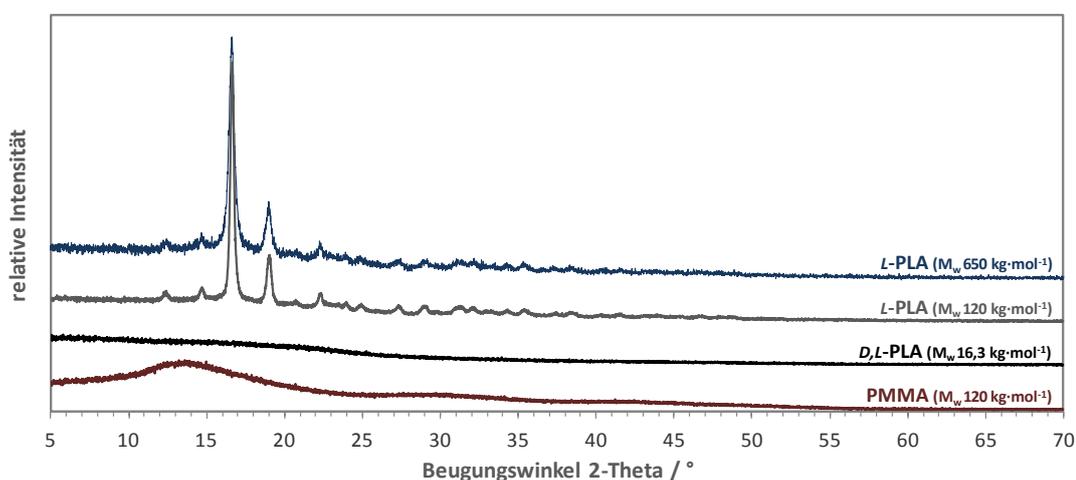


Abbildung 5.9: Röntgen-Pulverdiffraktogramme von unterschiedlichen Polyactiden und Polymethylmethacrylat. ($\text{Cu-K}\alpha_1$ mit $\lambda = 0,154060$ nm, Röhrenleistung 40 kV / 30 mA, Transmissionsmodus, Aufnahme-geschwindigkeit $0,4$ °·min⁻¹).

Darüber hinaus lassen sich die teilkristallinen und amorphen Polyactide mittels Raman-Spektroskopie unterscheiden (siehe Abbildung 5.11). Beim teilkristallinen

Poly(lactid) (*L*-PLA) zeigen sich vier charakteristische Banden bei 923, 873, 736 und 711 cm^{-1} . Das amorphe PLA zeigt nur zwei Banden bei 873 und 736 cm^{-1} (eine Zuordnung der Banden befindet sich in Abschnitt 5.2.2.3).

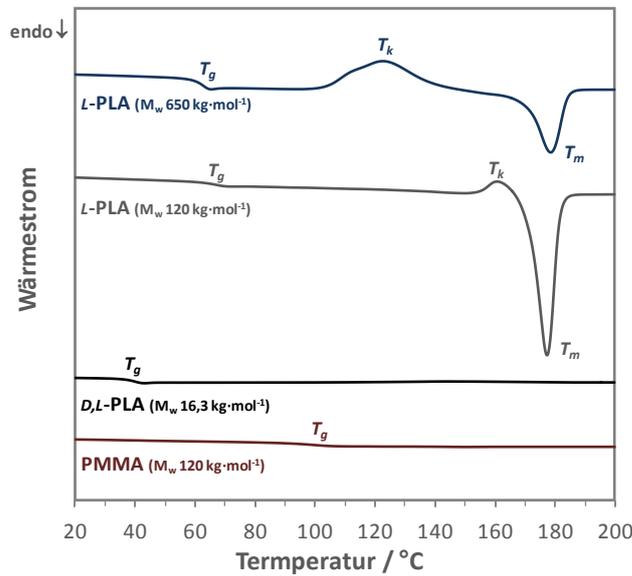


Abbildung 5.10: DSC-Thermogramme der verwendeten unterschiedlichen Polylactide und Polymethylmethacrylat. T_g : Glasübergangstemperatur, T_k : Rekristallisationstemperatur, T_m : Schmelztemperatur. (2. Aufheizung, Heizrate 10 $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$, Spülgas N_2).

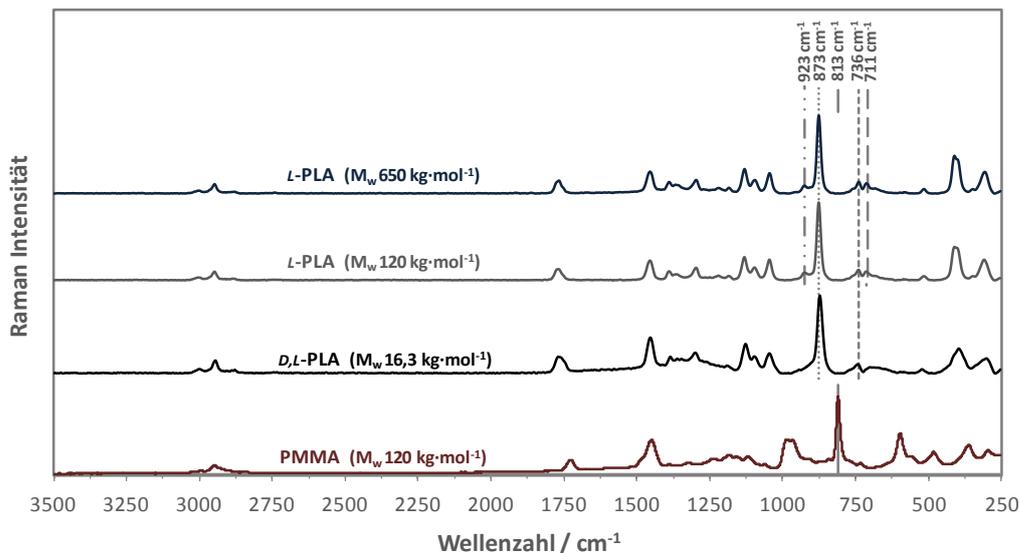


Abbildung 5.11: Raman-Spektren von drei unterschiedlichen Polylactiden und Polymethylmethacrylat bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm. (Dioden-Laser, Leistung 100 mW, Messzeit 10 s; spektrale Auflösung 12 cm^{-1}).

Zur Kontrolle der Mischbarkeit beider Polymere wurden drei PLA/PMMA-Blends mit einem PLA-Massenanteil von 12,5 Gew.-% hergestellt (siehe Abschnitt 5.3.2.3), wobei für jeden Blend ein anderes der drei in Tabelle 5.6 aufgeführten Polylactide verwendet wurde. Die DSC-Thermogramme der PLA/PMMA-Blends sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Die entsprechenden DSC-Ergebnisse sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

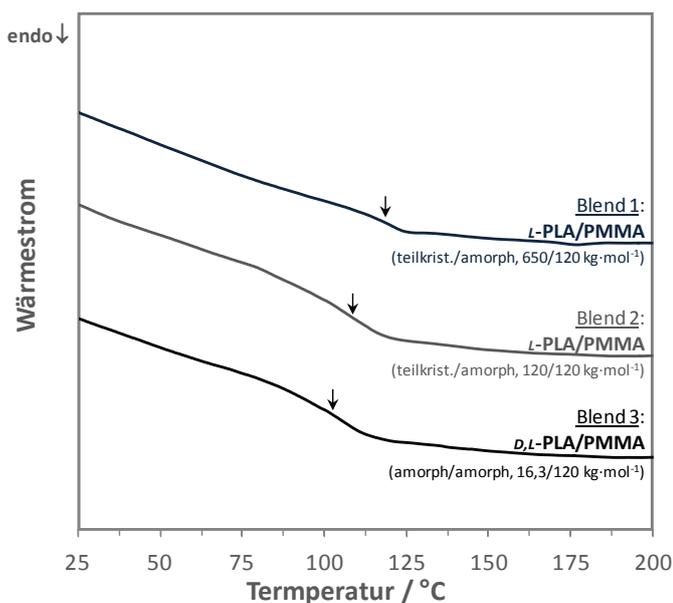


Abbildung 5.12: DSC-Thermogramme der drei PLA/PMMA-Blends mit unterschiedlichen PLA-Ausgangsmaterialien. Die Pfeile zeigen den Glasübergangsbereich (2. Aufheizung, Heizrate von 10 K·min⁻¹, N₂ als Spülgas).

Tabelle 5.7: Eigenschaften der für die Herstellung der PLA/PMMA-Blends eingesetzten Komponenten mit den entsprechenden DSC-Ergebnissen der thermischen Charakterisierung.

Blend	Struktur der Komponenten		M _w ^a der Komponenten		T _g / °C	T _m / °C
	PLA	PMMA	PLA	PMMA		
1	teilkristallin		650		(119,1 ± 0,9)	n.d. ^b
2	teilkristallin	amorph	120	120	(108,7 ± 0,3)	n.d. ^b
3	amorph		16,3		(103,1 ± 0,3)	-

^a Angegebene Molmasse, M_w in kg·mol⁻¹.

^b nicht detektierbar.

Die DSC-Ergebnisse zeigen, dass die Kurven der 2. Aufheizung des PLA/PMMA-Blends mit einem PLA-Massenanteil von 12,5 Gew.-% eine einzige T_g aufzeigen (siehe Abbildung 5.12). Dies bedeutet, dass die PLA/PMMA-Blends ein thermodynamisch mischbares System im amorphen Zustand bilden. Die Glasübergangstemperatur T_g , die eine entsprechende numerische Darstellung eines Glasübergangsbereiches ist [168], wird oft als Kriterium für die Beurteilung der Verträglichkeit oder Mischbarkeit von Polymerblends verwendet [156]. Eine Mischung von zwei miteinander mischbaren Polymeren im amorphen Zustand zeigt nur eine einzige Glasübergangstemperatur, die abhängig von der Zusammensetzung ist. Im Gegensatz dazu zeigt die Mischung von zwei nicht miteinander mischbaren Komponenten zwei T_g -Werte (Retention der T_g -Werte der beiden Einzelkomponenten) mit zwei separaten Phasen, die unabhängig von der Zusammensetzung sind. [156,161,169]

Im vorliegenden Fall war es bei den Blends mit teilkristallinem *L*-PLA (Blend 1 und 2) schwierig, die endothermen Schmelzpeaks mittels DSC zu detektieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit teilkristallinem *L*-PLA hergestellte PLA/PMMA-Blends, in denen der PMMA-Gehalt höher als 70 Gew.-% ist, keine Kristallisationspeaks von *L*-PLA in den DSC-Kurven ergeben [155,156,159], weil das amorphe PMMA die Kristallisation von *L*-PLA einschränkt. Außerdem ist gut zu erkennen, dass die T_g des Blends mit der Abnahme der Molmasse des PLA leicht sinkt (siehe Abbildung 5.12 und Tabelle 5.7), weil bei niedrigeren Molmassen die Kettenbeweglichkeit erhöht und damit die T_g erniedrigt wird [167].

Für jedes der hergestellten PLA/PMMA-Blends wurden zehn Raman-Spektren aufgenommen, ausgewählte Spektren sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Die Spektren aller drei Blends in Abbildung 5.13 sind sehr ähnlich und zeigen keine deutlichen Unterschiede, denn die Anzahl der Signale und die Symmetrie der Banden scheinen alle gleich zu sein. Darüber hinaus sind die Intensitäten der charakteristischen Banden von PLA und PMMA aller drei Blends vergleichbar (siehe Abbildung 5.13). Um dies zu bestätigen, wurden die Bandenflächen von PLA bei 873 cm^{-1} und PMMA bei 813 cm^{-1} integriert, gemittelt und die relativen Flächenverhältnisse der Raman-Banden $A_{873}^{\text{PLA}}/A_{813}^{\text{PMMA}}$ berechnet. In Tabelle 5.8 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Flächenverhältnisse der drei Blends aufgeführt.

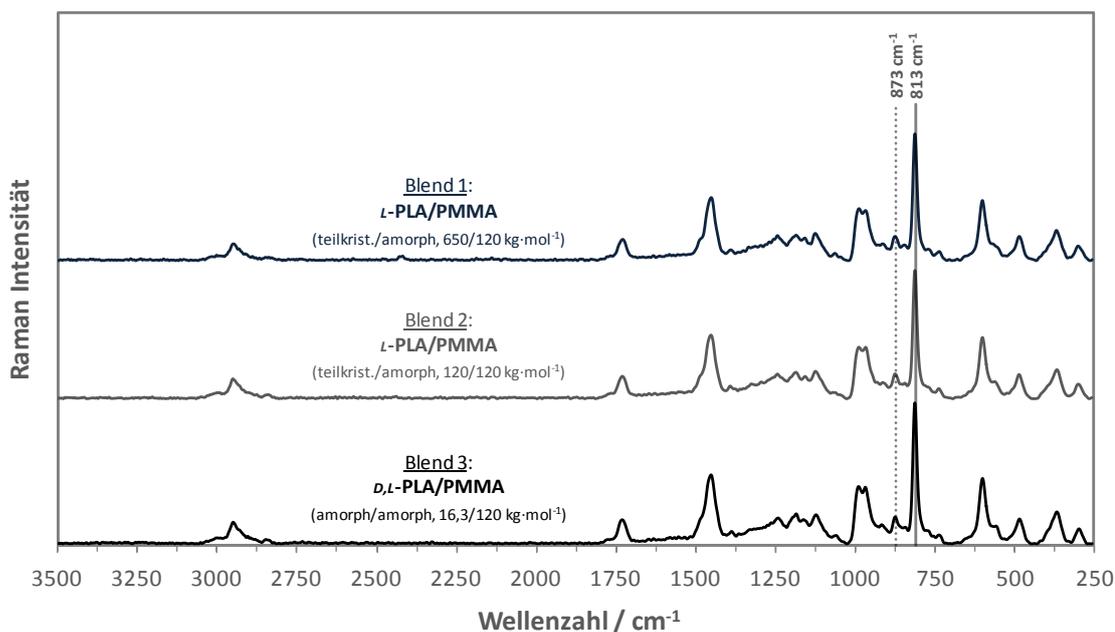


Abbildung 5.13: Raman-Spektren der drei unterschiedlichen PLA/PMMA-Blends bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm. (Dioden-Laser, Leistung 100 mW, Messzeit 10 s; spektrale Auflösung 12 cm⁻¹).

Tabelle 5.8: Raman-Bandenflächen der drei PLA/PMMA-Blends mit unterschiedlichen Polylactid-Komponenten.

Blend	Struktur der Komponenten		M_w^a der Komponenten		absolute Intensität ^b		rel. Intensität ^c
	PLA	PMMA	PLA	PMMA	A_{873}^{PLA}	A_{813}^{PMMA}	$A_{873}^{PLA}/A_{813}^{PMMA}$
1	teilkristallin		650		(1077 ± 81)	(10670 ± 957)	(0,101 ± 0,005)
2	teilkristallin	amorph	120	120	(1036 ± 103)	(10532 ± 1324)	(0,098 ± 0,007)
3	amorph		16,3		(1127 ± 92)	(11574 ± 1271)	(0,097 ± 0,006)

^a Angegebene Molmasse, M_w in kg·mol⁻¹.

^b entspricht der integrierten Bandenfläche der charakteristischen Banden für PLA bzw. PMMA.

^c entspricht dem Flächenverhältnis der Blend-Komponenten.

Die Ergebnisse in Tabelle 5.8 zeigen, dass die absoluten Intensitäten zwar leicht variieren, die relativen Intensitäten jedoch im Rahmen der Standardabweichung gleich sind. Um zu überprüfen, ob der Mittelwert der relativen Flächenverhältnisse vom teilkristallinen *L*-PLA mit hoher Molmasse (Blend 1) mit der zu untersuchenden Probe mit teilkristallinem *L*-PLA mit mittlerer Molmasse (Blend 2) bzw. mit dem amorphen *D,L*-PLA mit niedriger Molmasse (Blend 3) übereinstimmt, wurde in

Anlehnung an die Literatur [170] ein Zweistichproben-*t*-Test durchgeführt. In Tabelle 5.9 sind die Ergebnisse des erhaltenen *t*-Tests aufgeführt.

Tabelle 5.9: Ergebnisse des *t*-Tests zum Vergleich der hergestellten Blends.

Vergleich			Differenz der relativen Intensitäten	t-Test, P = 99 %, df ^b = 18	
Blend	PLA-Struktur	PLA- M_w ^a		berechneter t-Wert	kritischer t-Wert
1 und 2	teilkrist./teilkrist.	650/120	-0,003	1,85	2,88
1 und 3	teilkrist./amorph	650/16,3	-0,004	2,82	

^a Angegebene Molmasse, M_w in $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$.

^b Freiheitsgrad, $df = n_1 + n_2 - 2$, mit $n_1 = n_2 = 10$.

Die *t*-Test-Ergebnisse zeigen, dass die Differenzen der relativen Intensitäten von -0,003 bzw. -0,004 in Bezug auf das teilkristalline *L*-PLA mit einer hohen Molmasse (Blend 1) nicht signifikant sind. Es kann also mit einem Konfidenzniveau von 99 % gesagt werden, dass obwohl die PLA/PMMA-Blends mit zwei unterschiedlichen kristallinen Strukturen und drei unterschiedlichen Molmassen hergestellt wurden, die relativen Intensitäten der Raman-Banden aller drei PLA/PMMA-Blends vergleichbar sind. Aus diesem Grund kann eine Quantifizierung von *L*-PLA in den zu untersuchenden Proben mit PLA/PMMA-Blends als Arbeitsreferenzmaterialien durchgeführt werden, die aus zwei amorphen Polymeren (*D,L*-PLA und PMMA) hergestellt wurden.

5.3.2.3 Herstellung der als Arbeitsreferenzmaterialien verwendeten PLA/PMMA-Polymerblends

Um eine Quantifizierung von *L*-PLA in der realen Probe vorzunehmen, wurden acht Tabletten aus PLA/PMMA-Blends als Kalibrationsproben mit einem PLA-Massenanteil von 6,25; 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5; 75 und 87,5 Gew.-% hergestellt.

Die Polymere (amorphes *D,L*-PLA, M_w 16,3 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, und amorphes PMMA M_w 120 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich Co., USA) wurden zusammen eingewogen und dann mit Chloroform (> 99,0 %, LiChrosolv[®],

Merck KGaA, Deutschland) als Lösungsmittel unter Verwendung eines Magnetrührers bei Raumtemperatur ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) mit $300 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ für 120 min vermischt. Die PLA/PMMA-Lösungen wurden dabei mit einer gesamten Massenkonzentration von 1 % (w/v) hergestellt. Die Fällung wurde unter Rühren mit einem zehnfachen Volumenüberschuss an Petrolether (Benzin 40-60, Reinst, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) durchgeführt. Nach dem Dekantieren wurden die gewonnen pulverförmigen Polymerblends bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ für 72 h getrocknet. Schließlich wurden etwa 100 mg des Blends abgewogen und dann bei Raumtemperatur ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) in einer hydraulischen Presse (Perkin-Elmer) bei 100 kN für 1 min lang gepresst. Hieraus wurden Tabletten mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Dicke von etwa $50 \text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 5.14) gewonnen. Um eine mögliche Hydrolyse während der Lagerung zu minimieren, wurden alle Tabletten bis zur Verwendung in einem Exsikkator gelagert.



Abbildung 5.14: Lichtmikroskopische Aufnahme einer als Arbeitsreferenzmaterial verwendeten Tablette aus PLA/PMMA-Blend. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: $29 \times 21 \text{ mm}$, 10x.

5.3.2.4 Thermische Charakterisierung der Arbeitsreferenzmaterialien

Die Abbildung 5.15 zeigt die erhaltenen DSC-Thermogramme der zweiten Aufheizung von PLA pur, PMMA pur und den PLA/PMMA-Blends mit unterschiedlicher Zusammensetzung.

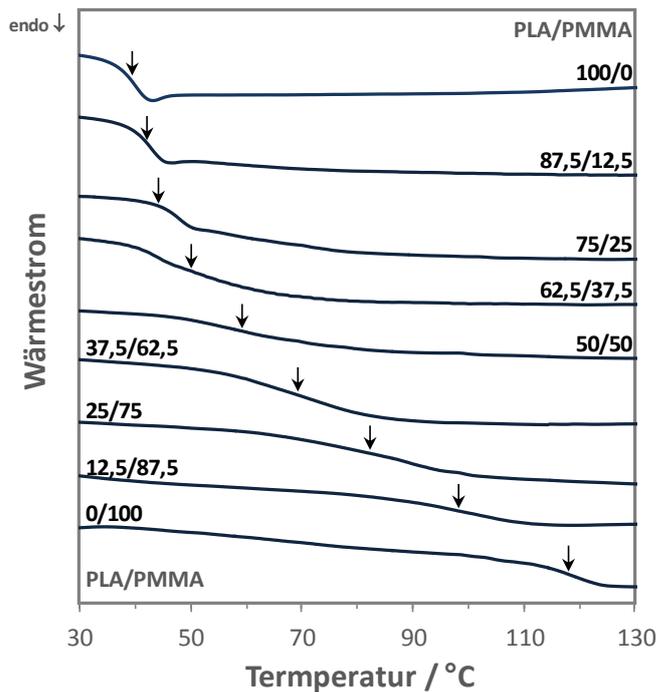


Abbildung 5.15: DSC-Thermogramme von PLA und PMMA sowie den entsprechenden PLA/PMMA-Blends. Die Pfeile markieren den Glasübergangsbereich (2. Aufheizung, Heizrate von $10 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$, N_2 als Spülgas).

Im Temperaturbereich von 30 bis $130 \text{ }^\circ\text{C}$ ist deutlich zu sehen, dass jede Kurve des untersuchten Blends eine einzige T_g bei mittleren Temperaturen zwischen PLA pur und PMMA pur zeigt. Dieses Ergebnis belegt, dass die PLA/PMMA-Blends als thermodynamisch mischbare Systeme im amorphen Zustand vorliegen und in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen von *Eguiburu et al.* [155] und *Zhang et al.* [156] sind. Darüber hinaus sinkt der T_g -Wert des Blends mit steigendem PLA-Gehalt. Eines der am häufigsten angewandten Modelle, um die Abhängigkeit der T_g von der Zusammensetzung der Mischung zu bewerten und die Glasübergangstemperatur von amorphen Mischungen vorherzusagen [169,171,172], ist die Gordon-Taylor Gleichung:

$$T_{g,m} = \frac{w_A \cdot T_{g,A} + k_m \cdot w_B \cdot T_{g,B}}{w_A + k_m \cdot w_B} \quad (5.1)$$

Die tiefgestellten Zeichen A , B und m stehen jeweils für die gemischten Komponenten A und B und die Mischung (des Blends), $w_{A,B}$ ist der Massenanteil der Komponenten A und B in der Mischung. Der Term k_m ist ein empirischer Parameter, der als Mischbarkeit interpretiert werden kann, da er sich auf die Stärke

der Wechselwirkung zwischen den Komponenten einer Mischung bezieht [155,157,161]. Die Abbildung 5.16 zeigt eine Darstellung der Glasübergangstemperatur für PLA pur, PMMA pur und PLA/PMMA-Blends in Abhängigkeit vom PLA-Massenanteil. Für alle Polymerblends wurden, mit zunehmendem PLA-Massenanteil, die T_g zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die Gleichung 5.1 wurde auf Versuchsergebnisse angewendet. Die T_g -Werte sind konsistent, wenn sie mit den vom Gordon-Taylor-Modell geschätzten T_g -Werten verglichen werden (siehe Abbildung 5.16). Ein Anpassungsparameter von $k_m = 0,33$ wurde für die PLA/PMMA-Blends erhalten. Das bedeutet, dass die Interaktion zwischen PLA und PMMA relativ schwach ist. Allerdings bilden die Komponenten des Blends trotzdem eine homogene Mischung, weil sie nur einen einzigen Glasübergangsbereich aufweisen.

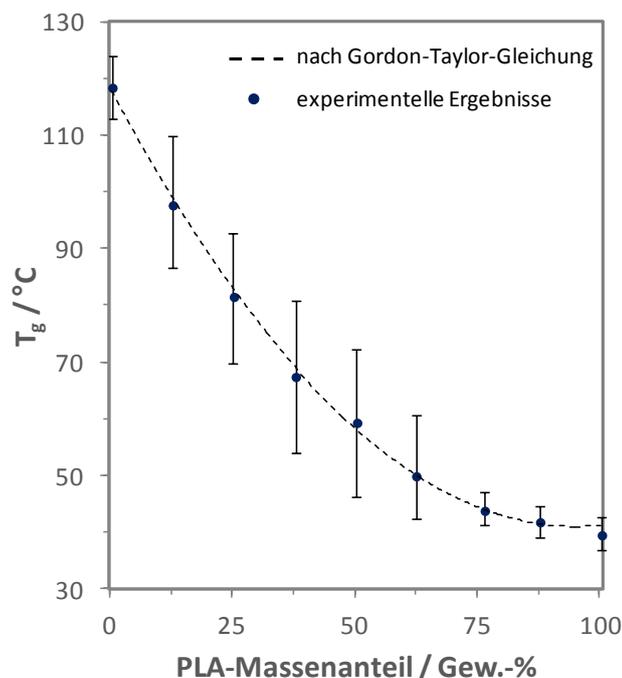


Abbildung 5.16: Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur von der Blend-Komposition. Die vertikalen Balken zeigen die Breite des gemessenen Glasübergangs.

5.3.2.5 Quantifizierungsstrategie

Die Raman-Spektren der als Referenzmaterialien eingesetzten PLA/PMMA-Blends sind in Abbildung 5.17 dargestellt. Auch hier überlappen die C-COO-Streckbande

von PLA bei 873 cm^{-1} und die C-O-C symmetrische Streckschwingung von PMMA bei 813 cm^{-1} nicht. Die resultierenden Molekülschwingungen in den Spektren der PLA/PMMA-Blends haben die gleiche Symmetrie wie die entsprechenden Schwingungen in den Spektren der reinen Polymere. Man erkennt deutlich, dass bei steigendem Massenanteil von PLA auch die Intensität der PLA-Bande zunimmt, während die Intensität der PMMA-Bande abnimmt. Obwohl dieses Ergebnis nahe legt, dass die PLA-Bandenintensität bei 873 cm^{-1} proportional zum PLA-Massenanteil zu sein scheint, hängt die Intensität der Raman-Banden nicht nur von der Konzentration der Raman-aktiven Substanz, sondern auch von einer Reihe anderer Faktoren ab (siehe Gleichung 4.1 in Abschnitt 4.3.1). Deshalb erfordert die Anwendung der Raman-Spektroskopie als analytische Methode zur Quantifizierung von PLA eine Korrektur der absoluten Intensität, und dies wurde durch die Auswahl einer geeigneten effektiven Kalibrationsstrategie erreicht. Hierzu kann das relative Verhältnissverfahren verwendet werden, mit dem die Variationen durch absolute Intensitätsschwankungen eliminiert werden können [109]. Da keine Bandenüberlagerung für die C-COO Streckschwingung von PLA bei 873 cm^{-1} und die symmetrische C-O-C Streckschwingung von PMMA bei 813 cm^{-1} vorliegt und diese ausgewählten Banden ausreichend intensiv sind, ist es geeignet, eine univariante Regression zur Quantifizierung von PLA vorzunehmen [173-177].

Um PLA in den Blends mittels einer univarianten Regression zu bestimmen, wurde die von *Shemouratov et al.* [178] entwickelte Quantifizierungsmethode angewandt. Für ein binäres System wie einem Blend, das aus nur zwei Komponenten besteht, $w_{PLA} + w_{PMMA} = 1$ und zwei isolierte Analysebanden mit den entsprechenden Flächen A_{873}^{PLA} und A_{813}^{PMMA} aufweist, wurde die Zusammensetzung aus dem relativen Flächenverhältnis der Raman-Banden der C-COO- Streckschwingung von PLA bei 873 cm^{-1} und der C-O-C symmetrischen Streckschwingung von PMMA bei 813 cm^{-1} $A_{873}^{PLA}/(A_{873}^{PLA} + A_{813}^{PMMA})$ bestimmt. Dabei steht die Bandenfläche der C-COO- Streckschwingung A_{873}^{PLA} in direktem Zusammenhang mit dem PLA-Massenanteil und die Bandenfläche der C-O-C symmetrische Streckschwingung A_{813}^{PMMA} in direktem Zusammenhang mit dem PMMA-Massenanteil.

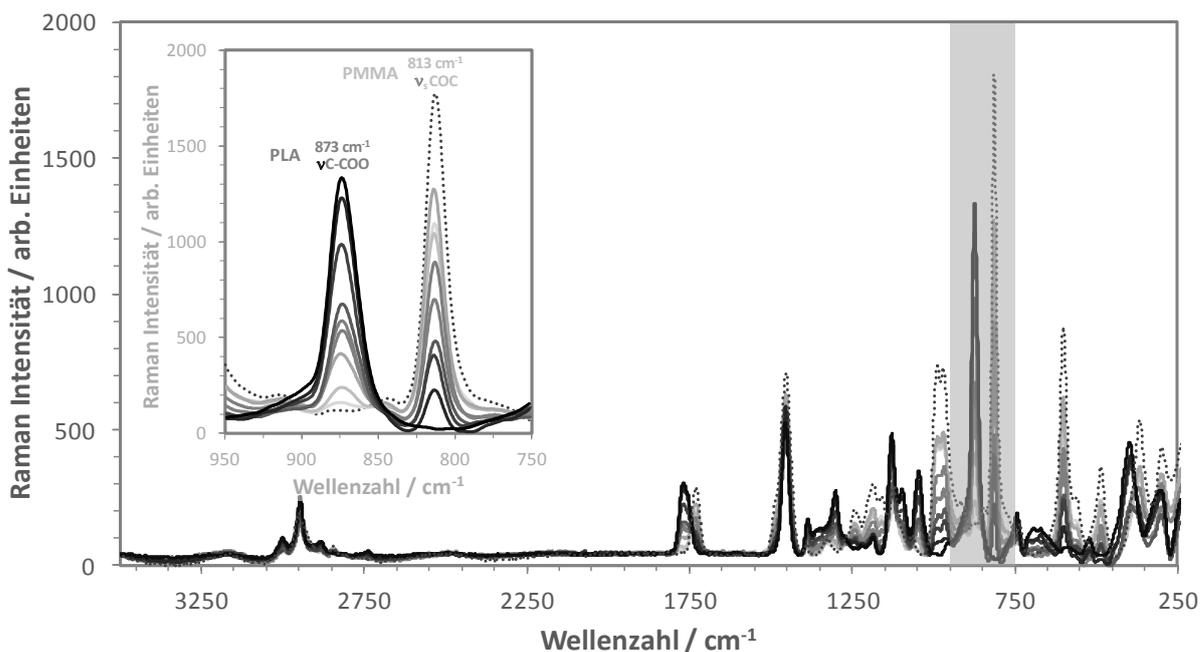


Abbildung 5.17: Raman-Spektren von PLA, PMMA und PLA/PMMA-Blends mit verschiedenen Polymer-Verhältnissen (PLA-Massenanteil von oben nach unten: 100; 87,5; 75; 62,5; 50; 37,5; 25; 12,5; 6,25 und 0 Gew.-%) – Detail der Abbildung: Vergrößerung im Bereich 950-750 cm^{-1} . (Laserquelle 785 nm, Laserleistung 100 mW, Messzeit 10 s, spektrale Auflösung 12 cm^{-1}).

5.3.2.6 Kalibrationsmodell

Um den mathematischen Zusammenhang zwischen dem PLA-Gehalt und dem relativen Flächenverhältnis der Raman-Banden zu bestimmen, wurden die acht Referenzmaterialien (PLA/PMMA-Blends) mit den PLA-Massenanteilen von 6,25; 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5; 75 und 87,5 Gew.-% jeweils 10 mal gemessen. Für jedes der erhaltenen 80 Raman-Spektren wurden die Flächen der Banden von PLA und PMMA integriert. Das Verfahren der einfaktoriellen Varianzanalyse (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA) sollte durchgeführt werden, um Information über die Qualität des Korrelationsgrades zwischen den relativen Flächenverhältnissen der Raman-Banden $A_{873}^{\text{PLA}} / (A_{873}^{\text{PLA}} + A_{813}^{\text{PMMA}})$ und dem PLA-Massenanteil w_{PLA} zu erhalten. Um diese ANOVA durchführen zu können, mussten zunächst die folgenden drei Grundvoraussetzungen erfüllt sein:

a) Die vom Kalibrierstandard verursachte Messunsicherheit sollte klein im Vergleich zur Messunsicherheit des gemessenen Signals sein [170,179,180]. Die Kalibrationsproben wurden deshalb gravimetrisch hergestellt, um die Beiträge der

Messunsicherheit zu minimieren. Unter Einbeziehung aller möglichen Messunsicherheitsquellen [181] lag die relative, erweiterte Messunsicherheit der Kalibrationsproben $U_{(W_{PLA})}$ zwischen 0,20 und 0,23 % (Erweiterungsfaktor $k = 2$). Im Gegensatz dazu lag die relative, erweiterte Messunsicherheit des relativen Flächenverhältnisses der Raman-Banden $U_{(A_{873}^{PLA}/(A_{873}^{PLA} + A_{813}^{PMMA}))}$ zwischen 1,0 und 5,7 % (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

b) Der resultierende Wert von mehreren wiederholten Messungen sollte normalverteilt sein [170,179,180]. Der David-Test wurde verwendet, um die Normalverteilung der Daten zu überprüfen [179,180], wobei die berechneten Werte \hat{q}_r für die relativen Flächenverhältnisse der Raman-Banden innerhalb der Grenzen für $n = 10$ mit $P = 99\%$ lagen (siehe Tabelle 5.10).

c) Die Varianz des Signals muss über den verwendeten Bereich der X-Achse gleich sein [170,179,180]. Der Test nach Cochran wurde durchgeführt, um die Homogenität der Varianz zu überprüfen [179,180]. Dieser Test zeigte, dass der kritische Wert C von 0,325 ($P = 99\%$, $n = 10$, $df = 8$) größer als der berechnete Wert \hat{C} (0,319) war, was bedeutet, dass die größte Varianz nicht signifikant größer als die anderen ist, also mit einer 99 %-igen Sicherheit die Varianzen homogen sind.

Tabelle 5.10: Statistische Auswertung der berechneten relativen Flächenverhältnisse der Raman-Banden: Test nach David.

W_{PLA} / $g \cdot g^{-1}$	Signal $A_{873}^{PLA}/(A_{873}^{PLA} + A_{813}^{PMMA})$	Standardabweichung $S_{[A_{873}^{PLA}/(A_{873}^{PLA} + A_{813}^{PMMA})]}$	P = 99 %, n = 10		
			berechneter Wert, \hat{q}_r	Untergrenze, q_L	Obergrenze, q_U
0,063	0,0482	0,0050	3,10		
0,124	0,1126	0,0108	2,78		
0,248	0,2323	0,0071	2,85		
0,374	0,3846	0,0139	3,56		
0,499	0,5018	0,0063	2,68	2,51	4,24
0,619	0,6290	0,0113	3,91		
0,759	0,7802	0,0041	2,90		
0,871	0,8840	0,0061	2,95		

Eine univariate Regression (engl. *Least Squares Regression* - LSR) wurde für die quantitativen Auswertungen mit Hilfe von Microsoft Office Excel® Version 2007 angewendet. Um das Modell zu validieren, wurde sowohl eine Residualanalyse als

auch eine Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von 99 % durchgeführt. In Tabelle 5.11 sind Test-Ergebnisse auf Linearität der Regression mit Hilfe der ANOVA zusammengefasst.

Tabelle 5.11: Parameterschätzungen und Varianzanalysetafel für den Datensatz des relativen Flächenverhältnisses der Raman-Banden/PLA-Massenanteils als Ergebnis einer linearen Regression mit wiederholten Messungen.

Modellzusammenfassung

Regressions-Statistik	Werte
Multipler Korrelationskoeffizient ^a , R	0,999
Bestimmtheitsmaß, R ²	0,999
Korrigiertes Bestimmtheitsmaß, R ²	0,998
Standardfehler	0,011
Beobachtungen	80

^a Einflussvariablen: (Konstante), PLA-Massenanteil.

ANOVA^b

Quelle	Freiheitsgrade	Quadratsumme	Mittlere Quadratsumme	F-Statistik	Signifikanz, p
Regression	1	6,5712	6,57120	52525,57	0,000 ^a
Residuen	78	0,0098	0,00013		
Gesamt	79	6,5810			

^a Einflussvariablen: (Konstante), PLA-Massenanteil.

^b Abhängige Variable: relatives Raman-Banden Flächenverhältnis.

Koeffizienten^a

Prädiktor	Koeffizienten	Standardfehler	t-Statistik	Signifikanz, p	99 % Konfidenzintervall	
					untere	Obere
Achsenabschnitt	-0,0158	0,0024	-6,6420	0,000	-0,0221	-0,0095
Steigung	1,0416	0,0045	229,18	0,000	1,0296	1,0536

^a Einflussvariablen: (Konstante), PLA-Massenanteil.

Die ANOVA-Ergebnisse bestätigen, dass statistisch gesehen, ein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen besteht.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird in der Literatur als Gütekriterium zur Beurteilung der Regressionanalyse bezeichnet ^[170,179]. Die Güte der Anpassung des Modells an vorhandene Daten ist in Tabelle 5.11 zusammengefasst. Das errechnete Bestimmtheitsmaß führte zu einer hervorragenden Anpassung des Modells mit einem Werte über 0,99. Das bedeutet, dass 99,8 % der gesamten Variabilität in dem relativen Flächenverhältnis der Raman-Banden durch das lineare Regressionsmodell erklärt werden. Daraus folgt, dass nur 0,2 % der Variabilität in diesen Daten durch das Modell nicht erklärt werden kann. Der Standardfehler (siehe die Modellzusammenfassung-Tafel in Tabelle 5.11) zeigt eine relativ geringe Streuung, die in der graphischen Darstellung der Residuen (siehe Abbildung 5.18) schon erkennbar war. Darüber hinaus zeigt diese Darstellung ein zufriedenstellendes Profil für das lineare Regressionsmodell, weil die Residuen einer Regressionsfunktion (linear, quadratisch, exponentiell, etc.) wie gefordert zufällig um den Wert Null (horizontale Achse) gestreut sind, wobei sie keine eindeutige Tendenz aufzeigen ^[179]. Auch ist in der ANOVA-Tafel zur Signifikanz der Regressionsgerade in Tabelle 5.11 zu sehen, dass die Wahrscheinlichkeit, dass der F -Wert (52525,57) auftritt, basierend auf einer F -Verteilung (1,78) kleiner ist als das Signifikanzniveau 0,01 ($P = 99\%$). Der Zusammenhang zwischen dem relativen Flächenverhältnis der Raman-Banden und dem PLA-Massenanteil ist also statistisch signifikant und somit gibt es einen starken Beweis dafür, dass das Modell linear ist.

Die Regressionskoeffizienten zur Regressionslinie in der Koeffizienten-Tafel in Tabelle 5.11 zeigen, dass der geschätzte Steigungsparameter den Wert 1,0416 mit einer Standardabweichung von 0,0045 aufweist. Der zur Überprüfung der erhaltenen Steigung des Regressionmodells eingesetzte t -Test zeigt, dass der erhaltene p -Wert kleiner als das Signifikanzniveau 0,01 ($P = 99\%$) ist. Dies ist ein eindeutiger Beweis gegen die Nullhypothese, die annimmt, dass der Regressionskoeffizient den Wert Null hat. Somit zeigt die Varianzanalyse, dass das Modell in dem geprüften Intervall des PLA-Massenanteils (0,0625 bis 0,875 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) bei 99 %-Signifikanzniveau ($\alpha < 0,01$) linear ist und damit der PLA-Gehalt bestimmt werden kann. Die Abbildung 5.19 zeigt eine graphische Darstellung der linearen Regressionsfunktion zwischen den relativen Flächenverhältnissen der Raman-

Banden $A_{873}^{PLA} / (A_{873}^{PLA} + A_{813}^{PMMA})$ und den PLA-Massenanteilen w_{PLA} . Die Gleichung der linearen Kalibrierfunktion ist $y = (1,0416 \pm 0,012) x - (0,0158 \pm 0,0063)$ mit einem hohen R^2 -Wert von 0,9985.

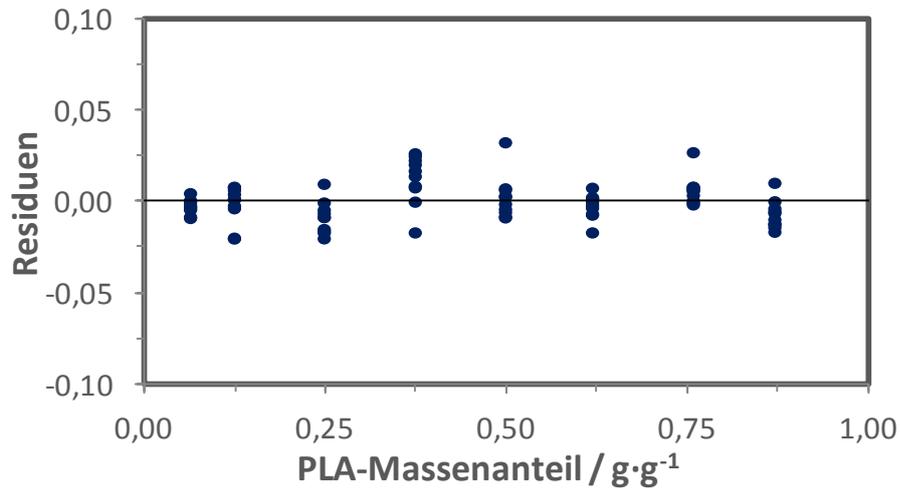


Abbildung 5.18: Streudiagramm der Residuen.

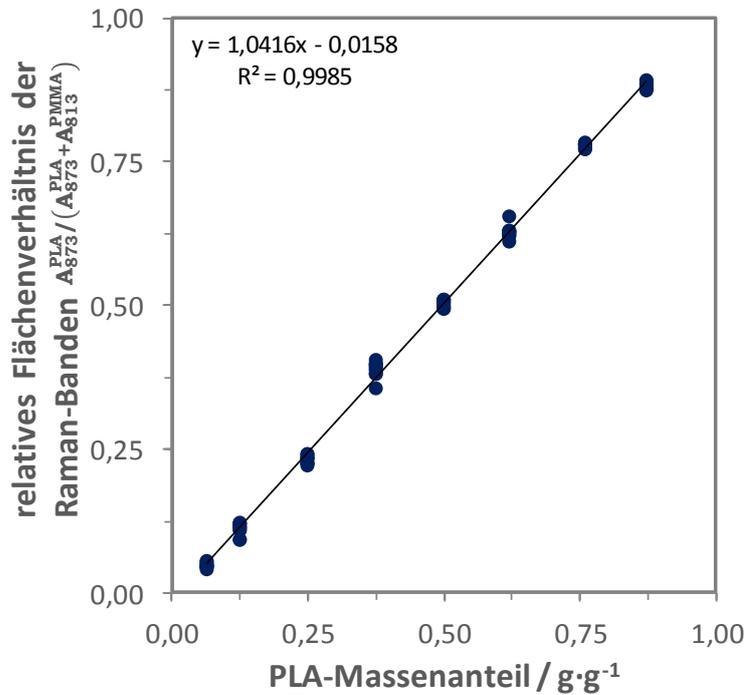


Abbildung 5.19: Die erhaltene Kalibrationsfunktion für Polyactid

5.3.2.7 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden über die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 [182] ermittelt. Jedoch wird in der Raman-Spektroskopie typischerweise eine Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis getroffen [183,184]. Um NG und BG durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu bestimmen und beide Verfahren zu vergleichen, wurden fünf PLA/PMMA-Blend-Tabletten mit einem PLA-Massenanteil von 1, 2, 3, 4 und 5 Gew.-% (siehe Abschnitt 5.3.2.3) hergestellt. Für jeden dieser Blends wurden zehn Spektren aufgenommen und gemittelt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 5.12 dargestellt und zeigen, dass beide Methoden Ergebnisse in der gleichen Größenordnung liefern.

Tabelle 5.12: Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Quantifizierung von Polylactid mittels Raman-Spektroskopie.

Methoden zur Ermittlung der	NG / Gew.-%	BG / Gew.-%
Signal-Rausch-Verhältnis ^a	3,1	10
Kalibrationsdaten ^b	2,7	9,3

^a NG (S/R-Verhältnis von 3:1), BG (S/R-Verhältnis von 10:1) [183,184].

^b mit einem Konfidenzniveau von 99 % nach DIN 32645 [182].

5.3.2.8 Richtigkeit und Präzision

Um die lineare Kalibrationsfunktion zu validieren und die Leistungsparameter Richtigkeit und Präzision zu überprüfen, wurden neun zusätzliche PLA/PMMA-Blend-Tabletten als Validationsproben mit jeweiligem PLA-Massenanteil von 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 und 85 Gew.-% (siehe Abschnitt 5.3.2.3) hergestellt. Die Raman-Spektren dieser Blends wurden 6 Wochen nach der Messung der Kalibrationsproben unabhängig voneinander gesammelt (9 Blends, insgesamt 90 Spektren). Die Bandenflächen von PLA, A_{873}^{PLA} und PMMA, A_{813}^{PMMA} aus den erhaltenen Spektren wurden integriert und ihre relativen Verhältnisse wurden berechnet.

Die Präzision der Methode wurde durch die relative Standardabweichung der relativen Flächenverhältnisse der Raman-Banden $A_{873}^{PLA}/(A_{873}^{PLA} + A_{813}^{PMMA})$ für 10

Wiederholungsmessungen charakterisiert. Unter Anwendung des Kalibrations-Modells (siehe Tabelle 5.11), das aus der Bewertung der Linearität erhalten wurde, konnte der PLA-Gehalt verschiedener Polymerblends bestimmt und die Genauigkeit durch den Bias als Ausmaß der systematischen Abweichung des Analytwertes quantifiziert werden. Die Parameter Präzision und Richtigkeit sind in Tabelle 5.13 angegeben. Die Variationskoeffizienten der relativen Flächenverhältnisse der Raman-Banden liegen im Bereich von 1 bis 9 %, während der Bias zwischen 1 und 4 % liegt.

Tabelle 5.13: Präzision und Richtigkeit der Methode zur Bestimmung des PLA-Gehaltes mittels μ -RS.

nominaler $w_{\text{PLA}} / \text{Gew.-%}$	$A_{873}^{\text{PLA}} / (A_{873}^{\text{PLA}} + A_{813}^{\text{PMMA}})$	Vk ^a / %	ermittelter $(w_{\text{PLA}} \pm \text{VB}^{\text{b}}) / \text{Gew.-%}$	Bias ^c / %
9,55	0,081	9,0	9,3 ± 3.4	-2,6
15,05	0,144	4,1	15,3 ± 3.3	1,9
25,57	0,240	3,0	24,6 ± 3.2	-3,7
35,10	0,342	3,6	34,2 ± 3.1	-2,6
44,31	0,449	2,3	44,7 ± 3.1	0,9
54,74	0,551	1,3	53,3 ± 3.1	-2,7
65,11	0,666	1,8	65,8 ± 3.2	1,1
74,56	0,752	0,6	73,1 ± 3.3	-1,9
85,02	0,867	0,7	85,4 ± 3.5	0,4

^a relativer Variationskoeffizient als quantitatives Maß für die Präzision = (absolute Standardabweichung/Mittelwert) × 100^[179,180].

^b VB: Vertrauensbereich mit einem Konfidenzniveau von 99 % nach Literatur^[179,180].

^c Bias (%) = [(ermittelter Wert – Nominalwert)/Nominalwert] × 100^[179,180].

In Abbildung 5.20 ist der Vergleich der ermittelten und der Nominalwerte für die Kalibrations- und Validationsreihen dargestellt. Obwohl die Kalibrations- und Validationsproben in zwei verschiedenen Zeiträumen (mit einem Abstand von 6 Wochen) gemessen wurden, zeigt der resultierende Plot eine sehr gute Linearität mit $R^2 = 0,9992$. Die für die PLA-Gehalte in den PLA/PMMA-Blends ermittelten Werte stimmen sehr gut mit den Nominalgehalten überein. Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Methode verwendet werden kann, um den PLA-Gehalt in einer PMMA-Matrix mit einer relativ guten Genauigkeit bestimmen zu können.

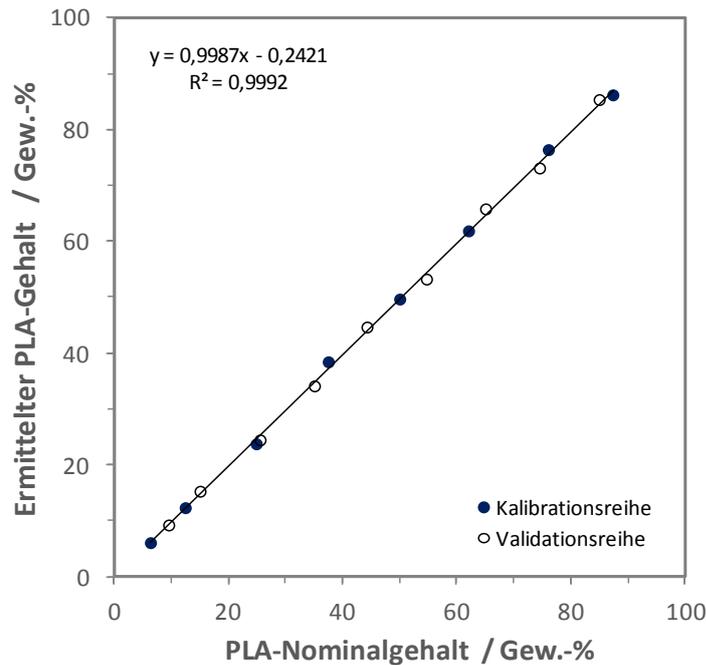


Abbildung 5.20: Graphische Darstellung für Kalibrations- und Validationsproben.

5.3.2.9 Anwendungsbeispiel

Um die etablierte Methode für die Analyse einer realen Probe anzuwenden, wurde die μ -RS zur Identifizierung und Quantifizierung von Polylactid in einem beschichteten Metallstent eingesetzt. Ein etwa 5 μm dicker, in Polymethylmethacrylat eingebetteter, Querschnitt eines mit Poly(L-lactid) beschichteten koronaren Metallstent wurde hergestellt und auf einem PMMA-Mikroskop-Objektträger platziert.

Die Abbildung 5.21a zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der untersuchten Probe mit den entsprechenden Messpositionen. Die PLA-Beschichtung hatte eine Dicke zwischen 20 und 25 μm . Ein Raman-Linienscan mit einer Scanlänge von 50 μm wurde vom Implantat über die Beschichtung bis in das umliegende Gewebe durchgeführt, wobei die Raman Spektren mit einer Anregungswellenlänge bei Emission von 785 nm und einer Laserintensität von 100 mW für eine Messzeit von 10 s aufgenommen wurden. Nach der Auswertung von PLA- und PMMA-Banden wurde das relative PLA-Gehaltsprofil (siehe Abbildung 5.21b) ermittelt, wobei der entsprechende Bereich der PLA-Beschichtung quantifiziert wurde.

Das Ergebnis zeigt, dass die entwickelte Methode ein geeignetes analytisches Verfahren zur Bestimmung der relativen Zusammensetzung von Polylactid in einer PMMA-Matrix ist.

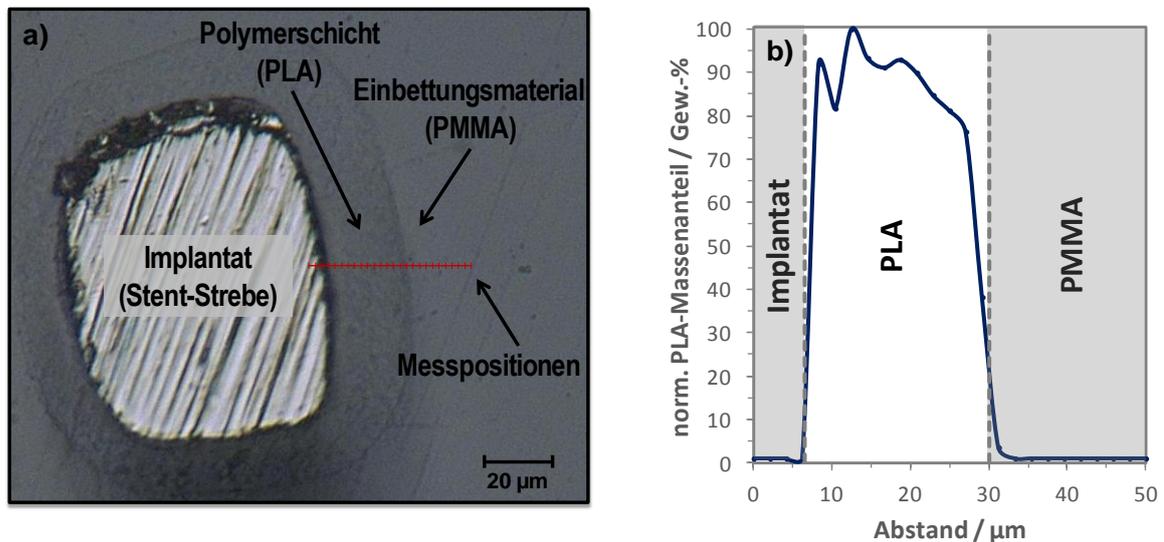


Abbildung 5.21: In Polymethylmethacrylat eingebetteter Querschnitt eines koronaren metallischen Stents mit einer Poly(lactid)-Beschichtung: a) lichtmikroskopische Aufnahme (Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 170×145 µm, 1000x), b) normiertes PLA-Gehaltsprofil des in linker Abbildung roten markierten Messbereiches.

5.3.3 Untersuchung zum Degradationsverhalten von Poly(L-lactid)

Mit der Kenntnis über das biologische Abbauverhalten eines biodegradierbaren synthetischen Materials kann, je nach gewünschter medizinischer Anwendung, die Abbaurate und die Freisetzung von eventuell integrierten Wirkstoffen angepasst werden. Daher ist die Bewertung und Kontrolle des biologischen Abbaus dieser Materialien im lebenden Körper von wesentlicher Bedeutung. [30,185–193] Um das Degradationsverhalten von L-PLA zu untersuchen, wurden die angefertigten Querschnittpräparate gestenteter Koronararterien von Schweinen nach Experimenten unterschiedlicher Dauer und Explantation analysiert. Die Proben sind in Abbildung 5.22 zu sehen. Die entsprechenden Bezeichnungen sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

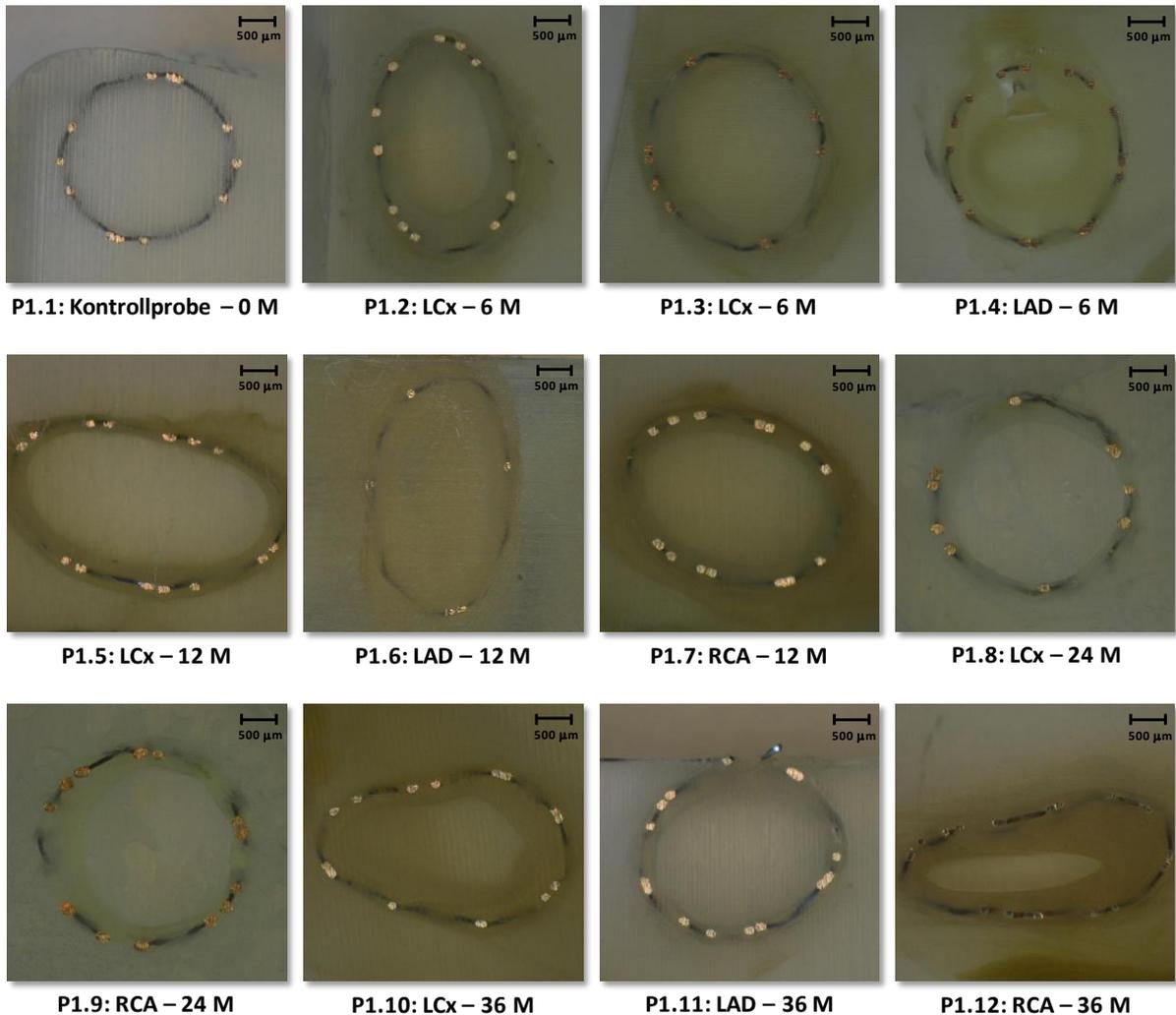


Abbildung 5.22: Lichtmikroskopische Übersicht der Querschnitte von Koronararterien (Schwein) nach unterschiedlicher Implantationsdauer eines PLA-beschichteten Metallstents (Abkürzung: Bezeichnung der Probe: Koronararterie – Implantationsdauer). Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 3,9×3,9 mm, 50x.

5.3.3.1 Bestimmung des PLA-Gehaltes eines mit Poly(L-lactid) beschichteten metallischen koronaren Stents

Die in Abschnitt 5.3.2 entwickelte μ -RS-Methode bietet die Möglichkeit, den PLA-Gehalt in einer nur wenige Mikrometer dicken Polymer-Beschichtung zu untersuchen. Für jede Probe wurden n Stent-Streben (siehe Tabelle 5.14) zufällig ausgewählt und mit jeweils zwei Raman-Linienscans entlang der x- und y-Achse mit 10 Messpositionen im Abstand von ca. 5,6 μm vermessen. Die Länge der Linien betrug 50 μm . Der Startpunkt jedes Linienscans befand sich an der Grenze

zwischen dem metallischen Stent und der PLA-Beschichtung, wie die schematische Darstellung in Abbildung 5.23 zeigt. Für jede einzelne Messposition wurde ein eigenes Spektrum aufgenommen. Die Randbedingungen sind in Tabelle 5.5 aufgelistet. Die aus den Spektren erhaltenen Bandenflächen von PLA, A_{873}^{PLA} und PMMA, A_{813}^{PMMA} wurden jeweils erst integriert, danach ihre relativen Verhältnisse berechnet und schließlich der PLA-Gehalt bestimmt.

Tabelle 5.14: Übersicht über die Anzahl der untersuchten Stent-Streben je nach Koronararterie und Implantationsdauer.

Implantationsdauer / Monat	Kontrollprobe	Koronararterie		
		LCx	LAD	RCA
0	$n = 5$	-	-	-
6	-	$n = 6^a$	$n = 3$	-
12	-	$n = 3$	$n = 3$	$n = 3$
24	-	$n = 3$	-	$n = 3$
36	-	$n = 3$	$n = 3$	$n = 3$
Gesamtanzahl	5	15	9	9

^a zwei Proben vorhanden.

n = Anzahl der untersuchten Stent-Streben.

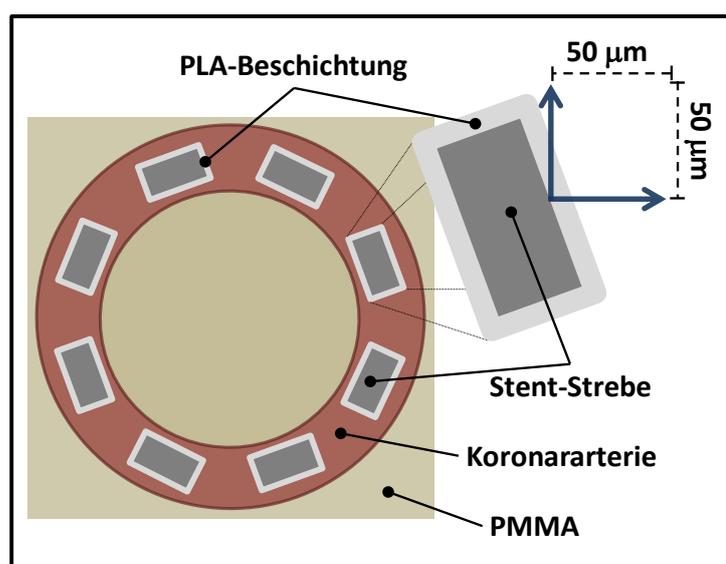


Abbildung 5.23: schematische Darstellung der Position der Raman-Linienscans (dunkelblaue Pfeile) auf einer Stent-Strebe zur Messung des PLA-Gehalts der Beschichtung.

In den Abbildungen A2.1 bis A2.4 im Anhang sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen mit dem untersuchten Bereich (Bilder a und b) und mit den entsprechenden Messpositionen (Bilder c und d), den Raman-Spektren (Diagramme e und f) und den PLA-Gehaltsprofilen (Grafiken g und h) für vier ausgewählte Streden von vier verschiedenen Proben nach unterschiedlicher Implantationszeit eines PLA-beschichteten Metallstent zu sehen.

Die Raman-Spektren, die in den Abbildungen A2.1 bis A2.4 (siehe Diagramme e und f im Anhang) dargestellt sind, zeigen auch die charakteristische Banden von PLA und PMMA, die zur Quantifizierung von PLA-Gehalt verwendet wurden.

In den PLA-Gehaltsprofilen (siehe Abbildungen A2.1 bis A2.4, Grafiken g und h im Anhang) ist deutlich zu erkennen, dass:

- 6 Monate nach der Implantation in einer LCx-Koronararterie der PLA-Gehalt bis zu etwa 50 Gew.-% und die Schichtdicke zwischen 20 und 25 μm beträgt (siehe Abbildung A2.1 im Anhang).
- 12 Monate nach der Implantation in einer LAD-Koronararterie der PLA-Gehalt nur noch maximal 30 Gew.-% beträgt und die Schichtdicke zwischen 20 und 25 μm vorliegt (siehe Abbildung A2.2 im Anhang).
- 24 Monate nach der Implantation in einer RCA-Koronararterie der PLA-Gehalt $> 5,4$ Gew.-% beträgt und die Schichtdicke zwischen 20 und 25 μm vorliegt (siehe Abbildung A2.3 im Anhang).
- 36 Monate nach der Implantation in einer LCx-Koronararterie sowohl der PLA-Gehalt als auch die Schichtdicke nicht detektierbar war.

Daraus lässt sich ableiten, dass der vollständige Abbau von PLA bei den durchgeführten Experimenten mehr als 24 Monate benötigte.

Eine Zusammenfassung der Bestimmung der PLA-Gehalte ist in Abbildung 5.24 dargestellt, wobei hier der Mittelwert der PLA-Gehalte aus der Auswertung von jeweils n zufällig ausgewählten Positionen auf den Stent-Streden der entsprechenden Probe dargestellt ist.

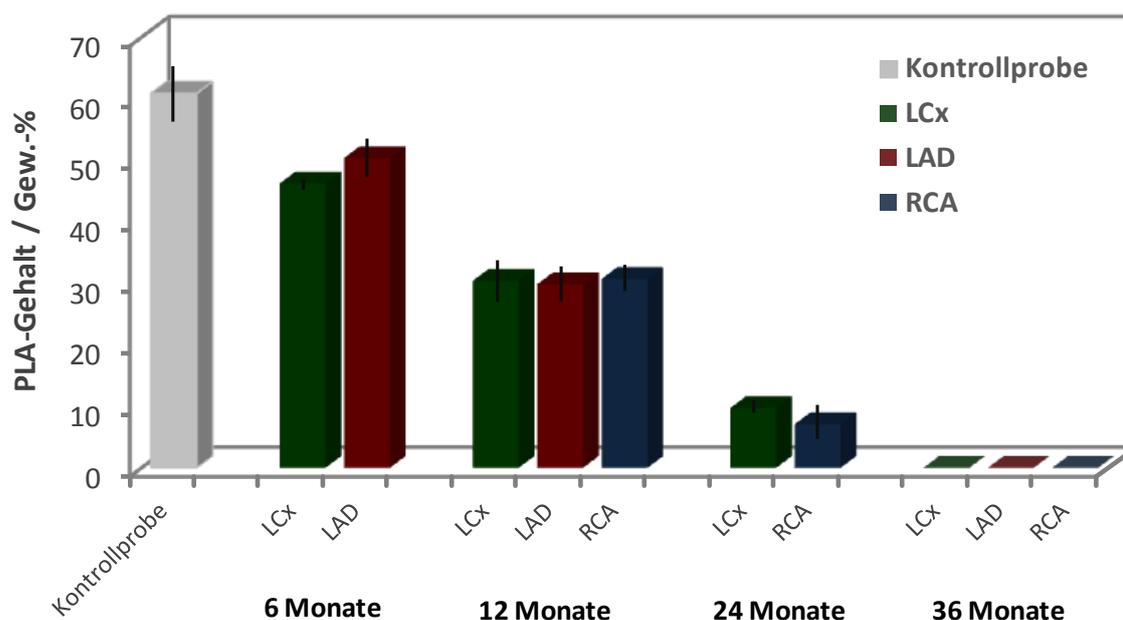


Abbildung 5.24: PLA-Gehalte in Abhängigkeit von der Implantationszeit und von der Stentposition in der koronaren Schweinearterie.

Aus der Abbildung 5.24 ist zuerst erkennbar, dass die Kontrollprobe einen PLA-Gehalt von ca. 60 Gew.-% aufweist, obwohl es sich um einen PLA-beschichteten Metallstent handelt, der nicht implantiert wurde und somit die PLA-Beschichtung unverändert hoch bei nahe 100 Gew.-% liegen müsste. Diese Abweichung könnte durch die Diffusionsvorgang der Einbettungsprozedur erklärt werden.

Die Einbettung von Gewebeproben in Kunststoff auf Methylmethacrylatbasis besteht laut Literatur ^[150,194] aus vier Schritten: (1) dem allgemeinen Fixierungs- und Entwässerungsschritt, (2) einem Präinfiltrationsschritt, (3) einem Infiltrationsschritt, und (4) einem Polymerisationsschritt. Bei Schritt (2) wurde die Probe mit einer Mischung aus flüssigem Methylmethacrylat und Härter (eine Peroxidverbindung) präinfiltriert und bei Schritt (3) mit einer Mischung aus flüssigem Methylmethacrylat (MMA), Härter und PMMA-Pulver infiltriert ^[150]. Das flüchtige MMA hat auch eine niedrige Viskosität und ermöglicht dadurch eine schnelle Infiltration der Probe ^[150].

Unter der Annahme, dass dieser Diffusionsvorgang von Methylmethacrylat-Moleküle in die PLA-Beschichtung in hohem Maße bei allen Proben stattgefunden hat, ist davon auszugehen, dass der Massengehalt von PLA bei allen Proben vor der Implantation gleich hoch (in einer Größenordnung von 60 %) war.

Außerdem ist zu sehen, dass die PLA-Gehalte unterschiedlicher Proben nach der Implantation unter dem gemessenen Wert der Kontrollprobe liegen. Wie erwartet nimmt der PLA-Gehalt mit zunehmender Implantationsdauer von $(60,9 \pm 4,4)$ Gew.-% (Kontrollprobe) auf 0 Gew.-% (36 Monate nach der Implantation) ab.

Um zu überprüfen, ob die PLA-Gehalte der verschiedenen Koronararterien (LCx, LAD und RCA) nach gleicher Implantationszeit signifikant unterschiedlich waren, wurde ein in der Literatur beschriebener Zweistichproben-*t*-Test [170] durchgeführt. In Tabelle 5.15 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 5.15: Ergebnisse des *t*-Tests zum Vergleich der PLA-Gehalte von Stents, die in unterschiedlichen Arterien implantiert wurden.

Standzeit	PLA-Gehalt	Vergleich	t-Test, P = 99 %, df ^a	
			berechneter t-Wert	kritischer t-Wert
6 Monate	LCx (46,2 ± 1,0)	LAD (50,4 ± 3,0)	3,36	3,50 ^b
	LCx (30,4 ± 3,3)	LAD (29,8 ± 2,8)	0,23	
12 Monate	LAD (29,8 ± 2,8)	RCA (30,7 ± 2,2)	0,42	4,60 ^c
	RCA (30,7 ± 2,2)	LCx (30,4 ± 3,3)	0,13	
24 Monate	LCx (9,7 ± 1,0)	RCA (7,1 ± 2,7)	1,59	4,60 ^c

^a Freiheitsgradzahl, $df = n_1 + n_2 - 2$.

^b $df = 7$, mit $n_1 = 6$ und $n_2 = 3$.

^c $df = 4$, mit $n_1 = n_2 = 3$.

Wie die *t*-Test-Ergebnisse zeigen, ist der prozentuale PLA-Gehalt nach gleicher Implantationszeit aber unterschiedlicher Position in den Arterien vergleichbar. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse auch, dass das Polymer nach 24 Monaten noch nicht vollständig abgebaut war, sondern erst nach 36 Monaten (BG für Polylactid unterschritten).

Obwohl PLA ein nicht permanentes Implantatmaterial ist, wird es bei den gewählten Bedingungen langsam, über Jahre, abgebaut. Laut Literatur [24,30,191] kann es beim

teilkristallinen *L*-PLA mehr als 24 Monate (2 Jahre) dauern, bis es komplett resorbiert wird.

5.3.3.2 Degradationsgrad und Abbauverhalten von Poly(*L*-lactid)

Die quantitative Bestimmung von PLA mit Hilfe der entwickelten Methode μ -RS ermöglichte eine Aussage über den Degradationsmechanismus des Polymers im Mikro-Bereich.

Wie in den vorherigen Ergebnissen gezeigt wurde, ändert sich der PLA-Gehalt durch die Degradation und es kommt zu einer Abnahme des PLA-Gehalts, sodass bei der Berechnung des Degradationsgrades (*DG*) mit der Gleichung 5.2 komplett ausgewertet werden kann:

$$DG = \frac{w_{t_0} - w_{t_i}}{w_{t_0}} \times 100 \quad (5.2)$$

Hierin ist w der PLA-Massenanteil und die tiefgestellten Zeichen t_0 und t_i stehen jeweils für die undegradierte Probe (Kontrollprobe) und die Proben nach den Experimenten unterschiedlicher Dauer ($i = 6, 12, 24$ und 36 Monate). In Abbildung 5.25 ist die graphische Darstellung des Degradationsprofils von Poly(*L*-lactid) im Tierversuch mit Schweinen nach Anwendung von Gleichung 5.2 zu finden.

Das Diagramm in Abbildung 5.25 beschreibt das Degradationsverhalten von *L*-PLA. Wie erwartet, ergibt das Ergebnis dieser Studie einen Anstieg des Degradationsgrades im Zuge der Implantatverweildauer. Bereits nach 6 Monaten beträgt der Degradationsgrad der PLA-Beschichtung etwa 20 %. Im weiteren Verlauf erfolgt der Anstieg des Degradationsgrads kontinuierlich und beträgt nach 12 Monaten circa 50 % und nach 24 Monaten bis zu 85 %. Nach 36 Monaten ist die PLA-Beschichtung vollständig abgebaut. Die Funktionsanpassung durch Regression an vorhandene Daten ergab ein quadratisches Modell. Das errechnete Bestimmtheitsmaß führte zu einer guten Anpassung des Modells mit einem Werte von 0,99.

Inwiefern diese Beobachtung auf den Verlauf des Abbauprozesses zurückzuführen ist, kann durch die hydrolytische Degradation erklärt werden. Polylactid gehört zur

Gruppe der aliphatischen Poly(α -hydroxy ester), deren Estergruppe in Gegenwart von Wasser hydrolytisch abgebaut wird [24,25,191,193]. Nach *Auras et al.* [24] erfolgt ein hydrolytischer Abbau von Polylactid über Bulk-Erosion, und nicht über Oberflächenerosion, wenn die PLA-Schichtdicke den kritischen Wert von 0,5-2,0 mm nicht überschreitet. Bei einer Bulk-Erosion ist die Wasser-Diffusion in das Polymer schneller als die Degradation der Makromoleküle [24,30,191,195] und daher erfolgt der hydrolytische Abbau homogen [24,30,191,195], unabhängig von der Polymeroberfläche [24,195]. Der Abbau von L-PLA erfolgte also in dieser Studie durch eine hydrolytische Degradation über den Bulk-Erosionsmechanismus und dies konnte durch folgende Beweise bestätigt werden: (1) Der PLA-Gehalt verringerte sich gleichmäßig über die gesamte Polymer-Schichtdicke und (2) die PLA-Beschichtung ist bis 24 Monate beinahe konstant geblieben.

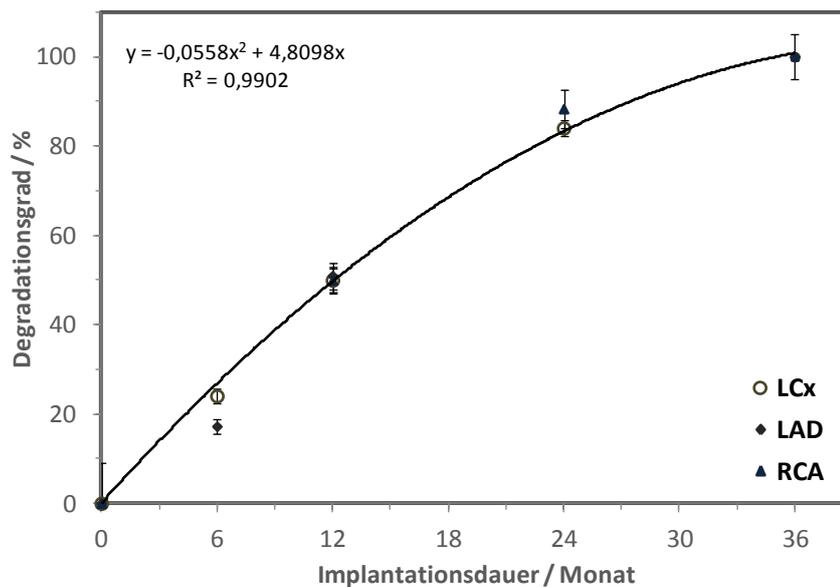


Abbildung 5.25: Degradationsprofil von Poly(L-lactid) in dem untersuchten Versuchsmodell (Schwein) unter Berücksichtigung der Implantationsposition.

6

Vergleichsstudie medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme

Der zweite Teil dieser Arbeit stellt die experimentellen Ergebnisse der Anwendung einer alternativen Methode für den Vergleich dreier bioresorbierbarer Metallstent-Systeme auf Mg-SEE-Basis (unbeschichtet und medikamentenbeschichtet), die vier Wochen im Tiermodell eingesetzt worden waren, vor.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu untersuchen, inwieweit die Wirkung des Stents auf das umliegende Arterien Gewebe sowie die Auswirkung der Freisetzung zweier Wirkstoffe (Paclitaxel bzw. Sirolimus) eines medikamentenfreisetzenden Stents auf die zelluläre Proliferation unter Einsatz von Mikro-Partikel-induzierter Röntgenemission (μ -PIXE) nachgewiesen und bewertet werden kann.

Darüber hinaus wurde die ns-Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-QMS) als zusätzliche Methode angewendet, um die aus den biodegradierbaren Mg-SEE-Stent-Systemen degradierten Spuren an Neodym in der Umgebung des Implantats nachzuweisen und ihre Gehalte zu quantifizieren.

6.1 Untersuchte Proben

Mit einer Stent-Implantation in die Koronararterien von 12 Hausschweinen erhielten die Tiere nach dem Zufallsprinzip jeweils zwei Implantate: entweder zwei unbeschichtete Metallstents (BMS) als Referenz, zwei Paclitaxel-freisetzende Stents (engl. *Paclitaxel-Eluting Stent*, PES) oder zwei Sirolimus-freisetzende Stents (engl. *Sirolimus-Eluting Stent*, SES). Nach der Explantation wurde jedes Koronargefäß in fünf Teile geschnitten: proximale, mediale und distale Stent-Segmente und proximale und distale Koronargefäß-Segmente. Die Tierversuche, sowie die Bearbeitung, die Routine-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und das Anfertigen der Koronar-Segmente, wurden in einem Auftragslabor unter Beachtung der dafür etablierten Verfahren durchgeführt und die entsprechenden angefertigten Paraffinblöcke (Abbildung 6.1) wurden von der Firma *MeKo Laserstrahl-Materialbearbeitungen e. K.* (Sarstedt/Hannover) zur Verfügung gestellt.

Bei den Proben handelt es sich um histologische Paraffinblöcke gestenteter Koronararterien am Schweinmodell. Hierfür wurden unterschiedliche Stents verwendet: Der unbeschichtete Metallstent (Abbildung 6.2) bestand aus einer resorbierbaren Magnesium-SEE-Legierung (1,8×14 mm, *MeKo Laserstrahl-Materialbearbeitungen e. K.*, Sarstedt/Hannover). Zwei zu prüfende medikamentenbeschichtete Metallstents, die auch aus der resorbierbaren Magnesium-SEE-Legierung bestanden, wiesen eine beladene biokompatible und biodegradierbare Polylactid-co-Glycolid-Beschichtung (PLGA) als Arzneistoffträger mit einer Dicke von $(8,5 \pm 1,5) \mu\text{m}$ auf, die entweder mit Paclitaxel (PTX) oder mit Sirolimus (SRL) versetzt wurde. Die Wirkstoffbeladung betrug $0,25 \mu\text{g}$ Paclitaxel je mm^2 Stent-Oberfläche bzw. $1,4 \mu\text{g}$ Sirolimus je mm^2 Stent-Oberfläche. Eine Zusammenfassung der untersuchten Proben ist in Tabelle 6.1 aufgelistet.

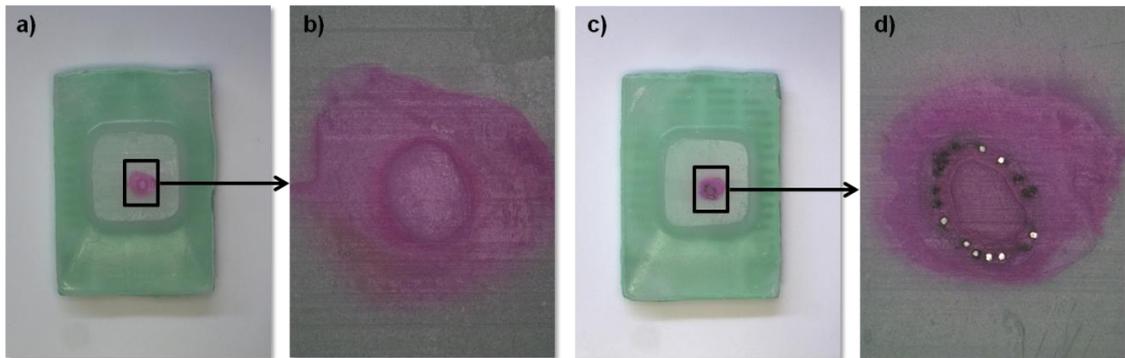


Abbildung 6.1: Lichtmikroskopische Aufnahme von zwei in Paraffinblöcken eingebetteten Proben von Koronararterien: a-b) distale Vorderwand-Koronararterie (d-LAD), c-d) gestentete distale Circumflexarterie (d-LCx). Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a/c) 45,5×60,7 mm, 5x; b/d) 4,55×6,07 mm, 50x.

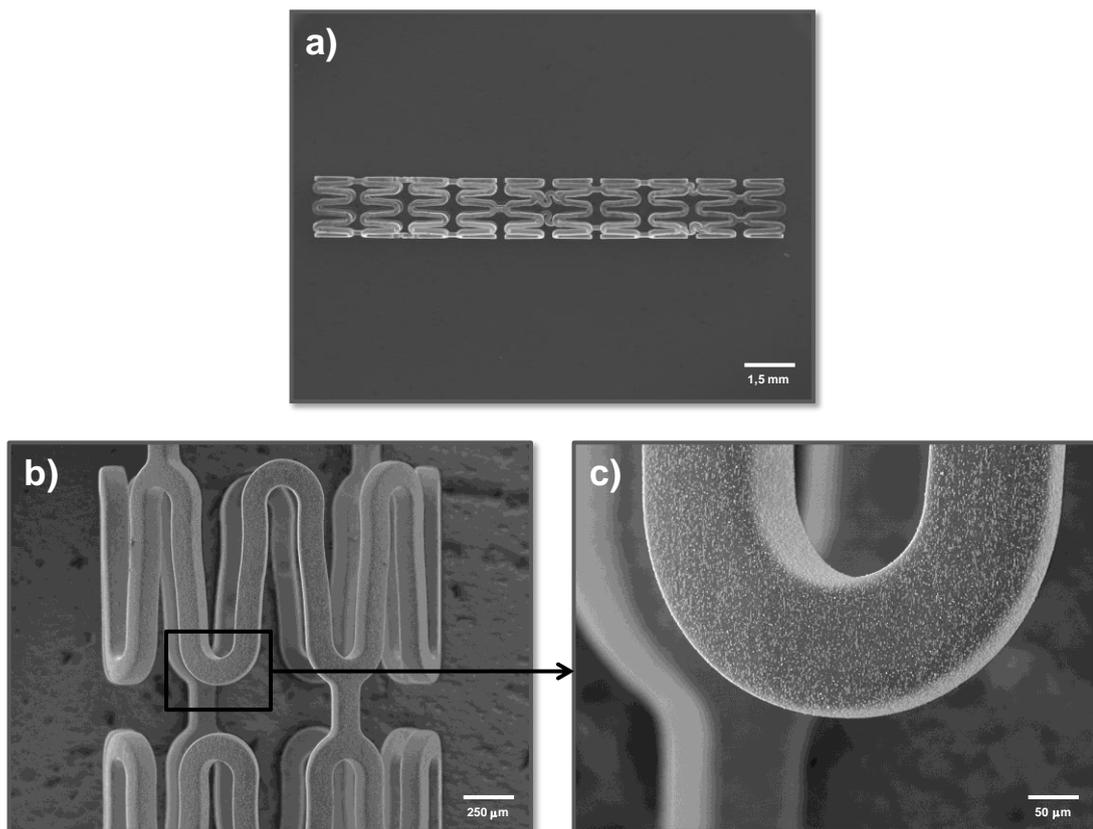


Abbildung 6.2: REM-Sekundärelektronenaufnahme eines unbeschichteten Metallstents (BMS). Beschleunigungsspannung 10 keV (Rasterelektronenmikroskop *JSM-6610LV*, JEOL Ltd.). Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a) 15,3×11,4 mm, 6x; b) 2,56×1,92 mm, 50x; c) 512×381 µm, 250x.

Tabelle 6.1: Ausgewählte Proben und verwendete Bezeichnungen.

Bezeichnung	Stent-Typ ^a	Abschnitt der Koronararterie ^b
P2.1	-	p-LAD
P2.2		d-LAD
P2.3		p-LCx
P2.4		d-LCx
P2.5	BMS	p-LAD
P2.6		m-LAD
P2.7		d-LAD
P2.8		p-LCx
P2.9		m-LCx
P2.10		d-LCx
P2.11	PES	p-LAD
P2.12		m-LAD
P2.13		d-LAD
P2.14		p-LCx
P2.15		m-LCx
P2.16		d-LCx
P2.17	SES	p-LAD
P2.18		m-LAD
P2.19		d-LAD
P2.20		p-LCx
P2.21		m-LCx
P2.22		d-LCx

^a **BMS**: unbeschichteter Metallstent, **PES**: Paclitaxel-freisetzender Stent, **SES**: Sirolimus-freisetzender Stent.

^b **LAD**: Vorderwandkoronararterie, **LCx**: linke Circumflexarterie, **p**: proximales Segment, **m**: mediales Segment, **d**: distales Segment.

6.2 Charakterisierung der Komponenten und der Mg-SEE-Stent-Systeme

Um die Komponenten des unbeschichteten Mg-SEE-Stents sowie die medikamentenfreisetzenden Mg-SEE-Stent-Systeme zu charakterisieren, wurden folgende analytische Methoden eingesetzt: optische Emissionsspektroskopie mit

induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) für die Bestimmung der genauen Zusammensetzung der Stent-Legierung, Schwingungsspektroskopie (Infrarot und Raman) als Fingerabdruck der verwendeten Wirkstoffe, des Arzneistoffträgers und des Einbettmaterials sowie Dynamische Differenzialkalorimetrie (DSC) für die Ermittlung der thermischen Eigenschaften von PLGA als Arzneistoffträger. Darüber hinaus wurde auch die Mikro-Raman-Spektroskopie (μ -RS) zur Charakterisierung der originalen medikamentenfreisetzenden Mg-SEE-Stent-Systeme verwendet, um das Auftreten von chemischen Bindungen bzw. Wechselwirkungen des Wirkstoffs mit dem Arzneistoffträger zu überprüfen.

6.2.1 Metallische Bestandteile

Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zusammengestellt.

Tabelle 6.2: Chemische Zusammensetzung der Stent-Legierung.

Element	Massenanteil / Gew.-%	Nominalgehalt ^a / Gew.-%
Mg	(88,7 ± 0,6)	Rest
Dy	(9,18 ± 0,05)	8 – 12
Nd	(1,01 ± 0,02)	0,5 – 1,5
Zn	(1,26 ± 0,03)	0,5 – 1,5
Zr	(0,07 ± 0,01)	0,10 – 0,30

^a Herstellerangabe

Die Ergebnisse in Tabelle 6.2 zeigen, dass die ermittelten Elementgehalte mit Ausnahme des Zirkoniums im erwarteten Bereich (Nominalgehalt) liegen. Eine Ursache für diese Abweichung ist die Tatsache, dass Zirkonium eine Dichte von $6,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (viel höher als die Mg-Schmelze) aufweist. Solange die Schmelze während der Legierungsherstellung nicht richtig gerührt wird, können deshalb metallische Zr-Teilchen gebildet werden, wachsen und abgelagert werden^[196]. Eine kleine Menge an Zirkonium wird in aluminiumfreien Magnesiumlegierungen als Kornverfeinerungsmittel zugegeben, um eine homogene Mikrostruktur zu erhalten^[196]. Eine geringere Menge an Zirkonium wäre im vorliegenden Fall jedoch

kein großes Problem: die Kornverfeinerung von Magnesiumlegierungen durch Zr-Zugabe macht sich besonders bei sehr niedrigen Zr-Gehalten (0,04 und 0,15 Gew.-%) bemerkbar, denn ihre Effizienz ist höher im Vergleich zu anderen Verfahren [197].

6.2.2 Organische Bestandteile

6.2.2.1 Schwingungsspektroskopische Charakterisierung

Die Schwingungsspektren von reinem Paclitaxel, Sirolimus, PLGA und Paraffin sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Die wichtigsten molekularen Schwingungen sind nach der entsprechenden Literatur, wie folgt zugeordnet:

A. Paclitaxel – PTX (Abbildung 6.3a):

- IR-Spektrum: Die N–H-Valenzschwingung führt zu der breiten Absorptionsbande im Bereich $3500 - 3330 \text{ cm}^{-1}$. Die Banden bei 2976 und 2885 cm^{-1} bzw. die Bande bei 2935 cm^{-1} werden durch die asymmetrische und symmetrische $-\text{CH}_2-$ -Streckschwingung und die $-\text{CH}_3$ -Streckschwingung verursacht. Die C=O-Valenzschwingung führt zum Auftreten einer starken Doppelbande zwischen 1740 bis 1715 cm^{-1} . Eine starke Absorptionsbande bei 1650 cm^{-1} ist hauptsächlich der C=O-Valenzschwingung der Amid-Gruppe zuzuordnen. Die C–N-Valenzschwingung und die C–O–C-Valenzschwingung von Ester treten bei 1275 cm^{-1} bzw. bei 1252 cm^{-1} auf. Die Ringschwingung und die *out-of-plane* C–H-Deformationsschwingungen der Aromaten liegen bei 1074 , 975 und 710 cm^{-1} . [198]

- Raman-Spektrum: Die Phenyl-Gruppen und Alkyl-Bindungen von Paclitaxel tragen zu einer starken aromatischen CH-Streckschwingungs-Bande bei 3070 cm^{-1} und zu einer $-\text{CH}_3$ -Streckschwingungs-Bande zentriert bei 2939 cm^{-1} bei. Die charakteristische C=O-Streckschwingung erscheint bei 1719 cm^{-1} [199]. Bei 1602 cm^{-1} tritt die C=C-Streckschwingung auf [199,200]. Die C–C-Streckschwingungs-Bande liegt bei 1002 cm^{-1} und die Bande bei 617 cm^{-1} wird durch die Schwingung der Benzolringe in der Struktur verursacht [200].

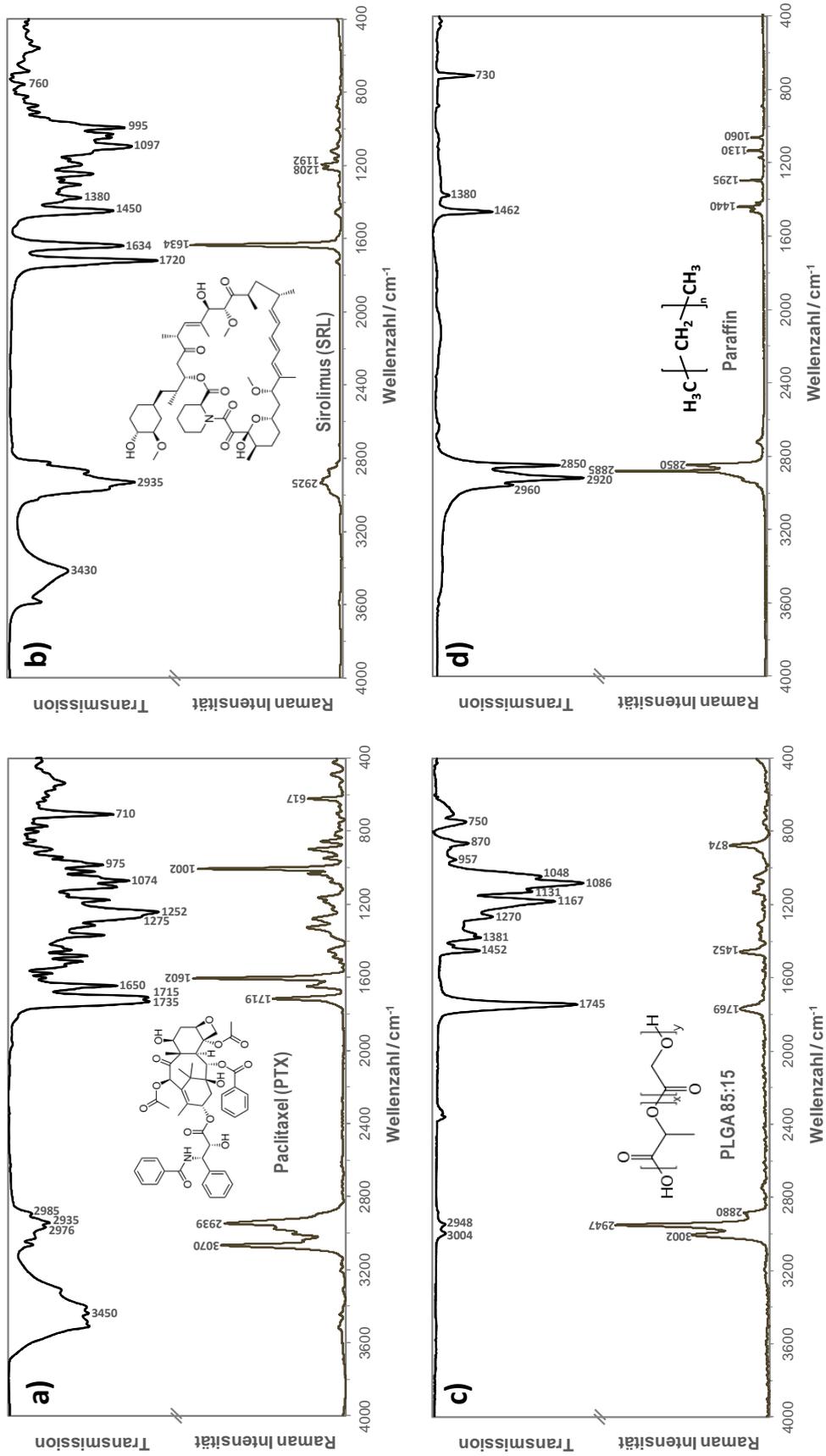


Abbildung 6.3: Charakteristische Schwingungs-Spektren von a) Paclitaxel, b) Sirolimus, c) PLGA 85:15 und d) Paraffin (FT-IR: Transmissions-Modus, KBr-Pressling, Scan-Anzahl: 50, Spektrale Auflösung: 4 cm⁻¹; Raman: 20 mW Nd:YAG-Laser, Anregungs-Wellenlänge: 532 nm, Leistung: 5 mW, Messzeit: 10 s, Spektrale Auflösung: 4 cm⁻¹).

B. Sirolimus – SRL (Abbildung 6.3b):

- IR-Spektrum: Banden bei 3430, 2935, 1720 und 1634 cm^{-1} können den Streckschwingungen der O–H, C–H, C=O und CH=CH Gruppe zugeordnet werden. Die Banden bei 1450 und 1380 cm^{-1} sind die asymmetrische und symmetrische C–H-Deformationsschwingung. Das Signal bei 1097 cm^{-1} entspricht der charakteristischen Bande der C–N-Valenzschwingung, während bei 995 und 760 cm^{-1} die *out-of-plane* Drehschwingung von C=C und C–H zu sehen sind. [201]
- Raman-Spektrum: die C–H-Streckschwingungen erscheinen im Bereich von 2800 cm^{-1} bis 3100 cm^{-1} . Bei 1634 cm^{-1} tritt die CH=CH-Streckschwingung auf. Schwache Banden im Bereich der –CH₂–Deformationsschwingungen sind bei ca. 1200 cm^{-1} zu beobachten. [202] Zudem ist die intensivste Bande der drei konjugierten Doppelbindungen bei 1634 cm^{-1} insbesondere für qualitative Identifizierung von SRL bekannt. [203]

C. PLGA 85:15 (Abbildung 6.3c):

- IR-Spektrum: Die sehr schwachen Banden zwischen 3000 und 2700 cm^{-1} sind charakteristisch für die aliphatischen >CH–, –CH₂– und –CH₃- Streckschwingungen [204]. Das Spektrum zeigt auch charakteristische Absorptionsbanden bei den Wellenzahlen 1745 cm^{-1} (ν C=O), 1452 cm^{-1} (δ_{as} CH₃), 1381 cm^{-1} (δ_{s} CH₃), 1270 cm^{-1} (τ CH₂), 1167 cm^{-1} (ν_{as} COC), 1131 cm^{-1} (ρ_{as} CH₃), 1086 cm^{-1} (ν_{s} COC), 1048 cm^{-1} (ν_{as} C–CH₃) und 957 cm^{-1} (ρ CH₃) [205]. Die CH-Schwingung erscheint bei 750 cm^{-1} [206].
- Raman-Spektrum: Die stärksten Signale bei 3002 cm^{-1} und 2947 cm^{-1} entsprechen den Valenzschwingungen der –CH₃- und –CH₂–Gruppen. Die Bande der C–H-Valenzschwingung erscheint bei 2880 cm^{-1} und die charakteristischen C=O-Streckschwingungen bei 1769 cm^{-1} . Die asymmetrische Deformationsschwingung der –CH₃ Gruppe wird zusammen mit der Deformationsschwingung der –CH₂–Gruppen bei etwa 1452 cm^{-1} beobachtet. Zuletzt tritt eine C–COO-Streckschwingung bei 874 cm^{-1} auf. [207]

D. Paraffin (Abbildung 6.3d):

- IR-Spektrum: die Absorptionsbanden bei 2960 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} sind charakteristisch für die aliphatischen CH-Streckschwingungen.

Das Signal bei 1462 cm^{-1} ist mit der CH-Biegeschwingung zu assoziieren. Die symmetrische C-H-Deformationsschwingung von der $-\text{CH}_3$ -Gruppe bei 1380 cm^{-1} und die $-\text{CH}_2-$ Schaukelabsorptionsbande bei 730 cm^{-1} bestätigen die lineare gesättigte aliphatische Struktur vom Paraffinwachs. [208]

- Raman-Spektrum: Die starken Banden bei 2885 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} werden den asymmetrischen und symmetrische $-\text{CH}_2-$ Streckschwingungen zugeordnet. Bei 1440 cm^{-1} und 1295 cm^{-1} treten die Banden von $-\text{CH}_2-$ Deformationsschwingung und $-\text{CH}_2-$ Drehschwingung auf. Die symmetrischen und asymmetrischen C-C-Streckschwingungsbanden erscheinen bei 1130 cm^{-1} und 1060 cm^{-1} . [209]

Nach erfolgten Signalzuordnungen erscheinen die charakteristischen IR- bzw. Raman-Banden in den Spektren aller untersuchten Substanzen im erwarteten Bereich. Darüber hinaus ist aus der Abbildung 6.3 ersichtlich, dass diese Substanzen sich anhand ihrer unverwechselbaren Schwingungsbanden eindeutig identifizieren lassen.

6.2.2.2 Thermische Eigenschaften von PLGA als Arzneistoffträger

Das experimentelle DSC-Thermogramm von PLGA 85:15 ist in Abbildung 6.4 zu sehen. Diese zeigt eine typische Aufheizkurve eines amorphen Polymers. Die DSC-Kurve weist einen Glasübergang bei $T_g = (52,2 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ auf und ist in Übereinstimmung mit dem entsprechenden Literatur-Wert [T_g : $(50-55)^\circ\text{C}$] [210].

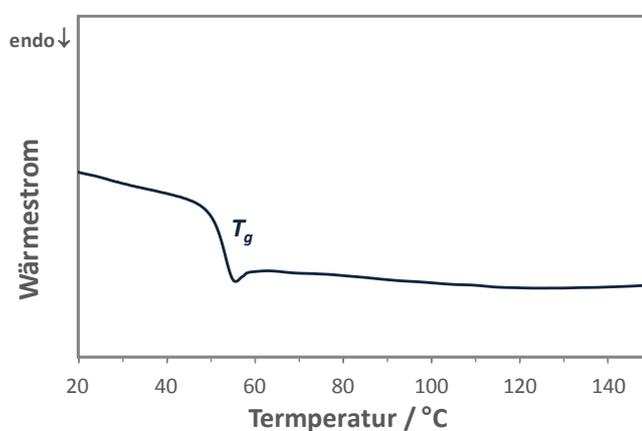


Abbildung 6.4: DSC-Thermogramm von Polylactid-co-Glycolid. T_g : Glasübergangstemperatur. (2. Aufheizung, Heizrate: $10\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$, Spülgas: N_2).

6.2.3 Medikamentenfreisetzende Mg-SEE-Stent-Systeme

Da die Raman-Spektroskopie ein leistungsfähiges analytisches Verfahren zur Strukturuntersuchung verschiedener Arten von Proben und ihrer Wechselwirkung mit anderen Molekülen ist ^[211], wurden Raman-Spektren aufgenommen, um die Beschichtungs-Komponenten (Wirkstoff und Arzneistoffträger) auf der Stent-Oberfläche zu identifizieren und ihre möglichen Wechselwirkungen nachzuweisen.

Die Abbildungen 6.5 und 6.6 zeigen die entsprechenden Spektren nach der Spektralanalyse im Bereich unterhalb von 2000 cm⁻¹ beider untersuchter Systeme (PES und SES). Wie aus den Abbildungen 6.5a und 6.6a zu ersehen ist, weisen die Spektren sowohl die drei wichtigsten Schwingungen von PTX (ν C=C bei 1602 cm⁻¹, ν C-C bei 1002 cm⁻¹ und ω >CH bei 671 cm⁻¹) und von SRL (ν >C=C< bei 1634 cm⁻¹, ω CH₂ bei 1208 cm⁻¹ und τ CH₂ bei 1192 cm⁻¹) als auch die drei intensiven Raman-Banden von PLGA (ν C=O bei 1770 cm⁻¹, δ CH₂ bei 1452 cm⁻¹ und ν C-COO bei 874 cm⁻¹) auf. Die zwei medikamentenfreisetzenden Mg-SEE-Stent-Systeme weisen charakteristische Banden der funktionellen Gruppen der entsprechenden Wirkstoffe (PTX bzw. SRL) und dem Arzneistoffträger (PLGA) auf, was darauf hindeutet, dass diese Raman-Spektren aus einer Überlagerung der getrennten Komponenten resultieren könnten. Um dies zu bestätigen, wurde eine sogenannte Spektrensubtraktion ^[174,212] durchgeführt, um das PLGA-Signal als Arzneistoffträger zu beseitigen. Als ausgewählter Schwingungsmodus zur Normierung der Spektren wurde die C-COO-Streckschwingungs-Bande von PLGA bei 874 cm⁻¹ ausgewählt (siehe Abbildung 6.5b und 6.6b). Die erhaltenen Raman-Spektren von PTX bzw. SRL nach der Subtraktion des PLGA-Signals (siehe Abbildung 6.5c und 6.6c) stimmen in den Positionen der auftretenden Banden gut mit den entsprechenden gemessenen Spektren der reinen Substanzen überein (siehe Abbildung 6.5d und 6.6d). Auch ist zu bemerken, dass das erhaltene Spektrum von PTX ein stärkeres Rauschen im Vergleich zum SRL-Spektrum zeigt. Laut Literatur ^[174] ist das Rauschen aufgrund des Subtraktionsverfahrens und der niedrigen Konzentration des Wirkstoffs zu erwarten. Der PTX-Massenanteil in PLGA war etwa 5-mal kleiner als der SRL-Massenanteil in PLGA. Da eine Änderung der Intensität oder eine Verschiebung zweier spezie-spezifischer Banden eine Wechselwirkung zwischen zwei oder mehr Spezies bedeuten kann ^[213], lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse feststellen, dass keine strukturelle Modifizierung von PTX/PLGA bzw. SRL/PLGA geschehen ist, oder dass die Wechselwirkungen des Wirkstoffes (PTX

bzw. SRL) mit dem Arzneistoffträger (PLGA) so klein sind, dass sie nicht mittels Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden können.

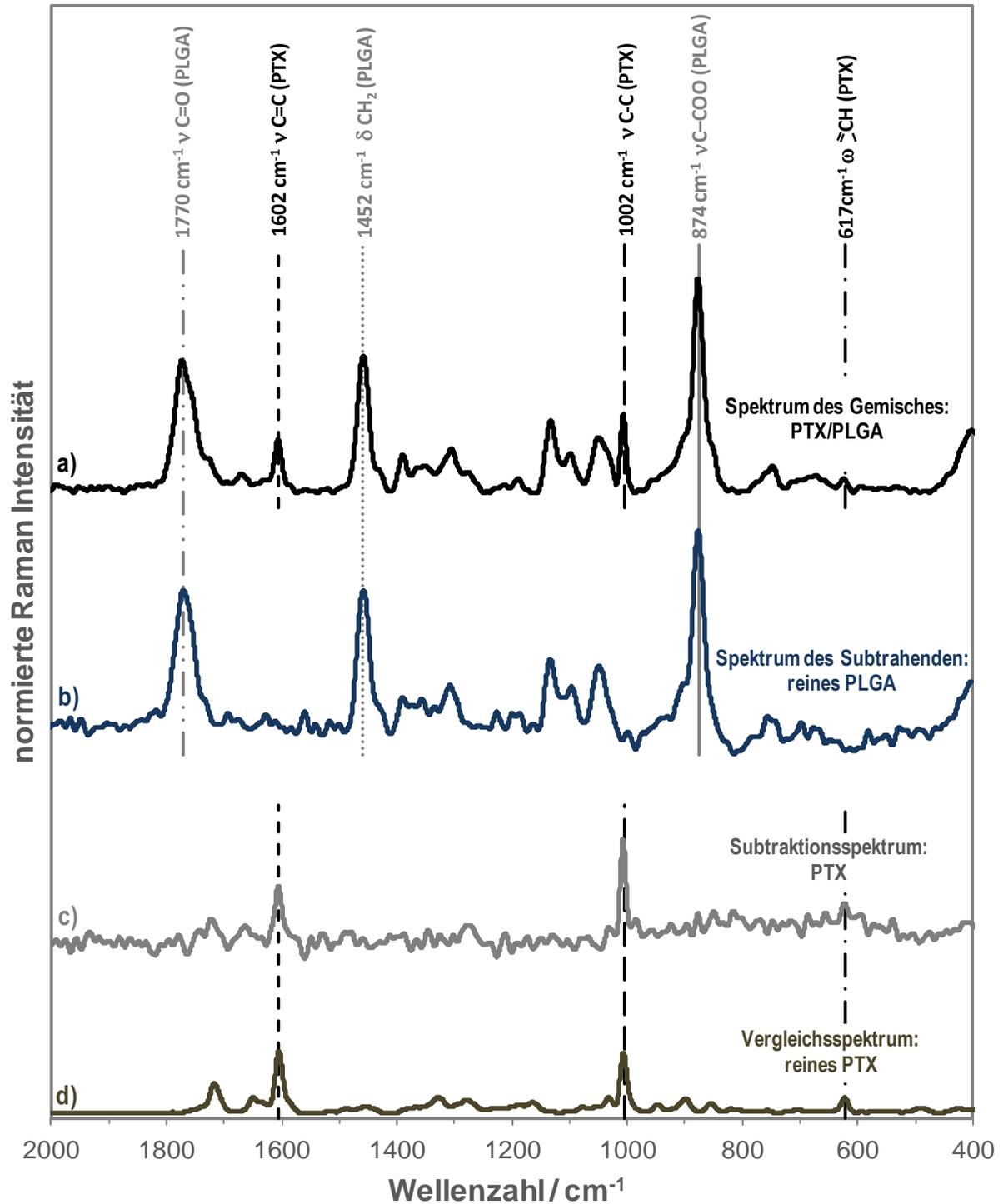


Abbildung 6.5: Spektrensubtraktion nach Messung der Oberfläche eines mit Paclitaxel/PLGA beschichteten Metallstents (PES) (2ω Nd:YAG-Laser, Anregungswellenlänge: 532 nm, Leistung: 5 mW, Messzeit: 10 s, Spektralaufösung: 4 cm^{-1}).

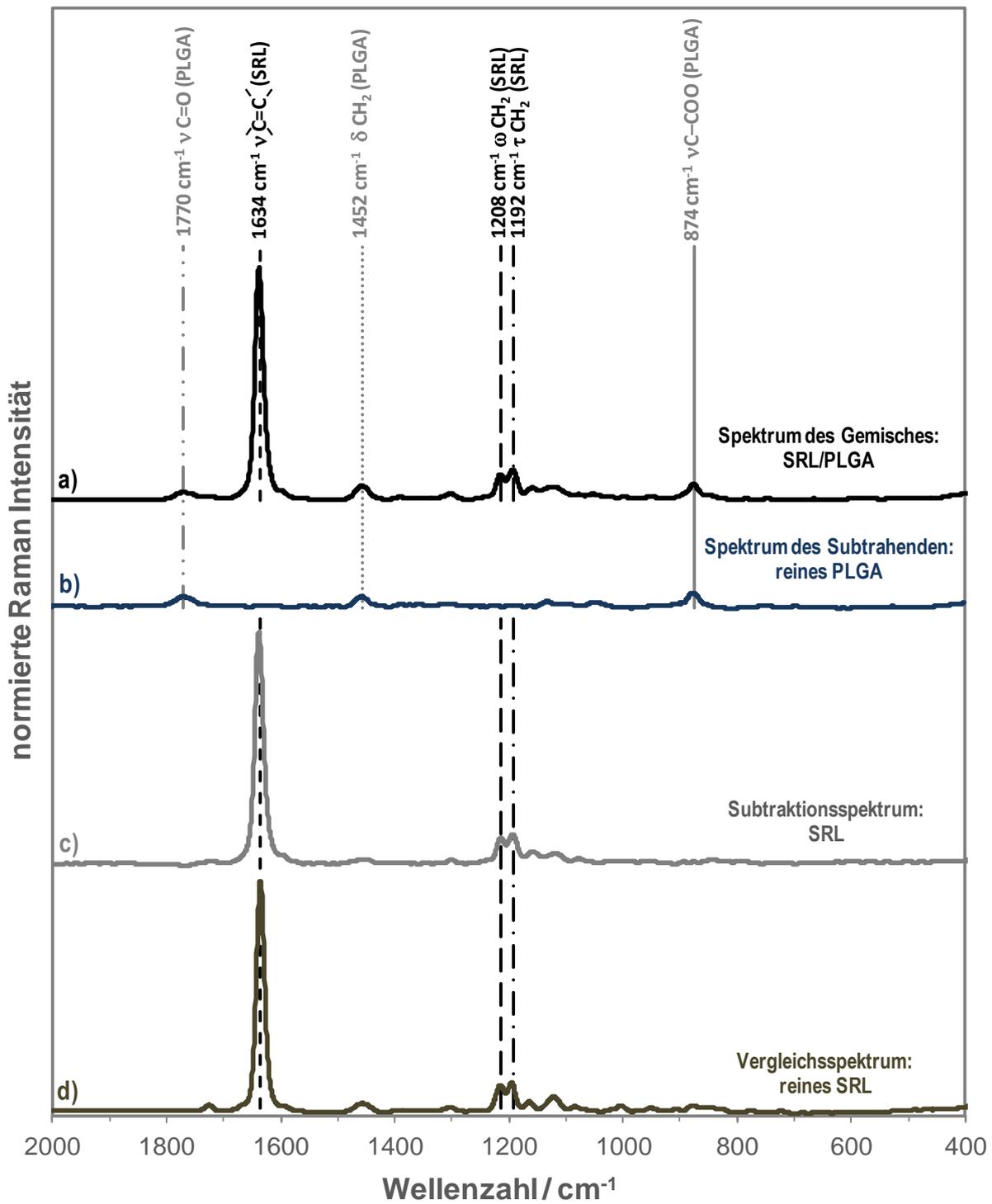


Abbildung 6.6: Spektrensubtraktion nach Messung der Oberfläche eines mit Sirolimus/PLGA beschichteten Metallstents (SES) (2ω Nd:YAG-Laser, Anregungswellenlänge: 532 nm, Leistung: 5 mW, Messzeit: 10 s, Spektralaufösung: 4 cm^{-1}).

6.3 Mikro-röntgenemissionsspektroskopische Untersuchung medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme

Um die induzierte neointimale Hyperplasie zu ermitteln und zwei verschieden beschichtete Metallstents mit antiproliferativen Wirkstoffen (Paclitaxel bzw. Sirolimus) gegenüber unbeschichtetem Metallstent zu vergleichen, wurde eine Mikro-röntgenemissionsspektroskopische Untersuchung an histologischen Paraffin-Blöcken gestenteter Koronararterien (siehe Tabelle 6.1) durchgeführt. Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission (μ -PIXE) bietet die Möglichkeit, die Oberfläche der Proben mit einer hohen lateralen Auflösung zu charakterisieren und die untersuchten Elemente mit einer guten Empfindlichkeit ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ -Bereich) zu detektieren [113,214].

6.3.1 Qualitativer Vergleich medikamentenfreisetzender Mg-SEE-Stent-Systeme

Da sich mit fokussierten, hochenergetisch beschleunigten Protonen zweidimensional projizierte Elementverteilungsbilder über einen definierten Bereich auf der untersuchten Probenoberfläche biologischer Präparate erzeugen lassen [215-220], konnten Darstellungen von hochaufgelösten Elementverteilungen in den gestenteten Schweine-Koronararterien erhalten und qualitativ ausgewertet werden.

Nach der Analyse der entsprechenden Röntgen-Spektren eines Testlaufs wurde beobachtet, dass neben den Signalen der Implantat-Komponenten (Dysprosium, Neodym, Zink und Zirconium) drei zusätzliche, ausgeprägte Signale (Schwefel, Calcium und Phosphor) vorlagen. Aus diesem Grund wurde beschlossen, diese sieben Elemente im Rahmen dieser Arbeit zu analysieren und zu diskutieren. In den Abbildungen 6.7 bis 6.12 sind die Elementverteilungsbilder unterschiedlicher Querschnitte von gestenteten Schweinekoronararterien zusammen mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme des jeweils untersuchten Bereiches dargestellt. Die Farbhelligkeit in diesen μ -PIXE-Bildern ist proportional zur gemessenen Intensität der in der Probe erzeugten Röntgenquanten, welche durch den abraasternden hochenergetischen Ionenstrahl erzeugt wurde.

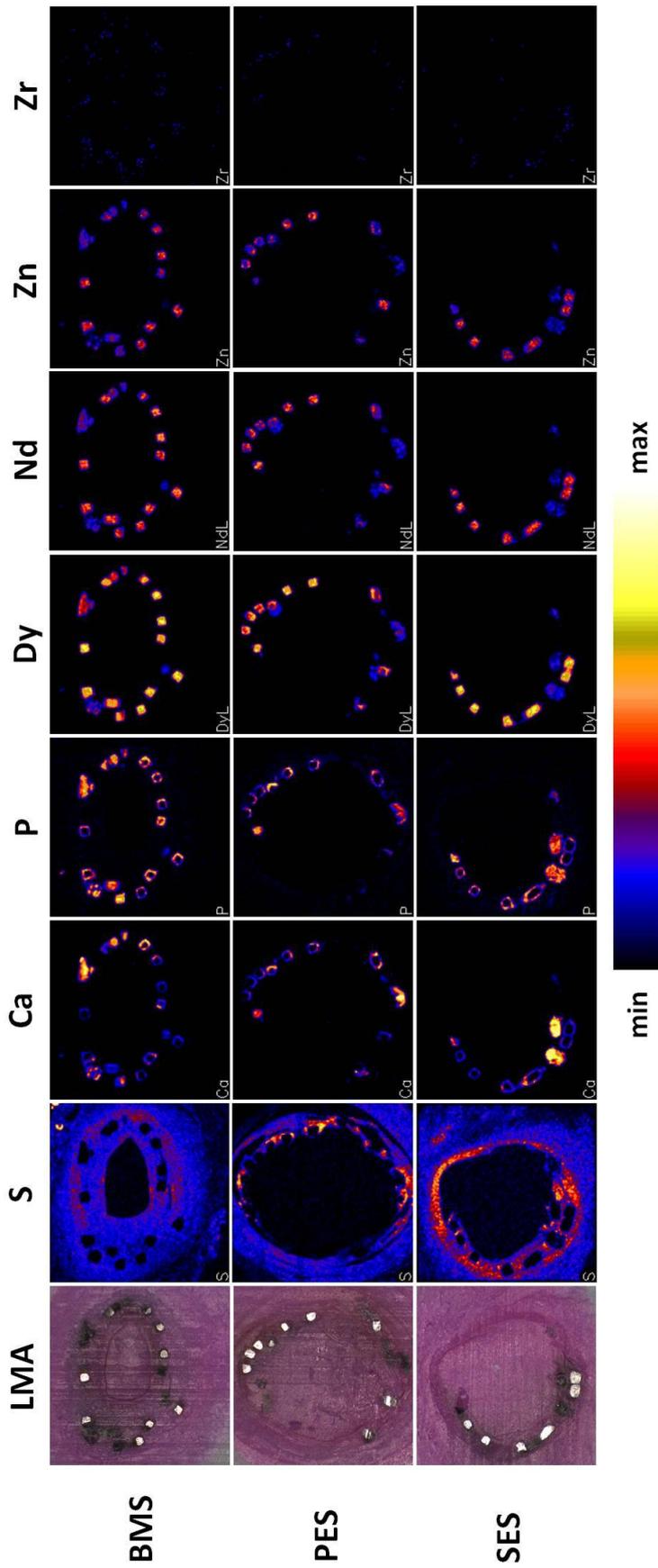


Abbildung 6.7: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und PIXE-Elementverteilungsbilder einer proximal-LAD-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.5), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.11) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.17).
PIXE: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m; Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70x2,70 mm, 100x.

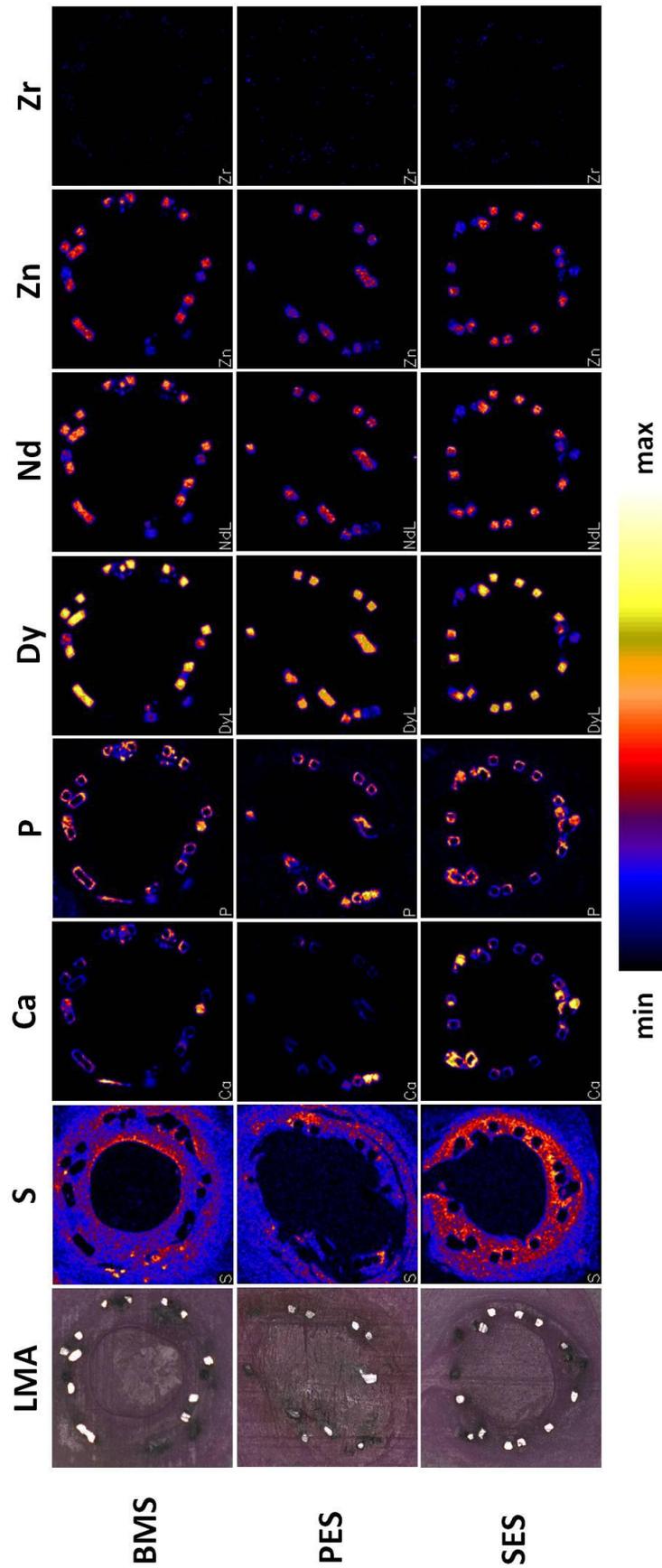


Abbildung 6.8: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und PIXE-Elementverteilungsbild einer medial-LAD-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.6), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.12) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.18).
 PIXE: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μC ; Strahldurchmesser: 1 μm ; Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70x2,70 mm, 100x.

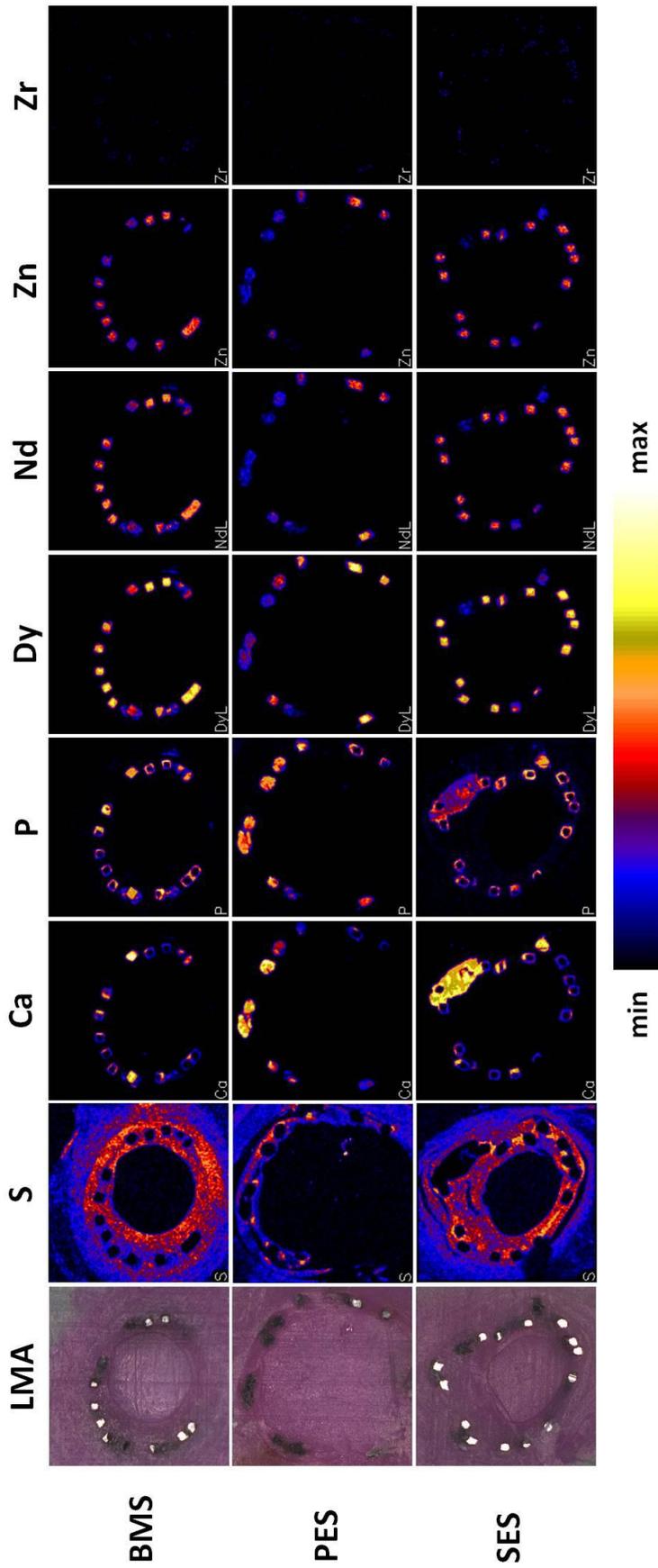


Abbildung 6.9: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und PIXE-Elementverteilungsbild einer distal-LAD-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.7), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.13) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.19).
PIXE: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m; Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70x2,70 mm, 100x.

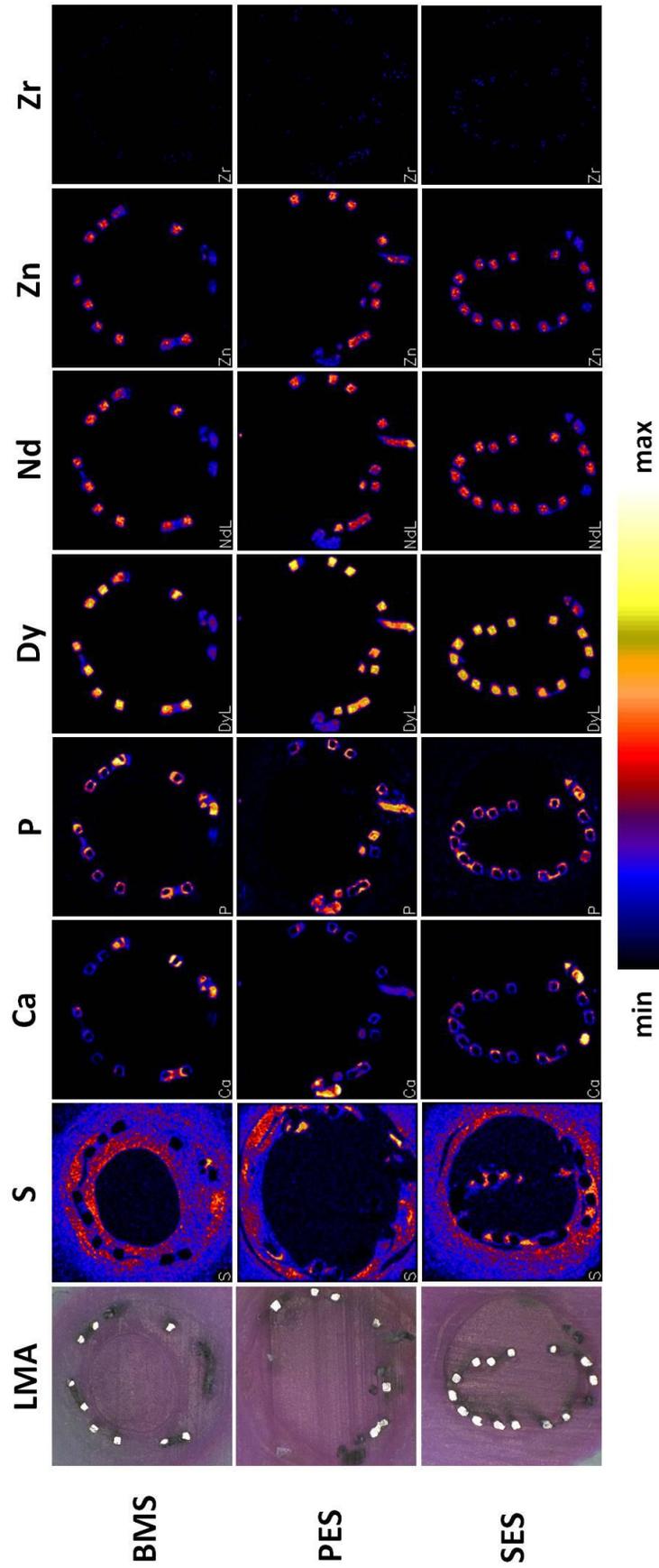


Abbildung 6.10: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und PIXE-Elementverteilungsbild einer proximal-LCx-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.8), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.14) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.20).
 PIXE: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 µC; Strahlendurchmesser: 1 µm; Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70×2,70 mm, 100x.

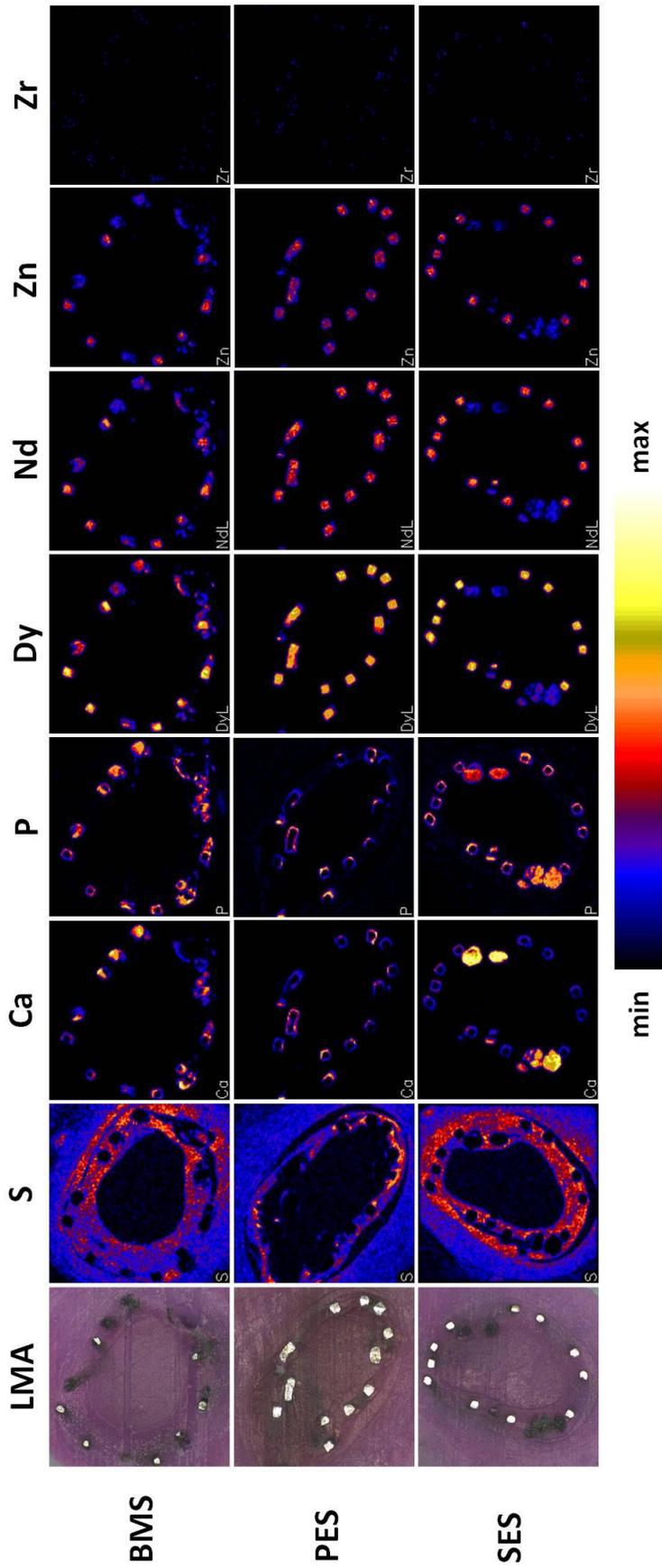


Abbildung 6.11: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und PIXE-Elementverteilungsbild einer medial-LCx-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.9), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.15) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.21).
PIXE: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m; Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70x2,70 mm, 100x.

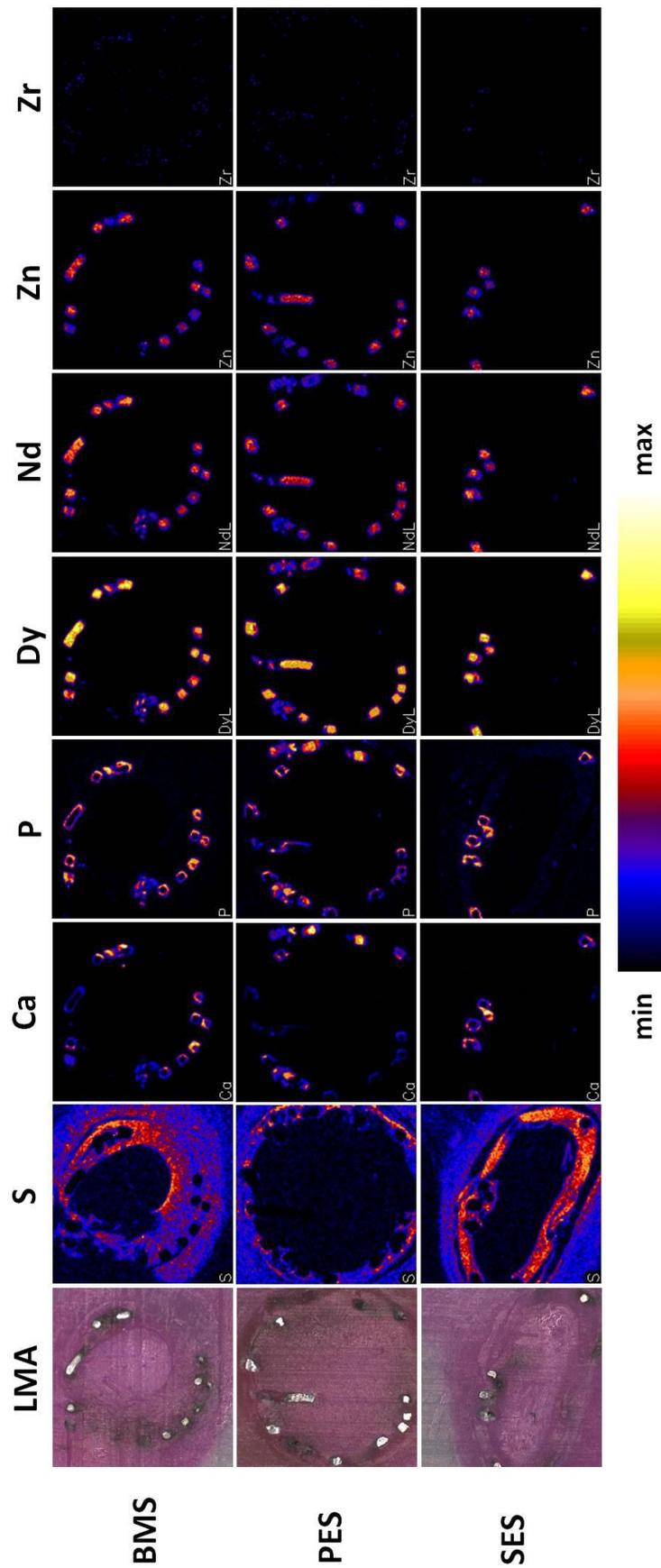


Abbildung 6.12: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und PIXE-Elementverteilungsbild einer distal-LCx-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.10), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.16) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.22).
 PIXE: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m; Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70x2,70 mm, 100x.

Aus den PIXE-Elementverteilungsbildern ist folgendes zu sehen:

- a. Schwefel-Bilder: durch die Verteilung dieses Elements kann deutlich unterschieden werden, wo sich Gewebe (blauer bis rot-oranger Bereich), Stent-Streben bzw. Lumen (schwarzer Bereich) in der untersuchten Fläche befinden. Auch ist ersichtlich, dass im Vergleich zu BMS, die PES-Bilder eine Erweiterung der Lumen-Fläche in beiden Abschnitten der Koronararterien zeigen (LAD und LCx). Im Gegensatz dazu ist in den SES-Bildern das Lumen im Vergleich zum BMS leicht oder kaum verändert. Eine relativ dichte Schwefel-Verteilung ist gleich oder etwas mehr als bei den BMS-Bildern um die Stent-Streben zu sehen. Die Differenz zwischen den beiden medikamentenfreisetzenden Stent-Systemen (PES und SES), bezogen auf den unbeschichteten Metallstent (BMS), entsteht natürlich aufgrund der unterschiedlichen Wirksamkeit des Medikaments und wird durch eine quantitative Bestimmung sowie eine histomorphometrische Bewertung in Abschnitt 6.3.2 und in Abschnitt 6.3.3 ausführlich diskutiert.
- b. Bilder der Legierungskomponenten des Implantats: Dysprosium ist sehr deutlich zu erkennen, Neodym und Zink lassen sich gut identifizieren, aber Zirkonium ist kaum sichtbar. Grund dafür ist die Fluoreszenzausbeute. Diese ist direkt proportional zur Atom- bzw. Massenkonzentration und auch abhängig von der Ordnungszahl Z des entsprechenden Elements ^[99,113,221]. Die gemessenen Elemente liegen in der Implantatlegierung mit einem Dy:Nd:Zn:Zr-Massen-Verhältnis von 50:5:5:1 vor. Außerdem zeigen die Bilder auch, dass es 4 Wochen nach der Implantation keinen deutlichen Hinweis auf eine Anreicherung dieser Elemente im Gewebe um die Stent-Streben gibt. Um dies zu prüfen, war es erforderlich, Detailaufnahmen um die Stent-Streben mit transversalem Intensitätsverlauf aufzunehmen. Diese ist in den Abbildungen 6.13 und 6.14 bzw. in den Abbildungen 6.16 und 6.17 dargestellt.
- c. Calcium- und Phosphor-Bilder: neben dem Schwefel-Signal wurden zusätzlich zu den Legierungskomponenten, wie Dy, Nd, Zn und Zr auch Calcium und Phosphor detektiert. Die beiden letzteren Elemente korrelieren in allen aufgenommenen Bildern direkt miteinander und daher erweist es sich entweder als eine Ca-P-Anreicherung bzw. Kalzifizierung oder eine Folge des Stent-Abbaus mit eventueller Bildung einer Ca-P-haltigen Mineralphase, denn diese mit Calcium und Phosphor angereicherten Bereiche finden sich interessanterweise um die Stent-Streben herum. Über diese Ca-P-haltigen Ablagerungen um das Implantat wurde schon seit Jahren in verschiedene Studien berichtet ^[222,223]. Um

diese Zusammenhänge zu klären, wurden sowohl Detailaufnahmen der Stent-Streben (siehe Abbildungen 6.13 - 6.15) als auch transversale Intensitätsverläufe (siehe Abbildungen 6.16 und 6.17) aufgenommen.

Aus den Detailaufnahmen in den Abbildungen 6.13 und 6.14 geht hervor, dass es sich um das Entstehen einer anorganischen Ablagerung oder mineralischen Phase handelt, die hauptsächlich aus Calcium und Phosphor besteht. Die Bildung dieser Ablagerung von Calciumphosphat oder anderen Calcium-haltigen Verbindungen, die als Kalzifizierung (auch Verkalkung) oder Mineralisierung bekannt ist [6,224], kann auf im Kreislaufsystem verwendete Biomaterialien und Implantate zurück zu führen sein und wird durch drei Faktoren beeinflusst [6]: a) den Stoffwechsel des Wirtes, b) die Struktur und chemische Zusammensetzung des Implantats, und c) die mechanische Belastung des Materials. Obwohl die Kalzifizierung eine große Vielzahl von medizinischen Implantaten beeinflusst, ist die Pathogenese der Mineralisation immer noch nicht völlig geklärt [224,225].

Morphologisch ist diese Ablagerung eine irreguläre Schicht mit unterschiedlichen Dicken (siehe Abbildungen 6.13 und 6.14), die auch als knotige Masse, je nach dem betroffenen Bereich und dem gemessenen Stent-Querschnitt, vorliegt, wie die Abbildung 6.15 zeigt und die Literatur [6,224,226] schon berichtet hat. Darüber hinaus zeigen die Abbildungen 6.16 und 6.17, dass die Kalzifizierung an der Oberfläche der Stent-Streben unterschiedliche Ausmaße annehmen kann mit einer Dicke bis zu 35 μm . Dies scheint unabhängig vom Stent-Typ (BMS oder DES) zu sein. Daneben zeigen diese Abbildungen auch (6.16 und 6.17), dass Calcium und Phosphor direkt korreliert sind und, wenn die Intensitäten dieser beiden Elemente ein Maximum erreichen, eine Abnahme der Intensität von Dysprosium stattfindet. Das könnte darauf hindeuten, dass sich die Mineralisation möglicherweise als Folge einer Auflösung oder eines Abbaus der Stent-Streben entwickelt. Um dies zu bestätigen, wurde mittels μ -PIXE eine Quantifizierung von S, Ca, P, Dy, Nd, Zn und Zr durchgeführt, welche im nächsten Abschnitt 6.3.2 beschrieben und diskutiert wird.

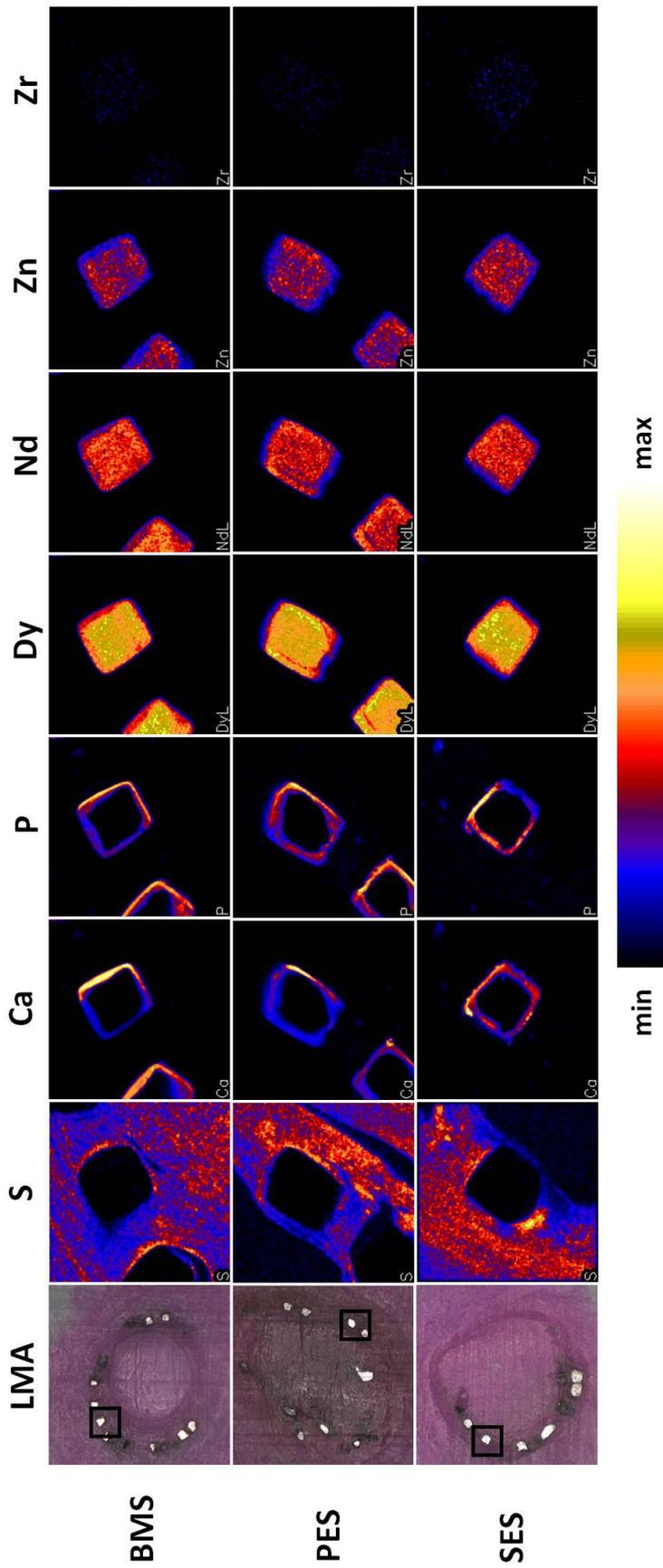


Abbildung 6.13: PIXE-Detailsaufnahmen von drei ausgewählten Stent-Streben in einer p-LAD-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation: LMA - Lichtmikroskopische Aufnahme mit gemessenem markierten Bereich, BMS - eines unbeschichteten Metallstents (P2.5), PES - eines Pacitaxel-freisetzenden Stents (P2.11) und SES - eines Sirolimus-freisetzenden Stents (P2.17). Protonenenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m, Kantenlänge μ PIXE-Abbildung: 400 \times 400 μ m.

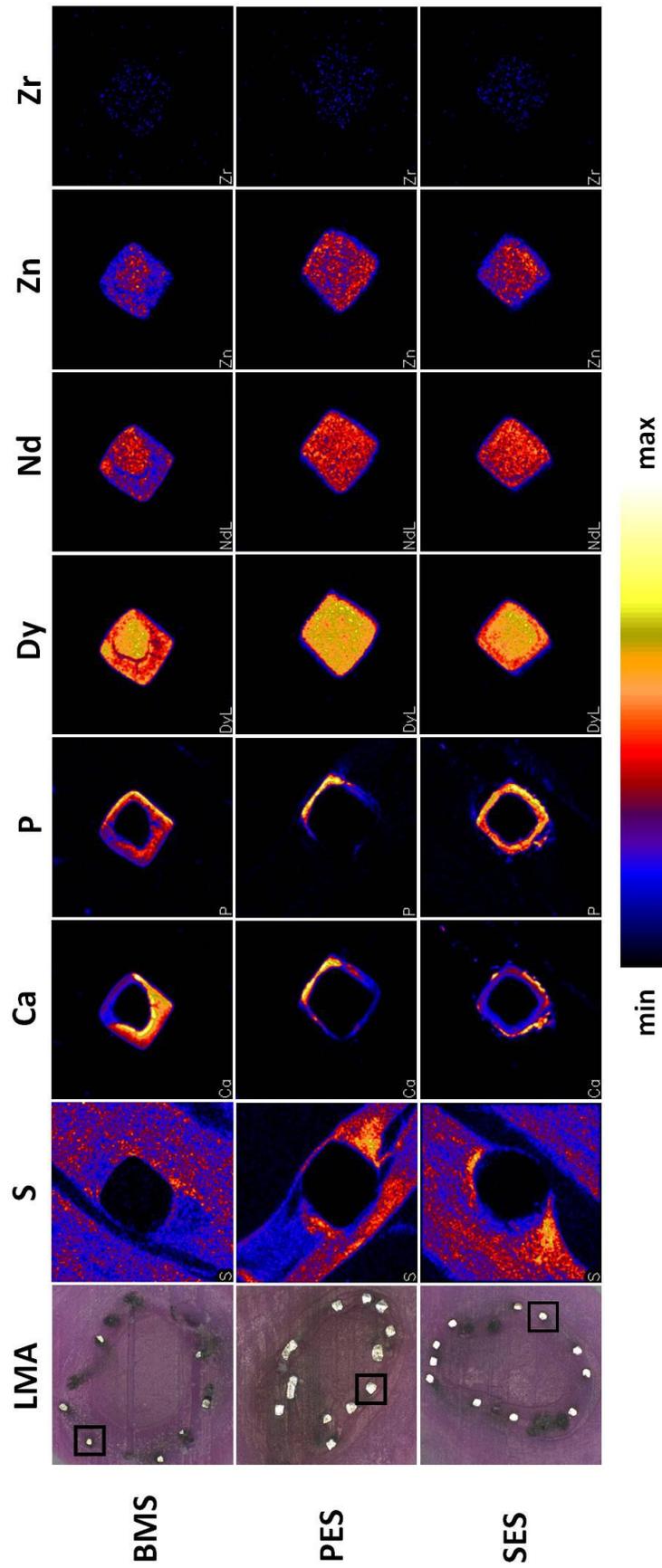


Abbildung 6.14: PIXE-Detailaufnahmen von drei ausgewählter Stent-Streben in einer m-LCx-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation: LMA - Lichtmikroskopische Aufnahme mit gemessenem markierten Bereich, BMS - eines unbeschichteten Metallstents (P2.9), PES - eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (P2.15) und SES - eines Sirolimus-freisetzenden Stents (P2.21). Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m, Kantenlänge μ PIXE-Abbildung: 400 \times 400 μ m.

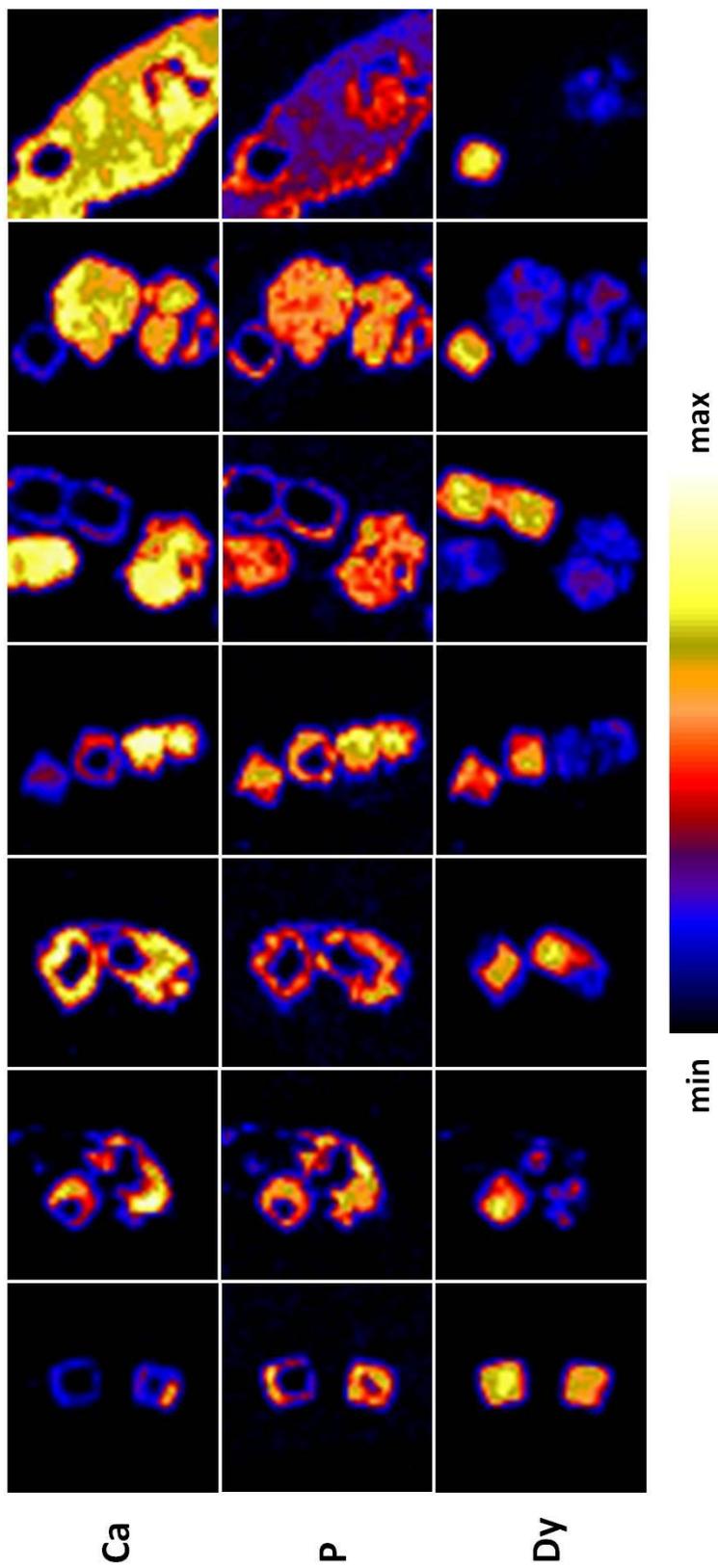


Abbildung 6.15: Ausbildung der Kalzifizierung um die Stent-Streben herum. PIXE-Verteilungsbilder für Calcium, Phosphor und Dysprosium: Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m; Kantenlänge Abbildung: 675 \times 675 μ m.

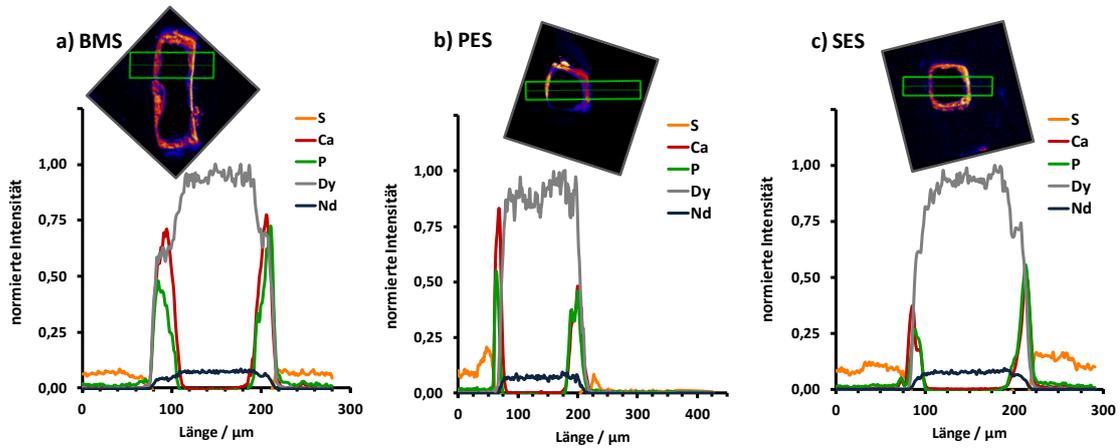


Abbildung 6.16: Normierter PIXE-Intensitätsverlauf von drei ausgewählten Stent-Streben in einer LAD-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation: a) eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.6), b) eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.11) und c) eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.19). Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 µC; Strahldurchmesser: 1 µm; Kantenlänge Abbildung: 0,40×0,40 mm.

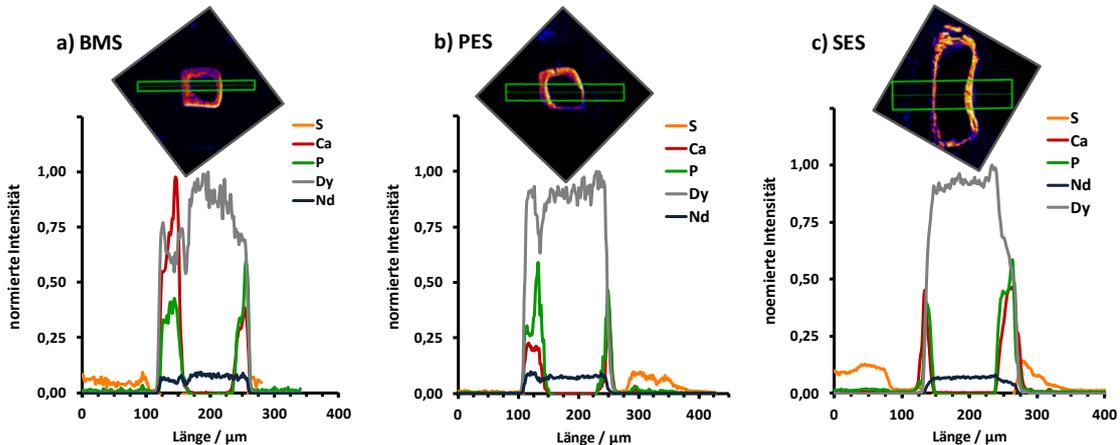


Abbildung 6.17: Normierter PIXE-Intensitätsverlauf von drei ausgewählten Stent-Streben in einer LCx-Koronararterie (Schwein) 4 Wochen nach Implantation: a) eines unbeschichteten Metallstents (BMS, P2.9), b) eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES, P2.14) und c) eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES, P2.22). Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 µC; Strahldurchmesser: 1 µm; Kantenlänge Abbildung: 0,40×0,40 mm.

6.3.2 Quantifizierung von S, Ca, P, Dy, Nd, Zn und Zr

Da die Intensität einer charakteristischen Röntgenlinie ein Maß für die Massenkonzentration des Elements ist [113,227] und die lokale Matrix-Zusammensetzung zur Berechnung der Dickenkorrekturfaktor sowie die Zahl der Inzidenzteilchen benötigt werden [228,229], wurden die μ -PIXE-Röntgenspektren und RBS-Energiespektren des Bereiches von Interesse ausgewertet, um eine standardfreie quantitative Elementanalyse durchzuführen. Die gemessenen Regionen wurden so gewählt, dass die für die Quantifizierung verwendeten Flächen ausreichende Intensitäten für die zu bestimmenden Elemente enthielten.

In Abbildung 6.18 sind exemplarische Detailaufnahmen zur Quantifizierung der Regionen auf der Stent-Strebe bzw. im umgebenden Gewebe mit den dafür verwendeten Bereichen der Probe (grün eingerahmte Flächen) zu sehen.

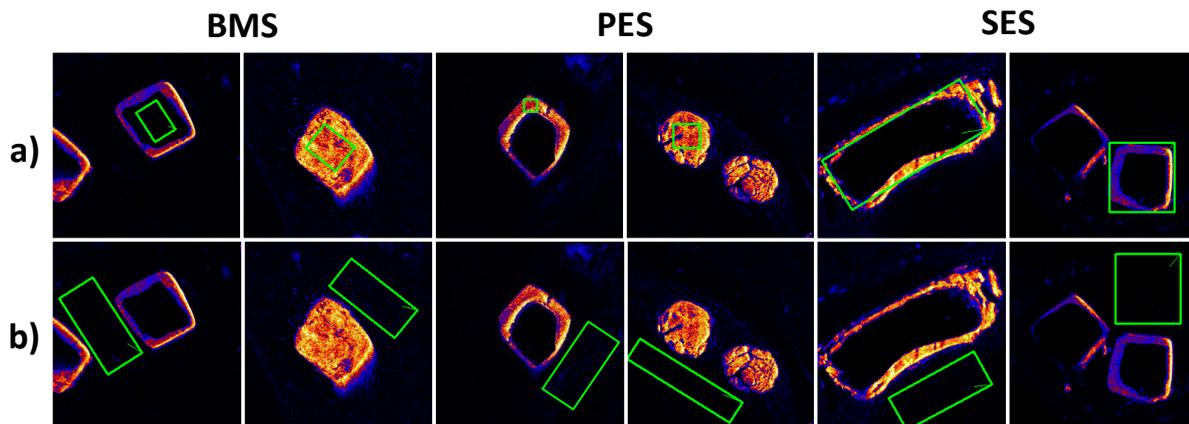


Abbildung 6.18: Ausgewählte PIXE-Detailaufnahmen zur Quantifizierung der Region auf a) der Stent-Strebe b) dem umgebenden Gewebe. Protonenergie: 2,25 MeV, Strom: 100-300 pA, Ladungsmenge pro Messung: 400 μ C; Strahldurchmesser: 1 μ m; Kantenlänge Abbildung: 0,40x0,40 mm.

6.3.2.1 Biomineralisierte Region

Die bisherigen qualitativen Ergebnisse zeigten, dass bei allen untersuchten Proben, unabhängig von Koronararterie und Stent-Typ, Biomineralisation stattfand. Ziel war es, einerseits einen möglichen Stent-Abbau nachzuweisen, und andererseits potenzielle neu gebildete Verbindung zwischen Ca und P nachzuweisen. Daher

wurden für die Auswertung nur 4 Elemente berücksichtigt: Ca und P (Hauptbestandteile der Kalzifizierung) sowie Dy und Nd als Bestandteile des Stents. Obwohl Zn eine höhere PIXE-Intensität im Vergleich zu Zr aufwies, wurde es nicht ausgewählt, weil laut Literatur^[230] Zink auch eine Rolle bei der pathologischen Kalzifizierung spielt. Mit den ermittelten Elementgehalten wurden Massenverhältnisse bestimmt, um die unterschiedlichen Proben besser zu vergleichen.

Das Massenverhältnis von Dy zu Nd betrug $12,7 \pm 2,3$ für die sehr heterogene kalzifizierte Region (n=8) und $12,2 \pm 1,0$ für die entsprechenden nicht-kalzifizierten Stent-Legierungen (n=5). Trotz dieser geringen Abweichung, welche auf die Heterogenität der analysierten Regionen zurückgeführt werden kann, kann daraus nicht der Schluss gezogen werden, dass der Stent abgebaut wurde. Für den Fall, dass die Stent-Legierung gleichmäßig abgebaut wurde, sollte sich wegen der sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften der beiden Seltenen Erden Elemente das Verhältnis zueinander nicht ändern. Hier spielt auch die Eindringtiefe des Analyseverfahrens (10-50 μm ^[99,113]) eine wichtige Rolle. Wenn eine kalzifizierte Region mit einer Dicke von bis zu 35 μm gemessen wurde (siehe Abschnitt 6.3.1), könnte der Ionenstrahl die Stent-Legierung erreichen und somit möglicherweise das erhaltene Dy/Nd-Massenverhältnis bestimmt werden. Aus diesem Grund ist für den Beweis des Stent-Abbaus auch die Analyse des Gewebes um das Implantat herum erforderlich. Andererseits ist die Biomineralisation sehr verschieden bezüglich der Mengen an mineralischen Anteilen, weshalb auch aufgrund der Inhomogenität sehr unterschiedliche Werte für das Ca/P-Massenverhältnis gemessen werden. Das deutet darauf hin, dass wahrscheinlich unterschiedliche Calciumphosphat-Phasen in den mineralischen Produkten gebildet wurden. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass die eingesetzte Technik nicht in der Lage ist, unterschiedliche Calciumphosphate einer Biomineralisierung von den organischen Phosphorverbindungen, die im Gewebe auch als Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Nukleotide vorliegen, zu unterscheiden. Drei unterschiedliche Ca/P-Verhältnisse wurden von den kalzifizierten Regionen unterschiedlicher Proben ermittelt: ein Verhältnis mit einem Mittelwert von $(0,76 \pm 0,16)$ für die meisten der untersuchten Proben (n=5: P2.12, P2.14, P2.15, P2.16 und P2.22), ein Verhältnis von 1,21 für eine der gemessenen Regionen (Probe P2.11) und zuletzt ein Verhältnis mit einem Mittelwert von $(2,91 \pm 0,64)$ für die analysierten Regionen der Proben P2.7 und P2.13. Laut Literatur^[6,223,226,230,231] ist die pathologische Kalzifizierung ein

schwachkristallines Calciumphosphat und nach *LeGeros* [232] und *Tomazic* [233] können in den Mineralphasen neben Carbonatapatit vom B-Typ (CHA, mit einem Ca/P-Verhältnis von 2,20 bis zu 2,97, auch als Bioapatit bezeichnet) andere Calciumphosphat-Phasen wie amorphes Calciumphosphat (ACP, mit einem Ca/P-Verhältnis zwischen 1,55 und 3,23), Calcium-Magnesium-Phosphat (TCMP, mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,94) und Oktacalciumphosphat (OCP, mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,72) gefunden werden (siehe Tabelle A3.1 im Anhang, biologisch relevante Calciumphosphate). Eine unvollständige Mineralisation aufgrund des hohen Phosphatgehaltes, wie unterschiedliche Autoren [231,234,235] berichteten, kann niedrige Verhältnisse erklären, denn eine arterielle Mineralisierung ist ein aktiver Prozess, der mit komplexen biomolekularen Mechanismen verbunden ist [225,233,236,237] und der abhängig ist von dem Gleichgewicht zwischen aktiven Induktoren und Inhibitoren dieser Mechanismen [238,239].

6.3.2.2 Gewebereich

Die erhaltenen Element-Massenanteile im Gewebe sind in Abbildung 6.19 dargestellt. Da die Durchführung eines *t*-Tests für die Gewebe ohne Implantat (als Referenz) gezeigt hat, dass es statistisch keinen Unterschied zwischen dem Elementgehalt beider Abschnitte der Koronararterie (LAD und LCx) gab, wurden die entsprechenden Ergebnisse nur nach Stent-Typ eingruppiert.

Obwohl die Elemente Dy, Nd, Zn und Zr gemessen wurden, ließen sich nur Spuren von Dysprosium (ca. $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in zwei von sechs untersuchten Proben (P2.7 und P2.9, Koronararterien mit einem unbeschichteten Metallstent als Implantat, BMS) nachweisen, aber nicht quantifizieren, weil die Werte unter den Bestimmungsgrenzen des Verfahrens ($150 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) lagen. Das bedeutet, dass eine empfindlichere Analysenmethode mit Nachweisgrenzen unter dem $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ -Bereich verwendet werden sollte. In diesem Sinne wurde die ns-Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-QMS) eingesetzt und in folgenden Abschnitt 6.4 vorgestellt und diskutiert.

Es ist auch zu bemerken, dass die Ca- und P-Gehalte sehr inhomogen im gemessenen Bereich waren und deshalb die Werte eine relative Messunsicherheit zwischen 30 und 50 % (Erweiterungsfaktor $k = 2$) erreichen, während der S-Gehalt

nahezu konstant mit einer relativen Messunsicherheit von etwa 10 % (Erweiterungsfaktor $k = 2$) geblieben ist.

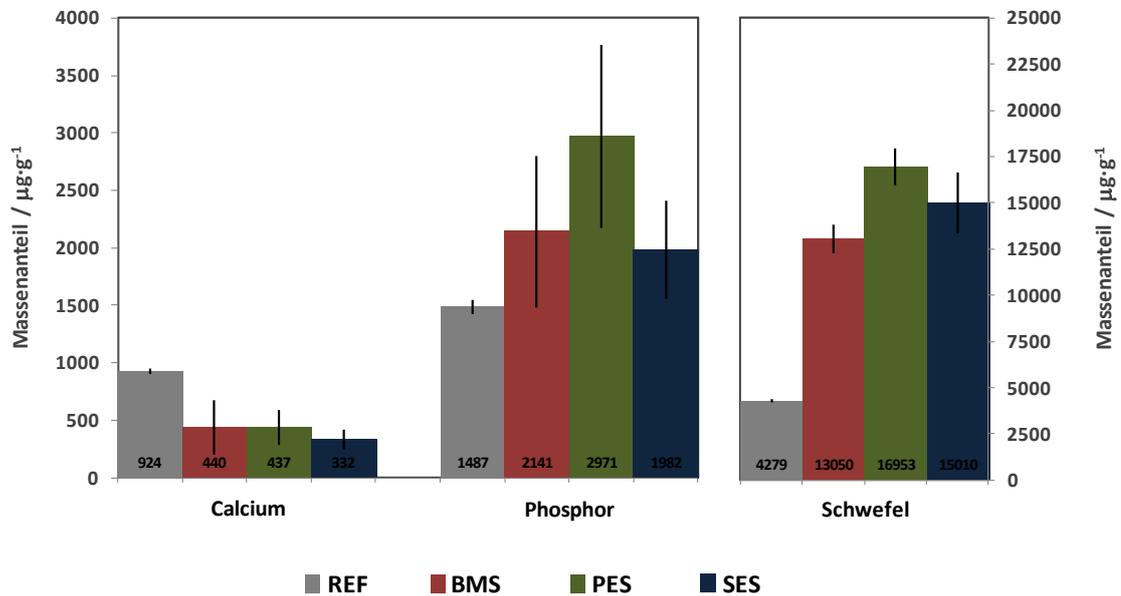


Abbildung 6.19: PIXE-Quantifizierung der Ca-, P- und S-Gehalte im Gewebe-Bereich: Koronararterie ohne Implantat als Referenz (REF) und nach der Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS), eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES) und eines Sirolimus-freisetzenden Stents (SES).

Aus der dargestellten μ -PIXE-Quantifizierung des Gewebereiches ist folgendes zu sehen:

- Calcium: Die Massenkonzentration dieses Elements sinkt auf Gehalte zwischen 52 und 65 % bezogen auf die Referenz. Dies könnte an dem Calcium-Verbrauch während der Biomineralisation zur Bildung bzw. Akkumulation der Ca-P-haltigen Mineralphase um die bzw. an der Stent-Strebe liegen.
- Phosphor und Schwefel: beide Elemente zeigen einen Anstieg: Phosphor zwischen 33 und 100 % und Schwefel zwischen 200 und 300 % bezogen auf die Referenz. Phosphor wird unter anderem für die zellulären Strukturkomponenten (z. B. Phospholipide, Nukleotide, Phosphoproteine), für die Energiespeicherung (wie ATP) und für den Sauerstofftransport (in roten Blutkörperchen, auch Erythrozyten genannt) benötigt ^[236]. Ein hoher Phosphorgehalt kann die Auswirkung einer Verringerung des Calciumgehalts

und eine ektopische Kalzifizierung – eine pathologische Biomineralisation im Weichgewebe wie kardiovaskuläres Gewebe [238,239] – umfassen [240]. Dies kann den niedrigen Calciumgehalt erklären. Währenddessen kommt Schwefel in allen lebendigen Organismen vor und ist ein sehr wichtiger Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin, einer Vielzahl von Proteinen wie z. B. Keratin, Insulin, Ribonuclease, der Cofaktoren Thiamin, Biotin, Liponsäure, Coenzym A, Molybdän-Cofaktor und Eisen-Schwefel-Cluster sowie der Proteoglykane (Glykosaminoglykane) [241–243]. Nach einer Stent-Implantation wurden vier vaskuläre Reaktionsphasen identifiziert: Thrombose, Entzündung, Proliferation und Remodellierung [244]. Veröffentlichte Studien [94,245,246] weisen nach, dass nach der Implantation eines Koronar-Stents eine Gefäßwandverletzung induziert werden und eine inflammatorische Reaktion ablaufen kann. Und nach *Echeverri* [247] ist die lokale inflammatorische Reaktion eine der kritischsten Faktoren einer vaskulären Verletzung, die durch einen medikamentenfreisetzenden Stent (DES) induziert wird. Dabei sind eine Reihe biologischer Wechselwirkungen aufgetreten, in denen sowohl zelluläre Komponenten (wie Fibrin, Erythrozyten, Thrombozyten, inflammatorische Zellen und Makrophagen) als auch extrazelluläre Matrix (EZM) beteiligt sind und die beide Elemente beinhalten. Damit könnte der Anstieg des P- und S-Gehaltes erklärt werden. Im Hinblick auf die Tatsache, dass PES einen hohen P- und S-Gehalt im Vergleich zu SES aufweist, ist es notwendig zu beachten, dass obwohl diese zwei Medizinprodukte (Sirolimus, SRL und Paclitaxel, PTX) in der Kardiologie als antiproliferative Medikamente mit einer wirksamen Verhinderung der neointimalen Hyperplasie durch Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen genutzt werden, wirken sie durch zwei ganz unterschiedliche Mechanismen [72,73,82,248]: SRL durch Hemmung des Zellwachstums (zytostatische Effekte) und PTX durch Apoptose (zytotoxische Effekte, programmierter Zelltod). SRL hemmt glatte Gefäßmuskelzellen und die Migration von Endothelzellen ohne Induktion von Zelltod durch Apoptose, während PTX zur Apoptose in beiden Zelltypen führen kann [248]. Und dies könnte die Ursache dafür sein, dass PES und SES unterschiedliche P- und S-Gehalte im Gewebe um die Stents ergeben. Ein Mechanismus, der einen höheren P-Gehalt mit PES implantierten Koronararterien erklären kann, ist die Induktion von Apoptose in vaskulären Zellen [249]. Durch diesen

Mechanismus wirkt PTX als Hemmer der endothelialen Zellproliferation und reduziert damit die neointimale Hyperplasie. Andererseits belegte die von *Wilson et al.* [250] durchgeführte präklinische Studie im Schweine-Modell, dass die Fibrin-Werte 30 Tage nach Implantation signifikant höher sowohl für PES als auch für SES im Vergleich zu BMS waren, während PES einen größer Wert als SES aufwies. Das Fibrin ist ein Proteinkomplex, der sich aus Fibrinogen bildet (ein Glykoprotein, das sich aus drei Paaren von Polypeptidketten zusammensetzt und die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind) [251]. Dies kann die Veränderung der Schwefelgehalte (PES > SES > BMS) im Gewebe erklären.

Die PIXE-Messungen zeigten, dass es keinen ausreichenden Hinweis auf eine Anreicherung der Komponenten aus dem metallischen Grundkörper des Implantats im Gewebe gibt.

6.3.3 Histomorphometrische Analyse der Neointima-Dicke mittels μ -PIXE

Die neointimale Dicke wird als der Abstand zwischen der Stent-Strebe und der Lumen-Oberfläche definiert [252]. Da die hierfür benötigten Informationen in den zweidimensional projizierten Elementverteilungsbildern von Schwefel und Dysprosium enthalten sind, wird in dieser Arbeit, basierend auf den PIXE-Elementverteilungsbildern die Neointima-Dicke bestimmt. Zum Vergleich wird die klassische histologische Färbemethode mit lichtmikroskopischer Detektion, die sich laut Literatur [253–258] als Referenzmethode etabliert hat, eingesetzt. Für die Untersuchungen wurden die histologischen Querschnitte der gestenteten m-LAD- und m-LCx-Koronararterien mit den Proben-Nummern: P2.8 und P2.9 mit einem unbeschichteten Metallstent (BMS), P2.12 und P2.15 mit einem Paclitaxel-freisetzenden Stent (PES) sowie P2.18 und P2.21 mit einem Sirolimus-freisetzenden Stent (SES) ausgewählt (Abbildung 6.20).

Für diese histomorphometrische Analyse wurden aus den entsprechenden lichtmikroskopischen und μ -PIXE-Bildern die Residual-Lumen (RL) und Stent-Diameter (SD) ermittelt (Abbildung 6.21), sowie die Neointima-Dicke (ND) und die

prozentuale In-Stent-Stenose (ISS) bestimmt. Dieser letzte zu bestimmende Wert wurde durch die folgende Gleichung 6.1 berechnet:

$$ISS = \frac{ND}{SD} = \frac{SD-RL}{SD} \times 100 \quad (6.1)$$

Eine exemplarische histomorphometrische Bestimmung der Neointima-Dicke ist in Abbildung 6.22 dargestellt. Die Daten der erhaltenen Werte von Residual-Lumen (RL) und Neointima-Dicke (ND) befinden sich in den Tabellen A4.1 und A4.2 im Anhang. Die morphometrischen Dreifachmessungen der Residual-Lumen und des Stent-Durchmessers wurden von zwei voneinander unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Als Ausmaß der systematischen Abweichung des erhaltenen ISS-Wertes nach μ -PIXE wurde, bezogen auf die lichtmikroskopische Detektion (Färbemethode) als Referenzwert, der Bias ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

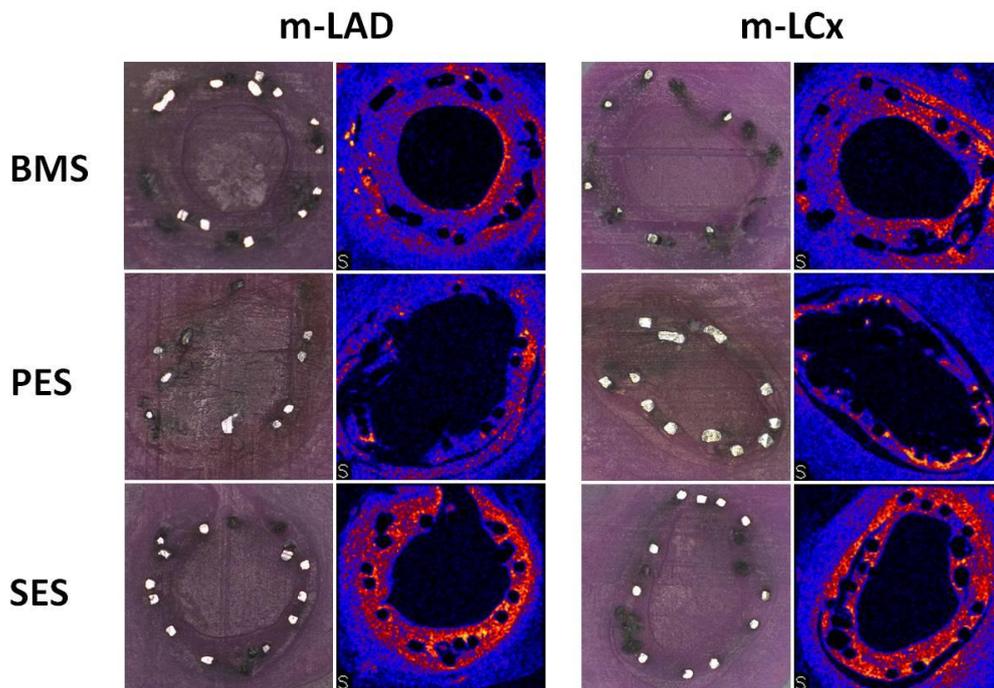


Abbildung 6.20: Lichtmikroskopische Aufnahme (LMA) und μ -PIXE-Elementverteilungsbilder von Schwefel zweier ausgewählter Koronararterien-Abschnitte zur Bestimmung der In-Stent-Stenose. BMS - eines unbeschichteten Metallstents (P2.6, P2.9), PES - eines Paclitaxel-freisetzenden Stents (P2.12, P2.15) und SES - eines Sirolimus-freisetzenden Stents (P2.18, P2.21). Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70x2,70 mm, 100x.

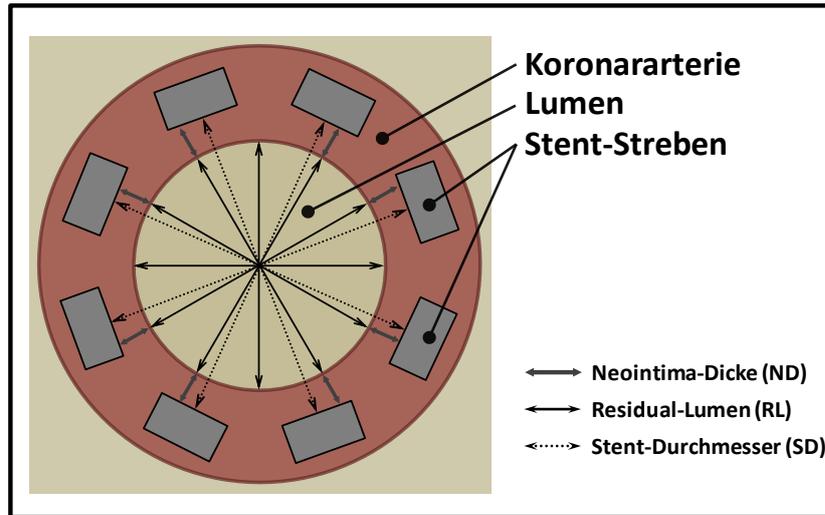


Abbildung 6.21: Messungen zur morphometrischen Bestimmung der Neointima-Dicke.

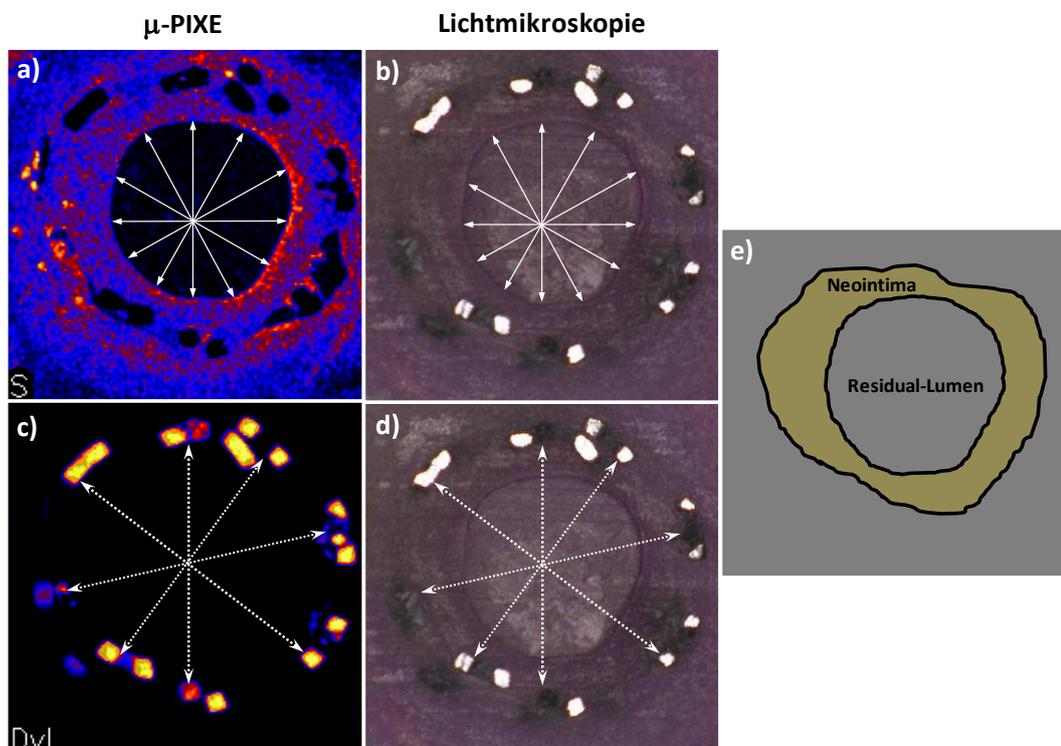


Abbildung 6.22: Histomorphometrische Methoden zur Bestimmung der Neointima-Dicke: μ-PIXE-Elementverteilungsbilder (a, c) und lichtmikroskopische Aufnahmen (b, d). Vermessung der Residual Lumen (a, b) und des Stent-Durchmessers (c, d). Darstellung der Neointima (e). Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: 2,70×2,70 mm, 100x.

Tabelle 6.3: Vergleich der histomorphometrischen Bestimmung der In-Stent-Stenose mittels klassischer lichtmikroskopischer und mikro-Röntgenemissions-Spektroskopischer Bilder.

Stent-Typ	Abschnitt der Koronararterie	μ-PIXE	Lichtmikroskopie	Bias ^a / %
		ISS / %		
BMS	m-LAD	31,9	31,4	1,5
	m-LCx	27,7	26,3	5,5
PES	m-LAD	0,0	0,0	-
	m-LCx	3,2	2,9	11
SES	m-LAD	14,6	15,0	-2,5
	m-LCx	21,5	21,7	-1,2

^a Bias (%) = [(ermittelter Wert – Referenzwert)/Referenzwert] × 100 [179,180].

Die in Tabelle 6.3 erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die histomorphometrische Analyse gestenteter Koronararterien mittels μ-PIXE verlässige und vergleichbare Ergebnisse liefert. Das Ausmaß des Bias beträgt weniger als 6 %. Nur der ISS-Wert eines PES-Schnittes (m-LCx) weist aufgrund einer geringeren Neointima-Dicke ein Ausmaß des Bias von etwa 10 % auf. Basierend auf der eindeutigen Identifikation des Gewebes durch das Schwefel-Signal und der Stent-Streben durch die entsprechenden Legierungselemente (Dy oder Nd) konnte mittels μ-PIXE der In-Stent-Stenosegrad bestimmt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben Elementverteilungs-Informationen aus den PIXE-Daten auch eine Reihe weiterer wichtiger Informationen gewonnen werden können. Für die Etablierung dieser Methode als Alternative zur lichtmikroskopischen Bestimmung von histomorphometrischen Daten sollte allerdings eine umfassende systematische Bewertung durchgeführt werden.

Die Neointimahyperplasie war nach 4 Wochen in BMS größer, so dass auch eine deutliche Differenz des In-Stent-Stenosegrades zwischen BMS und DES resultierte (Abbildung 6.20). Die medikamentenbeschichteten Stents haben das Potential, die Restenoserate entscheidend zu reduzieren [68,69,89,259], weil sie die bekannten Mechanismen der Stenoseentstehung – zelluläre Proliferation, Migration, Inflammation und Zellteilung – hemmen [69]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen

auch, dass im Vergleich zum BMS die Anwendung medikamentenfreisetzender Stents wie PES und SES zu einer Reduktion der neointimalen Proliferation und damit der In-Stent-Stenose führt. Der In-Stent-Stenosegrad verringerte sich dabei von etwa 30 % (BMS als Referenz) auf bis zu 3 % (PES) und auf zwischen 15 und 22 % (SES) (siehe Tabelle 6.3). Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Resultaten in Tierexperimenten [250,260,261], aus denen hervorgeht, dass nach 4 Wochen PES im Vergleich zu SES eine wesentlich geringere Neointima-Dicke aufweist (siehe Abbildung 6.20 sowie Tabellen A4.1 und A4.1 im Anhang) und somit zu einer signifikanten Reduktion des In-Stent-Stenosegrades führte. Dies liegt daran, dass PTX und SRL sich im Prozess der Neointimahyperplasie und Reendothelialisierung unterscheiden [262], da sie über zwei verschiedene Mechanismen wirken [82,248].

6.4 Festkörperspektrometrische Untersuchung von Neodym-Spuren in Koronararterien nach einer Mg-SEE-Stent-Implantation mittels ns-LA-ICP-QMS

Da sich Spuren von Legierungselementen aus den metallischen Mg-SEE-Stents im Gewebebereich mittel μ -PIXE nur schwer quantifizieren lassen (siehe Abschnitt 6.3.2.2), wird im nächsten Schritt eine festkörperspektrometrische Methode eingesetzt, um die Möglichkeit einer Anreicherung bzw. Diffusion gelöster Analyten aus dem metallischen Grundkörper des Implantats im Gewebe nachzuweisen und ihre Gehalte zu bestimmen. Die Laserablation-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-MS) bietet hierfür die Möglichkeit, eine Mikroanalyse von Spurenelementkonzentrationen durchzuführen und die untersuchten Elemente mit einer guten Empfindlichkeit zu detektieren. Die Nachweisgrenzen liegen je nach verwendetem Laser im unteren $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - bzw. oberen $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -Bereich [263,264]. Als große Herausforderung erweist sich oft die Quantifizierung, besonders wenn kein geeignetes zertifiziertes Referenzmaterial (ZRM) mit der gleichen Matrix zur Verfügung steht [264]. Aufgrund der fehlenden kommerziellen, festen Referenzmaterialien, die Seltene Erden Elemente wie Dysprosium oder Neodym enthalten und auf einer organischen Matrix basieren, können hierfür als Alternative Arbeitsreferenzmaterialien auf Acrylatbasis selbst hergestellt werden, die als Analyt eine geeignete organometallische

Verbindung benötigen, um die Homogenität im Polymer gewährleisten zu können (Metallorganische Verbindungen weisen eine höhere Homogenität in Polymer-Matrices auf als anorganische Füllmaterialien^[120]). Wie in vorherigen Abschnitt 6.3.2.2 bereits diskutiert wurde, ist Dysprosium ein besonders interessantes Element für die Untersuchung der degradablen Mg-SEE-Implantate, es stehen allerdings keine geeigneten kommerziell erhältlichen metallorganischen Dysprosium-Verbindungen (weder als öllösliches Metallsulfonat noch als Metallacetylacetonat) zur Verfügung. Da Neodym auch als Nebenbestandteil der Stent-Legierung und ebenfalls kommerziell als Neodym(III)-acetylacetonat-hydrat verfügbar war, wurde beschlossen, dieses Element über das stabile Isotop ¹⁴⁶Nd (es tritt keine relevante Interferenz auf^[265]) massenspektrometrisch zu analysieren.

Obwohl die Arbeitsreferenzmaterialien auf Basis einer organischen Verbindung wie der Acrylate hergestellt werden können, muss dennoch darauf geachtet werden, dass während der Ablations- und Massentransportprozesse sowie während der Verdampfungs-, Atomisierungs- und Ionisationsvorgänge ein gleiches Verhalten für das Arbeitsreferenzmaterial und die Gewebe-Proben vorliegt. Deshalb ist es erforderlich, Matrixeffekten vorzubeugen. Andererseits sind darüber hinaus die Messungen am LA-ICP-MS zeitabhängig, was bedeutet, dass eine instrumentelle Drift die Intensität des Analyten beeinflussen kann. Um die Auswirkung der Matrixeffekte sowie die instrumentelle Drift auf die Messsignale berücksichtigen zu können, wurde hier als Strategie die Anwendung von zwei Isotopen (¹³C und ¹³⁹La) für Korrekturen eingesetzt. Aufgrund der hohen Menge an Kohlenstoff in biologischen Proben bzw. Geweben, die einer möglichen Sättigung des Detektors bei LA-ICP-MS-Messungen führen kann, wird das häufigste Kohlenstoff-Isotop ¹²C nicht verwendet und somit wird üblicherweise, zur Reduzierung von Matrixeffekten, das ¹³C-Signal mit einer relativen Isotopenhäufigkeit von 1,07 % als interner Standard eingesetzt, wie die Literatur^[266-272] berichtet. Zur Korrektur der instrumentellen Driften kann das ¹³⁹La-Signal verwendet werden, weil dieses Isotop in demselben Massenbereich wie das zu bestimmende Isotop ¹⁴⁶Nd liegt und ein vergleichbares Ionisationspotential (IP) wie der Analyt besitzt (IP_{La} = 5,58 eV und IP_{Nd} = 5,49 eV; Werte nach Literatur^[264]).

6.4.1 Charakterisierung der Neodym-haltigen Festkörper-Arbeitsreferenzmaterialien mittels ICP-OES

Die Festkörper-Arbeitsreferenzmaterialien wurden charakterisiert und daraus ergibt sich ein Neodym-Massenanteil von (Angabe in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$): $(1,23 \pm 0,14)$, $(5,87 \pm 0,50)$, $(13,90 \pm 0,57)$, $(24,42 \pm 0,90)$, $(37,7 \pm 1,2)$, $(45,6 \pm 1,5)$, $(57,5 \pm 1,9)$. Die Massenanteile weichen von dem nominalen Wert im relativen Umfang um bis zu 23 % ab (siehe Tabelle A5.3 im Anhang). Grund dafür ist das Herstellungsverfahren, wie *Schwartz* ^[120] berichtete. Allerdings fällt auf, dass diese Abweichungen keine Rolle spielen, wenn die ermittelten Massenanteile bei der Kalibrierung berücksichtigt werden.

6.4.2 Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes mittels Verbrennungsanalyse (VA)

Da die ablatierten Massen und somit auch die transportierten Massen von den Materialeigenschaften abhängig sind, wird das ^{13}C -Signal als interner Standard verwendet, um die Matrixeffekte zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 6.4). Deshalb war es erforderlich, den Kohlenstoffgehalt der Referenzmaterialien sowie den der zu untersuchenden Proben zu bestimmen.

Arbeitsreferenzmaterialien:

Wie zu erwarten war, zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass der Kohlenstoff-Massenanteil (im Gew.-%-Bereich) nicht durch die Zugabe von geringen Mengen an Neodym (bis zu $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) verändert wurde (siehe Abbildung A5.1 im Anhang) und einen Durchschnittswert von $(68,44 \pm 0,56)$ Gew.-% ergab.

Gewebe-Proben:

Die Verbrennungsanalyse ergab einen Kohlenstoffgehalt von $(74,6 \pm 2,6)$ Gew.-% für das Paraffin und von $(48,1 \pm 1,1)$ Gew.-% für das entparaffinierte Gewebe.

Unter dem Umstand, dass die zu untersuchenden Proben in Paraffin eingebettet wurden und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Gewebeflüssigkeit durch ihre Infiltration mit dem entsprechenden Einbettmaterial ersetzt wurde (ca. 79 % Wasser enthalten laut Literatur ^[150,273] Arterien bzw. Herzgewebe), erreicht der

berechnete Kohlenstoffgehalt in den paraffinierten Koronararterien einen Wert von $(69,0 \pm 3,0)$ Gew.-%.

6.4.3 Bestimmung des Neodymgehalts in den Koronararterien mittels ns-LA-ICP-QMS

Die transienten Messsignale der gemessenen Isotope für die Ablation der Neodym-Arbeitsreferenzmaterialien sind in Abbildung 6.23 dargestellt. Die Graphen zeigen die transienten Messsignale des Untergrundbereiches vor und nach dem Ablationvorgang (UG₁ bzw. UG₂) sowie des Auswertebereiches. Die relative Höhe des ¹³C-Untergrundsignals, die durch Verunreinigungen im Argongas, aus der Atmosphäre und den Gasleitungen verursacht wird [274], beeinflusst die gemessene ¹³C-Intensität. Deshalb war die Durchführung einer Untergrundkorrektur besonders bei diesem Isotop notwendig. Das Verhältnis der relativen untergrundkorrigierten Intensitäten des ¹⁴⁶Nd-Signals zum Signal des ¹³C-Isotops als interner Standard dient als analytischer Parameter. Die erhaltene lineare Kalibrierfunktion ist in Abbildung 6.24 dargestellt.

Um die realen Proben mittels ns-LA-ICP-MS zu untersuchen, wurden Linienscans mit einer Länge von 300 µm auf dem Gewebebereich der gestenteten Koronararterien durchgeführt und die transienten Messsignale der gemessenen Isotope genauso wie die gemessenen Neodym-haltigen Arbeitsreferenzmaterialien verarbeitet. Die Anzahl der untersuchten Proben sowie die Anzahl der ablatierten Linienscans sind in Tabelle 6.4 angegeben. Mit Hilfe der erhaltenen Kalibrierfunktion ließ sich Neodym charakterisieren. Die entsprechenden Ergebnisse der Analyse an den ausgewählten Proben der Koronararterien sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst. Bei dieser Spurenanalyse mit ns-LA-ICP-MS lagen die Ergebnisse alle in der Nähe der Bestimmungsgrenze. Diese war für Neodym $< 3,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, sodass Neodym in den untersuchten Gewebebereichen nur nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden konnte (das analytische Verfahren ergibt eine Nachweisgrenze von $0,71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) und somit mit µ-PIXE nicht nachweisbar war (siehe Abschnitt 6.3.2.2). Hierfür wäre die Anwendung einer leistungsfähigeren Methode wie z. B. Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) oder eines anderen Lasers notwendig.

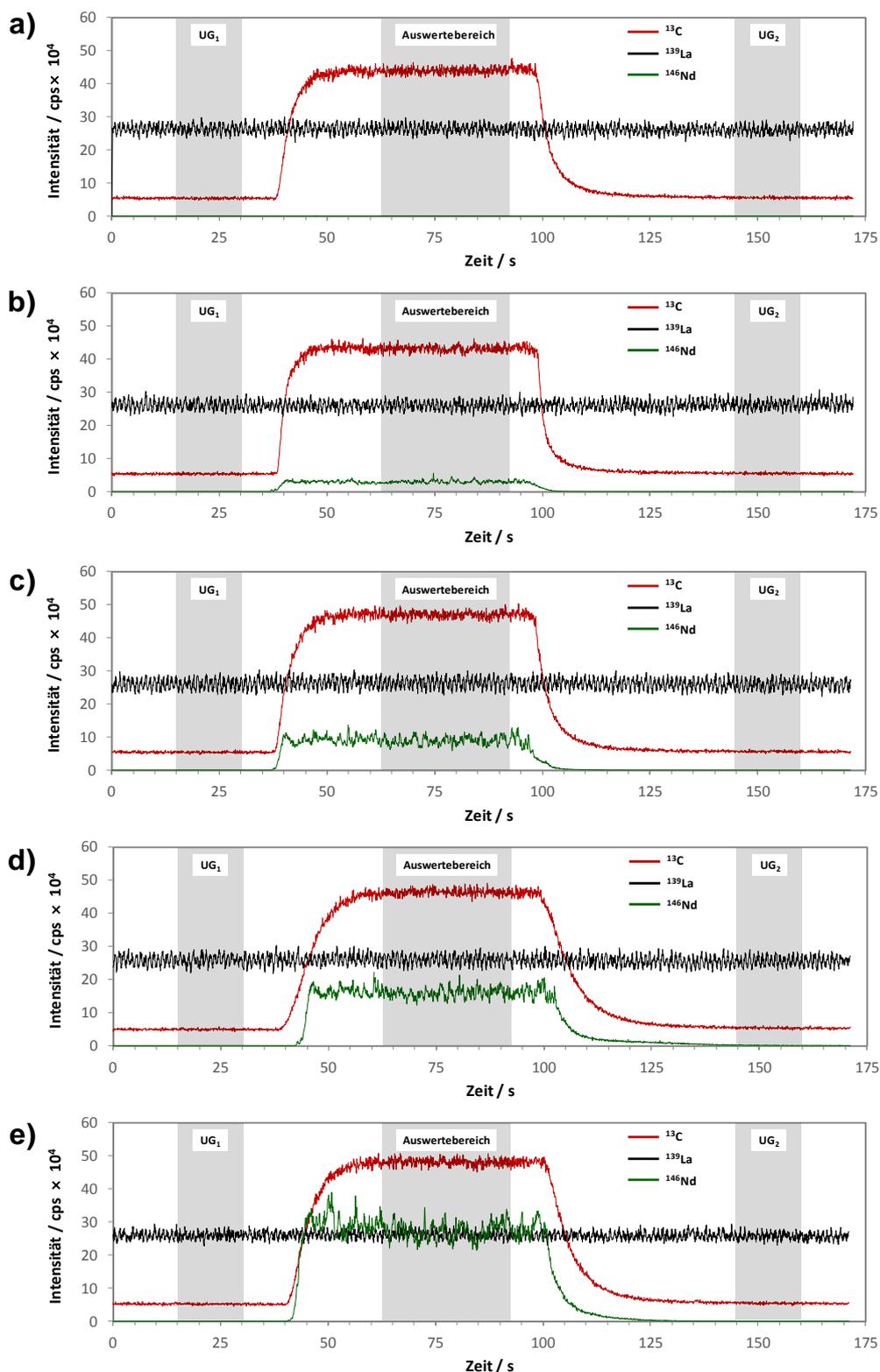


Abbildung 6.23: Signalverlauf von ^{13}C , ^{139}La und ^{146}Nd bei Ablation der Neodym-haltigen Arbeitsreferenzmaterialien: a) Blindwert, b) $\approx 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{Nd}$, c) $\approx 15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{Nd}$, d) $\approx 25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{Nd}$ und e) $\approx 35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{Nd}$. (Laserbedingungen Leistungsdichte: $0,10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, Pulsrate: 10 Hz, Laserspotgröße: $100 \mu\text{m}$, Scangeschwindigkeit: $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Heliumfluss: $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$).

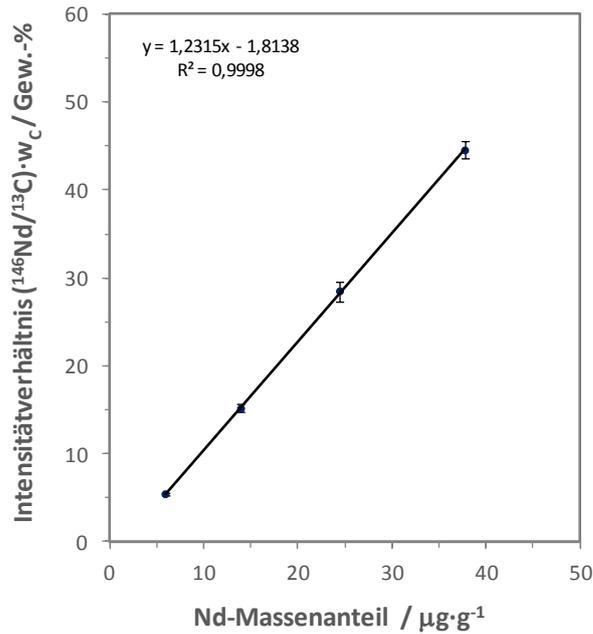


Abbildung 6.24: Kalibrierfunktion für Neodym mittels ns-LA-ICP-MS.

Tabelle 6.4: Bestimmung des Neodymgehalts in gestenteter LAD- und LCx-Koronararterie mittels ns-LA-ICP-QMS.

Stent-Typ	Anzahl der Proben ^a	Anzahl der gemessenen Linien ^b	Nd-Gehalt / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		NG ^c / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
			Koronararterie		
			LAD	LCx	
BMS	$n = 3$	$m = 16-26$			
PES	$n = 3$	$m = 26-28$	< 3,0	< 3,0	0,71
SES	$n = 3$	$m = 16-24$			

^a entspricht einem proximalen, einem medialen und einem distalen Segment pro untersuchte Koronararterie.

^b entspricht der Gesamtanzahl der ablatierten 300 μm -Linien pro untersuchte Koronararterie.

^c ermittelte Nachweisgrenze mit der Kalibriermethode nach DIN 32645 ^[182].

Die Ergebnisse in Tabelle 6.4 zeigen, dass nach vier Wochen Verweildauer eine Freisetzung des Neodyms durch Abbau des Implantates bzw. durch Diffusion gelöster Legierungskomponenten nachgewiesen werden kann. Es kann jedoch kein Anreicherungseffekt des untersuchten Elements Neodym im umgebenden Arterienewebe erkannt werden, wie dies in zwei anderen Studien ^[275,276] mit Koronararterien und mit Knochen beobachtet wurde.

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Anwendung einer neuen analytischen Methode zur Untersuchung des zeitabhängigen Abbaus von Poly(L-lactid) auf beschichteten permanenten Metallstents, die im Tiermodell eingesetzt worden waren, dargestellt. Des Weiteren wurden Mg-SEE-Stent-Systeme (unbeschichtet und medikamentenbeschichtet) hinsichtlich ihrer Wirkung auf das umliegende Arteriangewebe sowie die Auswirkung der Freisetzung zweier Wirkstoffe (Paclitaxel bzw. Sirolimus) eines medikamentenfreisetzenden Stents (DES) auf die zelluläre Proliferation mit einer alternativen analytischen Methode (μ -PIXE) miteinander verglichen.

Hierfür wurden histologische Präparate verwendet, die mit Hilfe unterschiedlicher kardiovaskulärer Stent-Systeme (unbeschichtete, passiv beschichtete und -aktiv-medikamentenbeschichtete Metallstents) in Schweinearterien implantiert worden waren.

In einem ersten Schritt wurde eine neue analytische Methode unter Einsatz der Mikro-Raman-Spektroskopie entwickelt, um den zeitabhängigen Abbau von Poly(L-lactid) auf beschichteten permanenten Metallstents quantitativ charakterisieren zu können. Nach der Optimierung der Raman-Bedingungen ließ sich Polylactid in einer komplexen Matrix (Gewebe, Abbauprodukten und

Einbettungsmaterial) untersuchen. Da PMMA als Einbettungsmaterial zu dieser Matrix gehörte und keine Bandenüberlagerung zwischen der C-COO-Streckschwingung von PLA bei 873 cm^{-1} und der symmetrischen C-O-C-Streckschwingung von PMMA bei 813 cm^{-1} vorlag, wurde PMMA als interner Standard verwendet. So konnte der PLA-Restgehalt aus den relativen Flächenverhältnissen der Raman-Banden $A_{873}^{\text{PLA}} / (A_{873}^{\text{PLA}} + A_{813}^{\text{PMMA}})$ bestimmt werden. Die zur Quantifizierung benötigten Kalibrationsproben aus PLA/PMMA-Polymerblends, die durch das Verfahren der gemeinsamen Ausfällung aus einer Lösung hergestellt wurden, zeigten nach der thermischen Charakterisierung, dass die Komponenten des Blends eine homogene Mischung bilden. Das erhaltene Kalibrationsmodell war in dem geprüften PLA-Massenanteil-Intervall ($0,0625$ bis $0,875\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) mit einem Signifikanzniveau von 99 % linear ($\alpha < 0,01$).

Statistisch gesehen ergab die Untersuchung der realen histologischen Proben, nach gleicher Implantationszeit, dass die prozentualen PLA-Gehalte, unabhängig von der Stentposition, vergleichbar waren. Darüber hinaus wurde das Polylactid nach 24 Monaten noch nicht vollständig abgebaut, sondern erst nach 36 Monaten. Zum Abschluss bestätigten die Ergebnisse, dass der Abbau des *L*-PLA durch eine hydrolytische Degradation über den Bulk-Erosionsmechanismus erfolgte.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte mikro-Raman-spektroskopische Methode erwies sich als ein geeignetes analytisches Verfahren zur quantitativen Charakterisierung von biologisch abbaubarem Poly(*L*-lactid) in einer Polymethylmethacrylat-Matrix (als Einbettungsmaterial für die Gewebeproben). Deshalb könnte diese Methode als Grundlage zur Untersuchung des Abbauverhaltens von Beschichtungsmaterialien anderer Polymere in passiv beschichteten Stent-Systemen oder auch in medikamentenfreisetzenden Stent-Systemen angewendet werden.

In einem zweiten Schritt wurde Mikro-Partikel-induzierte Röntgenemission (μ -PIXE) als alternative Methode für die Untersuchung dreier bioresorbierbarer Metallstent-Systeme auf Mg-SEE-Basis, mit und ohne Medikamentenbeschichtung, eingesetzt, um die Wirkung des Abbaus der Mg-SEE-Stents auf das umliegende Arterienewebe sowie die Auswirkung der Freisetzung zweier Wirkstoffe (Paclitaxel bzw. Sirolimus) eines medikamentenfreisetzenden Stents (DES) auf die zelluläre Proliferation zu vergleichen.

Die PIXE-Messungen zeigten, dass es keinen ausreichenden Hinweis auf eine Anreicherung der Komponenten aus dem metallischen Grundkörper des Implantats im Gewebe gab. Aber die PIXE-Quantifizierung der Ca-, P- und S-Gehalte im Gewebe-Bereich zeigte, bezogen auf die Referenz (Koronararterie ohne Implantat), dass vier Wochen nach der Implantation die Massenkonzentration von Calcium sank, während der Gehalt an Phosphor und an Schwefel deutlich stieg.

Basierend auf der Identifikation des Gewebes durch das Schwefel-Signal und der Stent-Streben durch das entsprechende SEE-Signal wie Dysprosium ließ sich der In-Stent-Stenosegrad mittels μ -PIXE bestimmen. Damit konnte die induzierte neointimale Proliferation vier Wochen nach Implantationsdauer mittels μ -PIXE quantitativ bewertet werden. Die vorläufigen Ergebnisse einer histomorphometrischen Analyse gestenteter Koronararterien mittels μ -PIXE lieferten Werte mit einem Ausmaß des Bias weniger als 6 % im Vergleich zur klassischen histologischen Färbemethode mit lichtmikroskopischer Detektion. Für die Etablierung dieser Methode als Alternative zur klassischen histomorphometrischen Methode sollte allerdings eine umfassende systematische Bewertung durchgeführt werden.

Die erhaltene experimentellen μ -PIXE-Ergebnisse bewiesen, dass an der Mg-SEE-Stent-Oberfläche der untersuchten medikamentenfreisetzenden Stent-Systeme (PES bzw. SES) eine Hemmung der zellulären Proliferation stattgefunden hat. Der In-Stent-Stenosegrad verringerte sich von etwa 30 % (unbeschichteter Metallstent, BMS als Referenz) auf bis zu 3 % (Paclitaxel-freisetzender Stent, PES) und auf zwischen 15 und 22 % (Sirolimus-freisetzender Stent, SES). Die röntgenemissionsspektroskopische Bewertung der Auswirkung medikamentenfreisetzender Stent-Systeme bestätigte auch, dass im Vergleich zum BMS bei Anwendung medikamentenfreisetzender Stents wie PES und SES eine Reduktion der neointimalen Hyperplasie eintritt und damit zu einer Abnahme der In-Stent-Stenose (ISS) führt.

Das Entstehen einer inhomogenen Calciumphosphat-Phase, die sich aus unterschiedlichen Calcium-Phosphor-Verhältnissen um die Stent-Streben herum gebildet hatte, konnte mittels μ -PIXE charakterisiert werden.

Darüber hinaus wurde die Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-QMS) als zusätzliche Methode angewendet,

um die aus den biodegradierbaren Mg-SEE-Stent-Systemen degradierten Spurengehalte an Neodym in der Umgebung des Implantats nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Anwendung von LA-ICP-MS bewies, dass vier Wochen nach der Implantation des biodegradierbaren Mg-SEE-Stents der Gehalt an Neodym in dem umgebenden Arterienewebe unterhalb der Bestimmungsgrenzen der Verfahren ($3,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) lag.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Untersuchung von Neodym im umgebenden Arterienewebe sowohl mittels μ -PIXE als auch mittels LA-ICP-QMS keinen deutlichen Hinweis auf eine Anreicherung lieferte. Zudem ließen sich mittels ns-LA-ICP-QMS zwar Neodym-Spuren in der Umgebung des Implantats nachweisen, aber es müsste eine leistungsfähigere Methode wie Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) verwendet werden, um dieses Element quantifizieren zu können.

A

Anhang

A.1 Bestimmungen mit CCD-ICP-Emissionspektrometer

Tabelle A1.1: Messparameter des CCD-ICP-OES.

Plasmaleistung	1400 Watt
Pumpgeschwindigkeit	30 min ⁻¹
Kühlgasfluss	12,00 L·min ⁻¹
Hilfsgasfluss	1,00 L·min ⁻¹
Zerstäuber-Gasfluss	0,79 L·min ⁻¹
Zerstäubertyp	Modifizierter Lichte-Zerstäuber

Tabelle A1.2: Verwendete Standardlösungen zur Herstellung der Kalibrierstandards.

Element	Massenkonzentration / mg·L ⁻¹	Dichte / kg·L ⁻¹	Hersteller
Magnesium	1000,4 ± 2,0	1,013	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dysprosium	1000,7 ± 2,0	1,011	Carl Roth GmbH + Co. KG
Neodym	1000,5 ± 2,0	1,011	Carl Roth GmbH + Co. KG
Zink	1002,0 ± 2,0	1,020	Merck KGaA
Zirkon	1000,0 ± 5,0	1,014	VWR International Ltd.

Tabelle A1.3: Kalibrationsdaten zur Bestimmung der Zusammensetzung einer Mg₁₀Dy₁Nd₁Zn_{0,2}Zr-Legierung.

Element	Linie / nm	Kalibrationsbereich / µg·g ⁻¹	Anzahl der Kalibrierlösung	NG ^a / ng·g ⁻¹
Mg	202,647	10 – 80	8	300
	279,079			770
Dy	353,170	1,0 – 8,0	8	62
	364,540			42
Nd	401,225	0,5 – 4,0	8	21
	406,109			21
Zn	202,613	0,5 – 4,0	8	40
	206,200			36
Zr	272,262	0,1 – 0,8	8	17
	343,823			20

^a ermittelte Nachweisgrenze mit der Kalibriermethode nach DIN 32645 ^[182].

A.2 Bestimmung des PLA-Gehaltes eines mit Poly(L-lactid) beschichteten metallischen koronaren Stents mittel μ -RS

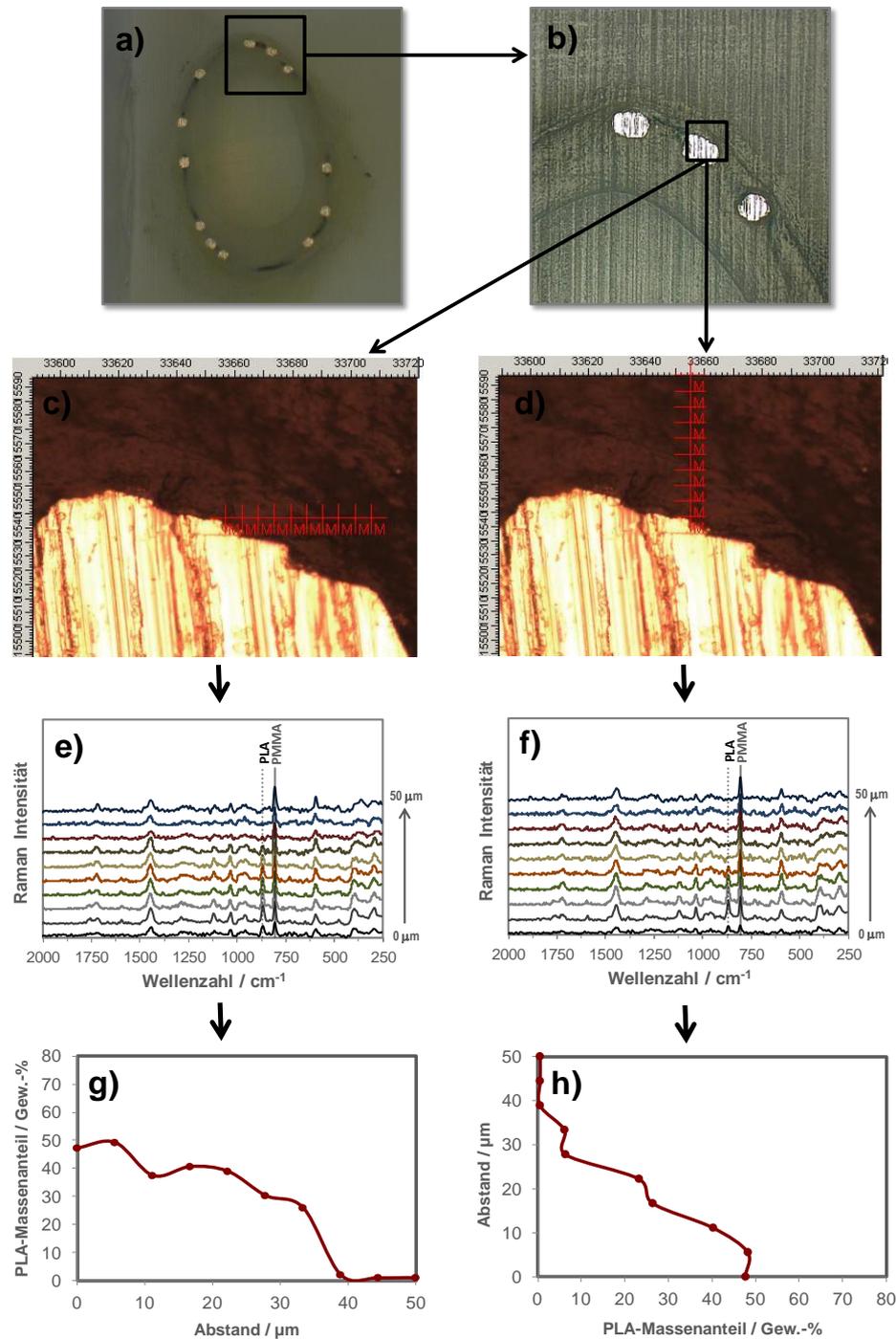


Abbildung A2.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit dem eingerahmten untersuchten Bereich (a-b) und mit den entsprechenden markierten Messpositionen (c-d), Raman-Spektren (e-f) und PLA-Gehaltsprofil (g-h) ausgewählter Querschnitte durch eine LCx-Koronararterie (Schwein) 6 Monate nach Implantation eines PLA-beschichteten Metallstents – Probe P1.2. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a) $3,9 \times 3,9$ mm, 50x; b) $1,2 \times 1,2$ mm, 100x; c) und d) 130×95 μm , 1000x.

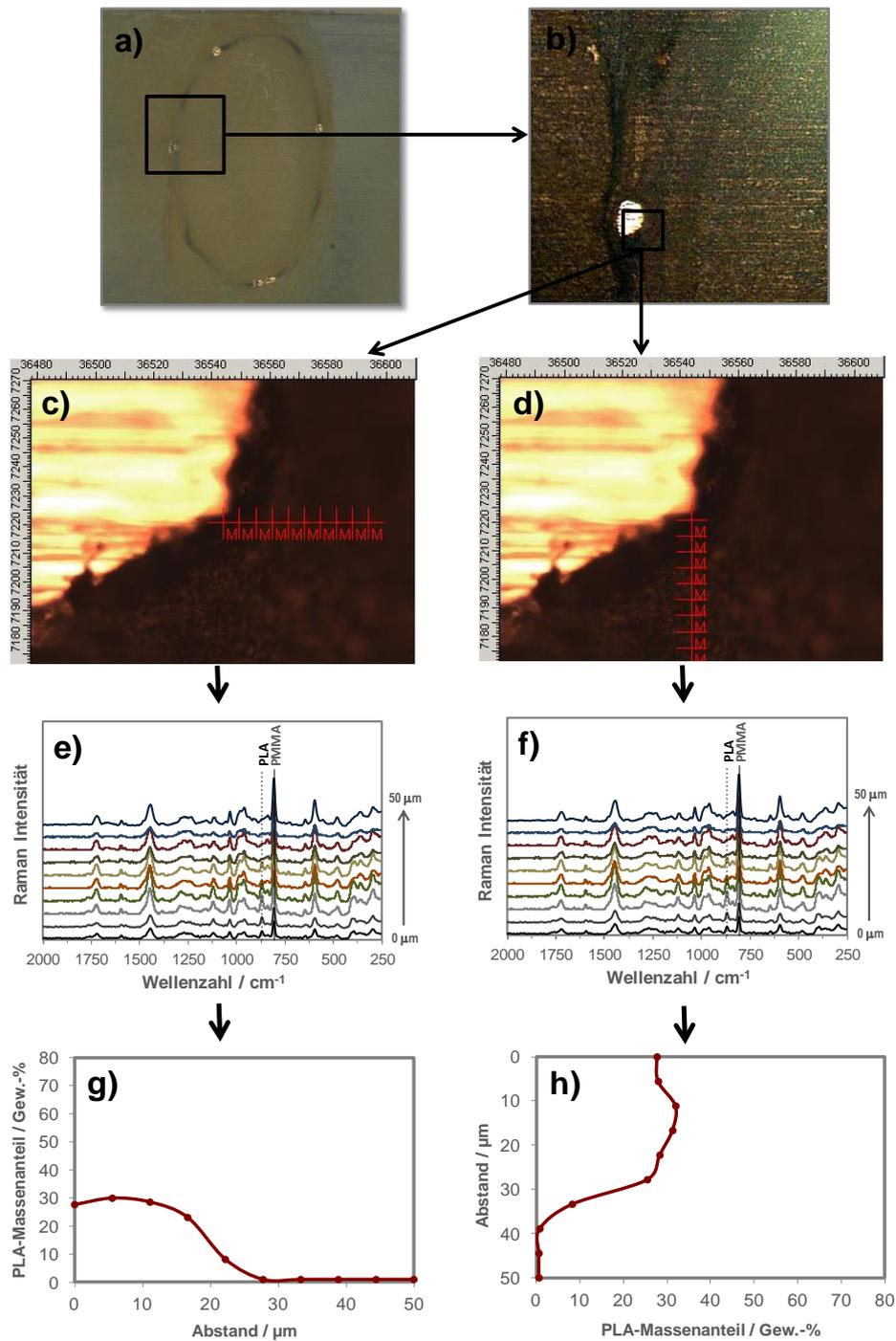


Abbildung A2.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit dem eingrahmten untersuchten Bereich (a-b) und mit den entsprechenden markierten Messpositionen (c-d), Raman-Spektren (e-f) und PLA-Gehaltsprofil (g-h) ausgewählter Querschnitte durch eine LAD-Koronararterie (Schwein) 12 Monate nach Implantation eines PLA-beschichteten Metallstents – Probe P1.6. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a) 3,9×3,9 mm, 50x; b) 1,2×1,2 mm, 100x; c) und d) 130×95 μm, 1000x.

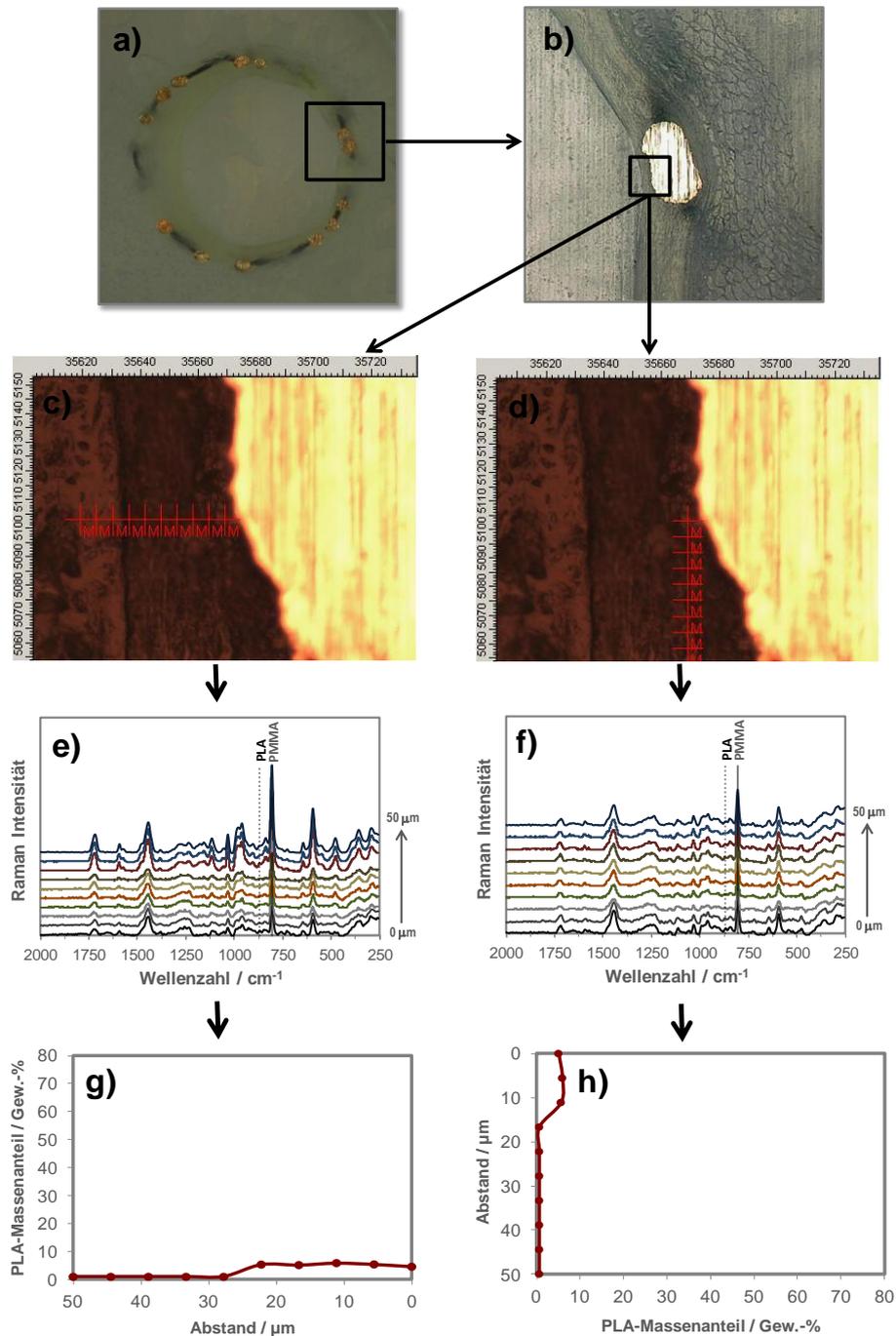


Abbildung A2.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit dem eingerahmten untersuchten Bereich (a-b) und mit den entsprechenden markierten Messpositionen (c-d), Raman-Spektren (e-f) und PLA-Gehaltsprofil (g-h) ausgewählter Querschnitte durch eine RCA-Koronararterie (Schwein) 24 Monate nach Implantation eines PLA-beschichteten Metallstents – Probe P1.9. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a) 3,9×3,9 mm, 50x; b) 1,2×1,2 mm, 100x; c) und d) 130×95 μm, 1000x.

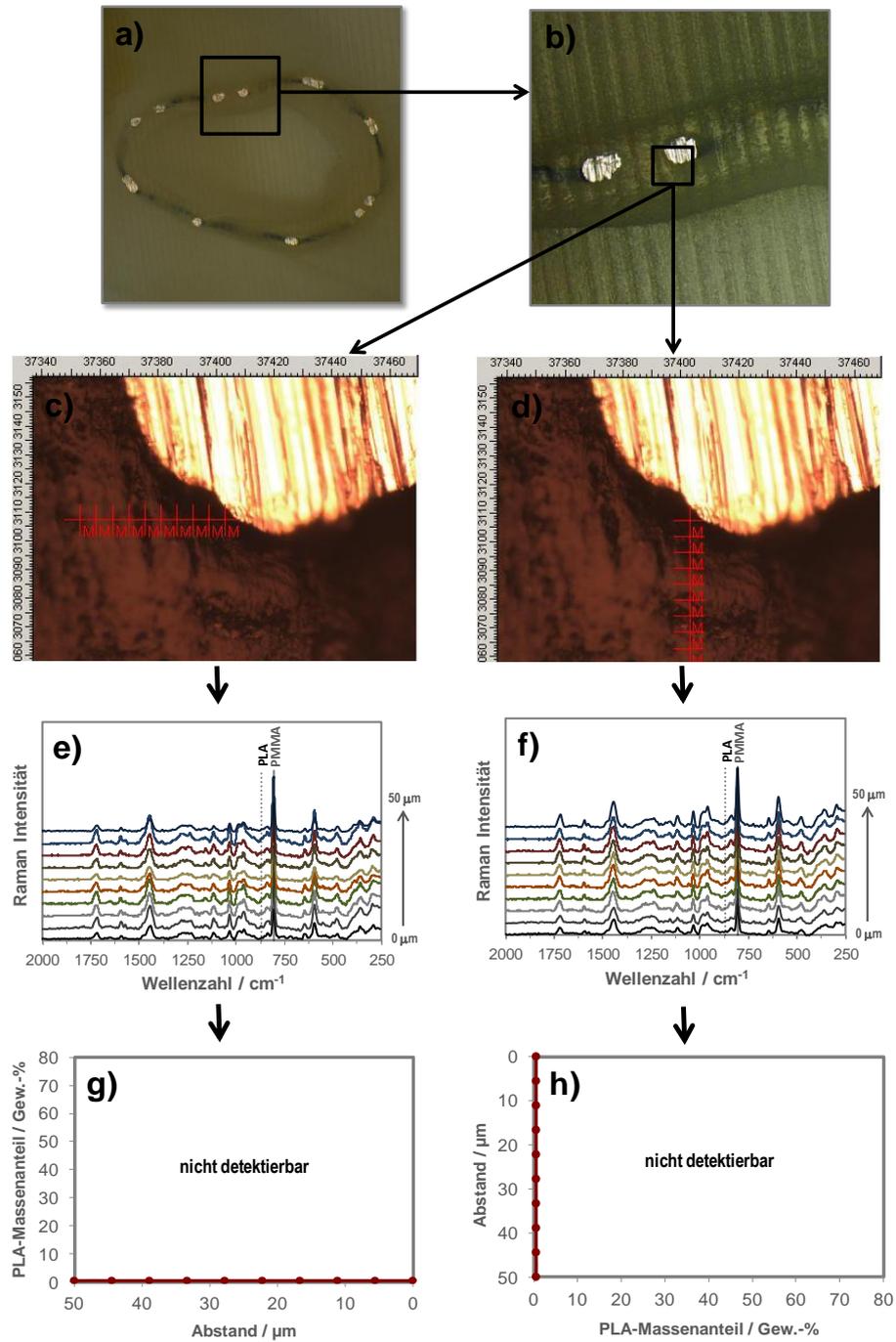


Abbildung A2.4: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit dem eingrahmten untersuchten Bereich (a-b) und mit den entsprechenden markierten Messpositionen (c-d), Raman-Spektren (e-f) und PLA-Gehaltsprofil (g-h) ausgewählter Querschnitte durch eine LCx-Koronararterie (Schwein) 36 Monate nach Implantation eines PLA-beschichteten Metallstents – Probe P1.10. Kantenlänge Abbildung und Vergrößerung: a) 3,9×3,9 mm, 50x; b) 1,2×1,2 mm, 100x; c) und d) 130×95 μm , 1000x.

A.3 Identifizierung von entstandenen Ca-/ P-Verbindungen bei der pathologische Kalzifizierung des Stent-Streben

Tabelle A3.1: Ca/P-Massenverhältnis biologisch relevanter Calciumphosphate. [225,232]

Ca/P-Verhältnis	Calciumphosphat	Formel
0,65	Monocalciumphosphat-Anhydrat, MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
0,65	Monocalciumphosphat-Monohydrat, MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1,29	Dicalciumphosphat-Anhydrat, DCPA	CaHPO_4
1,29	Dicalciumphosphat-Dihydrat, DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,29	Calciumpyrophosphat-Dihydrat, CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,72	Oktacalciumphosphat, OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,94	α -Tricalciumphosphat, α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,94	β -Tricalciumphosphat, β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,94	Mg-haltiges β -Tricalciumphosphat, β -TCMP	$(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$
2,08 – 2,13	Calciumdefizienter Hydroxylapatit, CDHA	$(\text{Ca},\text{M})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$
2,16	Hydroxylapatit, HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
2,16	Chlorapatit, CIA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$
2,16	Fluorapatit, FA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
2,16	Carbonatapatit, CA (A-Typ)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$
1,55 – 3,23	Amorphes Calciumphosphat, ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y$
2,58	Tetracalciumphosphat, TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$
2,20 – 2,97	Carbonat-Apatit oder -Hydroxylapatit, CA (B-Typ) oder CHA	$(\text{Na},\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$

A.4 Histomorphometrische Analyse vier Wochen nach Implantation eines Mg-SEE-Stent-Systems am Hausschwein

Tabelle A4.1: Klassische histomorphometrische Bestimmung der In-Stent-Stenose (ISS) mittel lichtmikroskopische Bilder.

Stent-Typ	Abschnitt der Koronararterie	Residual-Lumen, RL $\pm \sigma$ / mm	Neointima-Dicke, ND $\pm \sigma$ / mm	ISS / %
BMS	m-LAD	2,09 \pm 0,06	0,96 \pm 0,10	31,4
	m-LCx	2,23 \pm 0,25	0,79 \pm 0,21	26,3
PES	m-LAD	2,67 \pm 0,56	0,00 \pm 0,39	0,0
	m-LCx	2,04 \pm 0,47	0,06 \pm 0,28	2,9
SES	m-LAD	2,20 \pm 0,14	0,39 \pm 0,11	15,0
	m-LCx	2,10 \pm 0,50	0,58 \pm 0,39	21,7

Tabelle A4.2: Bestimmung der In-Stent-Stenose (ISS) mittels die 2D-Röntgenemissions-spektroskopie anhand von Schwefel- und Dysprosium-Verteilungsbildern.

Stent-Typ	Abschnitt der Koronararterie	Residual-Lumen, RL $\pm \sigma$ / mm	Neointima-Dicke, ND $\pm \sigma$ / mm	ISS / %
BMS	m-LAD	2,01 \pm 0,04	0,94 \pm 0,12	31,9
	m-LCx	2,16 \pm 0,24	0,83 \pm 0,21	27,7
PES	m-LAD	2,64 \pm 0,56	0,00 \pm 0,35	0,0
	m-LCx	1,98 \pm 0,40	0,07 \pm 0,26	3,2
SES	m-LAD	2,19 \pm 0,15	0,37 \pm 0,10	14,6
	m-LCx	2,12 \pm 0,43	0,46 \pm 0,34	21,5

A.5 Charakterisierung der Feststoff-Arbeitsreferenzmaterialien auf Acrylatbasis zur Bestimmung der Neodym-Konzentrationen in Koronararterien

Tabelle A5.1: Programm für den Mikrowellenaufschluss der Feststoff-Arbeitsreferenzmaterialien auf Acrylatbasis.

Schritt	Dauer / min	Leistung / W	Temperatur / °C	Druck / bar
1	2,5	600	70	100
2	10	800	200	120
3	2	1200	250	120
4	10	1200	250	120

Tabelle A5.2: Kalibrationsdaten zur Charakterisierung der Neodym-haltigen Feststoff-Arbeitsreferenzmaterialien mittels ICP-OES.

Element	Linie / nm	Kalibrationsbereich / ng·g ⁻¹	Anzahl der Kalibrierlösungen	NG ^a / ng·g ⁻¹
Nd	401,225	10 – 100	5	3,3
	406,109			4,9
	430,353			1,9

^a ermittelte Nachweisgrenze mit der Kalibriermethode nach DIN 32645 ^[182].

Tabelle A5.3: Nominaler und ermittelter Massenanteil der Neodym-haltigen Festkörper-Arbeitsreferenzmaterialien, sowie relative Abweichung der Messwerte.

nominal w_{Nd} / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	ermittelte ($w_{Nd} \pm U^a$) / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Bias ^b / %
1	1,23 ± 0,14	23
5	5,87 ± 0,50	17
15	13,90 ± 0,57	-7,3
25	24,42 ± 0,90	-2,3
35	37,7 ± 1,2	7,8
45	45,6 ± 1,5	1,4
55	57,5 ± 1,9	4,6

^a mit einem Erweiterungsfaktor $k = 2$ (Vertrauensniveau von ungefähr 95%)

^b Bias (%) = [(ermittelter Wert – nominaler Wert) / nominaler Wert] × 100 ^[179,180]

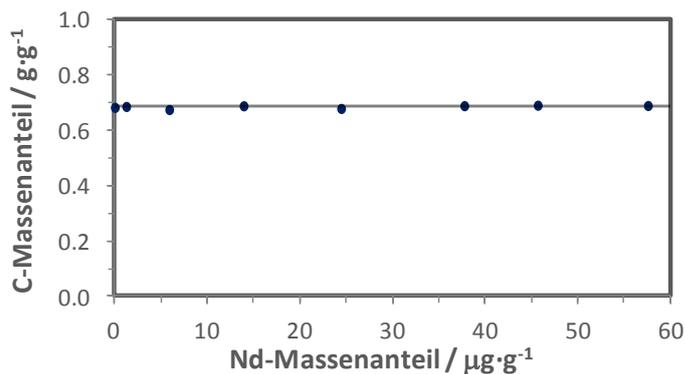


Abbildung A5.1: Kohlenstoffgehalte in Abhängigkeit vom eingesetzten Neodym-Massenanteil. Die vertikale Linie zeigt den durchschnittlichen C-Massenanteil.

Tabelle A5.4: Homogenität der Neodym-haltigen Arbeitsreferenzmaterialien gemessen mittels ns-LA-ICP-QMS.

nominal w_{Nd} / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	V_k^a der unkorrigierten ^{13}C - Intensität / %	V_k^a der unkorrigierten ^{146}Nd - Intensität / %
0	7,6	45
1	3,2	5,9
5	3,6	4,0
15	4,5	6,3
25	8,6	2,5
35	3,7	6,0
45	1,8	4,2
55	6,2	5,4

^a relativer Variationskoeffizient als quantitatives Maß für die Präzision ^[179,180]

B

Symbole und Abkürzungen

A	Fläche
abs.	absolut
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. <i>Atomic Force Microscope</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>Analyse of Variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Bestimmungsgrenze
BM	bioresorbierbares Metall
BMS	unbeschichteter Metallstent (engl. <i>Bare Metal Stent</i>)
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement (engl. <i>Charge-Coupled Device</i>)
CT	Computertomographie
d	distal
D,L-PLA	racemische Form von Polylactid
DES	Medikamentenfreisetzender Stent (engl. <i>Drug Eluting Stent</i>)
df	Freiheitsgrad
DG	Degradationsgrad
DIN	Deutsches Institut für Normung
D-PLA	stereochemische D-Form von Polylactid
DSC	Dynamische Differenzialkalorimetrie (engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. <i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EN	Europäische Normen
EXAFS	Röntgenabsorptionsspektroskopie zur Analyse der kantennahen Feinstruktur (engl. <i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>)
EZ	Endothelzellen
EZM	extrazelluläre Matrix

F	Teststatistik unter der Nullhypothese einer F- oder Fischer-Verteilung
FDA	die behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (engl. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GF-AAS	Atomabsorptionsspektrometrie mit elektrothermischer Aufheizung (engl. <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GMZ	glatte Gefäßmuskelzellen (engl. <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> , VSMC)
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
ICP-QMS	Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. <i>Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometry</i>)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP-OES	optische Emissions-Spektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
ISO	Internationale Organisation für Normung
ISR	In-Stent-Restenose
ISS	In-Stent-Stenose
k	Erweiterungsfaktor für die Berechnung der erweiterten Messunsicherheit
k_m	empirischer Parameter der Gordon-Taylor-Gleichung
LAD	Vorderwandkoronararterie (engl. <i>Left Anterior Descending</i>)
LA-ICP-QMS	Laserablation-Quadrupol-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Quadrupole Mass Spectrometry</i>)
LCx	linke Circumflexarterie (engl. <i>Left Circumflex Artery</i>)
LM	Lichtmikroskopie
LMA	lichtmikroskopische Aufnahme
L-PLA	stereochemische L-Form von Polylactid

LWD	großer Arbeitsabstand (Mikroskopie) (engl. <i>long working distance</i>)
μ	Mikro
m	Anzahl der Wiederholmessungen
m	medial
M	Monate
m/z	Masse-Ladung-Verhältnis
MMA	Methylmethacrylat
MPG	Medizinproduktegesetz
MS	Massenspektrometrie (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
Mw	gewichtsmittlere Molmasse
n	Anzahl der Proben
NA	numerische Apertur eines Objektivs
ND	Neointima-Dicke
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NG	Nachweisgrenze
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
p	proximal
p	Signifikanzniveau, statistische Wahrscheinlichkeit [0,1]
P	Signifikanzniveau, statistische Wahrscheinlichkeit [%]
PC	Polycarbonat
PCI	Perkutane Koronarintervention (engl. <i>Percutaneous Coronary Intervention</i>)
PCL	Polycaprolacton
PES	Paclitaxel-freisetzender Stent (engl. <i>Paclitaxel-Eluting Stent</i>)
PGA	Polyglycolid (engl. <i>Polyglycolic Acid</i>)
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHB	Polyhydroxybuttersäure

PHV	Polyhydroxyvalerate
PIXE	Partikel-induzierte Röntgenemission (engl. <i>Particle-Induced X-ray Emission</i>)
PLA	Polylactid (engl. <i>Polylactic Acid</i>)
PLGA	Polylactid-co-Glycolid (engl. <i>Poly Lactic-co-Glycolic Acid</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie (engl. <i>Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty</i>)
PTX	Paclitaxel
QUAM	Leitfaden zur Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen, (engl. <i>Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement</i>)
ρ	Dichte
\emptyset	Durchmesser
RBS	Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie (engl. <i>Rutherford Backscattering Spectrometry</i>)
RCA	rechte Koronararterie (engl. <i>Right Coronary Artery</i>)
REF	Referenz
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskop (engl. <i>Scanning Electron Microscope, SEM</i>)
RFA	Röntgenfluoreszenzspektroskopie (engl. <i>X-ray fluorescence spectroscopy, XRF</i>)
RL	Residual Lumen
RS	Raman-Spektroskopie (engl. <i>Raman Spectroscopy</i>)
σ	Standardabweichung
SD	Stent-Durchmesser
SEE	Seltene Erden Elemente (engl. <i>Rare Earth Elements, REE</i>)
SES	Sirolimus-freisetzender Stent (engl. <i>Sirolimus-Eluting Stent</i>)
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie (engl. <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>)

SRL	Sirolimus
SR-RFA	Röntgenfluoreszenzspektroskopie mit einer Synchrotronstrahlung als Quelle
t	Teststatistik unter der Nullhypothese einer <i>t</i> -Verteilung
t	Zeit, Implantationsdauer
T_g	Glasübergangstemperatur
T_k	Rekristallisationstemperatur
T_m	Schmelztemperatur
U	erweiterte Messunsicherheit
U	(arbiträre) Einheit
UG	Untergrundbereich
UV	Ultraviolett
VA	Verbrennungsanalyse (engl. <i>Combustion analysis</i>)
w	Massenanteil
WFR	Wiederfindungsrate
XANES	Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (engl. <i>X-Ray Absorption Near-Edge Structure</i>)
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. <i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
XRD	Röntgendiffraktometrie (engl. <i>X-Ray Diffraction</i>)

C

Medizinische Fachbegriffe

Apoptose:	programmierter Zelltod
Arteriosklerose:	beschreibt den pathologisch-anatomischen Zustand der Verhärtung (altgriechisch <i>skleros</i>) von Arterien
Ballondilatation:	Aufdehnung eines Gefäßes mittels eines Katheters aus Kunststoff, der ein endständiges, aufblasbares Ballonsegment besitzt
Dilatation:	Aufdehnung, Aufweitung
Endoprothese:	Ersatzstück aus Fremdmaterial, das einem erkrankten oder zerstörten Gewebe- bzw. Organteil (z. B. Koronargefäß, Gelenk) nachgebildet ist und in das Innere des Körpers eingebracht wird
endovaskulär:	innerhalb eines Gefäßes
Erythrozyten:	die häufigsten Zellen im Blut, rote Blutkörperchen, die dem Sauerstofftransport dienen
Fibrin:	das finale Produkt der Gerinnungsaktivierung
Inflammation:	Entzündung
In-Stent-Restenose:	erneutes Auftreten einer Stenose im Stent
Intima:	die innere Schicht einer Arterienwand. Der Wandaufbau der Arterien ist dreischichtig (Intima, Media und Adventitia)
intravaskulär:	innerhalb eines Gefäßes

<i>in vitro:</i>	Untersuchungen bzw. Analysen, die außerhalb bzw. ohne Kontakt zum lebenden Organismus in einer zumeist künstlichen Umgebung durchgeführt werden
<i>in vivo:</i>	Untersuchungen bzw. Analysen, die im oder direkt am lebenden Organismus durchgeführt werden
Kalzifikation:	Kalkeinlagerung, Verkalkung
kardiovaskulär:	das Herz oder das Gefäßsystem betreffend
Monozyten:	im Blut zirkulierende große Zellen des Immunsystems, die zu den Leukozyten (weiße Blutzellen) gehören
Makrophagen:	Zellen, die feste und gelöste Stoffe aufnehmen können
Neointima:	Bildung einer neuen Innenschicht nach Ballondilatation, die eine Restenose bewirkt
Pathogenese:	Entstehungsmechanismus
Plaque:	cholesterinhaltige, flächenhafte Auflagerung in den Gefäßwänden
Revaskularisationsverfahren:	hier ist die Behandlung von Koronargefäßen durch Ballondilatation bzw. durch Bypassversorgung gemeint
Stenosen:	angeborene oder erworbene Verengung; hier von Koronargefäßen
Stentthrombose:	lokalisierte Blutgerinnselbildung durch intravitale Blutgerinnung im Stent

Stentrestenosierung: erneutes Auftreten einer Stenose im Stent

Thrombozyten: die kleinsten Zellen des Blutes, Blutplättchen

Zytotoxizität: Zellschädigung

(Begriffe und Definitionen nach Literatur ^[4,277])

Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt (Destatis), *Todesursachen in Deutschland - 2011*, Wiesbaden, *Fachserie 12, Reihe 4* **2012**, 1-51.
- [2] Statistisches Bundesamt (Destatis), *Todesursachen in Deutschland - 2012*, Wiesbaden, *Reihe 4* **2013**, 1-53.
- [3] Statistisches Bundesamt (Destatis), *Todesursachen in Deutschland - 2013*, Wiesbaden, *Reihe 4* **2014**, 1-53.
- [4] A. Machraoui, P. Grewe, A. Fischer, *Koronarstenting: Werkstofftechnik, Pathomorphologie, Therapie*, Steinkopff Verlag, Darmstadt **2001**.
- [5] C. Vallbracht, F.-J. Roth, A. L. Strauss, *Interventionelle Gefäßtherapie*, Steinkopff Verlag, Darmstadt **2002**.
- [6] B. D. Ratner, *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, Academic Press, Oxford **2013**.
- [7] Y. F. Zheng, X. N. Gu, F. Witte, *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2014**, 77, 1.
- [8] H. Li, Y. Zheng, L. Qin, *Progress in Natural Science: Materials International* **2014**, 24, 414.
- [9] E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2009**.
- [10] D.-W. Park, Y.-H. Kim, H.-G. Song, J.-M. Ahn, W.-J. Kim, J.-Y. Lee, S.-J. Kang, S.-W. Lee, C. W. Lee, S.-W. Park, S.-C. Yun, K.-B. Seung, T.-H. Yang, S.-G. Lee, J.-H. Lee, I.-W. Seong, S.-S. Cheong, B.-K. Lee, N.-H. Lee, S.-W. Lee, S.-W. Lee, K. Lee, H.-S. Kim, D.-S. Jeon, M.-K. Kim, D.-Y. Nah, S.-J. Tahk, S.-J. Park, *JACC: Cardiovascular interventions* **2011**, 4, 1096.
- [11] D. J.-P. Labarre, G. Ponchel, C. Vauthier, *Biomedical and pharmaceutical polymers*, Pharmaceutical Press, London, Chicago **2011**.
- [12] G. Acharya, K. Park, *Advanced drug delivery reviews* **2006**, 58, 387.
- [13] G. Mani, M. D. Feldman, D. Patel, C. M. Agrawal, *Biomaterials* **2007**, 28, 1689.

- [14] J. A. Ormiston, Serruys, Patrick W S, *Circulation. Cardiovascular interventions* **2009**, 2, 255.
- [15] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden **2003**.
- [16] S. Kischkel, N. Grabow, A. Püschel, B. Erdle, M. Kabelitz, D. P. Martin, S. F. Williams, I. Bombor, K. Sternberg, K.-P. Schmitz, W. Schareck, C. M. Büniger, *Gefässchirurgie* **2014**, 19, 358.
- [17] C. M. Büniger, N. Grabow, K. Sternberg, L. Ketner, C. Kröger, M. Goosmann, H. J. Kreutzer, B. Lorenzen, K. H. Hauenstein, K.-P. Schmitz, H. Ince, D. Lootz, E. Klar, W. Schareck, *Gefässchirurgie* **2008**, 13, 99.
- [18] L. Claes, A. Ignatius, *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen* **2002**, 73, 990.
- [19] N. Eliaz (Ed.), *Degradation of Implant Materials*, Springer Science+Business Media, New York **2012**.
- [20] D. F. Williams, *Biomaterials* **2009**, 30, 5897.
- [21] A. Bandyopadhyay, S. Bose, *Characterization of biomaterials*, Elsevier Inc., Waltman **2013**.
- [22] D. Shi, *Biomaterials and tissue engineering*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2004**.
- [23] J. B. Park, R. S. Lakes, *Biomaterials: An introduction*, Springer Science+Business Media, New York **2007**.
- [24] R. Auras, *Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J. **2010**.
- [25] J. Ren, *Biodegradable poly (lactic acid): Synthesis, modification, processing and applications*, Tsinghua University Press; Springer-Verlag, Beijing, Berlin Heidelberg **2010**.
- [26] H. Tsuji, *Degradation of poly (lactide)-based biodegradable materials*, Nova Science Publishers, New York **2008**.
- [27] P. X. Ma, *Materials Today* **2004**, 7, 30.
- [28] P. Ducheyne, K. Healy, D. W. Hutmacher, D. W. Grainger, C. J. Kirkpatrick, *Comprehensive Biomaterials, Seven-Volume Set*, Elsevier Science, Burlington **2011**.
- [29] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, *Journal of controlled release official journal of the Controlled Release Society* **2012**, 161, 505.
- [30] F. Buchanan, *Degradation rate of bioresorbable materials: Prediction and evaluation*, Woodhead Published Limited; CRC Press, Cambridge, England, Boca Raton Boston New York Washington, DC **2008**.

-
- [31] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, *Progress in Polymer Science* **2010**, 35, 1217.
- [32] J. Cheng, B. Liu, Y. H. Wu, Y. F. Zheng, *Journal of Materials Science & Technology* **2013**, 29, 619.
- [33] F. Witte, *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, 1680.
- [34] J. Walker, S. Shadanbaz, Woodfield, Timothy B F, M. P. Staiger, G. J. Dias, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **2014**, 102, 1316.
- [35] F. Witte, N. Hort, C. Vogt, S. Cohen, K. U. Kainer, R. Willumeit, F. Feyerabend, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2008**, 12, 63.
- [36] X.-N. Gu, Y.-F. Zheng, *Front. Mater. Sci. China* **2010**, 4, 111.
- [37] S. Virtanen, *Materials Science and Engineering: B* **2011**, 176, 1600.
- [38] M. Moravej, D. Mantovani, *International journal of molecular sciences* **2011**, 12, 4250.
- [39] M. P. Staiger, A. M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, *Biomaterials* **2006**, 27, 1728.
- [40] C. Mewis, R. Riessen, I. Spyridopoulos, u. a., *Kardiologie compact: Alles für Station und Facharztprüfung; 189 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.] **2006**.
- [41] U. Kania, H. Schild, *Angiologie in Klinik und Praxis; 108 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.] **1998**.
- [42] H. Lapp, S. Becker, I. Härtel, *Das Herz-Buch: Bypass, Ballondilatation, Stents*, TRIAS Verlag, Stuttgart **2013**.
- [43] E. Erdmann, *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg **2011**.
- [44] C. Vallbracht, M. Kaltenbach, D. Horstkotte, *Herz Kreislauf kompakt*, Steinkopff Verlag, Darmstadt **2006**.
- [45] R. Kramme (Ed.), *Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2011**.
- [46] B. Radeleff, *Angiofibel: Interventionelle angiographische Diagnostik und Therapie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2013**.
- [47] U. Morgenstern, M. Kraft (Eds.), *Biomedizinische Technik - Faszination, Einführung, Überblick*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin Boston **2014**.
- [48] DP-Medsystems AG, *Wissen: Herz-Kreislauf-Erkrankungen - Behandlungsverfahren - Stent*, <http://www.kardionet.de/stent> [Abrufdatum 2015-02-05].
- [49] I. Krakau, H. Lapp, *Das Herzkatheterbuch: Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*, Thieme Verlag, Stuttgart [u.a.] **2005**.
-

- [50] R. Erbel, B. Pflücht, P. Kahlert, T. F. Konorza, *Herzkatheter-Manual: Diagnostik und interventionelle Therapie*, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln **2012**.
- [51] B. Becher, M. Kickbusch, S. Kramer, U. Schulz, D. Behrend, K.-P. Schmitz, *Biomedizinische Technik / Biomedical Engineering* **2001**, 46, 242.
- [52] M. Gyöngyösi, G. Fröhlich, R. Garamvölgyi, H. D. Glogar, B. Heinisch, A. Hevesi, U. Losert, J. Matiassek, N. Pavo, Z. Petrasi, I. Repa, T. M. Scherzer, M. Shirazi, W. Sperker, C. Strehblow, U. Windberger, N. Yahya, *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* **2004**, 11, 515.
- [53] S. Cassese, S. Desch, A. Kastrati, R. A. Byrne, L. King, T. Tada, B. Lauer, A. Schömig, H. Thiele, J. Pache, *Revista española de cardiología (English ed.)* **2013**, 66, 435.
- [54] M. Haude, S. W.-L. Lee, S. G. Worthley, S. Silber, S. Verheye, S. Erbs, M. A. Rosli, R. Botelho, I. Meredith, K. H. Sim, P. R. Stella, H.-C. Tan, R. Whitbourn, S. Thambar, A. Abizaid, T. H. Koh, P. Den Heijer, H. Parise, E. Cristea, A. Maehara, R. Mehran, *JACC: Cardiovascular interventions* **2013**, 6, 334.
- [55] D. Kamoi, H. Ishii, H. Takahashi, T. Aoyama, T. Toriyama, M. Tanaka, Y. Kawamura, K. Kawashima, D. Yoshikawa, T. Amano, T. Uetani, T. Matsubara, T. Murohara, *International journal of cardiology* **2013**, 165, 533.
- [56] W. C. Kang, Y. M. Park, K. C. Shin, C. I. Moon, K. Lee, S. H. Han, M. S. Shin, J. Moon, T. Ahn, E. K. Shin, *International journal of cardiology* **2013**, 165, 46.
- [57] M. Kollum, T. Heitzer, C. Schmoor, M. Brunner, B. Witzendichler, M. Wiemer, R. Hoffmann, K. J. Gutleben, H. P. Schultheiss, D. Horstkotte, J. Brachmann, T. Meinertz, C. Bode, M. Zehender, *International journal of cardiology* **2013**, 167, 1552.
- [58] M. S. Lee, E. Mahmud, L. Ang, G. Lluri, R. K. Cheng, J. Aragon, I. Sheiban, *Journal of the Saudi Heart Association* **2013**, 25, 75.
- [59] K. Nasu, Y. Oikawa, R. Yoshikawa, M. Kadotani, Y. Takeda, H. Ota, H. Kamiya, M. Muto, A. Okamura, M. Yamaki, S. Usui, S. Tohara, J. Yamashita, M. Suzuki, R. Kawaguchi, K. Kawajiri, Y. Nakatsu, Y. Uchida, Y. Kashima, N. Kawashima, T. Ozaki, T. Ogawa, T. Aizawa, T. Suzuki, *International journal of cardiology* **2013**, 166, 187.
- [60] C. Simsek, L. Räber, M. Magro, E. Boersma, Y. Onuma, G. G. Stefanini, T. Zanchin, B. Kalesan, P. Wenaweser, P. Jüni, van Geuns, R J, van Domburg, R T, S. Windecker, Serruys, P W J C, *International journal of cardiology* **2013**, 170, 36.
- [61] S. Kufner, R. A. Byrne, A. de Waha, S. Schulz, M. Joner, K.-L. Laugwitz, A. Kastrati, *Cardiovascular revascularization medicine including molecular interventions* **2014**, 15, 69.
- [62] K. Nasu, Y. Oikawa, T. Aizawa, T. Suzuki, *IJC Heart & Vessels* **2014**, 3, 21.

- [63] M. Otsuka, H. Yokoi, Y. Matsuyama, Y. Hayashi, N. Shiode, Y. Masaoka, T. Okimoto, H. Tamekiyo, T. Kawase, K. Yamane, Y. Kagawa, M. Nakamura, T. Muramatsu, S. Nanto, *Cardiovascular revascularization medicine including molecular interventions* **2014**, 15, 323.
- [64] H. Ota, M. Mahmoudi, H. Kitabata, R. Torguson, F. Chen, L. F. Satler, W. O. Suddath, A. D. Pichard, R. Waksman, *Cardiovascular Revascularization Medicine* **2015**, 16, 84.
- [65] M. R. Bennett, *Heart (British Cardiac Society)* **2003**, 89, 218.
- [66] H. Scholz, U. Schwabe, *Taschenbuch der Arzneibehandlung: Angewandte Pharmakologie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2005**.
- [67] M. Lichtenberg, *Zeitschrift für Gefässmedizin* **2014**, 11, 6.
- [68] J. Matiasek, M. Gyöngyösi, H. D. Glogar, *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* **2006**, 13, 85.
- [69] A. M. Vogt, W. Schöls, *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* **2003**, 10, 331.
- [70] J. W. Homeister, M. S. Willis, *Molecular and translational vascular medicine*, Humana Press; Springer Science+Business Media, New York Heidelberg Dordrecht London **2012**.
- [71] O. T. M. Chan, L.-X. Yang, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2000**, 49, 181.
- [72] H. S. Gurm, T. Boyden, K. B. Welch, *American heart journal* **2008**, 155, 630.
- [73] J. Kong, J. Hou, L. Ma, L. Xing, H. Jia, H. Liu, S. Zhang, B. Yu, I.-K. Jang, *Archives of cardiovascular diseases* **2013**, 106, 79.
- [74] H. N. Nguyen, Tran Thi, Hong Ha, D. Le Quang, T. N. Thi, Tran Thi, Nhu Hang, M. H. Le, P. T. Ha, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2012**, 3, 045005.
- [75] L. L. Lao, S. S. Venkatraman, *Journal of controlled release official journal of the Controlled Release Society* **2008**, 130, 9.
- [76] J. Aoki, G. S. Mintz, N. J. Weissman, J. T. Mann, L. Cannon, J. Greenberg, E. Grube, Masud, A R Zaki, J. Koglin, L. Mandinov, G. W. Stone, *JACC: Cardiovascular interventions* **2008**, 1, 161.
- [77] G. Nakazawa, A. V. Finn, M. C. John, F. D. Kolodgie, R. Virmani, *The American journal of cardiology* **2007**, 100, 36M.
- [78] vfa, *Wo Krebsmedikamente im Zellzyklus der Tumorzelle ansetzen* **2011**, <http://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/artikel-arzneimittel-forschung/schulen> [Abrufdatum 2015-02-11].
- [79] G. Steinbeck, G. Paumgartner, T. Brandt, B. Göke, N. Greten, W. Hiddemann, H. Lode, K. Mann, H. Riess, T. Risler, M. Schattenkirchner, W. Seeger, M. Wehling, *Therapie innerer Krankheiten*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2005**.

- [80] M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm, *Pharmakologie & Toxikologie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg **2012**.
- [81] M. Bäuml, K. Hergeth, T. Bein, *Intensivbuch Pharmakotherapie: Wirkstoffprofile, Behandlungsstrategien, Fehler und Gefahren in der Intensivmedizin*, MWV Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Berlin **2009**.
- [82] R. Wessely, A. Schömig, A. Kastrati, *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, 47, 708.
- [83] R. Erbel, H. Wieneke, in *FORUM Forschung 2004/2005*, Universität Duisburg, pp. 28-30.
- [84] B. Scheller, B. Levenson, M. Joner, R. Zahn, V. Klauss, C. Naber, V. Schächinger, A. Elsässer, *Kardiologe* **2011**, 5, 411.
- [85] S. Bruno, S. Ulrich, in *magazin forschung der Universität des Saarlandes* 2/**2007**, pp. 20-24.
- [86] J. Rosenthal, R. Kolloch (Eds.), *Arterielle Hypertonie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2004**.
- [87] S. A. Ghesquiere, *The role of phospholipases in atherosclerosis*, (Dissertation) Maastricht University, Netherlands **2006**.
- [88] M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, A. Matusch, J. S. Becker, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2008**, 63, 375.
- [89] H. J. Duckers, E. G. Nabel, P. W. Serruys, *Essentials of restenosis: For the interventional cardiologist*, Humana Press, Totowa, N.J. **2007**.
- [90] A. Kibos, A. Campeanu, I. Tintoiu, *Acute cardiac care* **2007**, 9, 111.
- [91] W. S. Weintraub, *The American journal of cardiology* **2007**, 100, 3K.
- [92] M. Ludwig, J. Rieger, V. Ruppert, *Gefäßmedizin in Klinik und Praxis: Leitlinienorientierte Angiologie, Gefäßchirurgie und interventionelle Radiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart [u.a.] **2010**.
- [93] H. Lapp, I. Krakau, *Das Herzkatheterbuch: Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*, Thieme Verlag, Stuttgart [u.a.] **2013**.
- [94] P. H. Grewe, T. Deneke, A. Machraoui, J. Barmeyer, K.-M. Müller, *Journal of the American College of Cardiology* **2000**, 35, 157.
- [95] *Richtlinie 93/42/EWG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 14. Juni 1993 über Medizinprodukte vom 14. Juni 1993 (ABl. EG Nr. L 169 S. 1), zuletzt geändert am 5. September 2007 (ABl. Nr. L 24 7 S. 0021-0055): RL 93/42/EWG* **2007**.
- [96] DIN EN ISO 25539-2, *Kardiovaskuläre Implantate - Endovaskuläre Implantate - Teil 2: Gefäßstents (ISO 25539-2:2012); Deutsche Fassung EN ISO 25539-2:2012*, Beuth Verlag, Berlin **2013**.

- [97] DIN EN ISO 10993-1, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems (ISO 10993-1:2009); Deutsche Fassung EN ISO 10993-1:2009*, Beuth Verlag, Berlin **2010**.
- [98] K. M. Becker, J. J. Whyte, *Clinical evaluation of medical devices*, Humana Press, Totowa, N.J. **2006**.
- [99] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2013**.
- [100] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2011**.
- [101] N. Kläntschi, *Elementanalytik: Instrumenteller Nachweis und Bestimmung von Elementen und deren Verbindungen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford **1996**.
- [102] S. L. R. Ellison and A. Williams, *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (QUAM)* **2012**, <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam>.
- [103] L. Spieß, *Moderne Röntgenbeugung: Röntgendiffraktometrie für Materialwissenschaftler, Physiker und Chemiker*, Teubner Verlag, Wiesbaden **2008**.
- [104] A. Frick, C. Stern, *DSC-Prüfung in der Anwendung*, Carl Hanser Verlag, München **2013**.
- [105] DIN EN ISO 11357-2, *Kunststoffe - Dynamische Differenz-Thermoanalyse (DSC) - Teil 2: Bestimmung der Glasübergangstemperatur und der Glasübergangsstufen (ISO 11357-2:2013); Deutsche Fassung FprEN ISO 11357-2:2013*, Beuth Verlag, Berlin **2014**.
- [106] DIN EN ISO 11357-3, *Kunststoffe - Dynamische Differenz-Thermoanalyse (DSC) - Teil 3: Bestimmung der Schmelz- und Kristallisationstemperatur und der Schmelz- und Kristallisationsenthalpie (ISO 11357-3:2011)*, Beuth Verlag, Berlin **2013**.
- [107] G. Schwedt, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2008**.
- [108] M. Hesse, S. Bienz, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 114 Tabellen*, Thieme Verlag, Stuttgart [u.a.] **2012**.
- [109] P. Larkin (Ed.), *Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier Inc., Oxford **2011**.
- [110] J. L. Koenig (Ed.), *Spectroscopy of Polymers (Second Edition)*, Elsevier Science, New York **1999**.
- [111] O. Svelto, D. C. Hanna, *Principles of lasers*, Springer Science+Business Media, New York Heidelberg Dordrecht London **2010**.
- [112] C. Cremer, B. R. Masters, *The European Physical Journal H* **2013**, 38, 281.

- [113] H. R. Verma, *Atomic and Nuclear Analytical Methods: XRF, Mössbauer, XPS, NAA and Ion-Beam Spectroscopic Techniques*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2007**.
- [114] R. P. H. Garten, in *Analytiker-Taschenbuch*, Vol. 4 (Eds.: W. Fresenius, H. Günzler, W. Huber, I. Lüderwald, G. Tölg), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **1984**, pp. 259-286.
- [115] G. Schatz, A. Weidinger, *Nukleare Festkörperphysik*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden **1997**.
- [116] D. Spemann, T. Reinert, J. Vogt, T. Andrea, N. Barapatre, R. Feder, A. M. Jakob, N. Liebing, C. Meinecke, F. Menzel, M. Rothermel, T. Butz, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2011**, 269, 2175.
- [117] C. G. Ryan, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2001**, 181, 170.
- [118] L. R. Doolittle, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **1985**, 9, 344.
- [119] K.-H. Schade, *Lichtmikroskopie: Technologie und Anwendung*, Verlag Moderne Industrie, Landsberg/Lech **1993**.
- [120] G. C. Schwartze, *Polymere Ein- und Mehrschichtmaterialien für die Kalibrierung moderner festkörperspektroskopischer Messsysteme*, (Dissertation) Leibniz Universität Hannover. GRIN Verlag GmbH, München **2013**.
- [121] J. P. Thieleke, *Entwicklung von Laserablationsstandards für die Analyse von Pflanzenproben*, (Masterarbeit) Leibniz Universität Hannover **2013**.
- [122] H. Fischer, H. Hofmann, J. Spindler, *Werkstoffe in der Elektrotechnik: Grundlagen, Aufbau, Eigenschaften, Prüfung, Anwendung, Technologie mit 75 Tabellen sowie zahlreichen Beispielen, Übungen und Testaufgaben*, Carl Hanser Verlag, München **2007**.
- [123] E. Roos, K. Maile, *Werkstoffkunde für Ingenieure: Grundlagen, Anwendung, Prüfung*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2011**.
- [124] DIN ISO 5832-5, *Chirurgische Implantate - Metallische Werkstoffe - Teil 5: Kobalt-Chrom-Wolfram-Nickel-Schmiedelegerung (ISO 5832-5:2005)*, Beuth Verlag, Berlin **2008**.
- [125] T. Miyata, T. Masuko, *Polymer* **1998**, 39, 5515.
- [126] J. F. Mano, Gómez Ribelles, J. L., N. M. Alves, M. Salmerón Sanchez, *Polymer* **2005**, 46, 8258.
- [127] Y. Ikada, K. Jamshidi, H. Tsuji, S. H. Hyon, *Macromolecules* **1987**, 20, 904.
- [128] D. Brizzolara, H.-J. Cantow, K. Diederichs, E. Keller, A. J. Domb, *Macromolecules* **1996**, 29, 191.

- [129] B. Li, F.-X. Dong, X.-L. Wang, J. Yang, D.-Y. Wang, Y.-Z. Wang, *European Polymer Journal* **2009**, 45, 2996.
- [130] H. Kaczmarek, M. Nowicki, I. Vuković-Kwiatkowska, S. Nowakowska, *Journal of Polymer Research* **2013**, 20:91, 1.
- [131] R. Hussain, D. Mohammad, *Turkish Journal of Chemistry* **2004**, 28, 725.
- [132] E. Shobhana, *International Journal of Modern Engineering Research* **2012**, 2, 1092.
- [133] A. K. Tomar, S. Mahendia, S. Kumar, *Advances in Applied Science Research* **2011**, 2, 327.
- [134] Z. Abidin, K. M. Nasir, S. Jamari, N. Saidon, S. V. Lee, N. A. Halim, R. Yahya, *Pigment & Resin Technology* **2013**, 42, 128.
- [135] D. Garlotta, *Journal of Polymers and the Environment* **2001**, 9, 63.
- [136] V. R. Sastri, *Plastics in medical devices: Properties, requirements and applications*, Elsevier Science, Burlington **2014**.
- [137] G. Kister, G. Cassanas, M. Vert, B. Pauvert, A. Térol, *Journal of Raman Spectroscopy* **1995**, 26, 307.
- [138] G. Kister, G. Cassanas, M. Vert, *Polymer* **1998**, 39, 267.
- [139] A. Neppel, I. S. Butler, *Journal of Raman Spectroscopy* **1984**, 15, 257.
- [140] J. D. Ingle, S. R. Crouch, *Spectrochemical analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. **1988**.
- [141] M. D. Morris, P. Matousek, *Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields*, Springer-Verlag, Heidelberg Berlin **2010**.
- [142] T. Dieing, O. Hollricher, J. Toporski, *Confocal raman microscopy*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2010**.
- [143] B. Schrader, *Chemie in unserer Zeit* **1997**, 31, 229.
- [144] D. B. Chase, *Journal of the American Chemical Society* **1986**, 108, 7485.
- [145] W. Demtröder, *Laserspektroskopie 2: Experimentelle Techniken*, Springer-Verlag, Heidelberg Berlin **2013**.
- [146] R. W. Kessler (Ed.), *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2012**.
- [147] M. Maiwald, *Halbleiterlaser basierte Mikrosystemlichtquellen für die Raman-Spektroskopie*, (Dissertation) Technischen Universität Berlin **2009**.
- [148] R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis*, John Wiley & Sons, New York **2000**.
- [149] R. Harig, *Applied optics* **2004**, 43, 4603.

- [150] G. Lang, *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, Springer-Verlag, Wien **2013**.
- [151] H.-C. Burck, *Histologische Technik: Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1966**.
- [152] B. von Falkai, *Lenzinger Berichte* **1977**, 42, 66.
- [153] W. Keim, *Kunststoffe: Synthese, Herstellungsverfahren, Apparaturen*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2006**.
- [154] H. Cherdrón, *Lenzinger Berichte* **1970**, 30, 44.
- [155] J. L. Eguiburu, J. J. Iruiñ, M. J. Fernandez-Berridi, J. San Román, *Polymer* **1998**, 39, 6891.
- [156] G. Zhang, J. Zhang, S. Wang, D. Shen, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2003**, 41, 23.
- [157] S.-H. Li, E. M. Woo, *Polymer International* **2008**, 57, 1242.
- [158] S.-i. Hirota, T. Sato, Y. Tominaga, S. Asai, M. Sumita, *Polymer* **2006**, 47, 3954.
- [159] T. Shirahase, Y. Komatsu, Y. Tominaga, S. Asai, M. Sumita, *Polymer* **2006**, 47, 4839.
- [160] K.-P. Le, R. Lehman, J. Remmert, K. Vanness, Ward, Paula Marie L, J. D. Idol, *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **2006**, 17, 121.
- [161] P. Kucharczyk, V. Sedlarik, T. Kitano, M. Machovsky, M. Barak, M. Koutny, P. Stloukal, P. Saha, *Recent researches in geography, geology, energy, environment and biomedicine; proceedings of the 4th WSEAS international conference on engineering mechanics, structures, engineering geology (EMESEG '11); proceedings of the 2nd international conference on geography and geology 2011 (WORLD-GEO '11); proceedings of the 5th international conference on energy and development, environment, biomedicine 2011 (EDEB '11)* **2011**.
- [162] C. Samuel, J.-M. Raquez, P. Dubois, *Polymer* **2013**, 54, 3931.
- [163] L. A. Utracki, *Polymer blends handbook*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston **2002**.
- [164] M. Chanda, *Introduction to polymer science and chemistry: A problem-solving approach*, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL **2013**.
- [165] B. van Eerdenbrugh, L. S. Taylor, *Pharmaceutical research* **2012**, 29, 2754.
- [166] B. Stuart, *Polymer analysis*, John Wiley & Sons, Chichester **2003**.
- [167] B. Tieke, *Makromolekulare Chemie: Eine Einführung*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2005**.
- [168] R. Jayachandra Babu, W. Brostow, I. M. Kalogeras, S. Sathigari, *Materials Letters* **2009**, 63, 2666.

-
- [169] W. Brostow, R. Chiu, I. M. Kalogeras, A. Vassilikou-Dova, *Materials Letters* **2008**, 62, 3152.
- [170] J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson/Prentice Hall, Harlow New York **2005**.
- [171] R. Pinal, *Entropy* **2008**, 10, 207.
- [172] I. M. Kalogeras, *Thermochimica Acta* **2010**, 509, 135.
- [173] O. Svensson, M. Josefson, F. W. Langkilde, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1999**, 49, 49.
- [174] I. R. Lewis, H. G. M. Edwards, *Handbook of Raman spectroscopy: From the research laboratory to the process line*, Marcel Dekker Inc., New York Basel **2001**.
- [175] M. S. Amer, *Raman spectroscopy for soft matter applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. **2009**.
- [176] S. Mozharov, A. Nordon, J. M. Girkin, D. Littlejohn, *Lab on a chip* **2010**, 10, 2101.
- [177] J.-J. Kim, J.-Y. Hwang, Y.-D. Kim, H.-E. Chung, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2011**, 32, 805.
- [178] Y. V. Shemouratov, K. A. Prokhorov, E. A. Sagitova, G. Y. Nikolaeva, P. P. Pashinin, Y. A. Lebedev, E. M. Antipov, *Laser Physics* **2009**, 19, 2179.
- [179] S. Kromidas, *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2011**.
- [180] M. Reichenbächer, J. W. Einax, *Challenges in Analytical Quality Assurance*, Springer-Verlag, Heidelberg Berlin **2011**.
- [181] EURACHEM/CITAC Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Laboratory of Government Chemistry, London **2012**.
- [182] DIN 32645, *Chemische Analytik, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen Begriffe, Verfahren, Auswertung*, Beuth Verlag, Berlin **2008**.
- [183] P. Vandenabeele, L. Moens, *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, 43, 1545.
- [184] P. Vandenabeele, J. Jehlička, P. Vitek, Edwards, H. G. M., *Planetary and Space Science* **2012**, 62, 48.
- [185] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff, *Chemical Reviews* **1999**, 99, 3181.
- [186] J. C. Middleton, A. J. Tipton, *Orthopaedic Polymeric Biomaterials: Basic Aspects of Biodegradables* **2000**, 21, 2335.
- [187] G. Scott, *Degradable Polymers: Principles and Applications*, Springer Science+Business Media, Dordrecht **2002**.
- [188] L. S. Nair, C. T. Laurencin, *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 762.

- [189] C. van Blitterswijk, P. Thomsen, A. Lindahl, J. Hubbell, D. F. Williams, R. Cancedda, Bruijn, Joost D. de, J. Sohier (Eds.), *Tissue Engineering*, Academic Press, Burlington **2008**.
- [190] S. Kalia, L. Avérous (Eds.), *Biopolymers: Biomedical and environmental applications*, Scrivener Publishing LLC; John Wiley & Sons, Hoboken, Salem, MA **2011**.
- [191] A. Lendlein, A. L. Sisson, *Handbook of biodegradable polymers: Synthesis, characterization and applications*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2011**.
- [192] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, *Progress in Polymer Science* **2012**, 37, 237.
- [193] L. T. Sin, A. R. Rahmat, W. A. W. A Rahman, *Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications*, William Andrew, Oxford **2012**.
- [194] E. Willbold, F. Witte, *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, 4447.
- [195] F. v. Burkensroda, L. Schedl, A. Göpferich, *Biomaterials* **2002**, 23, 4221.
- [196] L. Yang, Y. Huang, F. Feyerabend, R. Willumeit, C. Mendis, K. U. Kainer, N. Hort, *Acta Biomaterialia* **2013**, 9, 8499.
- [197] Y. C. Lee, A. K. Dahle, D. H. StJohn, *Metallurgical and Materials Transactions A* **2000**, 31, 2895.
- [198] S. A. Garea, A. Ghebaur, *Materiale Plastice* **2012**, 49, 1.
- [199] E. Kang, H. Wang, I. K. Kwon, Y.-H. Song, K. Kamath, K. M. Miller, J. Barry, J.-X. Cheng, K. Park, *Journal of biomedical materials research. Part A* **2008**, 87, 913.
- [200] J. Ling, S. D. Weitman, M. A. Miller, R. V. Moore, A. C. Bovik, *Applied optics* **2002**, 41, 6006.
- [201] H. Bian, S. Zhou, X. Liang, Q. Li, W. Han, *Progress in Natural Science: Materials International* **2012**, 22, 295.
- [202] K. M. Balss, G. Llanos, G. Papandreou, C. A. Maryanoff, *Journal of biomedical materials research. Part A* **2008**, 85, 258.
- [203] K. M. Balss, F. H. Long, V. Veselov, A. Orana, E. Akerman-Revis, G. Papandreou, C. A. Maryanoff, *Analytical chemistry* **2008**, 80, 4853.
- [204] C. D. C. Erbetta, R. J. Alves, J. Magalhães Resende, R.F. de Souza Freitas, R. G. de Sousa, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2012**, 03, 208.
- [205] H. Keles, A. Naylor, F. Clegg, C. Sammon, *Vibrational Spectroscopy* **2014**, 71, 76.
- [206] M. Kiremitci-Gumusderelioglu, G. Deniz, *Turkish Journal of Chemistry* **1999**, 23, 153.
- [207] A. Geze, F. Boury, J.-P. Benoit, I. Chourpa, P. Dubois, *Analyst* **1999**, 124, 37.

- [208] E. Fallahi, M. Barmar, M. H. Kish, *Iranian Polymer Journal* **2010**, 19, 277.
- [209] M. Zheng, W. Du, *Vibrational Spectroscopy* **2006**, 40, 219.
- [210] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, RPS Publishing, Grayslake **2009**.
- [211] T. Frosch, T. Meyer, M. Schmitt, J. Popp, *Analytical chemistry* **2007**, 79, 6159.
- [212] P. Lasch, J. Kneipp, *Biomedical vibrational spectroscopy*, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. **2008**.
- [213] C. A. Coutts-Lendon, N. A. Wright, E. V. Mieso, J. L. Koenig, *Journal of Controlled Release* **2003**, 93, 223.
- [214] T. Vo-Dinh, G. Gauglitz, *Handbook of spectroscopy*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2003**.
- [215] C. G. Ryan, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2011**, 269, 2151.
- [216] M. J. Hackett, R. Siegele, F. El-Assaad, J. A. McQuillan, J. B. Aitken, E. A. Carter, G. E. Grau, N. H. Hunt, D. Cohen, P. A. Lay, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2011**, 269, 2260.
- [217] R. Rajendran, R. Minqin, J. A. Ronald, B. K. Rutt, B. Halliwell, F. Watt, *Free radical biology & medicine* **2012**, 53, 1675.
- [218] R. Siegele, N. R. Howell, P. D. Callaghan, Z. Pastuovic, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2013**, 306, 125.
- [219] J. Lee, R. Siegele, Z. Pastuovic, M. J. Hackett, N. H. Hunt, G. E. Grau, D. D. Cohen, P. A. Lay, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2013**, 306, 129.
- [220] P. Pongrac, K. Vogel-Mikuš, L. Jeromel, P. Vavpetič, P. Pelicon, B. Kaulich, A. Gianoncelli, D. Eichert, M. Regvar, I. Kreft, *Food Research International* **2013**, 54, 125.
- [221] K. Cammann (Ed.), *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin **2010**.
- [222] M. E. Staab, D. K. Meeker, W. D. Edwards, S. S. Srivatsa, M. H. Jeong, D. R. Holmes, R. S. Schwartz, *Journal of the American College of Cardiology* **1995**, 25, 348A.
- [223] R. J. Levy, F. J. Schoen, H. C. Anderson, H. Harasaki, T. H. Koch, W. Brown, J. B. Lian, R. Cumming, J. B. Gavin, *Biomaterials* **1991**, 12, 707.
- [224] A. Munnelly, F. Schoen, N. Vyavahare, in *Degradation of Implant Materials* (Ed.: N. Eliaz), Springer Science+Business Media. New York **2012**, p. 359.

- [225] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2002**, *41*, 3130.
- [226] R. B. Roijers, R. K. Dutta, Cleutjens, Jack P M, Mutsaers, Peter H A, de Goeij, Jeroen J M, van der Vusse, Ger J, *Analytical chemistry* **2008**, *80*, 55.
- [227] R. Lapatto, *Biomedical applications of the PIXE and the PIGE methods*, (Dissertation) University of Helsinki, Finnish Society of Sciences and letters, Helsinki **1990**.
- [228] E. F. Garman, G. W. Grime, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2005**, *89*, 173.
- [229] Johansson, Sven A. E., J. L. Campbell, K. G. Malmqvist, *Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE)*, Wiley-Interscience, New York **1995**.
- [230] R. B. Roijers, N. Debernardi, Cleutjens, Jack P M, L. J. Schurgers, Mutsaers, Peter H A, van der Vusse, Ger J, *The American journal of pathology* **2011**, *178*, 2879.
- [231] T. Cichocki, D. Heck, L. Jarczyk, E. Rokita, A. Strzałkowski, M. Sych, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **1987**, *22*, 210.
- [232] R. Z. LeGeros, *Zeitschrift für Kardiologie* **2001**, *90*, III116.
- [233] B. B. Tomazic, *Zeitschrift für Kardiologie* **2001**, *90*, III68.
- [234] R. K. Dutta, R. B. Roijers, P. Mutsaers, P. Pauwels, J. de Goeij, van der Vusse, G.J., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2005**, *231*, 257.
- [235] M. M. McCormick, F. Rahimi, Y. V. Bobryshev, K. Gaus, H. Zreiqat, H. Cai, Lord, Reginald S A, C. L. Geczy, *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 41521.
- [236] F. Watt, R. Rajendran, M. Q. Ren, B. Tan, B. Halliwell, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2006**, *249*, 646.
- [237] M. Epple, P. Lanzer, *Zeitschrift für Kardiologie* **2001**, *90*, III2.
- [238] C. M. Giachelli, *The American journal of pathology* **1999**, *154*, 671.
- [239] C. M. Giachelli, *Zeitschrift für Kardiologie* **2001**, *90*, III31.
- [240] S. B. Baker, L. I. G. Worthley, *Critical care and resuscitation journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine* **2002**, *4*, 307.
- [241] S. Mitchell, *Biological interactions of sulfur compounds*, Taylor & Francis, London, UK, Bristol, PA, USA **1996**.
- [242] W. Ternes, *Biochemie der Elemente*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2013**.
- [243] G. Löffler, P. E. Petrides, *Physiologische Chemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **1988**.

- [244] E. R. Edelman, C. Rogers, *The American journal of cardiology* **1998**, 81, 4E–6E.
- [245] R. Kornowski, M. K. Hong, F. O. Tio, O. Bramwell, H. Wu, M. B. Leon, *Journal of the American College of Cardiology* **1998**, 31, 224.
- [246] A. Farb, G. Sangiorgi, A. J. Carter, V. M. Walley, W. D. Edwards, R. S. Schwartz, R. Virmani, *Circulation* **1999**, 99, 44.
- [247] D. Echeverri, *Revista Colombiana de Cardiología* **2010**, 17, 47.
- [248] T. J. Parry, R. Brosius, R. Thyagarajan, D. Carter, D. Argentieri, R. Falotico, J. Siekierka, *European journal of pharmacology* **2005**, 524, 19.
- [249] A. Trion, A. van der Laarse, *American heart journal* **2004**, 147, 808.
- [250] G. J. Wilson, G. Nakazawa, R. S. Schwartz, B. Huibregtse, B. Poff, T. J. Herbst, D. S. Baim, R. Virmani, *Circulation* **2009**, 120, 141.
- [251] B. F. Rodak, G. A. Fritsma, E. M. Keohane, *Hematology: Clinical principles and applications*, Saunders Elsevier, St. Louis, MO **2012**.
- [252] I.-K. Jang, *Cardiovascular OCT Imaging*, Springer International Publishing Switzerland, Cham Heidelberg New York Dordrecht London **2015**.
- [253] E. J. Gussenhoven, C. E. Essed, P. Frietman, F. van Egmond, C. T. Lancée, W. H. van Kappellen, J. Roelandt, P. W. Serruys, G. P. Gerritsen, H. van Urk, N. Bom, *European Journal of Vascular Surgery* **1989**, 3, 571.
- [254] R. A. Nishimura, W. D. Edwards, C. A. Warnes, G. S. Reeder, D. R. Holmes, A. Tajik, P. G. Yock, *Journal of the American College of Cardiology* **1990**, 16, 145.
- [255] C. Di Mario, S. H. The, S. Madretsma, van Suylen, Robert J., R. A. Wilson, N. Bom, P. W. Serruys, E. J. Gussenhoven, J. R. Roelandt, Y. Zhong, L. Wenguang, *Journal of the American Society of Echocardiography* **1992**, 5, 135.
- [256] M. A. Kjelsberg, P. Seifert, E. R. Edelman, C. Rogers, *The Journal of invasive cardiology* **1998**, 10, 142.
- [257] R. Mehran, G. S. Mintz, M. K. Hong, F. O. Tio, O. Bramwell, A. Brahim, K. M. Kent, A. D. Pichard, L. F. Satler, J. J. Popma, M. B. Leon, *Journal of the American College of Cardiology* **1998**, 32, 794.
- [258] M. Dettmer, N. Glaser-Gallion, P. Stolzmann, F. Glaser-Gallion, J. Fornaro, G. Feuchtner, W. Jochum, H. Alkadhi, S. Wildermuth, S. Leschka, *European journal of radiology* **2013**, 82, 264.
- [259] E. Grube, *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* **2002**, 9, 431.
- [260] A. V. Finn, F. D. Kolodgie, J. Harnek, L. J. Guerrero, E. Acampado, K. Tefera, K. Skorija, D. K. Weber, H. K. Gold, R. Virmani, *Circulation* **2005**, 112, 270.

- [261] S. Y. Lim, M. H. Jeong, S. J. Hong, D. S. Lim, J. Y. Moon, Y. J. Hong, J. H. Kim, Y. Ahn, J. C. Kang, *Circulation Journal* **2008**, 72, 463.
- [262] J. P. Liuzzo, J. A. Ambrose, J. T. Coppola, *The Journal of invasive cardiology* **2005**, 17, 497.
- [263] C. Vogt, C. Latkoczy, in *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook* (Ed.: S. M. Nelms), Blackwell Publishing Ltd; CRC Press LLC. Oxford, Boca Raton, FL **2005**, pp. 228-258.
- [264] J. S. Becker, *Inorganic mass spectrometry: Principles and applications*, John Wiley & Sons, Chichester **2007**.
- [265] DIN EN ISO 17294-1, *Wasserbeschaffenheit - Anwendung der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) - Teil 1: Allgemeine Anleitung (ISO 17294-1:2004); Deutsche Fassung EN ISO 17294-1:2006*, Beuth Verlag, Berlin **2007**.
- [266] J. Feldmann, A. Kindness, P. Ek, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17, 813.
- [267] J. S. Becker, R. C. Dietrich, A. Matusch, D. Pozebon, V. L. Dressler, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2008**, 63, 1248.
- [268] D. Hare, B. Reedy, R. Grimm, S. Wilkins, I. Volitakis, J. L. George, R. A. Cherny, A. I. Bush, D. I. Finkelstein, P. Doble, *Metallomics* **2009**, 1, 53.
- [269] B. Wu, Y. Chen, J. S. Becker, *Analytica chimica acta* **2009**, 633, 165.
- [270] C. Austin, D. Hare, T. Rawling, A. M. McDonagh, P. Doble, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2010**, 25, 722.
- [271] J. Lear, D. Hare, P. Adlard, D. Finkelstein, P. Doble, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2012**, 27, 159.
- [272] M. Siebold, P. Leidich, M. Bertini, G. Deflorio, J. Feldmann, E. M. Krupp, E. Halmschlager, S. Woodward, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, 402, 3323.
- [273] J. Cezo, E. Kramer, K. Taylor, V. Ferguson, M. Rentschler, T. P. Ryan, in *Proceedings of SPIE: Energy-based Treatment of Tissue and Assessment VII*, **2013**, p. 85840M-1.
- [274] S. Rege, S. Jackson, W. L. Griffin, R. M. Davies, N. J. Pearson, S. Y. O'Reilly, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2005**, 20, 601.
- [275] H. Drücker, *Korrosionsverhalten bioresorbierbarer Magnesiumlegierungen in vitro und in vivo*, (Dissertation) Leibniz Universität Hannover **2015**.
- [276] S. Gruhl, *Quantifizierung von Konzentrationsgradienten im μm -Bereich mittels Laserablation-ICP-MS*, (Dissertation) Leibniz Universität Hannover **2006**.
- [277] A. M. Gressner, T. Arndt, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2013**.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Artikel in Fachzeitschriften

1. K. Bobe, E. Willbold, I. Morgenthal, O. Anderson, T. Stuknitzky, J. Nellesen, W. Tilmann, C. Vogt, **K. Vano**, F. Witte;
In vitro and in vivo evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibers.
Acta Biomaterialia, Vol. 9, No. 10, **2013**, pp. 8611–8623.
2. **K. Vano-Herrera**, A. Misiun, C. Vogt;
Preparation and characterization of Poly(lactic acid)/poly(methyl methacrylate) blend tablets for application in quantitative analysis by micro Raman spectroscopy.
Journal of Raman Spectroscopy, Vol. 46, No. 2, **2015**, pp. 273–279.
3. **K. Vano-Herrera**, H. Drücker, C. Vogt;
Bioresorbierbare Implantate: Welche Informationen liefert die Analytik?
GIT Labor-Fachzeitschrift, Band 59, Heft 7, **2015**, S. 28–31.

Konferenzbeiträge (Vortrag)

1. H. Drücker, **K. Vano Herrera**, F. Feyerabend, N. Hort, C. Vogt;
Zeitabhängige in vitro Korrosion von potentiellen Implantatlegierungen und festkörperspektroskopische Untersuchung der entstandenen Produkte.
Colloquium Analytische Atomspektroskopie, CANAS'11, 13. – 16. März, Leipzig (Deutschland), **2011**.
2. C. Vogt, **K. Vano**, H. Drücker, J. Vogt;
Characterization of in vivo corrosion by 2D XRF and mass spectrometry techniques.
4th Symposium on Biodegradable Metals for Biomedical Applications, 27th August – 1st September, Maratea (Italy), **2012**.
3. **K. Vano-Herrera**, F. Zimmermann, M. Stekker, C. Vogt;
Investigation of coated magnesium alloys by IR, Raman, X-Ray and Mass spectrometry.
5th Symposium on Biodegradable Metals for Biomedical Applications, 26th – 31st August, Umang Island (Indonesia).
European Cells and Materials Vol. 26. Suppl. 5, **2013** (page 26).

4. K. Bobe, E. Willbold, I. Morgenthal, O. Anderson, J. Nellesen, W. Tilmann, C. Vogt, **K. Vano**, F. Witte;
Open porous Mg scaffolds show biocompatibility differences at long term.
5th Symposium on Biodegradable Metals for Biomedical Applications, 26th – 31st August, Umang Island (Indonesia).
European Cells and Materials Vol. 26. Suppl. 5, **2013** (page 50).
5. A. Hornemann, **K. Vano Herrera**, C. Vogt, B. Tyler, A. Hoehl, P. Emmer, B. Beckhoff;
Characterization of advanced biomaterials for the medical device industry using Synchrotron Radiation based FTIR microspectroscopy.
E-MRS Spring Meeting / ALTECH - Analytical techniques for precise characterization of nanomaterials, May 26th – 30th – Lille (France), **2014**.
6. B. Pollakowski, A. Hornemann, **K. V. Herrera**, C. Vogt, J. Reifenrath, P. Emmer, R. Unterumsberger, B. Beckhoff;
Vacuum and Ambient techniques for the characterization of Biodegradable Mg-implant Alloys in rabbit bone tissue.
16th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis ECASIA'15, September 28th – October 1st, Granada (Spain), **2015**.

Konferenzbeiträge (Poster)

1. C. Vogt, **K. Vano**, H. Drücker, F. Witte, J. Vogt;
In vivo Untersuchung des Abbauverhaltens resorbierbarer Implantatlegierungen.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, 01. - 03. November, Hamburg (Deutschland), **2012**.
2. F. Zimmermann, **K. Vano-Herrera**, C. Vogt;
Determination of background values in tissue for components of implant materials.
Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 6st – 11st January, Amelia Island, Florida (USA), **2014**.
3. F. Zimmermann, **K. Vano-Herrera**, C. Vogt;
Development of a method for ultra trace analysis of heavy metals in animal samples.
European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 22st – 26st February, Münster (Germany), **2015**.
4. **K. Vano-Herrera**, A. Misium, F. Zimmermann, C. Vogt;
Herstellung und Charakterisierung von Polylactid/Polymethylmethacrylat Standards für die quantitative Analyse von Implantatbeschichtungen mittels Mikro-Ramanspektroskopie.
Konferenz zur Analytischen Chemie, ANAKON 2015, 23. – 26. März, Graz (Österreich), **2015**.
5. M. Rine, **K. Vano-Herrera**, F. Zimmermann, C. Vogt;
Untersuchung von Freisetzungs- und Degradationsprozessen an Implantatoberflächen.
18. Tagung Festkörperanalytik, 18. FKA, 6. – 8. Juli, Wien (Österreich), **2015**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kelim Vano Herrera
Geburtstag	01. Juli 1974
Geburtsort	Valencia, Venezuela
Nationalität	venezolanisch

Schulbildung

10/1980 - 07/1991	Primär-, Sekundär- und Oberschule in Valencia, Venezuela Abschluss: <i>Bachiller Mención: Ciencias</i> (entspricht dem Abschluss Abiturient in Naturwissenschaften)
10/1991 - 07/1992	Vorbereitungskurs auf das Hochschulstudium in Valencia, Venezuela

Hochschulbildung

10/1992 - 11/1996	Institut für Technologie von Valencia in Venezuela Abschluss: <i>Técnico Superior Universitario en Química</i> (entspricht einem Fachhochschule-Abschluss in der Fachrichtung Chemie) Abschlussarbeit: „Optimierung von AAS-Methoden zur Bestimmung von Cadmium und Quecksilber in Wasserproben“
10/2001 - 12/2005	Universität von Carabobo in Valencia, Venezuela Abschluss: <i>Licenciado en Química</i> (entspricht dem Abschluss Diplom Chemiker) Abschlussarbeit: „Ermittlung der Messunsicherheit bei angewandten analytischen Verfahren für die Evaluation von Lebensmitteln“
10/2008 - 03/2011	Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Abschluss: Master of Science in Analytik Abschlussarbeit: „Festkörperspektroskopische Untersuchungen zum Korrosionsverhalten von Mg-Legierungen“
10/2011 - 10/2015	Promotion zum Dr. rer. nat. im Fachbereich Analytische Chemie am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Dissertation zum Thema: „Untersuchung von Abbauprozessen an bioresorbierbaren Implantatmaterialien“

Berufstätigkeit

- 04/1996 - 06/2002 Mitarbeiter / Qualitätsmanagement und Qualitätskontrolle
(Farb- und Lackindustrie in Valencia, Venezuela)
- 07/2002 - 03/2008 Qualitätskoordinator
(Kalibrierlaboratorium in Valencia, Venezuela)
- 04/2006 - 03/2008 Consultant im Bereich Labormanagement
(Beratungsfirma in Valencia, Venezuela)
- 03/2011 - 10/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
(Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover)

Nebentätigkeit

- 10/1993 - 07/1994 Studentische Hilfskraft
(Institut für Technologie von Valencia in Venezuela)
- 04/2009 - 08/2009 Studentische Hilfskraft
(Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover)
- 01/2010 - 06/2010 Wissenschaftliche Hilfskraft
(Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover)
-