

## Redaktion

D. Schultheiss, Hannover  
 G. Bartsch Jr., Ulm  
 C.G. Stief, München

K. Sternberg<sup>1</sup> · C. Selent<sup>1</sup> · N. Hakanßon<sup>1</sup> · J. Töllner<sup>2</sup> · T. Langer<sup>1</sup> · H. Seiter<sup>2</sup>  
 K.-P. Schmitz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock

<sup>2</sup>Urologische Klinik und Poliklinik der Universität Rostock

## Bioartifizielle Materialien in der Urologie

Seit Fabian et al. [1] 1980 erstmals eine rostfreie Stahlspirale als Stent in der Therapie der subvesikalen Obstruktion einsetzten, war der „urologische Stent“ einem stetigen Wandel unterworfen. Als Alternative zum Langzeitkatheterismus sowie zu herkömmlichen operativen Therapien (z. B. TUR-Prostata, transvesikale Adenomektomie, Urethrotomia interna) sollte so auch dem multimorbiden, inoperablen Patienten eine effektive, minimal-invasive Behandlungsform angeboten werden.

Im Laufe der Zeit wurden durch die Verwendung unterschiedlicher Stentmaterialien und -designs diverse Harnröhrenstents für den temporären wie permanenten Einsatz konzipiert. Beispielhaft seien hier der Urocoil-Nickel-Titan-Stent nach Yachia, die Uro-Spirale nach Concorcort, der Polyurethan-Stent nach Nissenkorn, der ASI- (Advanced-Surgical-Interventions-) Titanstent sowie der Urolume<sup>®</sup>-Stent der Fa. AMS erwähnt. Mittlerweile stehen auch für die Behandlung der prävesikalen Harntransportstörung selbstexpandierbare endoluminale Ureter-Stents (SPES), wie Wallstent<sup>®</sup> (Kobalt-Chrom-Nickel-Molybdän-Eisen-Legierung) und Memotherm<sup>®</sup>-Stent (Nickel-Titan-Legierung), zur Verfügung. Ihr wesentlicher Vorteil gegenüber dem herkömmlichen Ureterkatheter (Double-J) liegt in der Vermeidung des vesikoureteralen Refluxes, der in ca. 7% der Fälle zu einer Pyelonephritis führen kann.

Dennoch stellt der „urologische Stent“ immer noch eine therapeutische Randerscheinung dar. Ursächlich hierfür sind die in Abhängigkeit vom eingesetzten Stent-

typ auftretenden Komplikationen wie Inkrustation, Fragmentation, Infektion, Korrosion und Stentdislokation. Auch eine Tumorinduktion wird diskutiert. Liegezeit und Stentversagen korrelieren dabei direkt miteinander. Infolge der Stent-Epithel-Interaktion kommt es des Weiteren zur Induktion einer urothelialen Hyperplasie, die ihrerseits ein sekundäres Stentversagen durch Reokklusion [2] bedingen kann. Die Entfernung eines solchen Stents ist dann oft sehr schwierig bzw. unmöglich. Entscheidend für das Ausmaß der Komplikationen ist in diesem Zusammenhang, ob und in welcher Zeit der Stent epithelialisiert und wie er in die Ureter- oder Urethrawand integriert wird.

Dem allgemeinen Trend in der Medizin folgend versucht man deshalb, durch Verwendung biokompatibler, abbaubarer und resorbierbarer Polymere die Komplikationsrate zu minimieren und so die Stentzuverlässigkeit zu erhöhen. Wesentlich ist dabei, dass der Polymerstent für einen definierten Zeitraum, der beispielsweise für die Ausreifung von strikturiertem, fibrösem Gewebe notwendig ist, funktionell stabil bleibt, bevor er über den Stoffwechsel oder den Urin abgebaut wird. Der vollständige Abbau würde so auch Rezidiveingriffe bei Restenosen ermöglichen.

Im Allgemeinen kann man folgendes Anforderungsprofil an Stents für die Urologie formulieren:

- Biokompatibilität,
- ausreichende mechanische Stabilität und Flexibilität,

- einstellbares Degradationsverhalten ohne Freisetzung toxischer Degradationsprodukte,
- Vermeidung von Infektionen,
- Verhinderung von Dislokationen,
- Sterilisierbarkeit unter Verwendung herkömmlicher Sterilisationsverfahren,
- Implantation mit herkömmlichen Methoden,
- Wirtschaftlichkeit.

### Bioresorbierbare Stents

Erstmals wurde im Jahre 1993 über die Entwicklung eines bioresorbierbaren Urethrostents zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) in der Literatur berichtet [3]. Dieser spiralförmige Poly-L-lactid-Stent (PLLA) war mit einer Schicht aus Poly-D,L-lactid (PDLA) überzogen. Die Spirale wurde im Tierversuch (Kaninchen) mit Nahtmaterial befestigt. In zahlreichen nachfolgenden Arbeiten kamen fast ausschließlich selbstexpandierbare Polymerstents zum Einsatz, die im Design dem Fabian-Metallstent [1] nachempfunden wurden. Die dabei untersuchten bioresorbierbaren Polymere lassen sich entsprechend ihrer Degradationszeit in die 3 Gruppen unterteilen: Polyglycolid (PGA, Degradationszeit 3–6 Wochen), Poly-D,L-lactid (PDLA, Degradationszeit 3–6 Monate) und Poly-L-lactid (PLLA, Degradationszeit 12 Monate).

Gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF),  
 Projekt FKZ 01 ZZ 0108.

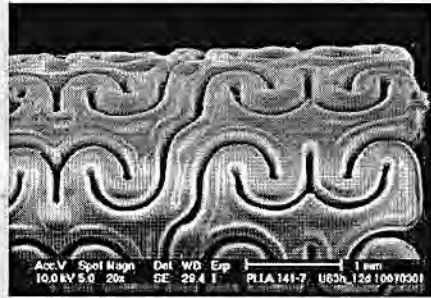
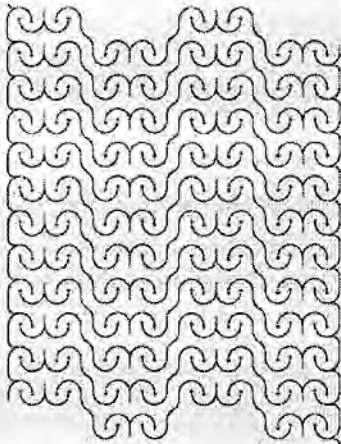


Abb. 1 ▲ Urethrostent aus PLLA mit S-förmigen Struts – Schneidzeichnung und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Prototypen (Vergr. 20:1, Ausschnitt)

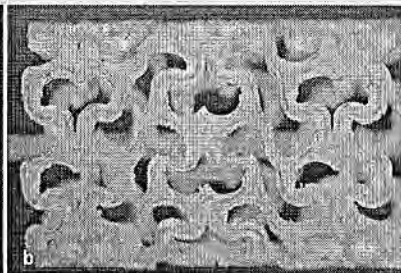
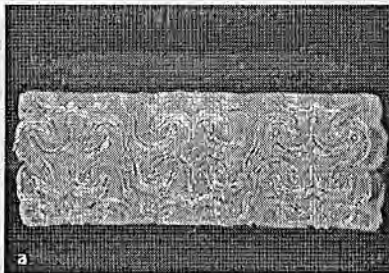


Abb. 2 ▲ PLLA-Stent vor (a) und nach Dilatation (b; Vergr 6:1)

Zur klinischen Anwendung kamen PGA-Stents als adjuvante Maßnahme in der Therapie der BPH mittels thermischer Verfahren wie VLAP („visual laser ablation of the prostate“; [4, 5]), TUMT („transurethral microwave thermotherapy“; [6]) und ILC („interstitial laser coagulation“; [7]). Allerdings ergaben sich Komplikationen, die auf eine zu schnelle Degradation zurückgeführt wurden [8].

In nachfolgenden klinischen Untersuchungen wurde daher PLLA als langsam resorbierbares Polymer ausgewählt und zur Behandlung von rezidivierenden Strikturen [9] sowie der BPH [10] eingesetzt. In diesem Zusammenhang bestätigten auch neuere tierexperimentelle Untersuchungen an Merino-Mix-Schafen von Hölzl et al. [11] die hohe Biokompatibilität eines PLLA-basierten Ureterstents, die sowohl in einer Reduktion der urothelialen Hyperplasie als auch in der Förderung der Geweberegeneration ihren Ausdruck fand. Analoge Experimente wurden mit PLGA- [12] und SR-PLLA/PDLA-Stents [13] durchgeführt. In vorklinischen Arbeiten wurden außerdem die Beladung (PGA, PLA96;

[14]) bzw. Beschichtung (PLLA, [15]) mit Antibiotika sowie der Einbau von Röntgenkontrastmitteln (PLA96, [16]) untersucht.

Prinzipiell ist der abbaubare Polymerstent für folgende urologische Indikationen denkbar:

- Auxiliäre Maßnahme nach Urethro- und Ureterotomien sowie nach alternativen BPH-Therapien (z. B. TUMT, VLAP, ILC) zur Vermeidung eines Rezidivs bzw. einer postinterventionellen Obstruktion,
- Sicherung von Anastomosen und Förderung des Heilungsprozesses nach offenen operativen Eingriffen am Harntrakt mit Neostomien (Nierenbeckenplastik, Ureterozystoneostomie (Boari-, Psoas-Hitch-Plastik), Harnröhrenplastik, Harnleiter-Darm-Anastomosen (Konduit, Neoblase).

### Gewebekultivierung

Gewebekulturen müssen im Gegensatz zu Zellkulturen nicht proliferierend in

einem möglichst ursprünglichen Zustand so lange wie möglich unter In-vitro-Bedingungen gehalten werden. Dies erscheint zwar sehr einfach, ist aber aus den unterschiedlichsten Gründen sehr schwierig, Gewebe unter Erhalt der Form und Funktion zu kultivieren. Im Allgemeinen werden erste Gewebekulturen damit begonnen, dass sterile, etwa 0,5 mm dünne Gewebeschnitte in Kulturschalen kultiviert werden, um das für die Versorgung optimale Medium zu sondieren. Da unter statischen Milieubedingungen jedoch die Gefahr besteht, dass tiefer liegende Zellschichten des Gewebes nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und durch Metabolite zellulären Ursprungs geschädigt werden, wird die Kultivierung von Geweben danach in Perfusionscontainern bzw. Bioreaktoren durchgeführt, da sie gleichmäßig mit immer frischem Medium durchströmt werden.

Zur Kultivierung von urologischen Geweben und zur Charakterisierung der durch die Stents hervorgerufenen Gewebereaktionen musste demzufolge eine experimentelle Basis aufgebaut werden, die es ermöglicht, für die Applikation relevante Gewebeteile unter Perfusionsbedingungen zu kultivieren und in ausreichenden Zeiträumen vital zu erhalten. Zum Screenen der Kultivierungsbedingungen wurden aufgrund der Abmaße der PLLA-Stentprototypen und aufgrund der Verfügbarkeit des biologischen Materials Harnleiter vom Schwein verwendet. Entsprechend dem Forschungsansatz werden in Folgeuntersuchungen mit PLLA-Stents bzw. PLLA/Methotrexat-Stents versehene porcine Harnleiterabschnitte (Stentimplantation mittels Ballonkatheter) im Perfusionscontainer über bestimmte Zeiträume kultiviert und die ausgelösten Gewebereaktionen histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch beurteilt.

### Material und Methoden

#### Polymer und Pharmakon

Zur Anwendung kam das biologisch abbaubare synthetische Homopolymer Poly-L-lactid (PLLA, Resomer<sup>®</sup> L214 M<sub>w</sub> = 650.000 g/mol, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,8), das als Gra-

nulat von der Fa. Boehringer Ingelheim Pharma (Ingelheim, Deutschland) bezogen wurde. Das Modellzytostatikum Methotrexat (MTX) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

### Stentherstellung

Die Herstellung der hohlzylindrischen Halbzeuge erfolgte mit Hilfe eines Tauchverfahrens aus der PLLA-Lösung (1,6% w/v). Um reproduzierbare Herstellungsbedingungen gewährleisten zu können, wurde für die Fertigung der Halbzeuge ein Tauchroboter entwickelt [17]. Aus den Halbzeugen wurden mit einem CO<sub>2</sub>-Laser (Wild Emco Lasertec, Österreich) die Stents geschnitten. Diese bestehen aus 4 Ringen mit S-förmigen Struts (Dicke ca. 0,4 mm), die paarweise spiegelverkehrt zueinander angeordnet sind. Die Ringe sind durch Versatzelemente miteinander verbunden (Abb. 1). Die Stentlänge beträgt 10,7 mm und der Innendurchmesser 4,0 mm [18]. Mit Hinblick auf die spätere In-vivo-Testung wurden die PLLA-Urethrostents zunächst für das Tiermodell Kaninchen dimensioniert.

### LDD-Beschichtung

Für die Beschichtung der PLLA-Stents mit dem Zytostatikum Methotrexat wurden Lösungen aus PLLA/Wirkstoff hergestellt, indem die Wirkstofflösung (17% w/v) mit der Polymerlösung (1,7% w/v) so gemischt wurde, dass Endkonzentrationen von Methotrexat in PLLA von 30% und 60% (w/w) erreicht wurden. Die PLLA/Wirkstoff-Lösungen wurden dann durch Sprühen (Airbrush) auf die Stentoberflächen aufgetragen. Alle beschichteten Stents wurden danach im Vakuumtrockenschrank bei 40°C getrocknet.

### Stentapplikation

Im Hinblick auf die Applikation des ballonexpandierbaren PLLA-Stents wurden die In-vitro-Untersuchungen an aufgeweiteten (dilatierten) Stents durchgeführt. Der Stent wurde mit einem Ballon der Größe 8,0x40 mm bis zum Enddruck von 8,0 bar bei 37°C aufgeweitet (Abb. 2). Nach dem gleichen Regime

## Zusammenfassung · Abstract

Urologe (A) 2004 · 43:1200–1207  
DOI 10.1007/s00120-004-0688-1  
© Springer Medizin Verlag 2004

K. Sternberg · C. Selent · N. Hakanßon · J. Töllner · T. Langer · H. Seiter · K.-P. Schmitz

### Bioartifizielle Materialien in der Urologie

#### Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung polymerbasierter bioresorbierbarer Stents für die Urologie und Testung ihrer Gewebereaktionen in vitro in kultivierten Ureter- bzw. Urethraabschnitten. Dafür sollte ein Modell zur Gewebekultivierung aufgebaut werden, was sich ausgewählter Techniken des Tissue Engineering bedient.

Wesentliche Vorteile biologisch abbaubarer Urethrostents sind die Vermeidung der durch die Epithelialisierung bedingten problematischen Extraktion sowie die Möglichkeit, die organbezogene Funktionalität wiederzuerlangen. Durch ein hohes Maß an Biokompatibilität ließe sich das Risiko einer Restenose infolge überschießender Hyperplasie deutlich senken. Abbaubare Urethrostents wären somit, auch wiederholt, bei den verschiedensten Formen der

subvesikalen Obstruktion einsetzbar. Bei der Behandlung von tumorbedingten Stenosen wäre der gezielte Einsatz von zytostatikabeladenen, biologisch abbaubaren Stents denkbar: neben dem mechanischen Effekt des Stents als „Platzhalter“ fände eine lokale Chemotherapie mit adjuvantem oder palliativem Ansatz statt. Deshalb wurde der entwickelte abbaubare Urethrostent mit dem Modellzytostatikum Methotrexat beschichtet, sodass eine lokale kontrollierte Wirkstofffreisetzung („local drug delivery“; LDD) durch Diffusion und während des Stentabbaus stattfindet.

#### Schlüsselwörter

Urethrostent · Gewebekultivierung · „Local drug delivery“ · Zytostatikabeladener Stent · Biokompatibilität

### Tissue cultivation for in vitro testing of polymer-based bioabsorbable urethral stents

#### Abstract

The scope of our research is the development of polymer-based bioabsorbable stents for urologic applications and in vitro testing of tissue reactions of cultured ureteral and urethral segments induced by implanted polymer stent prototypes. For these purposes a tissue cultivation model was developed using selected techniques of tissue engineering.

Essential advantages of degradable over nondegradable urethral stents are elimination of the adverse extraction of epithelialized stents and the potential for recovery of organ-specific functionality.

Moreover, the biocompatibility of a degradable urethral stent could potentially reduce the risk of restenosis due to hyperplasia and could be used, even repeatedly, for

the treatment of a number of subvesical obstructions. For the treatment of tumor-induced strictures, application of degradable polymer stents coated with cytostatic drugs may be possible. The mechanical effect of the drug-loaded stent as a „place holder“ could be complemented by adjuvant or palliative approaches such as local chemotherapy. We have developed and tested in vitro a degradable urethral stent incorporated with the model drug methotrexate for local drug delivery (LDD) by diffusion and during stent degradation.

#### Keywords

Urethral stent · Tissue cultivation · Local drug delivery · Stents coated with cytostatic drugs · Biocompatibility

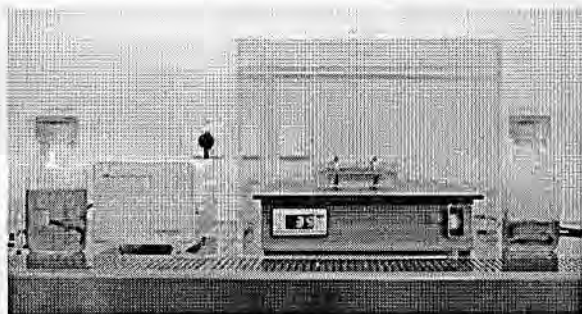


Abb. 3 ▲ Perfusionssystem für die Kultivierung der Ureterabschnitte mit Perfusionscontainer, Heizplatte, Abdeckhaube, Vorrats- und Abfallflasche, Peristaltikpumpe und Schlauchleitungen

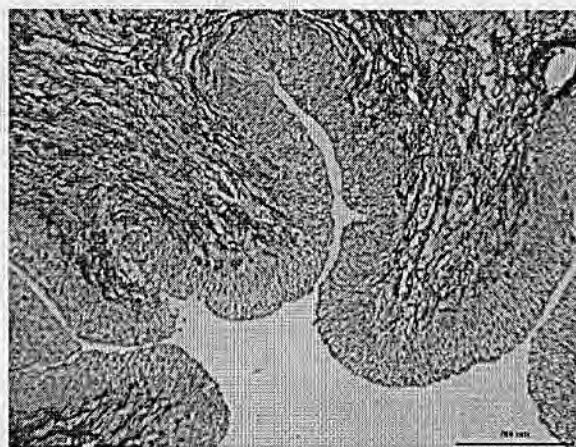


Abb. 4 ▲ Azanfärbung des Übergangsepithels und des subepithelialen Bindegewebes eines nativen Harnleiters (Vergr. 100:1, Ausschnitt)

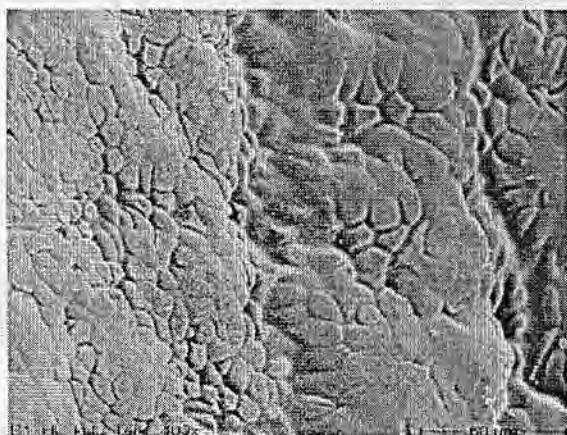


Abb. 5 ◀ Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Übergangsepithels eines über 3 Tage kultivierten Harnleiters (Vergr. 400:1, Ausschnitt)

werden die Stents in den für die Gewebekultivierung vorbereiteten Harnleiterabschnitt implantiert.

### Gewebekultur

Für die Gewebekultivierung wurden porcine Harnleiter unter semisterilen Bedingungen entnommen und in Kulturmedium mit erhöhter Antibiotika- und Fungizidkonzentration bei 4°C transportiert. Die zunächst ca. 0,5 cm langen Ureterabschnitte wurden in einer Perfusionskammer (von Minuth) bei 37°C kultiviert (Abb. 3).

Für die Kultivierung wurde DMEM/Hams-F12-Medium (3/2 v/v) mit 2% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 6,7 ng/ml Triiodothyronin, 0,5 ng/ml Hydrocortison, 140 µg/ml BPE und 5 ng/ml EGF verwendet. Die Gewebeproben wurden im ersten Kultivierungszeitraum nach 3 Tagen aus der Perfusionskammer

entnommen und rasterelektronenmikroskopisch sowie histologisch untersucht. Für die histologische Beurteilung der Proben (Kryoschnitte) wurden verschiedene Färbungen (Hämalaun-Eosin-Färbung, Azanfärbung nach Heidenreich) verwendet (Abb. 4).

### Zellkultur

Die In-vitro-Studien zur Beurteilung der Biokompatibilität des verwendeten PLLA wurden mit porcinen Urothelprimärkulturen aus dem Harnleiter und die Studien zur Prüfung des Einflusses des Zytostatikums Methotrexat mit der Zelllinie 5637 (humane Blasenkarzinomzellen) durchgeführt.

Zur Aufarbeitung der urothelialen Primärkulturen wurden Gewebeproben aus semisteril entnommenen porcinen Harnleitern verwendet. Die 5 cm langen Harnleiterabschnitte wurden mit der urothelbewachsenen Seite in eine Zellkulturschale mit einer Liberase-Blendzym-Lösung

(Fa. Roche, Deutschland, Liberase Blendzym II/PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> 1/49 v/v) gelegt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Urothel vorsichtig mit einer Sonde abgeschabt, in Kulturmedium (KS-FM, 5% FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin, 6,7 ng/ml Triiodothyronin, 0,5 ng/ml Hydrocortison, 140 µg/ml BPE, 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml Cholera-toxin) resuspendiert und zentrifugiert.

Anschließend wurden die gewonnenen Zellen mit Kulturmedium gewaschen, in eine 25-ml-Zellkulturflasche (Primaria, Fa. BD Biosciences Discovery Labware, Deutschland) pipettiert und bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 48 h ausgetauscht. Nachdem die Primärzellen eine Konfluenz bis zu 90% erreicht hatten, wurden sie subkultiviert. Hierfür wurden sie mit Dispase II (Fa. Roche, Deutschland) für 10 min bei 37°C be-

handelt und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  c/ml eingestellt.

Die Kultur der 5637-Zellen erfolgte mit dem Universalmedium RPMI-1640 (Fa. Gibco, Deutschland), dem 10% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### Biokompatibilität von PLLA

Zum Nachweis der Biokompatibilität des für die Stents und für die Beschichtungen verwendeten PLLA wurden Vitalitätstests an porcinen, primären Urothelzellen mit Folieneluat gemäß der europäischen Norm zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (Teil 5; Prüfung auf In-vitro-Zytotoxizität, EN ISO 10993-5, 1999) durchgeführt. Herangezogen wurde der MTS-Test als eine kolorimetrische Nachweismethode, bei dem ein Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) durch zelluläre Dehydrogenasen in einen Formazanfarbstoff verstoffwechselt wird. Der daraus resultierende Farbumschlag wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm (abzüglich unspezifischer Absorption bei 690 nm) nachgewiesen und ist ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen. Diese wird direkt proportional zur Anzahl der lebenden, vitalen Zellen gesetzt.

Für die Eluatuntersuchungen wurden die zu untersuchenden Polymerfolien mit Zellkulturmedium bei 37°C für 48 h unter ständigem Schütteln im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Folieneluate mit frischem Zellkulturmedium verdünnt (100% Eluat, 50% Eluat, 25% Eluat). Als Negativkontrolle wurde reines Zellkulturmedium ohne Prüfkörper und als Positivkontrollen wurden Eluate von Latexfolien bekannter Toxizität mitgeführt.

Die primären Urothelzellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  c/ml in 96er Well-Platten mit einem Volumen von 200 µl Zellkulturmedium/Well ausgesät und unter standardisierten Kulturbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte ein Austausch des Zellkulturmediums durch die oben genannten Prüfmedien. Diese Ansätze wur-

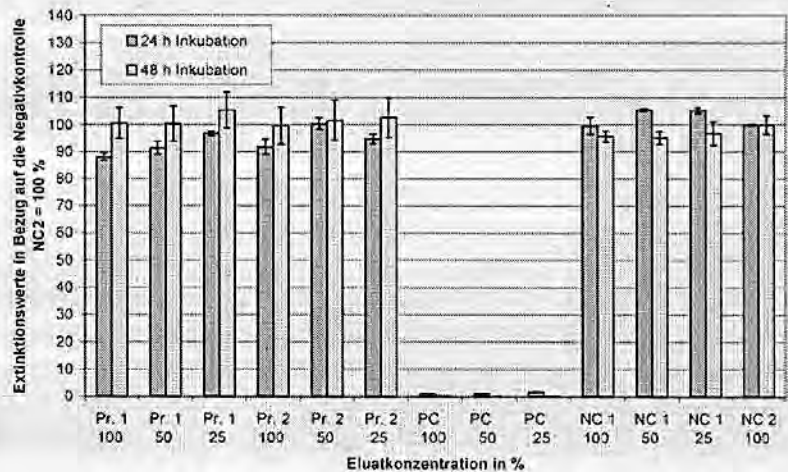


Abb. 6 ▲ MTS-Test nach indirektem Kontakt von porcinen, primären Urothelzellen mit PLLA (n=4), Untersuchung von unverdünnten (100%) und mit Zellkulturmedium verdünnten (50%, 25%) Eluat zweier PLLA-Folien (Pr. 1 Probe 1, Pr. 2 Probe 2), Positivkontrolle (PC): Eluate einer Latexfolie, Negativkontrolle (NC): reines Zellkulturmedium

den für 24 h und 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Prüfmedium gegen das MTS-Medium (MTS-Reagenz/DMEM-Medium ohne Phenolrot 1/5 v/v, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) ausgetauscht und der MTS-Test durchgeführt.

Für die Beurteilung der Biokompatibilität von PLLA-Folienstanzen im Direktkontakt mit porcinen, primären Urothelzellen wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  c/ml in 24er Well-Platten auf die Folien ausgesät. Nach 24 h und 48 h wurden Proben für die Rasterelektronenmikroskopie entnommen, mit 6,25%igem Glutardialdehyd fixiert und morphologisch begutachtet. Nach 72 h wurde außerdem die Vitalität der Zellen mittels MTS-Test bewertet.

### Nachweis der Wirkung von Methotrexat in vitro

Um anwendungsorientierte Informationen zur lokalen Karzinombehandlung zu erlangen, wurde der Einfluss des Modellzytostatikums Methotrexat auf die humane Blasenkarzinomzelllinie 5637 mittels Zytotoxizitätsassay MTS bestimmt.

Es wurde eine Stammlösung von Methotrexat in DMSO von  $1 \times 10^{-3}$  mol/l hergestellt, die durch weitere Verdünnung in Kulturmedium in Konzentrationen von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l bis  $1 \times 10^{-9}$  mol/l zum Ein-

satz kamen. Kontrollen mit den entsprechenden DMSO-Konzentrationen (0,1–0,000001%) wurden parallel angesetzt.

### Freisetzung von Methotrexat in vitro

Die Freisetzung von Methotrexat aus den beschichteten PLLA-Stents wurde in vitro in Kunsturin (nach Griffith; [19]) bei 37°C unter ständigem Bewegen der Proben untersucht. Dafür wurden die Stents in jeweils 4 ml Kunsturin gegeben und die freigesetzte Menge an Methotrexat mittels UV-Spektroskopie ( $\lambda=300$  nm) bestimmt. Nach jedem Zeitpunkt einer Probenentnahme wurde das Elutionsmedium erneuert.

### Ergebnisse

Im Rahmen der Untersuchungen wurde ein Perfusionsmodell zur Kultivierung von Harnleiterabschnitten aufgebaut. Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde sowohl in den nativen (nicht dargestellt) als auch in den kultivierten Gefäßabschnitten (Abb. 5) ein geschlossenes, prismatisches Urothel nachgewiesen. Dieses Ergebnis konnte auch durch die vorgenommenen Hämalaun-Eosin- und Azanfärbungen bestätigt werden. In den Experimenten wurden somit keine wesentlichen Unterschiede im Gewebenaufbau zwischen na-

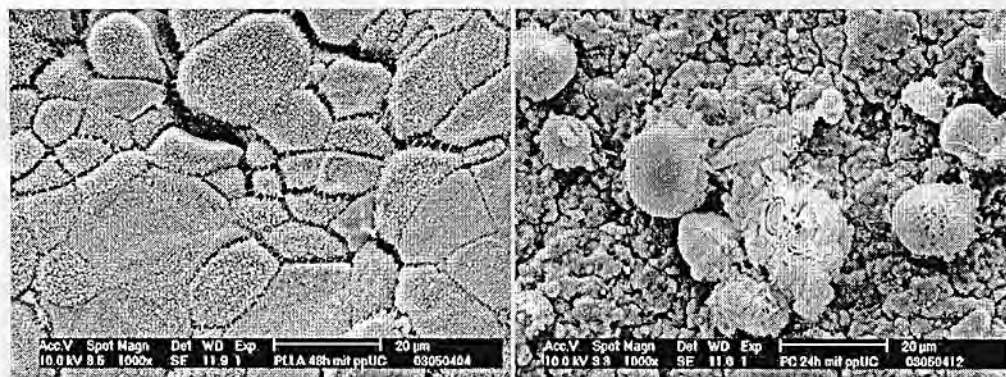


Abb. 7 ◀ Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von porcinen, primären Urothelzellen (ppUC) auf der PLLA-Oberfläche (a) und auf der Latexoberfläche (b; Vergr. 1000:1)

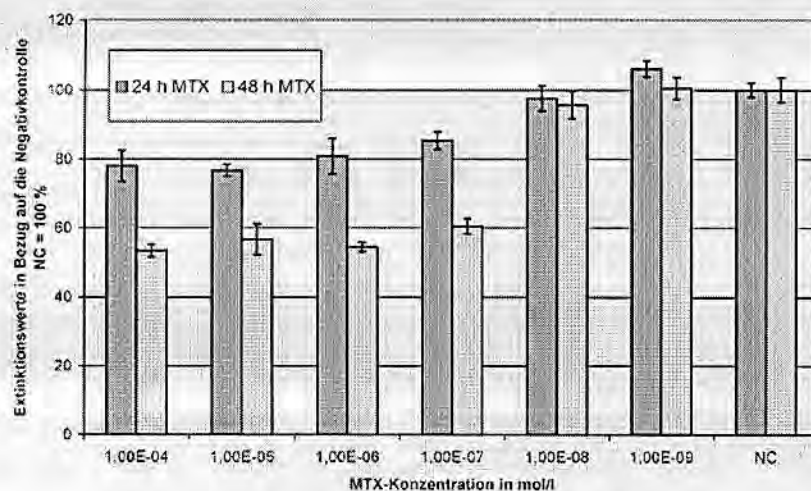


Abb. 8 ◀ MTS-Test von 5637 unter Einfluss von Methotrexat (MTX), n= 4, Zellkonzentration:  $3 \times 10^4$  c/ml, Zellaussaat: 24 h vor Wirkstoffzugabe, MTX-Inkubation über 24 h und 48 h, Extinktionen der Negativkontrolle NC ( $\lambda=492$  nm): 0,79 (24 h), 0,97 (48 h)

tiven und kultivierten Gewebeproben festgestellt. Diese ersten Untersuchungen verdeutlichen, dass es möglich ist, die für die Stentapplikation relevanten Urothelzellen über einen Zeitraum von 3 Tagen in kultivierten Harnleitern am Leben zu erhalten. In weiteren Untersuchungen soll der Kultivierungszeitraum auf bis zu 14 Tage verlängert werden.

Die Ergebnisse der Zellvitalitätstests zur Beurteilung der Biokompatibilität des für die Stents und für die LDD-Beschichtungen mit Methotrexat verwendeten PLLA zeigten, dass keine zytotoxischen Effekte durch die getesteten PLLA-Folien ausgelöst werden. Die im MTS-Test überprüfte metabolische Aktivität der Urothelzellen wurde durch die Inkubation mit den Eluaten der PLLA-Folien nur geringfügig beeinflusst (Abb. 6).

Nach direktem Kontakt der porcinen, primären Urothelzellen mit den PLLA-Folien blieb die Morphologie der Zellen unbeeinflusst. Die rasterelektronenmi-

kroskopischen Aufnahmen zeigten einen geschlossenen Zellrasen prismatisch auf den PLLA-Folien ausgebreiteter Urothelzellen (Abb. 7). Die wenigen zu beobachtenden Risse im Zellverband wurden durch die notwendige Entwässerung der Proben vor der Begutachtung verursacht. Zum Vergleich ist die Positivkontrolle dargestellt, bei der die Urothelzellen nicht auf der Latexoberfläche adhären und als Folge dessen absterben bzw. schon abgestorben sind (abgekugelte Zellen).

Die Untersuchungen zur Testung des Einflusses von Methotrexat (MTX) auf die humane Blasenkarzinomzelllinie 5637 mittels MTS führten zu dem Ergebnis, dass im Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l bis  $1 \times 10^{-7}$  mol/l MTX eine Hemmung der Zellvitalität um maximal 22% (nach 24 h) und maximal 47% (nach 48 h) zu verzeichnen ist (Abb. 8). Die verstärkte Hemmung der Vitalität der Testzellen nach 48 h Inkubation war im genannten

Konzentrationsbereich gegeben (maximale Erhöhung der Hemmung um 25% bei  $1 \times 10^{-4}$  mol/l MTX). Ab einer MTX-Konzentration von  $1 \times 10^{-8}$  mol/l war keine Beeinträchtigung der Vitalität der 5637-Zellen mittels MTS nachweisbar. Anhand dieser Untersuchungen ist es möglich, für die Applikation relevante, wirksame MTX-Konzentrationen zu benennen und eine annähernde Übertragung auf die erforderliche Freisetzungskinetik des Pharmakons MTX aus der LDD-Stentbeschichtung vorzunehmen.

Die In-vitro-Freisetzung des Modellzytostatikums Methotrexat zur lokalen Behandlung von Karzinomen über die Implantation eines Stents wurde getestet, indem die mit Methotrexat beschichteten LDD-Stentprototypen über Zeiträume von zunächst bis zu 100 h in Kunsturin eingelagert wurden. Dabei wurde analytisch nachgewiesen, dass das Zytostatikum aus der LDD-Beschichtung in für die Applikation relevanten Dosen freigesetzt wird

(PLLA/MTX 70/30% w/w: Freisetzung von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l MTX nach 96 h; PLLA/MTX 40/60% w/w: Freisetzung von  $1 \times 10^{-4}$  mol/l MTX nach 2 h).

## Diskussion

Zur Beurteilung der durch die entwickelten Stentprototypen hervorgerufenen Gewebereaktionen wurden zunächst für die entsprechende Applikation relevante explantierte Gewebeteile unter Perfusionsbedingungen kultiviert, sodass der originale Zustand unter In-vitro-Bedingungen erhalten blieb. In Folgeuntersuchungen sollen nun gestentete Gewebeschritte in Perfusion kultiviert werden, um die Wirkung der Stents auf die Zellen des Gewebeverbandes beurteilen zu können.

Durch diese In-vitro-Untersuchungen sollen wichtige Informationen zur „Antwort“ kultivierter Gewebe auf die entwickelten Stentprototypen erhalten werden, die für eine Übertragbarkeit auf In-vivo-Bedingungen von Nutzen sind. Die Anzahl an Tierversuchen kann somit drastisch reduziert werden, da wesentliche Erkenntnisse zu den geplanten Polymeren, den Wirkstoffen und den LDD-Stentsystemen bereits durch die dargestellten bzw. beabsichtigten In-vitro-Untersuchungen im Gewebekulturmodell gewonnen werden, die derzeit aus der Literatur für diese Applikationen noch nicht zugänglich sind.

Darüber hinaus werden die entwickelten und hinsichtlich ihrer Gewebereaktion in vitro charakterisierten Stentprototypen im Tiermodell Kaninchen getestet, da komplexere Fragen, wie die nach möglichen Entzündungsreaktionen, nur aus dem In-vivo-Versuch abgeleitet werden können.

## Korrespondierender Autor

**Dr. K. Sternberg**

Institut für Biomedizinische Technik  
der Universität Rostock,  
E.-Heydemann-Straße 6, 18057 Rostock  
E-Mail: katrin.sternberg@chemie.uni-rostock.de

**Interessenkonflikt:** Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

## Literatur

1. Fabian KM (1980) The intra-prostatic „partial catheter“ (urological spiral) (author's transl). *Urologe A* 19: 236–238
2. Pauer W, Kerbl K (1995) Self-expanding permanent endoluminal stents in the ureter: technical considerations. *Tech Urol* 1: 67–71
3. Kempainen E, Talja M, Riihela M (1993) A bioresorbable urethral stent. An experimental study. *Urol Res* 21: 235–238
4. Talja M, Tammela T, Petas A et al. (1995) Biodegradable self-reinforced polyglycolic acid spiral stent in prevention of postoperative urinary retention after visual laser ablation of the prostate-laser prostatectomy. *J Urol* 154: 2089–2092
5. Petas A, Karkkainen P, Talja M et al. (1997) Effects of biodegradable self-reinforced polyglycolic acid, poly-DL-lactic acid and stainless-steel spiral stents on uroepithelium after Nd:YAG laser irradiation of the canine prostate. *Br J Urol* 80: 903–907
6. Dahlstrand C, Grundtman S, Pettersson S (1997) High-energy transurethral microwave thermotherapy for large severely obstructing prostates and the use of biodegradable stents to avoid catheterization after treatment. *Br J Urol* 79: 907–909
7. Petas A, Isotalo T, Talja M et al. (2000) A randomized study to evaluate the efficacy of a biodegradable stent in the prevention of postoperative urinary retention, after interstitial laser coagulation of the prostate. *Scand J Urol Nephrol* 34: 262–266
8. Petas A, Talja M, Tammela TL et al. (1997) The biodegradable self-reinforced poly-DL-lactic acid spiral stent compared with a suprapubic catheter in the treatment of post-operative urinary retention after visual laser ablation of the prostate. *Br J Urol* 80: 439–443
9. Isotalo T, Tammela TL, Talja M et al. (1998) A bioabsorbable self-expandable, self-reinforced poly-L-lactic acid urethral stent for recurrent urethral strictures: a preliminary report. *J Urol* 160: 2033–2036
10. Isotalo T, Talja M, Valimaa T et al. (2000) A pilot study of a bioabsorbable self-reinforced poly L-lactic acid urethral stent combined with finasteride in the treatment of acute urinary retention from benign prostatic enlargement. *BJU Int* 85: 83–86
11. Hölzl F, Pfannschmidt O, Manegold E et al. (2000) In-vitro-Analytik und tierexperimentelle Untersuchung oberflächenmodifizierter biodegradierbarer Polylactidureterstents. *Urologe A* 6: 557–564
12. Nuutinen JP, Valimaa T, Clerc C et al. (2000) Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable knitted stents. *J Biomater Sci Polym Ed* 13: 1313–1323
13. Vaajanen A, Nuutinen JP, Isotalo T et al. (2003) Expansion and fixation properties of a new braided biodegradable urethral stent: an experimental study in the rabbit. *J Urol* 169: 1171–1174
14. Cormio L, La Forgia P, Siitonen A et al. (1997) Immersion in antibiotic solution prevents bacterial adhesion onto biodegradable prostatic stents. *Br J Urol* 79: 409–413
15. Multanen M, Talja M, Hallanvuo S et al. (2000) Bacterial adherence to ofloxacin-blended polylactone-coated self-reinforced L-lactic acid polymer urological stents. *BJU Int* 86: 966–969
16. Isotalo T, Alarakkola E, Talja M et al. (1999) Biocompatibility testing of a new bioabsorbable X-ray positive SR-PLA 96/4 urethral stent. *J Urol* 162: 1764–1767
17. Looz D, Behrend D, Schmitz KP et al. (1996) Entwicklung eines Herstellungsverfahrens für resorbierbare Stents und FEM-Simulation des Verformungsverhaltens. *Biomed Technik* 41, Erg-Bd 1: 586–587
18. Schlun M, Becher B, Martin H et al. (2003) Polymeric Stents: Aspects of structural mechanics in design and development. *Biomed Technik* 48, Erg-Bd 1: 384–385
19. Griffith DP, Musher DU, Itin C (1976) Urease – the primary cause of infection induced urinary stones. *Invest Urol* 13: 346–350