

**Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Radiologische Diagnostik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. D. Claussen**

**Auswirkungen einer Stent-Beschichtung von C1/C3-  
Komplement-Inhibitoren auf die Restenoserate beim Weißen  
Neuseelandkaninchen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Johannes Trück  
aus Karlsruhe**

**2004**

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. G. Tepe

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Schmidt

Meinen Eltern gewidmet



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die In-Stent Restenose .....	2
1.2	Behandlungsmöglichkeiten und Prävention der In-Stent Restenose .....	3
1.3	Local drug delivery .....	4
1.3.1	Drug eluting Stents.....	5
1.4	Fragestellung .....	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1	Tiermodell.....	7
2.1.1	Versuchstiere .....	7
2.1.2	Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau.....	7
2.2	Material .....	9
2.2.1	Katheter .....	9
2.2.2	Stents .....	9
2.3	Methoden .....	18
2.3.1	Präoperative Phase .....	18
2.3.2	Stentimplantation.....	18
2.3.3	Postoperatives Prozedere .....	20
2.4	Blutentnahmen .....	20
2.5	Applikation von 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) und 2'- Desoxycytidin (d-cyt) .....	20
2.6	Entnahme und histologische Aufarbeitung der Gefäßpräparate .....	21
2.6.1	Gefäßentnahme und Perfusionsfixierung .....	21
2.6.2	Vorbereitung der Gefäße.....	22
2.6.3	Einbettung in Paraffin und Schneiden .....	23
2.6.4	Einbettung in Methamethylakrylat und Herstellung von Querschnitten aus Stentsegmenten für die Morphometrie.....	24

2.6.5	Histologische Färbungen.....	25
2.6.6	Immunhistochemische Färbungen.....	26
<b>2.7</b>	<b>Auswertung.....</b>	<b>29</b>
2.7.1	Analyse des Gesamtcholesterins.....	29
2.7.2	Für die Auswertung der Gefäßpräparate verwendete Geräte.....	29
2.7.3	Morphometrische Auswertung.....	30
2.7.4	Bestimmung der Zelldichte und Proliferationsindex.....	31
2.7.5	Histopathologische Beurteilung der Stent- und Aortensegmente .....	32
2.7.6	Meßwertdefinitionen.....	37
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Gesamtcholesterin im Plasma.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Morphometrische Parameter.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Intimafläche.....	41
3.2.2	Stenosegrad.....	44
3.2.3	Mediafläche.....	45
3.2.4	Verhältnis Plaque- zu Mediadicke in den Längsschnitten.....	47
<b>3.3</b>	<b>Quantitative Zellzusammensetzung .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Zelldichte und Verhältnis Zelldichte Stent/Aorta in der Neointima.....	48
3.3.2	Proliferationsindex .....	50
<b>3.4</b>	<b>Histopathologische Beurteilung .....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Ödem.....	52
3.4.2	Schaumzellen.....	53
3.4.3	Fibrose .....	54
3.4.4	Fibrinablagerungen in der Neointima.....	55
3.4.5	Granulozytäre Infiltrate .....	56
3.4.6	Mononukleäre Infiltrate.....	56
3.4.7	Kalzifikationen.....	57
3.4.8	Destruktion elastischer Lamellen .....	58
3.4.9	Atrophie glatter Muskulatur.....	58

---

3.4.10	Vessel Injury Score .....	59
3.4.11	Inflammation Score.....	60
3.4.12	Endothel .....	62
3.4.13	Makrophagen.....	62
3.4.14	Atherosklerosestadien .....	64
3.4.15	Globale Betrachtung der Histopathologie .....	65
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>69</b>
<b>4.2</b>	<b>Material- und Methodenkritik.....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Tiermodell.....	69
4.2.2	Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau.....	73
4.2.3	Material.....	74
4.2.4	Aufarbeitung der Präparate .....	77
4.2.5	Auswertung.....	78
<b>4.3</b>	<b>Bewertung der eigenen Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
4.3.1	Gesamtcholesterin im Plasma.....	78
4.3.2	Morphometrische Ergebnisse.....	79
4.3.3	Quantitative Zellzusammensetzung der Plaques.....	80
4.3.4	Histologische Befunde .....	81
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin converting enzyme
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbachol
ARDS	Adult respiratory distress syndrome (akutes Lungenversagen)
BrdU	5'-Brom-2'-Desoxyuridin
CI	Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor
d-cyt	2'-Desoxycytidin
DNA	Desoxyribonucleid acid (= Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EvG	Elastica-van-Gieson
H	Beschichtung mit Hydrogel
HE	Hämalaun-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IS	Inflammation Score
Ko	Kontrollgruppe (keine Beschichtung)
MAC	Membrane-attack complex (= Membranangriffskomplex)
MG	Molekulargewicht
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Proliferationsindex
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
t-PA	Tissue-plasmin activator (= Gewebs-Plasmin Aktivator)
VIS	Vessel Injury Score
vWF	von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII der Blutgerinnung)

# 1 Einleitung und Fragestellung

Trotz Änderungen im Lebensstil und dem Gebrauch neuerer pharmakologischer Therapiemöglichkeiten bleiben Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer noch die bedeutendste Todesursache in den USA, Europa und dem Großteil Asiens.<sup>1,2</sup> Die Atherosklerose ist die wichtigste sowie häufigste krankhafte Veränderung der Arterien mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung. Die dabei auftretenden atherosklerotischen Läsionen stellen eine Folge hochspezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen dar, welche alles im allem am besten als eine entzündliche Krankheit beschrieben werden können.<sup>3-8</sup> Diese Plaques treten besonders in großen und mittelgroßen elastischen sowie muskulären Arterien auf und können eine Ischämie und möglicherweise einen Infarkt verschiedener Gewebe wie Herzmuskel, Gehirn oder Extremitäten zur Folge haben.<sup>3</sup> Obwohl das ideale Ziel in erster Linie eine Verhinderung der Plaquebildung sein sollte, so wird doch die Therapie der Folgen von Atherosklerose weiterhin eine besondere Rolle spielen, um Symptome zu limitieren und den natürlichen Verlauf dieser Krankheit zu verändern.<sup>9</sup>

Als therapeutische Möglichkeit kommt vor allem der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) eine besondere Bedeutung zu. Bei dieser Art der nichtoperativen Beseitigung kurzstreckiger Gefäßstenosen und -verschlüssen besteht das Prinzip in einer intravasalen Gefäßaufdehnung unter Verwendung von Ballonkathetern. Letztere werden in kollabiertem Zustand im Bereich der Verengung platziert und dort aufgeblasen, wodurch das Gefäßlumen erweitert und dessen Innenwand geglättet wird. Seit ihrer Entwicklung vor mehr als 30 Jahren wurde die PTA-Methode immer weiter verbessert und verfeinert, so dass sie heute als Standardverfahren zur Behandlung symptomatischer arterieller Koronarerkrankungen eingesetzt wird und die alternativen chirurgischen Verfahren weitgehend abgelöst hat. Trotzdem bleibt der Erfolg der alleinigen Ballonkatheterdilatation bis heute durch das häufige Auftreten von Restenosen

limitiert. Diese Komplikation bedeutet eine Wiedereinengung des zuvor erweiterten Gefäßlumens und tritt nach initialem positivem Ergebnis innerhalb von 6-7 Monaten bei 30-40 % der Fälle auf.<sup>10</sup> Diese Zahlenangaben variieren stark je nach Autor und Studie und repräsentieren in genannter Höhe eher die Verhältnisse in Koronargefäßen. In peripheren Arterien, wie z.B. der A. femoralis sind meist noch deutlich höhere Restenoseraten zu erwarten (~ 50 %). Bei der Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten stellte die Entwicklung des Stents im fortwährenden Kampf mit diesem Problem einen enormen Fortschritt dar. Diese scherenrasterartige Endoprothese wird vor der Intervention auf einen Ballonkatheter aufgebracht, dann mit dessen Hilfe an den Ort der Gefäßverengung vorgeschoben und dort durch Aufblasen des Katheters freigesetzt. Dank dieser Methode konnte zum ersten Mal seit Einführung der PTA eine signifikante Reduktion der nach der Prozedur regelmäßig auftretenden Restenose nachgewiesen werden.<sup>11-16</sup>

### 1.1 Die In-Stent Restenose

Stents erhalten ihren positiven Effekt auf die Restenoserate nach PTA durch rein mechanische Mittel. Sie sorgen für ein luminales Gerüst, welches die für die Pathogenese der Restenose nach dieser Prozedur verantwortlich gemachten Gefäßreaktionen („elastic recoil“ und „remodeling“) so gut wie eliminiert.<sup>17</sup> Trotzdem besteht bei Patienten, die einen neuen Stent erhalten, immer noch ein Risiko von 20-30 %, dass ein mit dieser Methode therapeutisch dilatiertes Gefäßstück wieder stenosiert. Die heutzutage in der Praxis eingesetzten unbeschichteten Stents vermindern nicht, sondern erhöhen sogar die proliferative Komponente der Restenose.<sup>18</sup> Dabei ist die vaskuläre Antwort nach Stentimplantation verschieden von der, die nach Angioplastie allein beobachtet wurde. Sie hat einen eher chronischen Verlauf und ist mit einem höheren Verletzungsgrad verbunden, der zu deutlicheren neointimalen Läsionen führt.<sup>18</sup> Diese das Lumen einengende intimale Hyperplasie besteht hauptsächlich aus proliferierenden glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix.<sup>17</sup> Der Großteil der Restenosen tritt innerhalb der ersten drei bis vier Monate nach der

Stentimplantation auf, während dieser Prozess üblicherweise nach sechs Monaten vollständig abgeschlossen ist.<sup>19</sup>

Mittlerweile sind eine Reihe von Variablen bekannt, welche das Risiko einer In-Stent-Restenose erhöhen. Bei Patienten mit Diabetes oder einer Vorgeschichte mit Restenose besteht ein erhöhtes Risiko dieser Komplikation.<sup>20,21</sup> Weiterhin gibt es Hinweise, dass genetische Faktoren<sup>22-25</sup> sowie positive allergische Reaktionen des Patienten auf die Stentkomponenten Nickel und Molybdän eine Rolle spielen könnten.<sup>26</sup> Außerdem wirken sich auf die Rate dieser Therapiekomplikation auch Faktoren aus, die mit der Art und Technik der Stentimplantation in Zusammenhang stehen. Zum Beispiel sind ein langer Stentabschnitt, der Einbau mehrerer Stents oder Läsionen in Gefäßen, die klein oder verschlossen sind, sich am Gefäßausgang oder in Venentransplantaten befinden, assoziiert mit erhöhten Restenoseraten.<sup>27-32</sup> Schlussendlich ist auch der minimale Lumendurchmesser nach Implantation ein wichtiger Parameter mit nachgewiesener Vorhersagekraft für spätere In-Stent Restenoseraten.<sup>33</sup>

## **1.2 Behandlungsmöglichkeiten und Prävention der In-Stent Restenose**

Als rein mechanisches Mittel, eine In-Stent Restenose zu behandeln, besteht die Möglichkeit, den stenotischen Gefäßabschnitt mit Hilfe einer erneuten PTA wieder zu erweitern. Dies ist eine einfache sowie allgemein verfügbare Möglichkeit, wobei üblicherweise der Ausgangsdiameter nach Stentimplantation trotz größerem Ballon und hohem Druck nicht erreicht werden kann.<sup>34</sup> Als attraktive Therapieoption erscheint die Atherektomie, bei der neointimales Gewebe innerhalb des Stents entfernt wird und so ein sofortiger Gewinn im Lumendurchmesser resultiert.<sup>35-37</sup> Jedoch waren die Resultate im Langzeitverlauf trotz initial gutem Ergebnis nicht zufriedenstellend.<sup>38-40</sup> Auf diesen Misserfolg hin erprobte Methoden wie die Laserangioplastie oder der „cutting ballon“ brachten leider ebenfalls nicht den durchschlagenden Erfolg.<sup>41-43</sup>

Ein sehr erfolgsversprechendes Verfahren zur Dezimierung der In-Stent Restenoseraten erscheint die intravaskuläre Bestrahlung mit radioaktiven Substanzen, die sogenannte Brachytherapie. Nach äußerst positiven Befunden in Tiermodellen wurden zahlreiche klinische Studien gestartet, die alle eine signifikante Reduzierung der Restenose nach sechs Monaten aufzeigen konnten.<sup>44-46</sup> Dieser Nutzen scheint jedoch im Langzeitverlauf weniger stabil zu sein. Nach drei Jahren hatten sich die Restenoseraten im Vergleich zur Kontrollgruppe schon angenähert<sup>47</sup>, ferner traten neue unbekannte Komplikationen auf, die mit der Bestrahlung zusammenhingen. Und zwar bildete sich am Rand des bestrahlten Gebietes eine starke Stenose aus, was auch als „candy wrapper effect“ bezeichnet wird.<sup>48,49</sup> Des Weiteren wurde nach dieser Behandlungsweise eine erhöhte Rate später Stentthrombosen beobachtet.<sup>50,51</sup> Darüber hinaus ist sowohl die Frage nach der Art der Strahlung und deren idealen Dosis noch ungeklärt<sup>52</sup> wie auch die Angst vor strahleninduzierten Langzeitkomplikationen noch nicht aus dem Weg geräumt ist.

Die lange Zeit in der Erforschung möglicher Therapiemodelle benutzten konventionellen, systemisch verabreichten Medikamente zeigten in Tierstudien guten Ergebnisse auf, welche aber im allgemeinen beim Menschen nicht bestätigt werden konnten. Dazu gehörten antithrombotische<sup>30,31</sup>, antiproliferative (Trapidil<sup>33</sup> und Angiopeptin<sup>53</sup>) und lipidsenkende<sup>32</sup> Medikamente sowie Vasodilatoren<sup>54</sup> und ACE-Inhibitoren.<sup>55</sup> Ein entscheidender Unterschied zwischen dem erfolgreichen Effekt dieser Substanzen in Tiermodellen und dem Versagen der gleichen Therapien beim Menschen war die Höhe der dabei verabreichten Dosis. Und zwar war es aus Sicherheitsgründen beim Menschen nicht möglich, die erforderliche Menge auf systemischem Weg zu geben, welche für die Hemmung des restenotischen Prozesses von Nöten gewesen wäre. Diese Erkenntnis führte zu der Vorstellung, Medikamente lokal zu verabreichen („local drug delivery“).

### **1.3 Local drug delivery**

Mögliche Vorteile der lokalen Medikamentengabe sind erstens, dass hierbei auch Substanzen verwendet werden können, die unter Umständen bei systemischer Gabe

toxische Nebenwirkungen aufweisen oder nur eingeschränkt verfügbar sind. Zweitens können sie auf diese Weise in systemisch komplikationslosen Mengen gegeben werden, wobei immer noch eine durch die hohe lokale Konzentration ausreichende Wirkung erreicht werden kann. Drittens wird so die Substanz an den Ort gebracht, an dem sie gebraucht wird und schließlich ist diese Art der Therapie wie geschaffen für die Beeinflussung der unterschiedlichen Aspekte des pathologischen Prozesses.

Trotz all dieser Vorzüge tauchen auch hier eine Reihe von Problemen auf. Und zwar stellt sich die Frage nach dem wirksamsten Medikament, der Höhe der Dosis, sowie die Verabreichungstechnik (mikroporöser Ballon oder beschichteter Stent). Ferner sollte das benutzte Medikament möglichst lange an dem gebrauchten Ort gespeichert werden und schlussendlich der Erfolg dieser Therapie auch gemessen und mit anderen Maßnahmen verglichen werden können.

### **1.3.1 Drug eluting Stents**

Die Gabe antirestenotischer Substanzen über den Stent selbst stellt die eleganteste Möglichkeit der lokalen Medikamentenverabreichung zur Prävention der In-Stent Restenose dar und hat eine Reihe von Vorteilen. Wie schon beschrieben, wird dadurch theoretisch eine hohe lokale Konzentration erreicht, ohne dass systemisch wirksame Medikamentenspiegel auftreten, die unerwünschte Nebenwirkungen auslösen könnten. Die benutzte Substanz kann ferner genau an den Ort des Geschehens gebracht werden. Durch Anheftung des Medikaments an den Stent kann die erwünschte Speicherung am Wirkort bewerkstelligt werden, wobei der Stoff nach der Stentimplantation möglichst langsam freigesetzt werden sollte. Das Erreichen eines ausgewogenen Gleichgewichts zwischen Freisetzungsrates und Speicherungsgrad ist dabei von größter Bedeutung. Wirksame Methoden, das gewählte Medikament an den Stent zu binden, sind hierzu erforderlich. Idealerweise sollte die Substanz vom Stent so abgesondert werden, dass sie auch die Gebiete zwischen den Stentstreben beeinflussen kann, was bei kovalent an das Metall gebundenen Substanzen nicht der Fall ist. Alternativ dazu kann ein System benutzt

werden, bei dem das eigentliche Medikament in eine Trägersubstanz eingeschlossen wird, welche dann als Beschichtung für den Stent dient. Diese Medikamentenplattform selbst sollte nicht von sich aus proliferative Effekte auflösen und im Hinblick auf die Restenoserate ein mit dem unbeschichteten Stent vergleichbares Ergebnis liefern.

Schon seit einigen Jahren gilt die Inflammation als wesentlich pathogenetischer Faktor für die Ausbildung einer In-Stent Restenose.<sup>56</sup> Bei der Wahl des Medikaments ist also vor allem auf entzündungshemmende Eigenschaften zu achten. Der unbeschichtete Stent selbst löst eine permanente Fremdkörperreaktion mit Entzündung aus, die wiederum das Entstehen einer das Lumen einengenden intimalen Hyperplasie zur Folge hat.

Ziel unserer Beschichtungsmethode war es, das nach Stentimplantation ablaufende komplexe Geschehen durch Unterbrechung der Komplementkaskade zu beeinflussen. Somit sollte die entstehende Entzündungsreaktion durch eine Modifizierung der Stentoberfläche verhindert oder zumindest gehemmt werden und daraus eine geringere proliferative Gefäßantwort resultieren.

### **1.4 Fragestellung**

Die Hauptfrage, die mit dieser Tierstudie beantwortet werden sollte, war natürlich, ob mit der benutzten Stentbeschichtung eine verminderte Restenoserate erreicht werden konnte. Zusätzlich sollte durch eine ausführliche pathohistologische Betrachtung die Qualität und das Ausmaß der entstandenen Entzündungsreaktion beurteilt und mit den Kontrollgruppen verglichen werden. Ebenso sollte durch die Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stentimplantation eine Auskunft über den Verlauf der entzündlich-proliferativen Gefäßantwort gegeben werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

#### 2.1.1 Versuchstiere

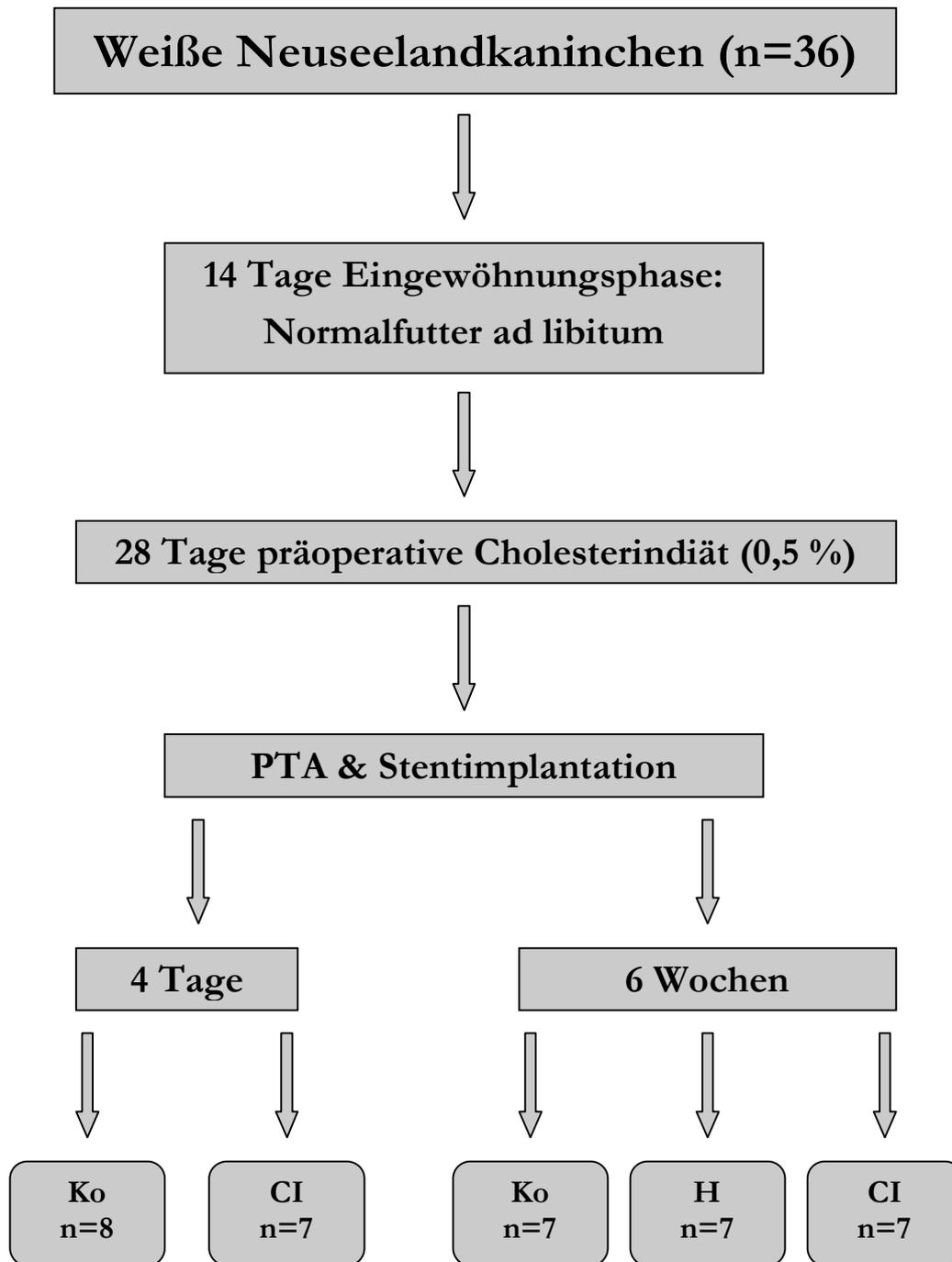
Wir verwendeten für den Versuch 36 männliche weiße Neuseelandkaninchen (Fa. Charles River, Kißlegg), die zum Zeitpunkt der Operation ein durchschnittliches Körpergewicht von  $3,4 \pm 0,3$  kg aufwiesen. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen in den dafür ausgelegten Räumen, wobei durch künstliche Beleuchtung versucht wurde, den natürlichen Tag-Nacht-Zyklus der Tiere aufrechtzuerhalten. Das Weiße Neuseelandkaninchen als Tiermodell wurde 1966 durch Baumgartner erstmals beschrieben und gilt heute als etabliertes und bewährtes Verfahren in der experimentellen Atherosklerose- und Restenoseforschung.<sup>57-60</sup> Unter der Antragsnummer R 4/98 wurde der Versuch von der Tierschutzkommission der Universität Tübingen und dem Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

#### 2.1.2 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Nach einer randomisierten Einteilung der Tiere in fünf Gruppen wurden sie während einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase mit Normalfutter (Altromin, Lage) ad libitum gefüttert. Präoperativ stellte man die Ernährung auf eine 0,5%ige Cholesterindiät (Altromin 2023, Altromin, Lage) um, die sie 28 Tage lang bis zu dem Eingriff erhielten. Während der Operation wurde jedem Tier nach vorhergehender Ballondenudation ein Stent in die infrarenale Aorta eingesetzt. Postoperativ erhielten die Tiere wieder Normalfutter ad libitum, bis sie nach einer Dauer von 4 Tagen ( $n = 15$ ) bzw. sechs Wochen ( $n = 21$ ) abgetötet wurden.

Zu den Einflussgrößen zählten einerseits die Zeit nach der Operation wie auch die unterschiedliche Beschichtung des Stents (keine Beschichtung = Ko; nur Hydrogelbeschichtung = H; Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Esterase-Inhibitor = CI).

Es resultierte folgende Einteilung der Tiere in die verschiedenen Gruppen (Abb.1):



**Abbildung 1.** Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau  
(Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

## 2.2 Material

### 2.2.1 Katheter

Bei der Durchführung der PTA wurden zur vorhergehenden Gefäßdilataion Fogarty® Arterien-Embolektomie-Katheter, Modell 12-060-2F (Baxter, Unterschleißheim) verwendet. Im klinischen Alltag wird dieser Katheter hauptsächlich zur Entfernung von Thromben und Emboli im arteriellen System benutzt.

### 2.2.2 Stents

Als Stents wurden Jostent peripheral® (Jomed International AB, Helsingborg, Schweden) eingesetzt. Diese Stents von der Art eines Palmaz Stent (bestehend aus rostfreiem Stahl) haben eine Länge von 17 mm und können durch Ballondilatation auf einen Durchmesser zwischen 4 und 9 mm gebracht werden. In der Humanmedizin werden diese expandierbaren Gefäßendoprothesen nach erfolgloser PTA in periphere Arterien eingesetzt.

#### 2.2.2.1 Grundlagen des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist Teil des Immunsystems und bildet eine unspezifische Abwehr gegen in den Körper eingedrungene Mikroorganismen und fremde Pathogene. Das Besondere an diesem System ist, dass es auch mit dem spezifischen Immunsystem in Wechselwirkung steht.<sup>61-64</sup>

Grundsätzlich kann das Komplement-System auf drei verschiedene Arten wirken:

- Durch Chemotaxis: Verschiedene Komplement-Faktoren (z.B. C3a, C4a, C5a) können Immunzellen herbeilocken und aktivieren. Diese als Anaphylatoxine bezeichneten Komplement-Spaltprodukte erhöhen außerdem die Gefäßpermeabilität, führen zur Kontraktion glatter Muskelzellen und aktivieren Mastzellen.

- Durch Lyse: Die Bildung eines Membranangriffskomplex (MAC) kann zur Auflösung der attackierten Zelle führen.
- Durch Opsonierung: Eine Anlagerung verschiedener Komplementfaktoren (z.B. C3b) an die Membran des eingedrungenen Mikroorganismus führt zu einer Markierung für phagozytierende Zellen, welche Komplement-Rezeptoren besitzen (z.B. Leukozyten, Makrophagen).

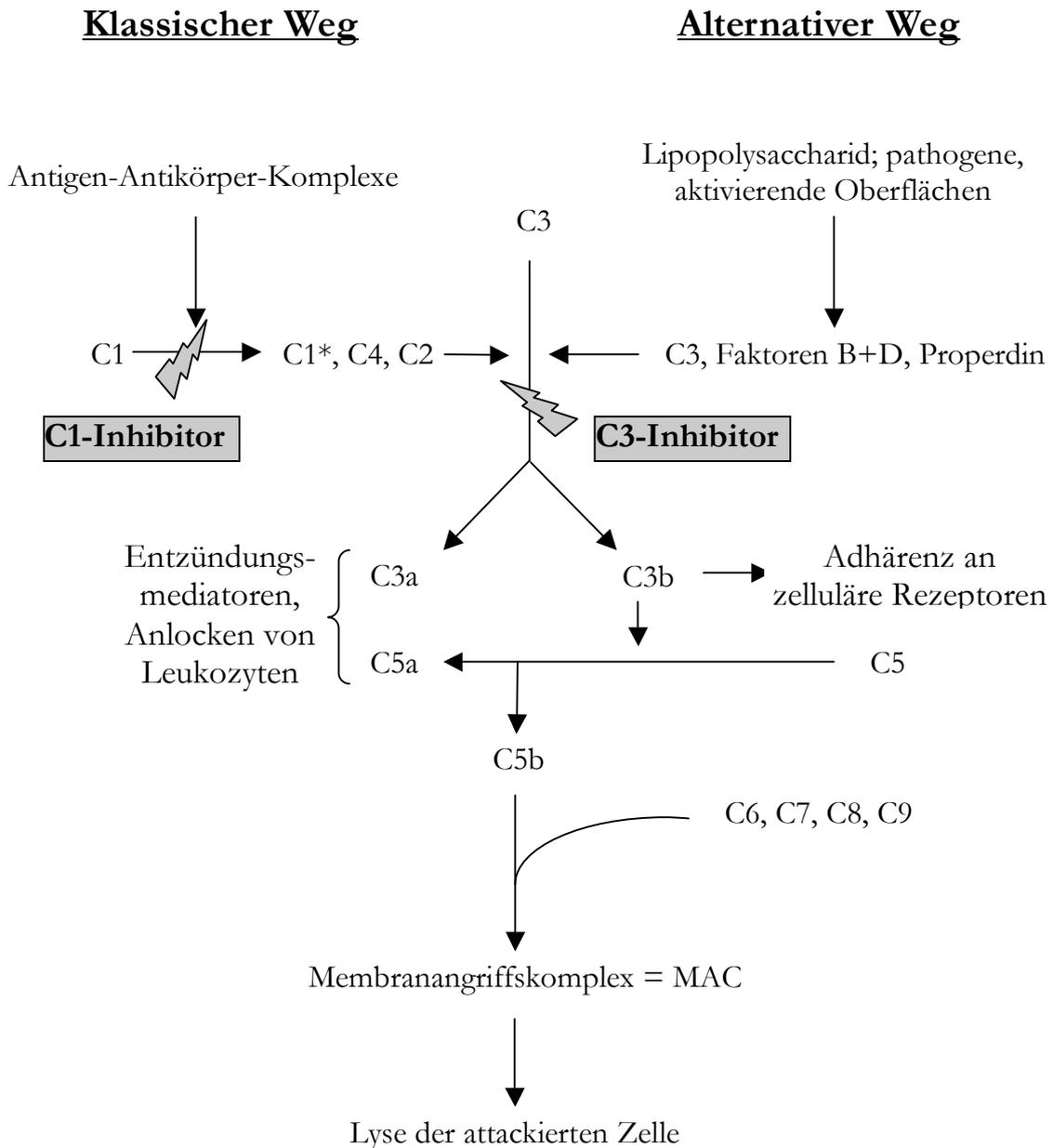
Das Komplementsystem besteht aus rund 20 verschiedenen Proteinasen, den Komplementfaktoren, die hauptsächlich im Blutplasma, aber auch anderen Körperflüssigkeiten vorkommen. Diese Faktoren bilden zwei miteinander verbundene Enzymkaskaden, die als klassischer und alternativer Reaktionsweg bezeichnet werden.

Beim klassischen Aktivierungsweg beginnt die Kaskade lokal und wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe in Gang gesetzt. C1 bindet an mehrere IgG- oder einen pentameren IgM-Antikörper, sofern diese membrangebunden in Form eines solchen Komplexes vorliegen, und wird dadurch aktiviert. In Verbindung mit den Faktoren C4 und C2 bildet sich anschließend aus aktiviertem C1 (C1\*) in einer kaskadenartigen Reaktion die Konvertase des klassischen Weges, welche C3 in C3a und C3b spaltet.

Beim alternativen Reaktionsweg erfolgt eine unspezifische Aktivierung des Systems an der Oberfläche von Fremdkörpern (z.B. Lipopolysaccharid), aber auch durch C-reaktives Protein, das an der Oberfläche von Pilzen und Bakterien gebunden ist (Opsonierung). Im Gegensatz zum klassischen Weg sind bei dieser Aktivierung keine Antikörper beteiligt. C3 reagiert daraufhin mit den Faktoren B und D sowie Properdin, wobei es zur Bildung der Konvertase des alternativen Weges kommt. Wie auch bei der klassischen Reaktionskaskade mündet dieser Weg schließlich in der Spaltung des Komplement-Faktors C3. Dieser zerfällt in zwei Komponenten unterschiedlicher Wirkung. Das kleinere Spaltprodukt C3a fördert zusammen mit den Faktoren C4a und C5a die Entzündungsantwort durch Anlocken von Leukozyten und Mastzellen.<sup>65,66</sup> Damit wirkt das Komplementsystem nicht nur als

humorales Abwehrsystem, sondern zusätzlich auch als Vermittler der zellulären Abwehr. Das größere Spaltprodukt C3b bindet dagegen kovalent auf der Oberfläche der attackierten Zelle und setzt eine erneute Reaktionskette in Gang. Die Komponenten C5-C8 polymerisieren mit C9 und erzeugen schließlich einen röhrenförmigen Proteinkanal in der Zellmembran, welcher zur vollständigen Auflösung der attackierten Zelle führt.<sup>67,68</sup>

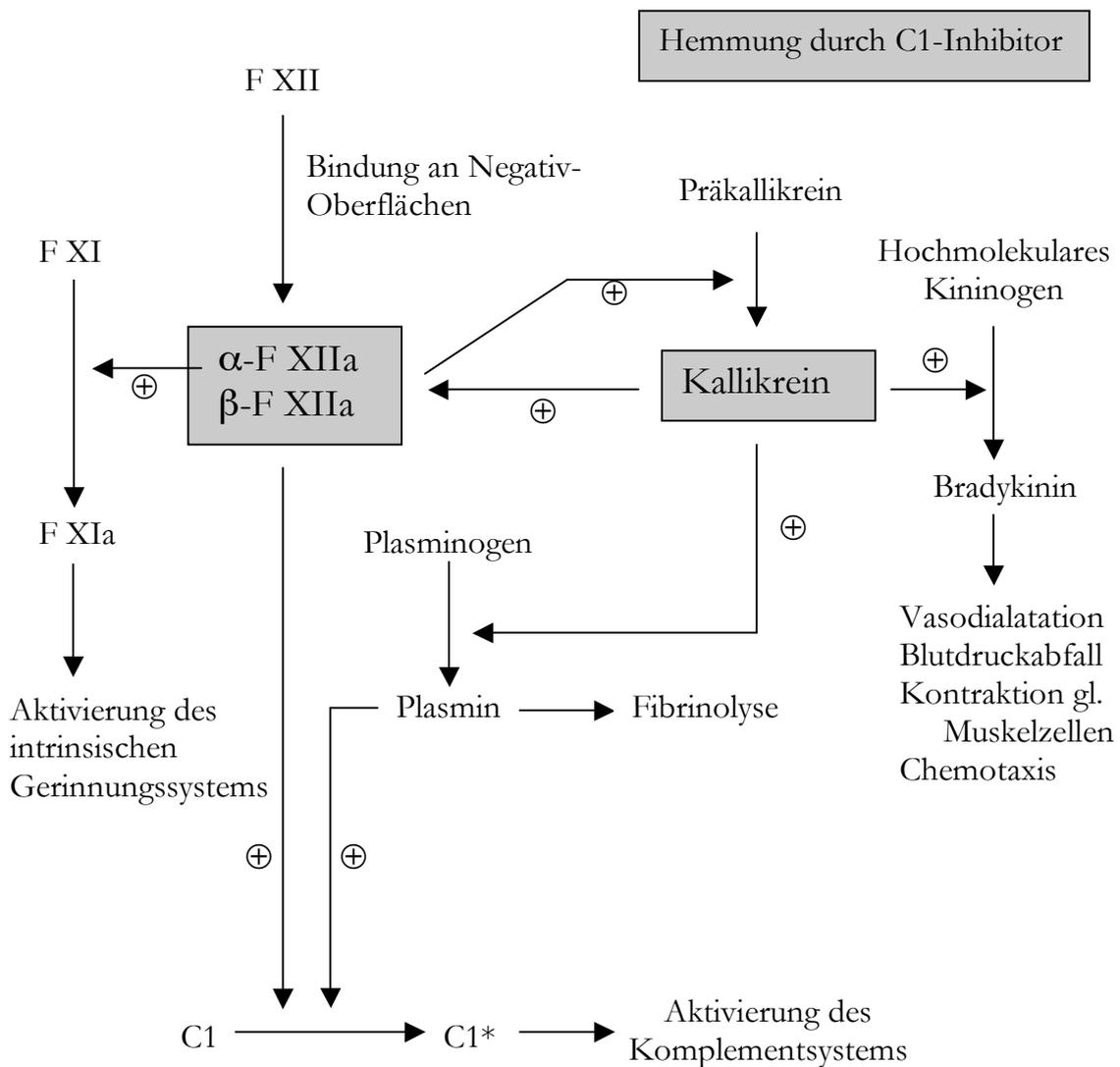
Ein Schema der beiden oben beschriebenen Reaktionswege ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2.** Schema des Komplementsystems mit seinen zwei Aktivierungswegen sowie den Ansatzpunkten der Hemmung durch C1- bzw. C3-Komplement-Inhibitor. Nach einer Aktivierung durch Antigen-Antikörper-Komplexe (klassischer Weg) bzw. der Aktivierung durch pathogene Oberflächen (alternativer Weg) wird als gemeinsame Endstrecke Faktor C3 durch die so auf unterschiedliche Weise entstandene C3-Konvertase in seine zwei Komponenten gespalten. C3a aktiviert zusammen mit C5a die zelluläre Abwehr. C3b aktiviert Faktor C5, was zu dessen Spaltung und Bildung von Fragment C5b führt. Dieses verbindet sich mit den Faktoren C6, C7, C8 und dem polymerisierten Faktor C9, was schließlich in der Bildung des terminalen Lysekomplex (MAC) und der Auflösung der attackierten Zelle endet.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Funktionen besitzt das Komplementsystem noch zahlreiche Interaktionen mit anderen Systemen des Blutes. So gibt es Wechselwirkungen zwischen den Initialphasen der klassischen Komplementaktivierung (C1) und dem Kontaktphasensystem der Blutgerinnung (Faktor XII-Kallikrein-Kinin-System) sowie dem Schlüsselenzym der Fibrinolyse (Plasmin). Ferner führt auch die Aktivierung von Leukozyten zur Aktivierung des Gerinnungs- und Kontaktphasensystems, die ihrerseits wieder in positiver Rückkopplung das Komplementsystem stimulieren. Entstandenes Plasmin kann den ersten Faktor der Komplementkaskade (C1) direkt oder indirekt über die Freisetzung eines Spaltproduktes von Faktors XII ( $\beta$ -F XIIA) aktivieren. Sobald Blut in Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen kommt, zerfällt das Proenzym Faktor XII in seine Fragmente  $\alpha$ - und  $\beta$ -Faktor XIIa, welche wiederum das gesamte Kontaktphasensystem aktivieren. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -F XIIa wandeln Präkallikrein in seine aktive Form Kallikrein um, während  $\alpha$ -F XIIa zusätzlich Faktor XI und damit das intrinsische Gerinnungssystem aktivieren kann. Die zwei F XII-Fragmente sind zudem noch über ihre aktivatorische Potenz auf Faktor VII des Gerinnungssystems, Plasminogen und Faktor C1 mit den anderen hämostaseologischen Systemen verknüpft. Dadurch ist z.B. bei Kontakt des Blutes mit nicht-körpereigenen Stoffen ebenfalls mit einer Komplementaktivierung zu rechnen. Da Kallikrein wiederum  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa aktivieren kann (positives Feedback), kommt es zu einer explosiven Aktivierung von Faktor XII. Kallikrein ist zudem in der Lage, von hochmolekularen Kininogen das Nonapeptid Bradykinin abzuspalten.<sup>69</sup> Dieser Stoff erhöht die Gefäßpermeabilität, bewirkt Blutdruckabfall und die Kontraktion glatter Muskelzellen, regt neutrophile Granulozyten zu Chemotaxis sowie zur Produktion von Elastase und Superoxid an und führt zur Freisetzung des Gewebs-Plasmin Aktivators (t-PA) aus dem Endothelium. Außerdem besitzt Kallikrein über die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin fibrinolytische Qualitäten.

Der Zusammenhang und die Wechselwirkungen der unterschiedlichen Systeme ist in vereinfachter Form in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3.** Zusammenhang der vier eng miteinander verknüpften Regulationskaskaden des hämostaseologischen System des Menschen: Kontaktphasen-System (Faktor XII-Kallikrein-Kinin-System), Gerinnungssystem, Fibrinolyse, Komplementsystem

Macht man sich einmal die zerstörenden Auswirkungen des Komplementsystems bewusst sowie die Art, in welcher seine Aktivierung äußerst schnell durch eine Enzym-getriggerte Kaskade verstärkt wird, so ist es nicht weiter verwunderlich, dass eine Reihe von Mechanismen bestehen, um eine unkontrollierte Aktivierung zu verhindern. Und zwar werden die Wirkmoleküle des Komplementsystems durch die sequentielle Aktivierung aus Vorstufen (Zymogene) erzeugt, welche im Plasma in inaktiver Form vorliegen. Die Aktivierung dieser Zymogene findet normalerweise an einer pathogenen Oberfläche statt, während die gebildeten aktivierten Komplement-Fragmente meist nahegelegenen gebunden oder sehr schnell durch

Hydrolyse inaktiviert werden. Diese zwei Charakteristika der Komplement-Aktivierung dienen als Schutz gegen eine unkontrollierte Aktivierung des Systems. Die potentiell zerstörerisch wirksamen Konsequenzen werden zudem von zahlreichen Kontrollproteinen verhindert, welche die Komplementkaskade an verschiedenen Stellen regulieren. Einer der wichtigsten Inhibitoren des Komplementsystems ist der C1-Inhibitor, welcher auch hemmend auf andere Enzymkaskaden, wie das Kallikrein-Kinin-System, das Gerinnungssystem und die Fibrinolyse, wirkt.

#### **2.2.2.2 Wirkmechanismus des C1- und C3-Komplementinhibitors**

Wie schon bereits dargestellt, gehört der C1-Inhibitor zu dem natürlichen Regulationssystem des Organismus und übt auf die sich sonst unkontrollierbar steigernde Reaktionskaskade eine wichtige hemmende Funktion aus. Er ist jedoch nicht nur der Inhibitor des ersten Komplement-Faktors, sondern hat auch Auswirkungen auf die Kontaktphasenaktivierung (Faktor XII-Kalikrein-Kinin-System). C1-Inhibitor ist der mächtigste Hemmer der Kontaktphase<sup>70</sup> und vermag sowohl 90 % des  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa sowie 80 % des freien Kallikreins durch Komplexierung zu inaktivieren. Die Generierung dieser beiden Serinproteasen stellt das initiale Ereignis beim Kontakt des Blutes mit einer Fremdoberfläche dar. Ihre zentrale Bedeutung resultiert aus ihrer Fähigkeit, sowohl intrinsische Gerinnung, Fibrinolyse, Komplementkaskade und Bradykinin aktivieren zu können, als auch aus Granulozyten einen Elastase-Release zu bewirken.<sup>71</sup> Durch Interaktion von  $\alpha$ -F XIIa mit der Aktivierung des Faktors XI und damit mit dem intrinsischen Gerinnungssystem vermag der C1-Inhibitor auch die Thrombin-Generierung und anschließende Fibrinpolymerisation zu hemmen. Da die Kontaktphasenaktivierung das initiale Ereignis beim Kontakt von Blut mit unphysiologischen Oberflächen ist, könnte eine C1-Inhibitor-Beschichtung die Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche verbessern.

Beim C3-Inhibitor handelt es sich um ein kleines zyklisches Peptid, welches erst vor kurzem durch eine randomisierten Untersuchung Phagen-exprimierender Peptide

entdeckt und isoliert wurde.<sup>72</sup> Dieses später als Compstatin bezeichnete Peptid besteht aus 13 Aminosäuren und bindet reversibel an eine Untereinheit (C3c) von nativem C3, wodurch dessen Spaltung verhindert wird. Durch die zentrale Rolle von Faktor C3 wird auf diese Weise sowohl der klassische als auch der alternative Aktivierungsweg der Komplement-Kaskade gehemmt.<sup>72-75</sup> Mit den beschriebenen Eigenschaften lässt sich gut vorstellen, dass C3-Inhibitor in klinischen Situationen von therapeutischem Nutzen sein könnte, welche einen Komplement-vermittelten Gewebedefekt zur Folge haben.<sup>72,73</sup> In bereits durchgeführten Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Komplement-Aktivierung *in vitro* durch Compstatin gehemmt wird.<sup>72</sup> Ferner ließ sich zeigen, dass auch in Modellen für extrakorporelle Kreisläufe<sup>76</sup>, bei der Xenotransplantation von Nieren<sup>77,78</sup>, sowie in Situationen, die typisch für einen herzchirurgischen Eingriff sind<sup>79</sup>, Compstatin die Aktivierung des Komplementsystems verhindern oder zumindest inhibieren kann. Hinzu kommt, dass Compstatin keine Zytotoxizität zu besitzen scheint, da es nur wenig bzw. keine Hemmung der Gerinnung zeigt.<sup>80</sup>

Mit diesem Hintergrund ist die Beschichtung mit einem C3-Inhibitor interessant, da damit sowohl die humorale als auch zelluläre Immunabwehr gegen ein Implantat reduziert werden kann und gleichzeitig keinerlei Nebenwirkungen zu erwarten sind.

### **2.2.2.3 Beschichtung der Stents**

Den Tieren der Kontrollgruppen wurden handelsübliche fabrikneue Stents implantiert. Im Gegensatz dazu wurde bei den Stents der H- sowie der Therapiegruppen eine Beschichtungsmethode angewandt, die ursprünglich für die Herz-Thorax-Chirurgie entwickelt wurde, um die Hämokompatibilität von extrakorporalen Kreisläufen zu verbessern. Beim Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen kommt das gesamte Blut des Patienten mit extrem viel Fremdoberfläche in Berührung, worauf der Organismus mit einer massiver Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr reagiert. Neben der Aktivierung von Gerinnung und Fibrinolyse tritt eine unspezifische Entzündungsreaktion auf, die zu einem sogenannten „post-perfusion syndrome“ führt, welches bis hin zum „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS), akuten Lungenversagen (ARDS = adult

respiratory distress syndrome), Sepsis und Multiorganversagen eskalieren kann.<sup>81,82</sup> Die zur Verhinderung oder zumindest Abschwächung dieser Komplikationen entwickelte Beschichtung enthält eine dem C1-Inhibitor ähnliche Substanz sowie die aktive Sequenz eines C3-Inhibitors. Es wurden dazu Peptidsequenzen mit einer Größe von < 20 Aminosäuren verwendet.

Diese Substanzen wurden jedoch nicht direkt an die Oberfläche des Stents gebunden, sondern mit Hilfe des Hydrogels Polyvinylpyrrolidone = PVP (K 90, Kollidon® BASF Ludwigshafen, Deutschland) über UV-Polymerisation immobilisiert. Dieses Verfahren hat zum Vorteil, dass über einen langen Zeitraum parallel zum Abbau des Hydrogels ein Ausbluten der Wirksubstanzen stattfindet (slow drug release). Nach der Implantation des Stents wird das PVP zusammen mit den Wirkstoffen von Enzymen im Blut abgebaut, wodurch eine langsame Freisetzung des Medikaments erreicht werden soll.<sup>83-85</sup>

Die eigentliche Beschichtung der Stents erfolgte im sogenannten Dipping- (Eintauch-) Verfahren. Zur Herstellung der Dipping-Lösung wurden 500 µg C1-Peptid sowie 500 µg C3-Peptid jeweils in Pulverform in 2 ml 10%iger wässriger PVP K 90-Lösung gegeben. Ein Initiator (4,4'-Diazidostilbene-2,2'-disulfonic acid Disodium salt Tetrahydrate, Fluca: 33483) wurde in 0,5%iger Form kurz vor der Beschichtung in die PVP K 90-Lösung gegeben (entspricht 0,01 g in 2 ml).

In diese so vorbereitete Beschichtungslösung wurde der Stent ca. drei Sekunden eingetaucht, dann bei 37°C drei Stunden lang getrocknet. Anschließend bestrahlte man den Stent jeweils von der Vorder- und Hinterseite zwei Minuten lang mit UV-Licht, was eine Photopolymerisation des Hydrogels auslöst. Durch diese Art der Behandlung vernetzen sich die einzelnen 90 kDa-Bausteine des PVP zu einem großen Netz, was einen einigermaßen einheitlichen Beschichtungsfilm über den gesamten Stent hinweg gewährleisten soll.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Präoperative Phase

Während einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase erhielten die Kaninchen Normalfutter (Altromin, Lage) ad libitum, bis die Ernährung der Tiere 28 Tage vor dem operativen Eingriff auf eine Cholesterindiät mit 0,5 % Cholesterin im Futter (Altromin 2023, Altromin, Lage) umgestellt wurde. 24 Stunden vor der Intervention erhielten sie zur Thromboseprophylaxe 30 mg Acetylsalicylsäure (Aspisol, Bayer AG, Leverkusen) in die Glutealmuskulatur injiziert. Ab diesem Zeitpunkt wurde ihnen das Futter entzogen, Wasser stand ihnen aber weiterhin unbegrenzt zu Verfügung.

### 2.3.2 Stentimplantation

Vor der Operation wurde den Tieren zur Narkotisierung und Analgesierung 4 ml eines Narkosegemisches aus Ketamin (Ketanest® 50, Parke-Davis, Berlin), Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer AG, Leverkusen) und Atropinsulfat (Atropinsulfat 0,5 mg, Braun, Melsungen) im Verhältnis 28 : 12 : 1 in die Glutealmuskulatur injiziert. Diese Mixtur führte bei den Tieren zu einer Vollnarkose mit völliger Schmerzlosigkeit und Muskelrelaxation, wobei Atropinsulfat die Salivation und mögliche kardio- bzw. atemdepressive Effekte verhindern soll.

Nach Erreichen der Narkose wurde den Kaninchen die rechte Leistenregion rasiert, mit Betaisodona-Lösung desinfiziert und das Operationsgebiet steril abgedeckt. Nach Palpation der Arterie wurde der ca. 3 cm lange Hautschnitt direkt über dem Verlauf der Arteria femoralis dextra gesetzt. Mittels stumpfer Präparation und Spaltung der darüber liegenden Muskulatur wurde der femorale Gefäßnervenstrang in seiner Muskelloge dargestellt. Die umhüllenden Faszie wurde eröffnet, um anschließend die Arterie von der Vene und dem Nervus femoralis zu trennen und freizulegen. Das danach gut sichtbare und zugängliche Gefäß wurde an beiden Enden mit einem Faden (Perma-Hand Seide® 2-0, Ethicon, Brüssel, Belgien) umschlungen, um so eine Möglichkeit zur Unterbindung haben zu können. Durch

einleitendes distales und folgendes proximales Setzen einer mikrochirurgischen Gefäßklemme (Yasargil-Phynox Aneurysma-Clip, Aesculap AG, Tuttlingen) konnte in dem gewünschten kurzen Gefäßstück eine optimale Blutfüllung erzielt werden. Die anschließende mikrochirurgische Inzision von 1,5 mm Länge eröffnete das Gefäß und schuf so einen Zugang für Katheter und Schleuse. Ein 2F-Fogarty® Arterien-Embolektomie-Katheter (Baxter, Unterschleißheim) wurde über die Öffnung eingeführt, die proximale Gefäßklemme entfernt, und der Katheter dann bis zur suprarenalen Aorta vorgeschoben. Unter geringem Druck konnte die Inflation des Ballons mittels einer mit 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung gefüllten 1-ml-Spritze erreicht werden. Durch dreimaliges Zurückziehen des inflatierten Ballons wurde das Gefäß mechanisch denudiert und dilatiert. Daraufhin konnte die Schleuse (5F Avanti, Cordis, Warren, USA) in der Arterie platziert werden.

Der auf einen Angioplastie-Katheter (Diameter 4 mm, Länge 2 cm, Savvy, Warren, USA) von Hand gecrimpte Stent wurde dann über die Schleuse in das Gefäß eingeführt. Die Dilatation aller Stents erfolgte ohne vorab angefertigte Angiographie auf 4 mm, da Angiographien früherer Studien gezeigt hatten, dass der Gefäßdiameter in diesem Bereich keine größeren Schwankungen aufweist. Nach Erreichen der infrarenalen Aorta abdominalis wurde der Angioplastie-Ballon unter Röntgenkontrolle 20 Sekunden lang auf einen Druck von 7-8 atm inflatiert, es folgte eine 20 Sekunden dauernde Deflation. Mit Hilfe eines Manometers (LeVeen inflator, Boston Scientific, Natick, MA) konnte der Inflationsdruck optimal gesteuert werden und schließlich durch den benutzten Ballon mit vorgegebenem Diameter ein Verhältnis Stent zu Arterie von ca. 1,2 : 1 erreicht werden.

Nachdem der Katheter und die Schleuse aus dem Gefäß entfernt worden waren, konnte die proximale Gefäßklemme wieder gesetzt werden. Anschließend wurden die Klemmen durch Ligaturen aus Haltefäden ausgetauscht. Eine evtl. notwendige Muskelnahrt erfolgte fortlaufend (Vicryl® Faden 2-0 SH, Ethicon, Brüssel, Belgien), während die Hautnaht mit Einzelkopf-Rückstichnähten nach Donati bewerkstelligt wurde (Vicryl® Faden 3-0 FS-2, Ethicon, Brüssel, Belgien).

Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurden im Laufe des operativen Eingriffes regelmäßig Atmung und Kornealreflex des Tieres kontrolliert, um bei Bedarf weiteres Narkosegemisch intramuskulär applizieren zu können.

### **2.3.3 Postoperatives Prozedere**

Um möglichen Thrombose-Komplikationen vorzubeugen, wurde den Tieren direkt nach der Operation subkutan 900 I.E. Standard-Heparin / kg Körpergewicht (Liquemin® N25000, Roche, Basel, Schweiz) und intramuskulär 30 mg Acetylsalicylsäure (Aspisol, Bayer AG, Leverkusen) injiziert. Gleiche Mengen erhielten die Tiere alle 12 Stunden während der nächsten drei postoperativen Tage. Ab dem vierten Tag nach dem Eingriff bekamen sie bis zum Versuchsende jeden dritten Tag 60 mg Acetylsalicylsäure.

Nach der Operation wurde die Ernährung aller Tiere wieder auf Normalfutter (Altromin, Lage) ad libitum umgestellt und eine tägliche Untersuchung mit Inspektion der Operationswunde vorgenommen.

## **2.4 Blutentnahmen**

Den narkotisierten Tieren wurde bei der Operation über die Schleuse aus der Arteria femoralis sowie bei Versuchsende durch intrakardiale Punktion jeweils ca. 4 ml Blut entnommen. Diese Blutproben konnten dann zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels zum Zeitpunkt der Operation und des Abtötens verwendet werden.

## **2.5 Applikation von 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) und 2'-Desoxycytidin (d-cyt)**

Achtzehn Stunden vor dem Abtöten wurden die Tiere, wie schon unter Kapitel 2.3.2 beschrieben, erneut narkotisiert, ihnen anschließend der Nacken rasiert und dort ein Hautschnitt von ca. 3 cm Länge gesetzt. Im darunter liegenden Fettgewebe konnten durch stumpfes Präparieren zwei Nackentaschen freigelegt werden, in die 100 mg BrdU / kg Körpergewicht und 75 mg d-cyt / kg Körpergewicht verteilt

wurden. Zum gleichen Zeitpunkt und ebenso zwölf Stunden vor der Gefäßentnahme erhielten die Tiere eine intramuskuläre Injektion von 30 mg BrdU/kg Körpergewicht und 25 mg d-cyt/kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung, die wegen des lokal reizenden Effektes dieser Stoffe gleichmäßig auf beide Seiten der Glutealmuskulatur verteilt wurde.

Diese hier angewendete fraktionierte, intramuskuläre und subkutane Applikation über 18 Stunden gewährleistet einen ausreichenden Wirkspiegel über den gesamten Zeitraum bis zur Perfusionsfixierung.<sup>86</sup> BrdU, eine Thymidin-analoge Substanz, wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und kann so in einer Farbreaktion (Kapitel 2.6.6.4), der Avidin-Biotin-Methode, für die histologische Auswertung sichtbar gemacht werden. Um eine ausreichende BrdU-Resorption nachzuweisen, wurden beim Zeitpunkt der Gefäßentnahme zusätzlich als Kontrolle Teile des Dünndarms entnommen und in deren histologischen Schnitten die Proliferationsrate der Mukosazellen geprüft.

## **2.6 Entnahme und histologische Aufarbeitung der Gefäßpräparate**

### **2.6.1 Gefäßentnahme und Perfusionsfixierung**

Durch intrakardiale Applikation von 2 ml T 61 (Hoechst Veterinär GmbH, Unterschleißheim) wurden die Tiere unter Narkose (8 ml des Narkosegemisches, vgl. Kapitel 2.3.2) abgetötet. T 61 ist ein Gemisch aus Embutramid, Mebezoniumjodid und Tetracainhydrochlorid im Verhältnis 40 : 10 : 1 und wird in der Veterinärmedizin zur exzitationslosen Tötung von Tieren verwendet. Embutramid hat dabei eine stark narkotisierende Wirkung auf das Atemzentrum, während Mebezoniumjodid eine Lähmung der quergestreiften Muskulatur hervorruft und zu einem schnellen Kreislaufkollaps führt.

Nach Abtötung der Tiere erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes durch eine Laparotomie und die Freipräparation der Aorta über ihre gesamte Länge. Anschließend wurde die infrarenale Aorta mit Stent gemeinsam mit dem distalen nativen Aorten-Abschnitt bis zur Bifurkation entnommen. Direkt nach der

Entnahme wurden die so gewonnenen Präparate mit einer Lösung gespült, um eine Perfusionsfixierung zu erreichen. Die dafür verwendete Lösung bestand aus einer mit 0,1 molarem Cacodylat (Dimethylarsäure, MG = 214,13 g, pH 7,4) gepufferten 2%igen Paraformaldehydlösung.

Wie schon in Kapitel 2.5 beschrieben, wurde zusätzlich noch ein Stück Dünndarm entnommen, welches als Positivkontrolle für den erfolgreichen Einbau von BrdU in proliferierendes Gewebe diente. Alle entnommenen Gewebeteile wurden anschließend einer mindestens 24 Stunden dauernden Immersionsfixation unterzogen, wozu eine mit 0,1 molarem Cacodylat (Dimethylarsäure, MG = 214,13 g, pH 7,4) gepufferte 2%ige Paraformaldehydlösung benutzt wurde.

### **2.6.2 Vorbereitung der Gefäße**

Erst befreite man die in Formaldehyd fixierten Gefäße von noch vorhandenem Bindegewebe. Mit einem Antriebsgerät aus der Dentaltechnik (Modell C1 Junior, Georg Schick Dental GmbH, Schemmerhofen) und einer rotierenden Trennscheibe (Diamant Instrumente Horico, Modell H 355 C190, Hopf. Ringleb & Co., Berlin) wurde folgend das Aortenstück mit Stent in der Mitte geteilt, danach verlief die Weiterverarbeitung der beiden Teile unterschiedlich.

Es wurden zwei verschiedene Arbeitsmethoden angewandt: die Einbettung der Gefäßpräparate in Paraffin (Kapitel 2.6.3) und in Methamethylakrylat (Kapitel 2.6.4). Dabei dienten die Paraffinschnitte zur Durchführung von histologischen und immunhistochemischen Färbungen, wobei die Plastikeinbettungen zur Morphometrie verwendet wurden. Trotz äußerst behutsamer Entfernung der Stentstreben aus den Präparaten konnte bei der Paraffinmethode nicht immer verhindert werden, dass Anteile der Neointima abrissen. Deshalb war die Einbettungsmethode in Methamethylakrylat von Nöten, um eine zuverlässige Morphometrie dieser Schnitte möglich zu machen. Vorteil der Plastikeinbettung war dabei, dass sie mit belassener Stentstrebe und damit ohne Risiko der Zerstörung der intimalen Hyperplasie durchgeführt werden konnte. Aufgrund der größeren Dicke (70-80  $\mu\text{m}$ ) und der Eigenschaften des Einbettungsmediums waren jedoch bei dieser

Methode keine genauen histopathologischen und immunhistochemischen Betrachtungen möglich.

### **2.6.3 Einbettung in Paraffin und Schneiden**

Unter einer Lupe wurden von dem proximalen Teilstück, beginnend an der ursprünglichen Mitte, mit der rotierenden Trennscheibe zwei ca. 0,1 cm breite Stücke abgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte an der Kreuzungsstelle der Stentstreben gesetzt wurden, um die nachfolgende vorsichtige Entfernung der Streben zu erleichtern. Die sich an das distale Teilstück anschließende native Aorta wurde mit einem feinen Skalpell 0,5 cm unterhalb des Stents in zwei ca. 0,2 cm breite Stücke geschnitten.

Alle Gefäßsegmente und die Dünndarmstücke wurden daraufhin in Biopsiekassetten eingeschlossen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-99 %) entwässert. Anschließend wurden die Präparate dreimal (1h, 15h und dann für mindestens 24h) in Methylbenzoat® (Fa. Merck, Darmstadt) und zweimal für 10 min in Rotihistol® (Fa. Roth, Karlsruhe) eingetaucht, um danach in Paraffin (Paraplast®, Fa. Sherwood, St. Louis, USA) eingebettet zu werden.

Mit Hilfe eines Mikrotoms (Modell Jung RM 2045, Leica, Wetzlar) wurden aus diesen eingebetteten Präparaten Semidünnschnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt, diese Querschnitte dann auf einen Objektträger (76 x 26 mm, Menzel, Darmstadt) aufgebracht und in Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingelagert.

Bis auf die für die Morphometrie benötigten Querschnitte der Stentsegmente wurden diese Paraffinschnitte für alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen verwendet.

#### **2.6.4 Einbettung in Methamethylakrylat und Herstellung von Querschnitten aus Stentsegmenten für die Morphometrie**

Die folgende Vorgehensweise beschreibt das Verfahren der Trenn-Dünnschliff-Technik.<sup>87</sup>

Das distale Stentsegment mit sich anschließender nativer Aorta entwässerte man über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, jeweils 1 Tag). Bei dieser Methode wurden die Stentstreben nicht entfernt. Anschließend erfolgte die Infiltration mit einem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff, bestehend aus einem Gemisch mit 100%igem Alkohol und Methamethylakrylat (MMA, Technovit 7200, Kulzer, Friedrichsdorf). Während in der ersten Stufe Alkohol und Methamethylakrylat im Verhältnis 70 : 30 benutzt wurden, mischte man die beiden Komponenten in der zweiten Stufe im Verhältnis 50 : 50 und in der dritten Stufe im Verhältnis 30 : 70. Danach folgten zwei Reihen mit reinem Methamethylakrylat, wobei jede Reihe 48 Stunden dauerte. Die Polymerisation und Aushärtung führte man in Einbettmulden durch, welche mit Methamethylakrylat aufgefüllt wurden.

Nach einer Dauer von 4 Stunden erreichte man bei einer Wellenlänge von 400-500 nm die Polymerisation im Exakt-Kulzer Lichtpolymerisationsgerät (Kulzer, Friedrichsdorf). Ein Objektträger wurde mit einem schnellhärtenden, kaltpolymerisierenden Dreikomponentenkunststoff (Technovit 4000, Kulzer, Friedrichsdorf) aufgeklebt, wobei anschließend von dem entstandenen Block eine ca. 200 µm dicke Scheibe abgetrennt wurde. Dies erfolgte durch ein mit Diamanten besetztes Trennband im Exakt-Trennschliffsystem (Exakt Apparatebau, Norderstedt) mit Vorschubkräften zwischen 50 und 100 Pond. In einem mikroparallel arbeitenden Schleifsystem (Exakt Apparatebau, Norderstedt) wurden die Kunststoffblöcke auf eine Dicke von ca. 79-80 µm geschliffen und die entstandenen Querschnitte auf Objektträger (76 x 26 mm, Menzel, Darmstadt) aufgebracht. Die Körnung des verwendeten Sandpapiers variierte von 1200 bis 2000. Abschließend wurden die Präparate mit Hämalaun-Eosin sowie Elastika-van-Gieson angefärbt und dann in Gelatine (Aquatex Merck 8562, Merck, Darmstadt) eingebettet.

Zusätzlich zu den Querschnitten wurden mit der gleichen Methode noch Längsschnitte angefertigt, die einen besseren Einblick in die Vorgänge am Übergangsbereich zwischen Stent und nativer Aorta ermöglichten. Mit Hilfe dieser Präparate konnte diese Region auf einen möglichen Edgeeffekt optimal untersucht werden.

## **2.6.5 Histologische Färbungen**

Im folgenden werden die histologischen Färbungen Hämalaun-Eosin (HE) und Elastika-van-Gieson (EvG) beschrieben. Vor der Durchführung dieser beiden Verfahren war zuerst eine Entparaffinierung durch Xylol sowie eine Entwässerung in einer absteigenden Alkoholreihe (100-70 %) notwendig.

### **2.6.5.1 HE-Färbung**

Zur Beurteilung der morphologischen Strukturen wurde eine Standard-Färbung mit Hämalaun und Eosin durchgeführt, bei der sich die Zellkerne blau und das Zytoplasma sowie die Interzellulärsubstanz rosa darstellen.

Für die Kernfärbung tauchte man die entparaffinierten Schnitte fünf Minuten in Mayers Hämalaun-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt), anschließend wurden sie zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und fünf Minuten in Eosin (Fa. Sigma, Deisenhofen) gegengefärbt. Zum Schluss wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, einige Minuten in Xylol belassen, und dann in Eukitt (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

### **2.6.5.2 EvG-Färbung**

Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne dunkelblau bis schwarz und elastische Fasern dunkelviolet bis schwarz dar, wobei Bindegewebe leuchtend rot und Muskulatur gelb erscheint.

Dazu wurden die entparaffinierten Gefäßschnitte 30 Minuten in Resorcinfuchsin (Chroma Gesellschaft, Köngen) getaucht und konnten dann, nach Spülen mit 80%igem Alkohol und H<sub>2</sub>O, sechs Minuten mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen) gefärbt werden. Anschließend an eine zehnminütige

Differenzierung in HCl-Alkohol wurden die Präparate unter fließendem Wasser gebläut und nach erneutem Spülen mit H<sub>2</sub>O etwa zwei Minuten lang in van-Gieson-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen) belassen. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nachfolgend wurden die gefärbten Schnitte kurz in Xylol getaucht und abschließend in Vitro Clud (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

## **2.6.6 Immunhistochemische Färbungen**

### **2.6.6.1 Grundlagen**

Für die Darstellung von Endothel, Makrophagen, und proliferierenden Zellen wurde das entsprechende Merkmal mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt. Es wurde dabei die Avidin-Biotin-Methode angewendet, um den Nachweis der verschiedenen Antikörper zu erbringen.<sup>88-90</sup> Diese Methode ermöglicht es, gesuchte Antigene durch Bindung spezifischer Erst- und Zweit-Antikörper anzufärben und dadurch der Auswertung unter dem Lichtmikroskop zugänglich zu machen.

Nach primärer Entparaffinierung, Blockierung der endogenen Peroxidase und Auftragen von Normalserum besteht das Prinzip dieser Arbeitsweise darin, die Gefäßschnitte mit dem Erst-Antikörper zu inkubieren, der an das spezifische Antigen bindet. Anschließend wird ein Biotin-konjugierter Zweit-Antikörper zugegeben, der gegen den Erst-Antikörper gerichtet ist. Wird nun ferner ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (ABC) beigelegt, so bindet sich das Avidin des Komplexes mit außergewöhnlich hoher Affinität an das Vitamin Biotin des Zweit-Antikörpers. Der im folgenden aufgetragene AEC-Komplex dient schließlich als Substrat für die mit dem Avidin-Biotin-Komplex konjugierte Peroxidase, wobei als Produkt der so möglichen Reaktion ein rosaroter Farbstoff und H<sub>2</sub>O entsteht.

Im Einzelnen lassen sich folgende vorgenommene Arbeitsstufen unterscheiden:

Zuerst wurden die Gefäßpräparate schrittweise in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe (100-70 %) entparaffiniert, worauf eine kurze Spülung in Aqua bidest.

folgte. Nach einer 20 Minuten dauernden Erhitzung der in Zitratpuffer getauchten Schnitte bei 750 Watt in der Mikrowelle, wurden sie im Eisbad wieder auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase beließ man die Präparate anschließend 30 Minuten in einem mit 30%igem Hydrogenperoxid versetzten PBS-Puffer<sup>a</sup>. Nach jedem der bisher beschriebenen Arbeitsschritte wurde eine zehnminütige Spülung der Schnitte in PBS-Puffer vorgenommen, welcher vorher auf einen pH von 7,4 austitriert worden war. Um unspezifische Bindungen im Gewebe zu blockieren, inkubierte man die Präparate in der Regel vor dem Auftragen des Erst-Antikörpers mit Normal Horse Serum (Vectastain ABC-Kit, Mouse IgG, PK-4002, Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) über zehn Minuten bei 37°C im Brutschrank.

Als Nächstes wurden der Erst- und Zweit-Antikörper und anschließend der ABC- (Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Goat IgG, Pk-4005; Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) und AEC-Komplex (Vector Peroxidase Substrat Kit AEC, SK 4200; Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) zugegeben, wobei zwischen dem Auftragen der einzelnen Substrate die Schnitte mit PBS-Puffer gespült wurden. Diesem Puffer mit pH 7,4 fügte man zur Herabsetzung der Oberflächenspannung das Detergenz Tween 20 (Fa. Merck, Schuchardt) hinzu.

Nach regelmäßiger Kontrolle der Farbtintensität unter dem Lichtmikroskop wurde die Färbung schließlich durch zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer zu Ende gebracht. Die Gegenfärbung konnte durch kurzes Eintauchen in Mayers Hämalaun-Lösung erreicht werden, anschließend wurden die Gefäßschnitte in Gelatine (Aquatex, Merck 8562) eingebettet.

Das hier beschriebene Verfahren wurde mit geringfügigen Abweichungen bei allen immunhistochemischen Färbungen angewendet, wobei auf die Besonderheiten bei einzelnen Färbungen im Folgenden näher eingegangen wird. Die genauen Angaben zu den Primär- und Sekundär-Antikörpern sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

---

<sup>a</sup> 150 ml PBS-Puffer + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)

1 l PBS-Puffer = 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Aqua bidest.

### **2.6.6.2 Endothel-Färbung**

Bei dieser Färbung wird der vom Endothel gebildete von-Willebrand-Faktor (vWF) rotbraun markiert, für dessen immunhistochemischen Nachweis die Schnitte vor der chemischen Entparaffinierung über 30-60 Minuten bei 60°C im Brutschrank thermisch vom Paraffin befreit wurden. Ebenfalls abweichend vom oben beschriebenen Schema tauchte man die Präparate anschließend zur Erhitzung in der Mikrowelle in Enhancer-Lösung (Histosafe-Enhancer, Linaris, Wertheim-Bettingen) statt in Zitratpuffer. Möglicherweise waren zuvor durch die Formalin-Fixierung Quervernetzungen entstanden, welche die zu markierenden Antigene maskieren können. Die Enhancer-Lösung bricht dabei diese Vernetzungen auf und macht so die Antigene der Antikörperbindung wieder zugänglich.

### **2.6.6.3 RAM 11-Färbung**

Zur Darstellung der Makrophagen und Schaumzellen wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch gegen das Zytoplasma von Kaninchen-Makrophagen gerichtet ist.<sup>91</sup> Dieser Antikörper reagiert mit einem zytoplasmatischen Antigen in den Makrophagen.

### **2.6.6.4 BrdU-Färbung**

Wie schon in Kapitel 2.5 beschrieben, ist es mit dieser Methode möglich, proliferierende Zellen durch einen immunologischen Nachweis von BrdU dazustellen.<sup>92</sup> Der dabei detektierte Stoff wird nur von Zellen exprimiert, die sich in der S-Phase (Synthese-Phase) des Zellteilungszyklus befinden. Als Primärantikörper diente hier anti-BrdUrd-DNA (Bio Cell Consulting, Laufen, Schweiz), ein monoklonaler Antikörper, der gegen das in die DNA proliferierender Zellen eingebaute BrdU gerichtet ist.<sup>90</sup>

Um die Vernetzung des Formaldehyds mit den entsprechenden Antigenstellen zu lösen, war bei dieser Färbung ebenfalls eine Andauung des Gewebes notwendig. Dies wurde dadurch verwirklicht, dass die Schnitte erst bei 37°C für genau

siebeneinhalb Minuten in 0,1%iger PBS-Protease-Lösung und nachfolgend bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 1 N HCl-Lösung inkubiert wurden.

**Tabelle 1.** Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

<b>Färbung</b>	<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Sekundär-Antikörper</b>
vWF	Monoclonal Mouse Anti-Human von-Willebrand-Faktor Verdünnung 1 : 50 (Dako A/S, Glostrup, Dänemark)	Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Mouse IgG, Pk-4002 Verdünnung 1 : 200 (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim)
RAM 11	Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Macrophage Verdünnung 1 : 50 (Dako Corp., Carpinteria, USA)	Anti Mouse Total Ig Biotinylated Antibody Verdünnung 1 : 100 (DIANOVA, Unitect Mouse Immunhistochemistry System, Hamburg)
BrdU	Monoclonal Mouse Anti-BrdUrd-DNA Verdünnung 1 : 500 (Bio Cell Consulting, Laufen, Schweiz)	Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Mouse IgG, Pk-4002 Verdünnung 1 : 200 (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim)

## 2.7 Auswertung

### 2.7.1 Analyse des Gesamtcholesterins

Das Gesamtcholesterin wurde im EDTA-Plasma nach der CHOD-PAP- (Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin-) Methode (Ecoline® 25, Boehringer, Mannheim) zum Zeitpunkt der Operation (nach vier Wochen Cholesterindiät) sowie zum Zeitpunkt des Abtötens bestimmt.

### 2.7.2 Für die Auswertung der Gefäßpräparate verwendete Geräte

Für die morphometrische Auswertung wurde ein Mikroskop (Laborlux S., Fa. Leica, Bensheim), eine „Maus“ mit einer Induktionsspule, ein Digitalisierungs-Tableau (SummaSketch III, Summagraphics, München) und die Software „BIOQUANT

INTRO: BQANALYSIS BQ-IAD Analysis Software“ und „BQANALYSIS BQ-IAD Measurement Software“ (Bilany Consultants GmbH, Düsseldorf) verwendet. Die verschiedenen Parameter wurden unter einem 1,25fach Objektiv (Plan 1,25/0,04; Zeiss, Oberkochen; Okular 10fach, Tubus 1,25fach) bzw. unter einem 10fach Objektiv (EF 10/0,25; Leica, Bensheim; Okular 10fach, Tubus 1,25fach) gemessen. Bedingt durch die morphometrische Messanordnung ergaben sich für das 1,25fach Objektiv eine 24fache und für das 10fach Objektiv eine 188fache Vergrößerung. Bei jeder Färbung wurde die jeweils vorhandene Plaquegröße zu Grunde gelegt. Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt und daraus das arithmetische Mittel gebildet.

Für digitale Fotografien wurden ein Mikroskop (Olympus BH 2, Olympus Optical Co. (Europe) GmbH, Hamburg) und eine 3CCD-Farbkamera (FUJIX Digital Camera HC-300 Z, Fujifilm, Tokyo, Japan) mit 1,280 x 1,000 Pixel Auflösung verwendet. Die Fotos wurden mit der Software AVT Horn 200 – FUJI-HC-300, Version 0.9 B (Fujifilm, Tokyo, Japan) im JPEG-Format gespeichert und mit dem Programm Corel PHOTO-PAINT™, Version 7.373, überarbeitet.

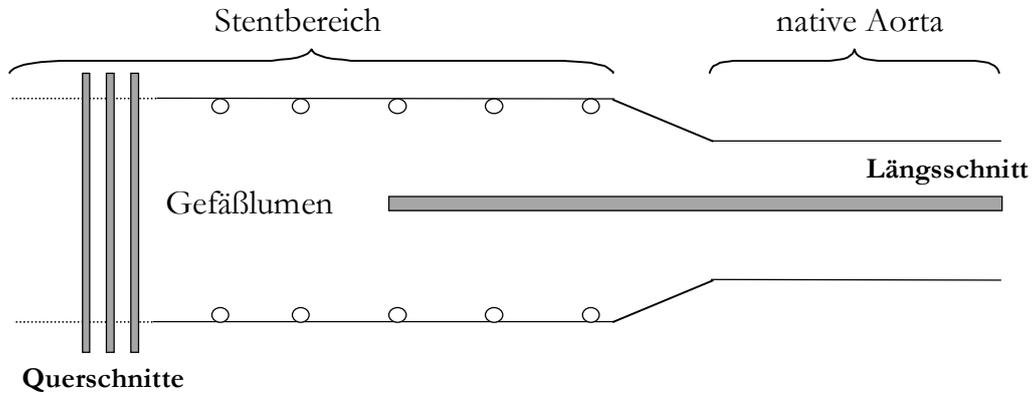
### **2.7.3 Morphometrische Auswertung**

Um das Ausmaß der intimalen Hyperplasie und die Mediafläche möglichst genau zu quantifizieren, wurden bei den in Methamethylakrylat gefärbten Querschnitten drei verschiedene Werte erhoben. Diese waren die Lumenfläche, sowie die Flächen innerhalb der Lamina elastica interna und externa.

Aus der Differenz zwischen der Fläche innerhalb der Lamina elastica interna und der Lumenfläche mit Abzug der Fläche der angeschnittenen Stentstreben konnte die Fläche der intimalen Hyperplasie berechnet werden. Die Mediafläche erhielt man durch Subtraktion der Flächen innerhalb der Lamina elastica interna und der Lamina elastica externa.

Zusätzlich zu dieser Methode wurde in den Längsschnitten an drei verschiedenen Stellen (Stent, Übergangsbereich und native Aorta) jeweils die Dicke von Neointima und Media gemessen und anschließend das Verhältnis beider Messwerte gebildet.

Die Anordnung der Schnitte und die ausgewerteten Stellen ist in Abbildung 4 dargestellt:



**Abbildung 4.** Anordnung der angefertigten Längs- und Querschnitte

#### 2.7.4 Bestimmung der Zelldichte und Proliferationsindex

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden die BrdU-gefärbten Präparate mit dem 40fach Objektiv (Planapo 40/1,0; Olympus Optical Co. (Europe) GmbH, Hamburg) unter Benutzung von Immersionsöl an vier diametral gelegenen Stellen digital abfotografiert. Die überarbeiteten und im JPEG-Format gespeicherten Bilder wurden mit einem Farbdrucker (CI Color Laser Jet 4500, Hewlett Packard, USA) ausgedruckt (94fache Vergrößerung). Auf den vier Fotos wurden nun alle Zellkerne innerhalb der Plaque ausgezählt sowie die korrespondierende Plaquefläche morphometrisch ausgemessen und hinterher die Werte der vier Fotos addiert. Aus dem Verhältnis der Gesamtzellzahl zur Fläche konnte schließlich die Zelldichte errechnet werden.

Um den Proliferationsindex zu ermitteln, wurde die Zahl der BrdU-positiv gefärbten Zellkerne ins Verhältnis zu der Gesamtzellzahl gesetzt, wobei nur solche Zellen als positiv gewertet wurden, deren Zellkerne eindeutig rot angefärbt waren.

### **2.7.5 Histopathologische Beurteilung der Stent- und Aortensegmente**

Um auch Aussagen über die unterschiedliche histopathologische Zusammensetzung der einzelnen Gewebeanteile in den Präparatabschnitten und so die Auswirkungen der Therapie erfassen zu können, wurden die Schnitte in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Gefäßpathologen beurteilt. Dies erfolgte unter Blindbedingungen, also ohne Angaben der Gruppen oder sonstiger Informationen, an den HE- und EvG-gefärbten Schnitten unter Zuhilfenahme der immunhistologischen Färbungen. Die Anzahl der Querschnitte betrug 3-5 pro Objektträger und es wurden jeweils alle Schnitte begutachtet, um schließlich eine Gesamteinschätzung vorzunehmen.

Bei den Stentsegmenten bestimmte man folgende Kriterien:

- Ödem
- Schaumzellen
- Fibrose
- Fibrinablagerungen
- Granulozytäre Infiltrate
- Mononukleäre Infiltrate
- Verkalkungen
- Destruktion elastischer Lamellen
- Atrophie glatter Muskulatur

Ferner ließen sich in den Präparaten folgende Lokalisationen unterscheiden:

- Intimale Hyperplasie
- Nahe der Stentstreben in der intimalen Hyperplasie
- Media
- Adventitia

Es wurde jedoch für die Auswertung der Pathohistologie nicht jeder Parameter an allen Lokalisationen bestimmt. Vielmehr wurde nach ausgiebiger Betrachtung der

Schnitte eine für die Beantwortung der Fragestellung aussagekräftige Auswahl der vorhandenen Merkmale getroffen.

Der Grad der Ausprägung eines jeden Merkmals wurde bei dieser semiquantitativen Auswertung nach folgendem Schema beurteilt:

**Tabelle 2.** Schema zur histopathologischen Auswertung

0	=	Merkmal nicht vorhanden
1	=	Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %)
2	=	Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %)
3	=	Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

### 2.7.5.1 Endothel

Zur Darstellung des Endothels wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung vorgenommen (siehe 2.6.6.2). Durch spezifische Markierung des vom Endothel gebildeten von-Willebrand-Faktors (Faktor VIII der Blutgerinnungskaskade) wurde diese sonst schlecht sichtbare dünne Gewebeschicht besonders hervorgehoben. Dabei wurden nur die Stentpräparate der 6-Wochen-Tiere begutachtet und eine mehrheitliche Anfärbung mit dem Ausprägungsgrad 1 bewertet. Waren keine oder nur geringe Anteile der Intima angefärbt, so ging man von einer fehlenden bzw. geringen Reendothelialisierung aus und stufte diese Präparate dem Grad 0 zu.

### 2.7.5.2 Makrophagen

Um eine optimale Darstellung der Makrophagen und Schaumzellen zu erhalten, wurde ferner die immunhistochemische RAM-Färbung eingesetzt (siehe 2.6.6.3). Dies ermöglichte eine bessere Beurteilung dieser vor allem in der Neointima und Media gelegenen Entzündungszellen. Dazu wurde in diesen Präparaten sowohl die Fläche der positiv angefärbten Areale als auch die Gesamtplaquefläche morphometrisch bestimmt. Aus dem Verhältnis der beiden Werte ergab sich

daraufhin der jeweils prozentuale Anteil der Makrophagen in der Plaque, der schließlich nach oben aufgeführtem Schema (siehe Tabelle 2) eingeteilt wurde.

### 2.7.5.3 Vessel injury Score

Der Grad der Gefäßwandverletzung durch den Stent wurde mit Hilfe des Vessel Injury Score nach Schwartz et al.<sup>54</sup> in einer abgeänderten Form erfasst. Dieser Score wurde 1992 erstmals beschrieben und hat sich in zahlreichen Studien als sinnvoller Parameter zur Erfassung der Gefäßwandverletzung durch eine Stentimplantation bewiesen und etabliert. Der Unterschied zu unserem Score besteht darin, dass nicht für jede Strebe ein Wert vergeben wurde, um danach einen Mittelwert für das gesamte Präparat zu erhalten. Vielmehr wurde jede Strebe betrachtet und dann ein Einheitswert für den ganzen Gefäßquerschnitt vergeben. Die jeweilige Beurteilung wurde an den EvG-Schnitten vorgenommen. Dabei ergaben sich folgende Ausprägungsgrade (0-3):

**Tabelle 3.** Modifizierter Vessel injury Score nach Schwartz et al.<sup>54</sup>

0	=	Lamina elastica interna intakt; Endothel denudiert; Media komprimiert, aber nicht zerrissen
1	=	Lamina elastica interna zerrissen; Media komprimiert, aber nicht zerrissen
2	=	Lamina elastica interna zerrissen; Media sichtbar zerrissen, Lamina elastica externa intakt, aber komprimiert
3	=	Lamina elastica externa zerrissen; große Einrisse in der Media, die sich in der Lamina elastica externa fortsetzen; teilweise Einkerbungen der Streben in der Adventitia

### 2.7.5.4 Inflammation Score

Sowohl Hofma et al.<sup>93</sup> als auch Kornowski et al.<sup>56</sup> stellten 1998 einen Inflammation Score auf, der die entzündlichen Veränderung in der Gefäßwand nach dem Trauma einer Stentimplantation möglichst gut charakterisieren sollte. Hofma et al. gingen dabei von der Annahme aus, dass die Entzündungszellen von der Adventitia über die Media in die Neointima einwandern und dort eine inflammatorische Antwort in

der Gefäßwand mit auslösen, verstärken und unterhalten. Deshalb war bei ihnen der Score um so höher, je mehr Entzündungszellen in den inneren Schichten der Gefäßwand vorhanden waren. Kornowski et al. hingegen beurteilten die Art und das Ausmaß der Entzündungsantwort direkt an der Strebe, dort wo die Verletzung durch den Stent am größten ist. In dieser Studie wurde ein direkter streng proportionaler Zusammenhang zwischen dem Grad der Verletzung (repräsentiert durch Vessel injury Score nach Schwartz et al.<sup>54</sup>) und dem Ausmaß der entzündlichen Antwort festgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass in unseren Präparaten durch die Art der Präparation kaum Adventitia vorhanden war und durch die Beschichtung das Areal um die Strebe eine besondere Bedeutung erhielt, entschieden wir uns für den Inflammation Score nach Kornowski et al. Wir benutzten ihn in einer etwas modifizierten Form, indem wir zusätzlich noch den Gehalt an Schaumzellen im betroffenen Gebiet miteinbezogen. Insgesamt wurde versucht, das Ausmaß und die Dichte der entzündlichen Infiltrate an jeder einzelnen Strebe in der Neointima zu erfassen. Dabei ergab sich schließlich folgende Gradeinteilung:

**Tabelle 4.** Modifizierter Inflammation Score nach Kornowski et al.<sup>56</sup>

0	=	keine Entzündungszellen im Areal um die Strebe sichtbar
1	=	leichte, diffuse Infiltration lymphozytärer und histiozytärer Zellen um eine einzelne Strebe oder zwischen zwei Streben; vereinzelt Schaumzellen vorhanden
2	=	lokale, mäßig dichte Zellaggregate im Bereich um die Strebe, deutlich Schaumzellen vorhanden
3	=	dichte, die gesamte Strebe umfassende Infiltration lymphozytärer und histiozytärer Zellen

### 2.7.5.5 Aortensegmente

Bei den Aortensegmenten wurden nur die Parameter Endothel und Makrophagen berücksichtigt. Zusätzlich erfolgte noch eine Einteilung der atherosklerotischen Veränderungen in die Stadien nach Stary et al.<sup>94</sup>

Diese Klassifikation wird für humane atherosklerotische Läsionen angewandt und dient deren praktischen Einordnung in verschiedene Schweregrade. Dazu werden morphologische Kriterien wie die histologische Zusammensetzung und Struktur der Plaque herangezogen, um sowohl eine Aussage über das Ausmaß als auch über die Stabilität der vorhandenen Läsion zu machen.

Folgende Stadien lassen sich dabei unterscheiden:

- Typ I (Initial-Läsion): Lipoproteinansammlung in der Intima
- Typ II (fatty streak): Lipoproteinansammlung in der Intima; Lipide in Makrophagen und glatten Muskelzellen; Leitkriterium: konfluierende Makrophagen
- Typ III (Präatherom): zusätzlich vereinzelt kleine Ablagerungen extrazellulärer Lipide zwischen glatten Muskelzellen; Intimaverbreiterung; Leitkriterium: granuläre Kalzifikationen
- Typ IV (Atherom): zusätzlich Zusammenfluss der vereinzelt Lipidablagerungen zu einem Lipidkern; plattenähnliche Kalzifikationen
- Typ V (Fibroatherom): zusätzlich Entwicklung deutlicher Kollagenschichten und Vermehrung der glatten Muskelzellschichten über dem Lipidkern
- Typ VI (Atherothrombose): zusätzlich Ablagerungen von thrombotischem Material und/oder Hämatom, Blutung und/oder Läsion mit Oberflächendefekt
- Typ VII: Kalzifiziertes Atherom
- Typ VIII: Fibrosiertes Atherom

### 2.7.5.6 Gruppenvergleich

Um später die Werte verschiedener Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde für jedes Merkmal ein Mittelwert berechnet. Dieser ergab sich aus der Teilung der Summe der vorhandenen Grade (0-3) durch die Anzahl der in dieser Gruppe berücksichtigten Tiere (n). Wurde zum Beispiel in einer Gruppe mit sieben Tieren (n=7) bei dreien der Grad 1, bei zweien der Grad 2 und bei jeweils einem Tier der Grad 0 und 3 gefunden, so ergab sich folgender Mittelwert:  $(1 \cdot 0 + 3 \cdot 1 + 2 \cdot 2 + 1 \cdot 3) / 7 = 10 / 7 \approx 1,4$ .

### 2.7.6 Meßwertdefinitionen

Es wurden zur Auswertung folgende Messwerte erhoben und teilweise statistisch miteinander verglichen:

- Konzentration des Serumcholesterins zum Zeitpunkt der Stentimplantation (in mg/dl)
- Intimafläche (in mm<sup>2</sup>)
- Mediafläche (in mm<sup>2</sup>)
- Verhältnis Plaque- zu Mediadicke in den Längsschnitten an drei verschiedenen Stellen
- Stenosegrad (in %):

Die Berechnung dieses Wertes erfolgte folgendermaßen:

$$\text{Stenosegrad} = \frac{\text{Intimafläche}}{\text{Fläche innerhalb der Lamina elastica interna}} \times 100$$

- Zelldichte (Zellen/mm<sup>2</sup>):

Dabei wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Gesamtzahl der Zellen in der Intima}}{\text{Intimalfläche}} \times 100$$

- Proliferationsindex:

Dieser wurde so berechnet:

$$\text{Proliferationsindex} = \frac{\text{BrdU-positive Zellen in der Intima}}{\text{Gesamtzellzahl in der Intima}} \times 100$$

## 2.8 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die statistischen Analysen wurde das Programm JMP (Version 4.0, SAS, Heidelberg, Cary, NC, USA) benutzt. Wenn Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Homogenität der Varianzen (Bartlett-Test) als Voraussetzung gegeben waren, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  betrachtete man als statistisch signifikant. Um Einzelgruppenunterschiede aufzudecken, wurde als nachgeschobener Test der Tukey-Kramer-Test gewählt.

Konnte bei den benutzten Werten nicht von Normalverteilung und Varianzhomogenität ausgegangen werden, so benutzte man den Wilcoxon-Test (Kruskal-Wallis-Test), um auf Signifikanz zu prüfen.

Um auf Korrelationen zwischen den einzelnen Gruppen zu prüfen, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet und als  $r$  angegeben.

## 3 Ergebnisse

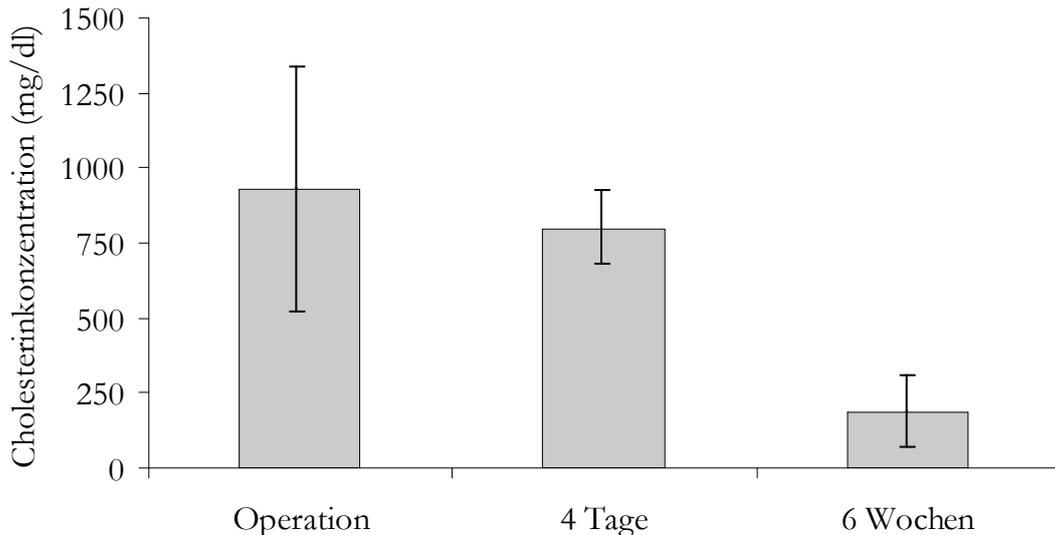
Die Ballonangioplastie und nachfolgende Implantation des Stents verlief bei 38 von 39 Versuchstieren problemlos. Bei einem Tier ließ sich die Schleuse nicht verschieben und es verstarb noch intraoperativ wahrscheinlich aufgrund einer unbemerkten Ruptur der Arteria femoralis. Ein weiteres Tier [Therapiegruppe] verstarb am Tag acht nach der Intervention, ohne dass bei der anschließend durchgeführten Obduktion eine Ursache festgestellt werden konnte. Auffällig war jedoch, dass zum Zeitpunkt der Intervention das dabei abgenommene Blut einen außerordentlich niedrigen Cholesterinspiegel aufwies. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass schon bei der Operation der Allgemeinzustand dieses Tieres beeinträchtigt war, da es schlechter als die anderen Tiere gefressen hatte. Ferner wurde bei einem Tier [Hydrogelgruppe] am zweiten postoperativen Tag eine großflächige Wundinfektion im Bereich des während der Operation eröffneten Hautareals erkannt, die sich trotz desinfizierender Spülung des betroffenen Gebietes und konsequenter Antibiotika-Therapie weiter ausbreitete und schließlich zwei Tage später zum Tod führte. Drei Tiere bissen sich durch den Wundreiz die sorgfältig verschlossene Wundnaht wieder auf, jedoch musste nur bei einem Tier die Naht unter Narkose revidiert werden. Diese Tiere erhielten für die Folgezeit bis zur Narbenbildung eine Halskrause, um ein nochmaliges Aufbeißen zu verhindern.

Keines der Tiere entwickelte eine akute oder subakute Stentthrombose. Insgesamt gingen alle überlebenden 36 Tiere in die Auswertung mit ein. Eine vollständige Übersicht aller erhobenen Daten ist nach Gruppen gegliedert im Anhang (Kapitel 7) aufgelistet.

### 3.1 Gesamtcholesterin im Plasma

Zu dem zugrunde gelegten Restenosemodell gehörte eine vierwöchige präoperative Cholesterinfütterung, deren Auswirkungen auf den Blutcholesterinspiegel bei allen Tieren sowohl zum Zeitpunkt des Eingriffes wie auch im Rahmen der Abtötung gemessen wurden. Falls eines der Tiere einen zu niedrigen Cholesterinspiegel

aufgewiesen hätte, wäre dies ein Ausschlusskriterium für die Auswertung gewesen. Im Augenblick der Operation lag die Cholesterinkonzentration im Plasma bei durchschnittlich  $928 \pm 407$  mg/dl, wobei sie nach vier Tagen auf  $799 \pm 121$  mg/dl und nach sechs Wochen auf einen Mittelwert von  $184 \pm 119$  mg/dl abfiel. Der so entstandene Verlauf ist in Abbildung 5 dargestellt:



**Abbildung 5.** Cholesterinkonzentration zu den verschiedenen Zeitpunkten

Am Tag der Intervention traten zwischen den einzelnen Gruppen teilweise erhebliche Unterschiede auf. Es konnte bereits in früheren Studien mit Weißen Neuseelandkaninchen nachgewiesen werden, dass bei Gesamtcholesterinwerten im Plasma über 500 mg/dl kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Gesamtcholesterins im Blut und der resultierenden Plaquefläche in der Aorta festzustellen ist. Auch bei unseren Tieren konnte trotz der bestehenden Abweichungen zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen der Cholesterinkonzentration und der Plaquegröße in der unbehandelten Aorta erfasst werden. Aus diesem Grund musste keines der Tiere von der Auswertung ausgeschlossen werden. Bei den 6-Wochen-Tieren wurden zum Zeitpunkt der Operation die niedrigsten Werte in der Kontrollgruppe ( $667 \pm 285$  mg/dl) und die höchsten Werte in der Hydrogelgruppe ( $1240 \pm 552$  mg/dl) gemessen, während sich

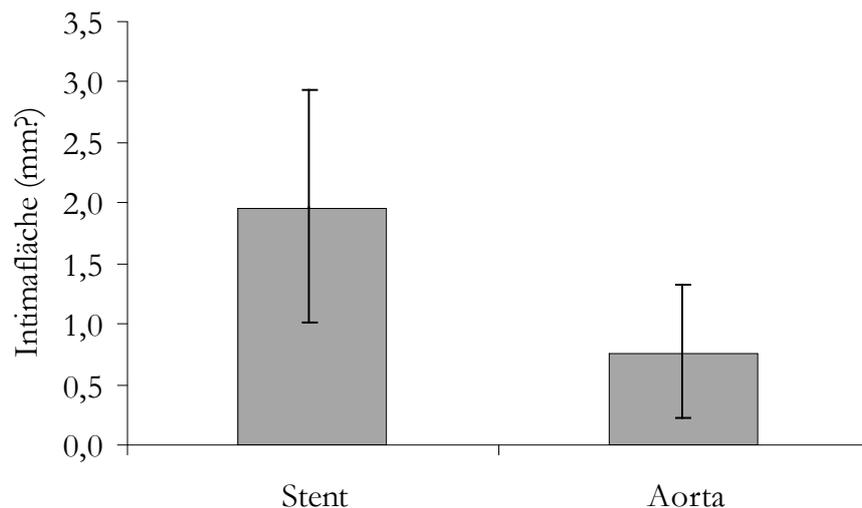
bei den 4-Tages-Tieren kaum Differenzen feststellen ließen (Ko:  $1036 \pm 351$  mg/dl vs. CI:  $701 \pm 139$  mg/dl)

## 3.2 Morphometrische Parameter

Unmittelbar nach Versuchsende wurde die Aorta abdominalis mitsamt Stent entnommen und histologisch aufgearbeitet. Anschließend konnten folgende Parameter bestimmt werden: Intimafläche, Mediafläche, Verhältnis Plaque- zu Mediadicke in den Längsschnitten, Stenosegrad, Zelldichte und Proliferationsindex.

### 3.2.1 Intimafläche

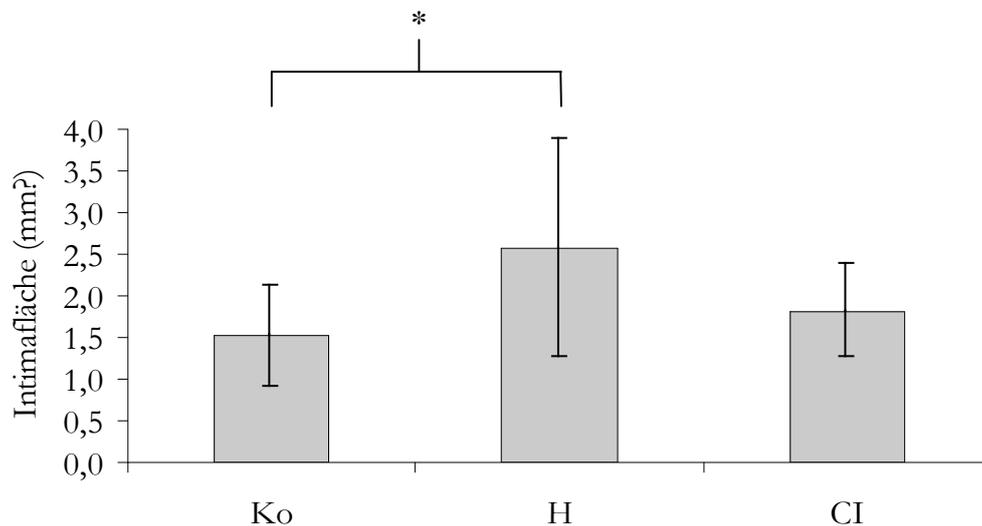
In den Stentpräparaten ist es durch die vierwöchige Vorfütterung mit cholesterinhaltigem Futter, die Ballondenudation und die nachfolgende Stentapplikation im Zeitraum von sechs Wochen zu einer deutlichen intimalen Gewebsneubildung von  $1,96 \pm 0,96$  mm<sup>2</sup> gekommen. Im Vergleich dazu fiel die Fläche der intimalen Hyperplasie im Aortenbereich durch alleinige Cholesterindiät und Ballondenudation mit  $0,76 \pm 0,55$  mm<sup>2</sup> deutlich geringer aus. Diesen Unterschied verdeutlicht Abbildung 6.



**Abbildung 6.** Vergleich der Neointimafläche im Stent und in der Aorta sechs Wochen nach Stentapplikation

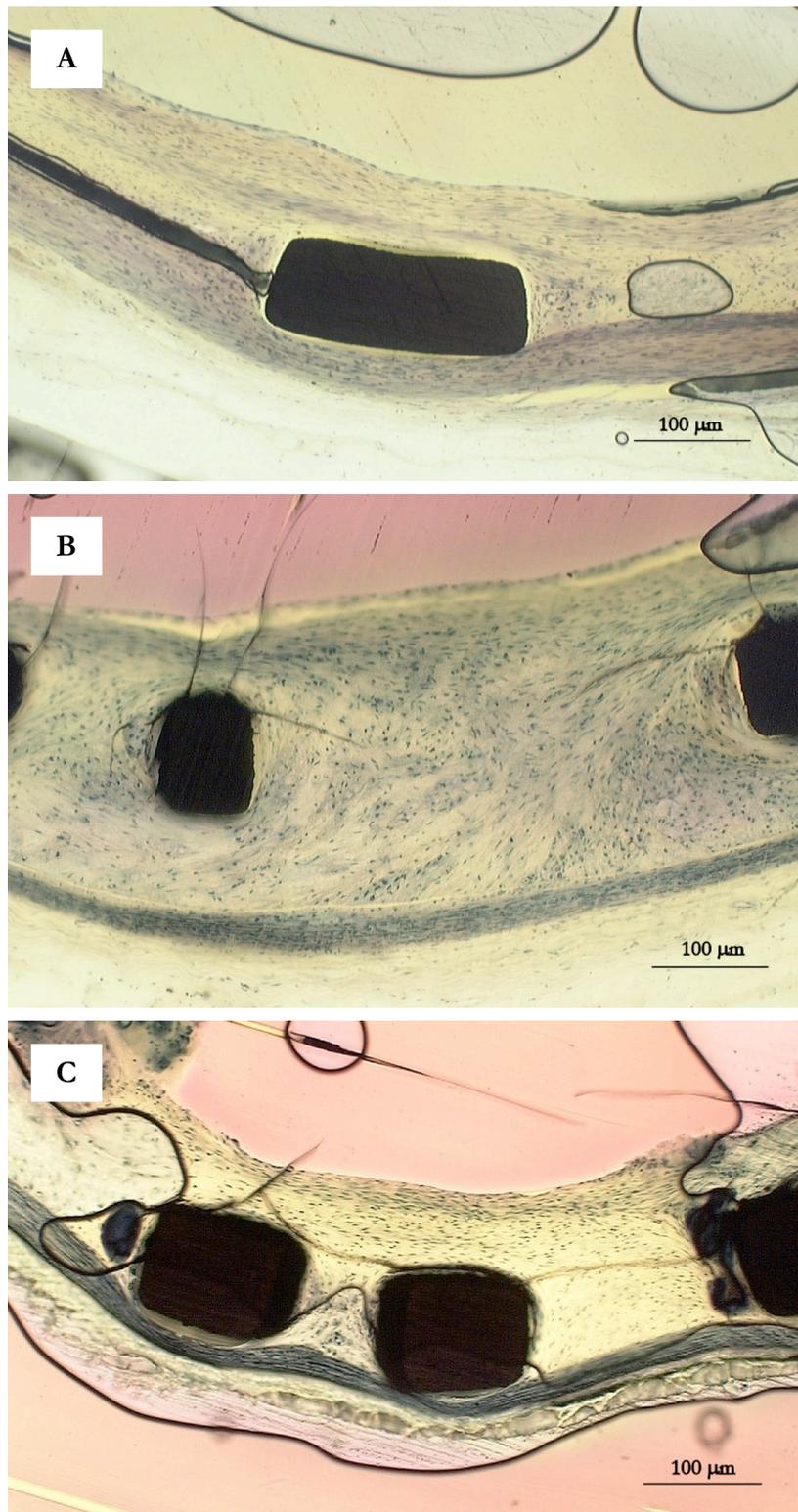
Die starke Streuung der Intimawerte in der Aorta beruhte auf einer signifikant erniedrigten Fläche in den CI-Präparaten ( $0,17 \pm 0,22 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zu den H- ( $0,89 \pm 0,49 \text{ mm}^2$ ) und Ko-Segmenten ( $1,21 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ ).

In den Stentsegmenten konnte sechs Wochen nach Intervention eine Tendenz zur Verringerung der Intimafläche in der Therapiegruppe ( $1,81 \pm 0,56 \text{ mm}^2$ ) gegenüber der Hydrogelgruppe ( $2,56 \pm 1,31 \text{ mm}^2$ ) festgestellt werden. Die niedrigsten Werte waren jedoch in der Kontrollgruppe ( $1,51 \pm 0,60 \text{ mm}^2$ ) zu finden. Dabei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der H- und der Kontrollgruppe (Wilcoxon-Test:  $p = 0,035$ ). Der Vergleich der Intimafläche der verschiedenen Gruppen ist in Abbildung 7 und 8 dargestellt.



**Abbildung 7.** Intimafläche in den Stentpräparaten der 6-Wochen-Tiere, unterteilt nach verschiedenen Beschichtungsarten; signifikante Differenzen ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen sind dabei mit einem Stern gekennzeichnet (Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

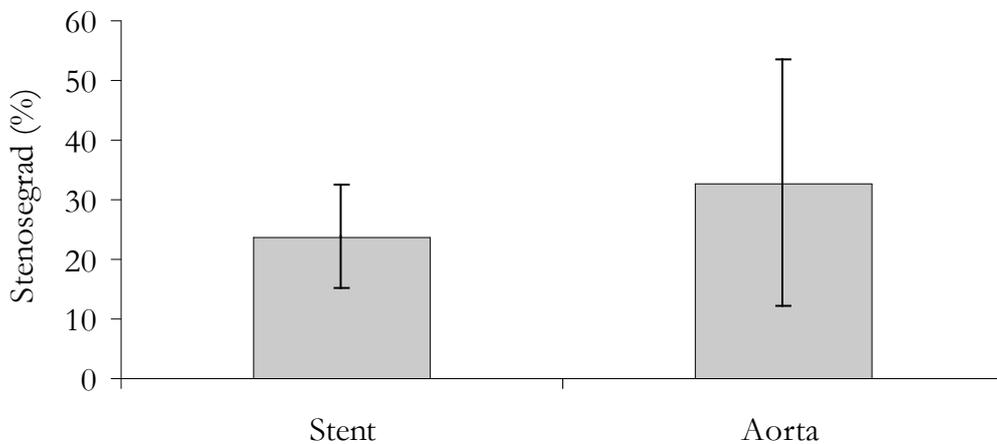
Außerdem unterschied sich die Größe der Plaquerfläche in den Stentpräparaten nach sechs Wochen ( $1,96 \pm 0,96 \text{ mm}^2$ ) deutlich von den Werten nach vier Tagen ( $0,03 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ).



**Abbildung 8.** Morphologie der Gefäßwand in den Stentpräparaten der 6-Wochen-Tiere (Methamethylakrylat-Einbettung); A: Kontrollgruppe; B: Beschichtung mit Hydrogel; C: Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor

### 3.2.2 Stenosegrad

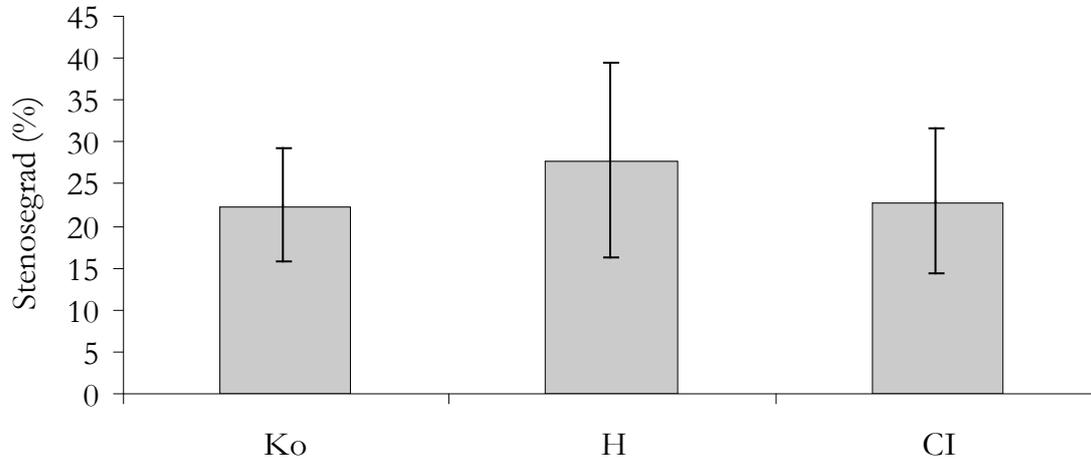
Der Stenosegrad beschreibt den prozentualen Anteil der Plaquefläche, der zu einer Einengung des Gefäßes führt. Dieser Parameter ist für die klinische Anwendung von besonderer Bedeutung, da sich durch eine an der Gefäßwand gebildete Plaque dementsprechend ein reduzierter Gefäßdiameter ergibt. Dies hat eine geringere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der distalen Gefäße und somit auch des Gewebes zur Folge, welche dem Patienten schmerzhafte Symptome verursachen können. Die Implantation eines Stents wirkt diesen Veränderungen durch Erzeugung einer starren Gefäßplastik entgegen. In unseren Präparaten führte der Einbau des Stents selbst nach Ausbildung einer neointimaler Proliferation einen geringeren Stenosegrad im Vergleich zur Aorta herbei (Stent:  $23,8 \pm 8,7$  % vs. Aorta:  $32,8 \pm 20,7$  %). Dieses sechs Wochen nach der Operation gefundene Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9.** Stenosegrad Stent vs. Aorta in den 6-Wochen-Tieren

In den Stentpräparaten ließ sich sechs Wochen nach der Operation eine nicht signifikante Erhöhung des Stenosegrades in der Hydrogelgruppe ( $27,7 \pm 11,5$  %) feststellen, während diese Werte in der Kontroll- ( $22,4 \pm 6,8$  %) und der Therapiegruppe ( $22,8 \pm 8,7$  %) nahezu identisch waren. In der Aorta ergab sich ein besonders niedriger Stenosegrad für die Therapiegruppe ( $19,1 \pm 23,0$  %) mit höheren Werten in der Ko- ( $35,7 \pm 7,1$  %) und Hydrogelgruppe ( $43,6 \pm 22,1$  %). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

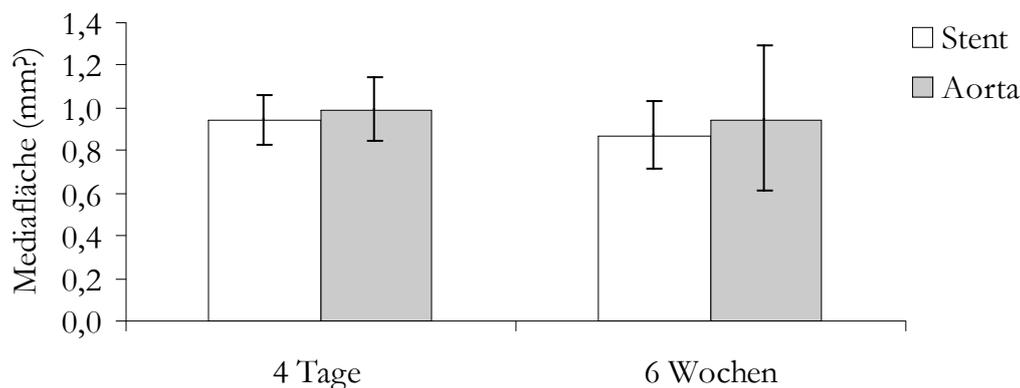
Im folgenden Diagramm sind die gruppenabhängigen Unterschiede im Stent der Langzeittiere dargestellt (Abbildung 10).



**Abbildung 10.** Stenosegrad in den Stentpräparaten der 6-Wochen-Tiere, unterteilt nach verschiedenen Beschichtungsarten (Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

### 3.2.3 Mediafläche

Für die Media ergab sich in den Stentpräparaten nach vier postoperativen Tagen eine Fläche von  $0,94 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ , welche nach sechs Wochen  $0,87 \pm 0,16 \text{ mm}^2$  betrug. In den Aortensegmenten wurde vier Tage nach der Intervention eine Fläche von  $0,99 \pm 0,15 \text{ mm}^2$  und nach sechs Wochen eine Fläche  $0,95 \pm 0,34 \text{ mm}^2$  gemessen. Der Gesamtvergleich zwischen Aorten- und Stentpräparaten zum jeweiligen Zeitpunkt ist zur Darstellung der Unabhängigkeit dieses Areals von der Zeit nach der Stentimplantation in Abbildung 11 dargestellt.

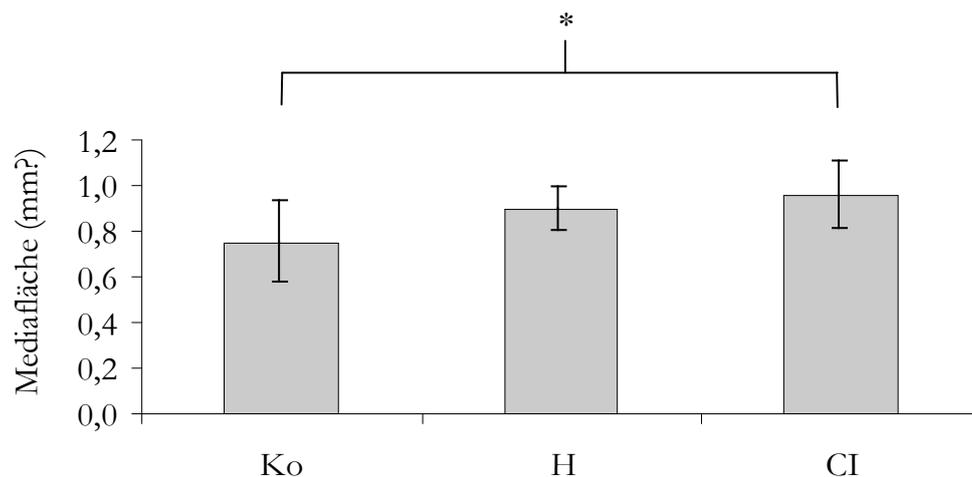


**Abbildung 11.** Mediafläche in den Stent- und Aortenpräparaten zu den zwei unterschiedlichen Zeitpunkten

In den Stent- und Aortenpräparaten der 4-Tages-Tiere ergaben sich in beiden Gruppen nahezu identische Werte.

Im Gruppenvergleich der Langzeitpräparate wurde in der Kontrollgruppe ( $0,75 \pm 0,18 \text{ mm}^2$ ) ein signifikant kleinere Mediafläche (ANOVA  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur H- ( $0,89 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ ) und Therapiegruppe ( $0,96 \pm 0,15 \text{ mm}^2$ ) gefunden. Der Test auf Einzelgruppenunterschiede (Tukey-Kramer-Test) ergab eine Signifikanz zwischen den Werten in der Kontroll- und Therapiegruppe. Eine signifikante Veränderung zwischen Mediafläche im Stent und Mediafläche in der Aorta konnte in keiner Gruppe festgestellt werden.

Im folgenden Diagramm sind die Werte der unterschiedlichen Gruppen im Stent vergleichend aufgetragen (Abbildung 12).

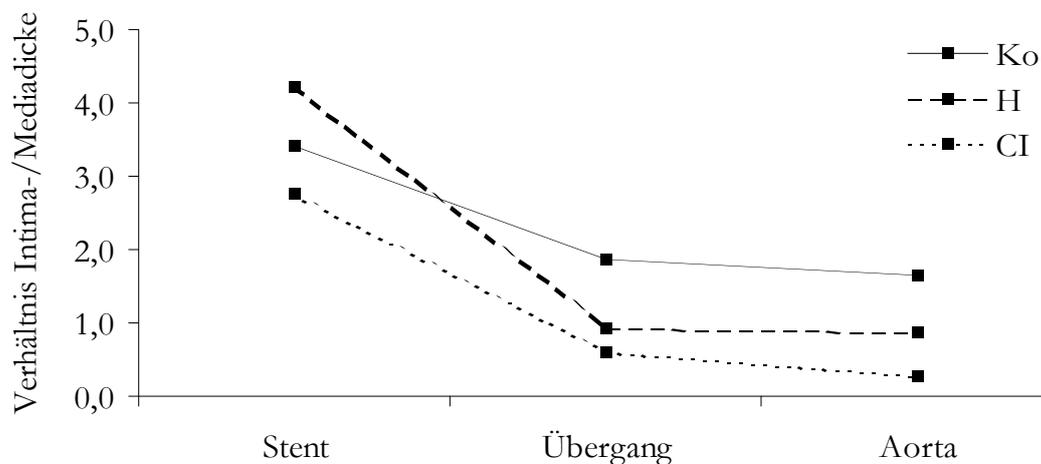


**Abbildung 12.** Mediafläche in den Stentpräparaten der 6-Wochen-Tiere; signifikante Differenzen ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

(Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

### 3.2.4 Verhältnis Plaque- zu Mediadicke in den Längsschnitten

Um denkbare Restenosen im Übergangsbereich vom gestenteten Bereich zur nativen Aorta aufzudecken, wurden Längsschnitte dieses Gebietes angefertigt, die eine lückenlose topographische Betrachtung ermöglichten. Die Messung der Intima- und Mediadicke erfolgte an drei verschiedenen Punkten dieser Präparate, nämlich im Stent, im Übergang und in der nativen Aorta. Für die Auswertung war es dabei von Bedeutung, ob es am Stentausgang zu einer unverhältnismäßig starken Verdickung der Intima gekommen war, was für das Vorliegen eines sogenannten Edge-Phänomens („candy-wrapper effect“) sprechen würde. Dieser Effekt trat bisher nur bei lokal radioaktiver Therapie auf. Ebenso konnte auch in unserem Versuch keine derartige Reaktion festgestellt werden. Es ergab sich vielmehr in allen Gruppen eine kontinuierliche Verringerung dieses Wertes im Verlauf vom Stent zur nativen Aorta, der im nachfolgenden Diagramm bildlich dargestellt ist (Abbildung 13). Es wurden nur die 6-Wochen-Tiere berücksichtigt.

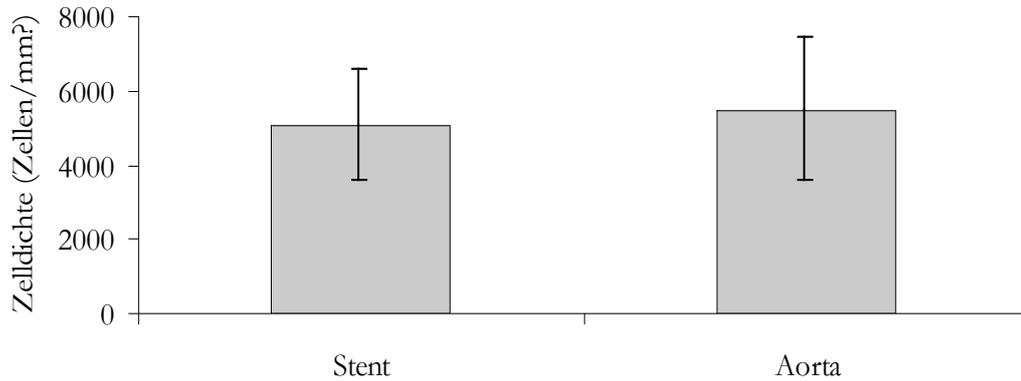


**Abbildung 13.** Verhältnis Intima- zu Mediadicke am Stentausgang (Ko = Kontrolltiere; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

### 3.3 Quantitative Zellzusammensetzung

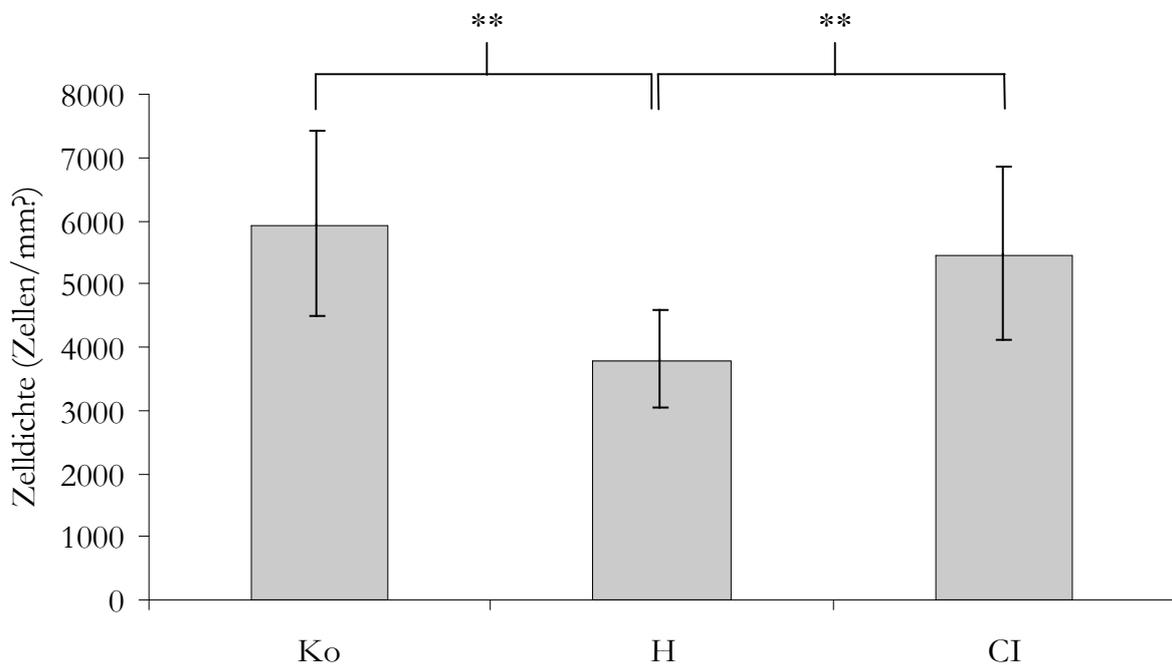
#### 3.3.1 Zelldichte und Verhältnis Zelldichte Stent/Aorta in der Neointima

Für die Zelldichte als Anzahl der Zellen pro  $\text{mm}^2$  Intimafläche konnte sechs Wochen nach dem operativen Eingriff im Stent ein insgesamt geringerer Wert ( $5060 \pm 1500$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) als in der Aorta ( $5490 \pm 1940$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) registriert werden. Diese unsignifikante Abweichung ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14.** Neointimale Zelldichte Stent vs. Aorta in den 6-Wochen-Tieren

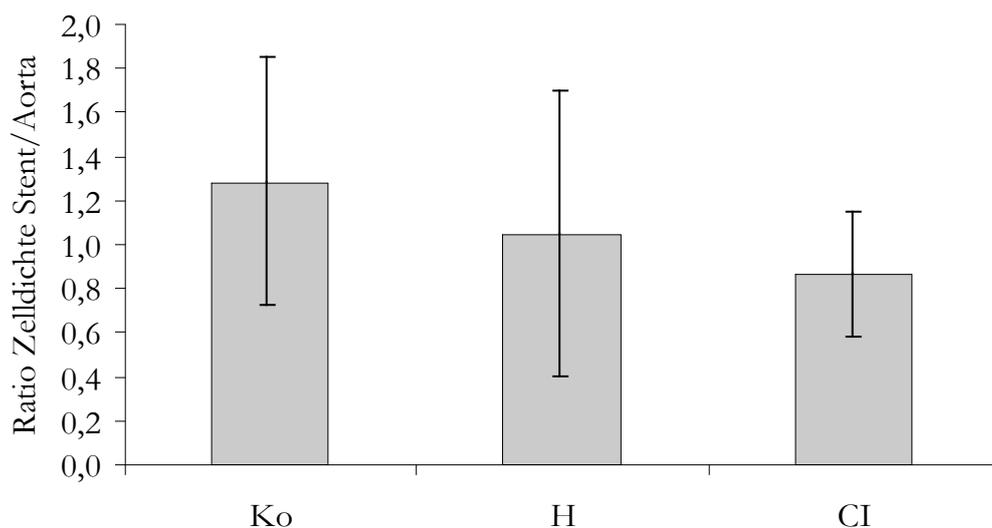
Bei Betrachtung der unterschiedlichen Gruppen fand sich in den H-Präparaten ( $3790 \pm 770$  Zellen/mm<sup>2</sup>) eine deutlich niedrigere Zelldichte verglichen mit den in den Kontroll- ( $5930 \pm 1470$  Zellen/mm<sup>2</sup>) und CI-Tieren ( $5450 \pm 1370$  Zellen/mm<sup>2</sup>) gefundenen Werten (Wilcoxon-Test  $p < 0,01$ ). Dieser Befund ist im folgenden Diagramm aufgezeigt (Abbildung 15).



**Abbildung 15.** Neointimale Zelldichte in den verschiedenen Gruppen der 6-Wochen-Tiere; die hierbei aufgetretenen hochsignifikanten Differenzen ( $p < 0,01$ ) zwischen den Gruppen sind mit zwei Sternen gekennzeichnet (Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

In den Stent-Präparaten der 4-Tages-Tiere präsentierte sich in der Therapiegruppe ( $5390 \pm 1740$  Zellen/mm<sup>2</sup>) eine niedrigere Zelldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $5960 \pm 2910$  Zellen/mm<sup>2</sup>), jedoch sollten diese Befunde aufgrund der gering vorhandenen Intimafläche und der damit verbundenen starken Extrapolierung nicht überbewertet werden.

Um ein Maß für die Zelldichte im Stent in Relation zur Zelldichte in der nativen Aorta für das jeweilige Tier zu bekommen, wurde zusätzlich das Verhältnis Stent zu Aorta dieser Werte gebildet. Dabei ergab sich bei den Langzeittieren ein zwar nicht signifikanter, jedoch wesentlich erniedrigter Wert in der Therapiegruppe ( $0,86 \pm 0,29$ ) im Vergleich zur H- ( $1,04 \pm 0,65$ ) und besonders ausgeprägt zur Kontrollgruppe ( $1,28 \pm 0,57$ )(Abbildung 16).



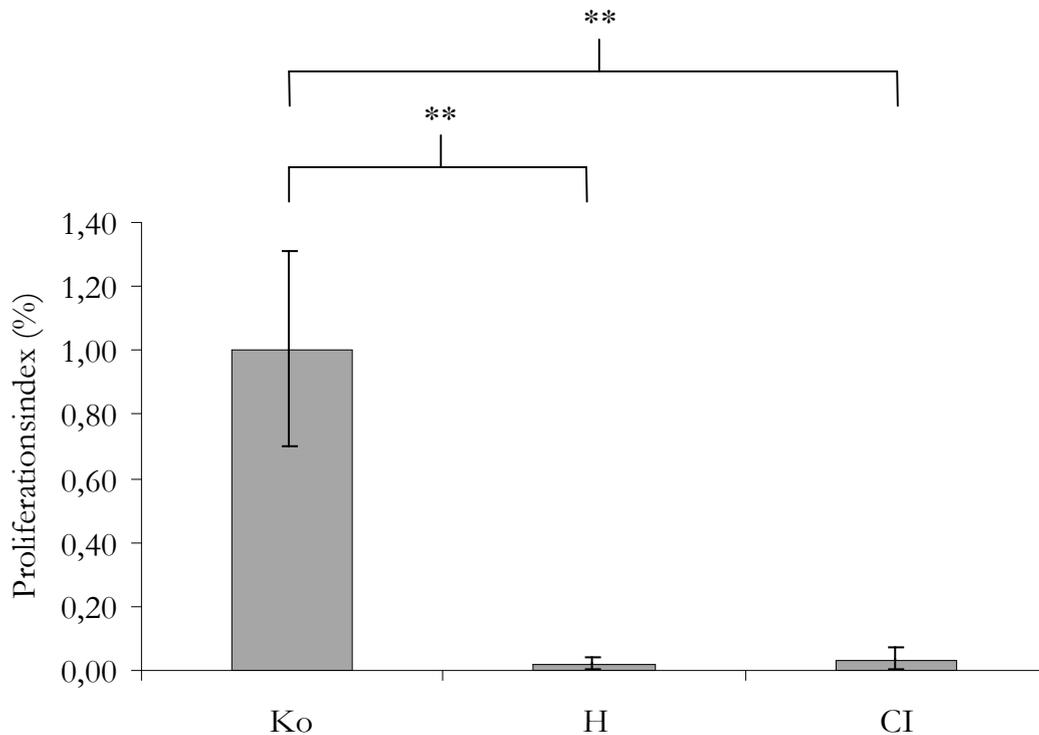
**Abbildung 16.** Verhältnis Zelldichte Stent zu Aorta in den Präparaten der 6-Wochen-Tiere, aufgelistet nach den verschiedenen Gruppen (Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

### 3.3.2 Proliferationsindex

Die Anzahl der proliferierenden Zellen in der Neointima wurde mit der BrdU-Färbung bestimmt. Wie schon oben für die Zelldichte beschrieben, so gilt auch für den Proliferationsindex, dass dieser bei den 4-Tages-Tieren aufgrund kleiner Intimaflächen und starker Extrapolation nur bedingt interpretationsfähig ist. Eine

eindeutige zeitabhängige Tendenz ließ sich jedoch auch unter Berücksichtigung dieser Einschränkung feststellen. Und zwar ergab sich im Stent für die 4-Tages-Gruppe einen drastisch höheren Proliferationsindex ( $9,68 \pm 15,26$  %) im Gegensatz zu dem sehr geringen Wert in der 6-Wochen-Gruppe ( $0,35 \pm 0,50$  %). Ein ähnlich großer Unterschied zeichnete sich ebenfalls in den Aortenpräparaten ab (4-Tages-Tiere:  $4,09 \pm 3,30$  %; 6-Wochen-Tiere:  $0,35 \pm 0,38$  %).

Im Vergleich der einzelnen 6-Wochen-Gruppen fiel vor allem der große Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ( $1,00 \pm 0,30$  %) und der H- ( $0,02 \pm 0,02$  %) sowie der Therapiegruppe ( $0,03 \pm 0,04$  %) auf (Wilcoxon-Test  $p < 0,01$ ). Eine graphische Darstellung dieser signifikanten Unterschiede ist in Abbildung 17 aufgezeigt.



**Abbildung 17.** Proliferationsindex in der Neointima der gestenteten 6-Wochen-Präparate; die hierbei aufgetretenen hochsignifikanten Differenzen ( $p < 0,01$ ) zwischen den Gruppen sind mit zwei Sternen gekennzeichnet (Ko = Kontrollgruppe; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor)

### 3.4 Histopathologische Beurteilung

Die Betrachtung der Histopathologie führte man hauptsächlich in den HE- und EvG-Färbungen durch, während bei besonderen Fragestellungen die jeweiligen Spezialfärbungen miteinbezogen wurden. Zur semiquantitativen Auswertung dieser Morphologie teilte man die Ausprägung des jeweiligen Merkmals in die Grade 0-3 ein (Tabelle 2). Um später die Werte unter den Gruppen vergleichen zu können, bildete man – wie schon in Kapitel 2.7.5.6 beschrieben – für jeden Wert und jede Gruppe einen Mittelwert.

#### 3.4.1 Ödem

Ein kapillartoxisches Ödem entsteht durch eine vermehrte Durchlässigkeit der kleinsten Haargefäße. Diese tritt u.a. nach mechanischer Reizung auf und wird durch die Freisetzung und dem Zusammenwirken von Entzündungsmediatoren angeregt und gesteuert.

Bei der Auswertung wurde das Vorhandensein eines diffusen Ödems in der Neointima beurteilt und dort nochmals gesondert die lokale Ausprägung im Bereich der Stentstreben begutachtet. Dabei fand sich dieses Merkmal in keinem der 4-Tages-Präparate, während es bei den 6-Wochen-Tieren im Allgemeinen sowohl diffus in der Neointima als auch lokalisiert nahe der Stentstreben vorhanden war. Interessanterweise zeigte sich im Gruppenvergleich der Langzeittiere in der Hydrogelgruppe die geringste Ausprägung.

**Tabelle 5.** Diffuses Ödem in der Neointima der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	8	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	7	-	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	1	6	-	-

**Tabelle 6.** Ödem in der Neointima nahe der Stentstreben

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	8	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	2	5	-	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	3	4	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	1	6	-	-

### 3.4.2 Schaumzellen

Schaumzellen sind lipidspeichernde Makrophagen und entstehen im Rahmen resorptiver Prozesse. In die Auswertung gingen nur die nahe der Stentstreben gelegenen Zellen ein.

Im Zeitverlauf von vier Tagen zu sechs Wochen zeigte sich eine starke Zunahme dieser Entzündungszellen, während sie zu beiden Zeitpunkten jeweils in der Therapiegruppe am häufigsten vorhanden waren.

**Tabelle 7.** Schaumzellen in der Neointima nahe der Stentstreben

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	8	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	2	5	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	5	2	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	-	5	1	1
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	2	5	-

### 3.4.3 Fibrose

Die Fibrose stellt morphologisch eine Vermehrung des Bindegewebes aufgrund adaptiver bzw. reaktiver Veränderungen dar. Durch einen mechanischen Reiz (Stent) werden eingewanderte oder ortsansässige Fibroblasten zur Produktion extrazellulärer Matrix angeregt. Zur Auswertung der Präparate begutachtete man sowohl bei den 4-Tages- wie auch bei den 6-Wochen-Tieren das Ausmaß dieses Merkmals in der Adventitia und der Intima, wobei in letzterem wieder besonders der Bereich um die Strebe geprüft wurde.

In der Adventitia der Gefäße zeigte sich hierbei eine früh (bei den 4-Tages-Tieren) vorhandene Fibrosebildung, die im Laufe der Zeit noch an Ausmaß zunahm. Im Gegensatz dazu war diese Gewebsveränderung in der Neointima vier Tage nach Stentapplikation nur äußerst gering ausgeprägt, während dort nach sechs Wochen ebenfalls deutliche Zeichen fibröser Umbauvorgänge zu sehen waren.

**Tabelle 8.** Fibrose in der Adventitia der Stentpräparate

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	1	6	1	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	4	3	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	-	7	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	1	6	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	3	4	-	-

**Tabelle 9.** Fibrose in der Neointima nahe der Stentstreben

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	7	1	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	6	1	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	4	3	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	1	5	1	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	4	3	-

### 3.4.4 Fibrinablagerungen in der Neointima

Eine Beurteilung der Fibrinablagerung fand ausschließlich in der Neointima nahe der Stentstreben statt. Bei der Auswertung unserer Präparate konnte vor allem in den 4-Tages-Tieren eine große Menge dieser Substanz registriert werden, welche im Laufe der Zeit abnahm und nach sechs Wochen nur noch gering vorhanden war. Im Gruppenvergleich der Kurzzeittiere zeigte sich in der Kontrollgruppe die stärkste Ausprägung, während sechs Wochen nach dem Eingriff in der Hydrogelgruppe das meiste Fibrin beobachtet wurde.

**Tabelle 10.** Fibrinablagerung in den Stentpräparaten nahe der Streben

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	-	4	4	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	2	4	1	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	3	4	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	5	1	1	-

### 3.4.5 Granulozytäre Infiltrate

Als Teil der Entzündungsreaktion wandern polymorphkernige Granulozyten in das Zielgewebe ein und sind hierbei maßgeblich an dem Verlauf und dem Fortbestehen der entzündlichen Immunantwort beteiligt. Dieser Parameter ist fast ausschließlich vier Tage nach Stentapplikation vorhanden, wobei zu diesem Zeitpunkt vor allem die Kontrollgruppe eine massive Infiltration von Granulozyten aufweist.

**Tabelle 11.** Granulozytäre Infiltrate in der Neointima um die Stentstreben

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	-	4	4	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	2	5	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	6	1	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	6	1	-	-

### 3.4.6 Mononukleäre Infiltrate

Ebenso wie die bereits beschriebenen polymorphkernigen Granulozyten sind Monozyten zur Migration, Infiltration und Phagozytose befähigt und treten im Rahmen entzündlicher Prozesse auf.

Betrachtet man die Adventitia der Stentpräparate, so lässt sich dort bei allgemein geringer Existenz mononukleärer Zellen nur in den Kontroll-Schnitten der 6-Wochen-Tiere eine starke Infiltration dieser Entzündungszellen erkennen.

**Tabelle 12.** Mononukleäre Infiltrate in der Adventitia der Stentpräparate

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	8	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	4	3	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	1	-	6	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	5	2	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-

In der Intima fehlen die Monozyten vier Tage nach Stentimplantation noch vollständig, während sie dort nach sechs Wochen vor allem in der Hydrogel- und Therapiegruppe vorhanden sind.

**Tabelle 13.** Mononukleäre Infiltrate in der Intima der Stentpräparate

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	8	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	6	-	1	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	2	5	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	7	-	-

### 3.4.7 Kalzifikationen

Kalzifikationen wurden lediglich in der Media beurteilt, da sie anderenorts in keinem der Präparate existierten. Vier Tage nach der Stentapplikation waren sie ebenfalls in keiner der Gruppen erkennbar. Nach sechs Wochen konnten sie dagegen vor allem in der Kontroll- und Hydrogelgruppe nachgewiesen werden, während in der Therapiegruppe kein einziger Schnitt eine mediale Verkalkung aufwies.

**Tabelle 14.** Kalzifikationen in der Media der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	8	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	4	3	-	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	4	3	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-

### 3.4.8 Destruktion elastischer Lamellen

Zur Beurteilung der Destruktion elastischer Lamellen in der Media wurde vor allem der Bereich der Stentstrebe in Augenschein genommen. Dort konnte in allen Präparaten eine mechanisch bedingte Kompression mit nachfolgender Faserfragmentation beobachtet werden. Dabei war weder zwischen den verschiedenen Beschichtungsgruppen noch zwischen Kurz- und Langzeittieren ein Unterschied festzustellen.

### 3.4.9 Atrophie glatter Muskulatur

Im Bereich der Stentstrebe wurden die medialen Muskelzellen ebenso wie die schon beschriebenen elastischen Lamellen durch den Druck der Strebe komprimiert. Daraus resultierte an diesen Stellen eine Druckatrophie mit kompensatorischer Hyperplasie zwischen den Streben. Dieses Ergebnis konnte in fast allen Schnitten beobachtet werden, wobei die Atrophie in den Präparaten der 6-Wochen-Tiere stärker ausgeprägt war als bei den 4-Tages-Tieren. Einzig die Kontrollgruppe der Langzeittiere fiel insofern aus dem Rahmen, als dass nur knapp die Hälfte aller Präparate eine Atrophie aufwies.

**Tabelle 15.** Atrophie glatter Muskelzellen in der Media an den Stentstreben

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Kriteriums (n)	
		0	1
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	1	7
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	-	7
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	4	3
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	-	7
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	7

### 3.4.10 Vessel Injury Score

Der Grad der Gefäßwandverletzung durch den Stent wurde mit Hilfe des Vessel Injury Score (VIS) nach Schwartz et al.<sup>54</sup> in einer etwas modifizierten Form erfasst. Die Einteilung in die verschiedenen Ausprägungsgrade erfolgte wie bereits in Kapitel 2.7.5.3 beschrieben und dort in Tabelle 3 aufgelistet.

Bei der Auswertung der eigenen Präparate ergab sich in den Gefäßen der Kurzzeittiere ein durchweg geringerer VIS, obwohl alle Tiere einer identisch ausgeführten Prozedur unterzogen wurden. Im Allgemeinen waren die Werte jedoch in allen Präparaten niedrig und unterschieden sich nur geringfügig zwischen den Gruppen.

**Tabelle 16.** Vessel Injury Score nach Schwartz et al.<sup>54</sup> in den Stentsegmenten

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	4	4	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	6	1	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	3	4	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	-	3	4	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	7	-	-

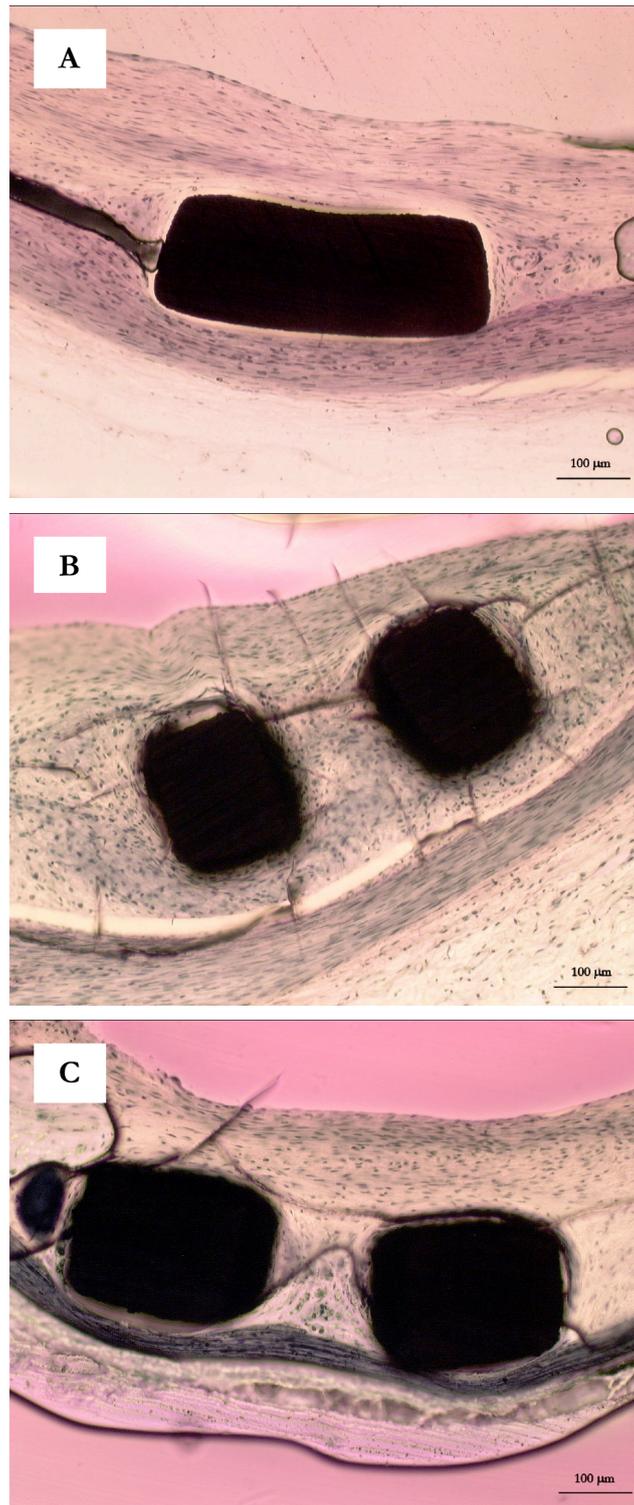
### 3.4.11 Inflammation Score

Um das Ausmaß und die Dichte der entzündlichen Infiltrate an jeder einzelnen Strebe in der Neointima möglichst einheitlich zu erfassen und die Werte auch vergleichen zu können, erfolgte die Einteilung in einen Inflammation Score (IS). Dieser wurde 1998 von Kornowski et al.<sup>56</sup> aufgestellt und bei der Auswertung unserer Präparate nur leicht verändert. Die Beschreibung des zur Klassifizierung der Gefäßwandveränderungen zugrunde liegenden Schemas erfolgte bereits in Kapitel 2.7.5.4 und ist dort in Tabelle 4 dargestellt.

In unseren Präparaten fand sich in beiden 4-Tages-Gruppen ein identisches Bild mit durchweg geringen Werten. Dagegen konnte in den Schnitten der 6-Wochen-Tiere starke gruppenspezifische Abweichungen ausgemacht werden. Und zwar unterschied sich in der Hydrogelgruppe das Ausmaß der entzündlichen Veränderungen doch deutlich von dem der beiden anderen Gruppen (Tabelle 17, Abbildung 18). Der durchschnittlich geringste IS konnte in der Therapiegruppe verzeichnet werden.

**Tabelle 17.** Inflammation Score nach Kornowski et al.<sup>56</sup> in den Stentpräparaten

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	-	8	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	-	7	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	6	1	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	-	-	5	2
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	6	-	1



**Abbildung 18.** Morphologische Struktur der Neointima in der Gefäßwand der verschiedenen Gruppen: leichte diffuse Infiltration von Entzündungszellen um eine Stentstrebe mit niedrigem Inflammation Score (IS = 1) bei der Kontroll- (A) und Therapiegruppe (C); lokal, mäßig dichte Zellaggregate im Bereich um die Strebe, deutlich Schaumzellen vorhanden in der Hydrogelgruppe (B), höherer Inflammation Score (IS = 2)

### 3.4.12 Endothel

Zur Darstellung des Endothels wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung vorgenommen. Durch spezifische Markierung des von-Willebrand-Faktors konnte diese in Übersichtsfärbungen sonst schlecht sichtbare Zellschicht besonders hervorgehoben werden. Bei der Auswertung unserer Gefäßschnitte wurde die Reendothelisierung nur in den 6-Wochen-Präparaten begutachtet und wie in Kapitel 2.7.5.1 beschrieben beurteilt.

Es resultierte eine komplette Endothel-Neubildung in der Hydrogel- und Therapiegruppe der Langzeittiere, während in der Kontrollgruppe nur etwas mehr als die Hälfte der Schnitte dieses Merkmal aufwies. In den Aortensegmenten der 6-Wochen-Tiere ließen sich gruppenunabhängig nahezu alle Präparate anfärben.

**Tabelle 18.** Anfärbung des Endothels in den Stentsegmenten

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Kriteriums (n)	
		0	1
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	3	4
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	-	7
<b>6 Wo CI</b>	(n = 6)	-	6

### 3.4.13 Makrophagen

Um eine optimale Darstellung der Makrophagen und Schaumzellen zu erhalten, wurde ferner die immunhistochemische RAM-Färbung eingesetzt. Dies ermöglichte eine bessere Beurteilung dieser vor allem in der Neointima und Media gelegenen Entzündungszellen. Bei den Langzeit-Tieren waren RAM-positive Zellen durchgehend nahe den Stentstreben und submedial nachweisbar. Die Media selbst und die Adventitia enthielten nur wenig Makrophagen. Bei den Kurzzeit-Tieren waren RAM-positive Zellen – wenn überhaupt – nur an den Stentstreben nachweisbar.

In den Stentpräparaten der 4-Tages-Tiere ließen sich in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr RAM-positive Zellen erkennen. Im Gegensatz dazu hatte sechs Wochen nach dem Eingriff der Anteil der positiv angefärbten Zellen in der Kontrollgruppe zugenommen, während er in der Therapiegruppe nahezu unverändert blieb. Interessanterweise waren die meisten Makrophagen zu diesem Zeitpunkt in der Hydrogelgruppe zu finden.

**Tabelle 19.** Makrophagen in der Neointima der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	7	1	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	1	4	2	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	1	5	-	1
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	-	2	2	3
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	-	7	-	-

In den Aortenpräparaten konnten bei den 4-Tages-Tieren nur wenige RAM-positive Zellen nachgewiesen werden. Sechs Wochen nach der Intervention kam es dagegen generell zu einer Steigerung des Makrophagen-Anteils. Die höchste Dichte dieser Zellen ließ sich hierbei wieder in der Hydrogelgruppe finden, die niedrigste in der Therapiegruppe.

**Tabelle 20.** Makrophagen in der Neointima der Aortensegmente

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Ausprägungsgrades (n)			
		0	1	2	3
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	6	2	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	7	-	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	6	1	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	1	2	4	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	4	3	-	-

### 3.4.14 Atherosklerosestadien

Mit unserem Tiermodell sollte die „natürliche“ Veränderung der arteriellen Gefäßwand beschleunigt simuliert werden. So war es von Bedeutung, dass auch in den ungestenteten Aortenstücken Zeichen von Atherosklerose zu erkennen waren. Für die Einteilung der dabei gefundenen Gefäßveränderungen wurde die Klassifikation nach Sary et al.<sup>95</sup> herangezogen (siehe Kapitel 2.7.5.5).

Bei den 4-Tages-Tieren fand sich hierbei keine oder nur eine geringe Umgestaltung der Gefäßwand. Wie schon in Kapitel 2.3.1 beschrieben, erhielten alle Tiere vier Wochen lang vor dem Eingriff cholesterinhaltiges Futter, welches mutmaßlich für diese Veränderungen verantwortlich war. Interessanterweise fand sich aber sechs Wochen nach der Stentapplikation und dem Absetzen des Cholesterinfutters ein deutlich größerer Anteil an atherosklerotisch veränderten Präparaten wie auch im allgemeinen eine Erhöhung der jeweiligen Schweregrade. In nachstehender Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei nicht aufgeführte Präparate keinerlei Läsionen aufwiesen.

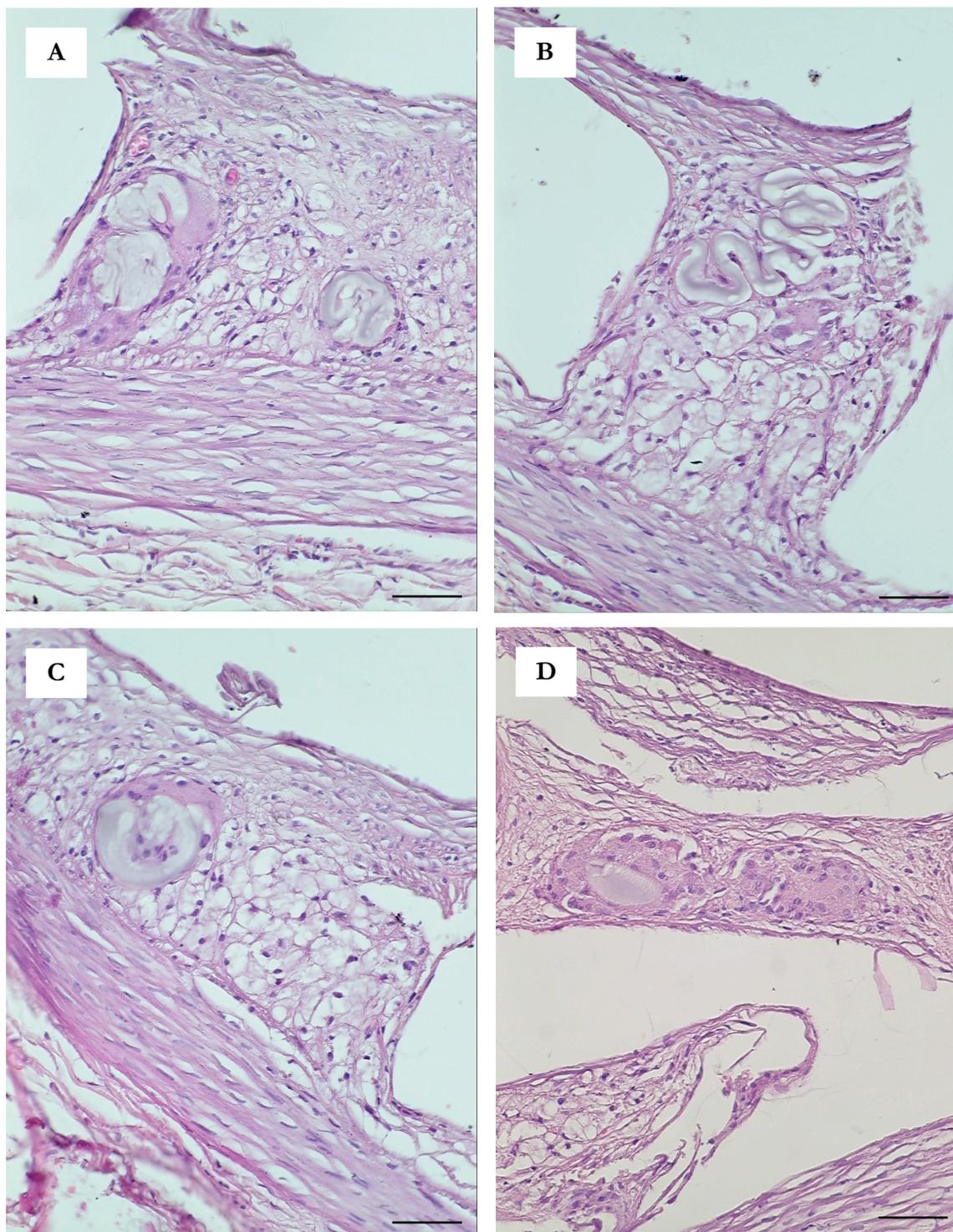
**Tabelle 21.** Einteilung der atherosklerotischen Plaques der Aortenpräparate in die Typen nach Sary et al.<sup>95</sup>

Gruppe	Anzahl	Häufigkeit des Stadiums (n)							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<b>4 Tage Ko</b>	(n = 8)	1	1	-	-	-	-	-	-
<b>4 Tage CI</b>	(n = 7)	1	-	-	-	-	-	-	-
<b>6 Wo Ko</b>	(n = 7)	-	3	3	1	-	-	-	-
<b>6 Wo H</b>	(n = 7)	1	4	1	1	-	-	-	-
<b>6 Wo CI</b>	(n = 7)	1	1	3	-	-	-	-	-

### **3.4.15 Globale Betrachtung der Histopathologie**

#### **3.4.15.1 Besonderheiten**

Als Besonderheit fand sich in den beiden Gruppen mit den beschichteten Stents eine Ablösung der dabei verwendeten Trägersubstanz. Das Hydrogel ließ sich histologisch eindeutig identifizieren und war in den Langzeit-Schnitten mit dem neugebildeten Intimagewebe fest verwachsen. Durch diesen zusätzlichen Fremdkörper bildeten sich strebennah regelmäßig pseudogranulomatöse Entzündungsherde mit Ansammlung von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen in Verbindung mit lymphoplasmazellulären Infiltraten. Einige beispielhafte Bilder sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19.** Plaquestruktur mit abgelöstem Hydrogel in den Präparaten der Hydrogel- (D) und Therapiegruppe (A-C); um das transparent erscheinende Gel gruppieren sich mehrkernige Riesenzellen vom Touton-Typ in Verbindung mit lymphoplasmazellulären Infiltraten; es handelt sich hierbei um eine pseudogranulomatöse Entzündung vom Fremdkörpertyp (die Länge des Balkens am rechten Unterrand der Bilder entspricht 50  $\mu\text{m}$ )

### 3.4.15.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Keines der Tiere entwickelte eine akute oder subakute Stentthrombose, während sich das Lumen aller untersuchten Gefäße stets offen zeigte. Durch die Implantation des Stents wurden alle Wandschichten zusammengedrückt, was sich vor allem auf die Media im Sinne einer mechanischen Komprimierung im Bereich der Stentstreben auswirkte. Es ließ sich dort außerdem ein generell „unruhiges“ Gewebe erkennen, in dem die Muskelzellen nicht parallel angeordnet waren und zudem eine elastische Faserfragmentation auftrat. Weitere Veränderungen der Gefäßwand waren eine mit der Zeit fortschreitende Verbreiterung und Fibrosierung der Adventitia in Verbindung mit dem vereinzelt auftretenden Vasa vasorum. Das mit der Zeit wachsende neointimale Proliferationsgewebe enthielt neben anderen Entzündungszellen vor allem massenhaft Schaumzellen. Im Hinblick auf die Stentimplantation als Auslöser einer Entzündungsreaktion lässt sich sagen, dass alle Gefäße gruppenunabhängig als geheilt eingestuft wurden und sich ferner keine Hinweise auf Instabilität der sich gebildeten Plaque finden ließen.

In folgender Tabelle sind die wichtigsten histologisch sowie morphometrisch gefundenen Ergebnisse vergleichend aufgelistet. Zur Erstellung der Daten wurde dabei wie in Kapitel 2.7.5.6 beschrieben vorgegangen und die einzelnen Werte der jeweiligen Gruppen zu Mittelwerten zusammengefasst.

**Tabelle 22.** Zusammenfassung der histologischen und morphometrisch gemessenen Ergebnisse

	4 Tage		6 Wochen		
	Ko (n=8)	CI (n=7)	Ko (n=7)	H (n=7)	CI (n=7)
<b>Schaumzellen Neointima</b>	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,8	1,7 ± 0,5
<b>Fibrin</b>	1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,8
<b>Granulozyten Strebe</b>	1,5 ± 0,5	0,7 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,4
<b>Monozyten Neointima</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,8	0,7 ± 0,5	1,0 ± 0,0
<b>Endothel</b>	-	-	0,6 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
<b>Makrophagen Neointima</b>	0,1 ± 0,4	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,9	2,1 ± 0,9	1,0 ± 0,0
<b>Vessel Injury Score</b>	0,5 ± 0,5	0,1 ± 0,4	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,5	1,0 ± 0,0
<b>Inflammation Score</b>	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,4	2,3 ± 0,5	1,3 ± 0,8
<b>Neointimafläche Stent (mm<sup>2</sup>)</b>	0,06 ± 0,05	0,0 ± 0,0	1,51 ± 0,60	2,56 ± 1,31	1,81 ± 0,56
<b>Mediafläche Stent (mm<sup>2</sup>)</b>	0,98 ± 0,11	0,90 ± 0,11	0,75 ± 0,18	0,89 ± 0,10	0,96 ± 0,15

## 4 Diskussion

### 4.1 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Studie wurde ein Kaninchen-Modell dazu benutzt, den Effekt der Stentbeschichtung einer entzündungshemmenden Substanz auf den Grad der In-Stent Restenose zu untersuchen. Ziel dabei war es, eine genaue Beschreibung der Entzündungsreaktion in unterschiedlichen Phasen nach Stentapplikation sowie eine mögliche therapeutische Auswirkung des benutzten Medikaments auf die neointimale Proliferation zu finden.

### 4.2 Material- und Methodenkritik

#### 4.2.1 Tiermodell

Das Auftreten einer Restenose nach Stentimplantation ist ein komplexes Geschehen vielfältiger Ursachen. Die Kenntnis der Pathophysiologie dieser Ereignisse ist erforderlich, um gezielte Maßnahmen zur Prävention zu ergreifen. Durch mehrere Faktoren sind der klinischen Forschung auf diesem Gebiet Grenzen gesetzt. Stents werden beim Menschen in Gefäße eingesetzt, deren Schädigung sich über einen langen Zeitraum entwickelt hat und außerdem multifaktoriell bedingt ist. Die Anwendung eines Tiermodells hat zum Vorteil, dass dort atherosklerotische Plaques in kurzen Zeiträumen entstehen und Einflussfaktoren kontrolliert werden können.<sup>96</sup> Alle Tiere in unserem Versuch stammten aus einer Zucht, wurden unter den gleichen Bedingungen aufgezogen und unterhalten und bekamen das identische Futter verabreicht.

Hinzu kommt, dass klinische Studien mit hohem organisatorischen Aufwand und enormen Kosten verbunden sind. Versuche am Tier dagegen können zu einer Vereinfachung und Abkürzung des Experiments führen und sparen somit auch Gelder.<sup>59,60</sup> Weiterhin sollten zum Verständnis der Geschehnisse Aussagen auf zellulärer und pathohistologischer Ebene getroffen werden können. Dazu ist man weitgehend auf Tiermodelle angewiesen.<sup>97</sup>

Die zentrale Frage bei Gebrauch eines Tiermodells ist natürlich, inwieweit die Übertragbarkeit der Ergebnisse für diese eine Fragestellung gegeben ist. Um die gefundenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, ist in unserem Fall eine möglichst exakte Simulation der humanen In-Stent Restenose beim Tier vonnöten. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass induzierte Veränderungen im Tiermodell den Vorgängen im Menschen möglichst nahe kommen sollten, diese Voraussetzung jedoch nie vollständig erreicht werden kann. Trotzdem ist es wichtig und für neue Therapiemöglichkeiten unabdingbar, mit solchen Modellen zu arbeiten.

#### **4.2.1.1 In der Atherosklerose- und Restenoseforschung verwendete Tierarten**

In der Atherosklerose- und Restenoseforschung verwendete Tiere sind unter anderem Kaninchen, Mäuse, Ratten, Schweine, Hunde und Affen.

Obwohl sich in der Maus eine dem Menschen ähnliche atherosklerotische Läsion induzieren lässt<sup>98,99</sup>, ist sie ebenso wie die Ratte trotz Vorteilen in Haltung und Kosten für eine Stentimplantation ungeeignet, da sie hierfür zu klein ist.<sup>100</sup>

Das Kaninchen war das erste in der Atherosklerose-Forschung eingesetzte Versuchstier und ist bis heute neben dem Schwein das am häufigsten verwendete. Bereits 1913 induzierten Anitschow und Chalатов beim Kaninchen atherosklerotische Plaques durch Gabe eines cholesterinhaltigen Futters.<sup>101-103</sup> Dieses Modell bietet Vorteile einer kostengünstigen und einfachen Haltung wie auch die Ausbildung reproduzierbarer atherosklerotischer Veränderungen innerhalb kürzester Zeit.<sup>96,104,105</sup> Die Größe der Iliacal-Gefäße und der infrarenalen Aorta eines ausgewachsenen Tieres entspricht ungefähr der einer menschlichen Koronararterie und ist damit groß genug, um operative Eingriffe vornehmen zu können und sie einer histologischen Aufarbeitung zuzuführen. Ein Nachteil ist, dass das Kaninchen ein reiner Pflanzenfresser ist, deshalb bestehen auch im Vergleich zum Menschen Unterschiede in der Plaquezusammensetzung. Diese Plaques enthalten hauptsächlich Schaumzellen und zeigen nur eine geringe Neigung, komplexe Läsionen mit Nekrosen, Ulzerationen, Verkalkungen und dergleichen

auszubilden. Allerdings lassen sie sich schon durch geringe Beimengung von Lipiden induzieren, was beim Menschen einen komplexeren und längeren Prozess erfordern würde.<sup>106</sup> Ferner kann durch Ballondilatation der großen Gefäße im normalen Kaninchen eine beachtliche proliferative Antwort glatter Muskelzellen beobachtet werden, welcher vor allem in der Pathogenese der Restenose eine entscheidende Rolle zukommt.<sup>107,108</sup> Die Lokalisation der atherosklerotischen Läsionen im Gefäßbaum kann beim Menschen und Kaninchen verschieden sein. Während beim Menschen insbesondere die mittleren und großen Arterien betroffen sind, treten Cholesterin-induzierte Läsionen beim Kaninchen vor allem in der thorakalen Aorta auf, wobei auch regelmäßig kleinere Arterien in den atherosklerotischen Prozess mit einbezogen sind.<sup>96</sup>

Im kardiovaskulären System des Schweins ist die Plaquestruktur vergleichbar mit der des Menschen, ebenso wie die Entzündungsreaktion und Thrombenbildung nach Stentimplantation.<sup>109</sup> Die Größe des Schweins bietet einen weiteren Vorteil für Forschungszwecke, bei denen mehrere und größere operative Eingriffe notwendig sind. Allerdings werden Schweine ebenso wie Hunde aufgrund Nachteilen wie aufwendiger Haltung und hoher Kosten seltener benutzt.<sup>58,110</sup> Außerdem sind bei diesen Tieren nur wenige Antikörper für die Immunhistochemie erhältlich.<sup>100</sup>

Beim Primaten sind die atherosklerotischen Läsionen in allen Stadien denen des Menschen sehr ähnlich, während jedoch nach Ballonverletzung speziesabhängig enorme Unterschiede in der Histologie auftreten.<sup>96,106</sup> Auch die Lokalisation der Plaques und das Lipoproteinprofil stimmen weitgehend mit dem des Menschen überein.<sup>96</sup> Leider schränken hohen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten wie auch die enorme Krankheitsanfälligkeit und die erforderlichen speziellen Kenntnisse im Umgang mit diesen Tieren deren Gebrauch ein.<sup>60,106</sup> Zusätzlich treten besonders bei dieser Tierart ethische Bedenken in den Vordergrund.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass derzeit das Schwein am geeignetsten für die Restenoseforschung zu sein scheint, an zweiter Stelle steht das Kaninchen.<sup>12,60</sup> Es gilt jedoch zu beachten, dass nicht ohne weiteres eine Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Mensch stattfinden kann. Die komplizierten

Vorgänge, die durch eine Verletzung der Gefäßwand beim Menschen hervorgerufen werden, lassen sich bisher in keinem Tiermodell nachvollziehen.<sup>58,106</sup> Ebenso muss die unterschiedliche Wirkung von Pharmaka zwischen den Spezies beachtet werden. Metabolismus, Gewebepenetration und Wirkungen können variabel sein. Außerdem könnten nach einer Stentimplantation gefundene Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen in Tiermodellen und denjenigen in klinischen Studien ihre Ursache auch in Unterschieden der benutzten Technik, dem Dehnungsgrad von Stent und Gefäß sowie des Verletzungstyps haben. Aufgrund der Komplexität der Gefäßantwort auf eine Verletzung ist es also nicht verwunderlich, dass in dieser Hinsicht speziesabhängig gewaltige Abweichungen auftreten.

#### **4.2.1.2 Wahl des Kaninchenmodells**

Für die vorliegende Studie wurde das Kaninchen als Versuchstier gewählt. Gründe hierfür waren vor allem der einfache Umgang mit diesen Tieren sowie bereits erfolgreich durchgeführte Studien derselben Arbeitsgruppe. Die Kosten für eine statistisch aussagekräftige Anzahl von Kaninchen sind vertretbar. Ferner steht eine breite Auswahl an Antikörpern für die Immunhistochemie zur Verfügung.<sup>100</sup> Dabei ist die benutzte infrarenale Aorta für die Stentimplantation groß genug und auch der Zugang mittels Katheter zu diesem Gefäß wirft keinerlei Probleme auf.

Obwohl das Kaninchen noch nicht häufig eingesetzt wurde, um pharmakologische Möglichkeiten zur Prävention der Restenose zu erforschen<sup>111,112</sup>, so konnten doch schon zahlreiche Studien zur Untersuchung der pathophysiologischen Effekte nach Ballon-Dilatation<sup>91,107,108,113</sup> und Stentimplantation<sup>114-118</sup> realisiert werden. Weiterhin zeigte sich, dass bei anderen Arten lokal arteriell applizierter Therapie, wie z.B. die Brachytherapie, die im Kaninchenmodell gefundenen Ergebnisse als besonders repräsentativ für die später im Menschen aufgetretene Gefäßantwort angesehen werden konnten.<sup>111</sup>

Daher könnte besonders dieses Modell trotz Unterschiede in der Plaquemorphologie im Vergleich zum Menschen dazu dienen, neue Erkenntnisse im Hinblick auf eine mögliche Therapie der In-Stent Restenose zu gewinnen.

## 4.2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Die gesamte Tierpopulation teilte sich in drei verschiedene Versuchsgruppen auf: keine Beschichtung (Ko) vs. nur Hydrogelbeschichtung (H) vs. Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Esterase-Inhibitor (CI). Diese Strategie hatte zum Ziel, dass dadurch die Beschichtung mit dem Trägerprotein im Vergleich zum unbehandelten Stent untersucht werden konnte, um somit eine Aussage über dessen alleinigen Effekt auf die Entzündung zu treffen. Ferner sollte damit auch die vom Hydrogel unabhängige Auswirkung des Medikaments auf die Gefäßantwort erforscht werden. Als Kompromiss zwischen wissenschaftlichen Ansprüchen und ethischen Gesichtspunkten war der Versuch so aufgebaut, dass schließlich pro Gruppe zwischen sieben und acht Tiere gewertet werden konnten.

Zusätzlich zu dieser Einteilung wurde in unserem Tierexperiment versucht, das Ergebnis unterschiedlicher Beschichtungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Stentimplantation (vier Tage vs. sechs Wochen) zu untersuchen. Als einflussreiche Arbeit erforschten Kornowski et al.<sup>56</sup> schon 1998 am Schweinemodell die Bedeutung der Entzündungsreaktion nach Stentimplantation und beschrieben die Korrelation der Entzündungsstärke zur Neointimadicke. Dabei wird als eine der Limitationen dieser Studie angesehen, dass morphologische und histologische Ergebnisse lediglich 28 Tage nach Stentimplantation erhoben wurden. Wie die inflammatorische Reaktion sich zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt ausprägt und inwieweit sich das Resultat durch eine medikamentöse Therapie beeinflussen lässt, ist weiterhin nur unzureichend bekannt. Durch die in unserer Studie gewählten unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkte sollte somit eine Aussage über den Verlauf der Histologie und Morphometrie über die Zeit gemacht werden. Erfahrungsgemäß ist beim Kaninchen nach sechs Wochen der Heilungsprozess des Gefäßes auf die Stentverletzung abgeschlossen, so dass diese auch für eine medikamentöse Beeinflussung interessante Zeitspanne mit unseren Langzeittieren abgedeckt ist.

### **4.2.3 Material**

#### **4.2.3.1 Wahl des Stents**

In unserer Studie wurden ballonexpandierbare Stents benutzt. Diese aus einem biokompatiblen rostfreien Stahlgeflecht bestehenden Gefäßstützen werden in der Humanmedizin in stenotische Gefäßabschnitte eingesetzt und bleiben dort auch liegen. Das Problem bei dieser Methode ist, dass der Stent als fortwährender „Fremdkörper“ eine chronische Abwehrreaktion des menschlichen Organismus hervorruft wie sie auch bei anderen nichtorganischen Materialien beobachtet werden kann.

Mögliche Alternativen zu dieser Stentart stellen selbstexpandierbare sowie die sogenannten „biodegradable“ Stents dar. Letztere sollen sich im Laufe der Zeit auflösen und somit zumindest theoretisch die chronische Entzündungsantwort des Gefäßgewebes, die nach der Implantation eines metallenen Stent beobachtet wird, verhindern.<sup>119</sup> Trotz hohem Potential auch in Hinsicht auf eine medikamentöse Beschichtung sind diese Stents noch nicht weit genug ausgereift und stellen zumindest im Augenblick keine Wahlmöglichkeit bei der Behandlung atherosklerotisch verengter Gefäße dar.

#### **4.2.3.2 In der Forschung verwendete Beschichtungsarten**

Im Gegensatz zur Restenose nach alleiniger Angioplastie basiert die In-Stent Restenose auf proliferativen Prozessen, wobei das Ausmaß der intimalen Hyperplasie ausschlaggebend für den Grad der Restenose ist. Die heutzutage in der Praxis eingesetzten Stents vermindern nicht, sondern erhöhen sogar die proliferative Komponente der Restenose.<sup>18</sup> Neueste Erkenntnisse in der Erforschung zur Prävention dieser Therapiekomplication haben gezeigt, dass der Inflammation eine besondere Wichtigkeit zukommt.<sup>56</sup> Der in das Gefäß platzierte Stent ruft eine Wandverletzung hervor, ferner korreliert die Stärke bzw. Tiefe dieser Schädigung mit der darauf folgenden entzündlichen Antwort.<sup>56</sup> Eine relativ neue und faszinierende Idee zur Behandlung der In-Stent Restenose stellt die Beschichtung der Stents mit einer antiproliferativen Beschichtung dar. Frühere Studien mit

radioaktiv beschichteten Stents konnten zwar eine Senkung des Restenose-Grades nachweisen, jedoch traten bei dieser Strategie Stenosen vor allem im Bereich der Stentenden auf, auch als sogenannter „candy wrapper“ Effekt bekannt.<sup>48-51,120,121</sup> Gerade im Hinblick auf die Entzündung als bedeutenden Faktor der In-Stent Restenose könnte sich das Prinzip des „drug-eluting stent“ als sinnvoll erweisen. Dabei wird auf den Stent mit Hilfe einer Trägersubstanz ein Medikament aufgebracht, das antiproliferativ und insbesondere entzündungshemmend wirken soll. Als solche Trägersubstanzen wurden anfangs Polymere verwendet, die jedoch selber eine starke entzündliche Antwort hervorriefen. So konnte Giessen et al. nachweisen, dass bei diesen polymer-beschichteten Stents eine verstärkte Entzündungsreaktion im Vergleich zu unbeschichteten Stents resultierte.<sup>122</sup> Erst mit der Benutzung von auf phosphoryl-basierenden Polymeren konnten diese Nebeneffekte beseitigt und so die Wirksamkeit verschiedener Medikamente getestet werden. Für mehrere Stoffe konnte in Tierversuchen eine langsame Freisetzung und eine Assoziation mit verminderter Neointima-Bildung gezeigt werden.<sup>111,123-125</sup> Die zwei erfolgversprechendsten Medikamente (Sirolimus und Paclitaxel) wurden kürzlich erstmals in klinischen Pilotstudien angewendet.

Sirolimus (Rapamycin), ein natürliches makrozyklisches Lakton, ist eine potente immunsupprimierende Substanz mit antientzündlichen sowie antiproliferativen Eigenschaften. Es handelt sich dabei um ein hydrophobes Medikament, welches eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien aufweist<sup>126</sup> und im Jahr 1999 eigentlich für die prophylaktische Behandlung der Abstoßung transplantierte Nieren entwickelt wurde.<sup>127</sup> Wegen seiner guten Fettlöslichkeit kann es leicht Zellmembranen passieren, verteilt sich gut im Gewebe und bewirkt gleichzeitig eine verlängerte Speicherung im arteriellen Gewebe.<sup>126</sup> Anfänglich bindet Sirolimus an ein intrazelluläres Rezeptorprotein und löst dort eine Aktionskaskade aus, welche schlussendlich in einem Stillstand des Zellzyklus endet. Es hemmt in vitro die Proliferation glatter Muskelzellen<sup>128,129</sup> und bewirkte in Tiermodellen eine Verringerung der Intimagröße künstlich verletzte Gefäße.<sup>126,128,130</sup>

Bei Paclitaxel (Taxol) handelt es sich ebenfalls um eine antineoplastische Substanz mit stark lipophilen und wenig hydrophilen Eigenschaften. Diese Merkmale machen es zu einem exzellenten Mittel für lokale Medikamentenapplikation durch einen Stent und prolongierter Speicherung in atherosklerotisch veränderten Gefäßen. Der Aktionsmechanismus von Paclitaxel beruht auf der Polymerisation von Tubulin, was die Bildung unnormale stabiler und nicht funktionstüchtiger Mikrotubuli zur Folge hat.<sup>131,132</sup> Dies wiederum führt zu einem Stopp der Zellteilung.<sup>133</sup> Wie auch schon für Sirolimus beschrieben, so zeigten auch mit diesem Medikament durchgeführte *in vitro* Studien eine Hemmung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.<sup>134,135</sup>

#### **4.2.3.3 Wahl der Beschichtung**

Wie schon in Kapitel 2.2.2 erwähnt, wendeten wir für unseren Versuch ein Verfahren an, das ursprünglich für die Herz-Thorax-Chirurgie entwickelt wurde. Der bei diesem Einsatz festgestellte positive Effekt sollte auch beim Stent dazu verhelfen, die überschießende Antwort des menschlichen Organismus auf einen Fremdkörper zu bremsen. In einem Flussmodell konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Stent erfolgreich mit dem Medikament (C1/C3-Komplement-Inhibitor) dotiert werden konnte und die Beschichtung im Blutfluss nicht von der Stentoberfläche abgewaschen wurde.

Wie schon in 4.2.3.2 erläutert, kommt der Beschichtungssubstanz, die ein Anhaften des Medikaments an den Stent bewirken soll, eine besondere Bedeutung zu. Die von uns benutzte Trägersubstanz war ein Hydrogel, welches in allen möglichen Bereichen der Technik und der Medizin seit Jahrzehnten angewandt wird. Diese Substanz bietet dem Medikament eine Plattform und bewirkt somit ein Anheften an den Stent. Ferner kann durch die angewandte Methode eine einigermaßen gleichmäßige Verteilung des Hydrogels und damit des Medikaments über die Stentoberfläche gewährleistet werden. Schließlich führt der enzymatische Abbau des Gels zu einer langsamen Freisetzung des Medikaments.

Im Gegensatz zu derzeit bereits benutzten Substanzen (siehe 4.2.3.3) beruht unser Ansatz auf einer niedrigen Dosierung des Medikaments am Wirkort. Der Zweck

dieses Verfahrens war eine schnelle Heilung des verletzten Gefäßes sowie eine Verringerung der Fremdkörperreaktion auf die Stentstreben. Es sollte also mit der Beschichtung des Stents keine lokale Applikation des Medikaments in die Gefäßwand erreicht werden, sondern vielmehr die Eigenschaft der Stentoberfläche verbessert werden. Ziel war es, die in Kapitel 2.2.2.1 beschriebene Kaskade direkt an deren Beginn zu hemmen und nicht ausschließlich Folgeschäden zu therapieren. Bei der hier verwendeten Kombination aus C1- und C3-Komplement-Inhibitor handelt es sich um einen a priori untoxischen Stoff, der keine Langzeitkomplikationen erwarten lässt.

#### **4.2.4 Aufarbeitung der Präparate**

Wie in Kapitel 2.2.2 erläutert, wurden die Aortenpräparate samt Stent mit Hilfe eines Schneidegerätes aus der Dentaltechnik durchgeschnitten. Dabei kam es vor, dass bei der notwendigen Erzeugung dünner Präparatscheiben sich die Neointima durch die Rotationsbewegung des Sägeblattes teilweise ablöste und so die weitere Verarbeitung erschwerte wurde. Auch gestaltete sich die Entfernung der Stentstreben mittels Pinzette vor allem bei den Kurzzeit-Tieren mit geringer Intima schwierig, da häufiger Teile des Gewebes an den Streben hängen blieben. Ein Grund dieser Problematik könnte gewesen sein, dass durch die Ablösung des Hydrogels vom Stent und der damit verbundenen starken lokalentzündlichen Reaktion eine Verwachsung der Streben mit dem umliegenden Gewebe stattfand.

Es wurden deshalb bei der Auswertung für die Morphometrie hauptsächlich die mit der Methamethylakrylat-Methode eingebetteten Präparate verwendet, da dort die Schnitte mit Belassung der Stentstrebe angefertigt wurden. Die teilweise beschädigten Paraffin-Schnitte der 6-Wochen-Tiere wurden ausschließlich für die pathohistologische Auswertung benutzt, bei der es nicht auf die absolute Größe der Plaque, sondern vielmehr deren Zusammensetzung ankommt.

## **4.2.5 Auswertung**

Bei der Auswertung der gefärbten Präparate wurde darauf geachtet, dass nur für die Bewertung der Ergebnisse repräsentative Parameter bestimmt wurden. So wurden im Rahmen der Morphometrie – wenn möglich – Flächen anstatt Dicken verwendet, um aufgrund der Unregelmäßigkeit der Plaques eventuell auftretende Fehler zu minimieren. Die histopathologische Beurteilung der Präparate wurde unter Blindbedingungen von einem Pathologen vorgenommen. Dabei wurden nur Merkmale bestimmt, die die Gefäßveränderungen gut charakterisieren und auch im Bezug auf die Wahl der Beschichtung eine Aussage möglich werden lassen. Besonderer Wert wurde dabei auf Parameter gelegt, welche das Ausmaß der Entzündung beschreiben.

Während der statistischen Auswertung wurde bei einigen morphometrischen Parametern festgestellt, dass die erforderliche Normalverteilung der Werte nicht gegeben war. War dies der Fall, so wurde der Wilcoxon-Test (Kruskal-Wallis-Test) angewandt, um auf Signifikanz zwischen den Gruppen zu prüfen. Ferner wurde bisweilen eine starke Streuung der Werte beobachtet, was zu einer großen Standardabweichung führte.

Wie schon in Kapitel 4.2.1 beschrieben, konnten jedoch durch die Arbeit mit dem Tiermodell bestimmte Einflussfaktoren kontrolliert werden. Zahlreiche Größen, welche die Resultate verkomplizieren können, wurden dadurch eliminiert. Somit erhalten die gefundenen Ergebnisse mehr statistisches Gewicht und es können meist aus Tendenzen schon bedeutende Rückschlüsse auf den Therapieerfolg gezogen werden.

## **4.3 Bewertung der eigenen Ergebnisse**

### **4.3.1 Gesamtcholesterin im Plasma**

Obwohl zum Zeitpunkt der Operation zwischen den einzelnen Gruppen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Cholesterinkonzentration auftraten, war die spätere Plaquegröße in der unbehandelten Aorta davon unabhängig. Dieser Tatbestand lässt

darauf schließen, dass dieser Wert zumindest in unserem Versuch keinen Einfluss auf die Größe der sich gebildeten Neointima hatte.

### 4.3.2 Morphometrische Ergebnisse

Durch die Implantation eines Stents wird im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit Ballon-Angioplastie verhindert, dass elastische Rückstellkräfte zu einer Einengung des Lumens führen. Ausschlaggebend für das Auftreten der In-Stent Restenose ist das Ausmaß der Neointimaprolieration. Diese Antwort des Körpers auf die Gefäßverletzung wird morphologisch als Neointimafläche dargestellt. Oberste Priorität bei der Behandlung der In-Stent Restenose muss deshalb die Verkleinerung dieser Intimahyperplasie erhalten. Mehrere Studien mit unterschiedlicher Medikamenten-Beschichtungen<sup>111,123-125,136</sup> konnten bereits eine Verringerung der Neointima im Tier aufzeigen, wobei im klinischen Versuch noch keine Langzeitresultate vorliegen.

In unserem Fall konnte durch die gewählte Beschichtung keine signifikante Verminderung der Intimafläche erreicht werden, was aber wohl am ehesten auf die Auswahl der Trägersubstanz zurückzuführen ist (siehe 4.3.4). Es zeigte sich nämlich, dass in der Kontrollgruppe mit unbeschichteten Stents die geringste Neointima zu finden war. Dabei ergab sich eine signifikante Abweichung zur Gruppe mit reiner Hydrogelbeschichtung (Wilcoxon-Test:  $p=0,035$ ). Im Vergleich der Hydrogel- zur Therapiegruppe, bei der die Beschichtung zusätzlich das Medikament enthielt, ließ sich eine deutliche Verminderung der Intimafläche in den Therapiepräparaten feststellen (H:  $2,56 \pm 1,31 \text{ mm}^2$  vs. CI:  $1,81 \pm 0,56 \text{ mm}^2$ ). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für den histologisch ermittelten Stenosegrad, wobei sich hierbei nahezu identische Werte für die Kontroll- und Therapiegruppe finden ließen (H:  $27,7 \pm 11,5 \%$  vs. CI:  $22,8 \pm 8,7 \%$  vs. Ko:  $22,4 \pm 6,8 \%$ ).

Bei der Auswertung der Längsschnitte für die 6-Wochen-Tiere (siehe 3.2.3) konnte in keinem der Präparate ein Hinweis auf Veränderungen hinsichtlich einer übermäßigen Ausprägung intimaler Hyperplasie am Stentende gefunden werden. Eine solche bisher ausschließlich bei lokaler Bestrahlungstherapie (Brachytherapie)

aufgetretene Komplikation stellt eine unverhältnismäßig starke Proliferation wandständiger Zellen sowie fibrotische Umbauvorgänge am Rand des bestrahlten Gebietes dar. Des Weiteren konnte in diesen Präparaten aufgezeigt werden, dass in der Therapiegruppe an allen drei Positionen (Stent, Übergang, Aorta) das kleinste Intima- zu Mediadicke-Verhältnis zu finden war. Ein hoher Wert als Zeichen einer dicken Intima und dünner Media kann dabei als ungünstiger Faktor in Hinsicht auf eine Restenose angesehen werden. Dies wäre nämlich neben einer starken Proliferation der Neointima und folgender Lumeneinengung auch ein Zeichen für rückbildende Prozesse in den wandstabilisierenden Anteilen der Media relativ im jeweiligen Tier.

Die Aufgabe der Tunica media eines gesunden arteriellen Gefäßes ist die Steuerung der Gefäßweite als Mittel zur Kreislaufregulierung. In einem gestenteten Gefäßabschnitt geht diese Funktion durch die Formstabilität des Stents verloren, folgend tritt eine Atrophie der dort ansässigen glatten Muskelzellen ein. Diese Rückbildung der Media könnte eine Perforation des Gefäßes in diesem Bereich befürchten lassen, was aber in unseren Präparaten nicht zu beobachten war. Beim Gruppenvergleich waren die Mediaflächen in den Stentpräparaten durchweg mit denen in den Aortenpräparaten vergleichbar, wobei sich ein Missverhältnis zwischen der Fläche an den Streben (Druckatrophie) und der Fläche zwischen diesen (kompensatorische Hyperplasie) ergab (siehe 4.3.4).

### **4.3.3 Quantitative Zellzusammensetzung der Plaques**

Nach einer Dauer von sechs Wochen lag der Proliferationsindex im Stent bei  $0,35 \pm 0,50$  % und war damit gleich niedrig wie der Proliferationsindex in der Aorta ( $0,35 \pm 0,38$  %). Daraus lässt sich ableiten, dass in der im Versuch beobachteten Dauer von sechs Wochen der für die Interpretation der Prozesse erforderliche Zeitraum abgedeckt ist. Die meisten histologischen Veränderungen in der Gefäßwand – als Antwort auf den Verletzungsreiz des Stents – sollten damit in der Untersuchung erfasst worden sein. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ( $1,00 \pm 0,30$  %) und den beiden anderen Gruppen (H:  $0,02 \pm 0,02$  %, CI:  $0,03 \pm 0,04$  %) dürfte

dabei von geringerer Bedeutung sein, da sie sich insgesamt auf einem äußerst niedrigen Niveau befinden.

Der in den 4-Tages-Tieren mit eingeschränkter Aussagefähigkeit (siehe 3.3.2) gefundene höhere Proliferationsindex ( $9,68 \pm 15,26$  % vs.  $0,35 \pm 0,50$  % in den 6-Wochen-Tieren) zeigt dennoch auf, dass nach dieser kurzen Zeitspanne die Reparationsvorgänge des Gefäßes noch in vollem Gange sind. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien zum selben Thema überein.<sup>111,123,124</sup>

Das Verhältnis der Zelldichte im Stent zur Zelldichte in der Aorta war als Maß für die Veränderungen im einzelnen Tier gedacht. Ein hoher Wert signalisiert dabei einen starken Zuwachs der Zelldichte durch die Stentimplantation. Im gesamten Gefäßbaum wurde allein durch die „natürlichen“ Veränderungen wie Cholesterin-Diät und Ballondenudation auch ohne Stenttrauma eine Plaquebildung ausgelöst, deren Zelldichte somit als Basis dieses Parameters im jeweiligen Tier angesehen werden kann. Folglich lässt eine im Stent höhere Zelldichte im Vergleich zu derjenigen in der nativen Aorta auf ein durch die Implantation bedingtes aktiveres entzündliches Geschehen in diesem Bereich schließen. Bei der Auswertung unserer Präparate stellte sich heraus, dass dieser Wert in der Therapiegruppe am niedrigsten und in der Kontrollgruppe am höchsten war. Dies könnte durch die Beschichtung mit dem Medikament bedingt sein und als ein daraus resultierendes geringeres Ausmaß der ständigen Fremdkörperreaktion gedeutet werden.

#### **4.3.4 Histologische Befunde**

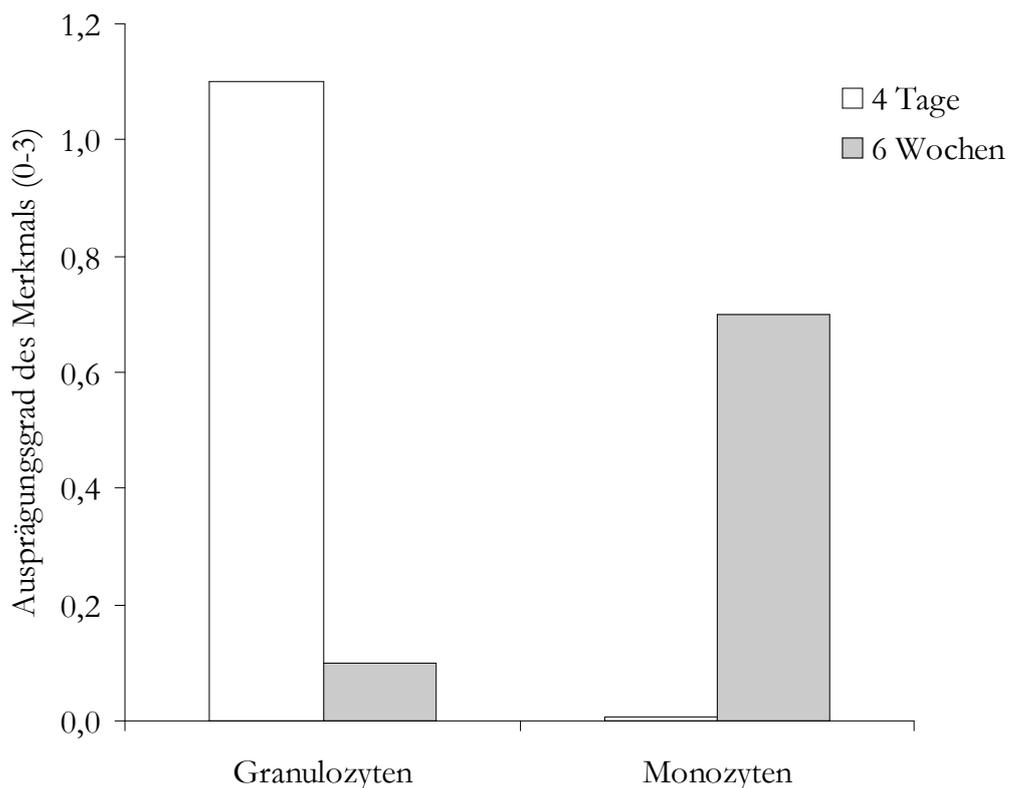
Das Ziel der histologischen Beurteilung der erstellten Präparate war vor allem die Untersuchung der einzelnen Entzündungsparameter im Hinblick auf die unterschiedlichen Beschichtungsarten. Im Allgemeinen zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Morphologie zwischen den Kurzzeit- und den Langzeittieren. Dabei traten Parameter wie intimales Ödem sowie Schaumzellen bzw. Makrophagen in der Neointima erst im längeren Verlauf des Versuchs auf. Die Fibrose als Zeichen adaptiver bzw. reaktiver Veränderung trat in der Adventitia schon relativ früh nach vier Tagen auf, während sie in der Neointima erst nach sechs Wochen

sichtbar war. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der Adventitia der Gefäße bereits Fibroblasten ortsständig vorhanden sind, welche auf einen mechanischen Reiz (Stent) zur Produktion extrazellulärer Matrix angeregt werden und so die Vermehrung des Bindegewebes herbeiführen.

Suzuki et al.<sup>124</sup> fanden in Studien mit einem Sirolimus-beschichteten Stent mit steigenden Konzentrationen des Medikaments auch eine Steigerung der Fibrinablagerung in der Neointima. Dies deuteten sie als Verzögerung in dem arteriellen Reparatursmechanismus und als Folge einer lokal toxischen Antwort auf die benutzte Substanz. Farb et al.<sup>111</sup> beschrieben ebenfalls eine vermehrte neointimale Fibrinablagerung in Kombination mit Einblutungen in die Intima, medialer Nekrose und erhöhter intimaler Zellproliferation als toxische Effekte auf den dabei untersuchten mit Paclitaxel beschichteten Stent. In unseren Präparaten konnte vor allem nach vier Tagen eine starke Fibrindeponierung registriert werden. Dieses Endprodukt der im Blut stattfindenden Gerinnungskaskade entsteht unter anderem durch eine endotheliale Dysfunktion, wobei auf eine Zerstörung des Endothels eine verstärkte Fibrinausscheidung folgt. Im Laufe der beobachteten Zeitdauer von sechs Wochen scheint das Fibrin durch Umstrukturierungs- und Neubildungsvorgänge in der Neointima wieder beseitigt worden zu sein. So ist es in den 6-Wochen-Schnitten nur noch gering vorhanden. Es fällt trotzdem auf, dass das Vorhandensein von Fibrin stark von dem Ausmaß der Faserdestruktion in demselben Bereich abhängt. Dabei zeigt sich vor allem luminal eine Faseraufsplitterung, die offensichtlich durch mechanische Kompression entstand. Gleichzeitig ließ sich ebenfalls durch den Druck des Stents in der medialen Gefäßwand eine Atrophie glatter Muskelzellen erkennen. Dabei war diese nur im Bereich der Streben vorhanden, während sich dazwischen eine kompensatorische Hyperplasie ausbildete.

Polymorphkernige Granulozyten als Frühreaktion der Entzündungsantwort fanden sich in unseren Präparaten nahezu ausschließlich bei den 4-Tages-Tieren. Auffällig dabei war, dass sich eine deutlich größere Anzahl von Granulozyten in den Kontroll-Präparaten im Gegensatz zu den Therapie-Schnitten zeigte. Dies lässt

darauf schließen, dass zumindest in diesem anfänglichen Stadium die Medikamenten-Beschichtung eine antiinflammatorische Wirkung entfalten konnte. Im Gegensatz dazu wurden Monozyten vermehrt in den Präparaten der 6-Wochen-Tiere entdeckt, was als spätere Antwort des Immunsystems auf den Entzündungsreiz des Fremdkörpers Stent gedeutet wurde. Außerdem fiel auf, dass im Gruppenvergleich der Langzeit-Tiere vor allem die Neointima der beschichteten Stentpräparate von diesen Entzündungszellen infiltriert worden war. Im Zusammenhang mit den Befunden der Kurzzeit-Tiere lassen sich diese Ergebnisse auf eine sich abschwächende Wirkung des Entzündungshemmers schließen, was zu einer verzögerten und – nicht wie gewünscht – verminderten Entzündungsreaktion führte.



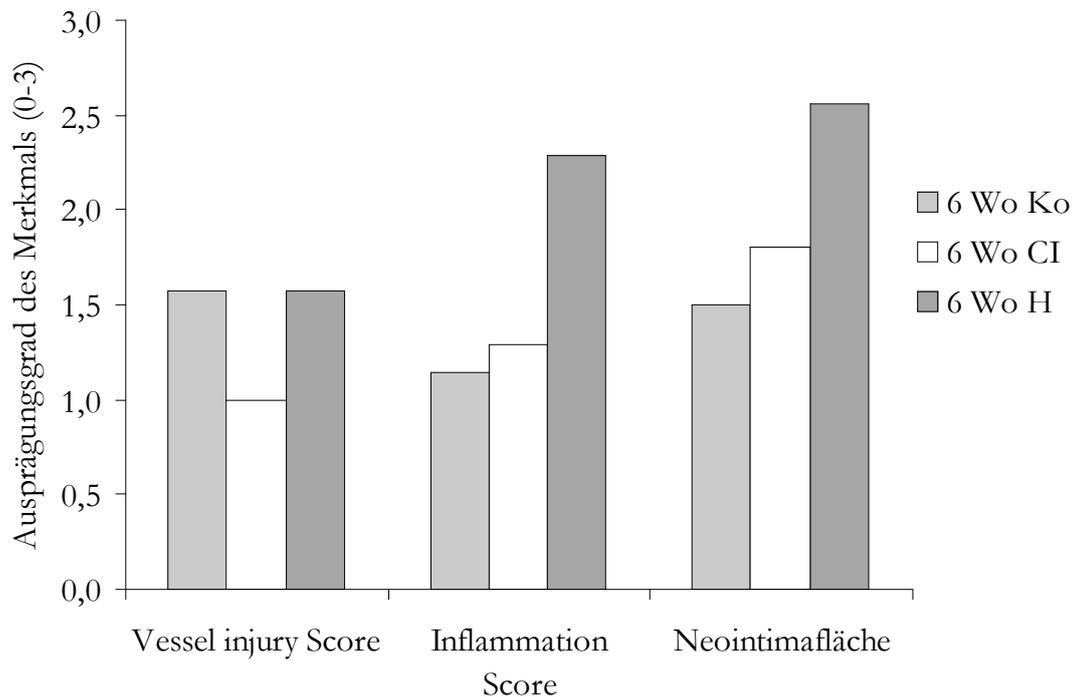
**Abbildung 20:** Vergleich der Vorkommen von Granulozyten und Monozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4 Tage vs. 6 Wochen)

Schon 1992 beschrieben Schwartz et al.<sup>54</sup> einen proportionalen Zusammenhang zwischen dem Grad der Gefäßverletzung durch den Stent sowie der daraus

resultierenden Neointimaproliferation. Wir benutzten zur Beurteilung der Wandschädigung den dort beschriebenen Vessel injury Score in einer etwas modifizierten Form (siehe 3.4.10). Ein solcher direkter Zusammenhang ließ sich bei der Auswertung unserer Präparate nicht feststellen. Dieser Befund ist aber auch nicht verwunderlich, da wir mit der Beschichtung der Stents eine von dem Verletzungsgrad unabhängige Verminderung der Neointimafläche erreichen wollten. Es ergab sich in den Gefäßen der Kurzzeittiere ein durchweg geringerer VIS, obwohl alle Tiere einer identisch ausgeführten Prozedur unterzogen wurden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die zur Erfassung des VIS herangezogenen Parameter für diesen Zeitpunkt kurz nach der Behandlung nicht aussagekräftig sind, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen der Reparationsvorgänge auftreten. Im Allgemeinen waren die Werte jedoch in allen Präparaten niedrig und unterschieden sich nur geringfügig zwischen den Gruppen.

Sechs Jahre darauf belegten Kornowski et al.<sup>56</sup> diese Angaben von Schwartz et al. und zeigten außerdem, dass zwischen dem Ausmaß der Entzündung und der Größe der Neointima eine signifikante Korrelation zu beobachten ist. Ferner konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass auch der Verletzungsgrad und das Maß der Entzündung einer starken Korrelation unterliegen. Interessanterweise wurde in dieser Studie auch dargestellt, dass sowohl entzündliche Veränderungen wie auch arterielle Schädigung unabhängig voneinander eine neointimale Reaktion auslösen können. So ergab sich bei dem Auftreten der Kombination aus starker Inflammation und großer Verletzung die größte Neointimafläche.

In unseren Gefäßschnitten ließ sich der Zusammenhang zwischen den gruppenspezifischen Mittelwerten des Inflammation Score (leicht modifiziert nach Kornowski et al.<sup>56</sup>) und denjenigen der neointimaler Fläche als eine positive Korrelation nachweisen ( $r = 0,9922$ ;  $p = 0,08$ ). Weiterhin war auch der Restenosegrad beträchtlich vom bestimmten Inflammation Score abhängig ( $r = 0,9967$ ;  $p = 0,05$ ). Dieses Ergebnis demonstriert, dass auch bei medikamentöser Beeinflussung der Entzündung das Ausmaß dieser inflammatorischen Antwort direkt für die Größe der Intimafläche sowie den Restenosegrad verantwortlich ist.



**Abbildung 21:** Vessel injury Score, Inflammation Score und Neointimafläche der verschiedenen Gruppen (Ko = Kontrolltiere; H = Beschichtung mit Hydrogel; CI = Beschichtung mit Hydrogel und C1/C3-Komplement-Inhibitor) sechs Wochen nach Stentapplikation

Beim absoluten Vergleich der Präparate in den 6-Wochen-Gruppen wurde in der Hydrogelgruppe mit Abstand der höchste Inflamationsgrad gefunden, obwohl der bestimmte Vessel Injury Score dies nicht erwarten ließ. Daraus kann abgeleitet werden, dass die alleinige Beschichtung des Stents mit Hydrogel eine übermäßige entzündliche Antwort hervorrief, die für die große Neointimafläche in dieser Gruppe verantwortlich war. Die kleinere Neointimafläche in Verbindung mit einem niedrigeren Inflammation Score in der Therapiegruppe spricht für den hemmenden Effekt der zusätzlichen Medikamenten-Beschichtung auf die entzündlichen und proliferativen Gefäßveränderungen.

## 4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, wie bereits in einer Arbeit von Kornowski et al.<sup>56</sup> beschrieben, dass der Inflammation bei der Entstehung einer In-Stent Restenose eine besondere Bedeutung zukommt. Dabei geht eine starke Entzündung der Gefäßwand als Reaktion auf die Stentimplantation mit einer großen neointimalen Fläche einher.

Die gewählte Beschichtung des Stents führte jedoch zu keiner signifikanten Verminderung der Neointimafläche und ist somit in dieser Form nicht als mögliche Alternative zum unbeschichteten Stent geeignet. Dieser Befund ist jedoch vermutlich auf die Auswahl der Trägersubstanz zurückzuführen. Das für diesen Zweck angewandte Hydrogel, als eine für die Beschichtung extrakorporeller Kreisläufe in der Chirurgie entwickelte Substanz, löste eine übermäßige entzündliche Reaktion mit resultierend großer Neointimafläche aus. Im Vergleich zur Gruppe mit Hydrogelbeschichtung konnte in der Therapiegruppe eine deutlich verminderte inflammatorische Antwort in Kombination mit einer erniedrigten neointimalen Proliferation aufgezeigt werden. Weiterhin lassen sich Hinweise dafür finden, dass die benutzte Medikamentendosis nicht für eine Hemmung der Entzündungsantwort ausreichte.

Somit ist nicht ausgeschlossen, dass die benutzte Substanz in Verbindung mit einem anderen – nicht von sich aus entzündungsstimulierenden – Trägermittel als lokal freiwerdendes Medikament dienen könnte. Für die Untersuchung dieser Möglichkeit sind freilich noch zusätzliche Studien über die Höhe der erforderlichen Dosis und die Erforschung der Pharmakokinetik des Medikaments von Nöten.

## 5 Zusammenfassung

Obwohl intraarteriell platzierte Stents die negativen Effekte nach Angioplastie entscheidend begrenzen können, bleiben sie immer noch anfällig für die Ausbildung einer Restenose, welche in erster Linie durch neointimale Hyperplasie verursacht wird. Bei der Pathogenese dieser In-Stent Restenose kommt vor allem der Inflammation eine besondere Bedeutung zu. In der vorliegenden Studie wurde der Effekt eines mit C1- & C3-Esterase-Inhibitor beschichteten Stents am Tiermodell untersucht. Ziel dabei war es, die Entzündungsreaktion in unterschiedlichen Phasen nach Stentapplikation zu analysieren und eine mögliche therapeutische Auswirkung des benutzten Medikaments auf die neointimale Proliferation zu finden.

Die Stents wurden in die infrarenale Aorta Weißer Neuseeland-Kaninchen implantiert, welche vier Tage bzw. sechs Wochen nach dem operativen Eingriff abgetötet wurden. Die Präparate wurden aufgearbeitet, gefärbt und morphometrisch sowie histopathologisch ausgewertet. Die Einteilung der Gruppen erfolgte in unbeschichtete Stents (n = 15), nur mit Hydrogel beschichtete Stents (n = 7) und in Stents, die mit dem C1- & C3-Esterase-Inhibitor sowie Hydrogel als Trägersubstanz beschichtet waren (n = 14).

Grundsätzlich führte die gewählte Stentbeschichtung zu keiner signifikanten Verminderung der Neointimafläche. Die benutzte Trägersubstanz löste sich vom Stent ab und rief eine übermäßige entzündliche Reaktion mit daraus resultierend großer Neointimafläche hervor. Jedoch konnte im Vergleich zur Gruppe mit reiner Hydrogel-Beschichtung in der Therapie-Gruppe eine deutlich verminderte inflammatorische Antwort mit erniedrigter neointimaler Proliferation festgestellt werden.

Die benutzte Stentbeschichtung ist in dieser Form nicht als Alternative zum unbeschichteten Stent geeignet. Das Ergebnis ist jedoch vermutlich auf die Auswahl der Trägersubstanz zurückzuführen, welche eine übermäßige Stimulation der Entzündung im Gewebe verursachte. Ferner fanden sich Hinweise dafür, dass die Dosis des Inhibitors nicht für eine Hemmung der Entzündungsantwort ausreichte. In Verbindung mit einem anderen – nicht entzündungsstimulierenden – Trägermittel könnte diese Substanz jedoch durchaus als lokal wirkendes Medikament benutzt werden und somit für die Prävention einer In-Stent Restenose nützlich sein.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Breslow JL: Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med* 1997;3:600-601
2. Braunwald E: Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997;337:1360-1369
3. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126
4. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-1339
5. Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 1976;295:420-425
6. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
7. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500
8. Ross R: Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993;143:987-002
9. Gershlick AH: Treating atherosclerosis: local drug delivery from laboratory studies to clinical trials. *Atherosclerosis* 2002;160:259-271
10. Poon M, Badimon JJ, Fuster V: Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* 2002;359:619-622
11. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Hoher M: [Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cell biological and molecular aspects]. *Z Kardiol* 1995;84:5-1
12. Garas SM, Huber P, Scott NA: Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. *Pharmacol Ther* 2001;92:165-178
13. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L: Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 1987;316:701-706

14. Yang XM, Manninen H, Matsi P, Soimakallio S: Percutaneous endovascular stenting: development, investigation and application. *Eur J Radiol* 1991;13:161-173
15. Gross-Fengels W, Friedmann G, Palmaz JC: [Balloon-expandable stents in arterial changes of the iliac arteries. Early and follow-up results of 65 interventions]. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1991;155:349-356
16. D'Agincourt L: Stents aid PTA in battle to reduce restenosis rates. *Diagn Imaging (San Franc)* 1991;13:106-113
17. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM: Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:183-193
18. Edelman ER, Rogers C: Pathobiologic responses to stenting. *Am J Cardiol* 1998;81:4E-6E
19. Mehran R, Dangas G, Abizaid AS, Mintz GS, Lansky AJ, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Stone GW, Leon MB: Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation* 1999;100:1872-1878
20. Abizaid A, Kornowski R, Mintz GS, Hong MK, Abizaid AS, Mehran R, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wu H, Popma JJ, Leon MB: The influence of diabetes mellitus on acute and late clinical outcomes following coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:584-589
21. Mittal S, Weiss DL, Hirshfeld JW, Kolansky DM, Herrmann HC: Comparison of outcome after stenting for de novo versus restenotic narrowings in native coronary arteries. *Am J Cardiol* 1997;80:711-715
22. Kosokabe T, Okumura K, Sone T, Kondo J, Tsuboi H, Mukawa H, Tomida T, Suzuki T, Kamiya H, Matsui H, Hayakawa T: Relation of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation and Plasma Homocysteine With Intimal Hyperplasia After Coronary Stenting [Record Supplied By Publisher]. *Circulation* 2001;103:2048-2054
23. Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Bottiger C, Duff GW, Schomig A: Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2168-2173
24. Kastrati A, Dirschinger J, Schomig A: Genetic risk factors and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Herz* 2000;25:34-46

25. Kastrati A, Schomig A, Seyfarth M, Koch W, Elezi S, Bottiger C, Mehilli J, Schomig K, von Beckerath N: PLA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 1999;99:1005-1010
26. Koster R, Vieluf D, Kiehn M, Sommerauer M, Kahler J, Baldus S, Meinertz T, Hamm CW: Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet* 2000;356:1895-1897
27. Dangas G, Mehran R, Lansky AJ, Waksman R, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Mintz GS, Stone GW, Leon MB: Acute and long-term results of treatment of diffuse in-stent restenosis in aortocoronary saphenous vein grafts. *Am J Cardiol* 2000;86:777-7A6
28. Kobayashi Y, De Gregorio J, Kobayashi N, Akiyama T, Reimers B, Finci L, Di Mario C, Colombo A: Stented segment length as an independent predictor of restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:651-659
29. Elezi S, Kastrati A, Neumann FJ, Hadamitzky M, Dirschinger J, Schomig A: Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. *Circulation* 1998;98:1875-1880
30. Kastrati A, Schomig A, Elezi S, Schuhlen H, Dirschinger J, Hadamitzky M, Wehinger A, Hausleiter J, Walter H, Neumann FJ: Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1428-1436
31. Sirnes PA, Golf S, Myreng Y, Molstad P, Emanuelsson H, Albertsson P, Brekke M, Mangschau A, Endresen K, Kjekshus J: Stenting in Chronic Coronary Occlusion (SICCO): a randomized, controlled trial of adding stent implantation after successful angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1444-1451
32. Heidland UE, Heintzen MP, Michel CJ, Strauer BE: Risk factors for the development of restenosis following stent implantation of venous bypass grafts. *Heart* 2001;85:312-317
33. Fitzgerald PJ, Oshima A, Hayase M, Metz JA, Bailey SR, Baim DS, Cleman MW, Deutsch E, Diver DJ, Leon MB, Moses JW, Oesterle SN, Overlie PA, Pepine CJ, Safian RD, Shani J, Simonton CA, Smalling RW, Teirstein PS, Zidar JP, Yeung AC, Kuntz RE, Yock PG: Final results of the Can Routine Ultrasound Influence Stent Expansion (CRUISE) study. *Circulation* 2000;102:523-530
34. Mehran R, Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB: Mechanisms and results of balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis. *Am J Cardiol* 1996;78:618-622

35. Hoffmann R, Mintz GS, Mehran R, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Wu H, Leon MB: Intravascular ultrasound predictors of angiographic restenosis in lesions treated with Palmaz-Schatz stents. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:43-49
36. Strauss BH, Umans VA, van Suylen RJ, de Feyter PJ, Marco J, Robertson GC, Renkin J, Heyndrickx G, Vuzevski VD, Bosman FT: Directional atherectomy for treatment of restenosis within coronary stents: clinical, angiographic and histologic results. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1465-1473
37. Sharma SK, Duvvuri S, Dangas G, Kini A, Vidhun R, Venu K, Ambrose JA, Marmur JD: Rotational atherectomy for in-stent restenosis: acute and long-term results of the first 100 cases. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1358-1365
38. Harrington RA, Lincoff AM, Califf RM, Holmes DR, Berdan LG, O'Hanesian MA, Keeler GP, Garratt KN, Ohman EM, Mark DB: Characteristics and consequences of myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: insights from the Coronary Angioplasty Versus Excisional Atherectomy Trial (CAVEAT). *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1693-1699
39. Meyer T, Schmidt T, Buchwald A, Wiegand V: Stent wire cutting during coronary directional atherectomy. *Clin Cardiol* 1993;16:450-452
40. vom Dahl J, Dietz U, Haager PK, Silber S, Niccoli L, Buettner HJ, Schiele F, Thomas M, Commeau P, Ramsdale DR, Garcia E, Hamm CW, Hoffmann R, Reineke T, Klues HG: Rotational atherectomy does not reduce recurrent in-stent restenosis: results of the angioplasty versus rotational atherectomy for treatment of diffuse in-stent restenosis trial (ARTIST). *Circulation* 2002;105:583-588
41. Giri S, Ito S, Lansky AJ, Mehran R, Margolis J, Gilmore P, Garratt KN, Cummins F, Moses J, Rentrop P, Oesterle S, Power J, Kent KM, Satler LF, Pichard AD, Wu H, Greenberg A, Bucher TA, Kerker W, Abizaid AS, Saucedo J, Leon MB, Popma JJ: Clinical and angiographic outcome in the laser angioplasty for restenotic stents (LARS) multicenter registry. *Catheter Cardiovasc Interv* 2001;52:24-34
42. Albiero R, Nishida T, Karvouni E, Corvaja N, Vaghetti M, Di Mario C, Colombo A: Cutting balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000;50:452-459
43. Adamian M, Colombo A, Briguori C, Nishida T, Marsico F, Di Mario C, Albiero R, Moussa I, Moses JW: Cutting balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis: a matched comparison with rotational atherectomy, additional stent implantation and balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:672-679

44. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE: Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *N Engl J Med* 2001;344:250-256
45. Waksman R, White RL, Chan RC, Bass BG, Geirlach L, Mintz GS, Satler LF, Mehran R, Serruys PW, Lansky AJ, Fitzgerald P, Bhargava B, Kent KM, Pichard AD, Leon MB: Intracoronary gamma-radiation therapy after angioplasty inhibits recurrence in patients with in-stent restenosis. *Circulation* 2000;101:2165-2171
46. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P: Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 1997;336:1697-1703
47. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Sirkin K, Cloutier DA, Leon MB, Tripuraneni P: Three-year clinical and angiographic follow-up after intracoronary radiation : results of a randomized clinical trial. *Circulation* 2000;101:360-365
48. Sabate M, Costa MA, Kozuma K, Kay IP, van der Giessen WJ, Coen VL, Ligthart JM, Serrano P, Levendag PC, Serruys PW: Geographic miss: a cause of treatment failure in radio-oncology applied to intracoronary radiation therapy. *Circulation* 2000;101:2467-2471
49. Serruys PW, Kay IP: I like the candy, I hate the wrapper: the (32)P radioactive stent. *Circulation* 2000;101:3-7
50. Albiero R, Adamian M, Kobayashi N, Amato A, Vaghetti M, Di Mario C, Colombo A: Short- and intermediate-term results of (32)P radioactive beta-emitting stent implantation in patients with coronary artery disease: The Milan Dose-Response Study. *Circulation* 2000;101:18-26
51. Costa MA, Sabat M, van der Giessen WJ, Kay IP, Cervinka P, Ligthart JM, Serrano P, Coen VL, Levendag PC, Serruys PW: Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation* 1999;100:789-792
52. Amols HI, Zaider M, Weinberger J, Ennis R, Schiff PB, Reinstein LE: Dosimetric considerations for catheter-based beta and gamma emitters in the therapy of neointimal hyperplasia in human coronary arteries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36:913-921

53. Johnson GJ, Griggs TR, Badimon L: The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1999;81:835-843
54. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR: Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-274
55. Muller DW, Golomb G, Gordon D, Levy RJ: Site-specific dexamethasone delivery for the prevention of neointimal thickening after vascular stent implantation. *Coron Artery Dis* 1994;5:435-442
56. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB: In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-230
57. Baumgartner HR, Studer A: [Effects of vascular catheterization in normo- and hypercholesteremic rabbits]. *Pathol Microbiol (Basel)* 1966;29:393-405
58. Ferrell M, Fuster V, Gold HK, Chesebro JH: A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis. *Circulation* 1992;85:1630-1631
59. Wissler RW, Vesselinovitch D: Experimental models of human atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1968;149:907-922
60. Marshall M: [Animal models for the study of arteriosclerosis]. *Vasa* 1978;7:313-321
61. Muller-Eberhard HJ: Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 1988;57:321-347
62. Lambris JD, Reid KB, Volanakis JE: The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Immunol Today* 1999;20:207-211
63. Walport MJ: Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1140-1144
64. Walport MJ: Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058-1066
65. Ehrenguber MU, Geiser T, Deranleau DA: Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett* 1994;346:181-184

66. el Lati SG, Dahinden CA, Church MK: Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol* 1994;102:803-806
67. Bonser RS, Dave JR, John L, Gademsetty MK, Carter PG, Davies E, Taylor P, Gaya H, Lennox SC, Vergani D: Complement activation before, during and after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg* 1990;4:291-296
68. Frank MM, Fries LF: The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 1991;12:322-326
69. Fuhrer G, Gallimore MJ, Heller W, Hoffmeister HE: FXII. *Blut* 1990;61:258-266
70. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD: Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-857
71. Mammen E.F.: Contact activation: The interaction of clotting, fibrinolytic, kinin and complement systems. *Biomedical Progress* 1990;2:31-34
72. Sahu A, Kay BK, Lambris JD: Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J Immunol* 1996;157:884-891
73. Sahu A, Soulika AM, Morikis D, Spruce L, Moore WT, Lambris JD: Binding Kinetics, Structure-Activity Relationship, and Biotransformation of the Complement Inhibitor Compstatin. *J Immunol* 2000;165:2491-2499
74. Morikis D, Roy M, Sahu A, Troganis A, Jennings PA, Tsokos GC, Lambris JD: The Structural Basis of Compstatin Activity Examined by Structure-Function-based Design of Peptide Analogs and NMR. *J Biol Chem* 2002;277:14942-14953
75. Morikis D, Assa-Munt N, Sahu A, Lambris JD: Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. *Protein Sci* 1998;7:619-627
76. Nilsson B, Larsson R, Hong J, Elgue G, Ekdahl KN, Sahu A, Lambris JD: Compstatin Inhibits Complement and Cellular Activation in Whole Blood in Two Models of Extracorporeal Circulation. *Blood* 1998;92:1661-1667
77. Fiane AE, Mollnes TE, Videm V, Hovig T, Hogasen K, Mellbye OJ, Spruce L, Moore WT, Sahu A, Lambris JD: Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. *Xenotransplantation* 1999;6:52-65

78. Fiane AE, Mollnes TE, Videm V, Hovig T, Hogasen K, Mellbye OJ, Spruce L, Moore WT, Sahu A, Lambris JD: Prolongation of ex vivo-perfused pig xenograft survival by the complement inhibitor Compstatin. *Transplant Proc* 1999;31:934-935
79. Soulika AM, Khan MM, Hattori T, Bowen FW, Richardson BA, Hack CE, Sahu A, Edmunds LH, Lambris JD: Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons. *Clin Immunol* 2000;96:212-221
80. Furlong ST, Dutta AS, Coath MM, Gormley JJ, Hubbs SJ, Lloyd D, Mauger RC, Strimpler AM, Sylvester MA, Scott CW, Edwards PD: C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. *Immunopharmacology* 2000;48:199-212
81. Müller E.: Adult respiratory distress syndrome (ARDS): Activation of complement, coagulation and fibrinolytic systems. *Biomedical Progress* 1991;4:3-6
82. Tayler K.M.: SIRS - the systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1607-1608
83. Martinez-Oharriz MC, Rodriguez-Espinosa C, Martin C, Goni MM, Trosillarduya MC, Sanchez M: Solid dispersions of diflunisal-PVP: polymorphic and amorphous states of the drug. *Drug Dev Ind Pharm* 2002;28:717-725
84. Tan YT, Peh KK, Al Hanba O: Investigation of interpolymer complexation between Carbopol and various grades of polyvinylpyrrolidone and effects on adhesion strength and swelling properties. *J Pharm Pharm Sci* 2001;4:7-4
85. Jenquin MR, Sarabia RE, Liebowitz SM, McGinity JW: Relationship of film properties to drug release from monolithic films containing adjuvants. *J Pharm Sci* 1992;81:983-989
86. Strohschneider T, Haemmerle H, Betz E: Evidence for the development in phases of stenosing process of arteries with a method of quantifying cell-kinetic reactions of smooth muscle cells in experimentally induced intima cushions. *Pflugers Arch.* 1988;412:56
87. Donath, K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik. Exakt-Kulzer Druckschrift, Norderstedt . 1989.
88. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1131-1139
89. Ternynck T, Avrameas S: Avidin-biotin system in enzyme immunoassays. *Methods Enzymol* 1990;184:469-481

90. Falini B, De S, I, Halverson C, Parker JW, Taylor CR: Double labeled-antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 1982;30:21-26
91. Rosenfeld ME, Ross R: Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10:680-687
92. Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, Gratzner H, Russo A, Mitchell JB: Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1983;72:1844-1850
93. Hofma SH, Whelan DM, van Beusekom HM, Verdouw PD, van der Giessen WJ: Increasing arterial wall injury after long-term implantation of two types of stent in a porcine coronary model. *Eur Heart J* 1998;19:601-609
94. Stary HC: Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177-1178
95. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1512-1531
96. Wissler RW, Vesselinovitch D: Differences between human and animal atherosclerosis, in Schettler G, Weizel A (eds): *Atherosclerosis III*. Berlin, Springer, 1974, pp 319-325
97. Fuster V, Ip JH, Badimon L, Badimon JJ, Stein B, Chesebro JH: Importance of experimental models for the development of clinical trials on thromboatherosclerosis. *Circulation* 1991;83:IV15-IV25
98. Desurmont C, Caillaud J-M, Emmanuel F, Benoit P, Fruchart JC, Castro G, Branellec D, Heard J-M, Duverger N: Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:435-442
99. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258:468-471
100. Rubin P, Williams JP, Schell MC, Okunieff P: Radiation inhibition of arterial restenosis -- a new frontier. *Acta Oncol* 1999;38:407-424

101. Anitschkow N, Chalатов S: Über experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Centralbl f Allg Pathologie u Pathol Anatomie* 1913;24:1-9
102. Anitschkow N: Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat* 1913;56:379-404
103. Finking G, Hanke H: Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;135:1-7
104. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ: Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:418-432
105. Haarbo J: Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: the rabbit model. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103 Suppl 13:49-2
106. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ: Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:418-432
107. Consigny PM, Tulenko TN, Nicosia RF: Immediate and long-term effects of angioplasty-balloon dilation on normal rabbit iliac artery. *Arteriosclerosis* 1986;6:265-276
108. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Renke HG, Hollenberg NK, Fallon JT, Ganz P, Cooke JP: Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation* 1990;81:1667-1679
109. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R: Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999;99:44-52
110. Dolmatch BL, Dong YH, Trerotola SO, Hunter DW, Brennecke LH, La Bounty R: Tissue response to covered Wallstents. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:471-478
111. Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, Scott DS, Froehlich J, Virmani R: Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation* 2001;104:473-479
112. Yasuda S, Noguchi T, Gohda M, Arai T, Tsutsui N, Nakayama Y, Matsuda T, Nonogi H: Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *Cardiovasc Res* 2002;53:481-486

113. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM: Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res* 1995;76:996-002
114. Robinson KA, Roubin GS, Siegel RJ, Black AJ, Apkarian RP, King SB: Intra-arterial stenting in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 1988;78:646-653
115. Carter AJ, Farb A, Gould KE, Taylor AJ, Virmani R: The degree of neointimal formation after stent placement in atherosclerotic rabbit iliac arteries is dependent on the underlying plaque. *Cardiovasc Pathol* 1999;8:73-80
116. Garasic JM, Edelman ER, Squire JC, Seifert P, Williams MS, Rogers C: Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury. *Circulation* 2000;101:812-818
117. Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R, Metz J, Kubler W, Hehrlein C: Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits. Role of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2383-2388
118. Hehrlein C, Zimmermann M, Pill J, Metz J, Kubler W, von Hodenberg E: The role of elastic recoil after balloon angioplasty of rabbit arteries and its prevention by stent implantation. *Eur Heart J* 1994;15:277-280
119. Colombo A, Karvouni E: Biodegradable stents : "fulfilling the mission and stepping away". *Circulation* 2000;102:371-373
120. Hafeez N: Prevention of coronary restenosis with radiation therapy: a review. *Clin Cardiol* 2002;25:313-322
121. Hehrlein C: [Radioactive stents: problems and potential solutions]. *Herz* 2002;27:17-22
122. van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR, Ellis SG, Topol EJ: Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;94:1690-1697
123. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M, Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta EG, Brinker JA, Hunter WL, Froehlich JP: Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation* 2001;103:2289-2295

124. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ: Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-1193
125. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Fliedner T, Erhardt W, Schomig A: Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 2000;101:1453-1458
126. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE: Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1366-1380
127. Groth CG, Backman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, Touraine JL, Claesson K, Campistol JM, Durand D, Wramner L, Brattstrom C, Charpentier B: Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999;67:1036-1042
128. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR: Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:412-417
129. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR: Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996;98:2277-2283
130. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ: Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 1999;99:2164-2170
131. Schiff PB, Horwitz SB, Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1561-1565
132. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277:665-667
133. Donaldson KL, Goolsby GL, Kiener PA, Wahl AF: Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ* 1994;5:1041-1050
134. Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, Froehlich JP, Crow MT, Lakatta EG, Rowinsky EK: Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest* 1995;95:1869-1876

135. Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, Wild DH, Brehm BR, Riessen R, Koveker G, Karsch KR: Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* 1997;96:636-645
136. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR, Palasis M, Yang D, Nott SH, Rogers C: Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2325-2332

## 7 Anhang

**Tabelle 23.** Einzelwerte der 4-Tages-Tiere mit Angabe des Mittelwertes (MW) innerhalb einer Gruppe und der zugehörigen Standardabweichung (SD).

Gruppe & Tiernummer	Gewicht OP (kg)	Cholesterin		Intimafläche		Stenosegrad		Mediafläche		Intimafläche Aorta	
		OP (mg/dl)	Ende (mg/dl)	Stent (mm <sup>2</sup> )	Stent (mm <sup>2</sup> )	Stent (%)	Stent (mm <sup>2</sup> )	Stent (mm <sup>2</sup> )	Stent (mm <sup>2</sup> )	Aorta (mm <sup>2</sup> )	
CI-1	3,14	584	547	0	0	0	0,90	0	0	0	0
CI-2	2,98	682	758	0	0	0	1,09	0	0,01	0,01	0,01
CI-3	3,40	702	814	0	0	0	0,91	0	0	0	0
CI-4	3,02	758	857	0	0	0	0,78	0	0	0	0
CI-5	3,02	569	782	0	0	0	0,75	0	0,01	0,01	0,01
CI-6	3,72	636	737	0	0	0	0,97	0	0	0	0
CI-7	3,30	978	762	0	0	0	0,92	0	0	0	0
<b>MW ± SD</b>	<b>3,23 ± 0,27</b>	<b>701 ± 139</b>	<b>751 ± 98</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0,90 ± 0,11</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>
Ko-1	3,2	628	720	0,01	0,01	0,2	0,90	0,01	0,01	0,01	0,01
Ko-2	2,78	1376	840	0,01	0,01	0,1	0,82	0,01	0,01	0,01	0,01
Ko-3	3,11	536	626	0,11	0,11	2,8	0,95	0,01	0,01	0,01	0,01
Ko-4	3,6	1448	940	0,01	0,01	0,2	0,94	0,01	0,16	0,16	0,16
Ko-5	3,54	804	922	0,01	0,01	0,2	1,17	0,01	0,01	0,01	0,01
Ko-6	3,55	1356	1016	0,10	0,10	1,5	1,06	0,01	0,01	0,01	0,01
Ko-7	3,59	1092	760	0,08	0,08	1,3	1,07	0,08	0,11	0,11	0,11
Ko-8	3,52	1044	901	0,14	0,14	2,2	0,90	0,14	0,08	0,08	0,08
<b>MW ± SD</b>	<b>3,36 ± 0,30</b>	<b>1036 ± 351</b>	<b>841 ± 130</b>	<b>0,06 ± 0,05</b>	<b>0,06 ± 0,05</b>	<b>1,05 ± 1,06</b>	<b>0,98 ± 0,11</b>	<b>0,06 ± 0,05</b>	<b>0,05 ± 0,06</b>	<b>0,05 ± 0,06</b>	<b>0,05 ± 0,06</b>

Tabelle 24. Fortsetzung von Tabelle 24

Gruppe & Tiernummer	Mediafläche Aorta (mm <sup>2</sup> )	Stenosegrad Aorta (%)	Zelllichte Stent (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Zelllichte Aorta (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Ratio Zelllichte Stent / Aorta
CI-1	0,94	0	6091	3263	1,87
CI-2	0,87	0	5469	4800	1,14
CI-3	1,03	0	5208	-	-
CI-4	0,99	0	4590	-	-
CI-5	1,20	0	6115	4524	1,35
CI-6	0,86	0	8000	-	-
CI-7	1,05	0	2267	-	-
<b>MW ± SD</b>	<b>0,99 ± 0,12</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>5391 ± 1745</b>	<b>4196 ± 819</b>	<b>1,45 ± 0,37</b>
Ko-1	0,78	1,8	6778	7538	0,90
Ko-2	0,85	2,6	8600	5556	1,55
Ko-3	0,99	2,4	1800	7450	0,24
Ko-4	0,95	11,3	9833	4593	2,14
Ko-5	1,04	1,0	5000	5692	0,88
Ko-6	1,32	1,7	5500	7182	0,77
Ko-7	1,17	9,4	2200	5275	0,42
Ko-8	0,83	9,6	8000	5684	1,41
<b>MW ± SD</b>	<b>0,99 ± 0,18</b>	<b>4,96 ± 4,32</b>	<b>5964 ± 2912</b>	<b>6121 ± 1111</b>	<b>1,04 ± 0,63</b>

Tabelle 25. Fortsetzung von Tabelle 25, PI = Proliferationsindex

Gruppe & Tiernummer	Proliferations-index Stent (%)	Proliferations-index Aorta (%)	Ratio PI Stent / Aorta
CI-1	0,56	0,11	4,96
CI-2	0,34	0,13	2,74
CI-3	0,19	-	-
CI-4	0,25	-	-
CI-5	0,26	0,18	1,41
CI-6	0,12	-	-
CI-7	0,53	-	-
<b>MW ± SD</b>	<b>0,32 ± 0,17</b>	<b>0,14 ± 0,04</b>	<b>3,04 ± 1,79</b>
Ko-1	6,6	2,0	3,30
Ko-2	9,3	6,0	1,55
Ko-3	59,3	4,0	14,83
Ko-4	11,9	3,8	3,13
Ko-5	6,7	10,1	0,66
Ko-6	12,1	7,0	1,73
Ko-7	18,2	7,1	2,56
Ko-8	18,8	4,6	4,09
<b>MW ± SD</b>	<b>17,86 ± 17,37</b>	<b>5,58 ± 2,52</b>	<b>3,98 ± 4,52</b>

Tabelle 26. Einzelwerte der 6-Wochen-Tiere mit Angabe von Gruppen-Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD)

Gruppe & Tiernummer	Gewicht OP (kg)	Cholesterin		Intimafläche Stent (mm <sup>2</sup> )	Stenosegrad Stent (%)	Mediafläche Stent (mm <sup>2</sup> )		Intimafläche Aorta (mm <sup>2</sup> )
		OP (mg/dl)	Ende (mg/dl)			Stent (mm <sup>2</sup> )	Stent (mm <sup>2</sup> )	
CI-1	3,72	846	42	1,62	19,32	0,81	0,81	0,23
CI-2	3,56	1012	53	1,50	33,53	0,93	0,93	0,27
CI-3	3,34	526	28	2,26	30,31	1,06	1,06	0,61
CI-4	3,76	1082	240	2,47	22,69	0,82	0,82	0,00
CI-5	3,64	1734	376	1,25	12,70	0,85	0,85	0,00
CI-6	3,16	958	298	2,43	29,53	1,02	1,02	0,00
CI-7	3,34	705	47	1,16	11,68	1,21	1,21	0,12
<b>MW ± SD</b>	<b>3,50 ± 0,23</b>	<b>980 ± 383</b>	<b>155 ± 146</b>	<b>1,81 ± 0,56</b>	<b>22,82 ± 8,70</b>	<b>0,96 ± 0,15</b>	<b>0,96 ± 0,15</b>	<b>0,17 ± 0,22</b>
H-1	3,66	2258	367	5,42	48,37	0,92	0,92	1,34
H-2	3,70	1350	183	2,40	24,44	0,82	0,82	0,78
H-3	3,36	753	49	1,50	18,85	0,97	0,97	0,00
H-4	3,17	843	269	1,90	17,58	0,80	0,80	1,41
H-5	3,20	1554	217	2,41	21,84	1,07	1,07	1,00
H-6	3,52	1206	328	2,46	32,56	0,85	0,85	0,57
H-7	3,42	705	139	1,85	19,22	0,83	0,83	1,12
<b>MW ± SD</b>	<b>3,43 ± 0,21</b>	<b>1238 ± 552</b>	<b>222 ± 110</b>	<b>2,56 ± 1,31</b>	<b>26,12 ± 11,04</b>	<b>0,89 ± 0,10</b>	<b>0,89 ± 0,10</b>	<b>0,89 ± 0,49</b>
Ko-1	3,72	292	277	1,14	22,23	0,67	0,67	1,46
Ko-2	4,43	488	231	2,75	37,19	0,72	0,72	1,19
Ko-3	3,64	1000	220	1,23	18,23	0,84	0,84	0,95
Ko-4	3,06	552	58	1,19	18,34	0,43	0,43	0,92
Ko-5	3,64	932	301	1,59	20,37	0,99	0,99	1,56
Ko-6	3,39	460	53	0,99	17,96	0,87	0,87	1,39
Ko-7	3,52	944	96	1,69	22,31	0,74	0,74	1,00
<b>MW ± SD</b>	<b>3,63 ± 0,42</b>	<b>667 ± 285</b>	<b>177 ± 105</b>	<b>1,51 ± 0,60</b>	<b>22,38 ± 6,79</b>	<b>0,75 ± 0,18</b>	<b>0,75 ± 0,18</b>	<b>1,21 ± 0,26</b>

Tabelle 27. Fortsetzung von Tabelle 27

Gruppe & Tiernummer	Mediäfläcche Aorta (mm <sup>2</sup> )	Stenosegrad Aorta (%)	Intimadicke / Mediadicke am Stent	Intimadicke / Mediadicke am Übergang	Intimadicke / Mediadicke an der Aorta
CI-1	0,78	23,60	3,62	1,08	0,53
CI-2	0,95	29,70	0,98	0,07	0,08
CI-3	0,80	63,11	2,33	1,31	0,67
CI-4	0,87	0,00	4,47	0,49	0,07
CI-5	1,57	0,00	2,64	0,66	0,34
CI-6	0,82	0,00	3,77	0,22	0,09
CI-7	0,82	17,01	1,44	0,31	0,09
<b>MW ± SD</b>	<b>0,94 ± 0,28</b>	<b>19,06 ± 22,98</b>	<b>2,75 ± 1,28</b>	<b>0,59 ± 0,46</b>	<b>0,27 ± 0,25</b>
H-1	1,63	44,28	7,66	1,72	1,62
H-2	0,97	61,01	4,57	1,11	0,84
H-3	0,86	0,00	3,10	0,14	0,22
H-4	1,13	60,90	5,44	0,96	1,05
H-5	1,12	30,10	2,35	0,96	1,18
H-6	0,02	53,84	3,41	0,49	0,76
H-7	1,43	54,86	3,07	1,09	0,46
<b>MW ± SD</b>	<b>1,02 ± 0,52</b>	<b>43,57 ± 22,05</b>	<b>4,23 ± 1,84</b>	<b>0,93 ± 0,50</b>	<b>0,88 ± 0,47</b>
Ko-1	0,94	40,47	3,05	2,27	2,52
Ko-2	1,06	48,95	3,51	1,92	1,04
Ko-3	0,80	30,63	3,32	1,90	1,34
Ko-4	0,57	30,00	4,35	1,77	1,18
Ko-5	0,93	37,03	3,50	1,67	1,49
Ko-6	0,86	30,28	3,54	1,79	2,10
Ko-7	0,92	32,22	2,66	1,74	1,79
<b>MW ± SD</b>	<b>0,87 ± 0,15</b>	<b>35,65 ± 7,07</b>	<b>3,42 ± 0,52</b>	<b>1,87 ± 0,20</b>	<b>1,64 ± 0,53</b>

Tabelle 28. Fortsetzung von Tabelle 28; PI = Proliferationsindex

Gruppe & Tiernummer	Zelldichte Stent (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Zelldichte Aorta (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Ratio Zelldichte Stent / Aorta	Proliferationsindex Stent (%)	Proliferationsindex Aorta (%)	Ratio PI Stent / Aorta
CI-1	8271	6540	1,26	0,007	0,001	5,60
CI-2	5436	4822	1,13	0,004	0,009	0,42
CI-3	5033	5298	0,95	0,022	0,001	27,25
CI-4	5145	6188	0,83	0,086	0,000	-
CI-5	5574	8862	0,63	0,084	0,000	-
CI-6	3824	8964	0,43	0,018	0,000	-
CI-7	4886	6032	0,81	0,010	0,013	0,78
<b>MW ± SD</b>	<b>5453 ± 1367</b>	<b>6672 ± 1634</b>	<b>0,86 ± 0,29</b>	<b>0,033 ± 0,036</b>	<b>0,003 ± 0,005</b>	<b>8,51 ± 12,72</b>
H-1	2870	1215	2,36	0,034	0,198	0,17
H-2	3379	7336	0,46	0,050	0,040	1,24
H-3	4844	7731	0,63	0,001	0,000	-
H-4	3447	2502	1,38	0,005	1,365	0,00
H-5	3207	4274	0,75	0,010	0,909	0,01
H-6	4076	5442	0,75	0,007	0,536	0,01
H-7	4719	4816	0,98	0,008	0,382	0,02
<b>MW ± SD</b>	<b>3792 ± 767</b>	<b>4759 ± 3275</b>	<b>1,04 ± 0,65</b>	<b>0,017 ± 0,018</b>	<b>0,490 ± 0,497</b>	<b>0,24 ± 0,49</b>
Ko-1	3733	6219	0,60	1,200	0,700	1,71
Ko-2	5098	4768	1,07	0,700	0,400	1,75
Ko-3	4983	5788	0,86	0,900	0,300	3,00
Ko-4	7916	4897	1,62	1,100	0,500	2,20
Ko-5	6754	6888	0,98	1,500	0,700	2,14
Ko-6	7278	3238	2,25	1,000	0,500	2,00
Ko-7	5733	3560	1,61	0,600	0,700	0,86
<b>MW ± SD</b>	<b>5928 ± 1466</b>	<b>5051 ± 1348</b>	<b>1,28 ± 0,57</b>	<b>1,000 ± 0,306</b>	<b>0,543 ± 0,162</b>	<b>1,95 ± 0,64</b>

## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Privatdozent Dr. Tepe, für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Ich danke Herrn Prof. Schmahl, an dessen Institut für Arbeits- und Sozialmedizin die Auswertung der Ergebnisse stattfand.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Brehme bedanken, deren kompetenter Rat mir zu jeder Zeit und in allen Situationen eine große Hilfe war.

Ich danke Herrn Dr. Janzen vom Institut für Pathologie für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der histopathologischen Auswertung.

Ich danke Herrn Dr. Blumenstock vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung für seine Beratung zu allen Fragen der Statistik.

Herrn Ernst vom Pathologischen Institut des Kreiskrankenhauses Reutlingen danke ich für die Herstellung der Methamethylakrylat-Präparate.

Für die entgegenkommende und tatkräftige Unterstützung bei den histologischen Färbungen möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des klinischen Labors im Institut für Arbeits- und Sozialmedizin Frau A. Glückmann, Frau M. Holz, Frau G. Kaletta und Frau J. Schatz bedanken.

Der größte Dank richtet sich jedoch an meine Familie und Freunde, die mich in allen Lagen und Situationen bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und ermutigt haben.

# Lebenslauf

Johannes Trück

Geboren am 30. April 1977 in Karlsruhe

Nationalität: deutsch

## Schulischer und beruflicher Werdegang

- 5/96           Abitur, Johannes-Kepler-Gymnasium Leonberg
- 9/96-10/97   Zivildienst beim Rettungsdienst des Roten Kreuz, Leonberg
- 10/97        Beginn des Medizinstudiums an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen
- 9/99         Physikum, Universität Tübingen
- 2/00-3/00    Famulatur Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Leonberg
- 8/00         1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Universität Tübingen
- 8/00         Eintritt in die Arbeitsgruppe von PD Dr. G. Tepe als medizinischer Doktorand der Abteilung für Interventionelle Radiologie der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
- 10/00        Studentenseminar der Pädiatrie "Bedside-teaching Seminar: Pediatrics" (Professor Truman, Babies & Children's Hospital NY, Columbia University, USA, und Dr. Hofweber, Kinderklinik St. Marien, Landshut)
- 2/01-3/01    Famulatur Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen
- 3/01         Studentenseminar der Inneren Medizin "Bedside-teaching Seminar: Internal Medicine" (Prof. Ian Fellows, West Norfolk Hospital, Norwich, U.K. und Prof. B. Jany, Missionsärztliche Klinik, Universität Würzburg)
- 8/01         Famulatur Hämatologie, Hadassah Medical Center Jerusalem, Israel
- 10/01-6/02   Auslandsstudium an der Université Victor Segalen in Bordeaux, Frankreich
- 7/02-8/02    Famulatur Pädiatrie, Katholisches Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg
- 2/03-3/03    Kurs für Akupunktur und Traditionelle Chinesische Medizin in Peking, China
- 4/03-6/03    Tutor Pädiatrie, Universitätskinderklinik Tübingen
- 9/03         2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Universität Tübingen
- 10/03-2/04   1. Terial des praktischen Jahres Innere Medizin, Marienhospital Stuttgart
- 2/04-5/04    2. Terial des praktischen Jahres Allgemeine Chirurgie, Centre Hospitalier Universitaire de Fort-de-France, Martinique
- 6/04-9/04    3. Terial des praktischen Jahres Pädiatrie, Universitäts-Kinderspital Bern, Schweiz
- 11/04        3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung & Approbation, Universität Tübingen