

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

**Antiinflammatorische Stentbeschichtung mit einem C1-
Esterase-Inhibitor zur Restenoseprophylaxe beim
Weißen Neuseelandkaninchen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
SILKE KOPPENSTEIN
aus Nürtingen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Tepe

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Riessen

Meinen lieben Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Tiermodell	12
2.1.1	Versuchstiere	12
2.1.2	Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau	12
2.2	Material	15
2.2.1	Katheter.....	15
2.2.2	Stent.....	15
2.2.3	Beschichtung der Stents und verwendete Substanzen	15
2.3	Methode.....	17
2.3.1	Präoperative Phase	17
2.3.2	Stentimplantation	17
2.3.3	Postoperatives Procedere	19
2.4	Blutentnahmen	19
2.5	Applikation von 5´-Brom-2´Desoxyuridin (BrdU) und 2´Desoxycytidin (d-cyt)	19
2.6	Entnahme und histologische Aufarbeitung der Gefäßpräparate.....	20
2.6.1	Gefäßentnahme und Perfusionsfixierung	20
2.6.2	Vorbereitung der Gefäße	21
2.6.3	Einbettung in Paraffin und Schneiden	22
2.6.4	Einbettung in Methamethylakrylat und Herstellung von Querschnitten aus Stentsegmenten für die Morphometrie	22
2.6.5	Histologische Färbungen	23
2.6.5.1	Grundlagen.....	23
2.6.5.2	HE-Färbung.....	23
2.6.5.3	EvG-Färbung.....	24
2.6.6	Immunhistochemische Färbungen.....	24
2.6.6.1	Grundlagen.....	24
2.6.6.2	Endothel-Färbung.....	26
2.6.6.3	RAM 11-Färbung.....	26

2.6.6.4	BrdU-Färbung.....	27
2.7	Auswertung.....	28
2.7.1	Analyse des Gesamtcholesterins	28
2.7.2	Für die Auswertung der Gefäßpräparate verwendete Geräte	28
2.7.3	Morphometrische Auswertung	29
2.7.4	Beurteilung des Endothels	29
2.7.5	Bestimmung des Anteils an Makrophagen	30
2.7.6	Bestimmung der Zelldichte und Proliferationsindex	30
2.7.7	Histologisch-pathologische Beurteilung der Aorten- und Stentsegmente	31
2.7.7.1	Vessel Injury Score	31
2.7.7.2	Inflammation Score	32
2.7.7.3	Aortensegmente	33
2.7.7.4	Gruppenvergleich	35
2.7.8	Messwertdefinitionen	35
2.8	Statistische Auswertung	36
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Gesamtcholesterin im Plasma	38
3.2	Morphometrische und immunhistochemische Parameter	41
3.2.1	Intimafläche.....	41
3.2.2	Stenosegrad.....	43
3.2.3	Mediafläche.....	46
3.2.4	Verhältnis Plaque-/ Mediadicke an Längsschnitten.....	48
3.2.5	Zelldichte.....	49
3.2.6	Proliferationsindex	52
3.2.7	Größe und zelluläre Zusammensetzung der intimalen Plaques.....	54
3.2.8	Von Willebrand Faktor (VIII).....	54
3.2.9	RAM	55
3.3	Histopathologische Auswertung.....	57
3.3.1	Intimale Hyperplasie	57
3.3.2	Inflammation score.....	59
3.3.3	Atherosklerosestadien	61
3.3.4	Schaumzellen	63
3.3.5	Fibrose	64
3.3.6	Fibrininsudation.....	66

3.3.7	Fibrino-leukozytäres Exsudat (polymorphkernige Granulozyten).....	66
3.3.8	Mononukleäre Infiltrate	67
3.3.9	Destruktion elastischer Lamellen.....	69
3.3.10	Atrophie glatter Muskelzellen.....	70
3.3.11	Kalzifikationen.....	72
3.3.12	Ödem	72
3.3.13	Vessel injury score.....	74
3.4	Komplikationen	75
4	DISKUSSION.....	76
4.1	Zielsetzung der Arbeit.....	76
4.2	Material- und Methodenkritik	76
4.2.1	Tiermodell	76
4.2.1.1	In der Atherosklerose- und Restenoseforschung verwendete Tierarten	77
4.2.1.2	Wahl des Kaninchenmodells.....	78
4.2.2	Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau	79
4.2.3	Auswertung, Statistik	81
4.2.4	Restenose, In-Stent Restenose und Stellenwert der Entzündung	81
4.2.5	Therapieansätze zur Prävention der Restenose und In-Stent Restenose	82
4.2.6	Material	85
4.2.6.1	Wahl des Stents	85
4.2.6.2	In der Forschung verwendete Beschichtungsarten	86
4.2.6.3	Wahl der Beschichtung	87
4.2.6.4	Drug-eluting Stent (DES)	89
4.2.6.5	In der Forschung verwendete Medikamente für DES.....	89
4.2.7	Wahl des Medikamentes, Einfluss des C1-Inhibitor auf die Entzündung und Restenoseentwicklung	92
4.3	Bewertung der eigenen Ergebnisse.....	96
4.3.1	Gesamtcholesterin im Plasma	96
4.3.2	Morphometrische und immunhistochemische Ergebnisse	96
4.3.3	Histopathologische Befunde	101
4.4	Limitationen	108
4.5	Schlussfolgerung	112

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	118
7	ANHANG	135

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Primär- und Sekundärantikörper	27
Tabelle 2: Modifizierter Vessel Injury Score nach Schwartz et al. ⁷¹	32
Tabelle 3: Inflammatory response nach Hofma et al. ⁴¹	33
Tabelle 4: Schematische Darstellung der Abfolge von Typ I- bis Typ VI-Läsionen nach Stary et al. 1995 ¹³¹	34
Tabelle 5: Schema zur histopathologischen Auswertung	35
Tabelle 6: Werte der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Stentimplantation	39
Tabelle 7: Werte der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt des Versuchsendes	40
Tabelle 8: Messwerte der Intima-/Plauefläche	42
Tabelle 9: Messwerte für den Stenosegrad	44
Tabelle 10: Messwerte für die Mediafläche	46
Tabelle 11: Verhältnis Plaque-/Mediadicke an verschiedenen Stellen im Gefäß	48
Tabelle 12: Gesamtzellzahl der Intima/ Intimafläche	50
Tabelle 13: Proliferationsindex = Anzahl der proliferierenden Zellen in der Intima pro Gesamtzellzahl in der Intima	52
Tabelle 14: Anfärbung des Endothels in den Aortensegmenten.....	54
Tabelle 15: Anfärbung des Endothels in den Stentsegmenten	55

Tabelle 16: Makrophagen in der Intima der Aortensegmente	56
Tabelle 17: Makrophagen in der Intima der Stentsegmente	56
Tabelle 18: Intimale Hyperplasie unter dem 10fach Objektiv in den Aortensegmenten	58
Tabelle 19: Intimale Hyperplasie unter dem 10fach Objektiv in den Stent- segmenten.....	58
Tabelle 20: Inflammatory response nach Hofma et al. ⁴¹ in den Aortensegmenten	59
Tabelle 21: Inflammatory response nach Hofma et al. ⁴¹ in den Stent- segmenten.....	60
Tabelle 22: Einteilung der atherosklerotischen Plaques in die Typen nach Stary et al. ¹³¹ in den Aortensegmenten.....	62
Tabelle 23: Schaumzellenlokalisierung in den Stentsegmenten um die Streben	63
Tabelle 24: Lokalisation von Fibrose in den Stentsegmenten um die Streben	64
Tabelle 25: Fibrose in der Intima der Stentsegmente	65
Tabelle 26: Lokalisation von Fibrose in der Adventitia der Stentsegmente	65
Tabelle 27: Fibrininsudation in den Stentsegmenten um die Strebe.....	66
Tabelle 28: Fibrino-leukozytäres Exsudat in den Stentsegmenten um die Strebe.....	67
Tabelle 29: Mononukleäre Infiltrate in der Intima der Stentsegmente.....	68
Tabelle 30: Mononukleäre Infiltrate in der Adventitia der Stentsegmente.....	68
Tabelle 31: Destruktion elastischer Lamellen in den Stentsegmenten um die Strebe.....	69

Tabelle 32: Destruktion elastischer Lamellen in der Media der Stentsegmente 70

Tabelle 33: Atrophie glatter Muskelzellen um die Strebe der Stentsegmente . 71

Tabelle 34: Atrophie glatter Muskelzellen in der Media der Stentsegmente 71

Tabelle 35: Kalzifikationen in der Media der Stentsegmente 72

Tabelle 36: Ödemlokalisierung in den Stentsegmenten um die Streben 73

Tabelle 37: Ödemlokalisierung in der Intima der Stentsegmente..... 73

Tabelle 38: Vessel injury score nach Schwartz et al.⁷¹ -adapted- in den
 Stentsegmenten 74

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schema des Komplementsystems mit seinen zwei Aktivierungswegen sowie des Ansatzpunktes der Hemmung durch C1-Esteraseinhibitor. Nach einer Aktivierung durch Antikörper (klassischer Weg) bzw. der Aktivierung durch pathogene Oberflächen (alternativer Weg) wird als gemeinsame Endstrecke Faktor C3 und C5 durch die so auf unterschiedliche Weise entstandene C3-Konvertase in seine zwei Komponenten gespalten. C3a aktiviert zusammen mit C5a die zelluläre Abwehr. C3b und C5b führt zur Aktivierung von C6, C7, C8 und dem polymerisierten Faktor C9, was schließlich in der Zerstörung der Zellmembran und der Auflösung der attackierten Zelle endet. 10
- Abbildung 2:** Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau (Ko = Kontrollgruppe; C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor; Ao = Aortengruppe).. 14
- Abbildung 3:** Anordnung der angefertigten Längs- und Querschnitte 29
- Abbildung 4:** Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Stentimplantation 39
- Abbildung 5:** Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt des Versuchsendes 40
- Abbildung 6:** Unterschied zwischen Größe der Intimafläche in den Aorten- und Stentsegmenten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor) 42
- Abbildung 7:** Morphologische Struktur der Gefäßwand und der Neointima. 43
- Abbildung 8:** Stenosegrad in den Aorten- und Stentsegmenten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor) ... 45

- Abbildung 9:** Mediafläche in den Aorten- und Stenpräparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor) ... 47
- Abbildung 10:** Verhältnis zwischen Plaque- und Mediadicke nach 6 Wochen .. 49
- Abbildung 11:** Zelldichte in der Plaque in den Aorten- und Stenpräparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor) ... 51
- Abbildung 12:** Proliferationsindex in den Aorten- und Stenpräparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor) ... 53
- Abbildung 13:** Morphologie der Gefäßwand und Struktur der Neointima in den Stentpräparaten der 6-Wochentiere (Methamethylakrylat-Einbettung). In der Kontrollgruppe (A) ist eine diffuse, klar sichtbare Entzündung um die Stentstreben mit höherem Inflammation Score (IS = 2) zu sehen. Bei der Therapiegruppe (B) mit C1-Esterase-Inhibitor beschichteten Stents ist nur eine leichte diffuse Infiltration von Entzündungszellen mit niedrigem Inflammation Score (IS = 1) erkennbar. 61

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin converting enzyme
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbachol
ARDS	Adult respiratory distress Syndrome (akutes Lungenversagen)
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BrdU	5'-Brom-2'-Desoxyuridin
C1	Beschichtung mit Hydrogel und C1-Komplement-Inhibitor
CFS	Colony-Stimulating Factors
CRP	C-Reaktives Protein
d-cyt	2'-Desoxycytidin
DES	Drug eluting Stent
DNA	Desoxyribonucleid acid (= Desoxyribonukleinsäure)
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EvG-Färbung	Elastica-van-Gieson-Färbung
HDL	High Density Lipoprotein
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HMWK	High-Molecular-Weight-Kininogen
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IS	Inflammation Score
ISR	In-Stent Restenose
IVUS	Intravascular ultrasound study
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ko	Kontrollgruppe (keine Beschichtung)
LDL	Low Density Lipoprotein
Lp (a)	Lipoprotein (a)
MAC	Membrane-attack complex (= Membranangriffskomplex)
MACE	Major adverse clinical events
MG	Molekulargewicht
NZW rabbit	New Zealand White rabbit (Weiße Neuseelandkaninchen)
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
t-PA	Tissue-plasmin activator (= Gewebs-Plasmin Aktivator)
TF	Tissue Factor

XVI Abkürzungsverzeichnis

TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VIS	Vessel Injury Score
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII der Blutgerinnung)

1 Einleitung und Fragestellung

Herz-Kreislaufkrankungen sind in den westlichen Industrienationen die bedeutendste Todesursache sowohl in den Altersgruppen unter als auch über 65 Jahre und für annähernd die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich.¹ Herzinfarkt, Schlaganfall, Gangrän und Funktionsverlust der Extremitäten sind Folgekrankheiten der Atherosklerose.²

Als Atherosklerose wird die lokale Wandverdickung und -verhärtung der größeren arteriellen Blutgefäße bezeichnet. Sie entsteht aus einer exzessiven entzündlich-fibroproliferativen Antwort auf vielfältige Formen von Reizungen des Endothels und glatten Muskelzellen der Arterienwand.³ Diese Veränderungen der Gefäßwand verursachen verschiedene klinische Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) der unteren Extremitäten und zerebrovaskuläre Erkrankungen. Verschiedene Risikofaktoren sind bekannt, die das Auftreten atherosklerotisch bedingter Erkrankungen begünstigen: Alter, Geschlecht sowie persönliche und familiäre Vorerkrankungen in Bezug auf KHK sind unbeeinflussbare Risikofaktoren, Hypercholesterinämie, Hypertonie und Nikotinabusus sind die wichtigsten beeinflussbaren.⁴ Das heute geläufige Modell, dass eine Gefäßwandverletzung und Thrombusbildung die Schlüsselrollen in der Entstehung der Atherosklerose spielen,^{3;5-7} entstand durch Zusammenfassung bisheriger Erklärungsmodelle von Virchow und Rokitansky, aus denen Ross die „Response-to-injury-Hypothese“ entwickelte.

Stenosen im Rahmen der Atherosklerose als Folge von Intimahyperplasie ist eine häufige Ursache für Durchblutungsstörungen und daraus folgender Ischämien.

Eine bedeutende Entwicklung für die Therapie von Stenosen und Verschlüssen peripherer Arterien war die Einführung der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) vor etwa 30 Jahren.⁸

Durch Verfeinerung der Technik und Modifikation des Dilatationskatheters gelang es Grüntzig et al. im Jahr 1977, dieses Verfahren zum ersten Mal erfolgreich auch bei atherosklerotisch verengten Koronargefäßen einzusetzen.⁹ Primäre Erfolgsraten von etwa 95 %¹⁰⁻¹³ bei 2-5 % Komplikationen trugen zur Akzeptanz dieses Verfahrens bei.¹⁴ Trotzdem bleibt der Erfolg dieser Methode durch das häufige Auftreten von Restenosen limitiert. Bald nach Einführung der PTA zur Behandlung von Gefäßverengungen bzw. -verschlüssen durch Atherosklerose wurde die Restenose zum Hauptproblem. Selbst unter optimalen Bedingungen¹⁴ ist eine Wiederverschlussrate in 30-40 % der Fälle^{15;16} und eine erneute Verengung des Gefäßlumens in 30-55 % der Fälle¹⁷⁻²⁵ innerhalb von 3-6 Monaten zu verzeichnen.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit brachte die Einführung der Stentimplantation. Intravaskuläre Stents sind Endoprothesen die der Stützung des Gefäßes dienen, geometrische Gefäßwandveränderungen vorbeugen²⁶ und somit eine dauerhafte Durchgängigkeit sichern sollen.

Bereits 1969 beschrieb Dotter eine Technik, transluminal eine Metallspirale in ein Gefäß zu platzieren.²⁷ Die wegberaubenden Arbeiten über perkutan implantierbare Stents erschienen Mitte der 80er Jahre²⁸⁻³³ und führten zur Entwicklung verschiedener Stents. Zum ersten Mal seit Einführung der PTA konnte eine signifikante Reduktion der nach der Prozedur regelmäßig auftretenden Restenose nachgewiesen werden.^{10;34;35} Stents sorgen für ein lumbinales Gerüst, welches die für die Pathogenese der Restenose nach PTA verantwortlich gemachten Gefäßreaktionen („elastic recoil“ und „remodelling“) so gut wie eliminiert.³⁶ Jedoch konnte auch hier die Restenosierung nicht in jedem Fall verhindert werden.^{37;38}

Als Restenose wird eine Verengung um mehr als 50 % des betroffenen Gefäßes oder mehr als 30 % Rückgang des Lumens, ausgehend vom ersten erfolgreichen Ergebnis bezeichnet. Dies kann histologisch, klinisch oder angiographisch bestimmt werden.²⁶

Bei der Restenose spielen intimale Hyperplasie^{14;39-41} und Umbauprozesse der Gefäßwand eine entscheidende Rolle.^{16;42-44} Bisher bekannte Ursachen sind Gefäßwandverletzungen durch Dilatation, Formation wandständiger Thromben,

was zu intimaler Hyperplasie führt.^{40;45;46} Desweiteren wird eine „abnormale Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, verbunden mit einer Deposition von extrazellulärer Bindegewebsmatrix“¹⁴ für die Restenose verantwortlich gemacht. Die klassischen Risikofaktoren für Atherosklerose: Rauchen, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus, haben auf die Entwicklung der Restenose keinen Einfluss.⁴⁷⁻⁴⁹ Ein erhöhter Serum-Lipoprotein-A-Spiegel wurde sowohl bei der PTA der femoropoplietalen Gefäße an Patienten mit pAVK⁴⁹ als auch bei perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) an Patienten mit KHK⁵⁰ als Risikofaktor eingestuft. Ebenso korrelierte der Grad der Primärstenose mit der Häufigkeit einer Restenose^{48;51} und wird als Risikofaktor betrachtet. Die Restenoserate ist nach Stentimplantation (14-36 %) geringer als nach PTCA (30-40 %),^{25;40;52-57} trotzdem ist die sogenannte In-Stent Restenose (ISR), der Wiederverschluss eines Stents, ein klinisches Problem.

Bisher gibt es keine zuverlässigen anamnestischen Kriterien oder Möglichkeiten, um Risikopatienten für die Ausbildung einer Restenose mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizieren zu können. Diagnostiziert wird die Restenose daher meist erst, wenn klinische Symptome, häufig in Form einer Ischämie,¹⁶ auftreten.

Um gezielte Maßnahmen zur Prävention von Restenosen ergreifen zu können, ist eine genaue Kenntnis des zugrundeliegenden Pathomechanismus erforderlich. Untersuchungen zur Pathogenese der Atherosklerose und Restenose erweisen sich am Menschen als schwierig, da sich die Atherosklerose, Restenose und durch Stents induzierte Schädigung im Gefäß über einen langen Zeitraum entwickeln und multifaktoriell bedingt sind. Für klinische Untersuchungen auf dem Gebiet der Restenoseforschung sind groß angelegte Studien notwendig, um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können. Es wird eine Probandenzahl von ca. 500 Patienten gefordert. Die Durchführung solcher, auf mehrere klinische Zentren verteilte Versuche ist mit enormen Kosten und einem hohen organisatorischen Aufwand verbunden.⁵⁸ Epidemiologische Studien liefern Ergebnisse über Zusammenhänge beispielsweise Risikofaktoren und Prävalenz der Atherosklerose und

Restenose. Um aber Aussagen auf zellulärer Ebene treffen zu können sowie Präventiv- und Therapiemaßnahmen erarbeiten zu können, ist man weitgehend auf Tiermodelle angewiesen.⁵⁹ Tiermodelle haben den Vorteil, dass atherosklerotische Plaques in kurzen Zeiträumen entstehen und Einflussfaktoren kontrolliert werden können.⁶⁰ Veränderungen in der Gefäßwand werden sowohl bei der langsamen Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque als auch bei der beschleunigten Restenosebildung als Antwort des Gefäßes auf eine Verletzung beobachtet. Die Art und Stärke der Verletzung ist zwar verschieden, doch wird ein ähnlicher Pathomechanismus postuliert.⁶¹

Die Pathomechanismen als Folgeaktionen einer Arterie auf die Stentimplantation sind nur unvollständig geklärt.⁶²⁻⁶⁴ Möglicherweise ein multifaktorieller Prozess mit durch Wachstumsfaktoren stimulierter Proliferation der glatten Muskelzellen, frühe elastische Rückstellkräfte (elastic recoil), Thrombusorganisation aufgrund einer Gefäßverletzung⁵² und späte Umbauprozesse in der Gefäßwand (negative remodelling).²⁶ Der herausragendste Mechanismus der Restenose nach Stentimplantation ist die neointimale Proliferation.^{26;40;41;53;57;65-68} Stents können die Neointimaproliferation triggern,^{65;69} also die proliferative Komponente der Restenose erhöhen. Der Grad der Gefäßverletzung korreliert mit der Dicke der Neointima.^{70;71} Vier Reaktionen der Gefäßwand auf Stentimplantation sind bekannt: Thrombose, Entzündung, Zellwachstum und spätere Veränderungen (Kollagenablagerungen).³⁹ STRESS^{53;72} und BENESTENT^{68;72} sind zwei Multicenterstudien mit jeweils über 400 Patienten, in denen die Rezidivraten der Gefäßstenosen ermittelt worden sind, die im klinischen Alltag allerdings noch höher sein können.⁷³ Die Restenose wird in diesen Studien als eine Stenose \geq 50% im Kontrollangiogramm nach einem halben Jahr definiert.

Fattori et al. und Degertekin et al. beschrieben 2003 bzw. 2002 verschiedene Phasen im Mechanismus der Restenose. Zahlreiche zelluläre und molekulare Vorfälle ereignen sich nach einer Gefäßverletzung. Fremdkörperreaktion auf den Stent und die Verletzung provozieren eine akute und chronische Entzündung in der Gefäßwand. Ausschüttung von Zytokinen und

Wachstumsfaktoren folgen, setzen Signalketten in Gang und aktivieren die Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen.^{62;74-77}

Die initiale Reaktion der elastischen Fasern in der Gefäßwand auf Überdehnung durch den Ballonkatheter ist die elastische Rückstellkraft. Sie stellt die frühe Phase der Restenose dar. Die endotheliale Denudation und Freilegung subintimaler Komponenten verursachen Plättchenaggregation, Fibrinablagerung und Thrombusbildung. Die anschließende Granulationsphase ist durch Migration glatter Muskelzellen und Fibrin in der Verletzungszone gekennzeichnet. Mediatoren der Entzündung wie auch zelluläre Elemente tragen zur Auslösung einer komplexen Reihe an Ereignissen bei, die wiederum Matrixbildung und Zellproliferation regeln. Zuletzt folgt die Phase des Gefäßremodellings mit Bildung von Neointima, Proteoglykan- und Kollagensynthese. Der allmählich fortschreitende Prozess, von Myofibroblasten der Adventitia ausgelöst, führt zur Veränderung des Gefäßdurchmessers und verzögertem Verlust des Lumens.

Exzessive Entzündung sowie extrazelluläre Matrixumbildung der Media und Adventitia werden als bedeutsame Faktoren der verengenden Gefäßdeformation nach Ballonangioplastie betrachtet.⁷⁸ Studien mit intravaskulärem Ultraschall (IVUS) haben demonstriert, dass Stents elastic recoil und negatives remodelling reduzieren,⁷⁹ teilweise sogar eliminieren.⁸⁰ Der Stent als Fremdkörper verschlimmert jedoch die Entzündung und ist mit starker neointimaler Hyperplasie vergesellschaftet,^{63;71} welche als Hauptursache für In-Stent Restenose (ISR) gilt.

Grundlegende Änderungen in der Technik der Stententwicklung und der Vorgehensweise bei Stentimplantation, der Produktion verschiedener Stentdesigns,⁸¹ als auch Herstellung aus verschiedenen Materialien, wie Nitinolstents⁸² oder Polymerstents,⁸³ konnten die Restenoserate gegenüber den Anfängen senken.^{10;34;35;72} Weitere Therapieansätze gibt es in Verbindung mit Stents. Es wurden verschiedene Beschichtungen erprobt: mit Glykoprotein IIb/IIIa,⁴⁵ mit aktiviertem Protein C,⁸⁴ mit Polyethylacrylat⁸⁵ oder radioaktiv markierten Stents.^{83;86;87}

Trotz dem Einsatz einer großen Palette therapeutischer Verfahren liegt die Restenoserate um die 30 %. Bisherige Behandlungen wie Laserangioplastie, Rotationsangioplastie oder Atherektomie waren nicht zufriedenstellend.^{73;88-94}

Studien mit systemischer pharmakologischer Therapie,^{26;52} antithrombotischen,^{26;95} antiproliferativen Substanzen oder mit lipidsenkenden Medikamenten brachten ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg.²⁶ Aus verschiedenen Ansätzen und weiter entwickelten Techniken zur Prävention der Restenose bzw. In-Stent Restenose ist in den letzten Jahren eine neue Idee entstanden: der Drug-eluting Stent (DES), der in Kapitel 4.2.6.4 erklärt wird.

Die Kombination aus einem biologischen und mechanischen Ansatz mit akzeptablen MACE-Raten (major adverse clinical events) in klinischen Studien erweist sich zunehmend als eine vielversprechende Therapieoption. Der Stent als Gefäßstütze dient der Stabilisierung des Lumens, verhindert elastic recoil und negative remodelling. Die biologische Lösung liegt darin, dass der Stent selbst Träger des Medikamentes ist.^{96;97} Die Beschichtung des Stents in Kombination mit einem Medikament soll die natürlichen Mechanismen in der Gefäßwand positiv beeinflussen und Faktoren wie Entzündung, Abwehrreaktion oder Zellproliferation vermeiden. Die Wirksamkeit ist abhängig vom Stent, Material, Beschichtung, Release und letztendlich auch vom Medikament.

Die Suche nach dem idealen Medikament zur Verhinderung der In-Stent Restenose ist zur Zeit Gegenstand vieler Experimente. Gegenwärtig sind verschiedene Wirkstoffe in klinischer Erprobung: Paclitaxel, Rapamycin, Actinomycin D, Tacrolimus, usw. Eine Reihe von Studien wurden jüngst publiziert oder werden durchgeführt zur Evaluierung dieser Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Freisetzungskinetik, optimalen Wirkstoffdosierung, Sicherheit im klinischen Einsatz sowie ihres Benefit: SCORE, TAXUS II, II, IIV, ELUTE, ASPECT, RAVEL, ACTION, EVIDENT, PRESENT, SIRIUS 400.

Zwei erfolgsversprechende Medikamente sind Sirolimus und Paclitaxel, sie sind bisher in der Klinik am erfolgreichsten:

Sirolimus (Rapamycin), ist eine potente immunsupprimierende Substanz mit antientzündlichen sowie antiproliferativen Eigenschaften. Sie wurde im Jahr 1999 eigentlich für die prophylaktische Behandlung der Abstoßung

transplantierten Nieren entwickelt.⁹⁸ Es hemmt *in vitro* die Proliferation glatter Muskelzellen^{99;100} und bewirkt in Tiermodellen eine Verringerung der Intimagröße künstlich verletzter Gefäße.^{99;101;102} Die erste klinische Studie mit einem Sirolimus beschichteten Stent wurde von Sousa et al. 2001 in Sao Paulo durchgeführt. Ein Rückgang um 40-50 % neointimaler Hyperplasie im Stent, Rückgang der Kolonisation glatter Muskelzellen, signifikanter Rückgang der Streben-assoziierten Entzündung und ein um 70 % vermindertes Entzündungszytokin (MCP-1) nach 28 Tagen im Vergleich zu unbeschichteten Stents werden berichtet.^{74;78}

Bei Paclitaxel (Taxol) handelt es sich ebenfalls um eine antineoplastische Substanz. Wie schon für Sirolimus beschrieben zeigten auch mit diesem Medikament durchgeführte *in vitro* Studien eine Hemmung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Paclitaxel, der erste der antiproliferativen Wirkstoffe im klinischen Einsatz in dieser Form, ermöglicht eine deutliche Inhibierung neointimaler Proliferation in Abhängigkeit von Applikationsdauer und Wirkstoffdosierung. In einer Studie von Heldmann et al. am Schweinemodell wurde eine signifikante Dosisabhängigkeit auf die Hemmung der intimalen Hyperplasie berichtet.¹⁰⁶

Park et al. bestätigte 2003 in seiner klinischen Studie zahlreiche Ergebnisse vorangegangener Studien. Ein signifikant geringerer Grad an Stenose (14 % vs. 39 %) und ein größerer Gefäßdurchmesser werden berichtet. Restenose trat in nur 4 % der Fälle auf gegenüber 27 % bei unbeschichteten Stents. Eine dosisabhängige Reduktion der intimalen Hyperplasie konnte ebenfalls festgestellt werden.¹⁰³

Trotz zahlreich durchgeführter Studien mit verschiedenen Beschichtungen und Medikamenten hat sich bis jetzt noch keine Beschichtungstechnik oder Medikament definitiv gegenüber anderen Verfahren durchsetzen können. Einige Studien mussten aufgrund von Zwischenfällen gestoppt werden (ACTION, BRILLIANT), es sind also klare vorklinische und klinische Tests erforderlich, um die zukünftige Rolle verschiedener Medikamente und Trägersubstanzen definieren zu können.

Angesichts der Häufigkeit der KHK und pAVK in unserer Gesellschaft verursacht die Restenose bei 80 % der betreffenden Patienten, bei denen Nachbehandlungen erforderlich werden, nicht zu unterschätzende Kosten.¹⁰⁷ Califf stellte für die USA gültige Berechnungen auf, die besagen, dass eine Senkung des Restenoserisikos um 25 % Ersparnisse von \$ 1400 pro KHK-Patient bedeuten würde, eine Senkung um 33 % sogar \$ 2000 pro Patient. Somit ist es von klinischem als auch von wirtschaftlichem Interesse Therapiemöglichkeiten zu finden, welche die Restenoserate langfristig verringern.

Die Rolle der Entzündung wird zunehmend als dominierende Ursache der ISR eingeschätzt. Plaqueentzündung prophezeit eine symptomatische Restenose im ersten Jahr nach perkutaner koronarer Intervention und legt eine daraus resultierende anhaltende Entzündung nahe. Der Grad der Stent-induzierten Gefäßverletzung korreliert mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion und der Stärke an neointimaler Proliferation.^{62;70;76;108;109} Dieser Zusammenhang macht deutlich, dass der Ansatz im vorliegenden Experiment, die Komplementkaskade zu unterbrechen, ein wichtiger Schritt zur Verhinderung der ISR sein könnte.

In dieser Arbeit wurde der Grad der Entzündung nach PTA und Stentimplantation durch verschiedene Methoden gemessen und es galt nachzuweisen, ob durch Komplementinhibitoren eine Unterbrechung der Komplementkaskade möglich ist und somit die Entzündungsreaktion verhindert oder zumindest verringert werden kann.

Die Komplementkaskade ist nicht nur ein humorales Abwehrsystem, sondern kann zusätzlich als Vermittler der zellulären Abwehrkaskade wirken. Sie wird einerseits über den klassischen Weg, also durch Besatz der Fremdzelle mit Immunglobulinen, andererseits über den alternativen Weg durch besondere Membranstrukturen wie Lipopolysaccharide oder virusinduzierte Membranantigene aktiviert. Mittels eines C1-Esteraseinhibitors wurde versucht, die Komplementkaskade gleich am Anfang zu unterbrechen, siehe Abbildung 1. Der C1-Esterase-Inhibitor ist neben seiner inhibitorischen Wirkung auf das Komplementsystem gleichzeitig der mächtigste Inhibitor von freiem Kallikrein

und β -Faktor XIIa.¹¹⁰ 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. Sobald Blut in Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen kommt, zerfällt Faktor XII, der inaktiv mit Präkallikrein und High-Molecular-Weight-Kininogen (HMWK) komplexiert vorliegt, in seine Fragmente α - und β -Faktor XIIa, welche wiederum zu einer Aktivierung des gesamten Kontaktaktivierungssystems führen. β -Faktor XIIa wandelt das Zymogen Präkallikrein in seine aktive Form Kallikrein um, welches vasodilatatorisch wirkendes Bradykinin von HMWK abspaltet.¹¹¹

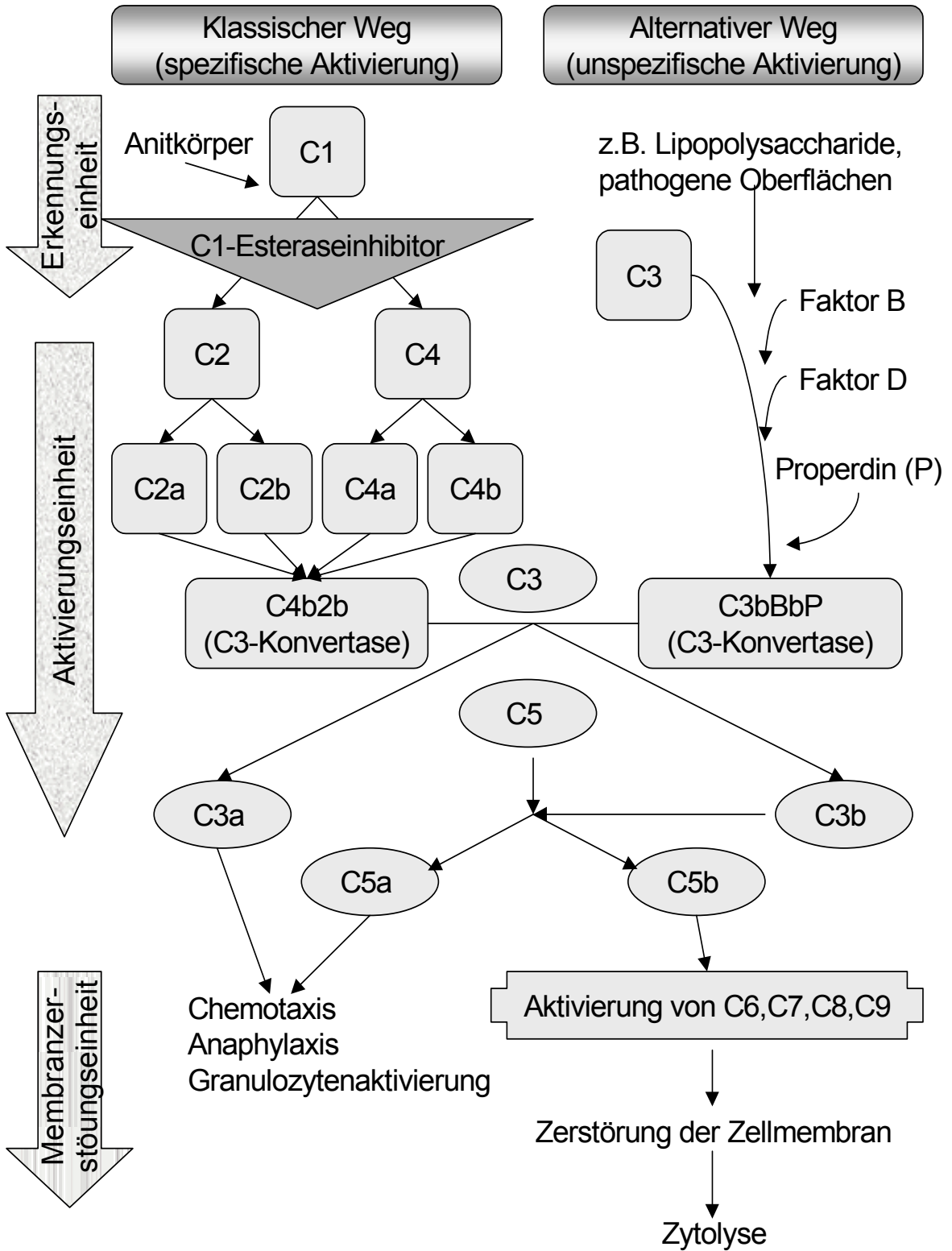


Abbildung 1: Schema des Komplementsystems mit seinen zwei Aktivierungswegen sowie des Ansatzpunktes der Hemmung durch C1-Esteraseinhibitor. Nach einer Aktivierung durch Antikörper (klassischer Weg) bzw. der Aktivierung durch pathogene Oberflächen (alternativer Weg) wird als gemeinsame Endstrecke Faktor C3 und C5 durch die so auf unterschiedliche Weise entstandene C3-Konvertase in seine zwei Komponenten gespalten. C3a aktiviert zusammen mit C5a die zelluläre Abwehr. C3b und C5b führt zur Aktivierung von C6, C7, C8 und dem polymerisierten Faktor C9, was schließlich in der Zerstörung der Zellmembran und der Auflösung der attackierten Zelle endet.

Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob

1. eine Bedeutung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Ablauf nach PTA und Stentimplantation im Hinblick auf die Neointimabildung zu finden ist
2. Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen Aortenstück, behandelt mit PTA und Aortenstück, behandelt mit PTA und Stentimplantation vorhanden sind
3. eine antiinflammatorische Beschichtung der Stents, mit einem C1-Esteraseinhibitor, die Restenoserate senken kann

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden 44 männliche Weiße Neuseelandkaninchen (NZW) (Fa. Charles River, Kißlegg) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht (KG) von 3,47 kg verwendet. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen in den dafür ausgelegten Räumen. Durch künstliche Beleuchtung wurde versucht, 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.^{15;112-114} Der Versuch wurde von der Tierschutzkommission der Universität Tübingen und dem Regierungspräsidium Tübingen unter Antrag Nr. R4/98 genehmigt.

2.1.2 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Die Tiere wurden randomisiert in sechs Gruppen eingeteilt. Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase mit Normalfutter ad libitum erhielten alle Tiere präoperativ eine 0,5%ige Cholesterindiät über 28 Tage. Bei der Operation wurde jedes Tier einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) und einer Stentimplantation unterzogen. Postoperativ erhielten die Versuchstiere wieder Normalfutter ad libitum. Zu den Einflussgrößen zählten die Zeit nach OP und der Stent – unbeschichtet (Ko) gegenüber beschichtet mit C1-Esterase-Inhibitor (C1).

Die Versuchsgruppen wurden zur Auswertung der morphometrischen und immunhistochemischen Parameter sowie histopathologischen Auswertung aufgeteilt. Die Stentsegmente sind die Gefäßabschnitte welcher einer PTA und anschließenden Stenimplantation unterzogen wurden. Sie sind definiert als C1-Gruppen (C1 = Stent mit C1-Esterase-Inhibitor beschichtet) und Kontrollgruppen (Ko = unbeschichteter Stent). Die Aortensegmente sind

definiert als Aortengruppe (Ao), dies sind die Gefäßabschnitte welche nur einer PTA unterzogen wurden.

Es resultierte folgende Einteilung der Tiere in die verschiedenen Gruppen (Abbildung 2):

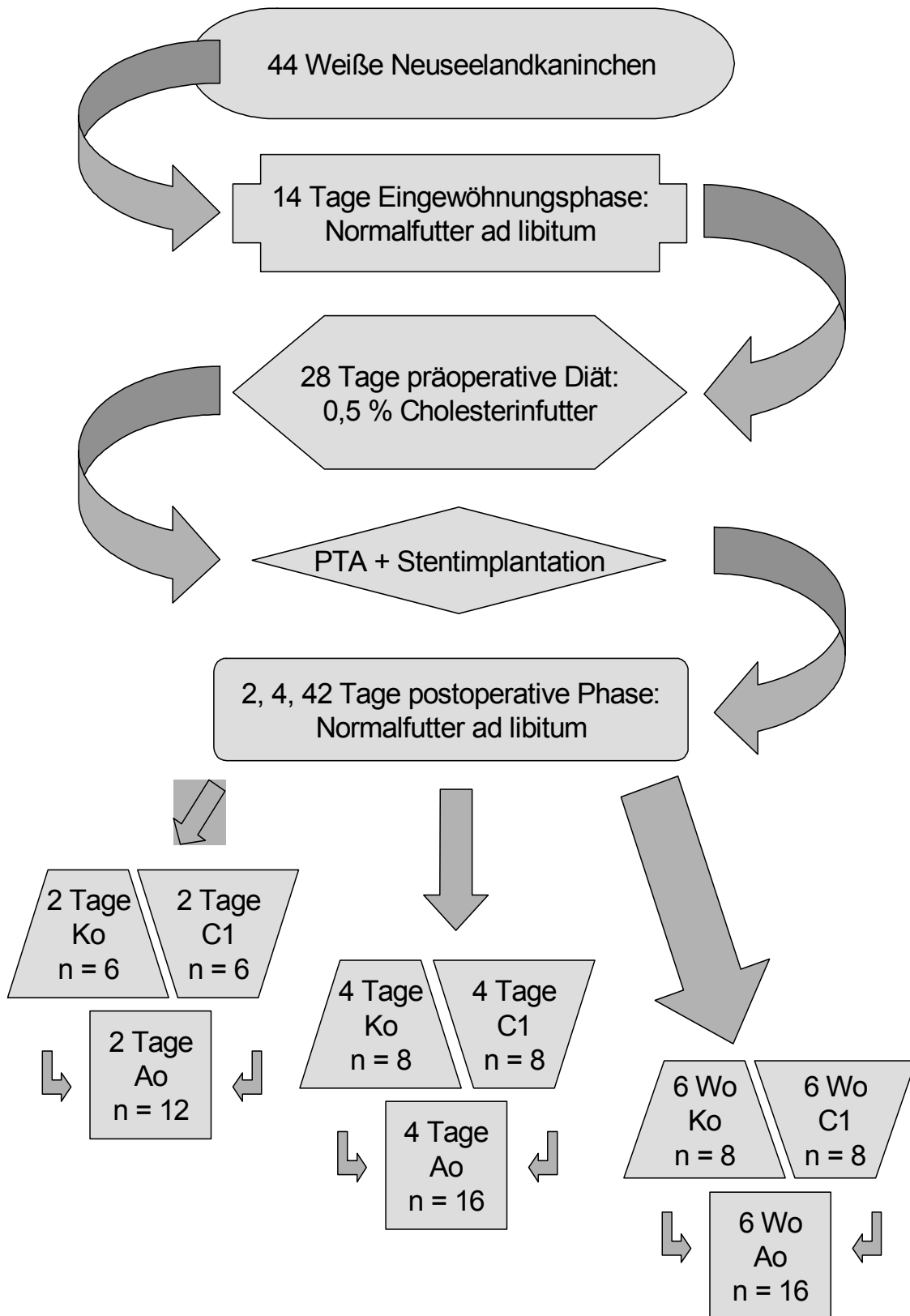


Abbildung 2: Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau (Ko = Kontrollgruppe; C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor; Ao = Aortengruppe)

2.2 Material

2.2.1 Katheter

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

2.2.2 Stent

Als Stents wurden Jostent peripheral® (Jomed International AB, Helsingborg, Schweden) verwendet. Der Stent von der Art eines Palmaz Stents hatte eine Länge von 17 mm und einem Durchmesser von 4 – 9 mm im expandierten Zustand. Es handelt sich um eine ballonexpandierbare Gefäßendoprothese aus einem biokompatiblen Stahl-Geflecht. Er wird in der Humanmedizin in periphere Arterien eingesetzt, nachdem diese erfolglos mittels PTA behandelt wurden. Unter sterilen Bedingungen wurde der Stent kurz vor der Implantation mit einer Peptidbeschichtung, die eine aktive Sequenz von C1- Esteraseinhibitor enthielt, überzogen.

2.2.3 Beschichtung der Stents und verwendete Substanzen

Den Tieren der Kontrollgruppen wurden handelsübliche fabrikneue Stents implantiert. Bei den Stents der C1-Gruppe wurde eine Beschichtungsmethode angewandt, die speziell für den Drug Release eingesetzt wird. Es wurden dazu Peptidsequenzen mit einer Größe von < 20 Aminosäuren verwendet. Die Beschichtung enthält eine dem C1-Inhibitor ähnliche Substanz.

Der C1-Esterase-Inhibitor ist ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 105 kD und einem Kohlehydrat-Anteil von 40 %. Seine Konzentration im menschlichen Plasma beträgt ca. 240 mg/l. Außer dem menschlichen Plasma, enthalten auch Placenta, Leberzellen, Monozyten und Thrombozyten C1-Esterase-Inhibitor. C1-Esterase-Inhibitor gehört zu dem Serin-Protease-Inhibitor-(Serpin)-System des menschlichen Plasmas. Unter physiologischen Bedingungen hemmt C1-Esterase-Inhibitor den klassischen

Weg der Aktivierung der Komplementkaskade durch Inaktivierung der enzymatisch aktiven Komponenten C1s und C1r. Die aktiven Enzyme bilden einen Komplex mit dem Inhibitor in einem Verhältnis von 1:1. Außerdem ist C1-Esterase-Inhibitor der wichtigste Inhibitor der Kontaktaktivierung, indem er Faktor XIIa und seine Fragmente hemmt und neben Alpha-2-Macroglobulin der wichtigste Inhibitor des plasmatischen Kallikreins ist.

Die Substanzen wurden mit Hilfe des Hydrogels Polyvinylpyrrolidone = PVP (K 90, Kollidon® BASF Ludwigshafen, Deutschland) über UV-Polymerisation immobilisiert und an die Oberfläche des Stents gebunden. Polyvinylpyrrolidone (PVP) ist ein bekanntes Polymer, welches seit Jahrzehnten klinische Verwendung findet, wie beispielsweise für Blutersatzmittel und Beschichtung von medizinischen Materialien.¹¹⁵ 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.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Die eigentliche Beschichtung der Stents erfolgte im sogenannten Dipping- (Eintauch-) Verfahren. Zur Herstellung der Dipping-Lösung wurden 500 µg C1-Peptid in Pulverform in 2 ml 10%iger wässriger PVP K 90-Lösung gegeben. Dies erhöht die Plasmahalbwertszeit wie Kaneda et al. gezeigt haben.¹¹⁹ 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 auslöste. 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.

Nach der Stentimplantation setzt das Polymer bei 37 °C die Substanz in den ersten 24 Stunden zu 90 % in das umgebende Gewebe frei.^{120;121} Die exakte Konzentration der Substanz pro mm² wurde in dieser Studie nicht berechnet. Die Konzentration von 500 µg C1-Peptid in der Beschichtungslösung gilt als ausreichend für die lokale Anwendung.^{122;123}

2.3 Methode

2.3.1 Präoperative Phase

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

2.3.2 Stentimplantation

Zur Narkotisierung und Analgesierung wurde den Tieren 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 Kombination aus Narkotikum und Sedativum führt zu einer Vollnarkose mit völliger Analgesie. Atropinsulfat unterdrückt dabei die Salivation und soll mögliche kardio- und atemdepressive Effekte des Narkosegemisches verhindern.

In anästhesiertem Zustand wurde die Regio inguinalis dextra rasiert, mit 70%igem Alkohol und Betaisodona-Lösung desinfiziert und das Operationsgebiet steril abgedeckt. Der 3 cm lange Hautschnitt erfolgte direkt über dem tastbaren Verlauf der Arteria femoralis dextra. Dem Hautschnitt folgte die Freilegung und Präparation der Arteria femoralis dextra. Die darüber

liegende Muskulatur wurde durch stumpfe Präparation an den Faszien durchtrennt, bis sich der femorale Gefäßnervenstrang in seiner Muskelloge darstellte. Die umhüllende Faszie wurde eröffnet, um anschließend die Arteria femoralis von Vena und Nervus femoralis zu trennen. Das Gefäß wurde an beiden Enden mit einem Faden (Perma-Hand Seide® 2-0, Ethicon, Brüssel, Belgien) umschlungen, um es besser darstellen und eine Möglichkeit zur Unterbindung haben zu können. Um eine optimale Blutfüllung zu erzielen, wurde eine mikrochirurgische Gefäßklemme (Yasargil-Phynox Aneurysma-Clip, Aesculap AG, Tuttlingen) zuerst distal, dann proximal gesetzt. Durch eine kleine Inzision von 1,5 mm Länge wurde das Gefäß mikrochirurgisch eröffnet, welche den Zugang für Katheter und Schleuse bildete. Ein 2F-Fogarty® Arterien-Embolektomiekatheter (Baxter, Unterschleissheim) wurde über die Öffnung eingeführt, die craniale Gefäßklemme entfernt, und der Katheter bis zur suprarenalen Aorta abdominalis vorgeschoben. Die Inflation des Ballons erfolgte mittels einer mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllten 1-ml-Spritze mit geringem Druck. Durch dreimaliges Zurückziehen des inflatierten Ballons wurde das Gefäß mechanisch dilatiert. Anschließend konnte die Schleuse (5F Avanti, Cordis, Warren, U.S.A.) in der Arteria femoralis dextra platziert werden. Der Stent wurde über die Schleuse auf dem Angioplastiekatheter (Cordis Savvy, Warren, U.S.A.) in das Gefäß eingeführt. Nach Erreichen der infrarenalen Aorta abdominalis wurde der Angioplastieballon unter Röntgenkontrolle 20 s lang auf einen Druck von 8 atm inflatiert, es folgte eine 20 s lange Deflation. Der Katheter und die Schleuse wurden anschließend aus dem Gefäßlumen entfernt und die craniale Gefäßklemme wieder gesetzt. Die Klemmen wurden nun durch Ligaturen aus Haltefäden ersetzt. Die Naht der Muskelloge erfolgte fortlaufend (Vicryl® Faden 2-0 SH, Ethicon, Brüssel, Belgien), die Naht der Haut mit Einzelkopf-Rückstichnähten nach Donati (Vicryl® Faden 3-0 FS-2, Ethicon, Brüssel, Belgien). Es wurden regelmäßig Atmung und Kornealreflex des Tieres zur Beurteilung der Narkosetiefe kontrolliert, um bei Bedarf weiteres Narkotikagemisch intramuskulär applizieren zu können.

2.3.3 Postoperatives Procedere

Zur peri- und postoperativen Thromboseprophylaxe wurde direkt nach der Operation und die nächsten drei postoperativen Tage alle 12 Stunden je 900 I.E. Standard-Heparin/kg Körpergewicht (Liquemin® N25000, Roche, Basel, Schweiz) subkutan appliziert, alle 24 Stunden 30 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin, Bayer AG, Leverkusen) in die Glutealmuskulatur injiziert. Bis zum Versuchsende erhielten die Tiere jeden dritten Tag 60 mg Acetylsalicylsäure. Die postoperative Untersuchung der Tiere und Inspektion der Operationswunde erfolgte täglich. Alle Versuchsgruppen erhielten von der Operation an bis zum Versuchsende Normalfutter (Altromin, Lage) ad libitum.

2.4 Blutentnahmen

Im Rahmen der Narkose wurden den Tieren bei der Operation über die Schleuse aus der Arteria femoralis und bei Versuchsende durch intrakardiale Punktion jeweils 4 ml Blut entnommen. Aus diesen Blutproben wurden die Serumcholesterinspiegel zum Zeitpunkt der Operation und des Abtötens bestimmt.

2.5 Applikation von 5´-Brom-2´Desoxyuridin (BrdU) und 2´Desoxycytidin (d-cyt)

Achtzehn Stunden vor der Perfusionsfixierung und der Entnahme der Gefäße wurden die Tiere erneut narkotisiert und analgisiert, wie unter Kapitel 2.3.2 beschrieben. Der Nacken wurde rasiert und ein Längsschnitt von ca. 3 cm gesetzt. Durch stumpfes präparieren entlang der Innenseite der Nackenhaut, durch die Fettschicht hindurch bis zur Halsfaszie wurden zwei Nackentaschen freigelegt und in diese 100 mg BrdU/kg KG und 75 mg d-cyt/kg KG verteilt. Gleichzeitig erhielten die Tiere eine intramuskuläre Injektion von 30 mg BrdU/kg KG und 25 mg d-cyt/kg KG in physiologischer Kochsalzlösung. Zwölf Stunden vor der Gefäßentnahme wurden den Tieren in einer erneuten Injektion 30 mg BrdU/kg KG und 25 mg d-cyt/kg KG in physiologischer Kochsalzlösung verabreicht.¹²⁴ Diese hier angewendete fraktionierte,

intramuskuläre und subkutane Applikation über 18 Stunden gewährleistet einen ausreichenden Wirkspiegel über den gesamten Zeitraum bis zur Perfusionsfixierung. Dadurch ist es möglich, dass BrdU, eine thymidinanaloge Substanz, während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und in einer unter Kapitel 2.6.6.1 beschriebenen Farbreaktion, der Avidin-Biotin-Methode, für die histologische Auswertung sichtbar gemacht wird. Um eine ausreichende BrdU-Resorption nachzuweisen, wurden zusätzlich als Kontrolle die Dünndarmmukosazellen der jeweiligen Versuchstiere entnommen und die Proliferationsrate bestimmt.

2.6 Entnahme und histologische Aufarbeitung der Gefäßpräparate

2.6.1 Gefäßentnahme und Perfusionsfixierung

Die Tiere wurden 2, 4 und 42 Tage nach dem operativen Eingriff unter Narkose (8 ml des Narkosegemisches, vgl. Kapitel 2.3.2) durch intrakardiale Applikation von 2 ml T 61 (Höchst Veterinär GmbH, Unterschleißheim) abgetötet. T 61 ist ein Gemisch aus Embutramid, Mebezoniumjodid und Tetracainhydrochlorid im Verhältnis 40 : 10 : 1. Es wird in der Veterinärmedizin zur exzitationslosen Tötung von Hunden, Katzen und anderen Tieren verwendet. Embutramid hat dabei eine stark narkotisierende Wirkung auf das Atemzentrum. Mebezoniumjodid lähmt die quergestreifte Muskulatur und führt zu einem schnellen Kreislaufkollaps.

Nach Abtötung der Tiere wurde der Bauchraum durch eine Laparotomie eröffnet und die Aorta abdominalis freipräpariert. Durch Punktion der Aorta mit einer Venenverweilkanüle in Richtung des Blutflusses und einer Ligatur cranial der Kanüle wurde der Zugang für die Perfusionsfixierung geschaffen. Mit Hilfe eines Infusionssystems konnte nun über den Katheter mit der Perfusionsfixierung über 30 min. bei einem Perfusionsdruck von 70 mmHg begonnen werden. Die dafür verwendete Lösung bestand aus einer mit 0,1 molarem Cacodylat (Dimethylarsäure, MG = 214,13 g, pH 7,4) gepufferten 2%igen Paraformaldehydlösung. Nach Beendigung der Perfusionsfixierung

wurde der infrarenale Anteil der Aorta mit Stent und nachfolgendem, ungestentetem Abschnitt bis zur Aortenbifurkation entnommen. Zusätzlich musste ein Stück Dünndarm entnommen werden, welches als Kontrolle für den erfolgreichen Einbau von BrdU bei der immunhistologischen Färbung diente. Anschließend erfolgte eine Immersionsfixation in einer mit 0,1 molarem Cacodylat (Dimethylarsäure, MG = 214,13 g, pH 7,4) gepufferten 2%igen Paraformaldehydlösung für mindestens 24 Stunden.

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 notwendig, 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 µm) 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

Die in Formaldehyd fixierten Gefäße wurden von noch vorhandenem Bindegewebe befreit. Von dem proximalen Teilstück wurden von der ursprünglichen Mitte ausgehend, an der Kreuzungsstelle der Stentstreben, mit der rotierenden Trennscheibe zwei ca. 0,1 cm lange Stücke abgeschnitten. Unter einer Lupe wurden die Stentstreben vorsichtig aus der Aorta entfernt. 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 lange Stücke geschnitten. Die Segmente und die Dünndarmstücke wurden dann in Biopsiekassetten eingeschlossen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-99 %) entwässert. Anschließend dreimal (1 h, 15 h und dann für mindestens 24 h) in Methylbenzoat[®] (Fa. Merck, Darmstadt) und zweimal für 10 min in Rotihistol[®] (Fa. Roth, Karlsruhe) belassen und danach in Paraffin (Paraplast[®], Fa. Sherwood, St. Louis, USA) eingebettet. Mittels eines Mikrotoms (Modell Jung RM 2045, Leica, Wetzlar) wurden aus den eingebetteten Gefäßen Semidünnschnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt, diese Querschnitte auf Objektträger (76 x 26 mm, Menzel, Darmstadt) aufgebracht und in Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingebettet. Für alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen, bis auf die HE- und EvG-Querschnitte der Stentsegmente für die Morphometrie, wurden Paraffinschnitte 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.¹²⁵ Über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, jeweils 1 Tag) wurde das distale Aortensegment mit Stent und sich anschließender nativer Aorta entwässert. Bei dieser Methode wurden die Stentstreben nicht entfernt. Anschließend erfolgte die Infiltration mit einem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff, bestehend aus einem Gemisch mit Alkohol 100 % und Methamethylakrylat (MMA, Technovit 7200, Kulzer, Friedrichsdorf). Während der ersten Stufe im Verhältnis Alkohol : Methamethylakrylat 70 : 30, bei der zweiten Stufe im Verhältnis 50 : 50 und in der dritten Stufe im Verhältnis

30 : 70. Danach folgten zwei Stufen mit reinem Methamethylakrylat. Jede Stufe dauerte 48 Stunden. Die Polymerisation und Aushärtung wurde in Einbettmulden durchgeführt, welche mit Methamethylakrylat aufgefüllt wurden. Die Polymerisation wurde im Exakt-Kulzer Lichtpolymerisationsgerät (Kulzer, Friedrichsdorf) bei einer Wellenlänge von 400 – 500 nm für 4 Stunden durchgeführt. Ein Objektträger wurde mit einem schnellhärtenden, kaltpolymerisierenden Dreikomponentenkunststoff (Technovit 4000, Kulzer, Friedrichsdorf) auf den gehärteten Kunststoff geklebt, nachfolgend vom Kunststoffblock eine ca. 200 µm dicke Scheibe abgetrennt. Dies erfolgte mittels einem Diamanten besetzten 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. 100 µm geschliffen und die Querschnitte auf Objektträger (76 x 26 mm, Menzel, Darmstadt) aufgebracht. Die Körnung des verwendeten Sandpapiers variierte von 1200 bis 2000. Abschließend wurden die Präparate Hämalaun-Eosin und Elastica-van-Gieson gefärbt und in Gelatine (Aquatex Merck 8562, Merck, Darmstadt) eingebettet.

2.6.5 Histologische Färbungen

2.6.5.1 Grundlagen

Im folgenden werden die histologischen Färbungen Hämalaun-Eosin (HE) und Elastica-van-Gieson (EvG) beschrieben. Für die HE- und EvG- Färbungen wurden die Präparate zunächst durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100-70 %) entparaffiniert.

2.6.5.2 HE-Färbung

Zur Beurteilung der morphologischen Strukturen wurde eine Standard-Färbung mit Hämalaun und Eosin durchgeführt, bei der die Zellkerne blau, das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanz rosa angefärbt werden. Die entparaffinierten Schnitte verblieben 5 min zur Kernfärbung in Mayers

Hämalaunlösung (Fa. Merck, Darmstadt). Anschließend wurden sie 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und 5 min in Eosin (Fa. Sigma, Deisenhofen) gegengefärbt. Zum Schluss wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, einige Minuten in Xylol belassen und in Eukitt (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

2.6.5.3 EvG-Färbung

Bei dieser Färbung, die zur histologisch-pathologischen Beurteilung verwendet wurde, stellen sich die Zellkerne dunkelblau bis schwarz, elastische Fasern dunkelviolet bis schwarz, Bindegewebe leuchtend rot und Muskulatur gelb dar. Die entparaffinierten Gefäßschnitte wurden 30 min mit Resorcinfuchsin (Chroma Gesellschaft, Köngen), anschließend nach Spülen mit 80%igem Alkohol und H₂O 6 min mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen) gefärbt. Die Präparate wurden nach Differenzierung in HCl-Alkohol 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und nach erneutem Spülen mit Wasser etwa 2 min in van-Gieson-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen) belassen; in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden sie entwässert. Die gefärbten Schnitte wurden kurz in Xylol getaucht und in Vitro Clud (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

2.6.6 Immunhistochemische Färbungen

2.6.6.1 Grundlagen

Für die Darstellung des Endothels, Makrophagen, sowie proliferierender Zellen wurde mittels spezifischer Antikörper das entsprechende Merkmal angefärbt.

Der Nachweis der verschiedenen Antikörper erfolgte mit der Avidin-Biotin-Methode.¹²⁶⁻¹²⁸ Diese Methode ermöglicht es, gesuchte Antigene durch Bindung spezifischer Erst- und Zweitantikörper anzufärben und dadurch der Auswertung unter dem Lichtmikroskop zugänglich zu machen. Das prinzipielle Vorgehen besteht darin, die entparaffinierten Gefäßschnitte nach Blockierung der endogenen Peroxidase und Auftragen von Normalserum mit dem spezifischen Erstantikörper zu inkubieren und anschließend einen Biotin-konjugierten

Zweitantikörper zu zugegeben. Durch Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes erfolgt die Bindung der freien Stellen des Avidinkomplexes an die Biotinmoleküle des Sekundärkomplexes. Dies ist aufgrund der außergewöhnlich hohen Affinität des Avidin zum Vitamin Biotin möglich. Nach Auftragen des Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes wurde anschließend der AEC-Komplex (3-Amino-9-Ethyl-Carbachol) zugegeben. Dieser dient als Substrat für die mit dem Avidin-Biotin-Komplex konjugierte Peroxidase. Durch die Reaktion der Peroxidase mit dem AEC-Komplex entsteht ein rosarotes Farbprodukt und H₂O.

Die Gefäßpräparate wurden zuerst schrittweise in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100-70 %) entparaffiniert und kurz in Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden sie in Citratpuffer 15 min in der Mikrowelle bei 750 Watt erhitzt und danach im Eisbad gekühlt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 30 min in einem mit 30%igem Hydrogenperoxid versetzten PBS-Puffer^a belassen. Nach jedem dieser Schritte wurden die Gefäßpräparate 10 min mit PBS-Puffer pH 7,4 gespült.

Vor dem Auftragen des Erstantikörpers wurden die Präparate in der Regel mit Normal Horse Serum (Vectastain ABC-Kit, Mouse IgG, PK-4002, Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um unspezifische Bindungen im Gewebe zu blockieren. Nach der Inkubation mit dem jeweils spezifischen Erstantikörper wurde ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper zugegeben, der sich an den Primärantikörper anlagert. Anschließend wurde der ABC- (Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Goat IgG, Pk-4005; Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) und der AEC-Komplex (Vector Peroxidase Substrat Kit AEC, SK 4200; Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden) aufgetragen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mit PBS-Puffer pH 7,4 gespült, dem zur Herabsetzung der Oberflächenspannung das Detergens Tween 20 (Fa. Merck, Schuchardt)

^a 150 ml PBS Puffer + 2 ml H₂O₂ (30 %)
1 Liter PBS-Puffer = 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g NaH₂PO₄ + 0,24 g KH₂PO₄ in 1 l Aqua bidest.

hinzugesetzt wurde. Nach regelmäßiger Kontrolle der Farbintensität unter dem Mikroskop wurde die Färbung durch zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer abgebrochen. Die Gegenfärbung wurde durch kurzes Eintauchen in Mayers Hämalaun durchgeführt. Die Gefäßschnitte wurden in Gelatine (Aquatex, Merck 8562) eingebettet.

Das hier beschriebene Verfahren wurde mit geringfügigen Abweichungen bei allen immunhistochemischen Färbungen angewendet. Die Besonderheiten bei einzelnen Färbungen werden im Folgenden erläutert. Die genauen Angaben zu den Primär- und Sekundärantikörpern sind Tabelle 1 zu entnehmen.

2.6.6.2 Endothel-Färbung

Bei dieser Färbung wird der vom Endothel gebildete von-Willebrand-Faktor (vWF) rotbraun markiert. Für den immunhistochemischen Nachweis des vWF wurden die Schnitte 30-60 min bei 60 °C im Brutschrank thermisch entparaffiniert. Abweichend vom oben beschriebenen Verfahren wurden die Gefäßschnitte nach dem Entparaffinieren in der Mikrowelle statt in Citratpuffer in "Enhancer"-Lösung (Histosafe-Enhancer, Linaris, Wertheim-Bettingen) erhitzt. Durch die Formalin-Fixierung können zu markierende Epitope durch Quervernetzungen maskiert sein. Die "Enhancer"-Lösung bricht diese Quervernetzungen auf und macht die Epitope der Antikörperbindung wieder zugänglich. Der Zweitantikörper war biotinyliert.

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.¹²⁹ Der Primärantikörper reagiert mit einem zytoplasmatischen Antigen in den Makrophagen. Auch bei dieser Färbung wurden die Gefäßschnitte nach dem entparaffinieren bzw. vor dem blockieren der endogenen Peroxidase 15 min in Citratpuffer in der Mikrowelle gekocht. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter monoklonaler Maus-Antikörper verwendet.

2.6.6.4 BrdU-Färbung

Mit der BrdU-Methode ist es möglich, proliferierende Zellen durch den immunologischen Nachweis von BrdU darzustellen.¹³⁰ Zellen, die sich in der S-Phase des Zellteilungszyklus befinden, exprimieren es, Zellen in der G0-, G1-, M- und G2-Phase nicht. Als Primärantikörper diente hier anti-BrdUrd-DNA (Bio Cell Consulting, Laufen, Schweiz), ein monoklonaler Antikörper, der gegen das unter Kapitel 2.5 beschriebene, in die DNA proliferierender Zellen eingebaute BrdU gerichtet ist.¹²⁷ Zur Durchführung dieser Färbung war eine Andauung des Gewebes nötig, um die Vernetzung des Formaldehyds mit den entsprechenden Antigenstellen zu lösen. Dazu wurden die Schnitte für genau 7,5 min. mit 0,1% Protease bei 37 °C und danach mit 1 N HCl für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 1: Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Färbung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
von-Willebrand-Faktor	Monoclonal Mouse Anti-Human von Willebrand Factor, 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 Immunohistochemistry 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

Im EDTA-Plasma wurde das Gesamtcholesterin nach der CHOD-PAP- (Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin-) Methode (Ecoline[®] 25, Boehringer, Mannheim) zum Zeitpunkt der Operation nach 4 Wochen Cholesterindiät und 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 Digitalisierungstableau (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. Durch die morphometrische Messanordnung bedingt 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 dreimal 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, Tokio, 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, Tokio, Japan) im JPEG-Format gespeichert und mit dem Programm Corel PHOTO-PAINT[™], Version 7.373, überarbeitet.

2.7.3 Morphometrische Auswertung

Die morphometrische Bestimmung der Intimafläche (in mm²) erfolgte an EvG-gefärbten Schnitten der verschiedenen Gefäßsegmente, indem die Fläche, die lumenwärts von der Lamina elastica interna umschlossen wird, und die Fläche des Lumens ausgemessen und voneinander subtrahiert wurden. Für die Plaquegröße wurde der Mittelwert der Gefäßsegmente eines Tieres verwendet; für die weiteren Färbungen und Auswertungen wurde von den ausgemessenen Gefäßsegmenten jeweils das Segment mit der größten Plaquefläche herangezogen. Durch Subtraktion der Flächen innerhalb der Lamina elastica interna und Lamina elastica externa wurde die Mediafläche errechnet. An Längsschnitten wurde die Dicke von Intima und Media der Langzeittiere an der Stenose, im Übergangsbereich Stent – native Aorta und in der nativen Aorta bestimmt und anschließend das Verhältnis beider Messwerte gebildet. Die Anordnung der Schnitte ist in Abbildung 3 dargestellt:

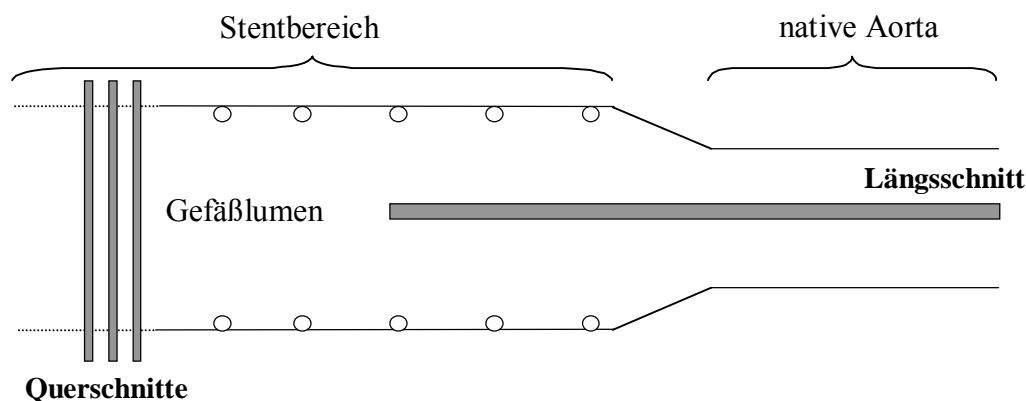


Abbildung 3: Anordnung der angefertigten Längs- und Querschnitte

2.7.4 Beurteilung des Endothels

Das Endothel wurde nur bei den Langzeittieren (42 Tage) beurteilt. Zur Darstellung des Endothels wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung vorgenommen (siehe Kapitel 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. Bei dieser Auswertung wurden die

Aorten- und Stentpräparate semiquantitativ mit 0 (Merkmal nicht vorhanden) und 1 (Merkmal vorhanden) bewertet.

2.7.5 Bestimmung des Anteils an Makrophagen

Um eine optimale Darstellung der Makrophagen zu erhalten, wurde ferner die immunhistochemische RAM-Färbung eingesetzt (siehe Kapitel 2.6.6.3). Dies ermöglichte eine bessere Beurteilung dieser vor allem in der Neointima und Media gelegenen Entzündungszellen. An den positiv angefärbten Segmenten wurde morphometrisch (siehe Kapitel 2.7.3) mit dem 1,25fach Objektiv die Gesamtplaquefläche bestimmt. Die Flächen (in mm^2), die Makrophagen in der Plaue einnahmen, wurden mit dem 10fach Objektiv ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtplauefläche gesetzt; daraus ergab sich der jeweils prozentuale Anteil an der Plaue.

2.7.6 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) und Immersionsöl an vier diametral gelegenen Stellen digital fotografiert. Die überarbeiteten und im JPEG-Format gespeicherten Bilder wurden mit einem Farbdrucker (HP Color Laser Jet 4500, Hewlett Packard, USA) ausgedruckt (94fache Vergrößerung). In der Plaue der vier Fotos wurden alle Zellkerne ausgezählt. Die Plauefläche (in mm^2) wurde auf den vier Fotos morphometrisch gemessen und die Werte der vier Fotos addiert. Aus diesen Daten ergab sich die Gesamtzellzahl und die Zelldichte, als Verhältnis der Gesamtzellzahl zur Fläche. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert berechnet.

Als positiv wurden Zellen gewertet, deren Zellkerne eindeutig rot angefärbt waren. Die Zahl der positiv gefärbten Zellkerne wurde ins Verhältnis zu der Gesamtzellzahl gesetzt. So ergab sich der Proliferationsindex.

2.7.7 Histologisch-pathologische Beurteilung der Aorten- und Stentsegmente

Die HE- und EvG-gefärbten Schnitte der Aorten- und Stentsegmente wurden histologisch-pathologisch bewertet. Die Auswertung wurde kontinuierlich an aufeinanderfolgenden Tagen unter Blindbedingungen, also ohne Angaben der Gruppen oder klinischer Informationen, in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Gefäßpathologen, durchgeführt. Die Anzahl der Querschnitte betrug 3 – 5 pro Objektträger, es wurden jeweils alle Querschnitte pro Objektträger beurteilt. Von den Aortensegmenten wurden die Kriterien intimale Hyperplasie, inflammatory response nach Hofma et al.⁴¹(siehe Tabelle 3) bestimmt und sie wurden in die Atherosklerosestadien nach Stary et al.^{131;132}(siehe Tabelle 4) eingeteilt. Die Stentsegmente wurden nach den Kriterien inflammatory response nach Hofma et al.⁴¹(siehe Tabelle 3), Schaumzellen, Fibrose, Fibrininsudation, fibrino-leukozytäres Exsudat, Destruktion elastischer Lamellen, Atrophie glatter Muskelzellen, Kalzifikationen, mononukleäre Infiltrate, Ödem und dem modifizierten Vessel Injury Score nach Schwartz et al.⁷¹(siehe Tabelle 2) beurteilt.

2.7.7.1 Vessel Injury Score

Der Grad der Gefäßwandverletzung durch den Stent wurde mit Hilfe des Vessel Injury Score nach Schwartz et al.⁷¹ 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 Vessel Injury Score wurde dahingehend verändert, dass jede Strebe betrachtet und dann ein Wert für das gesamte Präparat vergeben wurde und nicht ein Wert pro Strebe, um danach den Mittelwert für das gesamte Präparat zu bilden.

Tabelle 2: Modifizierter Vessel Injury Score nach Schwartz et al.⁷¹:

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 die Lamina elastica externa fortsetzen, teilweise Einkerbungen der Streben in der Adventitia

2.7.7.2 Inflammation Score

Um das Ausmaß und die Dichte der entzündlichen Infiltrate möglichst einheitlich zu erfassen und die Werte auch vergleichen zu können, erfolgte die Einteilung in einen Inflammation Score. Dieser wurde von Hofma et al.⁴¹ aufgestellt. Sowohl Hofma et al.⁴¹ als auch Kornowski et al.⁷⁶ stellten 1998 einen Inflammation Score auf, der die entzündlichen Veränderung im Gefäß 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 umso höher, je mehr Entzündungszellen in den inneren Schichten der Gefäßwand vorhanden waren. Kornowski et al. hingegen beurteilten die Art und das Ausmaß der Entzündungsantwort nach Stentimplantation direkt an der Stenose, 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.¹³³) und dem Ausmaß der entzündlichen Antwort festgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass in unserer Studie Aortenstücke ohne Stent und Gefäßstücke mit Stent beurteilt wurden, entschieden wir uns für den Inflammation Score nach Hofma et al., welcher in Tabelle 3 dargestellt ist.

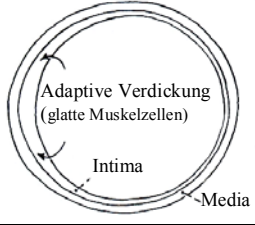


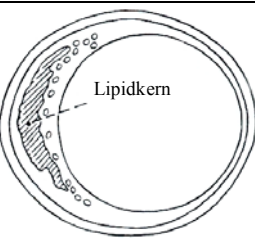
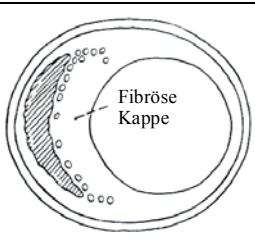
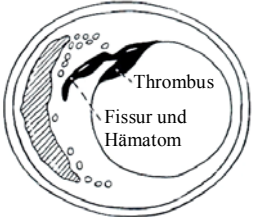
Tabelle 3: Inflammatory response nach Hofma et al.⁴¹

0	=	keine Entzündungsreaktion
1	=	Entzündung infiltriert die Adventitia
2	=	diffuse, klar sichtbare Entzündung infiltriert die Adventitia
3	=	schwere, oft granulomatöse Entzündungsreaktion in der Adventitia, teilweise bis in die Intima ausgedehnt

2.7.7.3 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.¹³¹ 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 (Tabelle 4):

Tabelle 4: Schematische Darstellung der Abfolge von Typ I- bis Typ VI-Läsionen nach Stary et al. 1995¹³¹

Typeneinteilung	Histologisches Bild	Wachstum	Auftreten	Klinik
Typ I (Initialläsion) Lipoproteinansammlung in der Intima		Wachstum hauptsächlich durch Ansammlung von Lipiden	ab dem 1. Lebensjahrzent	klinisch stumm
Typ II (fatty streak) Lipoproteinansammlung in der Intima; Lipide in Makrophagen und glatten Muskelzellen (intrazelluläre Lipidansammlung)				
Typ III (Intermediärläsion) zusätzlich: vereinzelt kleine Ablagerungen extrazellulärer Lipide			ab dem 3. Lebensjahrzehnt	
Typ IV (Atherom) zusätzlich: Zusammenfluß der vereinzelt Lipidablagerungen zu einem Lipidkern				
Typ V (Fibroatherom) zusätzlich: Entwicklung deutlicher Kollagenschichten und Vermehrung der glatten Muskelzellschichten über dem Lipidkern		beschleunigte Muskel- und Kollagenbildung	ab dem 4. Lebensjahrzehnt	klinisch stumm oder auffällig
Typ VI (Atherothrombose) zusätzlich: Ablagerungen von thrombotischem Material und/oder Hämatom und/oder Erosion oder Fissur		Atherothrombose und Hämatom		

2.7.7.4 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- +++) durch die Anzahl der in dieser Gruppe berücksichtigten Tiere (n). Der Grad der Ausprägung des jeweiligen Merkmals wurde bei der semiquantitativen Auswertung nach folgendem Schema beurteilt:

Tabelle 5: Schema zur histopathologischen Auswertung

0	=	Merkmal nicht vorhanden
+	=	Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %)
++	=	Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %)
+++	=	Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %).

2.7.8 Messwertdefinitionen

Folgende quantitativen Messwerte wurden erhoben und statistisch verglichen:

- Intimafläche (in μm^2):

Die Intimafläche berechnet sich wie folgt:

$$\text{Intimafläche} = \text{Fläche unter der Lamina elastica interna} - \text{Lumenfläche}$$

- Verhältnis Plaque-/ Mediadicke an Längsschnitten:

Das Verhältnis errechnete sich wie folgt:

$$\text{Ratio} = \text{Dicke der Plaque} / \text{Dicke der Media}$$

- Mediafläche (in mm²):

Um die Mediafläche zu berechnen, wurde wie folgt vorgegangen:

Mediafläche = Fläche unter der Lamina elastica externa - Fläche unter der Lamina elastica interna

- Stenosegrad (in %):

Mit Hilfe folgender Formel wurde das prozentuale Ausmaß der Stenosierung durch die Intima berechnet:

Stenosegrad = $\frac{\text{Intimafläche} \times 100}{\text{Intimafläche} + \text{Lumenfläche}}$

- Zelldichte (n/ mm²):

Die Zelldichte errechnet sich folgendermaßen:

Zelldichte = $\frac{\text{Gesamtzellzahl der Intima}}{\text{Intimafläche}}$

- Proliferationsindex:

Der Proliferationsindex wurde wie folgt berechnet:

Proliferationsindex = $\frac{\text{BrdU positive Zellen der Intima}}{\text{Gesamtzellzahl der Intima}}$

- Serumcholesterin (in mg/ dl)

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 p-Wert > 0,1) 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 Kruskal-Wallis-Test bzw. den Wilcoxon-Test, um auf Signifikanz zu prüfen. Um Korrelationen zwischen den einzelnen Gruppen zu berechnen, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient oder der Spearman-Korrelationskoeffizient bestimmt und als σ (Rho) angegeben.

3 Ergebnisse

Die Vorbehandlungsphase aller Gruppen bestand aus einer 0,5%igen Cholesterindiät über 4 Wochen vor der Operation; anschließend wurden die Tiere bis zum Versuchsende cholesterinfrei ernährt.

Die PTA und Implantation des Stents verlief bei allen Versuchstieren (n = 44) problemlos. 2 Tage, 4 Tage bzw. 6 Wochen nach der Intervention wurden die Tiere planmäßig abgetötet. Das Versuchsende erreichten alle 44 Tiere. Bei einem Tier der Gruppe 2 Tage C1 (C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor), war die Aorta perforiert und der Stent in der Bauchhöhle freigesetzt. Ein Kaninchen aus der Gruppe 6 Wochen Ko hatte zum Zeitpunkt der Intervention, im Vergleich zu allen anderen Kaninchen, einen sehr niedrigen Cholesterinspiegel, so daß von einer ungenügenden Cholesterinaufnahme ausgegangen werden kann. Von diesen beiden Kaninchen wurden keine Parameter berücksichtigt, insgesamt gingen 42 Tiere in die Auswertung ein.

3.1 Gesamtcholesterin im Plasma

Eine vierwöchige präoperative Cholesterinfütterung lag dem Restenosemodell zugrunde. Blut zur Bestimmung der Konzentration des Plasma-Gesamtcholesterins der vorbehandelten Tiere wurde zum Zeitpunkt der Intervention und zum Versuchsende entnommen.

Zum Zeitpunkt der Operation lag die Plasmakonzentration des Gesamtcholesterins bei durchschnittlich 1017 ± 446 mg/dl, es war kein signifikanter Unterschied feststellbar (Tabelle 6 und Abbildung 4). Nach Absetzen des cholesterinhaltigen Futters sanken die Gesamtcholesterinspiegel ab und lagen nach 2 Tagen bei 976 ± 365 mg/dl, nach 4 Tagen bei 748 ± 218 mg/dl und nach 6 Wochen bei 140 ± 83 mg/dl (Tabelle 7 und Abbildung 5).

Tabelle 6: Werte der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Stentimplantation

	Cholesterin bei OP (mg/dl)		
Zeitpunkt	2 Tage	4 Tage	6 Wochen
Mittelwert	1046,9	961	1053,3
Standabw.	260,1	365	621,3
Min.	568,0	292	292,0
Max.	1412,0	1480	2308,0
Median	1023,0	1016	944,0

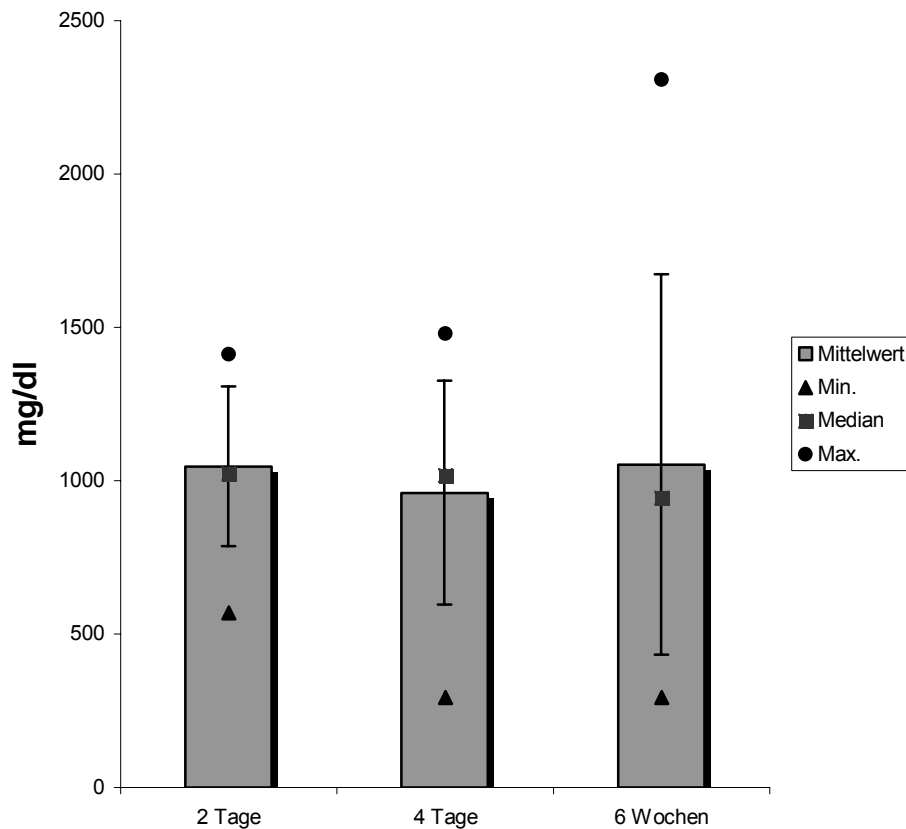
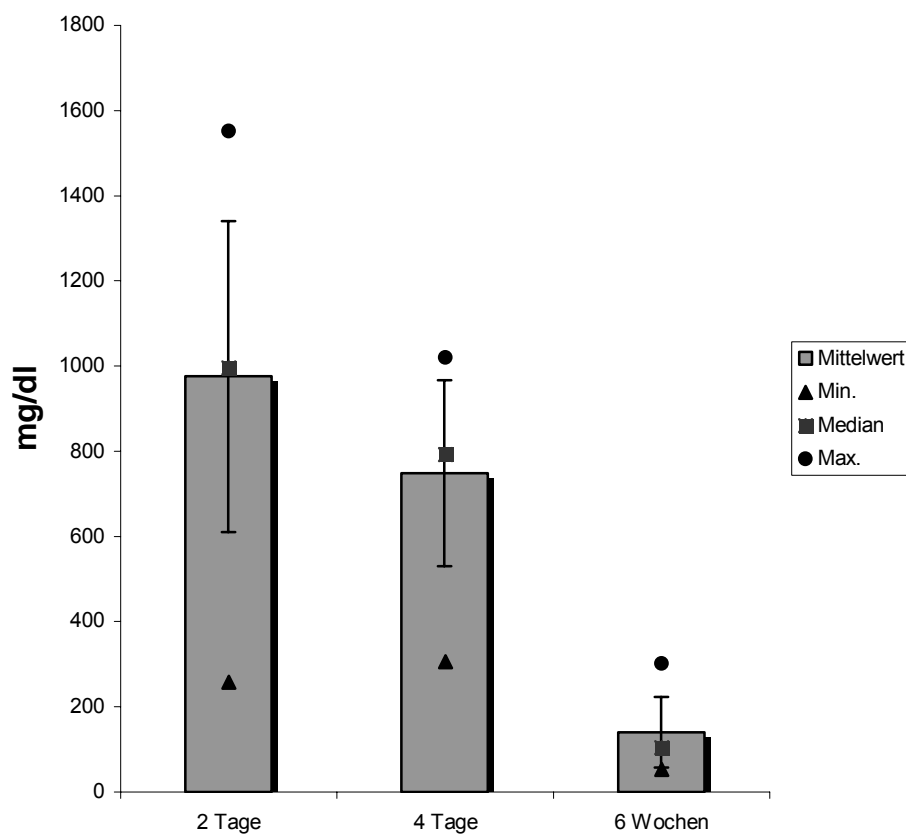


Abbildung 4: Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Stentimplantation

Tabelle 7: Werte der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt des Versuchsendes

Zeitpunkt	Cholesterin bei Versuchsende (mg/dl)		
	2 Tage	4 Tage	6 Wochen
Mittelwert	975,5	748,3	140,0
Standabw.	364,9	218,3	83,2
Min.	258,0	306,0	53,0
Max.	1551,0	1020,0	301,0
Median	996,0	792,0	104,0

**Abbildung 5:** Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma bei den Versuchsgruppen zum Zeitpunkt des Versuchsendes

3.2 Morphometrische und immunhistochemische Parameter

Unmittelbar nach Versuchsende wurde die Aorta abdominalis entnommen und histologisch aufgearbeitet. Von Interesse war das Ausmaß der Entzündungsreaktion unter verschiedenen Gesichtspunkten (im Stentsegment - Kontrollgruppen und C1-Gruppen, im Aortensegment und nach Zeit). Um diese Veränderungen miteinander vergleichen zu können, wurden folgende Parameter bestimmt: Intimafläche, Proliferationsindex, Zelldichte, Stenosegrad. Desweiteren wurde die Mediafläche, das Verhältnis Plaque-/ Mediadicke, der Anteil der Makrophagen und des Endothels bestimmt. Zusätzlich wurde eine histopathologische Auswertung durchgeführt.

3.2.1 Intimafläche

Da unter dem 10fach Objektiv bei den 2- und 4-Tagestieren die Intima teilweise nicht ausgemessen werden konnte, wurde sie unter dem 40fach Objektiv mit Immersionsöl abfotografiert und anschließend ausgemessen.

Die Intimafläche unterschied sich zwischen: Aorta - Stent, 2 Tage – 4 Tage – 6 Wochen und Ko - C1. Die intimale Gewebsneubildung war in allen Versuchsgruppen nach 6 Wochen signifikant stärker ausgeprägt als nach 2 und 4 Tagen.

In den 2-Tagesgruppen war die Plaquegröße der Ao-Tiere ($6,5 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$) signifikant ($p < 0,05$) geringer im Vergleich zu den Ko-Tieren ($34,3 \pm 17,1 \mu\text{m}^2$).

Innerhalb der 4-Tagesgruppen waren keine Signifikanzen zu erkennen.

Zu einer deutlichen intimalen Hyperplasie ist es bei den 6-Wochentieren gekommen. Dabei fiel diese mit $1512,3 \pm 598,8 \mu\text{m}^2$ bei der Ko-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer aus als bei der Ao-Gruppe mit $1035,5 \pm 324,7 \mu\text{m}^2$. Diese Unterschiede verdeutlichen Tabelle 8 und Abbildung 6.

Tabelle 8: Messwerte der Intima-/Plaquerfläche

Zeitpunkt	Plaquerfläche (µm ²)								
	2 Tage			4 Tage			6 Wochen		
Gruppe	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1
Mittelwert	6,5	34,3	21,8	64,1	57,0	49,6	1035,5	1512,3	1357,9
Standabw.	5,1	17,1	21,3	65,6	53,4	43,3	324,7	598,8	405,4
Min.	0,0	16,0	0,0	10,0	8,0	10,0	438,0	992,0	773,0
Max.	11,0	59,0	48,0	165,0	136,0	142,0	1561,0	2747,0	1929,0
Median	10,0	32,0	10,0	13,0	43,0	37,5	996,0	1231,0	1306,0

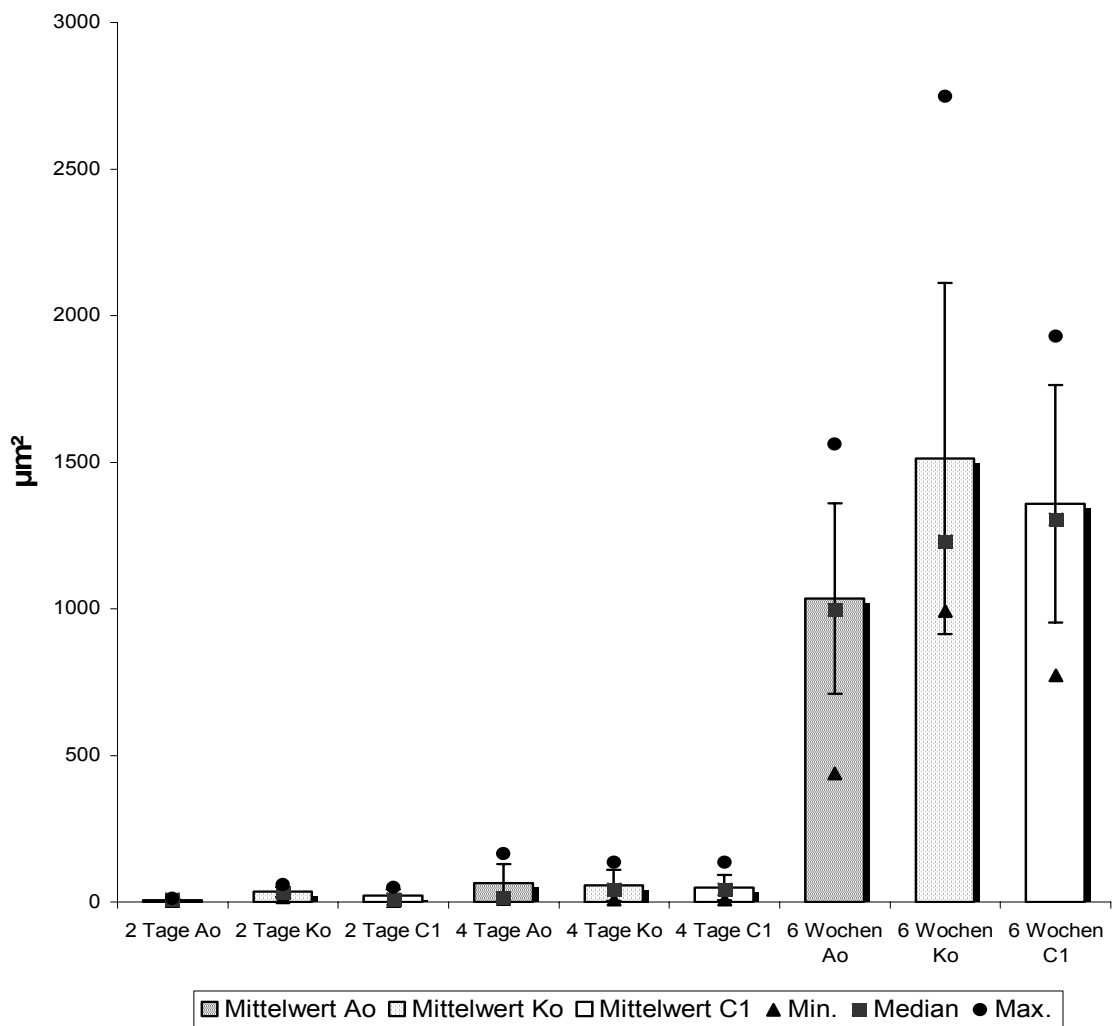
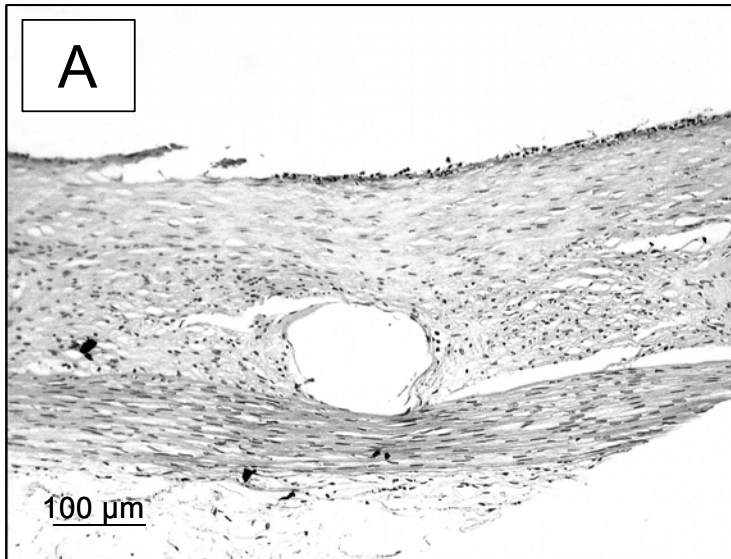
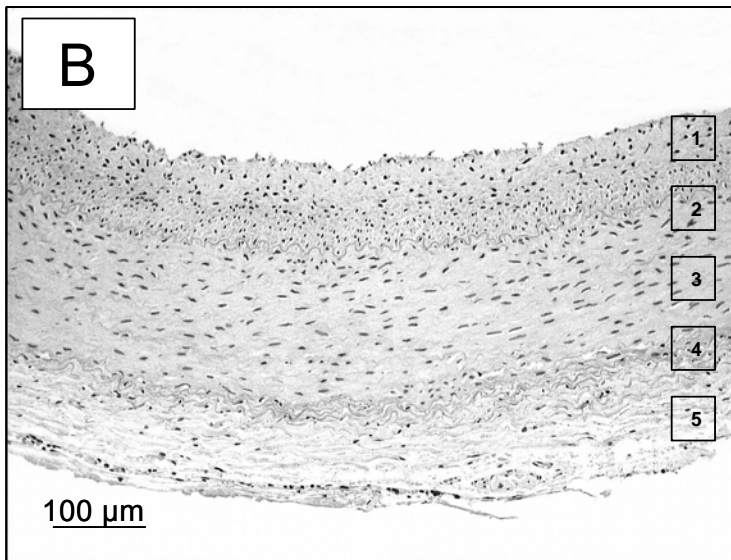


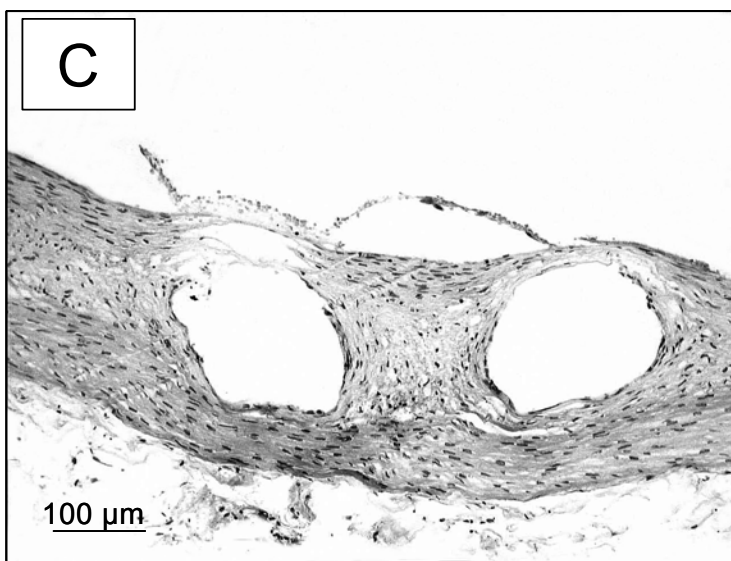
Abbildung 6: Unterschied zwischen Größe der Intimafläche in den Aorten- und Stentsegmenten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor)



A = Kontrollgruppe mit deutlich breiterer Neointima um die herausgetrennte Stentstrebe im Vergleich zur C1-Gruppe (C).



B = Aortengruppe nach Ballondilatation mit klar abgrenzbaren Schichten der Gefäßwand.
 1 = Neointima,
 2 = Lamina elastica interna,
 3 = Tunica media,
 4 = Lamina elastica externa,
 5 = Tunica adventitia.



C = C1-Gruppe (C1-Esterase-Inhibitor beschichtete Stents) mit geringerer Neointimabildung als bei der Kontrollgruppe (A).

Abbildung 7: Morphologische Struktur der Gefäßwand und der Neointima.

3.2.2 Stenosegrad

Der Stenosegrad beschreibt den prozentualen Anteil der Plaquefläche, der zu einer Einengung des Gefäßes führt. Dies ist speziell für die klinische Anwendung von Bedeutung, da sich durch eine an der Gefäßwand gebildete Plaque ein reduzierter Gefäßdiameter und folgend eine geringere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der distalen Gefäße und des Gewebes ergibt. Hierdurch können erneut Beschwerden beim Patienten nach einer Behandlung auftreten. Die Implantation eines Stents wirkt diesen Veränderungen durch Erzeugung einer starren Gefäßplastik entgegen.

Der Stenosegrad war in allen Versuchsgruppen nach 6 Wochen signifikant höher als nach 2 und 4 Tagen.

Innerhalb der 2-Tagesgruppen waren keine Signifikanzen zu erkennen.

Die 4-Tagesgruppen wiesen eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung des Stenosegrades zwischen Ko ($1,05 \pm 1,06$ %) und Ao ($4,89 \pm 4,48$ %) wie auch C1 ($0,97 \pm 0,74$ %) und Ao ($4,89 \pm 4,48$ %) auf.

Nach 6 Wochen ließen sich signifikante Erhöhungen ($p < 0,05$) des Stenosegrades zwischen allen Gruppen untereinander feststellen. Dieser nahm stetig ab von der Gruppe Ao ($35,17 \pm 7,52$ %) zu der Gruppe Ko ($22,38 \pm 6,79$ %) und der Gruppe C1 ($16,5 \pm 2,29$ %). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 und in Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 9: Messwerte für den Stenosegrad

Zeitpunkt	Stenosegrad (%)								
	2 Tage			4 Tage			6 Wochen		
	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1
Mittelwert	0,91	0,65	0,48	4,89	1,05	0,98	35,17	22,38	16,50
Standabw.	0,94	0,23	0,42	4,48	1,06	0,74	7,52	6,79	2,29
Min.	0,00	0,41	0,00	0,47	0,11	0,23	22,03	17,96	13,40
Max.	2,85	1,00	0,95	14,49	2,79	2,62	48,95	37,19	20,30
Median	0,88	0,61	0,35	2,51	0,74	0,95	36,52	20,37	16,87

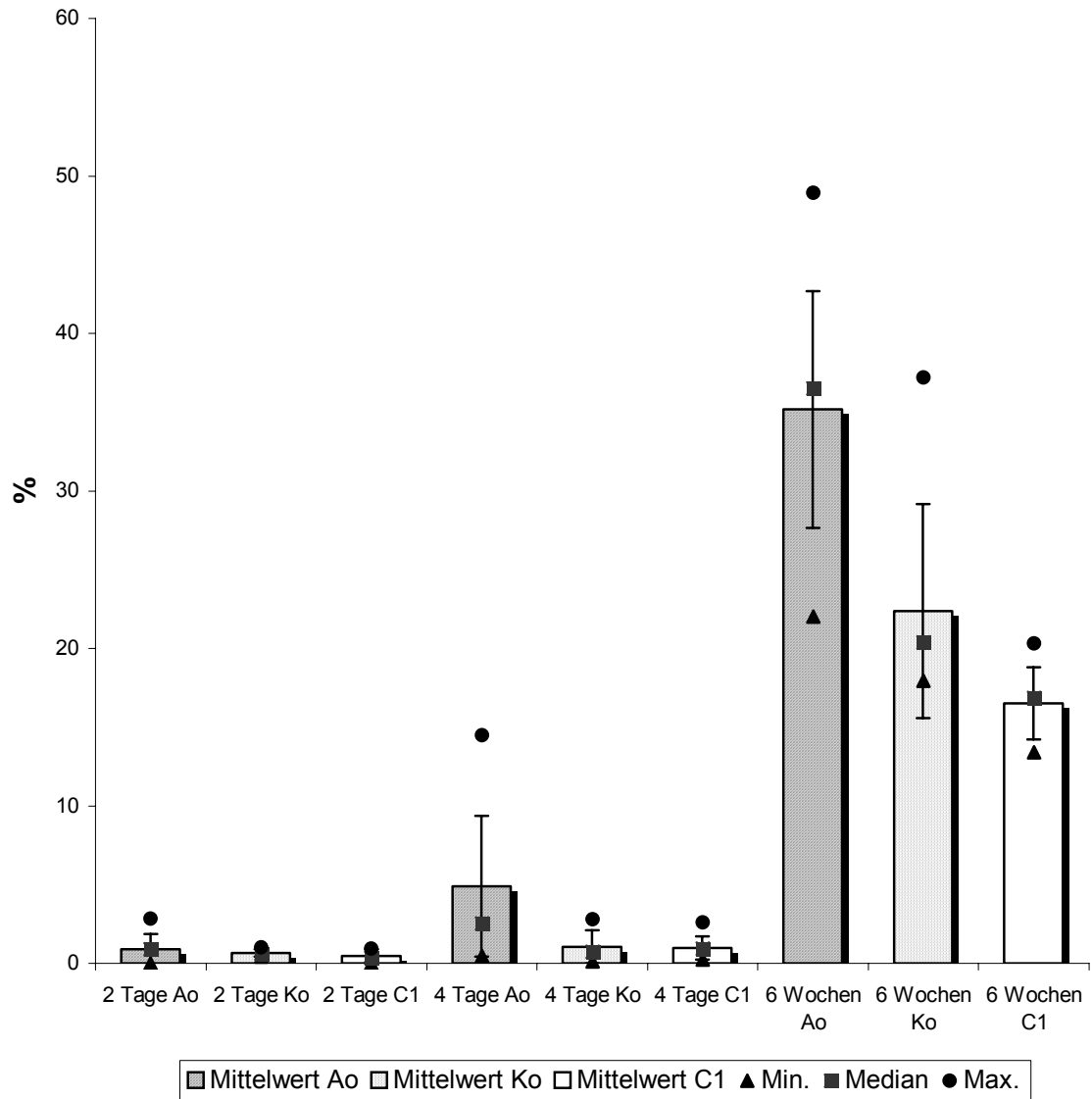


Abbildung 8: Stenosegrad in den Aorten- und Stentsegmenten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor)

3.2.3 Mediafläche

Die Media zeigte nach 2 und 4 Tagen wie auch nach 6 Wochen ähnliche Flächen in allen Gruppen.

Der Gesamtvergleich zwischen Aorten- und Stentsegmenten zeigt keine Signifikanzen (Tabelle 10 und Abbildung 9).

Tabelle 10: Messwerte für die Mediafläche

Zeitpunkt	Mediafläche (mm ²)								
	2 Tage			4 Tage			6 Wochen		
Gruppe	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1
Mittelwert	1,01	1,00	0,84	0,95	0,98	0,93	1,00	0,75	0,92
Standabw.	0,18	0,21	0,11	0,16	0,11	0,15	0,20	0,18	0,26
Min.	0,70	0,83	0,75	0,74	0,82	0,70	0,57	0,43	0,57
Max.	1,26	1,31	1,02	1,32	1,17	1,16	1,37	0,99	1,38
Median	1,01	0,90	0,81	0,93	0,95	0,93	0,94	0,74	0,90

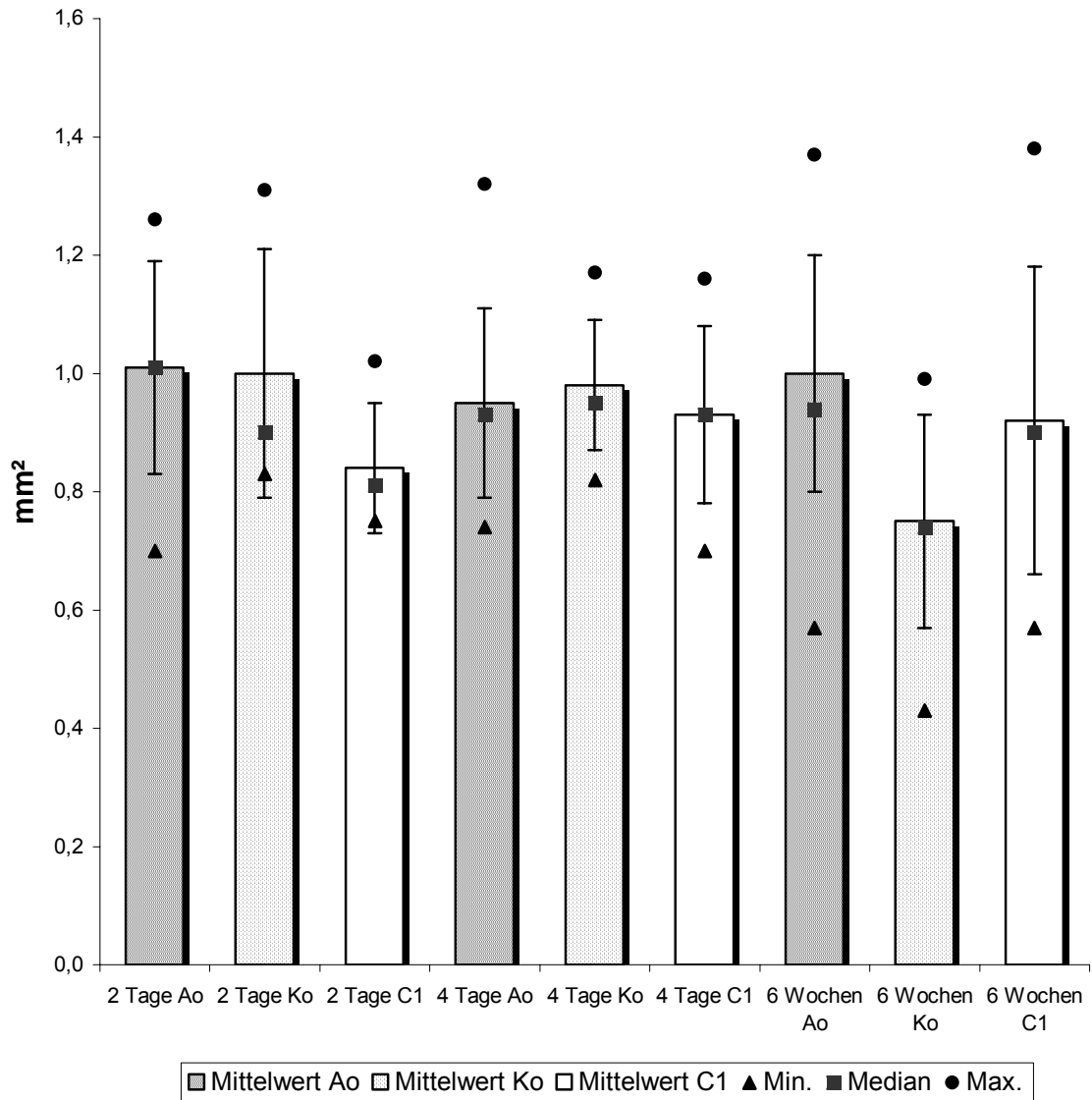


Abbildung 9: Mediafläche in den Aorten- und Stenpräparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor)

3.2.4 Verhältnis Plaque-/ Mediadicke an Längsschnitten

Längsschnitte ermöglichen eine Aussage hinsichtlich der Intima über eine relativ große Strecke, da die Präparate das Stentsegment, den Übergang Stent-Aorta und die native Aorta umfassen. Somit können denkbare Plaqueformationen im Übergangsbereich erkannt werden.

Es wurde in Präparaten der Gruppe 6 Wo Ko und 6 Wo C1 an 3 verschiedenen Stellen die Intima- und Mediadicke gemessen: Position 1 = im Stentsegment an den Streben, Position 2 = im Übergangsbereich Stent-Aorta und Position 3 = 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 wurde bisher nur bei lokal radioaktiver Therapie beschrieben.¹³⁴

Das Verhältnis war am Übergang (Position 2) und in der Aorta (Position 3) für die Gruppe 6 Wo C1 (Position 2: $1,4 \pm 0,4$; Position 3: $0,9 \pm 0,2$) signifikant niedriger ($p < 0,05$) als für die Gruppe 6 Wo Ko (Position 2: $1,9 \pm 0,2$; Position 3: $1,6 \pm 0,5$), welche im nachfolgenden Diagramm bildlich dargestellt ist (Abbildung 10).

Tabelle 11: Verhältnis Plaque-/Mediadicke an verschiedenen Stellen im Gefäß

Gruppe	Verhältnis Plaque/Media Aorta		Verhältnis Plaque/Media Übergang		Verhältnis Plaque/Media Strebe	
	6 Wochen Ko	6 Wochen C1	6 Wochen Ko	6 Wochen C1	6 Wochen Ko	6 Wochen C1
Mittelwert	1,64	0,94	1,87	1,42	3,42	3,00
Standabw.	0,53	0,19	0,20	0,42	0,52	0,51
Min.	1,04	0,70	1,67	0,77	2,66	2,12
Max.	2,52	1,19	2,27	1,91	4,35	3,55
Median	1,49	0,97	1,79	1,43	3,50	3,13

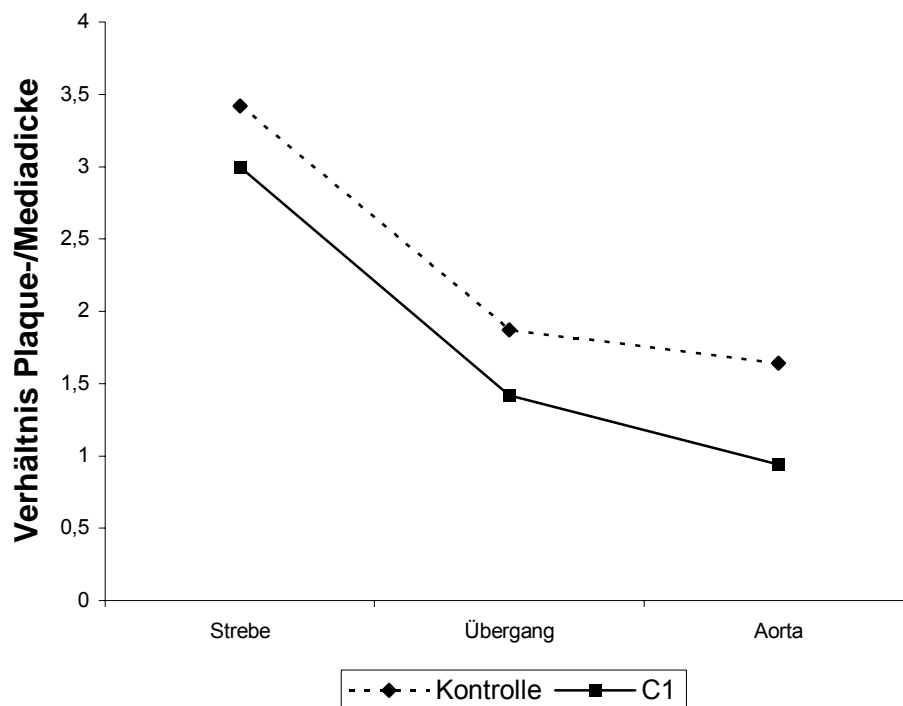


Abbildung 10: Verhältnis zwischen Plaque- und Mediadicke nach 6 Wochen

3.2.5 Zelldichte

Die Zelldichte (Gesamtzellzahl der Intima/ Intimafläche) in der Plaque nahm in allen Gruppen ab je länger der Zeitraum nach der Intervention lag (Tabelle 12 und Abbildung 11).

Signifikanzen zeigten sich bei den 2-Tagestieren zwischen den Gruppen Ko – C1 (Ko: 9078 ± 2926 Zellkerne/mm² - C1: 5306 ± 529 Zellkerne/mm²) und Ao – C1 (Ao: 12465 ± 3397 Zellkerne/mm² - C1: 5306 ± 529 Zellkerne/mm²), bei den 4-Tagestieren zwischen Ao – C1 (Ao: 5773 ± 1048 Zellkerne/mm² - C1: 4321 ± 767 Zellkerne/mm²) und bei den 6-Wochentieren unter den Gruppen Ko – C1 (Ko: 5928 ± 1466 Zellkerne/mm² - C1: 3660 ± 1043 Zellkerne/mm²) wie auch Ao – C1 (Ao: 4882 ± 1153 Zellkerne/mm² - C1: 3660 ± 1043 Zellkerne/mm²).

Tabelle 12: Gesamtzellzahl der Intima/ Intimafläche

Zeitpunkt	Zelldichte (Zellen/mm ²)								
	2 Tage			4 Tage			6 Wochen		
Gruppe	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1
Mittelwert	12465,3	9077,8	5305,7	5772,9	5963,9	4321,4	4881,9	5927,9	3660,4
Standabw.	3397,2	2925,5	529,4	1047,6	2912,5	766,9	1153,3	1466,0	1043,3
Min.	6368,0	6625,0	5000,0	3800,0	1800,0	3303,0	3238,0	3733,0	1679,0
Max.	16000,0	13250,0	5917,0	7538,0	9833,0	5489,0	6888,0	7916,0	5310,0
Median	12795,5	7750,0	5000,0	5713,5	6139,0	4042,5	4897,0	5733,0	3679,5

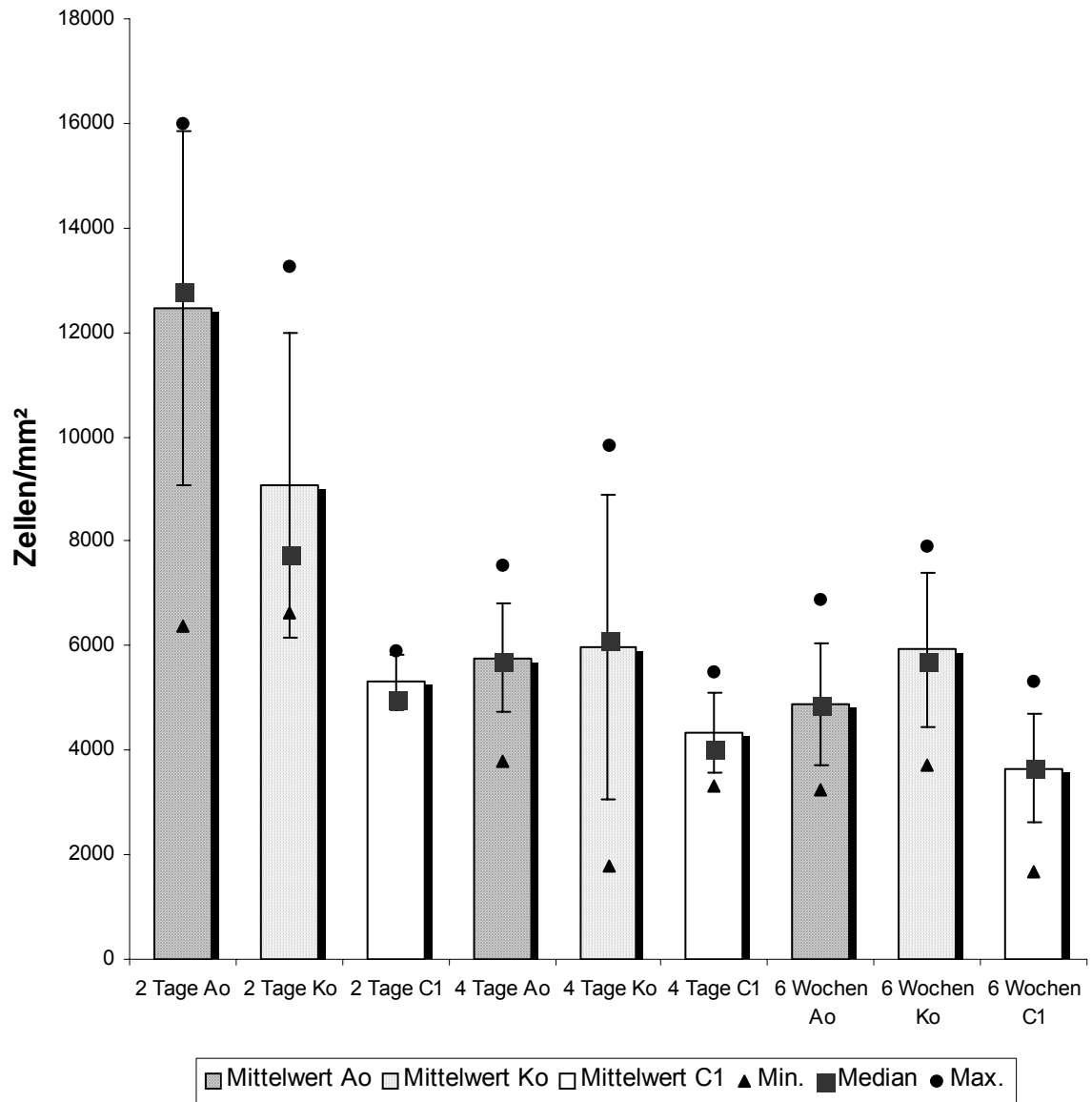


Abbildung 11: Zelldichte in der Plaque in den Aorten- und Stenpräparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor)

3.2.6 Proliferationsindex

Die Anzahl der proliferierenden Zellen in der Plaque zeigte Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 13). In der 4-Tagesgruppe trat die höchste Proliferationsrate auf, signifikant zu den Proliferationsraten nach 6 Wochen.

Der Proliferationsindex der Gruppe 2 Tage Ao ($2,2 \pm 1,3 \%$) war signifikant ($p < 0,05$) niedriger gegenüber den Gruppen 2 Tage Ko ($7,5 \pm 3,9 \%$) und C1 ($6,5 \pm 1,8 \%$). Innerhalb der 4- Tagesgruppen waren keine Signifikanzen feststellbar. 6 Wochen nach der Intervention war der Index der Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,3 \%$) signifikant höher im Vergleich zu der Ao-Gruppe ($0,6 \pm 0,2 \%$).

Tabelle 13: Proliferationsindex = Anzahl der proliferierenden Zellen in der Intima pro Gesamtzellzahl in der Intima

Zeitpunkt	Proliferationsindex (%)								
	2 Tage			4 Tage			6 Wochen		
Gruppe	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1	Aorta	Kontrolle	C1
Mittelwert	2,18	7,54	6,47	9,19	17,86	13,44	0,60	1,00	0,65
Standabw.	1,34	3,87	1,78	5,45	17,37	8,61	0,22	0,31	0,36
Min.	0,40	3,80	5,20	2,00	6,60	3,30	0,30	0,60	0,10
Max.	4,40	13,20	8,50	20,00	59,30	27,70	1,10	1,50	1,00
Median	2,00	6,50	5,70	7,70	12,00	12,75	0,60	1,00	0,85

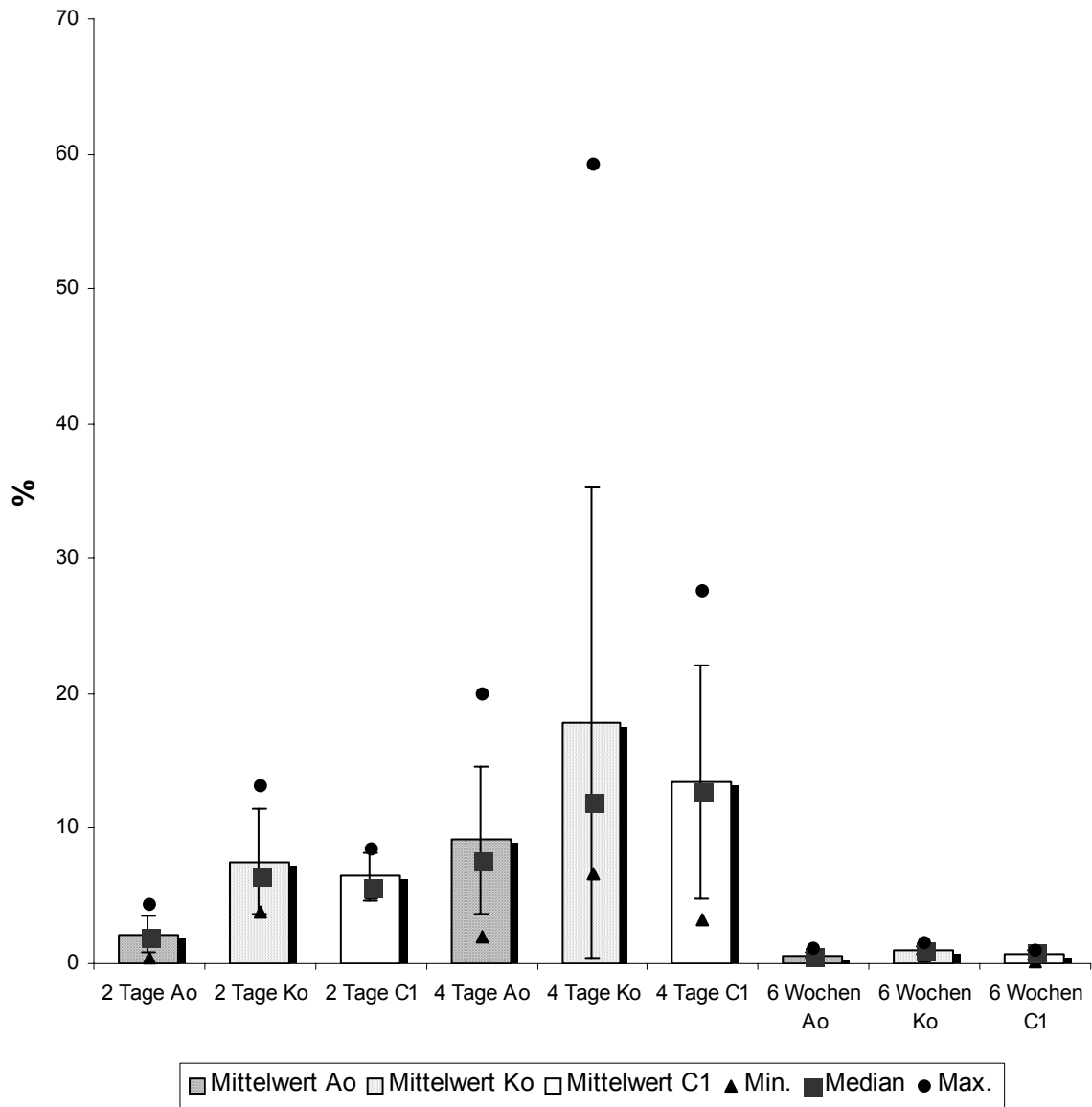


Abbildung 12: Proliferationsindex in den Aorten- und Stenpräparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ao = Aortengruppe, Ko = Kontrollgruppe, C1 = Beschichtung mit C1-Esterase-Inhibitor)

3.2.7 Größe und zelluläre Zusammensetzung der intimalen Plaques

Bei den 2- und 4-Tagestieren waren unter dem 10fach Objektiv nicht immer Plaques zu erkennen. Aus diesem Grund liegen in den folgenden Kapiteln bei einigen Färbungen nur die Ergebnisse der 6 Wochen alten Tiere vor oder es ist die Anzahl der Präparate in denen Plaques zu erkennen waren in einer gesonderten Spalte angegeben.

3.2.8 Von Willebrand Faktor (VIII)

Zur Darstellung des Endothels wurde der Faktor VIII in einer immunhistochemischen Reaktion angefärbt. Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches u.a. die Blutgefäße auskleidet.

Die Färbung des vWF führt zu einer fleckigen Granulierung der Endothelzellen. Die Endothelzellen zeigen eine dichte, flockige Immunreaktivität mit dem vWF. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 und 15 aufgeführt.

Tabelle 14: Anfärbung des Endothels in den Aortensegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums*	
		0	1
6 Wo Ao	(n = 15)	5	10

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

Tabelle 15: Anfärbung des Endothels in den Stentsegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)	
		0	1
6 Wo Ko	(n = 7)	3	4
6 Wo C1	(n = 8)	5	3

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

3.2.9 RAM

Um eine optimale Darstellung der Makrophagen zu erhalten, wurde die immunhistochemische RAM-Färbung eingesetzt. Diese ermöglichte eine bessere Beurteilung der vor allem in der Neointima und Media gelegenen Entzündungszellen.

Es ließ sich in allen Gruppen beobachten, daß sich die Makrophagen submedial, d.h. zur Lamina elastica interna hin anordnen. In den Stentsegmenten ist auch noch eine Anordnung zu den Streben hin zu erkennen. Die Media selbst und die Adventitia enthielten nur wenige Makrophagen. Bei den Langzeittieren waren RAM-positive Zellen durchgehend nahe den Stentstreben und submedial nachweisbar.

In den Präparaten konnten bei den Kurzzeittieren nur wenige RAM-positive Zellen nachgewiesen werden. Sechs Wochen nach der Intervention kam es dagegen generell zu einer Steigerung des Makrophagen-Anteils.

Tabelle 16: Makrophagen in der Intima der Aortensegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		Intima vorhanden	0	+	++
2 Tage Ao	(n = 2)	0	2	0	0
4 Tage Ao	(n = 4)	0	1	3	0
6 Wo Ao	(n = 15)	4	4	6	1

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),
 ++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

Tabelle 17: Makrophagen in der Intima der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		Intima vorhanden	0	+	++
2 Tage Ko	(n = 4)	0	4	0	0
2 Tage C1	(n = 2)	0	2	0	0
4 Tage Ko	(n = 1)	0	1	0	0
4 Tage C1	(n = 5)	0	5	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	1	5	0	1
6 Wo C1	(n = 8)	2	3	2	1

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),
 ++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3 Histopathologische Auswertung

Zur histopathologischen Auswertung wurden die HE- und EvG-Färbungen verwendet. Die HE-Färbung ist eine einfache, rasch auszuführende Übersichtsfärbung, in der die Zellkerne, Kalziumablagerungen, saure Mucopolysaccharide und grampositive Bakterien blau, alles übrige in verschiedenen Tonabstufungen rot gefärbt werden. In der EvG-Färbung werden die Kerne schwarzbraun und kollagene Fasern rotbraun gefärbt. Durch die Darstellung der Lamina elastica externa ist eine deutliche Abgrenzung zwischen Intima und Media möglich.

Die Auswertung wurde kontinuierlich an aufeinanderfolgenden Tagen unter Blindbedingungen, also ohne Angaben der Gruppen oder klinischer Informationen, in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Gefäßpathologen, durchgeführt. Die Anzahl der Querschnitte betrug 3 – 5 pro Objektträger, es wurden jeweils alle Querschnitte pro Objektträger beurteilt.

3.3.1 Intimale Hyperplasie

Unter dem 10fach Objektiv war bei den 2- und 4-Tagestieren keine intimale Hyperplasie zu erkennen. Eine Migration glatter Muskelzellen (Neointima) konnte bei den 6-Wochentieren beobachtet werden. Die Intima war umso breiter, je länger der Stent im Gefäß lag (Intimafibrose).

Tabelle 18: Intimale Hyperplasie unter dem 10fach Objektiv in den Aortensegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)	
		0	1
2 Tage Ao	(n = 11)	11	0
4 Tage Ao	(n = 16)	16	0
6 Wo Ao	(n = 15)	0	15

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

Tabelle 19: Intimale Hyperplasie unter dem 10fach Objektiv in den Stentsegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)	
		0	1
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	7
6 Wo C1	(n = 8)	0	8

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

3.3.2 Inflammation score

Um das Ausmaß und die Dichte der entzündlichen Infiltrate möglichst einheitlich zu erfassen und die Werte auch vergleichen zu können, erfolgte die Einteilung in einen Inflammation Score. Dieser wurde von Hofma et al.⁴¹ aufgestellt und bei der Auswertung unserer Präparate, wie in Kapitel 2.7.7.2 beschrieben und in Tabelle 3 dargestellt, angewendet.

Tabelle 20: Inflammatory response nach Hofma et al.⁴¹ in den Aortensegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	1	2	3
2 Tage Ao	(n = 11)	10	1	0	0
4 Tage Ao	(n = 16)	16	0	0	0
6 Wo Ao	(n = 15)	13	1	1	0

* 0 = keine Entzündungsreaktion, 1= Entzündung infiltriert die Adventitia, 2 = diffuse, klar sichtbare Entzündung infiltriert die Adventitia , 3 = schwere, oft granulomatöse Entzündungsreaktion in der Adventitia, teilweise bis in die Intima ausgedehnt

Im Vergleich zwischen den Aorten- und Stentsegmenten fiel auf, dass die Werte des Inflammation Scores und damit die Entzündungsreaktion in den Stentsegmenten höher waren als in den Aortensegmenten.

Tabelle 21: Inflammatory response nach Hofma et al.⁴¹ in den Stentsegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	1	2	3
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	4	1	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	7	1	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	6	2	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	6	1	0
6 Wo C1	(n = 8)	2	6	0	0

* 0 = keine Entzündungsreaktion, 1= Entzündung infiltriert die Adventitia, 2 = diffuse, klar sichtbare Entzündung infiltriert die Adventitia , 3 = schwere, oft granulomatöse Entzündungsreaktion in der Adventitia, teilweise bis in die Intima ausgedehnt

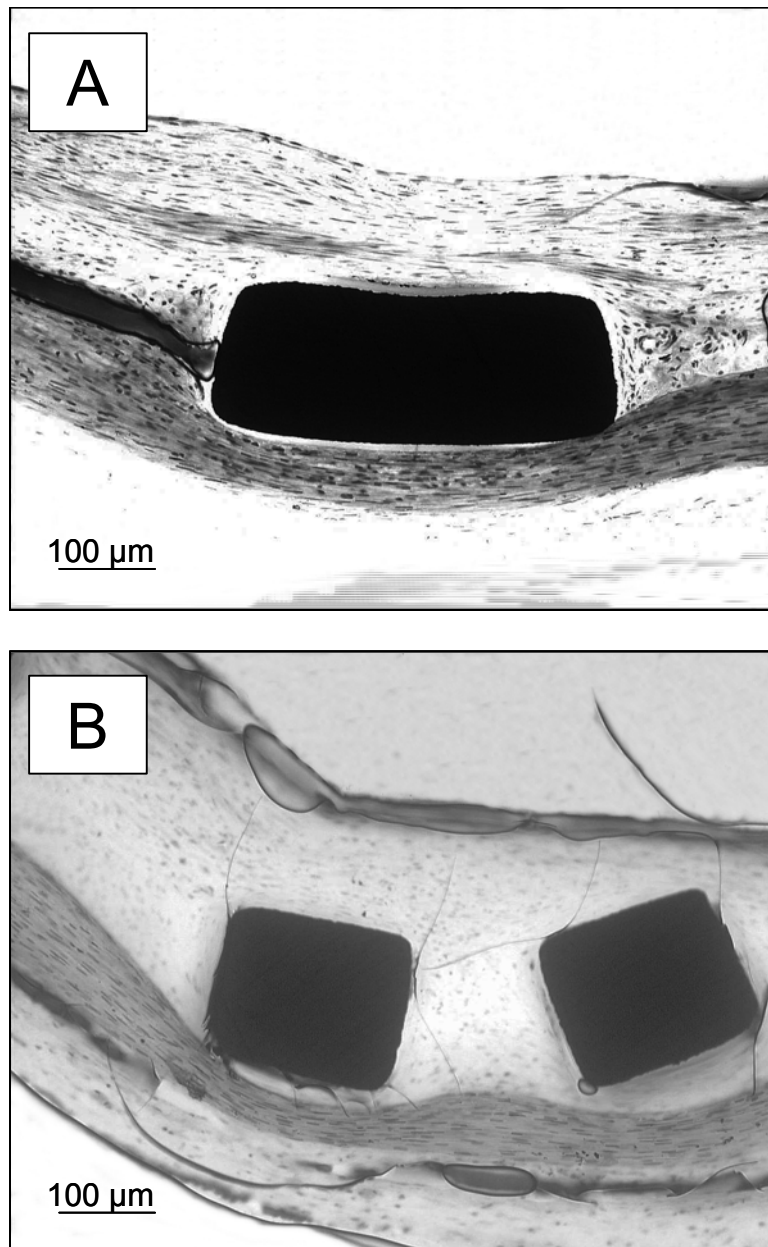


Abbildung 13: Morphologie der Gefäßwand und Struktur der Neointima in den Stentpräparaten der 6-Wochentiere (Methamethylakrylat-Einbettung). In der Kontrollgruppe (A) ist eine diffuse, klar sichtbare Entzündung um die Stentstreben mit höherem Inflammation Score (IS = 2) zu sehen. Bei der Therapiegruppe (B) mit C1-Esterase-Inhibitor beschichteten Stents ist nur eine leichte diffuse Infiltration von Entzündungszellen mit niedrigem Inflammation Score (IS = 1) erkennbar.

3.3.3 Atherosklerosestadien

In dem vorliegenden Tiermodell wurde die natürliche Veränderung der arteriellen Gefäßwand beschleunigt simuliert. Somit war auch in den ungestenteten Aortenstücken Zeichen von Atherosklerose zu erkennen. Für die Einteilung der gefundenen Gefäßveränderungen wurde die Klassifikation nach Sary et al.¹³¹ herangezogen (siehe Kapitel 2.7.7.3, Tabelle 4).

Bei den 2- und 4-Tagestieren fand sich immer eine Veränderung der Gefäßwand nach Typ I. Bei den 6-Wochentieren konnten Veränderungen bis Typ III festgestellt werden.

Tabelle 22: Einteilung der atherosklerotischen Plaques in die Typen nach Sary et al.¹³¹ in den Aortensegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)				
		1	2	3	4	5
2 Tage Ao	(n = 11)	11	0	0	0	0
4 Tage Ao	(n = 16)	16	0	0	0	0
6 Wo Ao	(n = 15)	8	6	1	0	0

- * 1 = Typ I (Initialläsion) Lipoproteinansammlung in der Intima,
 2 = Typ II (fatty streak) Lipoproteinansammlung in der Intima; Lipide in Makrophagen und glatten Muskelzellen (intrazelluläre Lipidansammlung); Leitkriterium: konfluierende Makrophagen,
 3 = Typ III (Intermediärläsion) zusätzlich: vereinzelte kleine Ablagerungen extrazellulärer Lipide; Leitkriterium: Kalzifikationen,
 4 = Typ IV (Atherom) zusätzlich: Zusammenfluß der vereinzelten Lipidablagerungen zu einem Lipidkern,
 5 = Typ V (Fibroatherom) zusätzlich: Entwicklung deutlicher Kollagenschichten und Vermehrung der glatten Muskelzellschichten über dem Lipidkern.

3.3.4 Schaumzellen

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

Im Zeitverlauf von zwei zu vier Tagen zeigte sich noch keine Bildung dieser Entzündungszellen. Sowohl in der Kontroll- als auch in der C1-Gruppe waren keine Schaumzellen zu erkennen. Nach sechs Wochen trat eine starke Zunahme dieser Zellen auf.

Tabelle 23: Schaumzellenlokalisierung in den Stentsegmenten um die Streben

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	5	2	0
6 Wo C1	(n = 8)	2	4	2	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.5 Fibrose

Die Fibrose ist eine Vermehrung des Bindegewebes aufgrund adaptiver bzw. reaktiver Veränderungen. In der Adventitia war schon früh eine Fibrose zu erkennen (Tabelle 26), da dort natürlicherweise Fibroblasten vorhanden sind und somit eine Aktivierung durch Reize (Stent) erfolgt.

Die Fibrose nahm im Laufe der Zeit an Ausmaß zu. Nach sechs Wochen war auch um die Streben und in der Intima eine Fibrose zu erkennen (Tabellen 24 und 25). Dort müssen die Fibroblasten erst einwandern.

Tabelle 24: Lokalisation von Fibrose in den Stentsegmenten um die Streben

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	4	3	0
6 Wo C1	(n = 8)	5	0	3	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

Tabelle 25: Fibrose in der Intima der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)		
		d	n	d+n
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	5	1	1
6 Wo C1	(n = 8)	5	3	0

* d = diffus; in der Intima und an den Streben, n = nodulär; umschriebene Fibrose innerhalb der Intima

Tabelle 26: Lokalisation von Fibrose in der Adventitia der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	0	0	6	0
2 Tage C1	(n = 5)	0	3	2	0
4 Tage Ko	(n = 8)	0	0	8	0
4 Tage C1	(n = 8)	1	6	1	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	0	7	0
6 Wo C1	(n = 8)	1	1	5	1

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),
++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.6 Fibrininsudation

Fibrin ist das Endprodukt der Blutgerinnung und wird u.a. durch endotheliale Dysfunktion ausgelöst.

Vor allem konnte in den Präparaten der 2- und 4- Tagestiere eine Menge dieser Substanz registriert werden. Nach sechs Wochen konnte keine Fibrininsudation mehr festgestellt werden.

Tabelle 27: Fibrininsudation in den Stentsegmenten um die Strebe

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	0	0	3	3
2 Tage C1	(n = 5)	0	2	2	1
4 Tage Ko	(n = 8)	0	0	4	4
4 Tage C1	(n = 8)	0	0	6	2
6 Wo Ko	(n = 7)	7	0	0	0
6 Wo C1	(n = 8)	8	0	0	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),
++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.7 Fibrino-leukozytäres Exsudat (polymorphkernige Granulozyten)

Ein fibrino-leukozytäres Exsudat entsteht im Rahmen von entzündlichen Prozessen oder aufgrund von Gefäßwandveränderungen. 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 in annähernd gleichem Maße zwei und vier Tage nach Stentapplikation vorhanden. Sechs Wochen später ist kein Exsudat mehr nachweisbar.

Tabelle 28: Fibrino-leukozytäres Exsudat in den Stentsegmenten um die Strebe

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	0	0	6	0
2 Tage C1	(n = 5)	0	1	4	0
4 Tage Ko	(n = 8)	0	0	8	0
4 Tage C1	(n = 8)	0	0	8	0
6 Wo Ko	(n = 7)	7	0	0	0
6 Wo C1	(n = 8)	8	0	0	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.8 Mononukleäre Infiltrate

Monozyten sind wie die unter Kapitel 3.3.7 beschriebenen polymorphkernigen Granulozyten zur Migration, Infiltration und Phagozytose befähigt und treten im Rahmen entzündlicher Prozesse auf.

In der Intima sind die mononukleären Infiltrate bei allgemein geringer Existenz nur bei den 6-Wochengruppen zu erkennen (Tabelle 29).

Betrachtet man die Adventitia der Stentsegmente so fällt das Vorkommen von mononukleären Infiltraten bei der Gruppe 2 Tage C1 auf. Nach vier Tagen sind keine Infiltrate festzustellen, wohl aber wieder nach sechs Wochen in der C1- und in der Kontrollgruppe (Tabelle 30).

Tabelle 29: Mononukleäre Infiltrate in der Intima der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	7	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	7	0	1	0
6 Wo C1	(n = 8)	4	1	3	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),
 ++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

Tabelle 30: Mononukleäre Infiltrate in der Adventitia der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	2	3	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	1	0	6	0
6 Wo C1	(n = 8)	3	0	5	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),
 ++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.9 Destruktion elastischer Lamellen

Zur Beurteilung der Destruktion elastischer Lamellen wurde vor allem der Bereich der Stentstrebe und die Media der Stentsegmente betrachtet. Dort konnte in allen Präparaten eine mechanisch bedingte Kompression mit nachfolgender Faserfragmentation beobachtet werden. Dabei war weder zwischen den verschiedenen Beschichtungsgruppen noch zwischen den beiden Betrachtungsorten ein Unterschied festzustellen. Kurz- und Langzeittiere unterschieden sich dahingehend, dass sich die Destruktion nach sechs Wochen ausgeprägter darstellte als nach zwei und vier Tagen.

Tabelle 31: Destruktion elastischer Lamellen in den Stentsegmenten um die Strebe

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	0	6	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	0	6	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	0	8	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	0	8	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	0	7	0
6 Wo C1	(n = 8)	0	0	8	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

Tabelle 32: Destruktion elastischer Lamellen in der Media der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	0	6	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	0	6	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	0	8	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	0	8	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	0	7	0
6 Wo C1	(n = 8)	0	0	8	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.10 Atrophie glatter Muskelzellen

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. Um die Streben entstand im Zeitraum von sechs Wochen eine numerische Atrophie mit kompensatorischer Hyperplasie (Tabelle 33).

Die Atrophie ist in der Media zu allen Zeitpunkten stärker ausgeprägt und in allen Gruppen nachweisbar. Die Media wird von der intimalen Hyperplasie zusammengedrückt (Tabelle 34).

Tabelle 33: Atrophie glatter Muskelzellen um die Stenose der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)	
		0	1
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0
6 Wo Ko	(n = 7)	4	3
6 Wo C1	(n = 8)	2	6

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

Tabelle 34: Atrophie glatter Muskelzellen in der Media der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)	
		0	1
2 Tage Ko	(n = 6)	0	6
2 Tage C1	(n = 5)	0	5
4 Tage Ko	(n = 8)	1	7
4 Tage C1	(n = 8)	0	8
6 Wo Ko	(n = 7)	2	5
6 Wo C1	(n = 8)	0	8

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

3.3.11 Kalzifikationen

Kalzifikationen wurden lediglich in der Media beurteilt, da sie ansonsten in keinem der Präparate existierten. Zwei und vier Tage nach der Stentapplikation waren sie ebenfalls in keiner der Gruppen erkennbar. Nach sechs Wochen konnten sie dagegen vor allem in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, während in der C1-Gruppe nur ein Schnitt eine mediale Verkalkung aufwies.

Tabelle 35: Kalzifikationen in der Media der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)	
		0	1
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0
6 Wo Ko	(n = 7)	4	3
6 Wo C1	(n = 8)	7	1

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, 1 = Merkmal vorhanden

3.3.12 Ödem

Ein kapillartoxisches Ödem entsteht bei gestörter Permeabilität der Kapillaren. Dieser liegt oft eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren zugrunde und tritt u.a. nach mechanischer Reizung auf.

Das Merkmal fand sich in keinem der 2- oder 4-Tagesgruppen, weder um die Streben noch in der Intima der Stentsegmente. Um die Streben war ein Ödem in der Kontrollgruppe erkennbar. In der Intima der Stentsegmente konnte ein Ödem in beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Tabelle 36: Ödemlokalisierung in den Stentsegmenten um die Streben

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	2	5	0	0
6 Wo C1	(n = 8)	8	0	0	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

Tabelle 37: Ödemlokalisierung in der Intima der Stentsegmente

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	+	++	+++
2 Tage Ko	(n = 6)	6	0	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	5	0	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	8	0	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	7	0	0
6 Wo C1	(n = 8)	0	6	2	0

* 0 = Merkmal nicht vorhanden, + = Merkmal gering ausgeprägt (< 25 %),

++ = Merkmal mäßig stark ausgeprägt (25-50 %), +++ = Merkmal stark ausgeprägt (> 50 %)

3.3.13 Vessel injury score

Der Grad der Gefäßwandverletzung durch den Stent wurde mit Hilfe des vessel injury score nach Schwartz et al.⁷¹ in einer abgeänderten Form erfasst, wie bereits in Kapitel 2.7.7.1 beschrieben und in Tabelle 2 aufgelistet ist. Der vessel injury score wurde dahingehend verändert, daß jede Strebe betrachtet und dann ein Wert für das gesamte Präparat vergeben wurde und nicht ein Wert pro Strebe, um danach den Mittelwert für das gesamte Präparat zu bilden.

Bei der Auswertung der eigenen Präparate ergab sich in den Gefäßen der Kurzzeittiere ein geringerer Vessel injury score als bei der Langzeittieren.

Tabelle 38: Vessel injury score nach Schwartz et al.⁷¹ -adapted- in den Stentsegmenten

Gruppe	Anzahl (n)	Häufigkeit des Kriteriums* (n)			
		0	1	2	3
2 Tage Ko	(n = 6)	3	3	0	0
2 Tage C1	(n = 5)	1	4	0	0
4 Tage Ko	(n = 8)	4	4	0	0
4 Tage C1	(n = 8)	8	0	0	0
6 Wo Ko	(n = 7)	0	3	4	0
6 Wo C1	(n = 8)	0	3	5	0

* 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
 die Lamina elastica externa fortsetzen, teilweise Einkerbungen der Streben in der Adventitia

3.4 Komplikationen

Es wurden n = 44 Tiere operiert. Die PTA und Stentimplantation verlief bei n = 43 Tieren ohne Komplikationen, bei n = 1 Tier wurde die Aorta bei Stentimplantation perforiert. Da die Perforation durch den Stent gedeckt war, überlebte das Tier ohne klinische Symptome zu entwickeln. Bei n = 5 Tieren mußte postoperativ die Wundnaht unter Narkose revidiert werden, da die Tiere sich durch den Wundreiz die Wundnähte aufgebissen hatten. Ein Tier erhielt für 22 Tage eine Halskrause, um mit Erfolg ein nochmaliges Aufbeißen der Naht zu verhindern. Die Wunde war stark entzündet, daher bekam das Tier eine Penicillin-Streptomycin-Kombination (Tardomyocel comp. III®, Bayer, Leverkusen) subkutan in die Nackentasche. Ein Tier wies am rechten Hinterlauf eine entzündete Wunde auf, die es sich selbst zugefügt hatte. Diese Wunde wurde mit Wundsalbe (Betaisodona® Salbe, Mundipharma GmbH, Limburg/Lahn) zur Ausheilung gebracht. Das Versuchsende erreichten alle 44 Tiere. Ein weiteres Kaninchen wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt, da es zum Zeitpunkt der Intervention einen sehr niedrigen Cholesterinspiegel aufwies. Insgesamt gingen 42 Tiere in die Auswertung ein.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Studie wurde ein Kaninchen-Modell dazu benutzt, die Bedeutung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Ablauf nach PTA und Stentimplantation zu untersuchen und Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen Aorten-, Kontroll- und C1-Gruppe zu finden. Ziel war es, Effekte einer antiinflammatorischen Stentbeschichtung auf den Grad der In-Stent Restenose, sowie eine mögliche therapeutische Auswirkung des benutzten Medikaments auf die neointimale Proliferation zu zeigen. Es wurde versucht eine genaue Beschreibung der Entzündungsreaktion in unterschiedlichen Phasen nach PTA und Stentapplikation darzustellen.

4.2 Material- und Methodenkritik

4.2.1 Tiermodell

Atherosklerose und Restenose sind ein komplexes Geschehen vielfältiger Ätiologie und teilweise unbekannter Pathophysiologie. Verschiedene Faktoren setzen der klinischen Forschung auf diesem Gebiet jedoch Grenzen. Eine Forschung am Menschen in bezug auf morphologische Gefäßwandveränderungen ist aufgrund unterschiedlicher Faktoren, wie Lebensumstände und Ernährung, schwierig. Für klinische Untersuchungen auf dem Gebiet der Restenoseforschung sind groß angelegte Studien notwendig, um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können. Epidemiologische Studien liefern Ergebnisse über Zusammenhänge beispielsweise Risikofaktoren und Prävalenz der Atherosklerose und Restenose. Um aber Aussagen auf zellulärer Ebene treffen zu können wie auch Präventiv- und Therapiemaßnahmen erarbeiten zu können, ist man weitgehend auf Tiermodelle angewiesen.⁵⁹ Tiermodelle haben den Vorteil, dass atherosklerotische Plaques in kurzen Zeiträumen entstehen und

Einflussfaktoren kontrolliert werden können.⁶⁰ Zum Nachweis einer möglichen Inhibition der Inflammation und damit der Restenose durch Verwendung der mit C1-Esterase-Inhibitor beschichteten Stents ist ein aussagekräftiges Tiermodell wichtig, dabei muß dieses verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Es muß eine ausreichende Analogie zum Menschen bezüglich Morphologie, Pathogenese und Beeinflußbarkeit der Atherosklerose bzw. In-Stent Restenose nachweisbar sein. Außerdem soll es zu einer Vereinfachung und Abkürzung des Experiments führen.^{113;114} Um die Eignung eines Modells zur Untersuchung der Restenoseentwicklung zu beurteilen, greift man auf Kriterien zurück, die auch bei der Atheroskleroseforschung gültig sind.

4.2.1.1 In der Atherosklerose- und Restenoseforschung verwendete Tierarten

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

Das Kaninchen war das erste in der Atheroskleroseforschung eingesetzte Versuchstier und ist bis heute das am häufigsten verwendete. Bereits 1913 induzierten Anitschow und Chalutow beim Kaninchen atherosklerotische Plaques durch Gabe eines cholesterinhaltigen Futters.¹³⁵⁻¹³⁷ Das Kaninchenmodell bietet Vorteile wie eine kostengünstige und einfache Haltung und die Entstehung reproduzierbarer atherosklerotischer Veränderungen innerhalb kurzer Zeit durch eine cholesterinreiche Diät.^{60;114;138} Die Gefäßgröße 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.

Beim Schwein sind durch eine cholesterinhaltige Diät und daraus resultierender Hypercholesterinämie Läsionen in der Gefäßwand induzierbar. Die Plaquestruktur im kardiovaskulären System des Schweins ist vergleichbar mit der des Menschen, wie auch die Entzündungsreaktion und Thrombenbildung nach Stentimplantation.⁶² Allerdings wird es in der Atherosklerose- und Restenoseforschung aufgrund einer aufwendigen Handhabung sowie hoher Kosten selten verwendet.¹⁵

Das dem Menschen am besten vergleichbare Modell zur Erforschung des Atherosklerose- und Restenoseprozesses ist derzeit das der Makaken. Die atherosklerotischen Läsionen sind in allen Stadien denen des Menschen sehr ähnlich. Auch die Lokalisation der Plaques und das Lipoproteinprofil stimmen weitgehend mit dem des Menschen überein.⁶⁰ Aufgrund ihrer guten Handhabung und der schnell induzierbaren atherosklerotischen Läsionen gelten sie vor allem bei der Erforschung der kardiovaskulären Erkrankungen als geeignetes Modell.^{139;140} Allerdings ist es schwierig mehrere erwachsene Tiere aus einer Züchtung zu erhalten, die keinen Krankheitserreger in sich tragen. Desweiteren ist dieses Modell mit hohen Kosten und speziellen Kenntnissen im Umgang mit diesen Tieren verbunden,^{58;113} zusätzlich treten ethische Aspekte in den Vordergrund.

Am geeignetsten für die Atherosklerose- und Restenoseforschung^{139;141} scheinen somit derzeit Schweine zu sein, an zweiter Stelle stehen Kaninchen.¹¹³ Allerdings lassen sich die komplizierten Vorgänge, die durch eine Verletzung der Gefäßwand beim Menschen hervorgerufen werden bisher in keinem Tiermodell nachvollziehen.^{58;76} Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen in Tiermodellen und klinischen Studien können ihre Ursache in Abweichungen des Verletzungstyps durch Unterschiede im Dehnungsgrad von Stent und Gefäß haben und damit den verbundenen Veränderungen der Gefäßwand und der entzündlichen Reaktion zwischen den verschiedenen Spezies.¹⁵ Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Tiermodell der menschlichen Krankheit möglichst nahekommen sollte, dies jedoch nie vollständig erreicht werden kann. Trotzdem ist es wichtig und für neue Therapiemöglichkeiten unabdingbar mit solchen Modellen zu arbeiten.

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 mit Ballondenudation,¹⁴²⁻¹⁴⁷ Laserablation,¹⁴⁸ Testung topischer Applikationssysteme^{149;150} und

Stentimplantation.^{40;151-153} Die Kosten für eine statistisch aussagekräftige Anzahl von Kaninchen sind vertretbar und eine breite Auswahl an Antikörpern für die Immunhistochemie ist verfügbar.¹⁵⁴ Die benutzte infrarenale Aorta ist für die Stentimplantation groß genug auch der Zugang mittels Katheter zum Gefäß wirft keinerlei Probleme auf. Die klinische Übertragbarkeit des hyperlipämischen Kaninchens ist nach Rubin et al.¹⁵⁴ gegeben. Die alleinige Stentimplantation im Weißen Neuseelandkaninchen bildet nicht zwingend eine große Plaquesfläche aus und war als Restenosemodell ungeeignet. Zur Erzeugung einer großen Plaquesfläche eignet sich die PTA in Kombination mit einer Cholesterindiät.¹⁵⁵ Desweiteren spielt auch das interessierende Gefäßsegment eine Rolle. So ist bekannt, daß es bei elastischen Arterien, wie der hier gewählten infrarenalen Aorta oder auch Arteria iliaca communis, zwischen den verschiedenen Spezies nur geringe histologische Variationen gibt.^{113;156}

Aufgrund dieser Eigenschaften hat sich das Kaninchen als adäquates Modell in der Atherosklerose- und Restenoseforschung etabliert. Trotz Unterschiede in der Plaquemorphologie könnte dieses Modell zur Gewinnung neuer Erkenntnisse im Hinblick auf eine mögliche Therapie der In-Stent Restenose dienen. Ein Vergleich mit dem Menschen erscheint gerechtfertigt.

4.2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Das im vorliegenden Versuch durchgeführte Protokoll erlaubt verschiedene Aussagen über die Folgereaktionen im Gefäß auf PTA und Stentimplantation und die Effekte des C1-Esterase-Inhibitors im Hinblick auf eine Entzündungsreaktion und daraus resultierenden Veränderungen im Gefäß. Die gesamte Tierpopulation teilte sich in drei verschiedene Versuchsgruppen auf: Aortenstück behandelt mit PTA (Ao), Aortenstück behandelt mit PTA und Implantation eines unbeschichteten Stents (Ko), Aortenstück behandelt mit PTA und Implantation eines beschichteten Stents (C1). Durch diese Aufteilung konnten die Mechanismen im Gefäß nach alleiniger PTA mit denen nach PTA und Stentimplantation verglichen werden. Ferner sollte auch die Auswirkung des C1-Esterase-Inhibitors auf die Gefäßantwort erforscht werden. Um eine

Aussage über den alleinigen Effekt des Trägerproteins auf die Entzündung, bzw. die vom Trägerprotein unabhängige Wirkung des C1- Esterase-Inhibitors treffen zu können, wäre noch eine zusätzliche Versuchsgruppe sinnvoll gewesen. Dabei hätte ein Stent, nur mit dem Trägerprotein beschichtet, implantiert werden müssen.

In unserem Tierexperiment wurden die Versuchsgruppen zusätzlich noch zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, nach 2 Tagen, 4 Tagen und 6 Wochen. Ziel war dabei, Aussagen über morphologische und histologische Ergebnisse zu kurz- und längerfristigen Zeitpunkten machen zu können. Experimente über Gefäßreaktionen auf PTA und Stentimplantation wurden u.a. 1992 von Schwartz et al.⁷¹ am Schweinmodell durchgeführt. Nach 4 Wochen wurde eine hohe Korrelation zwischen vessel injury score und Neointimadicke beschrieben. Tominaga et al.¹⁵⁷ fanden am Kaninchenmodell nach 24 Wochen immer noch Effekte hinsichtlich der Restenose im Vergleich zu früheren Zeitpunkten. Hofma et al.⁴¹ konnten auch nach 12 Wochen noch Veränderungen in der Entzündungsreaktion am Schweinmodell nach Stentimplantation feststellen. Durch die 2- und 4-Tagesgruppen sind frühe Effekte der Entzündungsreaktion, mit den Tieren der 6-Wochengruppe eher längerfristige Auswirkungen beobachtet worden. Um einen Verlauf der Veränderungen zu erhalten, müssten Versuchsgruppen zwischen den Zeitpunkten vier Tage und sechs Wochen gemacht werden. Für langfristige Effekte wären Versuchsgruppen über den Zeitraum von sechs Wochen hinaus sinnvoll, wie sie auch bei klinischen Studien empfohlen und sogar Zeiträume von mindestens 50-60 Wochen gefordert werden.¹⁵⁸

Um einerseits den wissenschaftlichen Ansprüchen und andererseits den ethischen Gesichtspunkten gerecht zu werden, wurde der Versuch so aufgebaut, dass zwischen sechs und acht Tiere pro Gruppe, insgesamt 44 Tiere, verwendet wurden.

4.2.3 Auswertung, Statistik

Die Auswertung der Präparate wurde pro Färbung kontinuierlich an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Es 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 von Unregelmäßigkeiten der Plaques eventuell auftretende Fehler zu minimieren. Die histopathologische Beurteilung der Präparate wurde unter Blindbedingungen, also ohne Angaben der Gruppen oder klinischen Informationen, ebenfalls kontinuierlich an aufeinanderfolgenden Tagen von einem erfahrenen Gefäßpathologen vorgenommen. Dabei wurden nur Merkmale bestimmt, welche die Gefäßveränderungen gut charakterisieren und auch im Hinblick auf die Wahl der Beschichtung eine Aussage möglich werden lassen. Besonderer Wert wurde auf Parameter gelegt, die das Ausmaß der Entzündung beschreiben.

Bei der statistischen Auswertung war bei einigen morphometrischen Parametern die erforderliche Normalverteilung der Werte nicht gegeben. In diesen Fällen wurde der Wilcoxon-Test (Kruskal-Wallis-Test) angewandt, um auf Signifikanz zwischen den Gruppen zu prüfen. Ferner wurde teilweise eine starke Streuung der Werte beobachtet, was zu einer großen Standardabweichung führte.

4.2.4 Restenose, In-Stent Restenose und Stellenwert der Entzündung

Als Restenose wird eine Malanpassungsreaktion nach intravaskulärem Eingriff bezeichnet, welche sich in einer Verringerung um mehr als 50 % des betroffenen Gefäßes oder mehr als 30 % Rückgang des Lumens, ausgehend vom ersten erfolgreichen Ergebnis, zeigt.^{26;97} Der Ausprägungsgrad ist je nach Revaskularisierungstechnik, wie Angioplastie, Stentimplantation, Atherektomie und intravaskulärer Beta- oder Gammabestrahlung unterschiedlich. Verzögerter Verlust des Gefäßdurchmessers nach minimal invasiver endovaskulärer Intervention ist gewöhnlicherweise das Resultat dreier verschiedener Vorgänge: frühe elastische Rückstellkräfte (elastic recoil), späte Umbauprozesse in der

Gefäßwand (negative remodelling) und neointimale Hyperplasie.⁷⁹ Elemente wie Blutplättchen und Entzündungszellen spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung des natürlichen Heilungsprozesses.

Exzessive Entzündung sowie extrazelluläre Matrixumbildung der Media und Adventitia werden als bedeutsame Faktoren der verengenden Gefäßdeformation nach Ballonangioplastie betrachtet.⁷⁸ Studien mit intravaskulärem Ultraschall (IVUS) haben demonstriert, dass Stents elastic recoil und negatives remodelling reduzieren,⁷⁹ teilweise sogar eliminieren.⁸⁰ Der Stent als Fremdkörper verschlimmert jedoch die Entzündung und ist mit starker neointimaler Hyperplasie vergesellschaftet,^{63;71} welche als Hauptursache für In-Stent Restenose (ISR) gilt.

Das Risiko der ISR wird durch zahlreiche Faktoren wie Diabetes, früher aufgetretene Restenosen, genetischen Faktoren und prozedural bezogenen Variablen wie Gefäßtyp, Anzahl der Stents, Länge und Durchmesser der Stents, usw. erhöht.^{80;108} In IVUS Studien wurde beschrieben, dass der Prozess der ISR seinen Höhepunkt um den dritten Monat zeigt und ein Plateau zwischen dem dritten und sechsten Monat nach der Intervention erreicht.⁸⁰ Aus diesem Versuch liegen Ergebnisse der Langzeitgruppe nur bis sechs Wochen nach Intervention vor. Das Versuchsende hat laut diesen Studien vor dem Höhepunkt im Prozess der ISR statt gefunden.

4.2.5 Therapieansätze zur Prävention der Restenose und In-Stent Restenose

In der Vergangenheit wurden verschiedene Techniken zur Prävention der Restenose entwickelt, dabei sind zwei wichtige Ansätze entstanden: mechanisch und pharmakologisch.⁹⁷ Die mechanischen Techniken wie Dilatation, Rotationsangiographie, Atherektomie, Laserangiographie und Stent vergrößern das Lumen im Gefäß. Der pharmakologische Ansatz basiert auf die im Körper ablaufenden biologischen Reaktionen auf die Gefäßverletzung durch PTA und Abwehrreaktionen auf den Stent.

Die PTA hat aufgrund ihrer relativ einfachen technischen Durchführbarkeit eine große Verbreitung gefunden. Die Methode führt aber über die Denudation zu

Endothelverletzung mit nachfolgender konsekutiver Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen. Elastic recoil und vascular remodelling begünstigen eine Restenosebildung. Laserangioplastie, Rotationsangioplastie oder Atherektomie konnten langfristig keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Wiederholte PTA, Rotationsangioplastie und Laserangioplastie rufen extrem hohe re-Restenoseraten von 30-80 % hervor.^{74;75}

Gegenüber den genannten Methoden können nur Stents die Restenoserate signifikant reduzieren.⁹⁷ Der große Vorteil von Stents ist ihre Formstabilität. Hiermit sind im Vergleich zur Ballonangioplastie bereits zwei Ursachen der Restenose ausgeschlossen. Elastic recoil und vascular remodelling sind bei Stents unbekannt. Nach Stentimplantation wird eine Reihe von Mechanismen ausgelöst. Diese beginnen mit Plättchen- und Leukozytenablagerung, gefolgt von Proliferation der glatten Muskelzellen, Migration und Produktion von extrazellulärer Matrix und enden im Produkt der Neointima, einer Schicht aus wachsendem Gewebe im Stent¹⁵⁹ die auch im vorliegenden Versuch zu beobachten war.

Eine attraktive Methode ist die systemische Gabe von Pharmaka, welche die Proliferation und Einwanderung glatter Muskelzellen hemmt. In den 80-er Jahren konnten viele Medikamente den Beweis für die Senkung der Restenoserate nicht erbringen. Gründe hierfür waren zu niedrige Dosierung, inadäquate Kinetik und systemische Nebenwirkungen,^{74;78} welche für eine lokale Applikation sprechen würden. Antikoagulantien wie Warfarin oder Heparin, Thrombozytenaggregationshemmer wie Aspirin oder Ticlopidin, Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten, Steroide und ACE-Inhibitoren haben die Revaskularisierungsraten nicht grundlegend verändert. Viele Ergebnisse in klinischen Studien waren im Gegensatz zu experimentellen Daten enttäuschend.^{160;161} Der signifikante Effekt auf die Reduzierung der Restenose in der EPIC-Studie¹⁶² mit Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten konnte in EPILOG¹⁶³ und ERASER⁹⁷ nicht bestätigt werden. Antiproliferative Medikamente wie z.B. Colchizin hemmen die Restenose in Experimenten, weisen in der Klinik aber keinen Vorteil auf.

Die lokale Applikation von Medikamenten über Hydrogel beschichtete Ballonkatheter oder poröse Katheter wurde Mitte der 90-er entwickelt. Ziel war eine lokale Substanzfreisetzung direkt ins Gefäß so dass Wirkstoffe direkt an den benötigten Ort gebracht werden und eine hohe lokale Konzentration aufweisen, ohne systemische Komplikationen zu verursachen. Aufgrund von starker Abhängigkeit der pharmakologischen Bedingungen resultieren große Unterschiede zwischen den Substanzen im Hinblick auf Medikamentenverbleib und -konzentrationen in der Gefäßwand. Ein weiteres Problem stellt die lokale Injektion an sich dar. Sie ist eine Verletzung der Gefäßwand und kann eine Restenose verursachen.⁷⁸

Die kathetergestützte Brachytherapie hat antiproliferative und antimigrative Eigenschaften. Sie kann die Kolonisation von Myoblasten und die Thrombusformation verhindern.¹⁶⁴ Allerdings kann eine gleichmäßige Bestrahlung aller Gefäßabschnitte nicht immer erreicht werden. Bei zu großer Dosisleistung kann ein strahleninduziertes Gefäßtrauma entstehen oder sogar Ischämien. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Kombination der Brachytherapie mit einem Stent. Bei der intravaskulären Bestrahlung mittels Stent werden Beta- und Gammastrahler verwendet. Diese Kombination gilt derzeit als Standardtherapie der In-Stent Restenose.^{75;78;80;159} Der Benefit dieser Methode auf die Hemmung der Restenoseentwicklung wird durch Ereignisse wie das Auftreten verzögerter Thrombosen, trotz langer (mindestens über ein Jahr) antithrombotischer Therapie, Aktivitätsverlust des Strahlers und Stenosen vor allem im Bereich der Stentenden, auch „candy-wrapper Effekt“ genannt, limitiert.^{79;96;165-171}

Aus allen den genannten Ansätzen und weiter entwickelten Techniken zur Prävention der Restenose bzw. In-Stent Restenose ist eine neue Idee entstanden: der Drug-eluting Stent (DES), der in Kapitel 4.2.6.4 erklärt wird.

Diese Methode bietet eine mechanische und biologische Lösung des Problems der ISR. Der Stent stellt eine Gefäßstütze dar, wirkt gegen elastic recoil und remodelling. Die biologische Lösung liegt darin, dass der Stent selbst Träger des Medikamentes ist.^{96;97} In unserem Versuch haben wir uns für diese vielversprechende Technik entschieden.

4.2.6 Material

4.2.6.1 Wahl des Stents

Als Stents wurden sterile ballonexpandierbare, aus einem biokompatiblen rostfreiem Stahlgeflecht bestehende Gefäßstützen (Jostent peripheral®) von der Firma Jomed International AG benutzt. Sie weisen eine longitudinale Flexibilität und radiale Widerstandskraft nach der Freisetzung im Gefäß auf und werden in der Humanmedizin als bleibende Stütze in stenotische Gefäßabschnitte eingesetzt. Sie stellen einen permanenten Fremdkörper dar, welcher im menschlichen Organismus eine Abwehrreaktion hervorruft. Der in das Gefäß plazierte Stent ruft eine Wandverletzung hervor, die Stärke bzw. Tiefe dieser Schädigung korreliert mit der darauffolgenden entzündlichen Antwort.⁷⁶ In Studien wurden Einflussfaktoren wie offenes, intermediäres oder geschlossenes Stentdesign untersucht, die Anordnung und Dicke der Streben, Flexibilität des Stents, wie auch das Material. Es wurden Effekte hinsichtlich der Restenoserate gefunden.¹⁵⁹ Um eine Fremdkörperreaktion weitgehend zu vermeiden, werden bei der Herstellung spezielle Stentdesigns und Verarbeitungstechniken angewandt. Der Jostent peripheral® hat ein geschlossenes Stentdesign, das sich bei Biegung in bestimmten Zonen nicht verändert. Somit ist ein guter Flow bei gleichbleibender oberflächlicher Schicht garantiert, woraus eine größere Lumenzirkulation durch geringere Neubildung von Gewebe im Stent resultiert. Die Öffnungen zwischen den Streben des Stents, sogenanntes „slotted tube“ Design, sind wichtig für die Freisetzung des im Trägerprotein gebundenen Medikaments.

Die besondere Endverarbeitung stellt eine sehr glatte Stentoberfläche her, um möglichst geringe Widerstandskräfte und thrombogene Flächen zu bieten. Tepe et al.¹⁷² beschrieben eine große Varianz im Bezug auf die Thrombogenität von Stents. Es wurden Modelle verschiedener Firmen verglichen und zusätzlich noch die Technik zur Herstellung glatter Oberflächen getestet, das „electropolishing“. Durch dieses Verfahren konnte die Thrombogenität der Stents im Vergleich zu den unbehandelten Stents weiter reduziert werden.

Obwohl der von uns eingesetzte Stent viele der in Studien^{108;159;161} geforderten Kriterien eines „optimalen“ Stents erfüllt, um das Auftreten von Abwehrreaktionen, Entzündung und In-Stent Restenose zu vermeiden, gibt es noch keinen perfekten Stent. Es müssen Aspekte wie z.B. Gefäßgröße oder Ort der Stenose berücksichtigt werden. Weiterhin bleibt die Optimierung der Stents ein Kompromiss zwischen akuter Funktionalität und langfristiger Stabilität.

Mögliche Alternativen zu dem von uns verwendeten ballonexpandierbaren Stent sind selbstexpandierbare Stents oder sogenannte biodegradable Stents, welche sich im Laufe der Zeit auflösen. Sie sollen die chronische Entzündungsantwort des Gefäßes nach Stentimplantation verhindern.¹⁷³ Tsuji et al.¹⁷⁴ veröffentlichten Ergebnisse eines biodegradablen Stents aus Poly-l-lactic acid (PLLA) Monofilament. Im Schweinmodell konnte nach Implantation des Igaki-Tamai Stents® keine Entzündung und nur minimale Neointima festgestellt werden. Im Anschluss an diese experimentelle Studie wurden in einer klinischen die Biokompatibilität und die Wirksamkeit des Stents bestätigt. Trotz ermutigender Ergebnisse stellen diese Stents im Moment noch keine echte Alternative zur Behandlung atherosklerotisch verengter Gefäße dar.

4.2.6.2 In der Forschung verwendete Beschichtungsarten

Die heutzutage in der Praxis eingesetzten Stents erhöhen die proliferative Komponente der Restenose, lösen eine Abwehrreaktion aus und nachfolgend eine Entzündung. Die Beschichtung der Stents modifiziert einerseits die Oberfläche und soll eine Verbesserung der biophysikalischen Eigenschaften bewirken. Andererseits dient sie als Träger für den Medikamententransport mit verschiedenen Freisetzungseigenschaften beim Drug-eluting Stent.^{75;79} Die ersten Beschichtungen als Reservoir für den Medikamententransport waren Fibrin- oder Polymerbeschichtungen. Viele der in den 90-er Jahren verwendeten Polymermaterialien lösten eine starke Entzündungsreaktion aus und machten den Effekt von Medikamenten zunichte.^{106;159;175;176} Poly-(n)-butylmethacrylat und Poly-ethylen-vinylacetat sind neuere Polymerbeschichtungen, die nur minimal nachteilige Effekte im Hinblick auf eine Entzündung aufweisen.¹⁷⁷ Andere Stoffe die zur Veränderung der

Stentoberfläche führen, mit dem Ziel die intimale Hyperplasie zu hemmen, sind Keramik, Polymer und antithrombogene Wirkstoffe (Heparin, Phosphorylcholin, Hirudin).¹⁰⁸ Mit der Zeit entwickelten sich weitere Konzepte als Träger für Substanzen. Eines davon ist das direkte Auftragen der Substanz auf den Stent ohne ein Polymer. Hierbei fehlen aber die Speicherungs- und Freisetzungseigenschaften der unterschiedlichen Trägersubstanzen. Die kontrollierte Abgabe des Medikamentes über slow release ist nicht möglich. Eine andere Idee, Trägersubstanz und Medikament zu vereinen, ist den Stent mit einer sehr dünnen Schicht (10 µm) aus nicht erodierbarem Methacrylat und Ethylen-gestütztem Co-Polymer zu umhüllen.⁷⁵ Das sogenannte Dip-Verfahren kann mit Polymer wie auch nur mit dem Medikament angewendet werden.

Ein Problem der genannten Techniken ist die unzureichende Medikamentenkonzentration. Umso bedeutsamer wird die Abgabeeigenschaft des Trägers (slow, intermediate oder fast). Die Sicherheit und der Wirkungsgrad des Systems sind abhängig von der Kombination aus Polymer, Medikament und Freisetzungskinetik. Ein aktueller Lösungsansatz, um alle Bedingungen möglichst gut zu erfüllen, sind neuartige Polymer- und Hydrogelbeschichtungen oder mit Karbon beschichtete Stents. Tomai et al. veröffentlichte 2003 Ergebnisse einer Studie über den Effekt von Karbonbeschichteten Stents auf Entzündungsmarker, Thrombinproduktion, Blutplättchen und Endothelaktivierung im Vergleich zu unbeschichteten Stents. Die entsprechenden Marker zeigten keinen Unterschied im Anstieg zwischen beschichtetem und unbeschichtetem Stent. Die Karbonbeschichtung beeinflusst die biologische Antwort der Gefäßwand auf die Stentimplantation nicht negativ. Sie zeichnet sich durch hohe Thromboresistenz und exzellente Biokompatibilität aus.⁷⁷

4.2.6.3 Wahl der Beschichtung

In unserem Versuch wurde von einem Beschichtungsverfahren Gebrauch gemacht, das speziell für den Drug Release eingesetzt wird. Wie schon in Kapitel 2.2.3 erwähnt, wurden Peptidsequenzen mit einer Größe

< 20 Aminosäuren verwendet. In einem Flussmodell konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Stent erfolgreich mit dem C1-Esteraseinhibitor dotiert werden konnte und die Beschichtung im Blutfluss nicht von der Stentoberfläche abgewaschen wurde. Die eigentliche Beschichtung der Stents erfolgte im sogenannten Dipping- (Eintauch-) Verfahren. Zur Herstellung der Dipping-Lösung wurden 500 µg C1-Peptid in Pulverform in 2 ml 10%iger wässriger PVP K 90-Lösung gegeben. Dies erhöht die Plasmahalbwertszeit wie Kaneda et al. gezeigt haben.¹¹⁹

In diese so vorbereitete Beschichtungslösung wurde der Stent ca. 3 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 auslöste. 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.

Der Beschichtungssubstanz kommt eine besondere Bedeutung zu. Wie schon in 4.2.6.2 erläutert soll sie ein Anhaften des Medikaments an den Stent bewirken. Die von uns benutzte Trägersubstanz war ein Hydrogel (Polyvinylpyrrolidone = PVP), welches in verschiedenen Bereichen der Technik und Medizin seit Jahren angewandt wird. Das Hydrogel bietet dem Medikament eine Plattform und bewirkt ein Anheften an den Stent. Darüber hinaus dient die Substanz als Reservoir und verhindert ein Abwaschen oder zu schnelle Abgabe des Wirkstoffes. Der enzymatische Abbau des Hydrogels führt zu einer langsamen Freisetzung des Medikaments (slow drug release).¹¹⁶⁻¹¹⁸ Nach der Stentimplantation setzt das Polymer bei 37 °C die Substanz in den ersten 24 Stunden zu 90 % in das umgebende Gewebe frei.^{120;121}

Die Anwendung der Polyvinylpyrrolidone-Beschichtung sollte erstens die Thrombogenität des Stents herabsetzen und somit die überschießende Antwort des menschlichen Organismus auf einen Fremdkörper bremsen. Zweitens sollte durch diese spezielle Beschichtungstechnik ein Verlust des Medikaments vor der Expansion des Stents verhindert und über das Hydrogel eine langsame, kontinuierliche Abgabe des Wirkstoffes garantiert werden.

4.2.6.4 Drug-eluting Stent (DES)

Die lokale Applikation immunsuppressiver bzw. antiproliferativer Wirkstoffe durch medikamentenbeschichtete Stents ist eine Technologie zur Inhibierung postinterventioneller In-Stent Restenosen. Der Stent als Gefäßstütze dient der Stabilisierung des Lumens, verhindert elastic recoil und negative remodelling. Die Beschichtung des Stents in Kombination mit einem Medikament soll die natürlichen Mechanismen in der Gefäßwand positiv beeinflussen und Faktoren wie Entzündung, Abwehrreaktion oder Zellproliferation vermeiden. Es wird eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration erreicht, ohne dass verlängerte systemisch wirksame Medikamentenspiegel auftreten, die unerwünschte Nebenwirkungen auslösen könnten.^{75;96;161} Durch die Freisetzungseigenschaften des Trägers wird das Medikament gleichmäßig und langsam abgegeben, es kann lokal ein wirksamer Medikamentenspiegel erreicht werden. Die Wirksamkeit ist abhängig vom Stent, Material, Beschichtung, Release und letztendlich auch vom Medikament.

Der DES könnte eine Therapie sein um die In-Stent Restenose in de Novo Läsionen zu verhindern. Allerdings differieren derzeit die Wirksamkeit und Sicherheit unterschiedlicher Beschichtungen und Medikamente.^{159;165}

4.2.6.5 In der Forschung verwendete Medikamente für DES

Die Suche nach dem idealen Medikament zur Verhinderung der In-Stent Restenose ist zur Zeit Gegenstand vieler Experimente. Welche Voraussetzungen muss diese Substanz erfüllen? Sie soll die Einwanderung der glatten Muskelzellen hemmen und die Proliferation von lokalen anti-entzündlichen Effekten fördern, dabei keine schwere Zytotoxizität entwickeln.

Zwei erfolgsversprechende Medikamente sind Sirolimus und Paclitaxel. Beide Substanzen waren bisher in der Klinik am erfolgreichsten.

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.^{75;101} Wegen

seiner guten Fettlöslichkeit kann es Zellmembranen leicht passieren, verteilt sich gut im Gewebe und bewirkt gleichzeitig eine verlängerte Speicherung im arteriellen Gewebe.¹⁰¹ Es hemmte in vitro die Proliferation glatter Muskelzellen^{99;100} und bewirkte in Tiermodellen eine Verringerung der Intimagröße künstlich verletzter Gefäße.^{99;101;102} Die erste klinische Studie mit einem Sirolimus beschichteten Stent wurde von Sousa et al. 2001 in Sao Paulo durchgeführt. Untersuchungen nach vier und sechs Monaten zeigten keine ISR und keinen edge-effect. Ein Jahr post interventionem wurde per intravaskulären Ultraschall und Angiographie nachuntersucht, dabei nur minimale neointimale Hyperplasie und keinen Fall von MACE dokumentiert.^{74;78}

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. Mit diesem Medikament durchgeführte in vitro Studien zeigten eine Hemmung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Park et al. bestätigte 2003 in seiner klinischen Studie zahlreiche Ergebnisse vorangegangener Studien. Bei den Paclitaxel beschichteten Stents war nach sechs Monaten die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen wesentlich geringer als bei den unbeschichteten Kontrollstents. Eine dosisabhängige Reduktion der intimalen Hyperplasie konnte ebenfalls festgestellt werden.¹⁰³

Einige Medikamente zeigten verschiedene ungünstige Effekte wie verzögerte Thrombose, spätere Restenose oder Aneurysmabildung. Actinomycin D (ACTION), eine zytotoxisch wirkende Substanz, welche die DNA-Kette unterbricht, wies im Menschen andere Grenzen von lokaler oder systemischer Toxizität auf als im Experiment. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Methylprednisolon gemacht. Weitere Wirkstoffe werden erprobt um eventuell als ideales Medikament gegen die In-Stent Restenose zu fungieren, z.B. Kortikosteroide als antientzündliche Medikamente, Batimastat als

metalloproteinase Inhibitoren (BRILLIANT), Dexamethason (DELIVER, STRIDE) oder Tacrolimus (PRESENT, EVIDENT).

Tsuji et al. machte Versuche mit Transilast als Medikament für einen DES. Transilast ist eine antiallergene, zytostatisch wirkende Substanz, welche die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen über PDGF (platelet-derived growth factor) und TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) in der G0/G1-Phase des Zellzyklus hemmt. Transilast verminderte die intimale Hyperplasie im Kaninchenmodell nach PTA und im Schweinemodell nach PTA und Stentimplantation signifikant.¹⁷⁴ Resultate aus derzeitigen Versuchen werden zeigen, ob Transilast die Erwartungen an ein gutes Medikament für DES erfüllt.

Trotz zahlreich durchgeführter Studien mit verschiedenen Beschichtungen und Medikamenten hat sich bis jetzt noch keine Beschichtungstechnik oder Medikament definitiv gegenüber anderen Verfahren durchsetzen können. Bis heute liegen hauptsächlich nur Ergebnisse von Studien mit kleinen Fallzahlen, kurzen Nachuntersuchungszeiträumen und eher einfachen Läsionen vor. Die bislang guten Ergebnisse müssen auch unter dem Aspekt, ob Drug-eluting Stents die In-Stent Restenose eventuell nur hinauszögern, eingeschränkt werden. Interessant wären Ergebnisse mit großen Fallzahlen, Langzeitbeobachtungen, komplexeren Läsionen und Ergebnisse von Risikopatienten, welche z.B. Diabetes haben. Unter diesen Gesichtspunkten haben bereits Studien begonnen bzw. sind geplant: ARTS II, DECODE, TAVUS IV, SVELTE, TROPICAL, usw.

Um in unserem Versuch ein Risikoprofil zu bekommen, sind die Kaninchen vier Wochen lang mit einer Cholesterindiät vor der Intervention ernährt worden. Durch den erhöhten Cholesteringehalt im Blut prägt sich die intimale Hyperplasie verstärkt aus und ein atherosklerotischer Zustand im Gefäß wird hergestellt. Dies ist natürlich nur eine Erkrankung im breiten Spektrum der möglichen Risiken. Wir haben in unserem Versuch mit nur einer provozierten Risikoerkrankung gearbeitet, da bei zu vielen Erkrankungen zum selben

Zeitpunkt die Gründe und auslösende Mechanismen für Effekte bzw. nicht eintretende Verbesserungen nicht mehr nachvollziehbar wären.

4.2.7 Wahl des Medikamentes, Einfluss des C1-Inhibitor auf die Entzündung und Restenoseentwicklung

Seit einigen Jahren gilt die Inflammation als wesentlich pathogenetischer Faktor für die Ausbildung einer In-Stent Restenose.¹⁷⁸ Es wurde eine Korrelation zwischen Entzündung, Gefäßschädigung und intimaler Hyperplasie festgestellt. Bei der Wahl des Medikaments sollte auf entzündungshemmende Eigenschaften geachtet werden.

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

Das Komplementsystem ist Teil des Immunsystems und bildet eine unspezifische Abwehr gegen in den Körper eingedrungene Mikroorganismen und fremde Pathogene und steht auch mit dem spezifischen Immunsystem in Wechselwirkung.¹⁷⁹⁻¹⁸² Es 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, wie in Abbildung 1 dargestellt.

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 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) oder

durch C-reaktives Protein. C3 reagiert daraufhin mit den Faktoren B und D sowie Properdin, wobei es zur Bildung der Konvertase des alternativen Weges kommt und schließlich zu der Spaltung des Komplement-Faktors C3 führt. 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.^{183;184} 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.^{185;186}

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Funktionen besitzt das Komplementsystem noch zahlreiche Interaktionen mit anderen Systemen des Blutes. So gibt es beispielsweise 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.

Der C1-Esterase-Inhibitor ist ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 105 kD und einem Kohlehydrat-Anteil von 40 %. Seine Konzentration im menschlichen Plasma beträgt ca. 240 mg/l. Außer dem menschlichen Plasma, enthalten auch Placenta, Leberzellen, Monozyten und Thrombozyten C1-Esterase-Inhibitor.

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. Der C1-Esterase-Inhibitor gehört zu dem Serin-Protease-Inhibitor-(Serpine)-System des menschlichen Plasmas. Unter physiologischen Bedingungen hemmt C1-

Esterase-Inhibitor den klassischen Weg der Aktivierung der Komplementkaskade durch Inaktivierung der enzymatisch aktiven Komponenten C1s und C1r. Die aktiven Enzyme bilden einen Komplex mit dem Inhibitor in einem Verhältnis von 1:1. Außerdem ist C1-Esterase-Inhibitor der wichtigste Inhibitor der Kontaktaktivierung, indem er Faktor XIIa und seine Fragmente hemmt. Neben Alpha-2-Macroglobulin ist er ebenfalls der wichtigste Inhibitor des plasmatischen Kallikreins¹¹⁰ und vermag sowohl 90 % des α - und β -F XIIa sowie 80 % des freien Kallikreins durch Komplexbildung 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. Sobald Blut in Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen kommt, zerfällt Faktor XII, der inaktiv mit Präkallikrein und High-Molecular-Weight-Kininogen (HMWK) komplexiert vorliegt, in seine Fragmente α - und β -Faktor XIIa, die wiederum zu einer Aktivierung des gesamten Kontaktaktivierungssystems führen. β -Faktor XIIa wandelt das Zymogen Präkallikrein in seine aktive Form Kallikrein um, welches vasodilatatorisch wirkendes Bradykinin von HMWK abspaltet.¹¹¹

Durch Interaktion von α -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.

Der Ansatz im vorliegenden Experiment beruht auf einer niedrigen Dosierung des Medikaments am Wirkort, im Gegensatz zu den vielen anderen benutzten Substanzen (siehe Kapitel 4.2.6.5), die eine hohe Dosis im Gefäß zum Ziel hatten. Bei dem hier verwendeten C1-Esteraseinhibitor handelt es sich um einen untoxischen Stoff, der keine Langzeitkomplikationen erwarten lässt. Es wurde eine schnelle Heilung des verletzten Gefäßes wie auch eine

Verringerung der Fremdkörperreaktion auf die Stentstreben angestrebt. Mit der Beschichtung des Stents sollte die Stentoberfläche verbessert werden, um Abwehrreaktionen gering zu halten. Der C1-Esteraseinhibitor wurde mit dem Ziel eingesetzt, die Komplementkaskade gleich zu Beginn zu unterbrechen wie auch in andere Systeme einzugreifen, damit Folgeschäden zu verhindern und nicht erst nach deren Auftreten zu therapieren. Mit nur einer Substanz können mehrere Kaskaden unterbrochen werden, die zu einer Entzündung führen können und letztendlich die In-Stent Restenose begünstigen würden.

Die Ergebnisse in diesem Experiment haben die Theorie der Unterbrechung komplexer Mechanismen mit dem C1-Esteraseinhibitor gezeigt. Im Vergleich zu anderen Substanzen wie Sirolimus und Taxol waren die Effekte aber eher gering. Bei vielen Parametern konnten keine Signifikanzen nachgewiesen werden, somit ist es fraglich ob der C1-Esterase-Inhibitor als alleinige Substanz tatsächlich klinische Relevanz hat. Es wäre noch interessant die Auswirkungen einer niedrigeren bzw. höheren Dosis zu untersuchen und zu sehen, ob sich unter sonst gleichen Bedingungen bessere oder gar schlechtere Ergebnisse zeigen. Die exakte Konzentration der Substanz pro mm² wurde in dieser Studie nicht berechnet. Die Konzentration von 500 µg C1-Peptid in der Beschichtungslösung gilt als ausreichend für die lokale Anwendung.^{122;123}

In unserem Versuch wurde nur eine Seite des Komplementsystems unterbrochen. Bessere Ergebnisse könnte man erhoffen, wenn der klassische und alternative Weg gleichzeitig unterbrochen werden. In einem Nachfolgeexperiment wird genau dieser Ansatz mit einer Kombination aus C1 und C3-Inhibitor untersucht. Das Komplementsystem ist allerdings nur ein Teil der Entzündung und In-Stent Restenose auslösenden Mechanismen und nach den Ergebnissen dieser Studie zu urteilen nicht das System, um den Haupteffekt zu erreichen, nämlich eine Entzündung und die In-Stent Restenose zu verhindern.

4.3 Bewertung der eigenen Ergebnisse

4.3.1 Gesamtcholesterin im Plasma

Zum Zeitpunkt der Operation traten zwischen den Gruppen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Cholesterinkonzentration auf, trotzdem war die spätere Plaquegröße in unserem Versuch davon unabhängig. In unserem Versuch wurde die Cholesterinkonzentration erst nach der 28-tägigen Cholesterindiät bestimmt. Somit ist keine Aussage über den Anstieg der Konzentration möglich. Die Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Cholesterinkonzentration könnten aus einem unterschiedlich schnellen Anstieg während der Diät resultieren. Es konnte im vorliegenden Versuch zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen der Cholesterinkonzentration und der Plaquegröße erfasst werden.

4.3.2 Morphometrische und immunhistochemische Ergebnisse

Nach Ballonangioplastie reagiert das Gefäß mit Umbauprozessen der Gefäßwand (remodelling), elastischen Rückstellkräften (elastic recoil) und mit Intimaproliferation auf die Gefäßverletzung. Diese Mechanismen führen zur Restenose. Bei der Stentimplantation wird eine Einengung des Lumens durch remodelling und elastic recoil verhindert, somit ist für das Auftreten einer In-Stent Restenose die Intimaproliferation ausschlaggebend.^{40;68;74;165} Wie schon in Kapitel 4.2.5 und 4.2.6.4 beschrieben, gibt es viele Ansätze die Restenose nach PTA und die In-Stent Restenose nach Stentimplantation zu verringern. Eine dieser Möglichkeiten ist über den Drug-eluting Stent. Mehrere Studien mit unterschiedlichen Medikamentenbeschichtungen konnten eine Verringerung der Neointima im Tierversuch aufzeigen, wobei in klinischen Versuchen diese positiven Resultate nicht immer bestätigt werden konnten.^{106;160;177;187-189}

Im vorliegenden Fall ist es nicht gelungen, durch die gewählte Beschichtung in der C1-Gruppe eine signifikante Verringerung der Intimafläche gegenüber der Kontrollgruppe zu erreichen. Zu allen Zeitpunkten war die Intimafläche in der C1-Gruppe nur geringfügig kleiner gegenüber der Kontrollgruppe. Dieses

Ergebnis könnte an einer unzureichenden Dosierung, mangelnde Freisetzung oder zu geringen Wirkung des C1-Esteraseinhibitors liegen. Im vorliegenden Versuch wurden keine Medikamentenkonzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Um eine Aussage über Gründe der nicht-signifikanten Verringerung der Intimafläche in der C1-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe machen zu können, wären diese Messungen notwendig gewesen. Mit Hilfe einer anderen Trägersubstanz hätte eventuell ein besseres Resultat erreicht werden können. Eine zweite Kontrollgruppe mit einer reinen Hydrogelbeschichtung ohne C1-Inhibitor fehlte in unserem Versuch. In einem Nachfolgeprojekt zeigte sich, dass die Hydrogelbeschichtung eine wesentlich stärkere Intimaprolieration auslöst als ein unbeschichteter Stent oder ein Stent mit Hydrogelbeschichtung und Medikament.

Der Stent stellt einen Fremdkörper dar, worauf das Gefäß mit einer stärkeren Intimaprolieration (Abbildung 6) reagiert als auf alleinige Ballondilatation. Nach 2 Tagen war die Plaquefläche der Ko-Tiere ($34,3 \pm 17,1 \mu\text{m}^2$) signifikant ($p < 0,05$) größer im Vergleich zu den Ao-Tieren ($6,5 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$). Bei den 6-Wochentieren ist es ebenfalls zu einer deutlichen intimalen Hyperplasie gekommen. Dabei fiel diese mit $1512,3 \pm 598,8 \mu\text{m}^2$ bei der Ko-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer aus als bei der Ao-Gruppe mit $1035,5 \pm 324,7 \mu\text{m}^2$. Diese Unterschiede verdeutlichen Tabelle 8 und Abbildung 6. Die intimale Gewebsneubildung war in allen Versuchsgruppen nach 6 Wochen signifikant stärker ausgeprägt als nach 2 und 4 Tagen.

Der Stenosegrad war in allen Versuchsgruppen nach 6 Wochen signifikant höher als nach 2 und 4 Tagen (Tabelle 8). Innerhalb der 2-Tagesgruppen waren keine Signifikanzen zu erkennen. Die 4-Tagesgruppen wiesen eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung des Stenosegrades zwischen Ko ($1,05 \pm 1,06 \%$) und Ao ($4,89 \pm 4,48 \%$) wie auch C1 ($0,97 \pm 0,74 \%$) und Ao ($4,89 \pm 4,48 \%$) auf, nicht jedoch zwischen Kontroll- und C1-Gruppe. Nach 6 Wochen liessen sich signifikante Erhöhungen ($p < 0,05$) des Stenosegrades zwischen allen Gruppen untereinander feststellen. Dieser nahm stetig ab von der Gruppe Ao ($35,17 \pm$

7,52 %) zu der Gruppe Ko ($22,38 \pm 6,79$ %) und der Gruppe C1 ($16,5 \pm 2,29$ %). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 und in Abbildung 8 dargestellt.

Diese Ergebnisse spiegeln das Ausmaß der intimalen Hyperplasie wieder: Der ausgeprägte Stenosegrad ist nach PTA überwiegend auf Umbauprozesse in der Gefäßwand und elastischen Rückstellkräften des Gefäßes zurückzuführen. Die Ergebnisse bekräftigen die schon bekannten Mechanismen remodelling, elastic recoil und Intimaproliferation, welche nach PTA an der Ausbildung einer Restenose maßgeblich beteiligt sind.^{14;42;43;47} Desweiteren wird deutlich, dass nach Stentimplantation die Auslöser der intimalen Hyperplasie gehemmt werden müssen, um eine In-Stent Restenose zu vermeiden, beispielsweise mit einem C1-Esteraseinhibitor, welcher in unserem Versuch die Intimabildung zumindest geringfügig verringert hat und somit auch den Stenosegrad. Der signifikante Unterschied zwischen der C1- und Kontrollgruppe nach 6 Wochen ist absolut gesehen nur gering (C1=16,5 % vs. Ko=22,38 %). Im Vergleich zu anderen Substanzen wie beispielsweise Sirolimus ist dies ein kleiner Effekt.^{74;99;190} Unter diesem Aspekt ist es fraglich ob der C1-Esteraseinhibitor als alleinige Substanz am Ende eine klinische Relevanz erreichen wird.

Übermäßige intimale Hyperplasie am Stentende, der sogenannte edge-effect oder candy-wrapper effect, konnte bei der Auswertung der Längsschnitte für die 6-Wochentiere (Abbildung 10) in keinem der Präparate gefunden werden. Das Ergebnis deckt sich mit bisher veröffentlichten Studien über Drug-eluting Stents, in denen unter Einsatz verschiedener Medikamente kein edge-effect festgestellt werden konnte.^{75;160;164} Der Effekt ist eine bisher ausschließlich bei lokaler Bestrahlungstherapie (Brachytherapie) aufgetretene Komplikation und stellt eine unverhältnismäßig starke Proliferation wandständiger Zellen sowie fibrotische Umbauvorgänge am Rand des bestrahlten Gebietes dar.^{96;106} Das Verhältnis war am Übergang (Position 2) und in der Aorta (Position 3) für die Gruppe 6 Wo C1 (Position 2: $1,4 \pm 0,4$; Position 3: $0,9 \pm 0,2$) signifikant niedriger ($p < 0,05$) als für die Gruppe 6 Wo Ko (Position 2: $1,9 \pm 0,2$; Position 3: $1,6 \pm 0,5$), wie in Tabelle 11 und Abbildung 10 dargestellt ist. Dies ist als positives Zeichen zu bewerten, denn ein hoher Wert wird als ungünstiger Faktor im Hinblick auf eine Restenose angesehen.

Vergleichbare Mediaflächen (Abbildung 9) konnten zu den verschiedenen Zeitpunkten bei den Aorten- und C1-Gruppen gemessen werden. Ein leichter Rückgang der Fläche im zeitlichen Verlauf der Kontrollgruppe ist wahrscheinlich auf eine Atrophie der Media zurückzuführen. Die Aufgabe der Tunica media eines gesunden arteriellen Gefäßes ist die Steuerung der Gefäßweite als Mittel zur Kreislaufregulierung. In einem Gefäßabschnitt mit implantiertem Stent geht diese Funktion durch das formstabile Gerüst verloren. Es folgt eine Atrophie der dort ansässigen glatten Muskelzellen. Bei der histopathologischen Untersuchung fiel in den Stentpräparaten ein Missverhältnis zwischen der Mediafläche an den Streben und der Fläche zwischen den Streben auf. Die vergleichbaren Flächen zwischen Aorten- und Stentpräparaten der druckalterierten, geschädigten Media ergaben sich aus Stellen gekennzeichnet von Druckatrophie (an den Streben) und Stellen mit kompensatorischer Hyperplasie (zwischen den Streben) an denen mehrere Zellschichten übereinander erkennbar waren.

Als Gesamtzellzahl der Intima pro Intimafläche ist die Zelldichte definiert. Ein hoher Wert signalisiert aktive Prozesse im Gefäß, als Reaktion auf Verletzung, Entzündung und andere Veränderungen. Die Zelldichte nahm in allen Gruppen ab je länger der Zeitraum nach der Intervention lag (Tabelle 12 und Abbildung 11). Signifikanzen zeigten sich bei den 2-Tagestieren zwischen den Gruppen Ko – C1 (Ko: 9078 ± 2926 Zellkerne/mm² - C1: 5306 ± 529 Zellkerne/mm²) und Ao – C1 (Ao: 12465 ± 3397 Zellkerne/mm² - C1: 5306 ± 529 Zellkerne/mm²), bei den 4-Tagestieren zwischen Ao – C1 (Ao: 5773 ± 1048 Zellkerne/mm² - C1: 4321 ± 767 Zellkerne/mm²) und bei den 6-Wochentieren unter den Gruppen Ko – C1 (Ko: 5928 ± 1466 Zellkerne/mm² - C1: 3660 ± 1043 Zellkerne/mm²) wie auch Ao – C1 (Ao: 4882 ± 1153 Zellkerne/mm² - C1: 3660 ± 1043 Zellkerne/mm²).

Es konnten Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen Aortenstück, behandelt mit PTA (Ao) und Aortenstück, behandelt mit PTA und Stentimplantation (Ko) beobachtet werden. Die hohen Werte 2 Tage nach dem Eingriff deuten auf das Einsprossen von Zellen hin. In der Aortengruppe sinkt

die Zelldichte stark ab, denn nach dem Reiz der Denudation ist kein weiterer Dauerreiz mehr vorhanden. Ganz anders sind die Verhältnisse in den Stentpräparaten. Ab dem 4.Tag wird die Zelldichte im Verhältnis zu der Aortengruppe größer. Hier liegt ein permanenter Fremdkörper im Gefäß, das mit Abstoßung, u.a. Entzündung, auf diesen reagiert. Im Verlauf bis 6 Wochen nach der Implantation setzen dann chronische Prozesse ein, die Werte zeigen keine großen Unterschiede mehr. Die C1-Gruppe hatte immer die niedrigste Zelldichte und über den Untersuchungszeitraum gesehen die geringsten Unterschiede. Ein geringeres Ausmaß der ständigen Fremdkörperreaktion mit Hemmung einer resultierenden Entzündung scheint durch die Beschichtung des Stents mit Hilfe des C1-Esteraseinhibitors möglich zu sein.

Auskunft über die Aktivität von Reparationsvorgängen im Gefäß gibt der Proliferationsindex (Abbildung 12 und Tabelle 13). 2 Tage nach der Behandlung sind diese Prozesse bereits aktiviert und steigern sich noch mehr bis zum Zeitpunkt 4 Tage. Der Proliferationsindex der Gruppe 2 Tage Ao ($2,2 \pm 1,3$ %) war signifikant ($p < 0,05$) niedriger gegenüber den Gruppen 2 Tage Ko ($7,5 \pm 3,9$ %) und C1 ($6,5 \pm 1,8$ %). Das die Reparationsvorgänge in diesem Zeitraum in vollem Gange sind wurde in mehreren Studien beschrieben.^{106;177;189} Die höheren Werte in den Stentpräparaten machen die stärkere Verletzung des Gefäßes durch den Stent deutlich. Nach 4 Tagen trat die höchste Proliferationsrate auf, signifikant zu den Proliferationsraten zum Zeitpunkt 6 Wochen post interventionem. Nach einer Dauer von 6 Wochen war der Proliferationsindex viel niedriger. Der Index der Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,3$ %) zeigte signifikant höhere Werte im Vergleich zu der Ao-Gruppe ($0,6 \pm 0,2$ %). Aus den ähnlich niedrigen Werten der C1-Gruppe im Vergleich zur Aortengruppe, lässt sich ableiten, dass die Beobachtungsdauer von 6 Wochen für die Untersuchung und Interpretation der Prozesse ausreicht. Diese Ergebnisse sprechen mit den 1998 gemachten Beobachtungen von Rogers et al. über einen Höhepunkt der Zellproliferation nach 3.-7.Tag post interventionem überein.¹⁹¹

Die Endothelfunktion (Tabelle 14 und 15) wurde 6 Wochen nach der Intervention bestimmt, wegen schlechter Färbung allerdings schwer beurteilbar. Verzögerte Reendothelisierung nach Stentimplantation ist bekannt und birgt das Risiko einer erhöhten Thrombosegefahr.¹⁹² Ob durch die Beschichtung diese Gefahr bei Drug-eluting Stents tatsächlich erhöht wird konnte in unserem Versuch nicht festgestellt werden.

Hanke et al.¹⁴³ fanden nach experimenteller Ballonangioplastie in Kaninchenkarotiden eine Ansammlung von Makrophagen innerhalb der Intima. Schwartz⁶⁴ entwickelte mehrere Modelle zur Klärung des Ursprungs von Neointimazellen. Danach können die glatten Muskelzellen der intimalen Hyperplasie nicht direkt von glatten Muskelzellen der Media abstammen. Ortsständige Makrophagen sind ein Bestandteil der atheromatösen Neointima. Im vorliegenden Versuch konnten die Beobachtungen von Hanke und Schwartz ebenfalls nachgewiesen werden. Makrophagen (Tabelle 16 und 17) waren in den Kurzzeitgruppen – wenn überhaupt – nahe den Stentstreben nachweisbar. Bei den Langzeitpräparaten konnten Makrophagen submedial, zu der Lamina elastica interna hin angeordnet und bei den Stentpräparaten zusätzlich noch durchgehend nahe den Streben, beobachtet werden. In der Media und Adventitia waren kaum welche zu erkennen.

4.3.3 Histopathologische Befunde

Die histopathologische Beurteilung wurde unter Blindbedingungen von einem erfahrenen Gefäßpathologen durchgeführt. Ziel war die Untersuchung von Reaktionen im Gefäß anhand verschiedener Parameter nach PTA und kombinierter PTA mit Stentimplantation (unbeschichteter (Ko) vs. C1-Esteraseinhibitor (C1) beschichteter Stent). Im Allgemeinen zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Morphologie zwischen den Kurzzeit- und Langzeittieren. Parameter wie intimale Hyperplasie, lipidspeichernde Makrophagen (Schaumzellen), Kalzifikationen oder intimales Ödem traten erst im längeren Verlauf des Versuchs auf. Die Fibrose als Zeichen adaptiver bzw. reaktiver Veränderung trat in der Adventitia schon nach 2 Tagen auf, während

sie in der Neointima erst nach 6 Wochen sichtbar wurde. 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 herbei führen. Die Fibrininsudation als früh reagierender Parameter nimmt mit der Zeit ab, andere Parameter wie Destruktion elastischer Lamellen oder vessel injury score nehmen zu. Durch die Intervention wurde eine Läsion gesetzt mit resultierenden Veränderungen der Gefäßwandstruktur: Umverteilung des Zellgehaltes, breitere Neointima, je länger der Stent liegt, eine schmaler werdende Media wegen numerischer Atrophie sowie eine breiter und zellreicher werdende Adventitia mit dichterem Bindegewebsgehalt im perimedialen Bereich.

Um eine Aussage über das Ausmaß als auch Stabilität der vorhandenen Läsion machen zu können, erfolgte eine Einteilung der atherosklerotischen Veränderungen in die Stadien nach Stary et al.¹³¹ (Kapitel 2.7.7.3). Die Läsionen waren in den Kontroll- und C1-Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils vergleichbar. Somit sind Unterschiede in anderen Parametern zwischen den beiden Gruppen nicht auf unterschiedlich starke Läsionen zurückzuführen. In den Kurzzeitgruppen waren stets Initialläsionen mit Lipoproteinansammlung in der Intima zu erkennen. Nach längerer Zeit kamen noch Typ II-Läsionen mit zusätzlichen Lipiden in Makrophagen (Schaumzellen) und glatten Muskelzellen (intrazelluläre Lipidansammlung) vor, sowie Typ III-Läsionen, welche sich durch vereinzelte kleine Ablagerungen extrazellulärer Lipide und Kalzifikationen auszeichnen. Bei einem lokalen Überangebot von Fett, in vorliegendem Versuch durch das Cholesterinfutter ausgelöst, nehmen Makrophagen über Pinozytose Fett auf. Durch diesen resorptiven Prozess entstehen Schaumzellen.⁵⁸ In unserem Versuch sind diese Lipid speichernden Makrophagen als Spätreaktion um die Streben herum aufgetreten. Das Merkmal war in der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt im Vergleich zur C1-Gruppe. Ähnliche Ergebnisse konnten in der Media für den seltenen und gering ausgeprägten Parameter Kalzifikationen festgestellt werden. Diese treten in degeneriertem Gewebe auf, bei uns in den Typ III-Läsionen nach Stary.

Eine frühe Reaktion als Zeichen ablaufender Prozesse in der Gefäßwand war die Fibrose, eine Vermehrung von kollagenfaserreichem Bindegewebe bzw. Gewebeverhärtung, als Folge chronisch-entzündlicher, ischämischer oder degenerativer Gewebeschädigung. Schon nach 2 Tagen war eine Fibrose in der Adventitia durchgehend vorhanden. Die natürlicherweise in der Adventitia vorhandenen Fibroblasten werden durch den Stent aktiviert, das erklärt die schnelle Reaktion. In der Intima und um die Stent herum dauert dieser Vorgang länger und wird erst nach 6 Wochen sichtbar. Dort sind eigentlich keine Fibroblasten vorhanden, sie müssen erst einwandern. In der Media ist keine Fibrose zu erkennen, da sie aus glatten Muskelfasern und elastischen Fasernetzen besteht, welche keine Fibroblasten und auch kein Bindegewebe enthalten. Bei sehr starker Entzündung ist eine Migration von Fibroblasten aus der Adventitia möglich (subadventitiell). Ursachen einer Fibrose sind u.a. Ödeme, in diesem Versuch eher nicht dafür verantwortlich, vorausgegangene Entzündungen oder Veränderung der Gefäßtextur durch einen permanenten Reiz (Stent) mit reaktiven Prozessen zur Adaptation. Diese Ursache scheint hier im Frühstadium der Verursacher zu sein, im Spätstadium kann die Entzündung zusätzlich noch eine wichtige Rolle spielen. Kapillartoxische Ödeme entstehen aufgrund gestörter Permeabilität der Kapillaren, der oft eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren zugrunde liegt und tritt u.a. nach mechanischen Reizen auf. Ödeme waren in geringem Maße bei den Langzeitversuchen sichtbar. In unserem Versuch konnten keine großen Unterschiede der Fibrose auslösenden Prozesse und der nachfolgenden Fibrose zwischen den C1-beschichteten Stents und der Kontrollgruppe mit unbeschichteten Stents festgestellt werden (Tabellen 24, 25 und 26). Scheinbar kann der C1-Esteraseinhibitor nur in geringem Maße auf weitere reaktive bzw. adaptive Veränderungen Einfluss nehmen.

Hiatt et al.⁷⁵ beschrieben eine vermehrte Fibrinablagerung bei Sirolimus beschichteten Stents gegenüber unbeschichteten Stents. Suzuki et al.¹⁷⁷ 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

Reparationsmechanismus und als Folge einer lokal toxischen Antwort auf die benutzte Substanz. Farb et al.¹⁸⁹ 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. Diese Ergebnisse konnten im vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden. Eine erhöhte intimale Zellproliferation konnte nicht festgestellt werden, sondern eine geringere Zelldichte und ein kleinerer Proliferationsindex (Tabellen 12 und 13). Es fand sich keine vermehrte Fibrininsudation bei den mit C1-Esteraseinhibitor beschichteten Stents gegenüber den unbeschichteten Stents. Im Gegensatz zu den genannten Ergebnissen war eine geringere Fibrininsudation bei der C1-Gruppe zu beobachten (Tabelle 27). Nach 2 Tagen und nach 4 Tagen konnte eine durchgehende Fibrindeponierung um die Stents registriert werden. Fibrin ist das Endprodukt der Blutgerinnung. Die Gerinnungskaskade wird durch die sogenannte Virchowsche Trias (Gefäßwandläsion, veränderte Strömung, Hyperkoagulabilität) aktiviert. Durch den Stent werden in der normalerweise laminaren Blutströmung Turbulenzen ausgelöst, welche Thrombenbildung verursachen. Durch die Gefäßwandläsion wird das Endothel geschädigt und bedingt eine endotheliale Dysfunktion mit nachfolgender Fibrinausscheidung. Im Laufe der beobachteten Zeitdauer von 6 Wochen scheint das Fibrin durch Umstrukturierungs- und Neubildungsvorgänge in der Neointima wieder beseitigt worden zu sein. In den 6 Wochenpräparaten ist es nicht mehr vorhanden.

Ein fibrino-leukozytäres Exsudat entsteht im Rahmen von entzündlichen Prozessen oder aufgrund von Gefäßwandveränderungen, durch welche sich über eine Plättchenadhäsion schließlich Fibrin bildet. 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. Polymorphkernige Granulozyten als Frühreaktion der Entzündungsantwort fanden sich in unseren Präparaten bei den 2- und 4-Tagestieren. Nach 6 Wochen war kein Exsudat mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurden Monozyten bei allgemein geringer Existenz in den Präparaten der 6-Wochentiere entdeckt, was als

spätere Antwort des Immunsystems auf den Entzündungsreiz des Fremdkörpers Stent gedeutet wurde. Außerdem fiel auf, dass im Gruppenvergleich der Langzeit-Tiere die Neointima der beschichteten Stentpräparate vermehrt 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. In der Adventitia waren Monozyten nach 2 Tagen in der C1-Gruppe aufgetreten, nach 4 Tagen waren keine sichtbar, erst wieder nach 6 Wochen. Dies könnte bedeuten, dass die entzündlichen Infiltrate in sehr kurzen Zeitintervallen auftreten und in den Schnitten nicht immer zu erfassen sind.

Bei der histopathologischen Untersuchung fiel eine Destruktion elastischer Lamellen auf. Diese Faserdestruktion war ab dem ersten Untersuchungszeitpunkt nach 2 Tagen gleichmäßig um die Streben und in der Media erkennbar. 6 Wochen später war die Destruktion stärker ausgeprägt. Die Lamellen werden bei der Intervention durch die Dehnung während der Ballondenudation geschädigt. Der Stent verursacht eine mechanische Kompression. Bis sich die Reaktion durch Fragmentation und Verschmelzungsprozesse voll ausprägt vergeht einige Zeit, daher ist erst nach 6 Wochen eine stärkere Destruktion zu erkennen. Ähnlich wie die elastischen Lamellen wurden auch die medialen Muskelzellen komprimiert. Es resultierte eine numerische Atrophie in der Media. Um die Streben war die Reaktion wahrscheinlich durch ähnliche Prozesse wie bei der Destruktion elastischer Lamellen verzögert und es entstand im Zeitraum von 6 Wochen eine Druckatrophie mit kompensatorischer Hyperplasie zwischen den Streben. Die Media wird zusätzlich von vermehrter intimaler Hyperplasie zusammengedrückt.

Schwartz et al.⁷¹ beschrieben einen proportionalen Zusammenhang zwischen dem Grad der Gefäßverletzung durch den Stent sowie der daraus resultierenden Neointimaprolieration. Zur Beurteilung der Gefäßwandverletzung durch den Stent wurde der dort beschriebene Vessel

injury Score (VIS) in einer etwas modifizierten Form (siehe Kapitel 2.7.7.1) verwendet. Ein solcher direkter Zusammenhang ließ sich bei der Auswertung unserer Präparate nicht feststellen. Kornowski et al.¹⁹³ belegten 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.

Hofma et al.⁴¹ konnten keine starke Korrelation zwischen Gefäßwandverletzung, Entzündung und Neointima feststellen. Der VIS stieg selbst nach korrekter Implantation des Stents stetig an, nicht aber nach alleiniger PTA. Auch die Neointima wurde im Laufe der Zeit immer dicker. In ihrer Studie war die Entzündungsreaktion insgesamt gering. Nach alleiniger PTA war die Entzündung nach Wochen nicht mehr sichtbar, nach Stentimplantation interessanterweise noch 12 Wochen später. Der größte Anstieg des VIS findet innerhalb der ersten 4 Wochen statt, während bei der Neointima erst ab der 4. Woche dieser starke Anstieg beginnt und bis zur 12. Woche reicht. In unseren Präparaten ist der VIS bis zur 6. Woche angestiegen, allerdings liegen keine Präparate zum Zeitpunkt 4 Wochen vor und es kann somit auch nicht gesagt werden, ob der VIS nach 4 Wochen höher war und bis zu unserer Messung schon wieder abgefallen ist. Neointima war unter dem 10fach Objektiv bei den 2- und 4-Tagestieren nicht zu erkennen. Dies spricht für eine gewünschte Abtragung der Intima während der Denudation mit Neubildung nach gewisser Zeit und eher gegen eine rein adaptive Veränderung der Intima. Eine Migration glatter Muskelzellen konnte bei den 6-Wochentieren in den Aorten- und Stentpräparaten beobachtet werden. Die Neointima wurde aufgrund der Migration und einer Intimafibrose immer breiter, je länger der Stent im Gefäß lag. Unsere Langzeitgruppe endete nach 6 Wochen, auch hier kann keine Aussage über eine weitere Zunahme der Intima getroffen.

Wir konnten bei der Auswertung, wie Hofma et al. keine starken Korrelationen beobachten. Zudem wollten wir mit der Beschichtung der Stents eine von dem

Verletzungsgrad unabhängige Verminderung der Neointimafläche erreichen. Obwohl alle Tiere einer identisch ausgeführten Prozedur unterzogen wurden, ergab sich in den Gefäßen der Kurzzeittiere ein durchweg geringerer VIS. Gründe hierfür könnten Reparationsvorgänge sein oder einfach der von Hofma et al. beschriebene starke Anstieg bis zur 4. Woche, so dass die zur Erfassung des VIS herangezogenen Parameter kurz nach der Behandlung noch nicht aussagekräftig sind, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt erfassbar werden. Im Allgemeinen waren die Werte jedoch in allen Präparaten niedrig und unterschieden sich nur geringfügig zwischen den Gruppen.

Um die Entzündungsreaktion zu bestimmen wurde eine von Hofma et al.⁴¹ beschriebene Einteilung der inflammatory response (Tabelle 3) verwendet, den inflammation score (IS). Diese Methode ist mehr für Veränderungen in der Spätphase geeignet. Additionelle immunologische Untersuchungen während der initialen Phase könnten frühe Abläufe verdeutlichen, beispielsweise der Nachweis von T- und B-Lymphozyten. Es fiel auf, dass nach alleiniger PTA die Entzündungsreaktion nach den Kriterien des IS geringer ausfällt als nach Stentimplantation. Verstärkt war eine Entzündung bei den Stentpräparaten nach 6 Wochen zu erkennen. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit denen von Hofma et al.⁴¹ Eine deutliche Entzündungshemmung durch den C1-Esteraseinhibitor konnte nicht beobachtet werden.

Die persistierende Entzündung im Stent könnte im Gegensatz zu alleiniger PTA eine bestehende Gefäßwandverletzung durch den Fremdkörper weiter verschlechtern oder wegen größerer morphologischer Veränderungen eine tiefere Penetration der Stent in die Gefäßwand ermöglichen. Eine chronische Entzündung beeinflusst möglicherweise über diese Mechanismen den VIS dahingehend, dass höhere Werte resultieren. Desweiteren beeinflussen Entzündungszellen über eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen das neointimale Wachstum und eine chronische endotheliale Dysfunktion. Eine leicht abgeschwächte Entzündung in Verbindung mit kleinerer Neointimafläche bei der C1-Gruppe kann für einen hemmenden Effekt der Medikamenten-Beschichtung auf die entzündlichen und proliferativen Gefäßveränderungen sprechen.

4.4 Limitationen

Wie bereits in den einzelnen Kapiteln ausführlich erläutert, gibt es auch in dieser Studie Einschränkungen, welche nachfolgend im Überblick zusammengefasst sind.

Als Tiermodell für die Atherosklerose- und Restenoseforschung^{139;141} scheinen derzeit Schweine am geeignetsten zu sein, an zweiter Stelle stehen Kaninchen.¹¹³ Die alleinige Stentimplantation im Weißen Neuseelandkaninchen bildet nicht zwingend eine große Plaqueläche aus. Um eine solche zu erzeugen, eignet sich die PTA in Kombination mit einer Cholesterindiät. Aufgrund dieser Eigenschaften hat sich das Kaninchen als adäquates Modell in der Atherosklerose- und Restenoseforschung etabliert. Jedoch kann nicht ohne weiteres eine Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen stattfinden. Die komplizierten Vorgänge, die durch eine Verletzung der Gefäßwand beim Menschen hervorgerufen werden, lassen sich bisher in keinem Tiermodell nachvollziehen.^{58;76} Mechanismen der Thrombozytenaggregation und die folgende fibroproliferative Antwort sind immer noch nicht vollständig wissenschaftlich erfasst und verlaufen vermutlich bei jeder Spezies anders ab. Ebenso muß die unterschiedliche Wirkung von Pharmaka zwischen den Spezies beachtet werden. Metabolismus, Gewebepenetration und Wirkungen können variabel sein. Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen in Tiermodellen und klinischen Studien können ihre Ursache auch in Abweichungen des Verletzungstyps durch Unterschiede der benutzten Technik und dem Dehnungsgrad von Stent und Gefäß haben und damit den verbundenen Veränderungen der Gefäßwand und der entzündlichen Reaktion zwischen den verschiedenen Spezies.¹⁵ Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Tiermodell der menschlichen Krankheit möglichst nahekommen sollte, dies jedoch nie vollständig erreicht werden kann.

Das im vorliegenden Versuch durchgeführte Protokoll erlaubt verschiedene Aussagen über die Folgereaktionen im Gefäß auf PTA und Stentimplantation und die Effekte des C1-Esteraseinhibitors im Hinblick auf eine Entzündungsreaktion und daraus resultierenden Veränderungen im Gefäß. Die

gesamte Tierpopulation teilte sich in drei verschiedene Versuchsgruppen auf: Aortenstück behandelt mit PTA (Ao), Aortenstück behandelt mit PTA und Implantation eines unbeschichteten Stents (Ko), Aortenstück behandelt mit PTA und Implantation eines mit C1-Esteraseinhibitor beschichteten Stents (C1). Durch diese Aufteilung konnten die Mechanismen im Gefäß nach alleiniger PTA mit denen nach PTA und Stentimplantation verglichen werden. Ferner sollte auch die Auswirkung des C1-Esteraseinhibitors auf die Gefäßantwort erforscht werden. Um eine Aussage über den alleinigen Effekt des Trägerproteins auf die Entzündung, bzw. die vom Trägerprotein unabhängige Wirkung des C1-Esteraseinhibitors treffen zu können, wäre noch eine zusätzliche Versuchsgruppe sinnvoll gewesen. Dabei hätte ein Stent, nur mit dem Trägerprotein beschichtet, implantiert werden müssen.

In unserem Tierexperiment wurden die Versuchsgruppen zusätzlich noch zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht: nach 2 Tagen, 4 Tagen und 6 Wochen. Ziel war dabei, Aussagen über morphologische und histologische Ergebnisse zu kurz- und längerfristigen Zeitpunkten machen zu können. Durch die 2- und 4-Tagesgruppen sind frühe Effekte der Entzündungsreaktion, mit den Tieren der 6-Wochengruppe eher längerfristige Auswirkungen beobachtet worden. Um einen Verlauf der Veränderungen zu erhalten, müssten Versuchsgruppen zwischen den Zeitpunkten vier Tage und sechs Wochen gemacht werden. Für langfristige Effekte wären Versuchsgruppen über den Zeitraum von sechs Wochen hinaus sinnvoll, wie sie auch bei klinischen Studien empfohlen und sogar Zeiträume von mindestens 50-60 Wochen gefordert werden.¹⁵⁸

Um einerseits den wissenschaftlichen Ansprüchen und andererseits den ethischen Gesichtspunkten gerecht zu werden, wurde der Versuch so aufgebaut, dass zwischen sechs und acht Tiere pro Gruppe verwendet wurden.

Der Beschichtungstechnik für das sogenannte „coating“ und der Beschichtungssubstanz kommt eine besondere Bedeutung zu. Bei den handelsüblichen fabrikneuen Stents der C1-Gruppe wurde eine Beschichtungsmethode angewandt, die speziell für den Drug Release eingesetzt wird. Es wurden dazu Peptidsequenzen mit einer Größe von < 20 Aminosäuren verwendet. Die Beschichtung enthält eine dem C1-Inhibitor

ähnliche Substanz. Die Substanzen wurden mit Hilfe des Hydrogels Polyvinylpyrrolidone = PVP über UV-Polymerisation immobilisiert und an die Oberfläche des Stents gebunden. Die Beschichtungssubstanz soll, wie schon in 4.2.6.2 erläutert, ein Anhaften des Medikaments an den Stent bewirken. Das Hydrogel bietet dem Medikament eine Plattform und bewirkt ein Anheften an den Stent. Darüber hinaus dient die Substanz als Reservoir und verhindert ein Abwaschen oder zu schnelle Abgabe des Wirkstoffes. 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.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Die eigentliche Beschichtung der Stents erfolgte im sogenannten Dipping- (Eintauch-) Verfahren. Zur Herstellung der Dipping-Lösung wurden 500 µg C1-Peptid in Pulverform in 2 ml 10%iger wässriger PVP K 90-Lösung gegeben. Dies erhöht die Plasmahalbwertszeit wie Kaneda et al. gezeigt haben.¹¹⁹

Die anschließende Bestrahlung mit UV-Licht löst eine Photopolymerisation des Hydrogels aus, welche einen einheitlichen Beschichtungsfilm über den gesamten Stent hinweg gewährleistet.

Die Anwendung der Polyvinylpyrrolidone-Beschichtung sollte erstens die Thrombogenität des Stents herabsetzen und somit die überschießende Antwort des menschlichen Organismus auf einen Fremdkörper bremsen. Zweitens sollte durch diese spezielle Beschichtungstechnik ein Verlust des Medikaments vor der Expansion des Stents verhindert und über das Hydrogel eine langsame, kontinuierliche Abgabe des Wirkstoffes garantiert werden.

Ein Problem der genannten Techniken ist die unzureichende Medikamentenkonzentration. Umso bedeutungsvoller wird die Abgabeeigenschaft des Trägers (slow, intermediate oder fast). Die Sicherheit und der Wirkungsgrad des Systems sind abhängig von der Kombination aus Polymer, Medikament und Freisetzungskinetik. Genaue Messungen der Freisetzungskinetik von verschiedenen Trägersubstanzen und effektive

Wirkspiegel sind durchzuführen. Dies wären beispielsweise Dosismessungen des Medikaments im Blut und im Vergleich dazu in der Gefäßwand.

Die Ergebnisse im vorliegenden Experiment haben die Theorie der Unterbrechung komplexer Mechanismen mit dem C1-Esteraseinhibitor gezeigt und dies mit einem Effekt auf die Hemmung der Restenose gegenüber der Kontrollgruppe bestätigt. Allerdings war der signifikante Unterschied im Stenosegrad absolut gesehen doch gering und im Vergleich zu Sirolimus ist der Effekt eher klein.^{74;99;190} In diesem Fall ist es nicht gelungen, durch die gewählte Beschichtung in der C1-Gruppe eine signifikante Verringerung der Intimafläche gegenüber der Kontrollgruppe zu erreichen. Zu allen Zeitpunkten war die Intimafläche in der C1-Gruppe nur geringfügig kleiner gegenüber der Kontrollgruppe. Es kann keine Aussage darüber gemacht werden ob dies an einer unzureichenden Dosierung, mangelnden Freisetzung oder zu geringen Wirkung des C1-Esteraseinhibitors gelegen hat, da im vorliegenden Versuch keine Medikamentenkonzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurden. Es wäre noch interessant die Auswirkungen einer niedrigeren bzw. höheren Dosis zu untersuchen und zu sehen, ob sich unter sonst gleichen Bedingungen bessere oder gar schlechtere Ergebnisse zeigen. Mit Hilfe einer anderen Trägersubstanz hätte eventuell ein besseres Resultat erreicht werden können. Eine zweite Kontrollgruppe mit einer reinen Hydrogelbeschichtung ohne C1-Inhibitor fehlte in unserem Versuch. Desweiteren wurde nur eine Seite des Komplementsystems unterbrochen. Bessere Ergebnisse könnte man erhoffen, wenn der klassische und alternative Weg gleichzeitig unterbrochen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre auch die Blockade der gemeinsamen Endstrecke mit einem C5-Inhibitor, hierbei werden die zahlreichen anderen Systeme, welche der C1-Inhibitor beeinflusst nicht tangiert.

Insgesamt betrachtet zeigte der C1-Esterase Inhibitor leichte Effekte. Viele Parameter waren aber nicht signifikant verändert, daher wurde eine Nachfolgestudie mit einer Kombination von C1- und C3-Inhibitor angeschlossen. Das Komplementsystem ist wohl ein Baustein im Komplex der Restenoseentstehung aber vielleicht nicht das den Haupteffekt auslösende System. Inzwischen gibt es Substanzen wie Sirolimus und Taxol welche

größere Effekte auf die Entzündungshemmung, Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen und somit eine Reduktion der intimalen Hyperplasie zeigen.^{74;99;102-105;190} Diese beiden Substanzen sind in der Klinik am Erfolgreichsten. Es ergibt sich die Frage ob der C1-Inhibitor als alleinige Substanz eine klinische Relevanz erreichen wird.

4.5 Schlussfolgerung

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Entzündungsreaktion im zeitlichen Ablauf nach PTA und Stentimplantation im Hinblick auf die Neointimabildung eine besondere Bedeutung zukommt. Abläufe verschiedener Reaktionen auf die jeweilige Behandlung finden teilweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt und beeinflussen das zeitliche Auftreten von bestimmten Parametern.

Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen Aortenstück, behandelt mit PTA und Aortenstück, behandelt mit PTA und Stentimplantation sind vorhanden. Dabei folgt einem geringeren Reiz nach PTA eine schwächere Entzündung der Gefäßwand, welche mit einem niedrigeren Proliferationsindex und einer kleinen neointimalen Fläche einher geht. Dementsprechend folgt einem stärkeren Reiz nach PTA und Stentimplantation eine ausgeprägtere Entzündung der Gefäßwand, höherem Proliferationsindex und größere neointimale Fläche. Es konnten unterschiedliche Ursachen einiger Effekte festgestellt werden, beispielsweise beim Stenosegrad. Nach alleiniger PTA tritt eine schwächere Neointimabildung auf als nach PTA und Stentimplantation. Der Stenosegrad ist jedoch zu allen gemessen Zeitpunkten höher, ab 4 Tage nach der Intervention sogar signifikant. Die Hauptursache nach Stentimplantation ist eine durch Entzündung bzw. Abwehrreaktion auf den Fremdkörper Stent ausgelöste Neointimabildung. Nach PTA sind überwiegend elastische Rückstellkräfte und Umbauprozesse in der Gefäßwand für den hohen Stenosegrad verantwortlich.

Eine antiinflammatorische Beschichtung der Stents mit einem C1-Esteraseinhibitor kann die In-Stent Restenoserate geringradig senken. Durch das Medikament ist die Zelldichte und der Proliferationsindex geringer als bei

den unbeschichteten Stents. Es wurden entzündungsauslösende Prozesse abgeschwächt, dabei die Neointimabildung gehemmt. Als Resultat trat ein kleinerer Stenosegrad auf, mit Signifikanz nach 6 Wochen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei dem verwendeten Tiemodell eine Prävention der Restenose mit Hilfe von C1-Esteraseinhibitor beschichteten Stents möglich ist, allerdings können Tiermodelle nie die Pathomechanismen im Vergleich zum Menschen exakt reflektieren. Ob diese Methode eine wirkliche Alternative zu den bisherigen Behandlungen darstellt, muss in fortführenden Experimenten mit Vergleich einer anderen Dosis, Erforschung der Pharmakokinetik des Medikaments und verschiedener Trägersubstanzen geprüft werden. Genau in diesen Punkten liegt die Limitation unseres Projektes. Erst nach diesen Versuchen können Vergleiche mit anderen Systemen und Substanzen gemacht werden, wie auch eine eventuelle klinische Relevanz und praktische Durchführbarkeit durch weitere Studien belegt werden.

5 Zusammenfassung

Atherosklerotische Gefäßerkrankungen sind in den westlichen Industrieländern für annähernd die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich. Als Atherosklerose wird die lokale Wandverdickung und -verhärtung der größeren arteriellen Blutgefäße bezeichnet. Sie entsteht aus einer exzessiven entzündlich-fibroproliferativen Antwort auf vielfältige Formen von Reizungen des Endothels und der glatten Muskelzellen der Arterienwand. Diese Veränderungen der Gefäßwand verursachen verschiedene klinische Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) der unteren Extremitäten und zerebrovaskuläre Erkrankungen.

Stenosen im Rahmen der Atherosklerose als Folge von Intimahyperplasie sind eine häufige Ursache für Durchblutungsstörungen und daraus folgender Ischämien. Eine bedeutende Entwicklung für die Therapie von Stenosen und Verschlüssen peripherer Arterien war die Einführung der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA). Eine weitere Behandlungsmöglichkeit brachte die Einführung der Stentimplantation. Intravaskuläre Stents sind Endoprothesen die der Stützung des Gefäßes dienen, geometrische Gefäßwandveränderungen vorbeugen und somit eine dauerhafte Durchgängigkeit sichern sollen. Sie sorgen für ein lumenales Gerüst, welches die für die Pathogenese der Restenose nach PTA verantwortlich gemachten Gefäßreaktionen („elastic recoil“ und „remodelling“) so gut wie eliminiert. Die Restenoserate ist nach Stentimplantation (14-36 %) geringer als nach PTCA (30-40 %), trotzdem ist die sogenannte In-Stent Restenose, der Wiederverschluss eines Stents, ein klinisches Problem.

Seit einigen Jahren gilt die Entzündung als eine dominierende Ursache der In-Stent Restenose. Es wurde eine Korrelation zwischen Entzündung, Gefäßschädigung und Neointimawachstum festgestellt. Der Stent, ein Metallimplantat, löst eine permanente Fremdkörperreaktion und folgend eine Entzündung aus. Eine Gefäßverletzung, verursacht durch PTA oder die dauerhafte mechanische Belastung des Gefäßes durch den Stent, löst eine

komplexe Kaskade mit Entzündung, thrombotischen Mechanismen und intimaler Hyperplasie aus.

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt eines mit C1-Esteraseinhibitor beschichteten Stents am Tiermodell untersucht. Ziel dabei war es, die Bedeutung der Entzündung im zeitlichen Ablauf nach PTA und Stentimplantation im Hinblick auf die Neointimabildung und Restenose zu erörtern und Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen Aortenstück, behandelt mit PTA, sowie Aortenstück, behandelt mit PTA und Stentimplantation zu finden. Desweiteren galt es nachzuweisen, ob durch eine antiinflammatorische Beschichtung der Stents, mit einem C1- Esteraseinhibitor, die Restenoserate gesenkt werden kann indem Komplementinhibitoren eine Unterbrechung der Komplementkaskade ermöglichen und somit die Entzündungsreaktion verhindern oder zumindest verringern.

Atherosklerotische Plaques wurden mit Hilfe einer 28-tägigen Cholesterindiät mit 0,5 % Cholesterin im Futter vor dem Eingriff induziert. Es wurden 44 männliche Weisse Neuseelandkaninchen einer PTA und anschließenden Stentimplantation in die Aorta abdominalis unterzogen. Das Versuchsende fand 2 Tage, 4 Tage und 6 Wochen nach dem operativen Eingriff statt. Die Präparate wurden aufgearbeitet, gefärbt und morphometrisch sowie histopathologisch ausgewertet. Die gesamte Tierpopulation teilte sich in drei verschiedene Versuchsgruppen auf: Aortenstück behandelt mit PTA (Ao, n = 44), Aortenstück behandelt mit PTA und Implantation eines unbeschichteten Stents (Ko, n = 22), Aortenstück behandelt mit PTA und Implantation eines beschichteten Stents (C1, n = 22). Der C1-Esteraseinhibitor war an ein Trägerprotein gebunden. Durch diese Aufteilung konnten die Mechanismen im Gefäß nach alleiniger PTA mit denen nach PTA und Stentimplantation verglichen werden, sowie die Auswirkung des C1-Esteraseinhibitors auf die Gefäßantwort.

Der Stent stellt einen Fremdkörper dar, worauf das Gefäß mit einer stärkeren Intimaprolieration (Abbildung 6) reagiert als auf alleinige Ballondilatation. Nach 2 Tagen war die Plaquefläche der Ko-Tiere ($34,3 \pm 17,1 \mu\text{m}^2$) signifikant

($p < 0,05$) größer im Vergleich zu den Ao-Tieren ($6,5 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$). Bei den 6-Wochentieren ist es ebenfalls zu einer deutlichen intimalen Hyperplasie gekommen. Dabei fiel diese mit $1512,3 \pm 598,8 \mu\text{m}^2$ bei der Ko-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer aus als bei der Ao-Gruppe mit $1035,5 \pm 324,7 \mu\text{m}^2$. Die intimale Gewebsneubildung war in allen Versuchsgruppen nach 6 Wochen signifikant stärker ausgeprägt als nach 2 und 4 Tagen (Tabelle 7).

In unseren Präparaten führte der Einbau des Stents selbst nach Ausbildung einer neointimalen Proliferation zu allen Zeitpunkten einen geringeren Stenosegrad im Vergleich zur Aorta herbei. Der Stenosegrad war in allen Versuchsgruppen nach 6 Wochen signifikant höher als nach 2 und 4 Tagen (Tabelle 8). Die 4-Tagesgruppen wiesen eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung des Stenosegrades zwischen Ko ($1,05 \pm 1,06 \%$) und Ao ($4,89 \pm 4,48 \%$) wie auch C1 ($0,97 \pm 0,74 \%$) und Ao ($4,89 \pm 4,48 \%$) auf, nicht jedoch zwischen Kontroll- und C1-Gruppe. Nach 6 Wochen liesen sich signifikante Erhöhungen ($p < 0,05$) des Stenosegrades zwischen allen Gruppen untereinander feststellen. Dieser nahm stetig ab von der Gruppe Ao ($35,17 \pm 7,52 \%$) zu der Gruppe Ko ($22,38 \pm 6,79 \%$) und der Gruppe C1 ($16,5 \pm 2,29 \%$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Der ausgeprägte Stenosegrad ist nach PTA überwiegend auf Umbauprozesse in der Gefäßwand und elastischen Rückstellkräften des Gefäßes zurückzuführen.

Die Zelldichte ist als Gesamtzellzahl der Intima pro Intimafläche definiert. Ein hoher Wert signalisiert aktive Prozesse im Gefäß, als Reaktion auf Verletzung, Entzündung und andere Veränderungen. Die Zelldichte nahm in allen Gruppen ab je länger der Zeitraum nach der Intervention lag (Tabelle 12). Signifikanzen zeigten sich bei den 2-Tagestieren zwischen den Gruppen Ko – C1 (Ko: 9078 ± 2926 Zellkerne/ mm^2 - C1: 5306 ± 529 Zellkerne/ mm^2) und Ao – C1 (Ao: 12465 ± 3397 Zellkerne/ mm^2 - C1: 5306 ± 529 Zellkerne/ mm^2), bei den 4-Tagestieren zwischen Ao – C1 (Ao: 5773 ± 1048 Zellkerne/ mm^2 - C1: 4321 ± 767 Zellkerne/ mm^2) und bei den 6-Wochentieren unter den Gruppen Ko – C1 (Ko: 5928 ± 1466 Zellkerne/ mm^2 - C1: 3660 ± 1043 Zellkerne/ mm^2) wie auch Ao – C1 (Ao: 4882 ± 1153 Zellkerne/ mm^2 - C1: 3660 ± 1043 Zellkerne/ mm^2). Es

konnten Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen Aortenstück, behandelt mit PTA (Ao) und Aortenstück, behandelt mit PTA und Stentimplantation (Ko) beobachtet werden.

Auskunft über die Aktivität von Reparationsvorgängen im Gefäß gibt der Proliferationsindex (Tabelle 13). 2 Tage nach der Behandlung sind diese Prozesse bereits aktiviert und steigern sich noch mehr bis zum Zeitpunkt 4 Tage. Der Proliferationsindex der Gruppe 2 Tage Ao ($2,2 \pm 1,3 \%$) war signifikant ($p < 0,05$) niedriger gegenüber den Gruppen 2 Tage Ko ($7,5 \pm 3,9 \%$) und C1 ($6,5 \pm 1,8 \%$). Die höheren Werte in den Stentpräparaten machen die stärkere Verletzung des Gefäßes durch den Stent deutlich. Nach einer Dauer von 6 Wochen war der Proliferationsindex viel niedriger. Der Index der Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,3 \%$) zeigte signifikant höhere Werte im Vergleich zu der Ao-Gruppe ($0,6 \pm 0,2 \%$).

Der höhere Inflammation Score bei den Stentpräparaten im Vergleich zu den Aortenpräparaten zeigt die stärkere Reizung des Gefäßes nach PTA mit Stentimplantation. Der Stent stellt einen permanenten Fremdkörper dar, auf welchen das Gefäß mit Abwehrreaktionen und auch Entzündungsprozessen reagiert. Folge davon ist ein höherer Proliferationsindex und eine größere neointimale Fläche, die sich wiederum nachteilig auf den Stenosegrad auswirkt. Die histopathologische Auswertung lässt Unterschiede zwischen den Kurz- und Langzeitgruppen, wie auch zwischen den Aorten- und Stentgruppen erkennen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass der Entzündung eine bedeutende Rolle im zeitlichen Ablauf nach PTA und Stentimplantation zukommt. Unterschiede in der Pathophysiologie nach alleiniger PTA im Vergleich zu PTA und Stentimplantation sind vorhanden. Das Experiment lässt einen inhibitorischen Effekt des C1-Esteraseinhibitors auf die Entzündungsprozesse und die Neointimabildung mit nachfolgend geringerer Stenoserate erkennen. In diesem Kaninchenmodell wurde die Wichtigkeit der Entzündungshemmung in Bezug auf die Senkung der Restenoserate gezeigt. Es eignet sich für weiterführende Untersuchungen zur Wirksamkeit antiinflammatorischer Stentbeschichtungen als Prophylaxe der In-Stent Restenose.

6 Literaturverzeichnis

1. Keil U, Spelsberg A. Epidemiologie der Atheroskleroserisiken. In: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie und Prävention der Dyslipoproteinämien. Schwandt P, Richter WO, eds. 1995. Schattauer, Stuttgart, New York.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
3. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986;314:488-500.
4. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1819-1824.
5. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992;326:310-318.
6. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.
7. Karsch KR, Haase KK, Wehrmann M, Hassenstein S, Hanke H. Smooth muscle cell proliferation and restenosis after stand alone coronary excimer laser angioplasty [see comments]. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:991-994.
8. Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application. 1964 [classical article]. *Radiology*. 1989;172:904-920.
9. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*. 1990;85:1234-1241.
10. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Hoher M. [Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cell biological and molecular aspects]. *Z Kardiol*. 1995;84:5-21.
11. Leimgruber PP, Gruentzig AR. Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). *Z Kardiol*. 1985;74 Suppl 6:107-110.

12. Detre K, Holubkov R, Kelsey S, Cowley M, Kent K, Williams D, Myler R, Faxon D, Holmes D, Bourassa M, et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981. The National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *N Engl J Med*. 1988;318:265-270.
13. Kalinowski M, Tepe G, Schieber A, Bruck B, Claussen CD, Duda SH. [Intra-arterial application of the ACE inhibitor ramipril using a microperforated catheter for the prevention of neointimal proliferation after angioplasty in an animal model]. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr*. 1998;169:532-536.
14. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg*. 1994;81:1254-1269.
15. Ferrell M, Fuster V, Gold HK, Chesebro JH. A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis [editorial; comment]. *Circulation*. 1992;85:1630-1631.
16. Phillips HJ, Kandarpa K. Restenosis: pathophysiology and preventive strategies. *J Vasc Interv Radiol*. 1996;7:321-333.
17. Duda SH, Karsch KR, Haase KK, Huppert PE, Claussen CD. Laser ring catheters in excimer laser angioplasty. *Radiology*. 1990;175:269-270.
18. Hewes RC, White-RJ J, Murray RR, Kaufman SL, Chang R, Kadir S, Kinnison ML, Mitchell SE, Auster M. Long-term results of superficial femoral artery angioplasty. *AJR Am J Roentgenol*. 1986;146:1025-1029.
19. Johnston KW, Rae M, Steiner G, Kalman PG, Schwartz L, Hill ME, Walker PM. An atherosclerosis risk factor assessment program for patients with peripheral arterial occlusive disease. *Ann Vasc Surg*. 1988;2:101-107.
20. Leimgruber PP, Roubin GS, Hollman J, Cotsonis GA, Meier B, Douglas JS, King-SB J, Gruentzig AR. Restenosis after successful coronary angioplasty in patients with single-vessel disease. *Circulation*. 1986;73:710-717.
21. Mosley JG, Gulati SM, Raphael M, Marston A. The role of percutaneous transluminal angioplasty for atherosclerotic disease of the lower extremities. *Ann R Coll Surg Engl*. 1985;67:83-86.
22. Roubin GS, King SB, Douglas-JS J. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Emory University Hospital experience. *Am J Cardiol*. 1987;60:39B-43B.
23. Currier JW, Faxon DP. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target? [editorial]. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25:516-520.

24. Currier JW, Pow TK, Haudenschild CC, Minihan AC, Faxon DP. Low molecular weight heparin (enoxaparin) reduces restenosis after iliac angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:118B-125B.
25. Poon M, Badimon JJ, Fuster V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet.* 2002;359:619-622.
26. Dangas G, Fuster V. Management of restenosis after coronary intervention. *Am Heart J.* 1996;132:428-436.
27. Dotter CT. Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery. *Invest Radiol.* 1969;4:329-332.
28. Carrasco CH, Wallace S, Charnsangavej C, Richli W, Wright KC, Fanning T, Gianturco C. Expandable biliary endoprosthesis: an experimental study. *AJR Am J Roentgenol.* 1985;145:1279-1281.
29. Cragg A, Lund G, Rysavy J, Castaneda F, Castaneda ZW, Amplatz K. Nonsurgical placement of arterial endoprotheses: a new technique using nitinol wire. *Radiology.* 1983;147:261-263.
30. Palmaz JC, Sibbitt RR, Reuter SR, Tio FO, Rice WJ. Expandable intraluminal graft: a preliminary study. Work in progress. *Radiology.* 1985;156:73-77.
31. Palmaz JC, Sibbitt RR, Reuter SR, Garcia F, Tio FO. Expandable intrahepatic portacaval shunt stents: early experience in the dog. *AJR Am J Roentgenol.* 1985;145:821-825.
32. Rousseau H, Puel J, Joffre F, Sigwart U, Duboucher C, Imbert C, Knight C, Kropf L, Wallsten H. Self-expanding endovascular prosthesis: an experimental study. *Radiology.* 1987;164:709-714.
33. Strecker EP, Berg G, Weber H, Bohl M, Dietrich B. [Experimental research with a new percutaneously insertable and expandable vascular prosthesis]. *ROFO Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed.* 1987;147:669-672.
34. Garas SM, Huber P, Scott NA. Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. *Pharmacol Ther.* 2001;92:165-178.
35. 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.
36. Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:183-193.

37. Hanke H, Kamenz J, Hassenstein S, Oberhoff M, Haase KK, Baumbach A, Betz E, Karsch KR. Prolonged proliferative response of smooth muscle cells after experimental intravascular stenting. *Eur Heart J*. 1995;16:785-793.
38. Strecker EP, Liermann D, Barth KH, Wolf HR, Freudenberg N, Berg G, Westphal M, Tsikuras P, Savin M, Schneider B. Expandable tubular stents for treatment of arterial occlusive diseases: experimental and clinical results. Work in progress. *Radiology*. 1990;175:97-102.
39. Edelman ER, Rogers C. Pathobiologic responses to stenting. *Am J Cardiol*. 1998;81:4E-6E.
40. 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.
41. 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.
42. Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:77B-88B.
43. Nicolini FA, Pepine CJ. Biology of restenosis and therapeutic approach. *Surg Clin North Am*. 1992;72:919-940.
44. Wilensky RL, March KL, Gradus P, I, Sandusky G, Fineberg N, Hathaway DR. Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*. 1995;92:2995-3005.
45. Aggarwal RK, Ireland DC, Azrin MA, Ezekowitz MD, de Bono DP, Gershlick AH. Antithrombotic potential of polymer-coated stents eluting platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antibody. *Circulation*. 1996;94:3311-3317.
46. Badimon L, Alfon J, Royo T, Berrozpe M, Martinez GJ, Vidal F, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Cell biology of restenosis post-angioplasty. *Z Kardiol*. 1995;84 Suppl 4:145-149.
47. Arora RR, Konrad K, Badhwar K, Hollman J. Restenosis after transluminal coronary angioplasty: a risk factor analysis. *Cathet Cardiovasc Diagn*. 1990;19:17-22.

48. Kotamaki M, Laustiola K, Syvanne M, Heikkila J. Influence of continued smoking and some biological risk factors on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Intern Med.* 1996;240:293-301.
49. Maca T, Ahmadi R, Derfler K, Horl WH, Koppensteiner R, Minar E, Schneider B, Stumpflen A, Ehringer H. Elevated lipoprotein(a) and increased incidence of restenosis after femoropopliteal PTA. Rationale for the higher risk of recurrence in females? *Atherosclerosis.* 1996;127:27-34.
50. Miyata M, Biro S, Arima S, Hamasaki S, Kaieda H, Nakao S, Kawataki M, Nomoto K, Tanaka H. High serum concentration of lipoprotein(a) is a risk factor for restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty in Japanese patients with single-vessel disease. *Am Heart J.* 1996;132:269-273.
51. Bresee SJ, Jacobs AK, Garber GR, Ruocco-NA J, Mills RM, Bergelson BA, Ryan TJ, Faxon DP. Prior restenosis predicts restenosis after coronary angioplasty of a new significant narrowing. *Am J Cardiol.* 1991;68:1158-1162.
52. Ellis SG, Savage M, Fischman D, Baim DS, Leon M, Goldberg S, Hirshfeld JW, Cleman MW, Teirstein PS, Walker C, et al. Restenosis after placement of Palmaz-Schatz stents in native coronary arteries. Initial results of a multicenter experience. *Circulation.* 1992;86:1836-1844.
53. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators [see comments]. *N Engl J Med.* 1994;331:496-501.
54. Foley JB, Penn IM, Brown RI, Murray PN, White J, Galligan L, MacDonald C. Safety, success, and restenosis after elective coronary implantation of the Palmaz-Schatz stent in 100 patients at a single center. *Am Heart J.* 1993;125:686-694.
55. Ishibashi UH, Yutani C, Imakita M, Kuribayashi S, Takamiya M, Uchida H, Kichikawa K, Suzuki T. Histologic comparison of coronary and iliac atherectomy tissue from cases of in-stent restenosis. *Angiology.* 1999;50:977-987.
56. Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, Bertrand ME, Puel J, Rickards AF, Meier B, Goy JJ, Vogt P, Kappenberger L, et al. Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent [see comments]. *N Engl J Med.* 1991;324:13-17.

57. Shiran A, Mintz GS, Waksman R, Mehran R, Abizaid A, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Early lumen loss after treatment of in-stent restenosis: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1998;98:200-203.
58. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis [published erratum appears in *J Am Coll Cardiol* 1992 Jun;19(7):1678]. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:418-432.
59. 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.
60. Wissler RW, Vesselinovitch D. Differences between human and animal atherosclerosis. In: *Atherosclerosis III*. Schettler G, Weizel A, eds. 1974. Springer, Berlin.
61. McGill HC, Stern MP. Sex and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1979;Rev 4:157-242.
62. 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.
63. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation*. 1998;98:224-233.
64. Schwartz RS. Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling. *Am J Cardiol*. 1998;81:14E-17E.
65. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study [see comments]. *Circulation*. 1996;94:1247-1254.
66. 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.
67. Mudra H, Regar E, Klauss V, Werner F, Henneke KH, Sbarouni E, Theisen K. Serial follow-up after optimized ultrasound-guided deployment of Palmaz-Schatz stents. In-stent neointimal proliferation without significant reference segment response. *Circulation*. 1997;95:363-370.

68. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group [see comments]. *N Engl J Med*. 1994;331:489-495.
69. Prati F, Di Mario C, Moussa I, Reimers B, Mallus MT, Parma A, Liroy E, Colombo A. In-stent neointimal proliferation correlates with the amount of residual plaque burden outside the stent: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1999;99:1011-1014.
70. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King SB. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:467-474.
71. 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 [see comments]. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:267-274.
72. Cohen EA, Schwartz L. Coronary artery stenting: indications and cost implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996;39:83-110.
73. Radke PW, vom DJ, Klues HG. [Stent restenosis: therapy concepts and possibilities for prevention]. *Med Klin*. 1999;94:88-92.
74. Degertekin M, Regar E, Tanabe K, Lee CH, Serruys PW. Sirolimus eluting stent in the treatment of atherosclerosis coronary artery disease. *Minerva Cardioangiol*. 2002;50:405-418.
75. Hiatt BL, Carter AJ, Yeung AC. The drug-eluting stent: is it the Holy Grail? *Rev Cardiovasc Med*. 2001;2:190-196.
76. 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.
77. Tomai F, Ghini AS, Ferri C, Desideri G, Versaci F, Gaspardone A, Altamura L, Magliano G, Crea F, Chiariello L. Effects of carbon-coated coronary stents on the markers of inflammation, thrombin generation and platelet and endothelial activation. *Ital Heart J*. 2003;4:23-28.
78. Hehrlein C, Arab A, Bode C. Drug-eluting stent: the "magic bullet" for prevention of restenosis? *Basic Res Cardiol*. 2002;97:417-423.
79. Duda SH, Poerner TC, Wiesinger B, Rundback JH, Tepe G, Wiskirchen J, Haase KK. Drug-eluting stents: potential applications for peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol*. 2003;14:291-301.

80. Garza L, Aude YW, Saucedo JF. Can we prevent in-stent restenosis? *Curr Opin Cardiol.* 2002;17:518-525.
81. Edelman ER, Rogers C. Stent-versus-stent equivalency trials : are some stents more equal than others? [editorial]. *Circulation.* 1999;100:896-898.
82. Cragg AH, De Jong SC, Barnhart WH, Landas SK, Smith TP. Nitinol intravascular stent: results of preclinical evaluation. *Radiology.* 1993;189:775-778.
83. Ozaki Y, Violaris AG, Serruys PW. New stent technologies. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996;39:129-140.
84. Foo RS, Gershlick AH, Hogrefe K, Baron JH, Johnston TW, Hussey AJ, Garner I, de Bono DP. Inhibition of platelet thrombosis using an activated protein C-loaded stent: in vitro and in vivo results. *Thromb Haemost.* 2000;83:496-502.
85. Tepe G, Duda SH, Hanke H, Schulze S, Hagmeier S, Bruck B, Schott U, Betz E, Schmahl FW, Claussen CD. Covered stents for prevention of restenosis. Experimental and clinical results with different stent designs. *Invest Radiol.* 1996;31:223-229.
86. 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 [see comments]. *N Engl J Med.* 1997;336:1697-1703.
87. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Palmer SJ, Wang C, Cipolla GD, King SB, III. Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries. *Circulation.* 1995;92:1383-1386.
88. Adelman AG, Cohen EA, Kimball BP, Bonan R, Ricci DR, Webb JG, Laramie L, Barbeau G, Traboulsi M, Corbett BN, et al. A comparison of directional atherectomy with balloon angioplasty for lesions of the left anterior descending coronary artery [see comments]. *N Engl J Med.* 1993;329:228-233.
89. Ahn SS, Concepcion B. Current status of atherectomy for peripheral arterial occlusive disease. *World J Surg.* 1996;20:635-643.
90. Baumbach A, Wachter C, Haase KK, Hanke H, Voelker W, Mauser M, Ickrath O, Karsch KR. [Acute and long-term results of coronary Excimer laser angioplasty]. *Z Kardiol.* 1992;81:656-663.
91. Buchwald AB, Werner GS, Unterberg C, Voth E, Kreuzer H, Wiegand V. Restenosis after excimer laser angioplasty of coronary stenoses and chronic total occlusions. *Am Heart J.* 1992;123:878-885.

92. Duda SH, Huppert PE, Arndt V, Wehrmann M, Haase KK, Claussen CD. In vitro and clinical feasibility study with an over-the-wire delivery system for pulsed dye laser angioplasty. *J Vasc Interv Radiol*. 1992;3:59-65.
93. Henry M, Amor M, Ethevenot G, Henry I, Allaoui M. Percutaneous peripheral atherectomy using the rotablator: a single-center experience [see comments]. *J Endovasc Surg*. 1995;2:51-66.
94. 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.
95. Rogers C, Welt FG, Karnovsky MJ, Edelman ER. Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1312-1318.
96. Grube E, Gerckens U, Muller R, Bullesfeld L. Drug eluting stents: initial experiences. *Z Kardiol*. 2002;91 Suppl 3:44-48.
97. Sheiban I, Carrieri L, Catuzzo B, Destefanis P, Oliaro E, Moretti C, Trevi GP. Drug-eluting stent: the emerging technique for the prevention of restenosis. *Minerva Cardioangiol*. 2002;50:443-453.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1366-1380.
102. 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.

103. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, Lee CW, Choi D, Jang Y, Lam R, Weissman NJ, Mintz GS. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med*. 2003;348:1537-1545.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. Califf RM. Restenosis: the cost to society. *Am Heart J*. 1995;130:680-684.
108. Lepor NE, Madyoon H, Kereiakes D. Effective and efficient strategies for coronary revascularization in the drug-eluting stent era. *Rev Cardiovasc Med*. 2002;3 Suppl 5:S38-S50.
109. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation*. 1995;91:2995-3001.
110. 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.
111. Fuhrer G, Gallimore MJ, Heller W, Hoffmeister HE. FXII. *Blut*. 1990;61:258-266.
112. Baumgartner HR, Studer A. [Effects of vascular catheterization in normo- and hypercholesteremic rabbits]. *Pathol Microbiol Basel*. 1966;29:393-405.
113. Marshall M. Tiermodelle zur Arterioskleroseforschung. In: Die Anwendung aktueller Methoden in der Arteriosklerose-Forschung. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Blaubeuren, 17.-19. März 1998. Betz E, ed. 1989. Selbstverlag Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V., Tübingen.
114. Wissler RW, Vesselinovitch D. Experimental models of human atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1968;149:907-922.

115. Moffitt EA. Blood substitutes. *Can Anaest Soc J.* 1975;22:12-19.
116. 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.
117. Martinez-Oharriz MC, Rodriguez-Espinosa C, Martin C, Goni MM, Troslarduya MC, Sanchez M. Solid dispersions of diflunisal-PVP: polymorphic and amorphous states of the drug. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28:717-725.
118. 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.
119. Kaneda Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Kamada H, Yamamoto Y, Kodaira.H., Tsunoda S, Okamoto, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials.* 2004;26:3259-3266.
120. Francois P, Vaudaux P, Nurdin N, Mathieu HJ, Descouts P, Lew DP. Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. *Biomaterials.* 1996;17:667-678.
121. Seabra AB, De Oliveira MG. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release. *Biomaterials.* 2004;25:3773-3782.
122. Holland MC, Morikis D, Lambris JD. Synthetic small-molecule complement inhibitors. *Current Opinion in Investigational Drugs.* 2004;5:1164-1173.
123. Horstick G, Kempf T, Lauterbach M, Bhakdi S, Kopacz L, Heimann A, Malzahn M, Horstick M, Meyer J, Kempinski O. C1-esterase-inhibitor treatment at early reperfusion of hemorrhagic shock reduces mesentery leukocyte adhesion and rolling. *Microcirculation.* 2001;8:427-433.
124. Strohschneider, T., Haemmerle, H., and 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.* 412, 56. 1988. Ref Type: Abstract
125. Donath, K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik. Exakt-Kulzer Druckschrift, Norderstedt . 1989. Ref Type: Journal (Full)
126. Ternynck T, Avrameas S. Avidin-biotin system in enzyme immunoassays. *Methods Enzymol.* 1990;184:469-481.

127. 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.
128. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* 1979;27:1131-1139.
129. 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.
130. 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.
131. Sary 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.
132. Sary HC. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 2:28-35.
133. 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.
134. Grube E, Gerckens U, Muller R, Bullesfeld L. Drug eluting stents: initial experiences. *Z Kardiol.* 2002;91 Suppl 3:44-48.
135. 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.
136. Anitschkow N. Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat.* 1913;56:379-404.
137. 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.
138. Haarbo J. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: the rabbit model. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103 (Suppl 13):49-52.
139. Adams MR, Register TC, Geary RL, Wagner JD, Williams JK. Animal models of atherosclerosis. *Estr Vessel Wall.* 1998;3:187-200.

140. Malinow MR. Atherosclerosis. Regression in nonhuman primates. *Circ Res.* 1980;46:311-320.
141. Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause: Workshop report. *Menopause J NAMS.* 2000;7:14-24.
142. Hanke H, Karsch KR. Rolle der Proliferation glatter Muskelzellen nach Ballonangioplastie. *Herz.* 1992;17:300-308.
143. Hanke H, Hassenstein S, Ulmer A, Kamenz J, Oberhoff M, Haase KK, Baumbach A, Gown AM, Karsch KR. Accumulation of macrophages in the arterial vessel wall following experimental balloon angioplasty. *Eur Heart J.* 1994;15:691-698.
144. 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.
145. 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.
146. Sary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1177-1178.
147. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Renne 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.
148. Hanke S, Hanke H, Oberhoff M, Haase KK, Hassenstein S, Betz E, Karsch KR. [Transluminal excimer laser angioplasty of experimentally-induced atheromatous plaque: morphologic changes and importance of proliferation of smooth muscle cells]. *Z Kardiol.* 1991;80:404-411.
149. Baumbach A, Oberhoff M, Bohnet A, Miljak T, Herdeg C, Horch B, Blessing E, Kunert W, Haase KK, Karsch KR. Efficacy of low-molecular-weight heparin delivery with the Dispatch catheter following balloon angioplasty in the rabbit iliac artery. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1997;41:303-307.
150. Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Haase KK, Horch B, Kranzhoefer A, Karsch KR. Local drug delivery with porous balloons in the rabbit: assessment of vascular injury for an improvement of application parameters. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1997;41:308-314.

151. 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.
152. 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.
153. Robinson KA, Roubin GS, Siegel RJ, Black AJ, Apkarian RP, King SB. Intra-arterial stenting in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*. 1988;78:646-653.
154. Rubin P, Williams JP, Schell MC, Okunieff P. Radiation inhibition of arterial restenosis -- a new frontier. *Acta Oncol*. 1999;38:407-424.
155. Tepe G, Duda SH, Hagmeier S, Brehme U, Kalinowski M, Bruck B, Schmahl FW, Claussen CD. [Plaque morphology after arterial interventions in the New Zealand white rabbit--which model of restenosis is most suitable?]. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr*. 1998;168:84-89.
156. More RS, Ruddy G, Underwood MJ, Brack MJ, Gershlick AH. A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. *J Pathol*. 1994;172:287-292.
157. Tominaga R, Harasaki H, Sutton C, Emoto H, Kambic H, Hollman J. Effects of stent design and serum cholesterol level on the restenosis rate in atherosclerotic rabbits. *Am Heart J*. 1993;126:1049-1058.
158. Unverdorben M, Sippel B, Degenhardt R, Sattler K, Fries R, Abt B, Wagner E, Koehler H, Daemgen G, Scholz M, Ibrahim H, Tews KH, Hennen B, Berthold HK, Vallbracht C. Comparison of a silicon carbide-coated stent versus a noncoated stent in human beings: the Tenax versus Nir Stent Study's long-term outcome. *Am Heart J*. 2003;145:e17.
159. Rogers CD. Drug-eluting stents: role of stent design, delivery vehicle, and drug selection. *Rev Cardiovasc Med*. 2002;3 Suppl 5:S10-S15.
160. Grube E, Gerckens U, Buellesfeld L. Drug-eluting stents: clinical experiences and perspectives. *Minerva Cardioangiol*. 2002;50:469-473.
161. Guagliumi G, Musumeci G, Vassileva A, Tespili M, Valsecchi O. Through the drug-eluting stent labyrinth. *Ital Heart J*. 2003;4:236-245.

162. Karsch KR, Preisack MB, Baildon R, Eschenfelder V, Foley D, Garcia EJ, Kaltenbach M, Meisner C, Selbmann HK, Serruys PW, Shiu MF, Sujatta M, Bonan R. Low molecular weight heparin (reviparin) in percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of a randomized, double-blind, unfractionated heparin and placebo-controlled, multicenter trial (REDUCE trial). Reduction of Restenosis After PTCA, Early Administration of Reviparin in a Double-Blind Unfractionated Heparin and Placebo-Controlled Evaluation. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1437-1443.
163. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. The EPILOG Investigators. *N Engl J Med.* 1997;336:1689-1696.
164. Serruys PW, Degertekin M, Tanabe K, Abizaid A, Sousa JE, Colombo A, Guagliumi G, Wijns W, Lindeboom WK, Ligthart J, de Feyter PJ, Morice MC. Intravascular ultrasound findings in the multicenter, randomized, double-blind RAVEL (RAndomized study with the sirolimus-eluting VELOCITY balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery Lesions) trial. *Circulation.* 2002;106:798-803.
165. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet.* 2003;361:247-249.
166. Albiero R, Adamian M, Kobayashi N, Amato A, Vagheti 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.
167. 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.
168. Hafeez N. Prevention of coronary restenosis with radiation therapy: a review [In Process Citation]. *Clin Cardiol.* 2002;25:313-322.
169. Hehrlein C. [Radioactive stents: problems and potential solutions]. *Herz.* 2002;27:17-22.
170. 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.
171. Serruys PW, Kay IP. I like the candy, I hate the wrapper: the (32)P radioactive stent. *Circulation.* 2000;101:3-7.

172. Tepe G, Wendel HP, Khorchidi S, Schmehl J, Wiskirchen J, Pusich B, Claussen CD, Duda SH. Thrombogenicity of various endovascular stent types: an in vitro evaluation. *J Vasc Interv Radiol*. 2002;13:1029-1035.
173. Colombo A, Karvouni E. Biodegradable stents : "fulfilling the mission and stepping away". *Circulation*. 2000;102:371-373.
174. Tsuji T, Tamai H, Igaki K, Kyo E, Kosuga K, Hata T, Nakamura T, Fujita S, Takeda S, Motohara S, Uehata H. Biodegradable stents as a platform to drug loading. *Int J Cardiovasc Intervent*. 2003;5:13-16.
175. Murphy JG, Schwartz RS, Huber KC, Holmes D-RJ. Polymeric stents: modern alchemy or the future? *J Invasive Cardiol*. 1991;3:144-148.
176. Murphy JG, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes D-RJ. Percutaneous polymeric stents in porcine coronary arteries. Initial experience with polyethylene terephthalate stents. *Circulation*. 1992;86:1596-1604.
177. 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.
178. 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.
179. Muller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:321-347.
180. Lambris JD, Reid KB, Volanakis JE. The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Immunol Today*. 1999;20:207-211.
181. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1140-1144.
182. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1058-1066.
183. 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.
184. 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.

185. 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.
186. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today.* 1991;12:322-326.
187. 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.
188. 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.
189. 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.
190. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Van Langenhove G, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001;104:2007-2011.
191. Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:10134-10139.
192. Waksman R. Late thrombosis after radiation. Sitting on a time bomb. *Circulation.* 1999;100:780-782.
193. 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.

7 Anhang

Tier-Nr.	Cholesterin bei OP (mg/dl)	Cholesterin bei Versuchs-ende(mg/dl)	Plauefläche (µm²)	Mediafläche (mm²)	Stenosegrad (%)	Zelldichte (Zellen/mm²)	Proliferationsindex (%)
2 Tage Ko							
441	872	864	35	0,85	0,63	11000	4,6
442	568	872	59	0,93	1,00	7750	6,5
443	952	1344	16	0,86	0,41	13250	3,8
444	1412	1551	29	1,31	0,58	6625	13,2
445	1068	258	49	1,22	0,85	6764	9,6
446	1004	573	18	0,83	0,44		
Mittelwert	979,3	910,3	34,3	1,00	0,65	9077,8	7,54
Standabw.	274,6	477,8	17,1	0,21	0,23	2925,5	3,87
Min.	568,0	258,0	16,0	0,83	0,41	6625,0	3,80
Max.	1412,0	1551,0	59,0	1,31	1,00	13250,0	13,20
Median	978,0	868,0	32,0	0,90	0,61	7750,0	6,50
2 Tage C1							
447	1368	1176	41	0,87	0,89	5000	5,2
448	771	756	10	0,81	0,35	5000	5,7
449	1143	1167	0	0,75	0,00		
450	1335	1173	48	0,77	0,95	5917	8,5
451	1023	996	10	1,02	0,20		
452							
Mittelwert	1128,0	1053,6	21,8	0,84	0,48	5305,7	6,47
Standabw.	244,5	183,0	21,3	0,11	0,42	529,4	1,78
Min.	771,0	756,0	0,0	0,75	0,00	5000,0	5,20
Max.	1368,0	1176,0	48,0	1,02	0,95	5917,0	8,50
Median	1143,0	1167,0	10,0	0,81	0,35	5000,0	5,70
4 Tage Ko							
433	628	720	10	0,90	0,18	6778	6,6
434	1376	840	10	0,82	0,11	8600	9,3
435	536	626	109	0,95	2,79	1800	59,3
436	1448	940	8	0,94	0,19	9833	11,9
437	804	922	10	1,17	0,15	5000	6,7
438	1356	1016	97	1,06	1,45	5500	12,1
439	1092	760	76	1,07	1,28	2200	18,2
440	1044	901	136	0,90	2,22	8000	18,8
Mittelwert	1035,5	840,6	57,0	0,98	1,05	5963,9	17,86
Standabw.	350,8	129,8	53,4	0,11	1,06	2912,5	17,37
Min.	536,0	626,0	8,0	0,82	0,11	1800,0	6,60
Max.	1448,0	1016,0	136,0	1,17	2,79	9833,0	59,30
Median	1068,0	870,5	43,0	0,95	0,74	6139,0	12,00
4 Tage C1							
425	1060	824	10	1,06	0,23	4000	12,5
426	988	744	26	0,94	0,96	3833	13,0
427	752	686	142	0,91	2,62	5489	23,6
428	292	306	66	0,70	0,95	3303	13,8
429	796	505	40	0,83	0,94	5417	27,7
430	488	322	35	0,80	0,83	4085	3,6
431	1480	1020	68	1,16	1,02	4000	3,3
432	1236	840	10	1,03	0,25	4444	10,0
Mittelwert	886,5	655,9	49,6	0,93	0,98	4321,4	13,44
Standabw.	387,9	256,4	43,3	0,15	0,74	766,9	8,61
Min.	292,0	306,0	10,0	0,70	0,23	3303,0	3,30
Max.	1480,0	1020,0	142,0	1,16	2,62	5489,0	27,70
Median	892,0	715,0	37,5	0,93	0,95	4042,5	12,75

Tier-Nr.	Cholesterin bei OP (mg/dl)	Cholesterin bei Versuchs-ende(mg/dl)	Plauefläche (µm ²)	Mediafläche (mm ²)	Stenosegrad (%)	Zelldichte (Zellen/mm ²)	Proliferationsindex (%)
6 Wo Ko							
409	292	277	1141	0,67	22,23	3733	1,2
410							
411	488	231	2747	0,72	37,19	5098	0,7
412	1000	220	1231	0,84	18,23	4983	0,9
413	552	58	1194	0,43	18,34	7916	1,1
414	932	301	1591	0,99	20,37	6754	1,5
415	460	53	992	0,87	17,96	7278	1
416	944	96	1690	0,74	22,31	5733	0,6
Mittelwert	666,9	176,6	1512,3	0,75	22,38	5927,9	1,00
Standabw.	284,8	105,1	598,8	0,18	6,79	1466,0	0,31
Min.	292,0	53,0	992,0	0,43	17,96	3733,0	0,60
Max.	1000,0	301,0	2747,0	0,99	37,19	7916,0	1,50
Median	552,0	220,0	1231,0	0,74	20,37	5733,0	1,00
6 Wo C1							
417	2308	74	1929	1,13	16,67	3504	0,9
418	964	58	1521	0,57	20,30	4367	0,2
419	1432	64	1118	0,95	14,62	3233	0,9
420	680	104	1188	0,66	17,27	3330	1
421	1160	175	773	0,84	14,30	5310	0,8
422	1732	98	1424	0,84	18,36	3855	0,4
423	636	135	1039	0,97	13,40	4005	0,1
424	2220	156	1871	1,38	17,07	1679	0,9
Mittelwert	1391,5	108,0	1357,9	0,92	16,50	3660,4	0,65
Standabw.	650,0	43,5	405,4	0,26	2,29	1043,3	0,36
Min.	636,0	58,0	773,0	0,57	13,40	1679,0	0,10
Max.	2308,0	175,0	1929,0	1,38	20,30	5310,0	1,00
Median	1296,0	101,0	1306,0	0,90	16,87	3679,5	0,85

Tier-Nr.	Verhältnis Plaue/Media Strebe	Verhältnis Plaue/Media Übergang	Verhältnis Plaue/Media Aorta
6 Wo Ko			
409	3,050	2,270	2,520
410			
411	3,510	1,920	1,040
412	3,320	1,900	1,340
413	4,350	1,770	1,180
414	3,500	1,670	1,490
415	3,540	1,790	2,100
416	2,660	1,740	1,790
Mittelwert	3,419	1,866	1,637
Standabw.	0,519	0,199	0,531
Min.	2,660	1,670	1,040
Max.	4,350	2,270	2,520
Median	3,500	1,790	1,490
6 Wo C1			
417	2,820	1,680	1,070
418	3,550	0,770	0,920
419	2,990	1,140	0,730
420	3,380	1,130	0,700
421	3,430	1,910	1,020
422	2,440	1,170	0,770
423	3,270	1,820	1,150
424	2,120	1,770	1,190
Mittelwert	3,000	1,424	0,944
Standabw.	0,511	0,420	0,193
Min.	2,120	0,770	0,700
Max.	3,550	1,910	1,190
Median	3,130	1,425	0,970

Tier-Nr.	Cholesterin bei OP (mg/dl)	Cholesterin bei Versuchs-ende(mg/dl)	Plaueffläche (µm²)	Mediafläche (mm²)	Stenosegrad (%)	Zellidichte (Zellen/mm²)	Proliferations-index (%)
2 Tage Ao							
441	872	864	11	1,26	0,96	12091	1,5
442	568	872	10	1,16	1,64	16000	2,1
443	952	1344	10	1,17	1,61	13500	1,9
444	1412	1551	0	1,03	0,00		
445	1068	258	10	0,96	1,63	15000	4,4
446	1004	573	0	0,80	0,00		
447	1368	1176	10	1,23	0,88	11833	2,8
448	771	756	0	0,86	0,00		
449	1143	1167	10	1,01	0,48		
450	1335	1173	10	0,70	2,85	6368	0,4
451	1023	996	0	0,96	0,00		
452							
Mittelwert	1046,9	975,5	6,5	1,01	0,91	12465,3	2,18
Standabw.	260,1	364,9	5,1	0,18	0,94	3397,2	1,34
Min.	568,0	258,0	0,0	0,70	0,00	6368,0	0,40
Max.	1412,0	1551,0	11,0	1,26	2,85	16000,0	4,40
Median	1023,0	996,0	10,0	1,01	0,88	12795,5	2,00
4 Tage Ao							
425	1060	824	10	0,85	0,47	6000	14,6
426	988	744	165	0,74	14,49	5735	18,0
427	752	686	140	0,96	6,76	6538	20,0
428	292	306	10	0,83	1,05	3800	15,8
429	796	505	10	1,12	0,53	4500	8,3
430	488	322	115	0,91	6,49	6083	12,3
431	1480	1020	159	1,03	7,38	5741	8,4
432	1236	840	10	0,84	1,34	5000	5,0
433	628	720	13	0,78	1,75	7538	2,0
434	1376	840	10	0,85	2,62	5556	6,0
435	536	626	10	0,99	2,40	7450	4,0
436	1448	940	159	0,95	11,33	4593	3,8
437	804	922	13	1,04	0,97	5692	10,1
438	1356	1016	11	1,32	1,65	7182	7,0
439	1092	760	110	1,17	9,40	5275	7,1
440	1044	901	81	0,83	9,59	5684	4,6
Mittelwert	961,0	748,3	64,1	0,95	4,89	5772,9	9,19
Standabw.	365,5	218,3	65,6	0,16	4,48	1047,6	5,45
Min.	292,0	306,0	10,0	0,74	0,47	3800,0	2,00
Max.	1480,0	1020,0	165,0	1,32	14,49	7538,0	20,00
Median	1016,0	792,0	13,0	0,93	2,51	5713,5	7,70
6 Wo Ao							
409	292	277	1457	0,94	40,47	6219	0,7
410							
411	488	231	1194	1,06	48,95	4768	0,4
412	1000	220	948	0,80	30,63	5788	0,3
413	552	58	924	0,57	30,00	4897	0,5
414	932	301	1561	0,93	37,03	6888	0,7
415	460	53	1394	0,86	30,28	3238	0,5
416	944	96	996	0,92	32,22	3560	0,7
417	2308	74	941	1,14	22,18	5590	0,6
418	964	58	1212	1,37	40,11	4934	0,6
419	1432	64	534	0,95	33,00	5365	0,9
420	680	104	727	0,91	41,18	3707	0,5
421	1160	175	823	0,92	36,52	4144	1,1
422	1732	98	1125	1,23	40,73	3906	0,4
423	636	135	438	1,21	22,03	6491	0,3
424	2220	156	1259	1,14	42,25	3733	0,8
Mittelwert	1053,3	140,0	1035,5	1,00	35,17	4881,9	0,60
Standabw.	621,3	83,2	324,7	0,20	7,52	1153,3	0,22
Min.	292,0	53,0	438,0	0,57	22,03	3238,0	0,30
Max.	2308,0	301,0	1561,0	1,37	48,95	6888,0	1,10
Median	944,0	104,0	996,0	0,94	36,52	4897,0	0,60

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn PD Dr. med. G. Tepe, Abteilung für Radiologische Diagnostik, für die Überlassung des Themas und den vielen lehrreichen Stunden bei der experimentellen Durchführung sowie die immer nette und unkomplizierte Zusammenarbeit danken.

Für die Beschichtung der Stents danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. P. Wendel, Institut für Thorax-, Herz-, und Gefäßchirurgie.

Bei Herrn Dr. med. J. Janzen, Institut für Pathologie, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der histopathologischen Auswertung der Präparate, seinem Engagement und die vielen Anregungen für die Diskussion.

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

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Brehme, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, deren kompetenter Rat mir zu jeder Zeit und in allen Situationen eine große Hilfe war.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. F.W. Schmahl, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, an dessen Institut Teile der experimentellen Arbeit durchgeführt wurden.

Für die Beratung zu allen Fragen der Statistik bedanke ich mich bei Herrn Mag. G. Blumenstock (MPH) vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Arbeits- und Sozialmedizin gilt mein Dank für die kooperative Zusammenarbeit, besonders für die Hilfe bei den immunhistologischen Färbungen Frau A. Glückman, Frau M. Holz, Frau G. Kaletta und Frau J. Schatz.

Frau Bachmann und Mitarbeiterinnen vom Schnellschnittlabor des Instituts für Pathologie, danke ich für die entgegenkommende und tatkräftige Unterstützung bei den HE- und EvG-Färbungen.

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

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Silke Koppenstein
Geburtsdatum/-ort: 28.02.1975 in Nürtingen
Anschrift: Traunreuter Straße 20
81549 München
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981 - 1985 Grundschule, Altenriet
1985 - 1994 Gymnasium, Neckartenzlingen
mit Abschluss Abitur

Hochschulbildung:

Okt. 1994 Studium der Humanmedizin
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
Aug. 1997 Physikum
März 2000 1. Staatsexamen
März 2002 2. Staatsexamen
28. Mai 2003 3. Staatsexamen

Berufserfahrung:

Famulaturen:

Feb. 1998 Gynäkologie und Geburtshilfe
Kreiskrankenhaus Nürtingen
März - April 1998 Chirurgie
Universitätsklinik Innsbruck/ Österreich
Aug. 1998 Radiologie
Praxis für Radiologie und Nuklearmedizin, Metzingen
Feb. - März 1999 Innere Medizin/ Alkohol- und Drogenservice
University of Queensland, Brisbane/ Australien
Sept. 1999 Notfallmedizin, Intensivmedizin, Hyperbare Medizin
Centre Hôpitalier Sud Réunion, Ile la Réunion/ Frankreich
April 2000 Anaesthesie, Intensiv- und Notfallmedizin (Luftrettung)
Klinikum Ingolstadt

Praktisches Jahr:

Mai - Aug. 2002 Anaesthesie
Kantonsspital Baden/ Schweiz
Sept. - Dez. 2002 Innere Medizin
Städtische Kliniken Esslingen a.N.
Dez. 2002 - Jan. 2003 Chirurgie
St. Josephs Health Centre, Toronto/ Canada
Feb. - März 2003 Chirurgie/ Notfallmedizin
Pretoria Academic Hospital, Pretoria/ Südafrika

AiP/ Assistenzzeit:

- Jan. 2004 - Nov.2005 Anaesthesie
Klinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin, Universität Tübingen
- Dez.2005 – dato Anaesthesie
Klinik für Anaesthesie und Intensivmedizin, Städtisches
Klinikum München GmbH, Krankenhaus Harlaching

Fort-/ Weiterbildungen:

- Jan. 2004 - Nov. 2005 regelmäßige ärztliche Fortbildungen der
Landesärztekammer Baden-Württemberg (Seminar
Interdisziplinäre Intensivmedizin, Anaesthesiologisches
Kolloquium, Morbidity and Mortality Konferenz), Klinik für
Anaesthesie und Intensivmedizin, Universität Tübingen
- März 2005 Kompaktseminar Notfallmedizin zum Erwerb der
Zusatzbezeichnung Notfallmedizin/ Fachkunde
Rettungsdienst und Zertifikat Reanimationsstandard,
Akademie für Wissenschaft, Wirtschaft und Technik an der
Universität Ulm e.V., Seminarleitung Dr. rer. nat. Dr. med.
B.Dirks, Sektion Notfallmedizin, Abteilung für
Anaesthesiologie, Universität Ulm
- Dez. 2005 bis dato regelmäßige ärztliche Fortbildungen der
Landesärztekammer Bayern

Promotionsarbeit:

„Antiinflammatorische Stentbeschichtung mit einem C1-
Esteraseinhibitor zur Restenoseprophylaxe beim Weißen
Neuseelandkaninchen“
Interventionelle Radiologie, Universität Tübingen

Nebentätigkeiten:

- Feb. 1995 - Sept. 1996 Nachtwache, Universität Tübingen
Pädiatrie
- Okt. 1996 - Dez. 1998 Nachtwache, Universität Tübingen
Innere Medizin
- Okt. 2000 - Sept. 2001 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft
Radiologische Diagnostik, Universität Tübingen
- März 1996 - Dez. 2004 Fachkraft in Teilzeit
Deutsche Lufthansa AG, Flughafen Stuttgart
- Nov. 2003 – Dez. 2004 Mitarbeiterin im „Special Assistance Team“ der Deutschen
Lufthansa AG (Team für Katastropheneinsätze)

Sonstige Kenntnisse:

Fremdsprachen	Englisch und Französisch fließend in Wort und Schrift English in Medicine Grundkenntnisse in Spanisch
EDV	Word, Excel, Access, PowerPoint Jump Unisys und Guide

Hobbys:

Musik - Akkordeon, Keyboard, Klarinette, Saxophon
Sport - Skifahren, Snowboarden, Tauchen, Radfahren

