

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie

**Stentbeschichtung mit Shikonin zur Restenoseprophylaxe nach
Angioplastie in der infrarenalen Aorta abdominalis beim weißen
Neuseelandkaninchen-Modell**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Müller-Mahdavi, geb. Mahdavi-Sabet, Pegah

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Wiesinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Beckert

Tag der Disputation: 01.09.2017

Meinen Eltern und meinem Ehemann Manuel gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	7
Legende	8
I Einleitung.....	10
1.1 Entstehung einer Atherosklerose und Epidemiologie.....	10
1.2 Atherosklerose	10
1.2.1 Atherosklerose bedingte Krankheitsbilder.....	11
1.3 Therapiemöglichkeiten	13
1.3.1 PTA.....	14
1.3.2. Stentimplantation	15
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	21
II Material und Methoden.....	22
2.1 Tiermodell	22
2.1.1 Versuchstiere	22
2.1.2 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau	22
2.2 Materialien	24
2.2.1 Katheter	24
2.2.2 Stents.....	24
2.2.3 Vorgang der Substanzbeschichtung	24
2.3 Methoden	25
2.3.1 Präoperative Phase	25
2.3.2 Operative Phase – Die Stentimplantation	25
2.3.3 Postoperative Phase.....	29

Inhaltsverzeichnis

2.4 Entnahme und Histologie-Aufarbeitung der Gefäßpräparate	29
2.4.1 Vorbereitung zur Gefäßentnahme.....	29
2.4.2 Gefäßentnahme und Fixierung	30
2.4.3 Präparation der gestenteten Aorta abdominalis.....	30
2.4.4 Einbettung in Paraffin und Schneiden.....	31
2.4.5 Einbettung in Methamethylacrylat und Querschnitttherstellung	33
2.5 Histologische Färbungen	34
2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	34
2.5.2 Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG-Färbung)	35
2.6 Immunhistochemische Färbungen	36
2.6.1 Endothel-Färbung	38
2.6.2 RAM-11-Färbung (Rabbit-anti-macrophages).....	38
2.6.3 PCNA-Färbung (proliferating cell nuclear antigen).....	39
2.6.4 DAPI-Färbung (4,6-Diamidinophenylindol)	41
2.6.5 Kollagen Typ I und Typ III Färbung.....	41
2.7 Auswertung	42
2.7.1 Verwendete Geräte für die Auswertung der Gefäßpräparate.....	42
2.7.2 Morphometrische Auswertung	43
2.7.3. Histopathologische Beurteilung der Aorten- und Stentsegmente.....	46
2.7.4 Messwertdefinitionen	53
2.8 Statistische Auswertung.....	54
III Ergebnisse	55
3.1 Morphometrische Parameter und Histopathologie	55
3.1.1 Neointimafläche	56

Inhaltsverzeichnis

3.1.2 Mediafläche	60
3.1.3 Gefäßwandverletzung.....	62
3.1.4 Entzündungsreaktion in der Gefäßwand.....	64
3.2 Immunhistochemische Parameter.....	65
3.2.1 Endothel.....	66
3.2.2 Proliferationsindex	71
3.2.3 Makrophagenverteilung	86
3.2.4 Nachweis von Kollagen Typ I und Typ III.....	90
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	92
IV Diskussion.....	94
4.1 Zielsetzung der Arbeit	94
4.2 Tiermodell	94
4.3 Gruppeneinteilung und Auswertungsstrategie	96
4.4 Problem und Prävention einer Restenosierung.....	97
4.5 Wahl des Stents und der Beschichtung	100
4.6 Ausmaß der Gefäßwandreaktion auf die unterschiedlichen Beschichtungen	102
4.6.1 Fläche der Neointima und Media	102
4.6.2 Proliferationsindex	103
4.6.3 Entzündungsreaktion in der Gefäßwand.....	104
4.6.4 Makrophagenverteilung	105
4.6.5 Gefäßwandverletzung.....	106
4.7. Unterschiede der Gefäßbeschaffenheit nach Implantation der Stents .	106
4.7.1 Endothel.....	106
4.7.2 Kollagen Typ I und Typ III	107

4.8 Schlussfolgerungen aus der Arbeit	108
V Zusammenfassung	111
VI Literatur.....	113
VII Erklärung zum Eigenanteil	124
VIII Anhang.....	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Shikonin.	19
Abbildung 2: Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung	23
Abbildung 3: Stentimplantation unter Durchleuchtung.....	27
Abbildung 4: Stentimplantation unter Durchleuchtung, entfalteter Stent	28
Abbildung 5: Schema der histologischen Aufarbeitung.	31
Abbildung 6: Schnittstellen in schematischer Darstellung	32
Abbildung 7: EvG-Färbung. Tiernummer 7 aus der Rapamycingruppe.....	36
Abbildung 8: Angefertigte Querschnitte.....	44
Abbildung 9: EvG-Färbung. Vorbereitung für die Flächenberechnung	45
Abbildung 10: Flächenberechnung.....	45
Abbildung 11: Beispiel einer RAM-Färbung zur Makrophagenbestimmung.	48
Abbildung 12: RAM-Färbung in 10-facher Vergrößerung	49
Abbildung 13: RAM-Färbung in 10-facher Vergrößerung	49
Abbildung 14: Kollagen Typ I Färbung.	51
Abbildung 15: Kollagen Typ III Färbung	51
Abbildung 16: Neointimafläche in der Stentmitte.....	57
Abbildung 17: Neointimafläche am Stentende	58
Abbildung 18: Neointimafläche in der nativen Aorta	59
Abbildung 19: Mediafläche in der Stentmitte	60
Abbildung 20: Mediafläche am Stentende	61
Abbildung 21: Mediafläche in der nativen Aorta	62
Abbildung 22: Mosaikdiagramm der Gefäßwandverletzung.	63
Abbildung 23: Mosaikdiagramm der Entzündungsreaktion	65
Abbildung 24: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung in der Stentmitte...	67
Abbildung 25: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung am Stentende	69
Abbildung 26: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung in der Aorta	70
Abbildung 27: Proliferationsindex der Neointima in der Stentmitte.....	72
Abbildung 28: PCNA-Färbung Kontrollstentgruppe Stentmitte	73
Abbildung 29: DAPI-Färbung Kontrollstentgruppe Stentmitte	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: PCNA-Färbung Rapamycingruppe Stentmitte	74
Abbildung 31: DAPI-Färbung Rapamycingruppe Stentmitte	74
Abbildung 32: PCNA-Färbung niedrig dosierte Shikoningruppe Stentmitte.....	75
Abbildung 33: DAPI-Färbung niedrig dosierte Shikoningruppe Stentmitte.	75
Abbildung 34: PCNA-Färbung mittel dosierte Shikoningruppe Stentmitte.....	76
Abbildung 35: DAPI-Färbung mittel dosierte Shikoningruppe Stentmitte..	76
Abbildung 36: PCNA-Färbung hoch dosierte Shikoningruppe Stentmitte.....	77
Abbildung 37: DAPI-Färbung hoch dosierte Shikoningruppe Stentmitte	77
Abbildung 38: Proliferationsindex der Neointima am Stentende.....	78
Abbildung 39: PCNA-Färbung Kontrollstentgruppe Stentende.....	79
Abbildung 40: DAPI-Färbung Kontrollstentgruppe Stentende	79
Abbildung 41: PCNA-Färbung niedrig dosierte Shikoningruppe Stentende	80
Abbildung 42: DAPI-Färbung niedrig dosierte Shikoningruppe Stentende	80
Abbildung 43: PCNA-Färbung mittel dosierte Shikoningruppe Stentende.....	81
Abbildung 44: DAPI- Färbung mittel dosierte Shikoningruppe Stentende	81
Abbildung 45: PCNA-Färbung mittel dosierte Shikoningruppe Stentende.....	82
Abbildung 46: DAPI-Färbung mittel dosierte Shikoningruppe Stentende..	82
Abbildung 47: PCNA-Färbung hoch dosierte Shikoningruppe Stentende	83
Abbildung 48: DAPI-Färbung hoch dosierte Shikoningruppe Stentende	83
Abbildung 49: Proliferationsindex der Media in der Stentmitte	84
Abbildung 50: Proliferationsindex der Media am Stentende	85
Abbildung 51: Mosaikdiagramm der Makrophagenanzahl Stentstreben	87
Abbildung 52: 10-fache Vergrößerung Makrophagen um die Stentstreben.....	88
Abbildung 53: Mosaikdiagramm der Makrophagenanzahl übrige Neointima....	89
Abbildung 54: Mosaikdiagramm der Makrophagenanzahl in der Media	90
Abbildung 55: Verhältnis Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III	91

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Fontaine [7].....	12
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Rutherford [8].....	12
Tabelle 3: Schweregrade der Angiona pectoris in der CCS-Klassifikation [10].	13
Tabelle 5: Semiquantitative Auswertung in Prozent.	47
Tabelle 6: Modifizierter Vessel Injury Score nach Schwartz et al. [25].	52
Tabelle 7: Modifizierte Inflammation Score nach Kornowski et al. [60].....	53
Tabelle 7: Messwerte.	53
Tabelle 9: Neointimafläche in der Stentmitte	125
Tabelle 10: Neointimafläche am Stentende.....	125
Tabelle 11: Neointimafläche in der nativen Aorta.	125
Tabelle 12: Mediafläche in der Stentmitte.	125
Tabelle 13: Mediafläche am Stentende.	126
Tabelle 14: Mediafläche in der nativen Aorta.	126
Tabelle 15: Proliferationsindex der Neointima in der Stentmitte.	126
Tabelle 16: Proliferationsindex der Neointima am Stentende.....	126
Tabelle 17: Proliferationsindex der Media in der Stentmitte.	127
Tabelle 18: Proliferationsindex der Media am Stentende.	127
Tabelle 19: Makrophagenverteilung im Bereich der Stentstreben.	127
Tabelle 20: Makrophagenverteilung in der übrigen Neointima.	128
Tabelle 21: Makrophagenverteilung in der Media.....	128
Tabelle 22: Verhältnis Kollagen I zu Kollagen III.	129

Legende

Legende

A.	Arteria (lat.)
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
AEC-Komplex	3-Amino-9-Ethyl-Carbachol-Komplex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
COX-2	Cyclooxygenase-2
D I	Dosisgruppe I
D II	Dosisgruppe II
D III	Dosisgruppe III
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidinophenylindol-Dihydrochlorid
DES	Drug eluting Stent
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EvG	Elastika-van-Gieson
Fc-Fragment	Crystallisable fragment (engl.)
HE-Färbung	Hämatoxlin-Eosin-Färbung
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ko	Kontrollgruppe
LTB4	Leukotrien-B4-Biosynthese
MW	Mittelwert

Legende

NaCl	Natriumchlorid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate-Buffered Saline (engl.)
Post-OP	Postoperativ
Prä-OP	Präoperativ
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RAM-11	Rabbit-anti-macrophages 11 (engl.)
sER	Smooth endoplasmic reticulum (engl.), glattes Endoplasmatisches Retikulum (deutsch)
SD	Standardabweichung
TNF- α	Tumornekrose-Faktor- α
UVB	Ultraviolette Strahlung Typ B
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation

I Einleitung

1.1 Entstehung einer Atherosklerose und Epidemiologie

In den westlichen Staaten spielen kardiovaskuläre Erkrankungen eine zentrale Rolle [1]. Rund 39% aller Verstorbenen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2014 (50.104 Bürger) starben aufgrund einer kardiovaskulären Erkrankung, welche immer noch als häufigste Todesursache gilt, noch vor den bösartigen Tumoren [2]. Dank der Weiterentwicklung von endovaskulären Therapiemethoden konnte die Sterberate durch kardiovaskuläre Ischämien gesenkt werden, was zu einem Rückgang der Sterblichkeit im Jahr 2014 gegenüber dem Vorjahr um 2,8% und gegenüber 2004 um knapp 19 % geführt hat [2–4]. Im Jahr 2004 starben in der Bundesrepublik Deutschland 61.736 Bürger an ischämischer Herzkrankheit [4].

1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Wandverdickung und –verhärtung der Arterien. Sie entsteht auf dem Boden entzündlich-proliferativer Prozesse durch Schädigung der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen. Sie entsteht auch im Rahmen einer Intimaverletzung unter Ausbildung von Thromben. Im Rahmen der Atherosklerose wird die Intima der Arterie zunehmend hyperplastisch, wodurch im Laufe der Zeit eine Gefäßstenose mit konsekutiver Durchblutungsstörung und folgender Ischämie der entsprechenden Region entsteht. Durch diese Veränderungen folgen Erkrankungen, wie periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) insbesondere der unteren Extremitäten, koronare Herzkrankheit (KHK) und zerebrovaskuläre Erkrankungen (ischämischer Schlaganfall). Es gibt bekannte Risikofaktoren, die das Auftreten einer vorzeitigen Atherosklerose begünstigen. Hauptrisikofaktoren sind die

Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus [5]. Fettreiche Diät, Adipositas, Bewegungsmangel, Lipidstoffwechsel- oder Glucosetoleranzstörung und Auswirkungen des oxidativen Stress haben einen negativen Einfluss auf die Endothelfunktion und können Entzündungen, Arrhythmien und Thrombosen auslösen, die die Atherosklerose deutlich begünstigen [6]. Ebenso bestehen nicht beeinflussbare prädisponierende Faktoren, wie die Verwandtschaft ersten Grades und das höhere Lebensalter (bei Männern ab dem 45. Lebensjahr und Frauen ab dem 55. Lebensjahr).

1.2.1 Atherosklerose bedingte Krankheitsbilder

Die arterielle Verschlusskrankheit kann in nahezu allen Körperregionen auftreten. Häufig sind arterielle Verschlüsse in den Koronararterien, den Karotiden, Hirnarterien und den Extremitäten. Die arteriellen Stenosen und Verschlüsse der Extremitäten werden als periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) bezeichnet, die vorwiegend in den unteren Extremitäten in Erscheinung tritt.

Unterschieden wird die pAVK der unteren Extremität nach der anatomischen Höhe des Auftretens des arteriellen Verschlusses. So wird die pAVK in Beckentyp (Beckenarterien), Oberschenkeltyp und Unterschenkeltyp eingeteilt. Da die atherosklerotische Einengung langsam und stetig zunimmt, kommt es zur Ausbildung von ausgeprägten Kollateralkreisläufen, durch die die anatomische Region distal der Einengung versorgt wird. Die pAVK kann so eine längere Zeit asymptomatisch bleiben. Ab einem bestimmten Stenosegrad treten dann die Symptome auf. Gemäß Fontaine wird die pAVK anhand des Auftretens von Symptomen eingeteilt, siehe Tabelle 1 [7]. Rutherford ergänzte 1997 die Einteilung der pAVK anhand der Symptomatik um dopplersonographische Messungen, siehe Tabelle 2 [8].

I Einleitung

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Fontaine [7].

I	Kein Symptom
II	Symptome beim Gehen, claudicatio intermittens a) schmerzfreie Gehstrecke > 200 m b) schmerzfreie Gehstrecke < 200 m
III	Ruheschmerz
IV	Trophische Störung, Nekrose mit Ulkus oder Gangrän

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Rutherford [8].

0	Kein Symptom, keine hämodynamisch signifikant okklusive Störung
1	Milde claudicatio intermittens <ul style="list-style-type: none">• 5 Minuten Belastung komplett möglich• Knöchelarteriendruck nach Belastung > 50 mmHg, aber mindestens 20 mmHg niedriger als Ruhewerte
2	Moderate claudicatio intermittens, zwischen Kategorie 1 und 3
3	Schwere claudicatio intermittens <ul style="list-style-type: none">• 5 Minuten Belastung nicht möglich mit vorzeitigem Abbruch• Knöchelarteriendruck nach Belastung < 50 mmHg
4	Ruheschmerz <ul style="list-style-type: none">• Knöchelarteriendruck < 40 mmHg und/oder• Großzehenarteriendruck < 30 mmHg
5	Kleiner Gewebeverlust – nicht heilendes Ulkus, fokale Gangrän mit diffus pedaler Ischämie
6	Großer Gewebeverlust – über die metatarsale Ebene hinaus, Fußamputation

Die Stenosierung einer Koronararterie bei KHK verursacht überwiegend eine stabile oder instabile Angina pectoris. Auch treten häufig Herzrhythmusstörungen auf. Eine stumme Myokardischämie oder ein plötzlicher Herztod kann dadurch

I Einleitung

auch oftmals auftreten. Die Angina pectoris wurde 1976 durch die Canadian Cardiovascular Society in klinische Schweregrade eingeteilt, siehe Tabelle 3 [9, 10]. Die Symptomatik ist mit einem stechenden Brustschmerz, einem retrosternal dumpfen oder brennenden Schmerz und Erstickungsgefühl verbunden. Oftmals strahlen die Beschwerden in den linken Arm, Nacken, Rücken, Epigastrium, Schulter und selten auch in die Kieferregion aus.

Tabelle 3: Schweregrade der Angina pectoris in der Canadian Cardiovascular Society- (CCS-) Klassifikation [10]. Modifizierte Darstellung.

0	Milde Myokardischämie, keine Symptomatik
I	Symptomatik bei schwerer körperlicher Belastung
II	Leichte Symptomatik bei normaler körperlicher Belastung
III	Schwere Symptomatik bei normaler körperlicher Belastung
IV	Symptomatik bereits bei geringer Belastung und / oder in Ruhe

1.3 Therapiemöglichkeiten

Zunächst sind präventive und therapeutische Maßnahmen notwendig, die in Kapitel 1.3 beschriebenen Risikofaktoren zu bekämpfen, wie zum Beispiel körperliche Aktivität, Umstellung der Ernährungsgewohnheiten, Gewichtsreduktion, lipid- und cholesterinsenkende Medikamente.

Bei bereits bestehenden Gefäßstenosen oder -verschlüssen gibt es eine Reihe von Therapiemöglichkeiten. Für eine Revaskularisation der Arterie stehen gefäßchirurgische und interventionelle Maßnahmen zur Verfügung. In der Gefäßchirurgie werden die Thrombendarterektomie und die Bypassanlage angewendet. Interventionell sind die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) und der intravaskuläre Einsatz von Stents etabliert, die gegenüber der Chirurgie über minimalinvasive Techniken durchführbar sind.

I Einleitung

Als Therapieziel ist die Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen entscheidend, die insbesondere abhängig von der Morphologie der Läsion sowie vom Alter und Komorbiditäten ist. Der Umfang der Restdurchblutung hängt unter anderem davon ab, wie ausgeprägt die Stenose oder der Verschluss ist, aber auch, ob Stenosen in mehreren Gefäßetagen vorliegen oder sich bereits ein Kollateralkreislauf gebildet hat. In Abhängigkeit davon erfolgt der chirurgische oder der minimalinvasive Eingriff.

1.3.1 PTA

Die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) zur Behandlung der Gefäßstenosen wurde vor etwa 50 Jahren eingeführt [11]. Zum ersten Mal konnten Grüntzig et al. das Verfahren auch in stenosierten Koronargefäßen im Jahr 1977 mit Erfolg durchführen [12].

Bei der PTA wird ein Katheter in der Regel über die Arteria (A.) femoralis, oder auch über die A. brachialis oder A. radialis bis in die Stenose vorgeschoben. An der Katheterspitze befindet sich ein Ballon, der mittels eines Manometers inflatiert werden kann. Durch die Ballondilatation im Bereich der Stenose werden die einengenden Plaques in die Gefäßwand gepresst und so das Gefäßlumen aufdilatiert. Die primäre Erfolgsrate der PTA bei der Atherosklerosebehandlung liegt je nach Lokalisation und Ausprägung zwischen 78 - 100%, bei fokalen Verschlüssen der Beckenarterien zwischen 78 – 83 % und bei femoropoplitealen Stenosen bei nahezu 100% [13].

1.3.1.1 Pathogenese einer Restenose nach PTA

Ein Nachteil der PTA ist das Auftreten einer Restenosierung nach erstmalig erfolgreicher Applikation. In der angiographischen Darstellung wird die Restenose als ein um 50 % reduzierter Gefäßdurchmesser definiert. Eine wichtige Ursache dafür sind die elastischen Rückstellkräfte (elastic recoil) und

die Umbauprozesse der Gefäßwand (negative remodeling) [14]. Der Reiz hierfür besteht in der Gefäßwandverletzung durch die Gefäßdilatation. Es kommt zur Migration und Proliferation der Muskelzellen mit nachfolgender Entzündungsantwort. Hieraus resultiert die intimale Hyperplasie, auch Neointima genannt.

Eine wiederholte Applikation der PTA bei Restenose ist durchaus möglich, meistens dann in Form weiterentwickelter Techniken wie beschichteter Ballonkatheter oder Stents.

1.3.2. Stentimplantation

Um die langfristigen Restenoseraten zu reduzieren, kann nach einer PTA eine intravaskuläre Implantation von Stents durchgeführt werden. Zum ersten Mal wurde im Jahr 1969 eine Studie von Charles Dotter veröffentlicht, in deren Rahmen Prothesen aus Edelstahlröhren in Hundegefäße implantiert wurden [15]. Nach umfangreichen Weiter- und Neuentwicklungen in den vergangenen Jahrzehnten mit unterschiedlichen Legierungen und Beschaffenheit sowie mit unterschiedlichen Substanzbeschichtungen der gitternetzartigen Röhren, können sie zum einen sekundär nach zum Beispiel ineffizienter PTA-Behandlung oder bereits als primäre Behandlung eingesetzt werden [16].

Auf der Spitze des Ballonkatheters ist eine zusammengefaltete Metallprothese angebracht. Wie bei der PTA wird der Ballonkatheter über die A. femoralis oder A. brachialis vorgeschoben bis in die Gefäßverengung. Infolge der Ausdehnung des Ballons dehnt sich der darüber befindende Stent auf und es kommt zur Aufweitung der Stenose. Nach dem Zurückziehen des Katheters verbleibt der Stent in diesem Gefäßareal. Auch sind selbstexpandierbare Stents verfügbar, welche insbesondere die Möglichkeiten der Behandlung im Bereich der Oberschenkelarterien deutlich verbessert hat.

Dank dieser Interventionstechnik ist die Restenoserate signifikant gesunken [16]. Vorteil dieser Technik gegenüber der alleinigen PTA ist das Verhindern von negative remodeling und elastic recoil [14]. In bestimmten Gefäßabschnitten wird die Stentimplantation bevorzugt eingesetzt, wie beispielsweise in den Koronararterien (mehr als 50 % der Eingriffe) und der Aorta. Aber auch in anderen Gefäßen mit Plaques wird der Stent eingebracht.

1.3.2.1 In-Stent Restenose

Die Wahrscheinlichkeit für eine erneute lokale Restenosierung nach erfolgreicher Stentimplantation mit einem unbeschichteten Stent (bare metal stent) lag bei 20-40%, sogenannte In-Stent-Restenose [17, 18]. Trotz des Vorteils des Stents gegenüber PTA mit Verhinderung von negative remodeling und elastic recoil können intimale Hyperplasien entstehen. Durch das Implantieren und durch den Verbleib des Stentmaterials entsteht eine Reizung der Gefäßwand, die zu Thrombose- und Entzündungsreaktionen, Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima und Media mit Bildung von extrazellulärer Matrix führen [19]. Es existiert eine Reihe von Ansätzen, diese unerwünschten Wirkungen zu vermeiden. Unter anderem wurden Versuche mit modifizierter Beschaffenheit der Stentoberfläche oder auch mit Legierungen durchgeführt, die zwar Verbesserungen aufweisen, allerdings das Problem der Restenose weiterhin nicht beseitigen konnten [20].

1.3.2.1.1 Thrombose- und Entzündungsreaktion

Durch die mechanische Verletzung des Endothels entstehen akute und chronische Entzündungen in der Gefäßwand. Bereits in den ersten drei Tagen werden Thrombozyten und Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Zytokine, plättchenaktivierender Faktor (PAF) und Monozyten, gebildet [21–23]. Die Größe des Thrombus, die sich an einer Stentstrebe anlagert, hängt vom

Umfang der Dilatation des Gefäßlumens durch den Stent ab. Die Stärke der Gefäßwandverletzung korreliert mit der Ausprägung der Restenose, die unter anderem von Faktoren wie Freilegung von thrombogenem Material und dem Material des Stents beeinflusst wird [24–27].

Die Thrombosierung nach PTA mit Stentimplantation stellt eine Limitation des Verfahrens dar. Die Inzidenz konnte aber durch vorsichtige Implantationstechnik und periinterventionelle Medikation auf unter 1 % gesenkt werden [19].

Durch Migration von Entzündungszellen wird eine lokale Entzündung ausgelöst mit Adhäsion von Monozyten an der Lamina elastica interna [19]. Die höchste Anzahl an Monozyten konnte nach einer Woche mit einer linearen Korrelation zwischen der Monozytenzahl pro Arterie und dem Ausmaß der Intimafläche nachgewiesen werden [26]. Nach der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen im Bereich der Stentstreben folgt die Fusionierung der Makrophagen zu vielkernigen Riesenzellen und damit die chronische Antwort auf das Fremdmaterial des Stents [19].

1.3.2.1.2 Zellwachstum – Neointima

Etwa am achten postinterventionellen Tag erreichen die Proliferation der Makrophagen und der glatten Muskelzellen ein Maximum [19]. Studien zeigten, dass es durch die Proliferation der glatten Muskelzellen und durch die Veränderung der extrazellulären Matrix zur homogenen Neointima mit konzentrisch bzw. zirkulärer Gefäßinnenwandauskleidung kommt [28, 29]. Die Dicke der Neointima hängt mit dem Grad der Gefäßverletzung zusammen [25]. Der hauptsächliche Grund für die In-Stent-Restenose ist die neointimale Proliferation und stellt das entscheidende pathomorphologische Korrelat dar [30].

1.3.2.2 Stent

Stents werden in unterschiedlichen Formen und aus verschiedenen Materialien hergestellt, wobei der chirurgische Edelstahl, Cobalt-Chrom und Nitinol die geläufigsten sind [31]. Das Metall dient als Gefäßstütze, die das Gefäßlumen stabilisiert und ein elastic recoil und negative remodeling verhindert. Als elastic recoil wird ein akuter Verlust vom gewonnenen Gefäßdurchmesser innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ballondilatation beschrieben, der ein wichtiger Pathomechanismus der Restenosierung ist, wodurch der Querschnitt des Gefäßlumens auf bis zu 50% reduziert werden kann [21, 22]. Durch die Bauart der meisten Stentarten wird ein Lumenverlust bzw. das elastic recoil nach der Angioplastie verhindert [19].

1.3.2.2.1 Stent-Material: Yukon-Stent

Systemisch medikamentöse Therapien waren zur Prävention der In-Stent-Restenose in den vergangenen Studien nicht erfolgsversprechend [26]. In den letzten Jahren entstand ein neues Konzept, das konventionelle Rohmetall (engl. bare metal stent (BMS)) mit zusätzlichen Beschichtungen (engl. Drug Eluting Stent (DES)) zu versehen [31]. Zur Verhinderung von postinterventionellen In-Stent-Restenosen werden antiproliferative Wirkstoffe auf die Stents aufgetragen. Im vorliegenden Versuch wurde der sogenannte Yukon-Stent von translumina® (translumina GmbH, Rangendingen, Deutschland) eingesetzt. Die Stents sind formstabil und polymerfrei. Dafür enthalten sie auf ihrer Oberfläche Mikroporen, um die Adsorption verschiedener organischer Substanzen zu ermöglichen. Die Beschichtungslösung füllt die Poren aus, begünstigt die Adhäsion von Endothelzellen und ermöglicht eine bessere Reendothelialisierung. Der Vorteil der Mikroporen liegt in der verzögerten Freisetzung der beschichteten Substanz. Der Schaftdurchmesser beträgt proximal 0,67 mm und distal 0,9 mm. Diese Stents sind in unterschiedlichen Längen verfügbar, von 8 bis 50 mm Länge. Diese aus medizinischem Edelstahl bestehenden Stents sind speziell zur Anwendung

von antiproliferativen, antientzündlichen und antithrombotischen Medikamenten entwickelt und auch für Bypass-Stenting indiziert.

Viele Studien verwendeten die Yukon-Stents sowohl als BMS, als auch mit verschiedenen Substanzen beschichtet (DES). Sie konnten zeigen, dass DES vergleichend zu BMS die Restenosierungen reduzieren [32].

1.3.2.3 Die Beschichtung der DES mit der Substanz Shikonin

Shikonin ist eine rote, kristalline Substanz, die aus den Wurzeln des echten Steinsamens *Lithospermum erythrorhizon* als Naphthochinon-Derivat isoliert wird. Sie wird in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) als Heilprodukt angewendet. Historisch betrachtet, wurde Shikonin seit Jahrtausenden zur Behandlung von Verbrennungen, Entzündungen und zur Förderung der Wundheilung eingesetzt [33].

Sie besitzt die Summenformel $C_{16}H_{16}O_5$ und die in Abbildung 1 dargestellte Strukturformel.

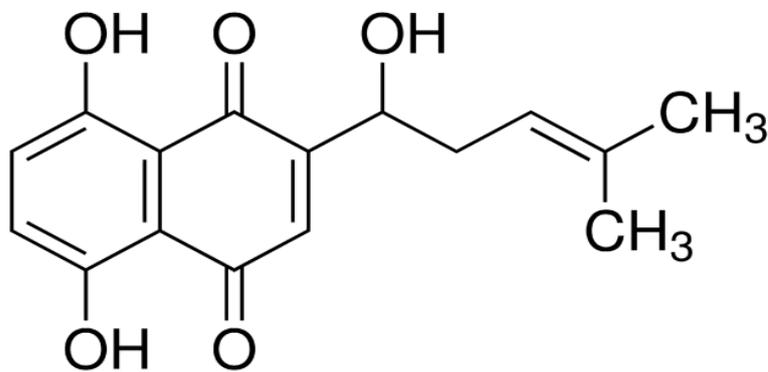


Abbildung 1: Strukturformel von Shikonin.

Die Substanz hat viele biologische Funktionen, neben einem antitumorösen Effekt wirkt sie antimikrobiell und entzündungshemmend [34–36].

Schon vor etwa 50 Jahren wurde klinisch belegt, dass Shikonin als Salbe antiinflammatorische Effekte besitzt und wirksames Mittel gegen

I Einleitung

Hautverletzungen ist, da sie in der lokalen Anwendung durch Histamin oder Wärme entstandene akute Ödeme und erhöhte vaskuläre Permeabilität hemmt [37].

Nachweislich wirkt die Substanz protektiv auf einen experimentell ischämischen Schlaganfall, unter anderem durch Hemmung proinflammatorischer Mediatoren [38]. Die Substanz hat sich im Rahmen ihres antiinflammatorischen Effektes als wirksam erwiesen gegen thermische Ödeme, Arthritiden, Atherosklerose und wurde auch als Schutz gegen UVB-induzierte Entzündungen in kultivierten menschlichen epidermalen Keratinozyten angewendet [39]. Auch wurde nachgewiesen, dass ihr Derivat eine antioxidative Wirkung aufweist [40].

Die entzündungshemmende Wirkung der Substanz ist auf mehrere Wirkmechanismen zurückzuführen, wie die Hemmung der Cyclooxygenase-2-Transkription (COX-2), Hemmung der Leukotrien-B₄-Biosynthese (LTB₄), Hemmung der Mastzelldegranulierung, Hemmung von zytotoxischen Substanzen der Neutrophilen, Hemmung des Phosphatidylinositol-Signalweges und Hemmung der Chemokinligandenbindung zu CC-Chemokin-Rezeptoren [33, 41].

Auch zeigte sich ihre antifugale Wirkung bei Infektionen mit *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* [42]. Studien konnten auch eine anti-HIV-Aktivität nachweisen [43].

Shikonin wurde auf der Grundlage spektroskopischer Analysen identifiziert und auf seine inhibitorische Aktivität gegen das menschliche Cholesterin-Enzym Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase ACAT getestet [44]. Die Acyltransferase ist das primäre Enzym für die intrazelluläre Veresterung von freiem Cholesterin und ist verantwortlich Fettacyl-CoA-Cholesterinester in verschiedenen Geweben zu erzeugen [44]. Die Zunahme von Cholesterylester führt zur Bildung von Schaumzellen, die Kennzeichen für atherosklerotische Läsionen sind [44]. Schaumzellen sind Makrophagen mit im Zytoplasma angesammelten Lipidtröpfchen, die sich im histologischen Präparat „schaumig“ darstellen. Die Hemmung von ACAT verhindert das Fortschreiten der atherosklerotischen

I Einleitung

Läsionen durch Hemmung der intestinalen Cholesterinabsorption, die den Plasmalipidspiegel absenkt und die Akkumulation von Cholesterinveresterungen in Makrophagen verhindert [44].

Darüber hinaus hemmt Shikonin die von Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) vermittelte Proliferation und Invasion der vaskulären glatten Muskelzellen, die zur Atherosklerose beitragen [45]. Außerdem fördert sie die Apoptose und blockiert den Zellzyklus der vaskulären glatten Muskelzellen durch Veränderungen der Zellzyklusregulationsproteine, die die Atherosklerose hemmen [46]. Auch wurde nachgewiesen, dass sie eine antikanzerogene Eigenschaft bei Lungenkrebs besitzt [47].

Aufgrund der vielfältigen geschilderten Wirkungen von Shikonin wurde diese in diesem Versuch als Beschichtung für Stents angewendet und auf deren Wirkung auf die Gefäßregeneration und Restenoseprophylaxe hin untersucht.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Im Wesentlichen sollten mit diesem Schritt zwei Fragen beantwortet werden:

- a. Zeigt die Substanz in-vivo einen Benefit im Vergleich zu Rapamycin und konventionellen Stentprodukten in Bezug auf die Restenoserate und Reendothelialisierung?
- b. Lässt sich eine Dosisabhängigkeit zeigen?

II Material und Methoden

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 52 weiße Neuseelandkaninchen. Histologisch ausgewertet wurden davon 40 Kaninchen, die das Versuchsende erreichten. 12 Tiere erreichten das Versuchsende nicht. Das Tiermodell der weißen Neuseelandkaninchen ist in der experimentellen Forschung im Bereich der Atherosklerose und Restenose bewährt und wurde erstmals durch Baumgartner 1966 beschrieben [48–50].

2.1.2 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden randomisiert in fünf Gruppen eingeteilt. Die Reihenfolge der Tiernummern zwischen Gruppe eins und fünf wurden aufgeteilt. Die Zuordnung zu den Gruppen wurde erst nach der Auswertung entblindet. Elf Tiere wurden in Gruppe eins, sechs Tiere in Gruppe zwei, sieben Tiere in Gruppe drei und jeweils acht Tiere in Gruppe vier und fünf eingeteilt.

Allen Gruppen wurden Yukon®-Stents unterschiedlicher Substanzbeschichtungen implantiert. Die folgenden Stentbeschichtungen wurden verwendet: Die Kontrollgruppe erhielt die Beschichtung mit Lösungsmittel ohne Wirkstoff mit der Funktion als BMS. Die Vergleichsgruppe erhielt die Beschichtung Rapamycin. Die Verum-Gruppe erhielt die Substanz Shikonin. Diese Gruppe wurde in drei Dosisgruppen aufgeteilt. Eine Gruppe davon erhielt die Stentbeschichtung mit der Dosis I (2,5 µg/ml), die zweite Gruppe die Dosis II (5 µg/ml) und die dritte Gruppe die Dosis III (10 µg/ml).

II Material und Methoden

In der folgenden Abbildung sind Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung schematisch erfasst:

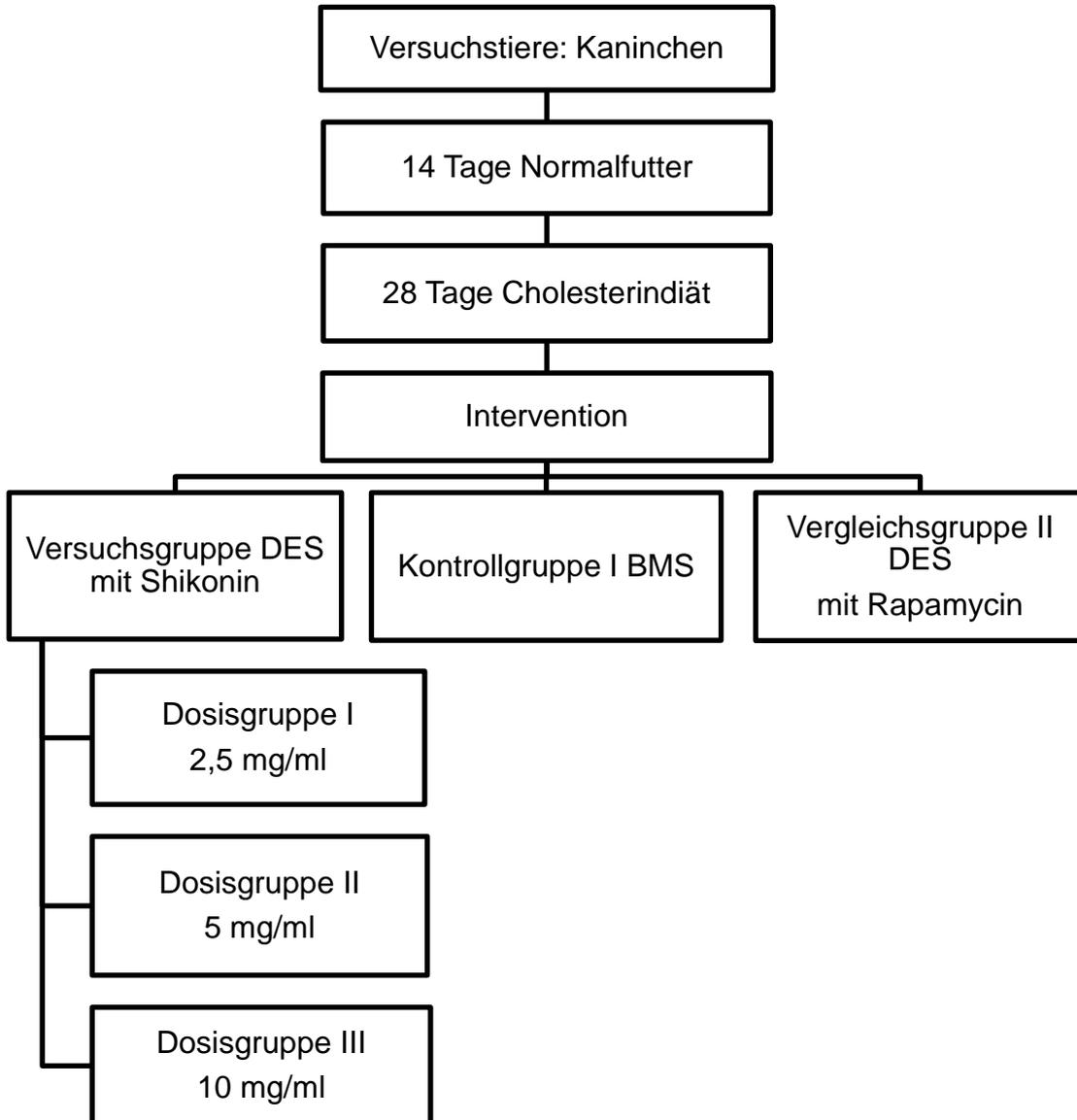


Abbildung 2: Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung. DES = Drug Eluting Stent, BMS= bare metal stent.

2.2 Materialien

Wie im Versuchsaufbau Kapitel 2.1.2 erwähnt, wurden allen Versuchstieren Stents implantiert. Als Zielgefäß wurde die infrarenale Aorta abdominalis gewählt.

2.2.1 Katheter

Um das Gefäß auf die folgende Stentanlage vorzubereiten, wurde es mittels eines Fogarty®-Katheters, Modell 12-060-2F (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) denudiert, um durch den Endothelschaden einen Proliferationsreiz zu erzeugen. Der Katheter wird in der alltäglichen Praxis zur Embolektomie der Blutgefäße angewendet.

2.2.2 Stents

Im Versuch wurden Stents der Marke Yukon® Choice^{DES} (translumina GmbH, Rangendingen, Deutschland) angewendet. Über Führungsdrähte wurden die Stents in die infrarenale Aorta eingebracht. Laut Angaben des Herstellers haben sie nach der Ballondilatation einen Durchmesser von 2 bis 2,5 mm, die Dicke der Streben beträgt 0,087 mm und die Abstände zwischen den Streben 1,1 mm. Die Stents hatten eine Länge von 21 mm und einen Durchmesser von 4 mm nach Anwendung eines Inflationsdrucks von 9 bar, laut Hersteller Medium Vessel Size.

2.2.3 Vorgang der Substanzbeschichtung

Drei Schritte wurden benötigt, um die Stents zu beschichten. Zunächst wurde eine Patrone in die Stent-Beschichtungsmaschine (SCM 7, translumina GmbH, Rangendingen, Deutschland) eingelegt, dann das entsprechende Medikament dazugegeben. Schließlich erfolgte die Beschichtung mit dem Gerät. Die Beschichtungslösung füllt die Mikroporen der Stentoberfläche aus und erzeugt

II Material und Methoden

darüber eine gleichförmige Schicht. Der Beschichtungsprozess ist schnell durchzuführen und der Stent für den sofortigen Einsatz bereit.

In diesem Versuch wurden die Stents, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, mit Shikonin, Rapamycin und einer Wirkstoff-freien Kontrolllösung beschichtet. Stents mit Shikonin wurden in den Konzentrationen von 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml eingebracht. Die Kontrollgruppe erhielt das Wirkstoff-freie Lösungsmittel und die Vergleichsgruppe 5 µg/ml Rapamycin.

2.3 Methoden

2.3.1 Präoperative Phase

In der ersten vierzehntägigen Phase wurden die Tiere mit einem Normalfutter ad libitum ernährt (Fa. Altromin, Lage, Deutschland). Danach erhielten alle Versuchstiere 28 Tage lang eine 0,5%ige Cholesterindiät (Fa. Altromin, Lage, Deutschland).

2.3.2 Operative Phase – Die Stentimplantation

Zur Vollnarkose und Schmerzlosigkeit erhielten die Tiere vor der Operation 4 ml eines Gemisches aus Ketamin, Xylazin und Atropinsulfat. Das Verhältnis des Gemisches betrug 28:12:1. Zur Prämedikation erhielten sie intravenös 500 IE Heparin (Liquemin® N 25000, Roche, Basel, Schweiz) und 60 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Es erfolgte eine intramuskuläre Injektion in den Musculus gluteus maximus. Während der Narkose wurde die Leistenregion rasiert und anschließend eine Desinfektion mit Betaisadona-Lösung durchgeführt. Vor dem Eingriff erfolgte eine sterile Abdeckung des Operationsfeldes.

II Material und Methoden

Zum Aufsuchen der A. femoralis wurde das Gebiet palpiert und ein kleiner Hautschnitt über der Arterie durchgeführt. Anschließend erfolgte eine stumpfe Präparation in die Tiefe durch das Subkutangewebe bis auf die Faszie. Danach folgte die stumpfe Präparation der Muskulatur in die Tiefe, bei vorheriger scharfer Faszienpaltung. Das Gefäß-Nerven-Bündel in der Leiste wurde freigelegt. Die A. femoralis wurde proximal und distal mit einem Faden angeschlungen und anschließend jeweils eine Gefäßklemme proximal und distal gesetzt. Zwischen den beiden Gefäßklemmen wurde eine Arteriotomie für den Katheter- und Schleusenzugang durchgeführt. Über die Öffnung wurde der 2F-Fogarty®-Arterien-Embolektomie-Katheter (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) eingeführt. Nach dem Entfernen der proximalen Gefäßklemme wurde die Katheterspitze über die A. femoralis, die A. iliaca externa in die Aorta abdominalis bis distal des Nierenarterienabgangs vorgeschoben. Periinterventionell wurden 200 IE Heparin (Liquemin® N 25000, Roche, Basel, Schweiz) intraartiell injiziert. Die Inflation des Ballons erfolgte mit einer 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung, die in einer 1ml-Spritze aufgezogen wurde. Nach der mechanischen Gefäßdilatation durch das dreimalige Zurückziehen des Ballons wurde über einen Terumo®-Führungsdraht (Terumo, Eschborn, Deutschland) eine Schleuse (4F Avanti, Cordis, Warren, USA) eingelegt und der Stent in der infrarenalen Aorta abdominalis platziert. Unter Durchleuchtungskontrolle wurde der Ballonkatheter je 20 Sekunden mit 9 bar inflatiert und deflatiert, um den Stent freizusetzen. Die Schleuse und der Katheter wurden entfernt. Danach folgte ein Verschluss der Arteriotomie und abschließend schichtweiser Wundverschluss mit Vicryl®-Fäden für die Muskel- und Hautnaht.

Folgende Abbildungen zeigen exemplarische Durchleuchtungsbilder des Implantationsprozesses.

II Material und Methoden

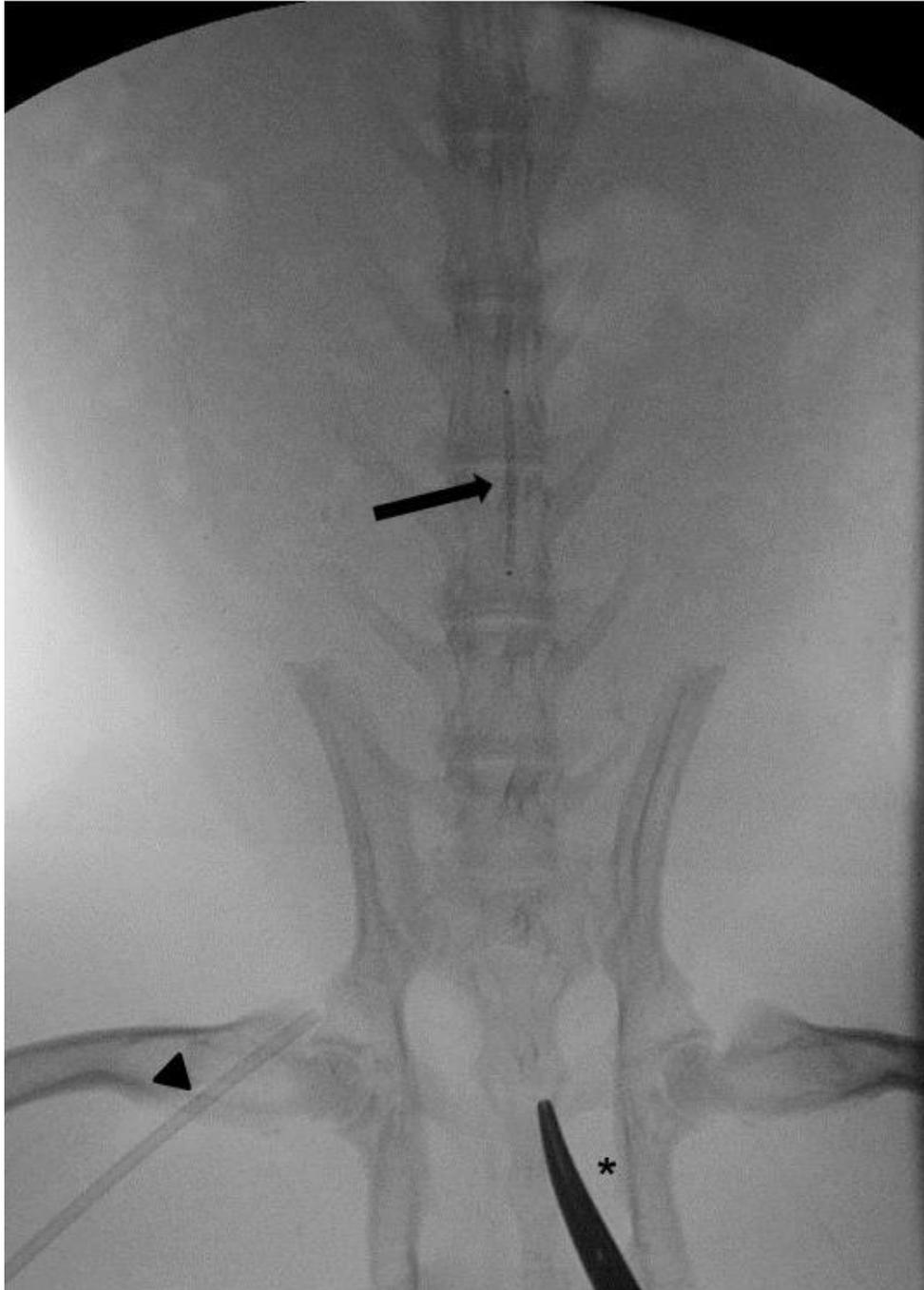


Abbildung 3: Stentimplantation unter Durchleuchtung. Positionieren des noch nicht aufballonierten Stents (Pfeil) in die infrarenale Aorta abdominalis. Zugang von der A. femoralis rechts mit liegender Schleuse (Pfeilspitze). Miterfasste Klemme (Stern) auf der Haut des Tieres.

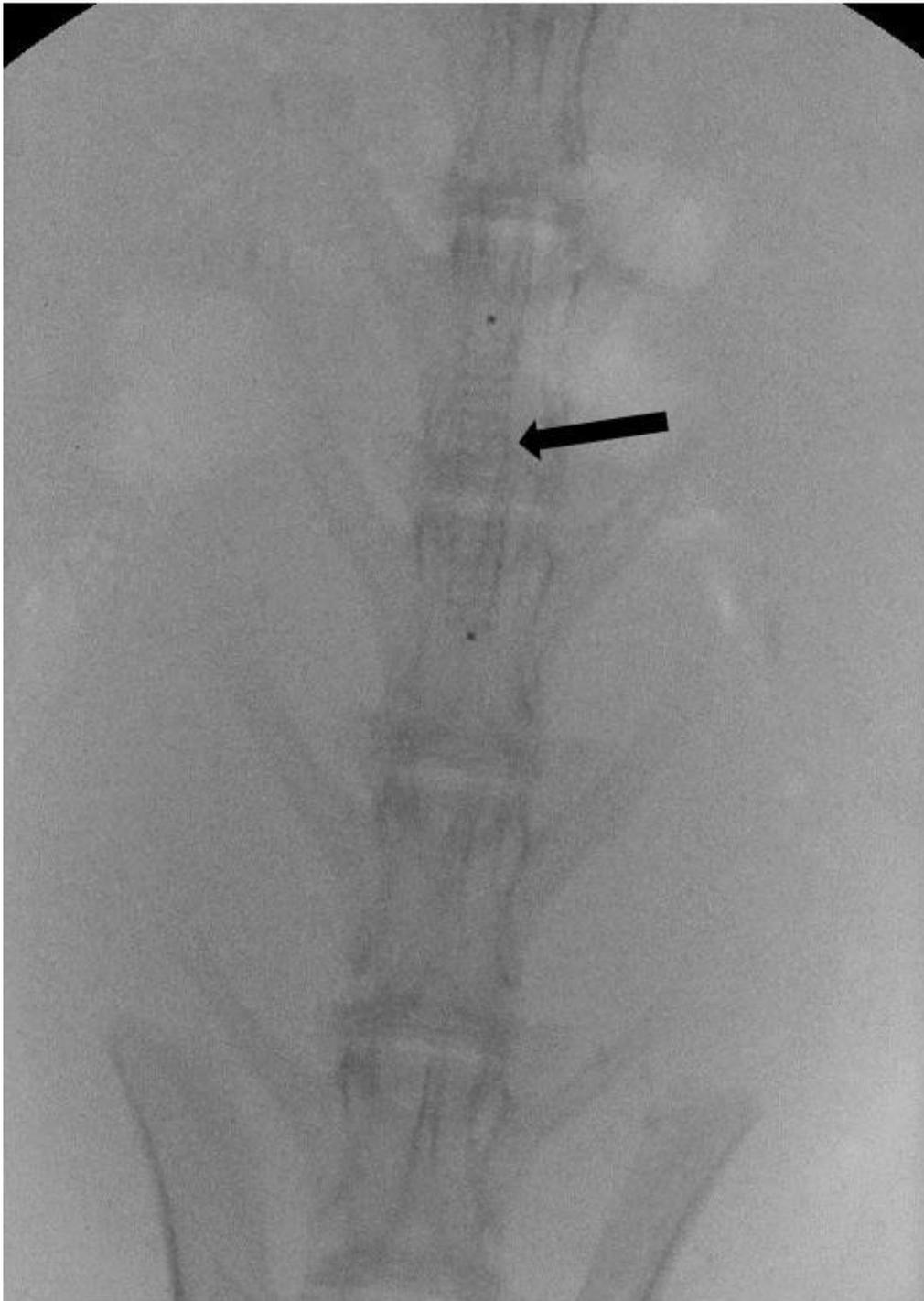


Abbildung 4: Stentimplantation unter Durchleuchtung. Nach Inflation und Deflation des Ballonkatheters, entfalteter Stent (Pfeil) in der Abschlussuntersuchung.

2.3.3 Postoperative Phase

Zur Thrombose- und Embolieprophylaxe wurden am Abend der Operation allen Tieren 900 I.E. Standard-Heparin (Liquemin® N 25000, Roche, Basel, Schweiz) und 5 mg Clopidogrel subkutan injiziert. An drei darauffolgenden Tagen wurden ihnen alle 12 Stunden je 900 I.E. Standard-Heparin (Liquemin® N 25000, Roche, Basel, Schweiz) subkutan injiziert. Ab dem ersten postoperativen Tag erhielten die Tiere alle 24 Stunden eine subkutane Injektion von 15 mg DL-Lysinmono-Acetylsalicylsäure (Linden Arzneimittel-Vertrieb-GmbH, Heuchelheim, Deutschland) und intravenöse Antibiose mit Enrofloxacin (ENR, Baytril®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) für fünf Tage. Ab dem fünften Tag bis zum Versuchsende wurde die subkutane Acetylsalicylsäure-Injektion alle drei Tage mit einer Dosis von 60 mg fortgeführt.

Alle Versuchstiere erhielten nach der Operation eine 0,5%ige cholesterinreiche Diät (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) für sechs Wochen. Danach wurden sie zur Präparation vorbereitet.

2.4 Entnahme und Histologie-Aufarbeitung der Gefäßpräparate

2.4.1 Vorbereitung zur Gefäßentnahme

Die Tiere wurden mit dem Injektionsgemisch T61 exzitationslos euthanasiert. Das Gemisch besteht aus dem ausschließlich in der Veterinärmedizin und im Rahmen von Tierversuchen als Tötungsmittel verwendeten Embutramin (200 mg), Mebezoonii iodidum (50 mg) und Tetracaini hydrochloridum (5 mg). Die Lösungen wirken narkotisierend, peripher muskelrelaxierend und auch lokalanästhetisch und wirken binnen Sekunden bis wenigen Minuten.

2.4.2 Gefäßentnahme und Fixierung

Über eine Laparotomie wurde zunächst die Aorta abdominalis freigelegt. Es erfolgte eine Zielentnahme der mit Stent implantierten Aorta abdominalis bis zur Aufzweigung in die Arteriae iliacae communes dextra et sinistra. Diese Präparate wurden für eine Perfusionsfixierung mit einer 4%igen Formaldehydlösung gespült, die mit 0,1 mol Cacodylat gepuffert ist. Cacodylat ist eine Dimethylarsäure mit einem Molekulargewicht von 214,13 g und einem pH von 7,4. Durch die Perfusionsfixierung wurden Strukturen in dem augenblicklichen Zustand fixiert, die Stoffwechselprozesse gestoppt und auf dieser Weise der postmortalen Zerfall verhindert. Schließlich erfolgte eine 48-stündige Immersionsfixierung, indem die Objekte in die Fixierungsflüssigkeit selbst und erneut mit der Cacodylat gepufferten Formaldehydlösung eingebracht wurden.

2.4.3 Präparation der gestenteten Aorta abdominalis

Nach dem Fixieren der Aorta abdominalis in Formaldehyd wurde das umgebende Bindegewebe entfernt. Anhand eines Schleifschneidegerätes (Georg Schick Dental GmbH, Schemmerhofen, Deutschland) wurde die gestentete Aorta mit einer rotierenden Trennscheibe (DIAMANT Instrumente HORICO, Modell H 355 C190, Hopf. Ringleb & Co., Berlin, Deutschland) in der Mitte in zwei Hälften geteilt. Die zwei gestenteten Aortenstücke wurden in zwei unterschiedlichen Arbeitsmethoden aufgearbeitet.

Das eine Teilstück wurde nach der Stententfernung in Paraffin und das andere mit dem fortbestehend implantierten Stent in Methacrylat eingebettet. Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung der histologischen Aufarbeitung.

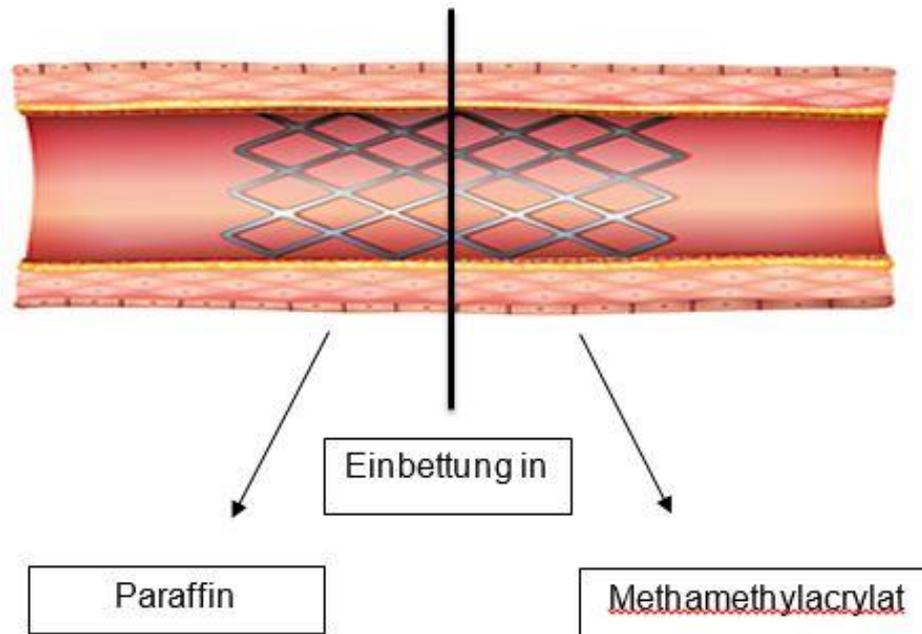


Abbildung 5: Schema der histologischen Aufarbeitung.

Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden für eine histologische und immunhistochemische Färbung verwendet. Die Plastikeinbettungen mit Methamethylacrylat wurden für die morphologische Beurteilung verwendet, da bei den paraffinierten Präparaten die Neointima bei Stentstreben-Entfernung abgelöst werden kann. Der Vorteil der zweiten Arbeitsmethode besteht darin, dass vom Entfernen der Stentstreben abgesehen werden konnte und so die Neointima intakt blieb.

2.4.4 Einbettung in Paraffin und Schneiden

Mit einer rotierenden Trennscheibe (DIAMANT Instrumente HORICO, Modell H 355 C190, Hopf. Ringleb & Co., Berlin, Deutschland) wurden die in Formaldehyd fixierten Präparate von der ursprünglichen Mitte aus zum Endstück hin in 0,1 cm breiten Abständen in Scheiben geschnitten. Wichtig war, diese Schnitte an Kreuzungsstellen der Stentstreben vorzunehmen, um das anschließend

vorsichtige Entfernen der verbliebenen Strebenreste zu vereinfachen und das Risiko für einen vollständigen Abriss der Neointima zu reduzieren. Am Ende der stentfreien Aorta wurden zwei 0,2 cm breite Stücke ab Stentende präpariert. Abbildung 6 zeigt den Schnittvorgang.

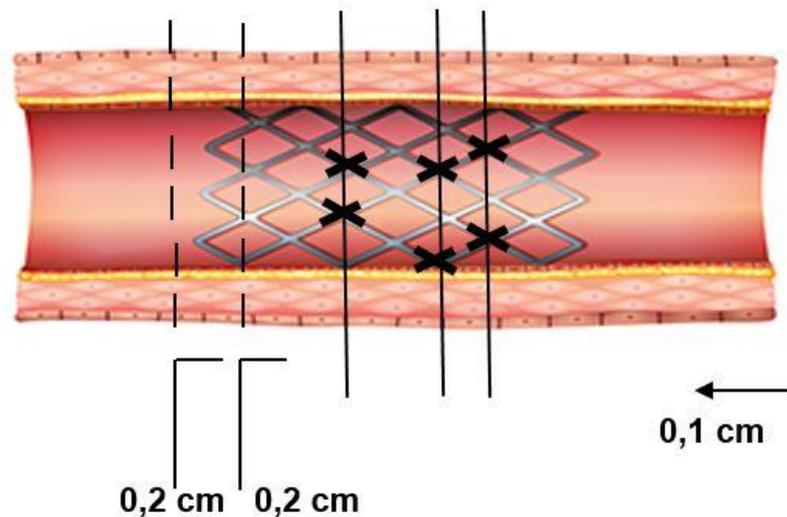


Abbildung 6: Schnittstellen in schematischer Darstellung. In der Stentmitte wurden die Schnitte möglichst in der Mitte der Stentstreben durchgeführt.

Zunächst wurden die in Formaldehyd fixierten Gefäßstücke in aufsteigenden Ethanolreihen für je 2 Stunden dehydriert (70%, 80%, 90%, 96% und 99%). Anschließend wurden diese Präparate für 40 Stunden in Methylbenzoesäure (Fa. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) und für 20 Minuten in Rotihistol (Fa. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Schließlich wurden sie in Paraffin (Paraplast® Fa. Sherwood, St. Louis, USA) eingebettet.

Es wurden 4-10µm messende Dünnschnitte aus den eingebetteten Präparaten mittels einem Mikrotom (Modell Jung RM 2045, Leica Instruments GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Für histologische Untersuchungen wurden diese Querschnitte anschließend auf Objektträger der Größe 76 x 26 mm

(Menzel, Darmstadt, Deutschland) aufgebracht und in Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingelagert.

2.4.5 Einbettung in Methamethylacrylat und Querschnittherstellung

Im Folgenden wird das Verfahren einer Trenn-Dünnschliff-Technik beschrieben [51].

Die in Formaldehyd fixierte gestentete Aortenhälfte und native Aorta wurden in aufsteigender Ethanolreihe zu 70%, 96% und 100% je 24 Stunden dehydriert. Die Stentstreben wurden im Gegensatz zur Paraffineinbettung nicht entfernt. Mit einem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff, der aus einem Gemisch von 100%igem Alkohol und Methamethylacrylat (MMA, Technovit 7200, Kulzer, Friedrichsdorf, Deutschland) bestand, erfolgte eine Infiltration in fünf Stufen für je 48 Stunden. In der ersten Stufe betrug das Verhältnis des Gemisches 70:30 (Alkohol:Methamethylacrylat), in der zweiten Stufe 50:50, in der dritten Stufe 30:70 und in der vierten und fünften Stufe 0:100 (rein Methamethylacrylat). Die Einbettmulden waren gefüllt mit Methamethylacrylat. Darin wurde eine Polymerisation und Aushärtung durchgeführt. Anschließend wurden sie in einem Exakt-Kulzer Lichtpolymerisationsgerät (Histolux® Kulzer, Friedrichsdorf, Deutschland) mit der Wellenlänge zwischen 400-500 nm beleuchtet. Mit einem Schnellhärter, einem kaltpolymerisierenden Dreikomponentenkunststoff (Technovit 4000, Kulzer, Friedrichsdorf, Deutschland), wurde ein Objektträger aufgeklebt. Mit Hilfe eines mit Diamanten besetzten Trennbandes im Exakt-Trennschliffsystem (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) folgte eine Abtrennung einer Scheibe von etwa 200 µm Dicke von dem entstandenen Kunststoffblock. Die Vorschubkräfte der Trennwand betragen zwischen 0,49 bis 0,98 Newton. Die Kunststoffblöcke wurden anschließend über ein Schleifsystem mit Planparallelitätsfunktion (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) auf ca. 80 µm dünn geschliffen und die entstandenen Querschnitte auf die 76 x 26 mm großen Objektträger (Menzel, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Im

letzten Schritt erfolgte eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und Elastika-van-Gieson und schließlich eine Einbettung in Gelatine (Aquatex Merck 8562, Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.5 Histologische Färbungen

Als histologische Färbungen wurden die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und die Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG-Färbung) für die planimetrischen Messungen durchgeführt [52, 53]. Die noch mit Paraffin eingebetteten Präparate wurden vorerst durch Xylol und Dehydrierung in absteigender Ethanolreihe (100%, 96% und schließlich 70%) entparaffiniert. Danach folgten die Färbungen, die im Folgenden beschrieben werden.

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

HE-Färbung ist eine Routinefärbemethode für morphologische Untersuchungen, die in der Pathologie als Zellübersichtsfärbung angewendet wird. In Biopsien und Operationspräparaten erleichtert diese Färbemethode die Diagnostik krankhafter Veränderungen [52, 53].

Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin aus dem Blauholzbaum entwickelt in Form seines basischen Hämalan eine intensiv färbende Eigenschaft. Alle Zellstrukturen, die basophil bzw. sauer sind, werden blau bis blauviolett gefärbt. Diese sind zum Beispiel DNA, mit Ribosomen angereichertes raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) und insbesondere in unserem Versuch die relevanten Zellkerne.

Der synthetische Farbstoff Eosin färbt alle basischen (eosinophilen) bzw. azidophilen Zellstrukturen rosa bis rot. Dazu gehören Proteine des Zytoplasmas,

Mitochondrien, Kollagen und glattes Endoplasmatisches Retikulum (sER) [52, 53].

Die entparaffinierten Präparate wurden für fünf Minuten in Mayers Hämatoxylin-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) eingetaucht. Anschließend wurden sie unter fließendem Leitungswasser zehn Minuten lang gespült und für fünf Minuten in Eosin (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gegengefärbt. Abschließend erfolgte in aufsteigender Ethanolreihe eine Dehydrierung. Sie wurden für einige Minuten in Xylol aufgehellt und in Eukitt (Fa. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) eingebettet.

2.5.2 Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG-Färbung)

EvG-Färbung ist eine Kombinationsfärbung der van Gieson-Färbung und Elastika-Färbung. Zunächst wurde das Gewebe mit einer Resorcinfuchsin-Lösung nach Weigert und anschließend mit Hämatoxylin gefärbt. Daraus resultierte eine schwarzviolette Färbung der elastischen Fasern in der Lamina elastica interna und im übrigen Gefäßabschnitt sowie eine schwarzbraune Färbung der Zellkerne. Schließlich erfolgte eine Gegenfärbung mit Pikrinsäure-Säurefuchsin (Pikrofuchsin), die das Muskelgewebe gelb und die Kollagenfasern rot färbte.

Die entparaffinierten Gefäßpräparate wurden für 30 Minuten in Resorcinfuchsin (Chroma Gesellschaft, Köngen, Deutschland) eingetaucht und mit 80%igem Alkohol und Wasser gespült. Sie wurden für sechs Minuten mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen, Deutschland) gefärbt. Nach Differenzierung in Chlorwasserstofflösung wurden diese für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser in eine Blaufärbung überführt. Anschließend erfolgte ein erneutes Spülen mit Wasser, eine zweiminütige Einlagerung in van Gieson-Lösung (Chrom Gesellschaft, Köngen, Deutschland) und Dehydrierung unter aufsteigender Ethanolreihe. Die Präparate wurden abschließend kurz in Xylol

II Material und Methoden

getaucht und in Vitro-Clud (Fa. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingebettet.

Ein Beispiel aus der nativen Aorta eines Tieres aus der Rapamycingruppe in Abbildung 7:

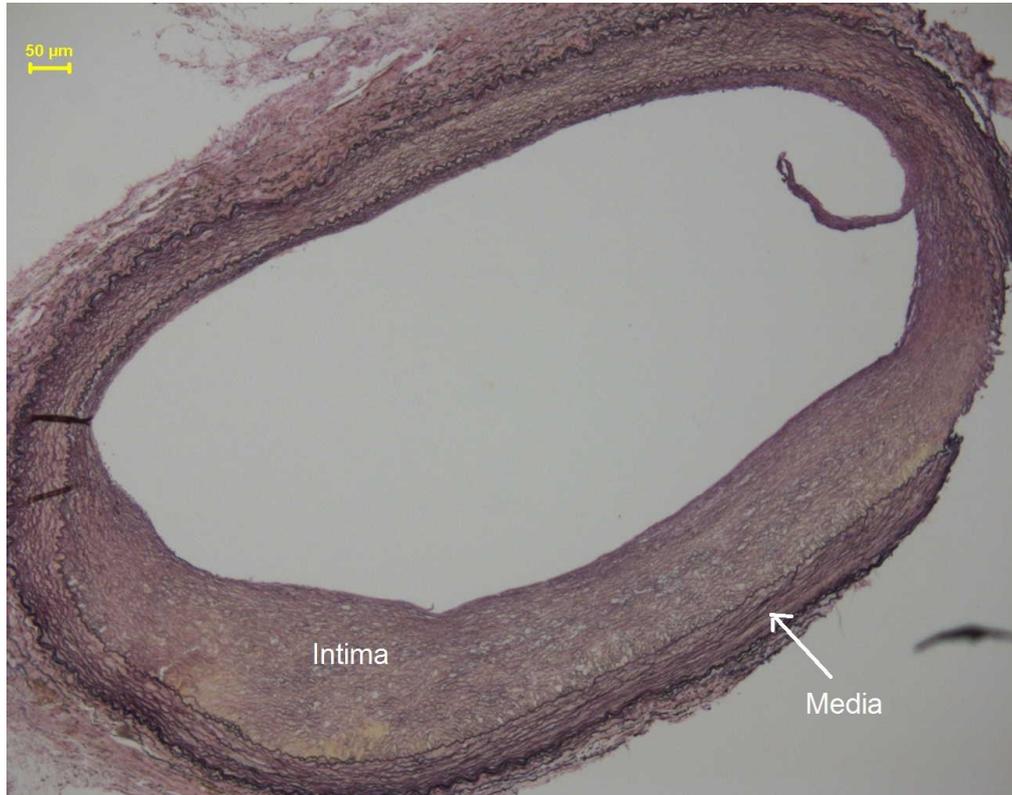


Abbildung 7: EvG-Färbung. Tiernummer 7 aus der Rapamycingruppe. Erkennbar ist die nach der Denudation verbreiterte Intima.

2.6 Immunhistochemische Färbungen

In der immunhistochemischen Färbemethode können Zell- und Gewebestrukturen anhand von Antigen-Antikörper-Reaktionen markiert werden, indem die gesuchten Antigenstrukturen mittels Farbstoff gekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht werden [52]. Dabei wird als Antigen-Antikörper-Reaktion die

II Material und Methoden

Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft der Antigenoberfläche, der antigenen Determinante (= Epitop) nachgewiesen [52]. Zwei unterschiedliche Färbemechanismen wurden durchgeführt, eine direkte und eine indirekte Färbung. In der direkten Färbemethode wurde ein spezifischer Antikörper (Ak), ein Primär-Antikörper, mit einem Farbstoffmarker gekoppelt. In der indirekten Färbemethode wurde neben dem Primär-Ak noch ein zweiter Ak, der Sekundär-Ak bzw. Anti-Ak, für das Koppeln des Farbstoffmarkers mit dem Sekundär-Ak verwendet. Der markierte Sekundär-Ak ist gegen das Immunglobulin des Primär-Ak's gerichtet und bindet daher an ein Fc-Fragment des Primär-Ak's.

In diesem Versuch wurden für die immunhistochemischen Färbungen der Merkmale von proliferierenden Zellen, Gefäßendothelien und Makrophagen ein Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Kit, Peroxidase Goat IgG, Pk-4005, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland) verwendet. Avidin, ein Glykoprotein aus Vogelei mit vier identischen Untereinheiten, bindet aufgrund seiner sehr hohen Affinität an Biotin, ein Vitamin H, und wirkt als Abwehrmechanismus bakteriostatisch. Anhand dieser Methode erfolgt eine Färbung durch Bindung der gesuchten Antigene mit einem Ak und macht eine mikroskopische Auswertung möglich [54–57]. Zunächst wurde die endogene Peroxidase der entparaffinierten Präparate gehemmt und auf Normalserum aufgetragen. Nach einer Inkubation mit einem spezifischen Primär-Ak erfolgte eine Zugabe eines mit Biotin markierten Sekundär-Ak's und anschließenden Avidin-Biotin-Komplexes. Die freien Stellen des Avidinkomplexes wurden an Biotinmoleküle des Sekundärkomplexes gebunden. Der Avidin-Biotin-Komplex wurde anschließend mit Peroxidase gekoppelt. Danach wurde ein 3-Amino-9-Ethyl-Carbachol-Komplex (AEC-Komplex) hinzugefügt. Der AEC-Komplex und die Peroxidase reagierten zu Wasser und änderten ihre Farbe zu rosa bis rot. Nach Entparaffinierung durch Xylol und absteigender Ethanolreihe (100-70%) erfolgte eine Spülung mit Leitungswasser. In einem Zitratpuffer wurden die Präparate erhitzt und danach gekühlt. Anschließend wurden diese in einem PBS-

Puffer (Phosphate-Buffered Saline) mit 30%igem Hydrogenperoxid eingelagert und auf einem pH von 7,4 titriert. Die Pufferung diente zur Hemmung der endogenen Peroxidase und bestand aus Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat und 0,9%ige Kochsalzlösung. Danach wurde die grenzflächenaktive Substanz Polysorbat 20 (Tween® 20, Fa. Merck, Schuchardt, Deutschland) hinzugefügt, die zur Reduzierung der Oberflächenspannung diente. Abschließend wurden die Präparate, je nach Farbtintensität, unter Kontrolle im Lichtmikroskop mit dem PBS-Puffer gespült. Zum Schluss wurden sie in Hämatoxylin-Lösung zur Gegenfärbung eingetaucht.

2.6.1 Endothel-Färbung

Die Präparate wurden nach der Entparaffinierung für zehn Minuten in einem Zitratpuffer gekocht und die Hemmung der endogenen Peroxidase durchgeführt. Danach wurden sie in Rinderserumalbumin und normalem Pferdeserum inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe eines spezifischen Primär-Ak's. Für die Endothel-Färbung wurde als Primär-Ak das Anti-Human Factor VIII related Antigen Serum (BioRAD, Labor Diagnostika GmbH, Heiden, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Zwischendurch erfolgte eine Spülung mit PBS-Puffer. Danach wurde als spezifischer Sekundär-Ak die Peroxidase-Goat-IgG (Vectastain ABC-Kit, Pk-4005, Linaris biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland) im Verhältnis von 1:200 verdünnt. Zu dieser Lösung wurde der Avidin-Biotin- und AEC-Komplex hinzugefügt und schließlich mit Hämatoxylin gegengefärbt und in Aquatex (Merck 8562, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. In dieser Färbemethode wurde der von-Willebrandt-Faktor (vWF), der vom Endothel gebildet wird, rotbraun markiert.

2.6.2 RAM-11-Färbung (Rabbit-anti-macrophages)

Anhand dieser Färbemethode wurden Makrophagen dargestellt.

II Material und Methoden

Für einen Progress der Atherosklerose spielen Makrophagen eine essentielle Rolle, da sie im ersten Schritt der Arteriosklerose in die arterielle Gefäßwand einwandern. Mittels der Färbung wurden die RAM-11-positiven Zellen in der Neointima nachgewiesen.

Nach der Entparaffinierung wurde eine Antigendemaskierung mit Zitratpuffer durchgeführt, um Fixationsartefakte ausschließen zu können. Nach Hemmung der endogenen Peroxidase und Inkubation mit Rinderserumalbumin und Pferdeserum konnte eine Bindung eines Primär-Ak's erfolgen. Hierzu wurde ein Primär-AK, das RAM-11 (Rabbit-anti-macrophages, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA), das spezifisch gegen das zytoplasmatische Antigen von Kaninchen-Makrophagen gerichtet ist, mit einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt und zwischendurch mit PBS-Puffer gespült [58]. Als spezifischer Sekundär-AK wurde ein monoklonaler, mit Biotin konjugierter Maus-Ak Vectastain mit einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (Anti-Mouse-IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), der eine sehr hohe Affinität zu Avidin hat. Hierzu wurde Meerrettichperoxidase konjugiertes Avidin hinzugefügt. Mit Hilfe eines Farbstoffes 3'3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB plus Kit, Burlingame, CA, USA) konnte der Avidin-Biotin-Komplex sichtbar gemacht werden [59]. DAB diente als elektronenspendendes Chromogen. Zur besseren Sichtbarkeit der Makrophagenzellkerne wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und schließlich in Aquatex (Merck 8562, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Die Makrophagen wurden durch die braune Färbung identifizierbar.

2.6.3 PCNA-Färbung (proliferating cell nuclear antigen)

In dieser Färbetechnik wurde mittels einer PCNA-Färbung, die als Kofaktor der DNA-Polymerase dient, die Zellproliferation nachgewiesen.

Nach der Präparat-Entparaffinierung wurden die endogenen Peroxidasen in einer 0,4%igen Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Für die Erhöhung der

II Material und Methoden

Permeabilität wurden die Präparate mit 0,1%igem nichtionischen Triton X-100™ (SIGMA Chemical) in PBS-Puffer getaucht und mit diesem einmal gewaschen. Danach wurden sie für vier Minuten in Trispuffer bei pH 9 (TBS, Tris Buffered Saline, DAKOCYTOMATION GmbH, Hamburg, Deutschland) vorbehandelt, um eine Reaktion der antigenen Determinante (=Epitop) mit dem spezifischen Ak zu ermöglichen. Nach fünfzehn Minuten Abkühlung erfolgte eine zweimalige Spülung mit PBS und 10%igem Wasserstoffperoxid für je fünf Minuten. Die Präparate wurden dann im Blockierungspuffer aus 1%igem Rinderserumalbumin (BSA, Bovines Serum-Albumin, SIGMA, Taufkirchen, Deutschland) in PBS-Puffer zehn Minuten lang inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Sekundär-Ak zu verhindern und um eine spezifische Adsorption des Primärantikörpers zu ermöglichen. Als spezifischer Primär-Ak wurde PCNA-AB-1, ein monoklonaler Maus-Antikörper vom IgG-Typ gegen PCNA (DAKO M 0879, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt und für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine zweimalige Spülung in Phosphatpuffer (PBS-Puffer) für je fünf Minuten und eine Spülung in PBS-Puffer mit 10%iger Wasserstoffperoxidlösung für weitere fünf Minuten. Anschließend wurde als Sekundär-Ak monoklonales, biotinyliertes Anti-Maus-IgG (DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:400 mit 5%igem Rinderserumalbumin hinzugefügt und für zwölf Stunden bei 4°Celsius inkubiert. Anschließend wurde der Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen und mit dem AEC-Komplex (SIGMA, Taufkirchen, Deutschland) für dreißig Minuten bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Zwischendurch wurden die Präparate mit PBS-Puffer gespült. Durch Hinzugabe von Meerrettichperoxidase (HRP) und Wasserstoffperoxid mit 3'3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB plus Kit, Burlingame, CA, USA) entstand eine braune, unlösliche Färbung. Für die Differenzierung und Vermeidung der Nachfärbung erfolgte schließlich die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Spülung mit Leitungswasser. Abschließend erfolgte die Einbettung in Aquatex (Merck 8562, Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.6.4 DAPI-Färbung (4,6-Diamidinophenylindol)

Zur Zellkernfärbung wurde ein Fluoreszenzfarbstoff DAPI (SIGMA, Deisenhofen, FRG, Deutschland) eingesetzt, der zur Visualisierung der Gesamtzellzahl dient. DAPI wurde bei 4°Celsius lichtgeschützt gelagert. Die Präparate wurden in TritonX-100-Lösung bei 4°Celsius über Nacht inkubiert und bis maximal eine Stunde vakuumiert. Die Lösung wurde anschließend gegen DAPI-Färbepuffer bestehend aus EDTA, NaCl und Phosphatpuffer (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) ausgetauscht und erneut für zehn Minuten im Vakuum inkubiert. Anschließend erfolgte das Einlegen in einen 0,1%igen Natrium-Pyrophosphat-Puffer und 0,1%igen Iminodiacetic-Ionenaustauscher (SIGMA, Deisenhofen, Deutschland), anschließend kurzes Einlegen in ein Ultraschallbad. Im Dunkeln wurden die Präparate mit DAPI zehn Minuten lang gefärbt und lichtgeschützt getrocknet. Schließlich erfolgte die Fixierung mit Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium. Daraus resultierte im UV-Licht eine intensiv blau leuchtende Farbe.

Die Aufgabe von DAPI war, an Adenin-Thymin-reichen Regionen der Doppelstrang-DNA im Zytoplasma zu binden. Unter UV-Licht kam es zu intensiv blau leuchtenden Farbeindrücken bei einem Absorptionsmaximum von 365 nm und einem Emissionsmaximum von 418 nm.

2.6.5 Kollagen Typ I und Typ III Färbung

Nach der Entparaffinierung wurden die Präparate zweimal für jeweils zehn Minuten in 100%igen Ethanol überführt. Danach erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidase mit der 0,4%igen Wasserstoffperoxidlösung. In absteigender Alkohollösung von 100% bis 10% wurden die Präparate für jeweils zehn Minuten gespült. Im nächsten Schritt wurden sie zweimal jeweils für fünf Minuten in Zitronensäurepuffer von 10 mmol bei einem pH von 5,5 und einer Temperatur von 95°C gekocht. Anschließend wurden sie in destilliertes Wasser getaucht. Die Präparate wurden danach in PBS-Puffer inkubiert und mit Rabbit-

II Material und Methoden

Normalserum (Vectastain ABC Kit PK 4500, Vector Laboratories Burlingame, USA) für zehn Minuten geblockt. Danach wurden sie mit dem ersten Antikörper, dem polyklonalen IgG der Ziege (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA), gegen das Kollagen Typ I und gegen das Kollagen Typ III in Verdünnung von 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Spülung mit PBS-Puffer wurden sie mit dem zweiten Antikörper, dem biotinylierten Anti-IgG der Ziege (Anti-Goat-Immunglobulin, Vectastain ABC Kit PK 4500, Vector Laboratories Burlingame, USA), 1:400 verdünnt inkubiert. Die Präparate wurden erneut gespült und mit DAB und PBS-Puffer in destilliertes Wasser überführt. Anhand dieser Technik konnte das Kollagen durch Braunfärbung markiert werden. Mit destilliertem Wasser erfolgte die Spülung und anschließend Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für drei Minuten. Mit diesem Schritt wurden die Zellkerne blau gefärbt. Schließlich wurden sie für zehn Minuten mit Leitungswasser gespült, getrocknet und eingedeckt.

2.7 Auswertung

2.7.1 Verwendete Geräte für die Auswertung der Gefäßpräparate

Für die quantitative Bestimmung der Morphometrie wurde ein Mikroskop der Firma Leica (Leica DM-RBE, Wetzlar, Deutschland) mit dem Bildverarbeitungssystem Q600 (Quantimet 600 von Leica, Wetzlar, Deutschland) und der Bildverarbeitungssoftware Qwin (Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Dieses Bildverarbeitungssystem machte es möglich, die in dem Versuch verwendeten Präparate, durch Messung von Flächen, Volumen, Längen und Entfernungen zu quantifizieren. Zur Aufnahme eines mikroskopischen Bildes wurde eine 3-CCD-Farbvideokamera der Firma Sony verwendet. Diese Kamera erzeugte ein elektronisches Signal, das proportional zur Helligkeit des Bildes war,

II Material und Methoden

das dann zu sogenannten Pixeln (Bildpunkten) digitalisiert wurde. Für jeden Pixel wurde die Helligkeit des Bildes ermittelt, als Grauwert zwischen 0 und 255 kodiert und schließlich digital vom Quantimet für die Analyse herangezogen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde die Quecksilber-Höchstdrucklampe eingeschaltet. Die Farbvideokamera wurde gegen das lichtstärkere Schwarzweiß-High Performance-CCD-Kamera der Firma COHU ausgetauscht. In einem Image Setup Menü wurde die Slow-Analogue-Kamera angewählt. Die Präparate wurden unter das Mikroskop gelegt, das Licht ausgeschaltet und für die jeweilige Fluoreszenzfärbung den entsprechenden Filterblock in den Strahlengang gebracht.

In diesem Versuch wurden die Präparate unter einem 2,5er (25-fache Vergrößerung im Okular bzw. 44,5-fache Vergrößerung auf dem Bildschirm) und einem 10er Objektiv (100-fache Vergrößerung im Okular, 178-fache Vergrößerung auf dem Bildschirm) verwendet. Der Maßstab auf dem Bildschirm entsprach bei 1 cm Größe 56 μm in dem 10er Objektiv und 225 μm im 2,5er Objektiv.

2.7.2 Morphometrische Auswertung

Vor dem Auflegen des ersten Präparates erfolgte zum Kameraabgleich einmal täglich ein Weißabgleich, indem ein leerer Objektträger mit einem Deckglas bestückt unter das Mikroskop gelegt wurde. Danach wurden die zu untersuchenden Präparate unter das Mikroskop gelegt. Nach dem Auflegen und Scharfstellen der einzelnen Präparate wurden alle Messungen drei Mal durchgeführt und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Die mit EvG-gefärbten Querschnitte wurden zur Flächenbestimmung angewendet, um die Ausprägung der Neointima und Media bestimmen zu können. Diese Messungen wurden jeweils an drei verschiedenen Querschnittebenen bestimmt, im Stentbereich, im

Übergangsbereich zwischen der gestenteten Aorta und der nativen Aorta und in der nativen Aorta, wie in der Abbildung 8 dargestellt.

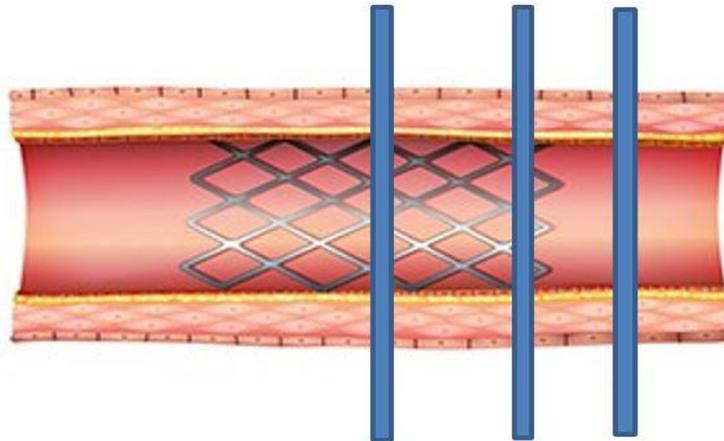


Abbildung 8: Angefertigte Querschnitte, von links: Im Stent in der Stentmitte (links), im Randbereich des Stents als Stentende (mitte) und in der nativen Aorta (rechts).

2.7.2.1 Auswertung der histologischen Färbungen

Aus der histologischen Färbung wurden die Flächen der Neointima und Media als Ausdruck der Restenose ermittelt. Die HE-Färbung war eingeschränkt verwertbar, so dass optional die EvG-Färbung durchgeführt wurde, die einzelne Strukturen wie elastische Fasern besser auflöste. Zur Berechnung der zirkulären Neointimafläche in mm^2 wurde die Differenz zwischen der Lumenfläche und der Fläche innerhalb der Lamina elastica interna abzüglich der angeschnittenen Stentstreben gemessen. Bei der regionären Neointima wurden die Flächen innerhalb des Präparatquerschnitts summiert. Für die Fläche der Media in mm^2 wurde die Fläche innerhalb der Lamina elastica interna von der Fläche innerhalb der Lamina elastica externa subtrahiert.

Die nächsten Abbildungen zeigen den Vorgang zur Flächenberechnung der Neointima und Media.

II Material und Methoden

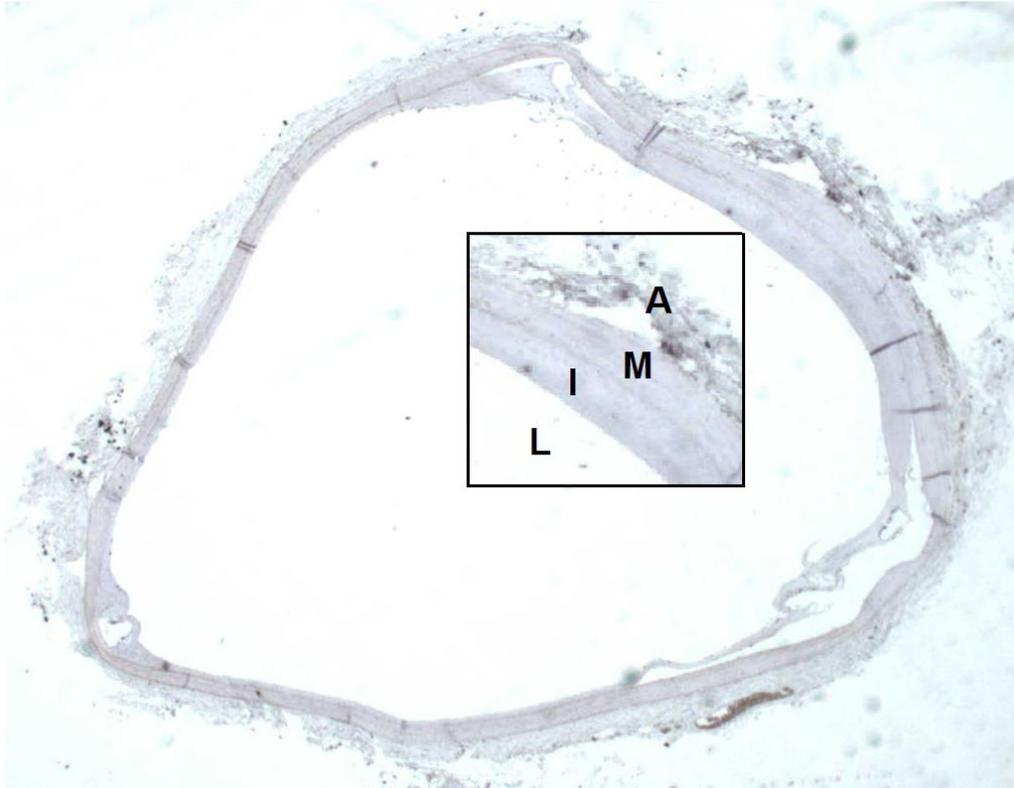


Abbildung 9: EvG-Färbung. Vorbereitung für die Flächenberechnung der Neointima und Media. Tiernummer 4 in der Stentmitte mit 2-facher Vergrößerung. A = Adventitia, I = Intima mit Neointima, M = Media, L = Lumen.



Abbildung 10: Flächenberechnung. a) Im Schritt 1 wurde zunächst die Gesamtfläche gemessen, bestehend aus Media, Neointima und Lumen. A = Adventitia. b) Im Schritt 2 wurde die Fläche aus Intima und Lumen gemessen, diese wurde dann von Schritt 1 abgezogen und ergab die Mediafläche. c) Im Schritt 3 wurde die Lumenfläche gemessen, diese wurde von Schritt 2 abgezogen, daraus resultierte die Intimafläche.

2.7.3. Histopathologische Beurteilung der Aorten- und Stentsegmente

Die Präparate der Aorten- und Stentsegmente wurden histopathologisch bewertet. Ohne Angaben zur Gruppe wurden die Präparate kontinuierlich möglichst an aufeinanderfolgenden Tagen ausgewertet. Pro Objektträger gab es drei Querschnitte, alle drei wurden jeweils betrachtet. Aus den drei Querschnitten pro Objektträger wurde der Querschnitt zur Beurteilung ausgewählt, der sich am besten zur Auswertung eignete. Von den Aorten- und Stentsegmenten wurden die Kriterien intimale Hyperplasie, Entzündungsreaktion nach Hofma et al. (inflammatory response) [60], Makrophagen, Fibrose, Destruktion elastischer Lamellen, Atrophie glatter Muskelzellen, Kalzifikationen, Ödem und Gefäßwandverletzung nach Schwartz et al. (Vessel injury Score) berücksichtigt [25].

2.7.3.1 Bestimmung der Färbungen als Gruppenvergleich

Für den Vergleich der verschiedenen Gruppen untereinander wurde der Ausprägungsgrad des jeweiligen Merkmals in 0, I, II oder III mit den entsprechenden prozentualen Anteilen eingeteilt. Für den Grad 0 war das Merkmal zu 0-10% vom gesamten Querdurchmesser des Präparates vorhanden. Für Grad I war das jeweilige Merkmal zu 11-40%, für Grad II 41-70% und für Grad III 71-100% vorhanden, siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Semiquantitative Auswertung in Prozent [%].

0	0-10%	Merkmal nicht bis kaum vorhanden
I	11-40%	Merkmal geringgradig vorhanden
II	41-70%	Merkmal mäßiggradig vorhanden
III	71-100%	Merkmal stark bis vollständig vorhanden

2.7.3.2 Endothel

Zur Beurteilung der Endothelien wurden die Präparate über eine immunhistochemische Färbemethode spezifisch markiert (siehe Kapitel 2.6.1). Hierdurch konnte der von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII der Blutgerinnungskaskade), der von Endothelzellen gebildet wird, gefärbt werden. Die Präparate wurden semiquantitativ ausgewertet. Die Messungen waren mit 0 (0-10%), 1 (11-40%), 2 (41-70%) und 3 (71-100%) durchgeführt und daraus der Mittelwert für einzelne Präparate bestimmt.

2.7.3.3 Makrophagen

Zur Bestimmung des Anteils an Makrophagen erfolgte die Immunhistochemie anhand der RAM-Färbung (siehe Kapitel 2.6.3). Mit Hilfe dieser konnte man die Makrophagen beurteilen, die sich bevorzugt in der Neointima, um die Stentstreben und Media aufhielten. Morphometrisch wurden die Makrophagen aus den Plaueflächen (in mm²) eines Präparates ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtplauefläche in Prozent gesetzt.

II Material und Methoden

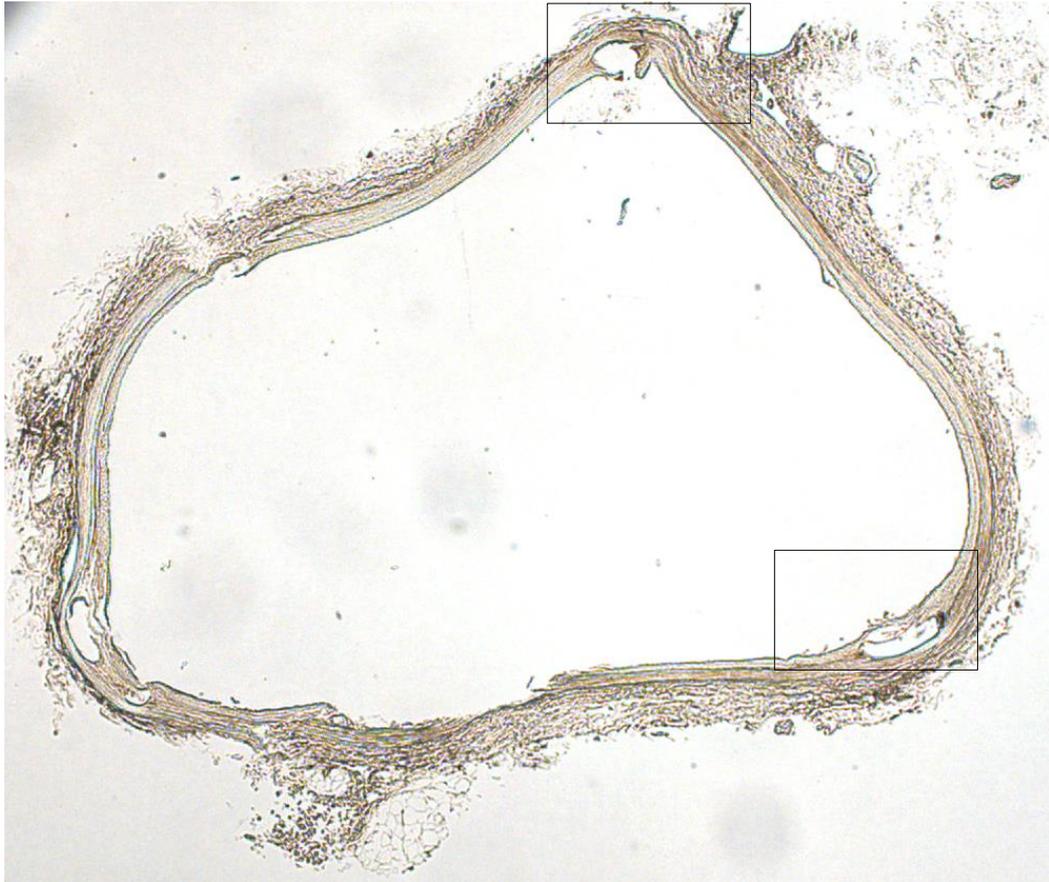


Abbildung 11: Beispiel einer RAM-Färbung zur Makrophagenbestimmung. Tiernummer 5 in der Stentmitte mit 2,5-facher Vergrößerung. Die beiden Kästen zeigen die Vergrößerung in Abbildung 12 und 13.

II Material und Methoden

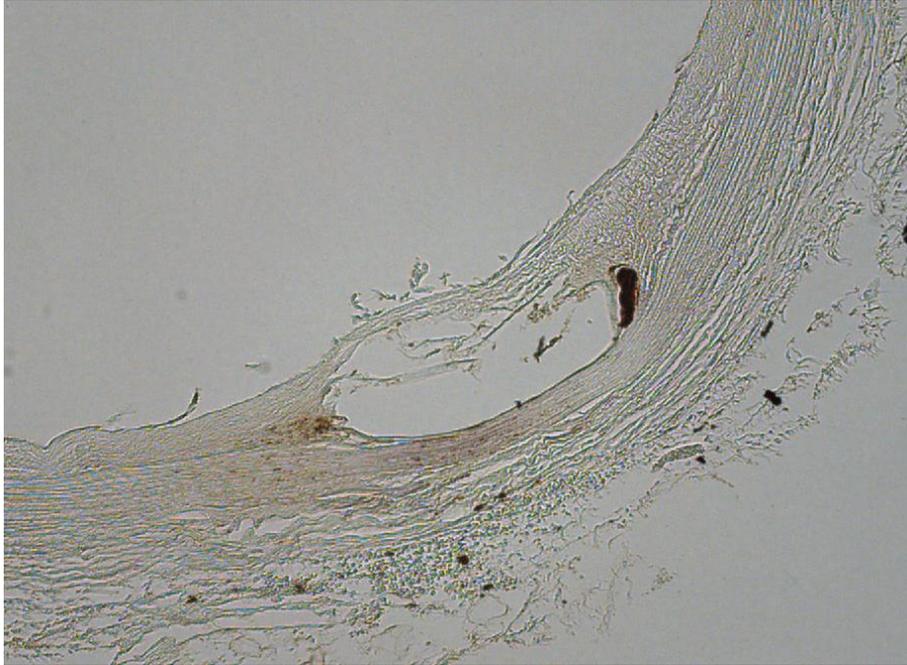


Abbildung 12: Die RAM-Färbung von der Tiernummer 5 in der Stentmitte in 10-facher Vergrößerung aus dem unteren Kasten in Abbildung 11.

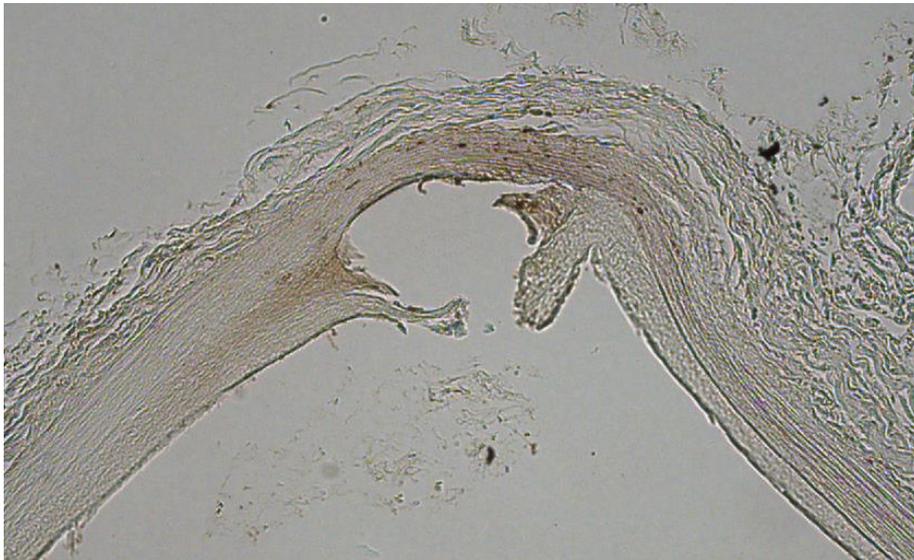


Abbildung 13: Die RAM-Färbung von der Tiernummer 5 in der Stentmitte in 10-facher Vergrößerung aus dem oberen Kasten in Abbildung 11.

2.7.3.4 Zellkerndichte in den Wandschichten und Proliferationsindex

Zur Bestimmung der Zelldichte und Proliferation wurden anhand der immunhistochemischen PCNA- und DAPI-Färbung (siehe Kapitel 2.6.4 und 2.6.5) die Messungen durchgeführt. Hierzu wurden aus 5-10 Feldern eines Präparatschnittes alle Zellkerne zusammengezählt und die Plaueflächen in mm² gemessen. Daraus entstanden die Gesamtzellzahl und die Anzahl der zum Zeitpunkt des Versuchsendes proliferierenden Zellen. Der Proliferationsindex wurde aus dem Verhältnis der proliferierenden Zellen und der Gesamtzellzahl zur Fläche jeweils als Mittelwert errechnet.

2.7.3.5 Kollagen Typ I und Typ III

Zur Beurteilung des Kollagens wurde anhand der immunhistochemischen Färbung das Kollagen Typ I und Typ III jeweils spezifisch markiert (siehe Kapitel 2.6.6). Im Präparat wurden alle Flächen des markierten Kollagen Typ I in mm² summiert und alle Flächen des markierten Kollagen Typ III in mm² summiert. Anschließend wurde eine Ratio von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III gebildet.

Abbildungen 14 und 15 zeigen ein Beispiel der immunhistochemischen Färbung zur Bestimmung von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III.

II Material und Methoden

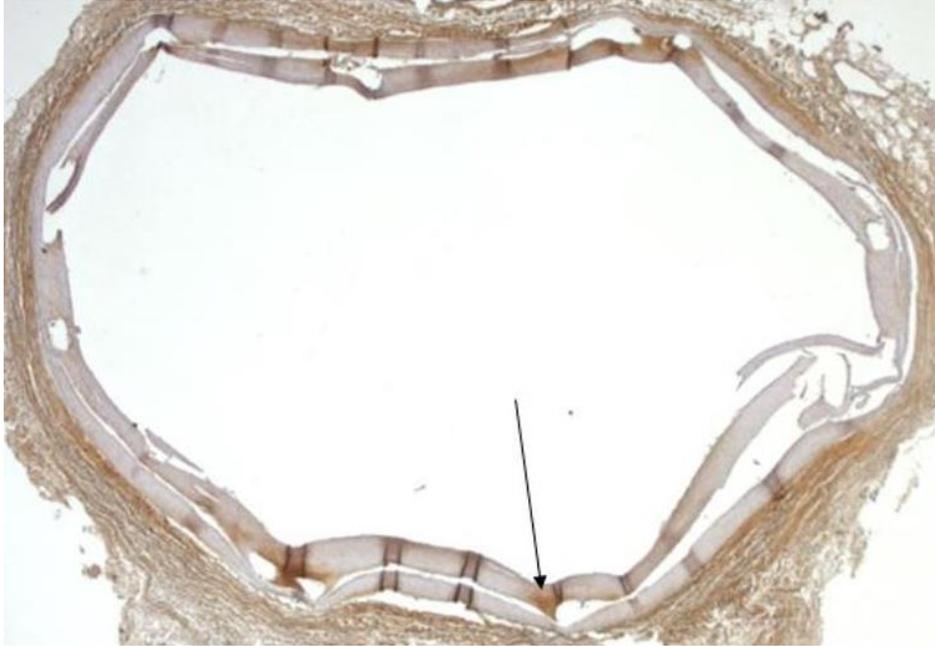


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung zur Bestimmung von Kollagen Typ I in der Stentmitte (Pfeil als Beispiel). Beispiel Tiernummer 7 aus der Rapamycingruppe. 2,5-fache Vergrößerung.

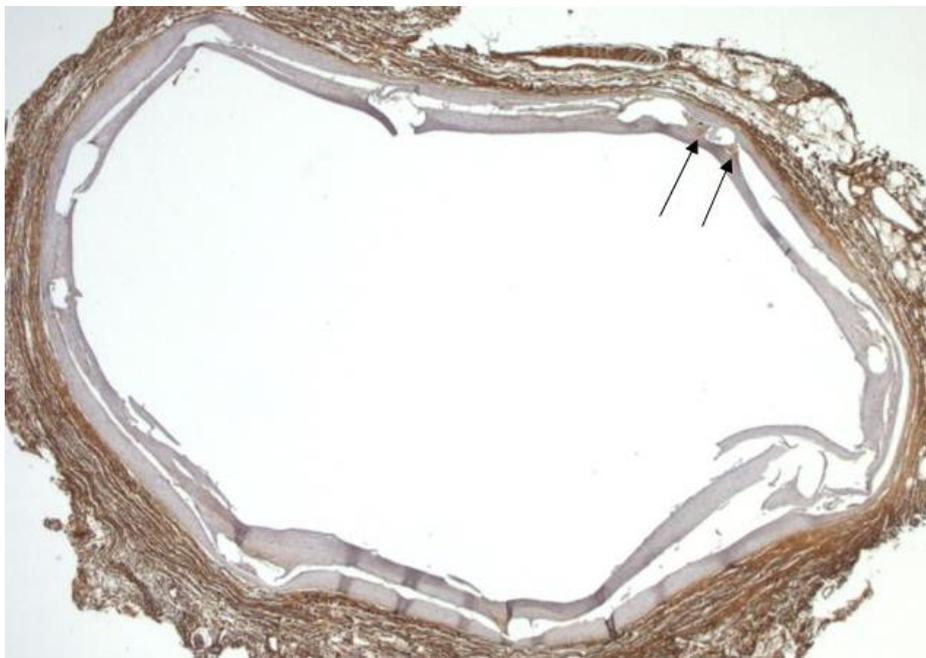


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung zur Bestimmung von Kollagen Typ III in der Stentmitte (Pfeile als Beispiel). Gleiches Tier aus Abbildung 14 (Tiernummer 7 aus der Rapamycingruppe). 2,5-fache Vergrößerung.

2.7.3.6 Gefäßwandverletzung - Vessel Injury Score

In vielen Studien ist die Auswertung der durch Stentimplantation verursachten Verletzungen der Gefäßwand als sinnvoller Parameter etabliert. Erstmals wurde diese 1992 von Schwartz et al. beschrieben und entsprechend eingeteilt, die in Tabelle 5 modifiziert dargestellt wurde [25]. In diesem Versuch wurde jede Stenose betrachtet, ausgewertet und daraus der Mittelwert für das gesamte Präparat gebildet.

Tabelle 5: Gefäßwandverletzung – Modifizierter Vessel Injury Score nach Schwartz et al. [25].

0	Lamina elastica interna intakt Endothel denudiert Media komprimiert, nicht zerrissen
1	Lamina elastica interna zerrissen Media komprimiert, nicht zerrissen
2	Lamina elastica interna zerrissen Media sichtbar gerissen Lamina elastica externa intakt, aber komprimiert
3	Lamina elastica externa zerrissen Media mit großen Einrissen mit Ausbreitung in die Lamina elastica externa, teilweise Einkerbung der Streben in der Adventitia

2.7.3.7 Entzündungen in der Gefäßwand - Inflammation Score

In vielen Studien wurde nach Gefäßtrauma oder Stentimplantation die Entstehung von entzündlichen Veränderungen im Gefäß nachgewiesen. Erstmals wurde diese 1998 von Hofma et al. und Kornowski et al. beschrieben und stellten eine Inflammation Score auf [60, 61]. Nach Art und Ausmaß bewerteten Kornowski et al. die Entzündungen direkt um die Stenosen, wo die Verletzungen durch den Stent nach der Implantation am größten waren [60]. Je mehr Entzündungszellen in den inneren Gefäßwandschichten zu finden waren,

II Material und Methoden

desto höher war bei ihnen der Score [61]. In diesem Versuch wurde für den Inflammation Score nach Kornowski entschieden, da durch die Stentbeschichtung in unserem Versuch der Bereich um die Streben besonders bedeutsam war. Dabei wurden das Ausmaß und die Dichte der infiltrierenden Entzündungszellen an einzelnen Streben in der Neointima mit einbezogen. Folgende modifizierte Graduierung nach Kornowski et al. wurde schließlich erstellt, siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Modifizierter Inflammation Score nach Kornowski et al. [60].

0	0 – 10 %	Kaum Entzündungszellen um die Stentstreben
1	11 – 40 %	Mild, mit minimal entzündlichen Infiltraten um die Stentstreben
2	41 – 70 %	Mäßiggradige entzündliche Infiltrate um die Stentstreben
3	71 – 100 %	Ausgeprägte entzündliche Infiltrate um die Stentstreben

2.7.4 Messwertdefinitionen

Zur Auswertung wurden die Messwerte in Tabelle 7 ermittelt und statistisch verglichen.

Tabelle 7: Messwerte.

Intimafläche in mm ²	Aus Fläche zwischen Lamina elastica interna und Lumen
Mediafläche in mm ²	Aus Fläche zwischen Lamina elastica interna und Lamina elastica externa
Zelldichte in Zellzahl/mm ²	Aus Gesamtzellzahl pro Intimafläche
Proliferationsindex	Positive Zellen der Neointima / Gesamtzellzahl der Intima

2.8 Statistische Auswertung

Alle Auswertungen, Analysen und Graphikerstellungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes JMP (Version 12.2.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Zur Auswertung der Neointima- und Mediaflächen wurde für Einzelgruppenvergleiche der Tukey-Kramer-Test gewählt. Dabei wurde das Signifikanzniveau bei multiplem Testen auf die p-Werte angepasst. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

III Ergebnisse

Von 52 Tieren verstarben 12 Tiere durch periinterventionelle Komplikationen wie Blutungen oder systemische Infektionen, so dass 40 Tiere das Versuchsende erreichten und in die Auswertung mitgingen. Die perkutane transluminale Angioplastie mit anschließender Stentimplantation verlief bei allen Versuchstieren unkompliziert. Bei keinem der Tiere entwickelte sich eine Stentthrombose. Nach der Euthanasie am Versuchsende wurde die Aorta abdominalis mit dem Stent der einzelnen Tiere entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die Präparate wurden aus dem Bereich der gestenteten Aorta in der Stentmitte und am Stentende sowie im Bereich der stentfreien Aorta angefertigt. Eine geringe Anzahl an Präparaten konnten aufgrund fehlerhafter Färbung oder Präparatschaden nicht ausgewertet werden.

3.1 Morphometrische Parameter und Histopathologie

Mit den histopathologischen Färbungen wurden die Neointima- und die Mediaflächen gemessen und in mm² ausgewertet. Anhand der EvG-Färbung wurden Zellkerne schwarzbraun und Kollagenfasern der Lamina elastica externa zwischen Intima und Media rotbraun gefärbt. Dadurch war die Abgrenzung zwischen Intima und Media gut erkennbar. Im Folgenden wurde die Wirkstofffreie Kontrollgruppe, die Rapamycin beschichtete Vergleichsgruppe und die drei Shikonin beschichteten Dosisgruppen miteinander verglichen. Für den Vergleich der Werte der Neointima- und Mediafläche unter den Gruppen wurde für jede Gruppe ein Minimalwert, 25% Quantile, Median, 75% Quantile, 90% Quantile und Maximalwert und anhand dessen Box Plot- Diagramme erstellt. Für den Vergleich der Werte der Gefäßwandverletzung und Entzündungsreaktion unter

III Ergebnisse

den Gruppen wurde nach semiquantitativen Messungen zur groben Einschätzung Mosaikdiagramme erstellt.

3.1.1 Neointimafläche

3.1.1.1 Neointimale Fläche in der Stentmitte

In der Stentmitte zeigte die Wirkstoff-freie Kontrollgruppe mit einem Median von 0,6 mm² die geringste Ausprägung an Neointimafläche. An zweiter Stelle war die Rapamycingruppe mit einem Median von 0,68 mm² nachweisbar, wobei ihre maximale Neointimafläche von 0,95 mm² kleiner als die von allen anderen Tieren war. Die größte Neointimafläche von allen erhobenen Tieren zeigte sich bei einem Tier aus der hochdosierten Shikoningruppe mit 1,66 mm².

Die unterschiedlich dosierten Shikoningruppen zeigten alle eine höhere neointimale Flächenbildung gegenüber der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe und der klinisch angewendeten Rapamycingruppe. Die moderat dosierte Shikoningruppe zeigte im Median weniger neointimale Gewebsneubildung mit 0,83 mm² Fläche als die niedrig dosierte Gruppe mit 0,98 mm², wobei dieser Unterschied nicht signifikant ausfiel. Die Tiere der hoch dosierten Shikoningruppe zeigten bei 1,01 mm² die höchste Ausprägung an neointimaler Flächenbildung und hiermit signifikant höhere Werte als die Tiere der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe ($p=0,0275$). Zur graphischen Veranschaulichung siehe hierzu Abbildung 16. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

III Ergebnisse

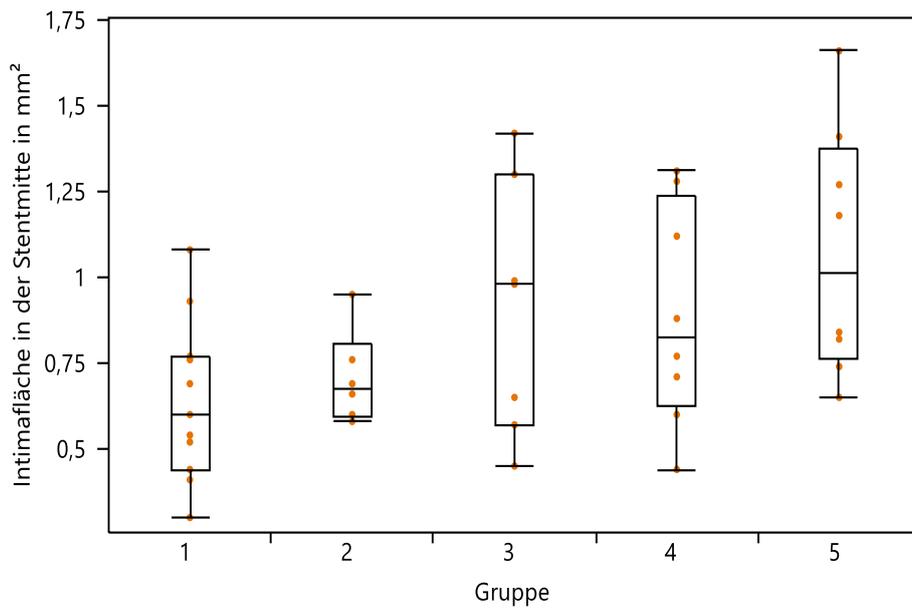


Abbildung 16: Neointimafläche in der Stentmitte in mm². 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.1.1.2 Neointimale Fläche am Stentende

Unter den fünf Tiergruppen am Stentende zeigte die Rapamycingruppe im Median von 0,68 mm² die geringste Neointimafläche. Ihr Maximalwert von 0,87 mm² Fläche war geringer als die Flächen von alle anderen Tieren und zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Unter den Verum-Gruppen zeigte die hoch dosierte Gruppe im Median bei 0,93 mm² Neointimafläche am Stentende die geringste Ausprägung an Gewebsneubildung, wobei diese höher als unter den Vergleichsgruppen Rapamycin und Kontrolle (0,91 mm²) war. Ihr Maximalwert bei 1,32 mm² Fläche war jedoch niedriger als die der Kontrollgruppe bei maximal 1,43 mm² Fläche. Im Median zeigte die moderat dosierte Shikoningruppe die höchste Neointimafläche mit 1,16 mm². Die niedrig dosierte Shikoningruppe zeigte einen Median von 0,95 mm². Hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zur

III Ergebnisse

graphischen Veranschaulichung siehe hierzu Abbildung 17. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

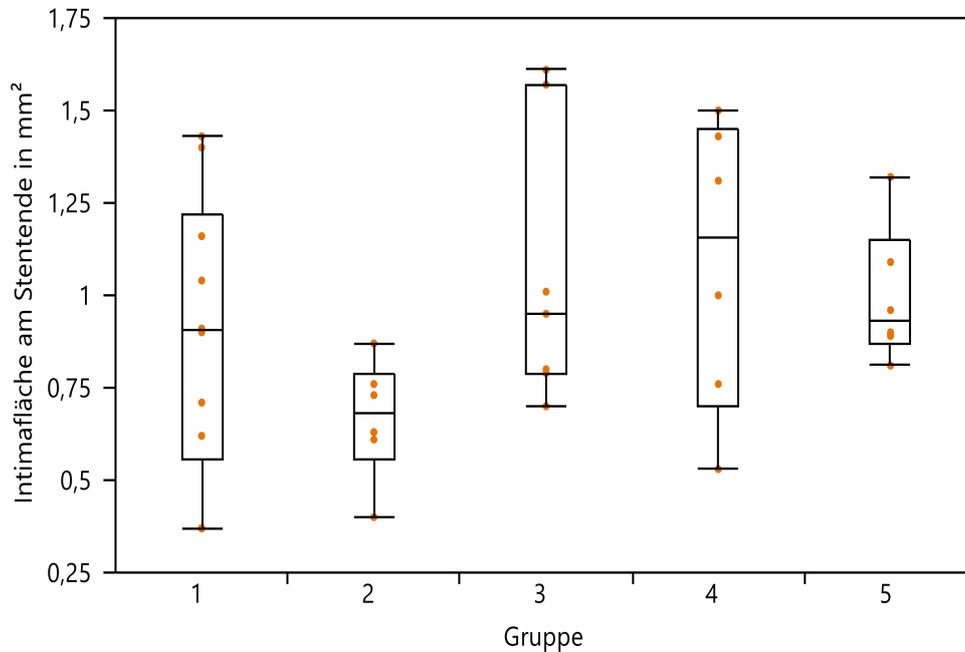


Abbildung 17: Neointimafläche am Stentende in mm². 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycingruppe. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.1.1.3 Neointimale Fläche in der nativen Aorta

In der stentfreien Aorta ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Neointimaflächen zwischen den Gruppen. Die niedrig dosierte Shikoningruppe zeigte im Median die geringste neointimale Fläche bei 0,59 mm². Die höchste Ausprägung an neointimaler Flächenbildung unter allen Tiergruppen zeigten die moderat dosierte Shikoningruppe mit einem Median von 1,02 mm² und die Rapamycingruppe von 1,01 mm². Nach der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe mit 0,77 mm² im Median war die hoch dosierte Shikoningruppe bei 0,79 mm² im Median knapp über der Kontrollgruppe. Insgesamt zeigten im Median die niedrig

III Ergebnisse

und hoch dosierten Shikoningruppen geringere Neointimaflächen als die Rapamycingruppe, auch wenn die größte Neointimafläche ein Tier aus der niedrig dosierten Shikoningruppe mit 1,72 mm² aufwies. Die moderat dosierte Shikoningruppe und die Rapamycingruppe zeigten kaum voneinander abweichende Flächenbildungen im Median. Zur graphischen Veranschaulichung siehe hierzu Abbildung 18. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

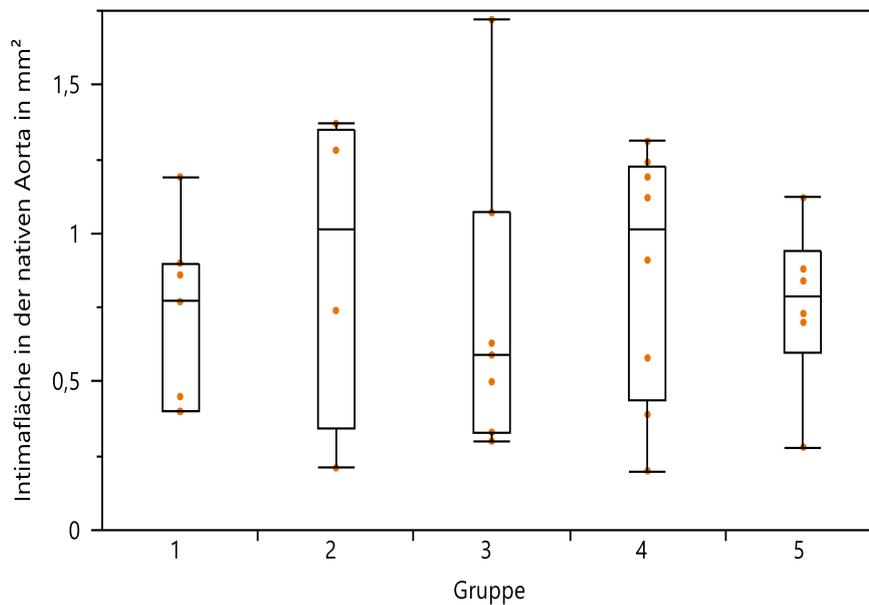


Abbildung 18: Neointimafläche in der nativen Aorta in mm². 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.1.2 Mediafläche

3.1.2.1 Mediafläche in der Stentmitte

Mit einem Median von 0,58 mm² zeigte die niedrig dosierte Shikoningruppe die geringste Mediafläche gegenüber den übrigen Gruppen. An zweiter Stelle stand die Wirkstoff-freie Kontrollgruppe bei 0,64 mm² Fläche im Median, gefolgt von der hoch dosierten Shikoningruppe mit 0,74 mm² Mediafläche, wobei diese eine leichte Tendenz zur geringeren Fläche gegenüber Rapamycin mit einer Mediafläche von 0,77 mm² aufzeigte. Die größte Mediafläche betrug mit 0,82 mm² in der mittel dosierten Shikoningruppe. Auch hier ergaben sich unter den fünf Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 19. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

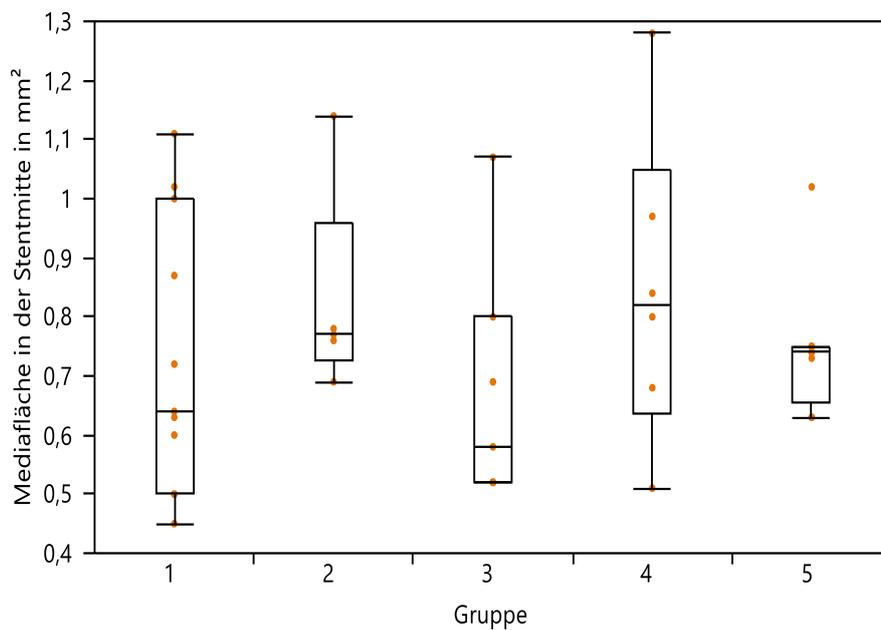


Abbildung 19: Mediafläche in der Stentmitte in mm². 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.1.2.2 Mediafläche am Stentende

Am Stentende zeigten alle Tiergruppen bis auf die hoch dosierte Shikonin Gruppe eine Mediafläche zwischen 0,87 und 0,88 mm² im Median. Die hoch dosierte Shikonin Gruppe war bei einem Median von 0,76 mm² Fläche am geringsten ausgeprägt. Zwischen den fünf Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Mediaflächen am Ende der gestenteten Aorta. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 20. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

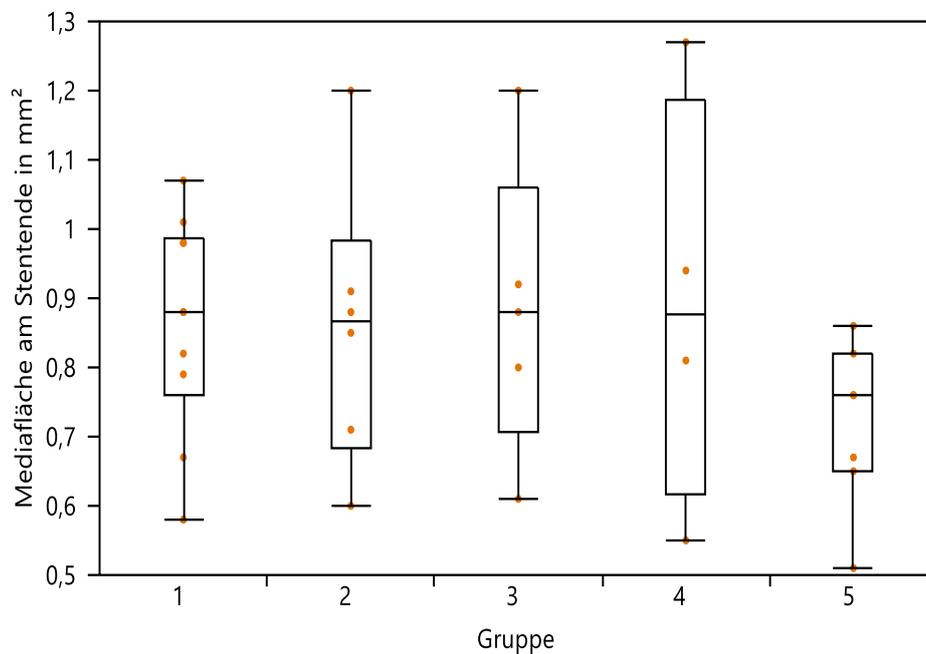


Abbildung 20: Mediafläche am Stentende in mm². 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.1.2.3 Mediafläche in der nativen Aorta

In der stentfreien Aorta zeigte die niedrige Shikonindosis bei einem Wert von 0,78 mm² die kleinste Mediafläche im Median. Die Hochdosisgruppe zeigte bei einem

III Ergebnisse

Wert von 1,02 mm² im Median die zweitkleinste Mediafläche. Die Rapamycingruppe und die Gruppe der mittleren Shikonindosis zeigten bei Mediaflächen von 1,12 und 1,13 mm² die größten Flächen im Median, größer als die Wirkstoff-freie Kontrollgruppe bei 1,08 mm² Fläche im Median, wobei ein Tier aus der Kontrollgruppe die größte Mediafläche mit 1,71 mm² gegenüber allen anderen Tieren hatte. Zwischen den Shikonin-, Rapamycin- und Kontrollgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Abbildung 21 zeigt die Graphik der Mediafläche in der nativen Aorta. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

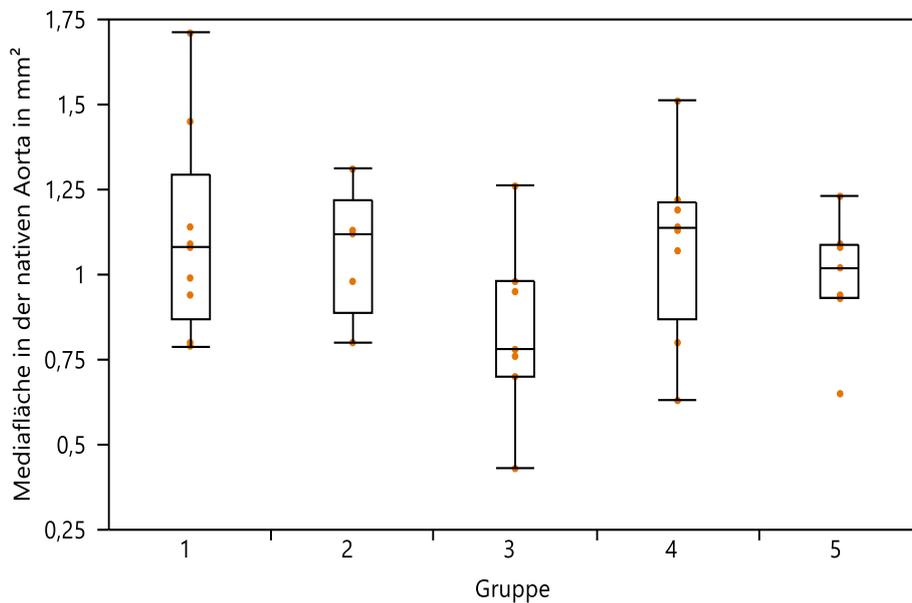


Abbildung 21: Mediafläche in der nativen Aorta in mm². 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.1.3 Gefäßwandverletzung

Durch die bei Stentimplantation entstandene Gefäßwandverletzung wurde mittels vessel injury score nach Schwartz et al. in modifizierter Form graduiert, wie bereits in Kapitel 2.7.3.6 beschrieben [25]. Hier war ein Wert pro Stentstrebe

III Ergebnisse

vergeben und daraus der Mittelwert für das gesamte Präparat gebildet worden. Dadurch waren die in Tabelle 5 angegebenen Gradeinteilungen 0, 1, 2 und 3 nicht mehr ersichtlich.

Grob betrachtet zeigte sich die geringste Gefäßwandverletzung unter den fünf Gruppen bei der Rapamycingruppe, gefolgt von der Kontrollgruppe. Die Shikoningruppen zeigten alle mehr Gefäßwandverletzungen als die Rapamycingruppe und auch tendenziell mehr als die Kontrollgruppe. Es war auch festzustellen, dass es bei steigender Dosis zu tendenziell erhöhten Verletzungen kam. Siehe hierzu das Mosaikdiagramm in Abbildung 22.

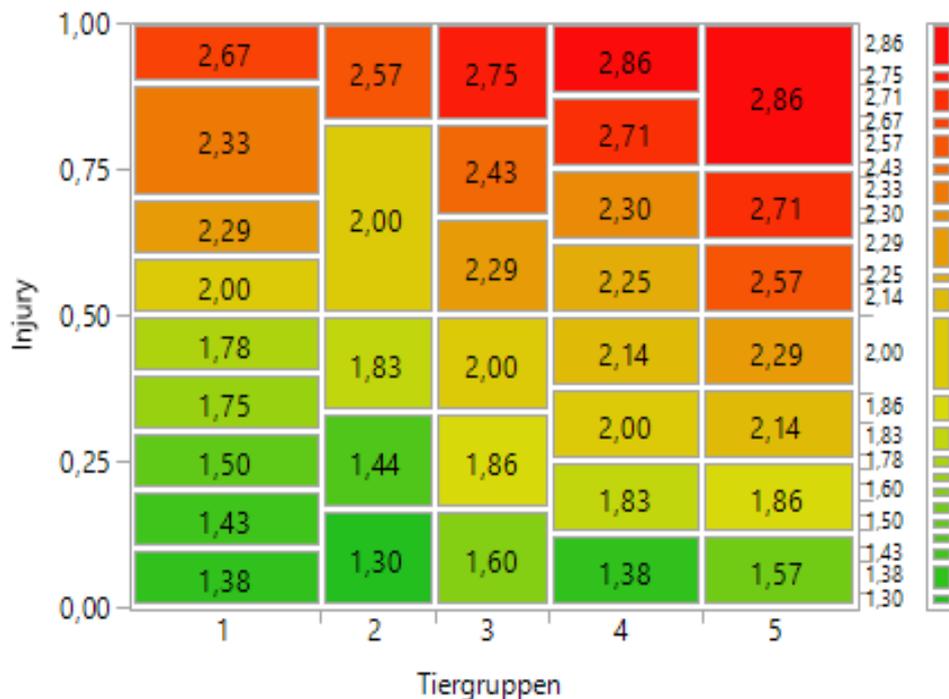


Abbildung 22: Mosaikdiagramm der Gefäßwandverletzung. Vessel injury score nach Schwartz et al. in modifizierter Form [25]. Farbeinteilung der einzelnen Präparate aus der jeweiligen Gruppe von gering (grün) über mäßig (gelb) bis starker (rot) Ausprägung der Gefäßwandverletzung mit integrierten Werten aus der semiquantitativen Skala. 1= Kontrollgruppe, 2 = Rapamycingruppe, 3 = Shikoningruppe Dosisgruppe I (2,5 µg/ml), 4 = Shikoningruppe Dosisgruppe II (5 µg/ml), 5 = Shikonin Dosisgruppe III (10 µg/ml).

3.1.4 Entzündungsreaktion in der Gefäßwand

Das Ausmaß entzündlicher Infiltrate wurden im vessel inflammation score erfasst, der von Kornowski et al. aufgestellt wurde [60]. Auch hier wurde ein Wert pro Stentstrebe vergeben und daraus der Mittelwert für das gesamte Präparat gebildet. Dadurch sind die in Tabelle 6 angegebenen Gradeinteilungen 0, 1, 2 und 3 nicht mehr ersichtlich.

Tendenziell zeigte die Kontrollgruppe das geringste Ausmaß an Inflammation vergleichend zu allen Tiergruppen, wobei in der Rapamycingruppe eine größere Spannweite der Inflammationsstärke zu erkennen war. Ihr Minimum fiel gegenüber allen Gruppen am geringsten und ihr Maximum höher als bei der Kontrollgruppe aus, zugleich jedoch niedriger als bei den Shikoningruppen. Bei Shikonin waren mehr entzündliche Infiltrate als in den Vergleichsgruppen festzustellen. Hierbei zeigte sich tendenziell eine stetige Zunahme der Inflammation bei steigender Shikoninkonzentration, wobei sich die Verteilung der Inflammation in der Gruppe der mittleren Dosis eher betont im oberen Bereich bewegte. Zur Veranschaulichung siehe das Mosaikdiagramm in Abbildung 23.

III Ergebnisse

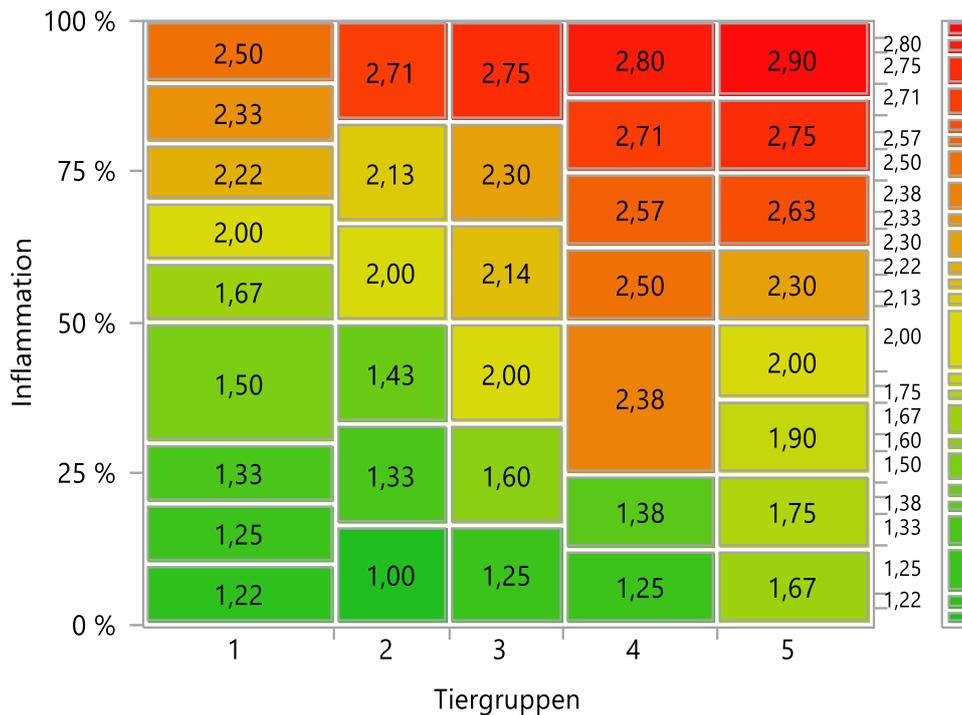


Abbildung 23: Mosaikdiagramm der Entzündungsreaktion. Modifizierter Inflammation Score nach Kornowski et al. [60]. Farbeinteilung der einzelnen Präparate aus der jeweiligen Gruppe von gering (grün) über mäßig (gelb) bis starker (rot) Ausprägung der Entzündungsreaktion mit integrierten Werten aus der semiquantitativen Skala. 1= Kontrollgruppe, 2 = Rapamycingruppe, 3 = Shikoningruppe Dosisgruppe I (2,5 µg/ml), 4 = Shikoningruppe Dosisgruppe II (5 µg/ml), 5 = Shikonin Dosisgruppe III (10 µg/ml).

3.2 Immunhistochemische Parameter

Mit den immunhistochemischen Färbungen wurden die Endothelzellen, die Makrophagenverteilung, der Proliferationsindex, das Kollagen, die Gefäßwandverletzung und die Entzündungsreaktion bestimmt.

Im Folgenden wurden die Wirkstoff-freie Kontrollgruppe, die mit Rapamycin beschichtete Vergleichsgruppe und die drei mit Shikonin beschichteten Dosisgruppen miteinander verglichen. Für die Auswertung der Endothelzellen,

III Ergebnisse

der Makrophagen, der Gefäßwandverletzung und der Entzündungsreaktion wurde die semiquantitative Skala von 0 bis 3 angewendet mit 0 für 0 - 10%, 1 für 11 – 40%, 2 für 41 – 70% und 3 für 71-100% Ausprägung. Für die Auswertung des Proliferationsindex und des Kollagens wurde die Fläche in mm² gemessen und jeweils ein Quotient daraus gebildet.

3.2.1 Endothel

Nach immunhistochemischer Färbung ließ sich der von Endothelzellen exprimierte vWF rotbraun markieren. Dessen Nachweis zeigte das Vorhandensein der Endothelzellen an. Ein fehlender Nachweis des vWF war auf einen Endothelzellverlust zurückzuführen. Für den Vergleich der Werte unter den Gruppen wurde die semiquantitative Skala als Grundlage erstellt. Für den Vergleich der Werte wurden die Messungen mit 0, 1, 2 und 3 graduiert und daraus der Mittelwert für einzelne Präparate bestimmt. Zur groben Einschätzung der Messwerte wurden schließlich Mosaikdiagramme erstellt.

3.2.1.1 Endothelialisierung in der Stentmitte

In allen Stentgruppen konnte bei jeweils mehreren Tieren eine nahezu vollständige oder vollständige Reendothelialisierung in der Stentmitte gefunden werden. Eine Reendothelialisierung von 71-100% war bei der hohen Shikonindosis mit grob 30% der Präparate am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Rapamycin und der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe mit jeweils um die 20%. In der Gruppe der niedrigen und mittleren Shikonindosis waren weniger Präparate mit mehr als 70% Endothelzellen zu erkennen. Wenn man die 41-70%ige Reendothelialisierung betrachtete, zeigten die Rapamycingruppe und die niedrig dosierte Shikoningruppe diese Ausprägung nicht. Dafür wies die Gruppe der mittleren Shikonindosis die stärkste Ausprägung auf, gefolgt von der Kontrollgruppe und schließlich der Gruppe mit der hohen Shikonindosis. 40% der

III Ergebnisse

Rapamycingruppe und 50% der niedrig dosierten Shikoningruppe zeigten deutliche Endothelzelldefekte. Die übrigen Gruppen zeigten deutlich weniger Endothelzelldefekte. Die geringste Ausprägung bei der Graduierung 0 der Reendothelialisierung (Endothelzellen bis zu 10%) zeigte sich in der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe. Zur Veranschaulichung siehe das Mosaikdiagramm Abbildung 24.

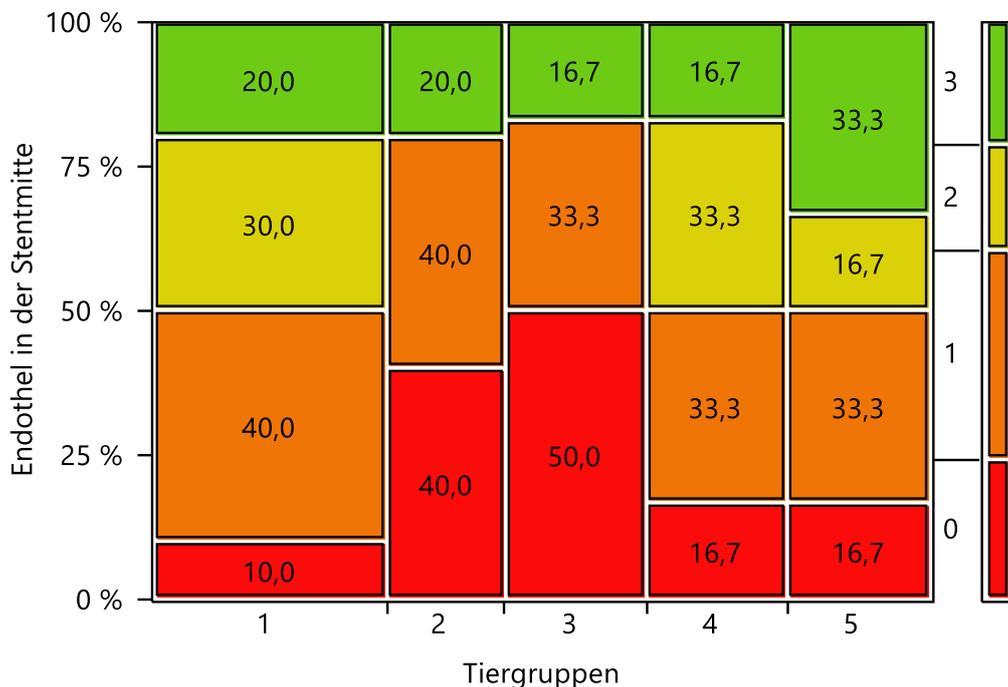


Abbildung 24: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung in der Stentmitte. Häufigkeitsverteilung der semiquantitativen Messung in prozentualer Verteilung. Hierbei bedeuten die oberen Kästchen eine fast vollständige Reendothelialisierung von 71-100% (grün), die gelben Kästchen eine Reendothelialisierung zwischen 41-70%, die orangenen Kästchen eine geringe Reendothelialisierung (zwischen 11-40%) und die unteren Kästchen (rot) eine nahezu fehlende Reendothelialisierung (zwischen 0-10%). Gruppe 1 = Ko, 2 = Rap, 3 = D I, 4 = D II, 5 = D III.

3.2.1.2 Endothelialisierung am Stentende

Am Stentende waren bei 71-100%iger Reendothelialisierung jeweils 20% der Präparate aus der Kontrollgruppe und aus der mittleren Dosisgruppe zu sehen. In keinem der Präparate der übrigen Tiergruppen zeigte sich eine gute Reendothelialisierung. Bei 50% der Präparate aus der hoch dosierten Shikoningruppe war eine Reendothelialisierung von 41-70% nachweisbar und damit am stärksten ausgeprägt innerhalb der 41-70%igen Reendothelialisierung. Alle anderen Tiergruppen wiesen auch ähnlich viele Endothelzellen in voriger Ausprägung auf, jedoch mit einem geringeren Prozentsatz der Präparate (um die 30% bei der niedrigen Shikonindosisgruppe, um 25 % bei der Kontrollgruppe, jeweils um die 17% bei der Rapamycin- und mittlerer Shikonindosisgruppe). Die geringsten Endothelzelldefekte zeigte die Kontrollgruppe, gefolgt von der hoch dosierten Shikoningruppe. Die meisten Endothelzellverluste zeigte die niedrig dosierte Shikoningruppe mit geringfügig weniger als 50% der Präparate. Siehe Abbildung 25.

III Ergebnisse

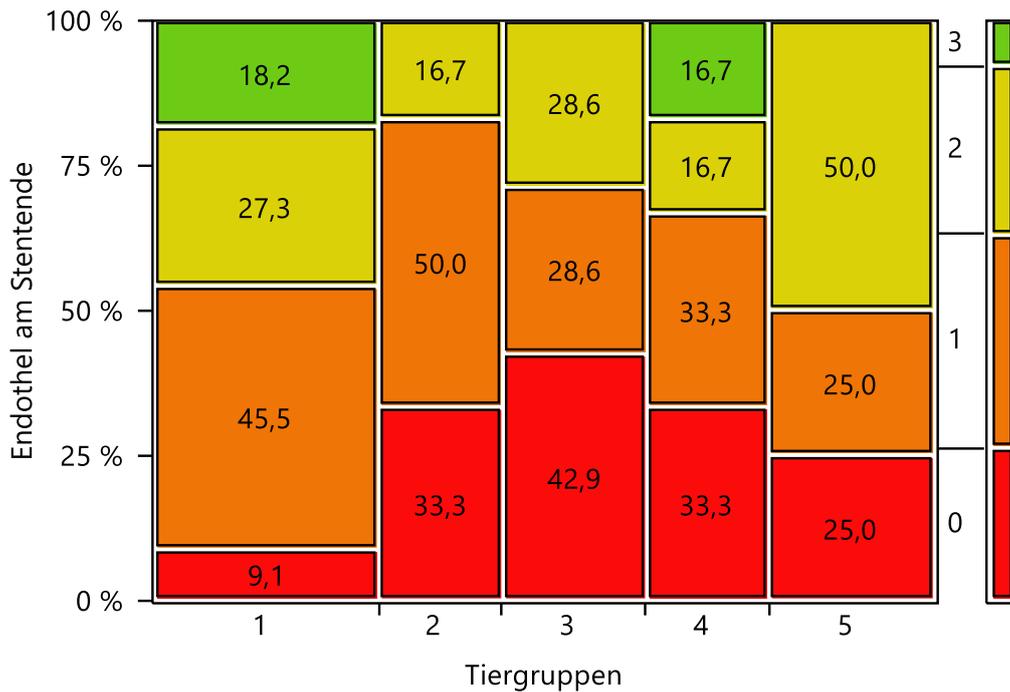


Abbildung 25: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung am Stentende. Häufigkeitsverteilung der semiquantitativen Messung in prozentualer Verteilung. Hierbei bedeuten die oberen Kästchen eine fast vollständige Reendothelialisierung von 71-100% (grün), die gelben Kästchen eine Reendothelialisierung zwischen 41-70%, die orangenen Kästchen eine geringe Reendothelialisierung (zwischen 11-40%) und die unteren Kästchen (rot) nahezu fehlende Reendothelialisierung (zwischen 0-10%). Gruppe 1 = Ko, 2 = Rap, 3 = D I, 4 = D II, 5 = D III.

3.2.1.3 Endothelialisierung in der nativen Aorta

Die Rapamycingruppe wies in der nativen Aorta die geringste Ausprägung bei der Reendothelialisierung mit maximal 40% auf. In dieser Gruppe zeigte kein Präparat eine über 40%ige Reendothelialisierung. Eine gute bis vollständige Reendothelialisierung mit 71-100% in der nativen Aorta war am stärksten ausgeprägt in der niedrig dosierten Shikoningruppe (40% und damit der höchste Prozentsatz), in geringerer Ausprägung die hohe Shikonindosisgruppe gefolgt von der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe. Die geringste Ausprägung der obig erwähnten Reendothelialisierungsausprägung war in der mittleren

III Ergebnisse

Shikonindosisgruppe (circa 20% der Präparate) zu beobachten. Vollständige Endothelzellverluste waren am häufigsten in der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe zu finden (circa 40% der Präparate), gefolgt von der Rapamycingruppe. Vollständige Endothelzelldefekte haben sich in den Gefäßen der mittleren Shikoningruppe nicht gezeigt. In der niedrigen und hohen Shikonindosisgruppe wies die geringste Anzahl der Präparate eine Endothelzellularfreiheit auf. Im Durchschnitt zeigten die Shikoningruppen die beste Reendothelialisierung in absteigender Konzentration. Siehe hierzu das Mosaikdiagramm in Abbildung 26.

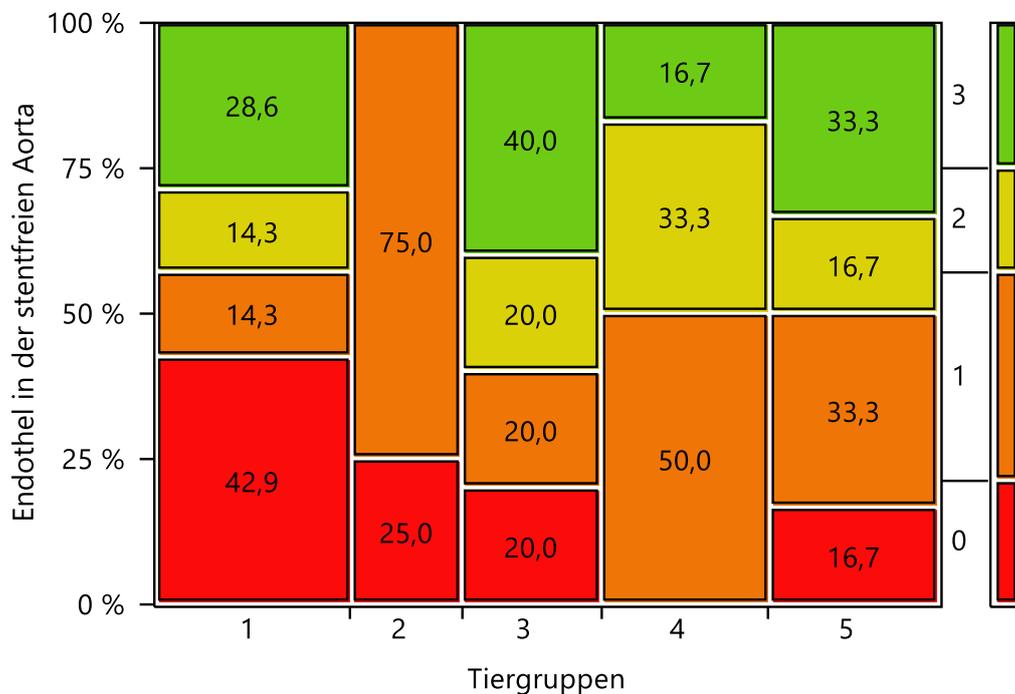


Abbildung 26: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung in der nativen Aorta. Häufigkeitsverteilung der semiquantitativen Messung in prozentualer Verteilung. Hierbei bedeuten die oberen Kästchen eine fast vollständige Reendothelialisierung von 71-100% (grün), die gelben Kästchen eine Reendothelialisierung zwischen 41-70%, die orangenen Kästchen eine geringe Reendothelialisierung (zwischen 11-40%) und die unteren Kästchen (rot) nahezu fehlende Reendothelialisierung (zwischen 0-10%). Gruppe 1 = Ko, 2 = Rap, 3 = D I, 4 = D II, 5 = D III.

3.2.2 Proliferationsindex

Der Proliferationsindex wurde, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, aus dem Quotient der Zellzahl pro mm² Fläche der immunhistochemischen Färbung mit PCNA und DAPI errechnet, also aus dem Anteil der Zellteilung (proliferierende Zellen) im Verhältnis zur Gesamtzellzahl. Je höher die Proliferationsrate bzw. der –index, desto höher ist das Proliferationsgeschehen. Dieser Index wurde in der Mitte und am Ende der gestenteten Aorta bestimmt.

3.2.2.1 Neointima

3.2.2.1.1 Proliferationsindex in der Stentmitte

Hierbei zeigte die hohe Shikonindosis bei einem Median von 0,29 die geringste Proliferationsrate in der Stentmitte der Neointima. Die größte Proliferationsrate wies die mittlere Shikonindosis bei einem Median von 0,67 auf. Die Rapamycingruppe (0,39) und die niedrige Shikonindosisgruppe (0,40) zeigten eine annähernd gleiche Ausprägung am Zellumsatz. Beide zeigten einen kleineren Proliferationsindex als die Wirkstoff-freie Kontrollgruppe bei einem Median von 0,62. Siehe Abbildung 27. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

III Ergebnisse

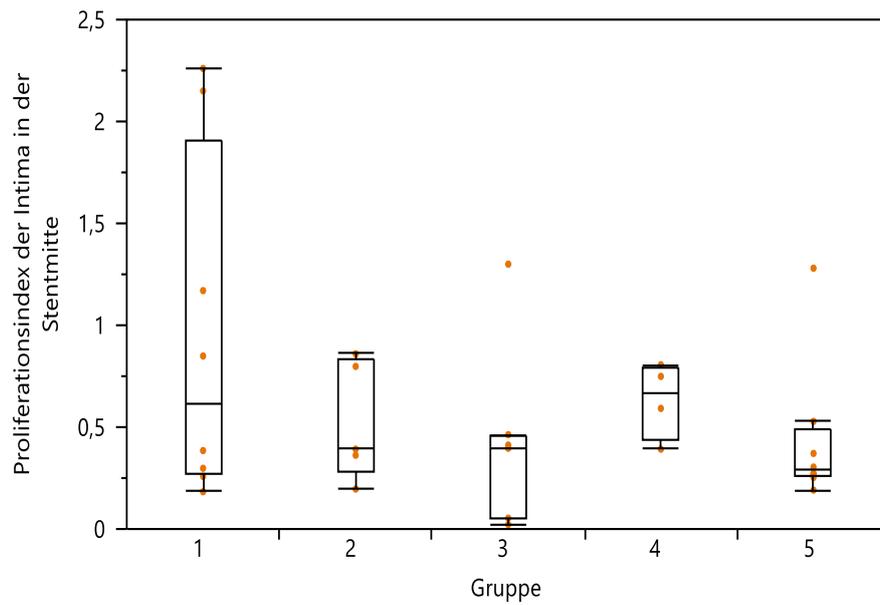


Abbildung 27: Proliferationsindex der Neointima in der Stentmitte. 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

In den folgenden Abbildungen wurde als Beispiel aus jeder Gruppe je ein Gefäßpräparat mit der immunhistochemischen Färbung vom Proliferationsindex dargestellt.

III Ergebnisse



Abbildung 28: Tiernummer 13 aus der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe. Immunhistochemische PCNA-Färbung zur Markierung von proliferierenden Zellen (braun).

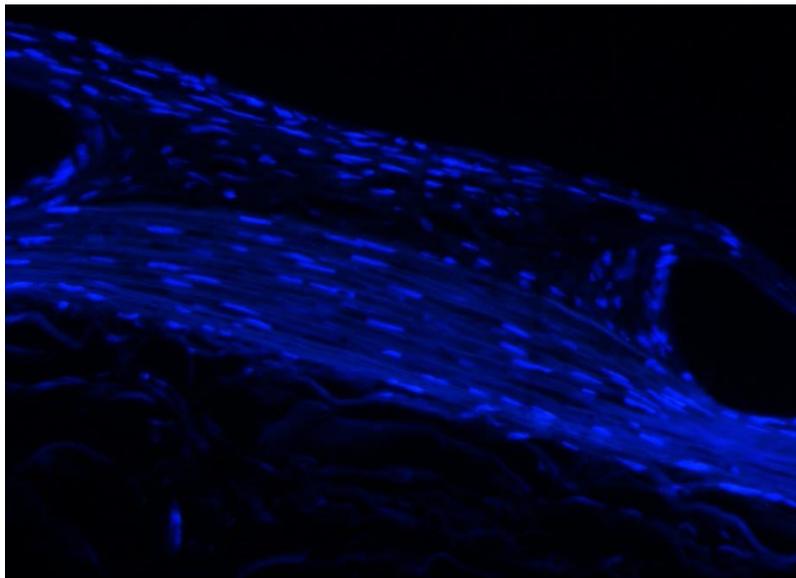


Abbildung 29: Tiernummer 13 aus der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe. Immunhistochemische DAPI-Färbung zur Markierung Gesamtzellzahl (blau).

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen ein Tier aus der Kontrollgruppe, die eine geringere Zellproliferation gegenüber der Gesamtzellzahl mit einem geringeren Proliferationsindex darstellte.

III Ergebnisse

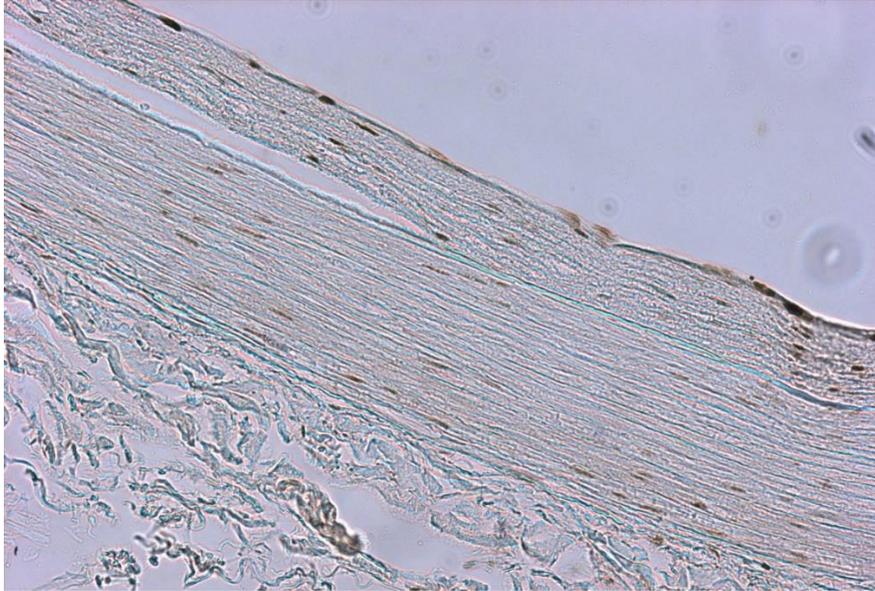


Abbildung 30: Rapamycingruppe, Tiernummer 16, Stentmitte. PCNA-Färbung. Die proliferierenden Zellen ließen sich braun markieren.

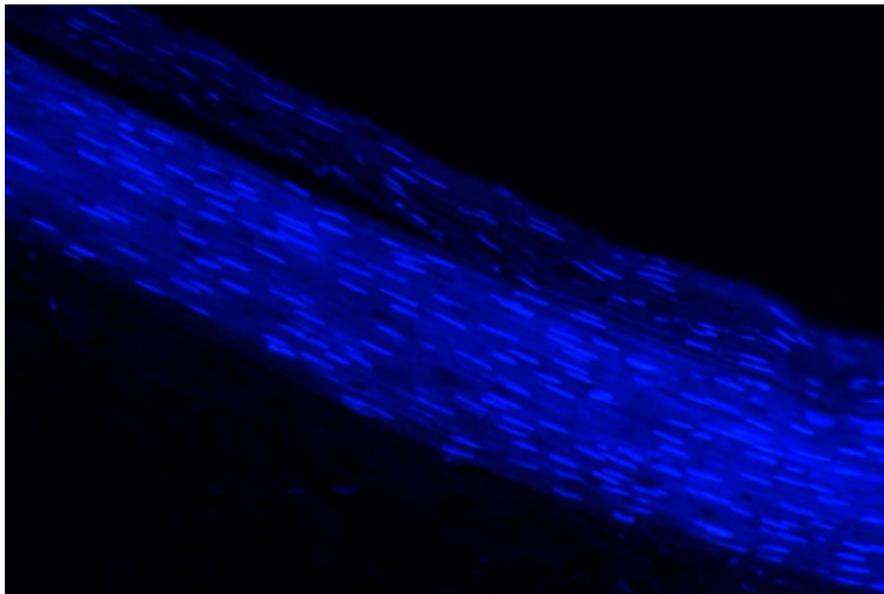


Abbildung 31: Rapamycingruppe, Tiernummer 16, Stentmitte. DAPI-Färbung. Die Gesamtzellzahl ließ sich hier blau markieren.

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen ein Tier aus der Rapamycingruppe mit wenig proliferierenden Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl, sowohl in der Intima, als auch in der Media.

III Ergebnisse

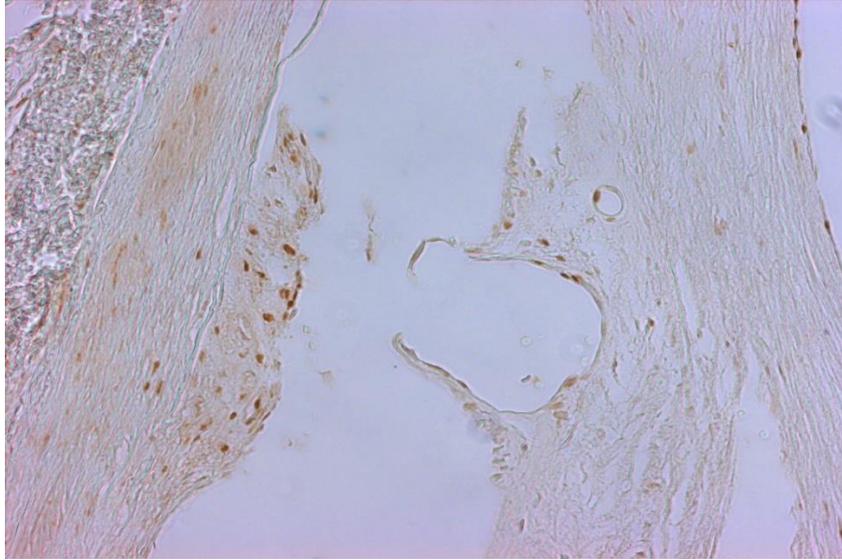


Abbildung 32: Tiernummer 35 aus der Shikoningruppe der niedrigen Dosis (2,5 µg/ml). Stentmitte. Die proliferierenden Zellen erschienen anhand der PCNA-Färbung braun.

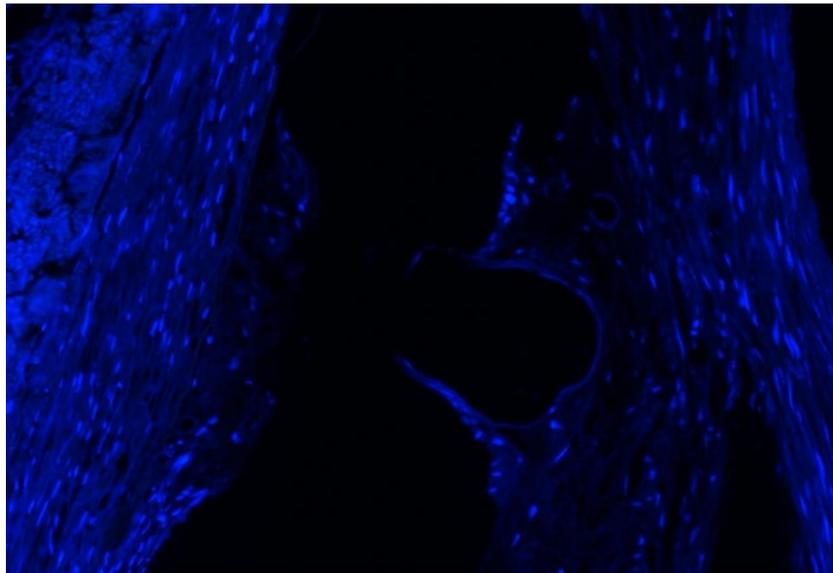


Abbildung 33: Tiernummer 35 aus der Shikoningruppe der niedrigen Dosis (2,5 µg/ml). Anhand der DAPI-Färbung wurden alle Zellen blau markiert.

Als Beispiel zeigte ein Tier aus der niedrigen Shikonindosisgruppe, in den Abbildungen 32 und 33, mehr proliferierende Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl mit erhöhtem Proliferationsindex. Das Median der niedrig dosierten Shikoningruppe zeigte dafür einen geringen Proliferationsindex.

III Ergebnisse

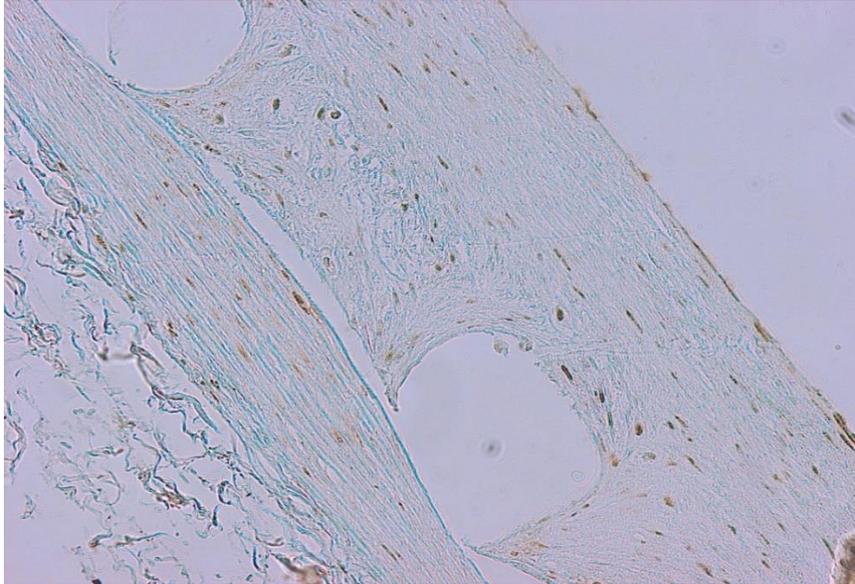


Abbildung 34: Ein Beispiel aus der Shikoningruppe der mittleren Dosisgruppe (5 µg/ml). Tiernummer 20, Stentmitte. Immunhistochemische PCNA-Färbung zur Markierung proliferierender Zellen (braun).

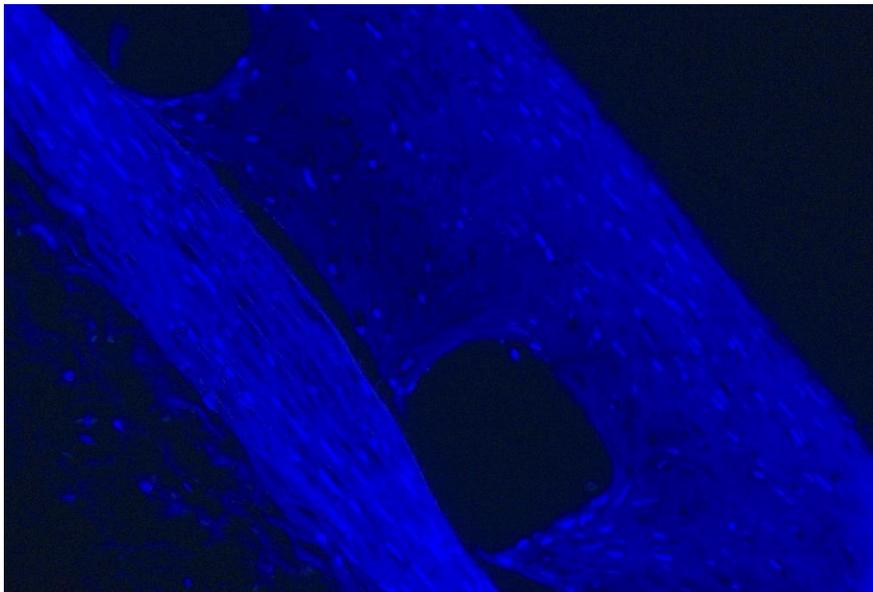


Abbildung 35: Ein Beispiel aus der Shikoningruppe der mittleren Dosisgruppe (5 µg/ml). Tiernummer 20, Stentmitte. Immunhistochemische DAPI-Färbung zur Markierung aller Zellen (blau).

III Ergebnisse

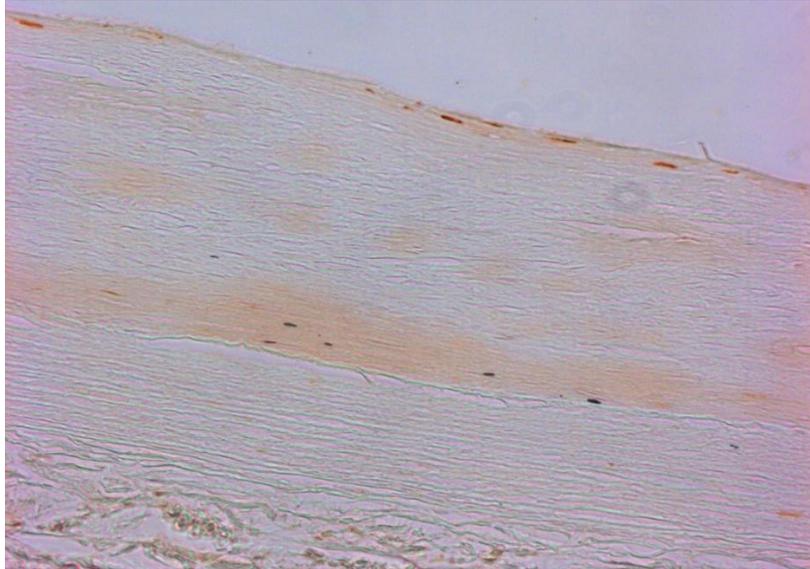


Abbildung 36: Tiernummer 30 aus der hoch dosierten Shikoningruppe, Stentmitte. Anhand der immunhistochemische Färbung mit PCNA, die zur Braunfärbung der proliferierenden Zellen führte.

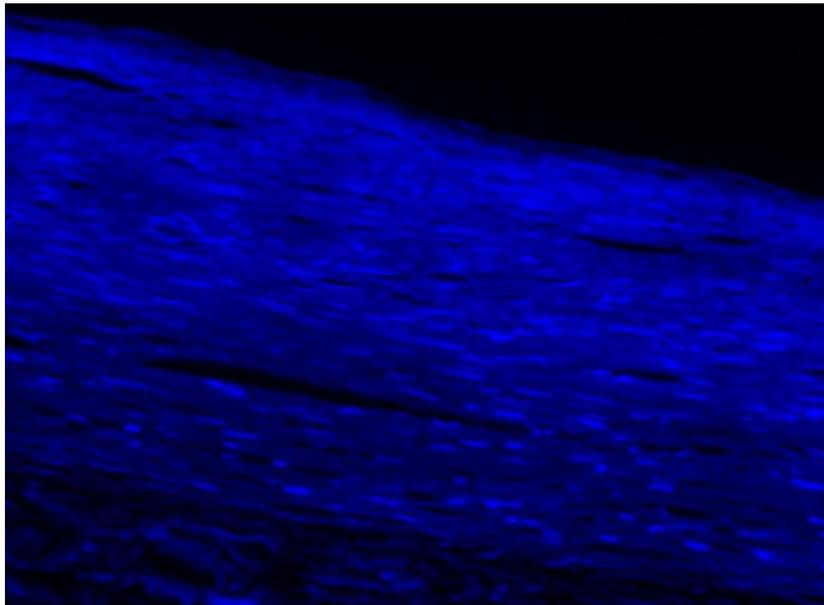


Abbildung 37: Tiernummer 30 aus der hoch dosierten Shikoningruppe, Stentmitte. Anhand der Immunhistochemie mit DAPI kam es zur Blaufärbung aller Zellen.

Die Abbildungen 36 und 37 zeigen das Präparat eines Tieres aus der Gruppe der hohen Shikoninkonzentration. Bei diesem Präparat war eine sehr geringe Zellproliferation mit einem kleinen Proliferationsindex ersichtlich.

3.2.2.1.2 Proliferationsindex am Stentende

Am Stentende war der kleinste Proliferationsindex in der Rapamycingruppe bei einem Median von 0,46 in der Neointima zu beobachten, gefolgt von der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe bei einem Median von 0,66. Alle Verum-Gruppen zeigten größere Proliferationsraten als ihre Vergleichsgruppen. Hierbei betrug der Index der niedrigen Shikonindosisgruppe im Median 0,80 und der mittleren Dosisgruppe 0,77. Am stärksten ausgeprägt war der Proliferationsindex in der hochdosierten Shikoningruppe bei einem Median von 2,07. Abbildung 38 zeigt das Diagramm des Proliferationsindex der Neointima am Stentende. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

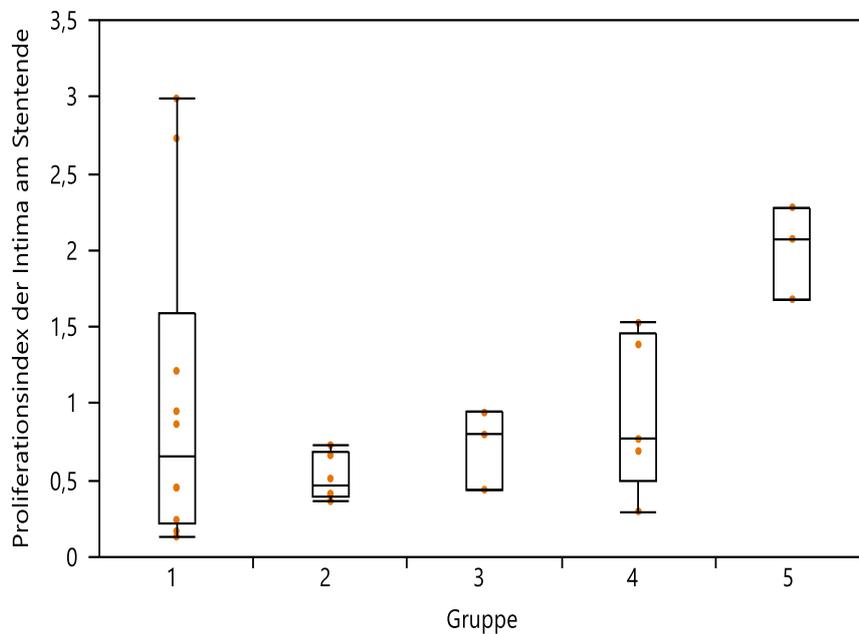


Abbildung 38: Proliferationsindex der Neointima am Stentende. 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

In den folgenden Abbildungen wurde als Beispiel aus jeder Gruppe je ein Gefäßpräparat mit der immunhistochemischen Färbung vom Proliferationsindex dargestellt.

III Ergebnisse

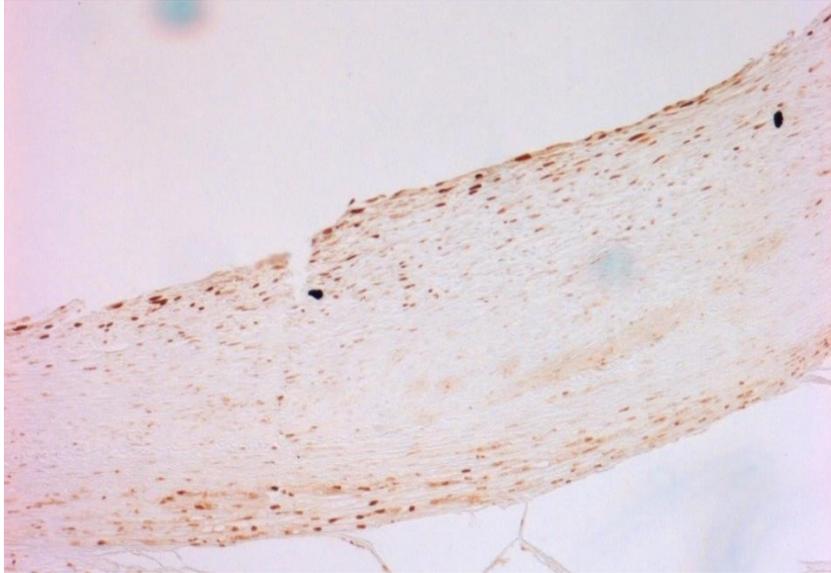


Abbildung 39: Tiernummer 27 aus der Kontrollgruppe. Präparatschnitt am Stentende. Immunhistologische Färbung mit PCNA zur Braunfärbung proliferierender Zellen.

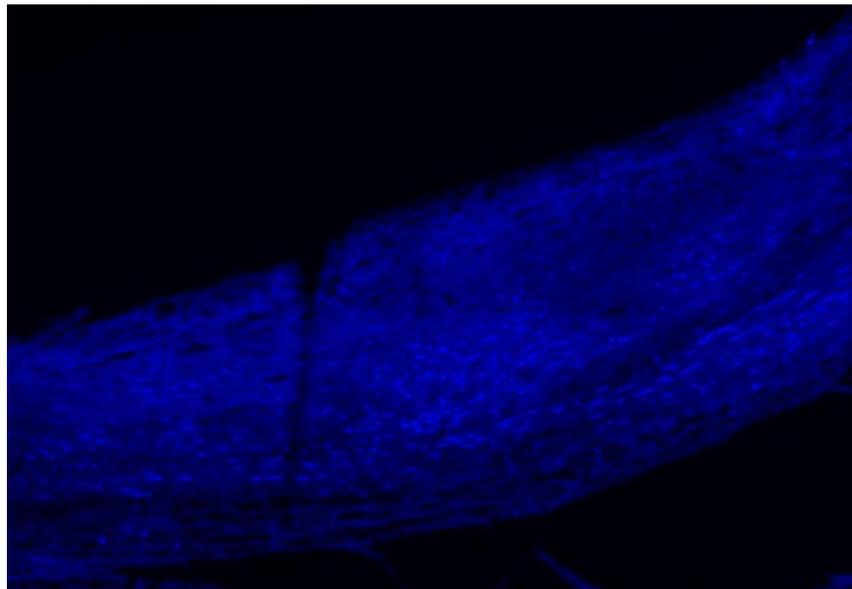


Abbildung 40: Tiernummer 27 aus der Kontrollgruppe. Präparatschnitt am Stentende. Immunhistologische Färbung mit DAPI zur Blaufärbung aller Zellen.

Die Abbildungen 39 und 40 zeigen ein Präparat aus der Kontrollgruppe. Die Intima wies lumenwärts mehr proliferierende Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl auf.

III Ergebnisse

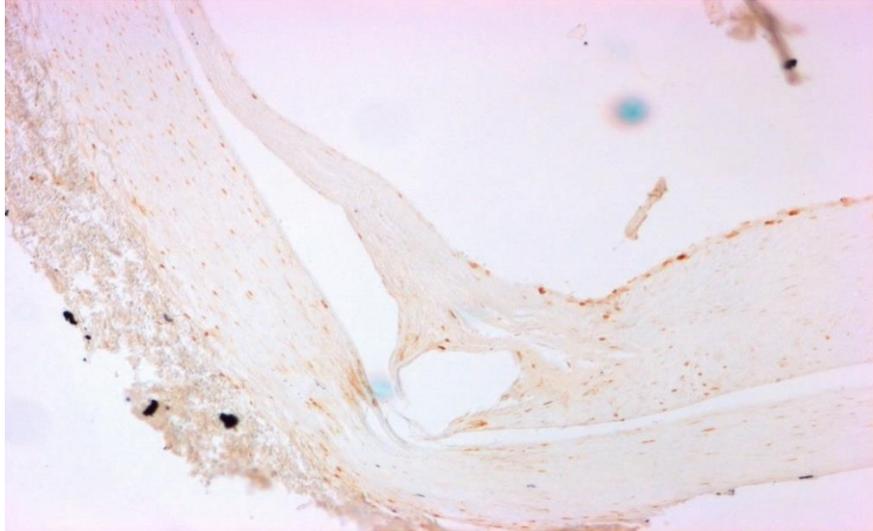


Abbildung 41: Tiernummer 33 aus der niedrig dosierten Shikoningruppe. Stentende. Immunhistochemische Färbung mit PCNA zur Braunfärbung proliferierender Zellen.

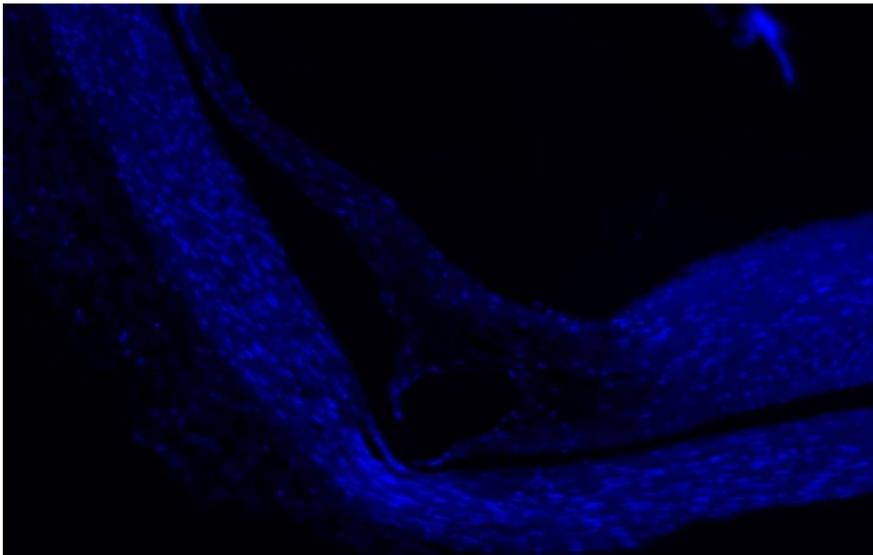


Abbildung 42: Tiernummer 33 aus der niedrig dosierten Shikoningruppe. Stentende. Immunhistochemische Färbung mit DAPI zur Blaufärbung aller Zellen.

Abbildungen 41 und 42 zeigen ein Präparat aus der niedrig dosierten Shikoningruppe. In diesem Präparat war ebenfalls ein geringer Proliferationsindex mit wenige braune, proliferierende Zellen bei hoher Gesamtzellzahl zu beobachten.

III Ergebnisse

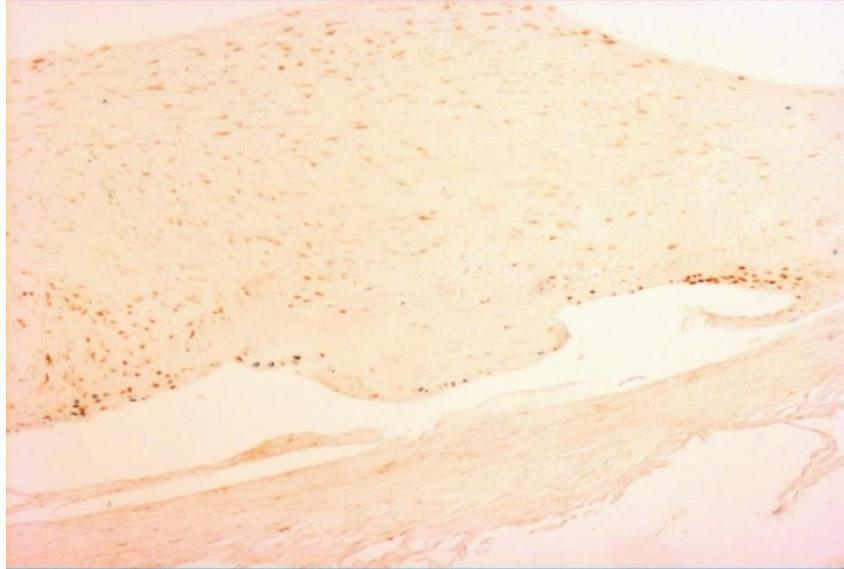


Abbildung 43: Tiernummer 5 aus der mittel dosierten Shikoningruppe. Stentende. PCNA-Färbung zur Braunfärbung proliferierender Zellen.

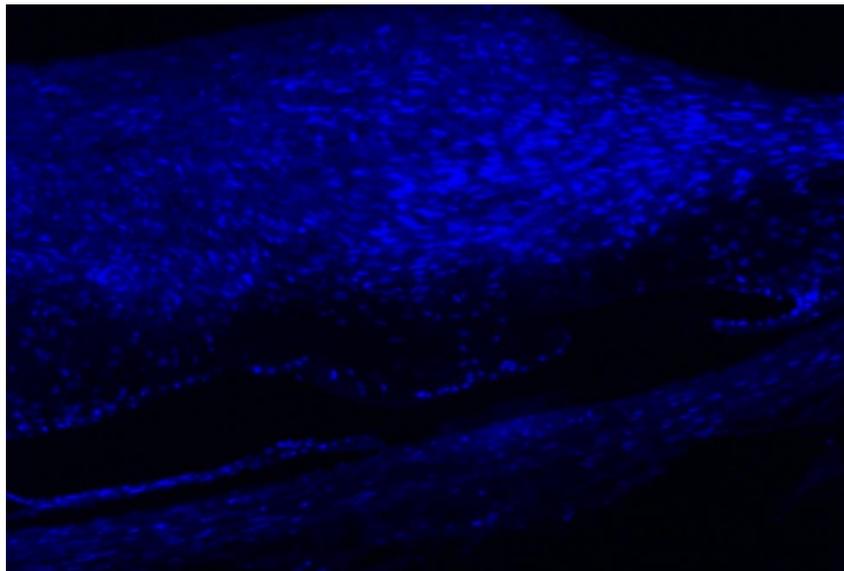


Abbildung 44: Tiernummer 5 aus der mittel dosierten Shikoningruppe. Stentende. DAPI-Färbung zur Blaufärbung aller Zellen.

Bei einem Tier aus der mittleren Shikonindosisgruppe, Abbildungen 43 und 44, war eine hohe Gesamtzellzahl zu beobachten. Im Vergleich dazu waren die proliferierenden Zellen geringer und somit der Index geringer.

III Ergebnisse

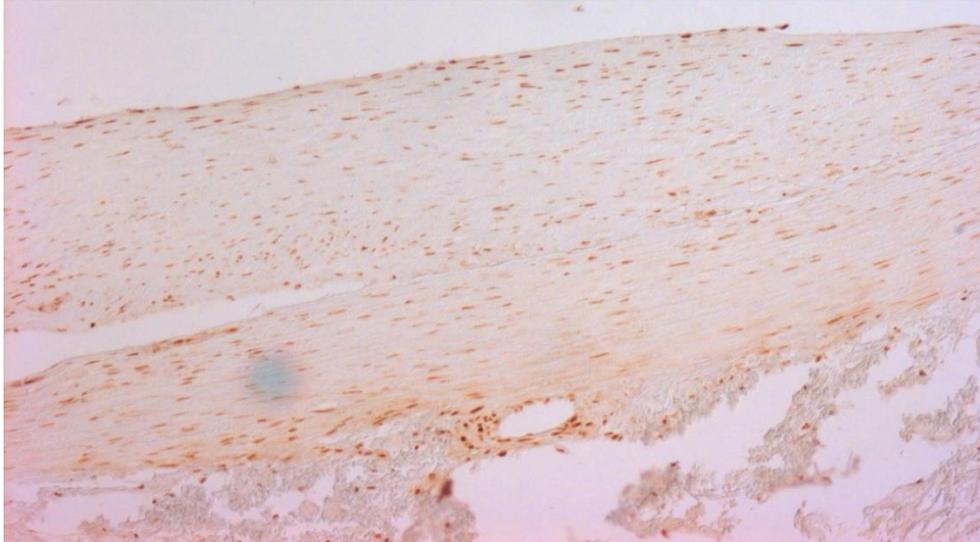


Abbildung 45: Tiernummer 18 aus der mittel dosierten Shikoningruppe. Stentende. PCNA-Färbung.

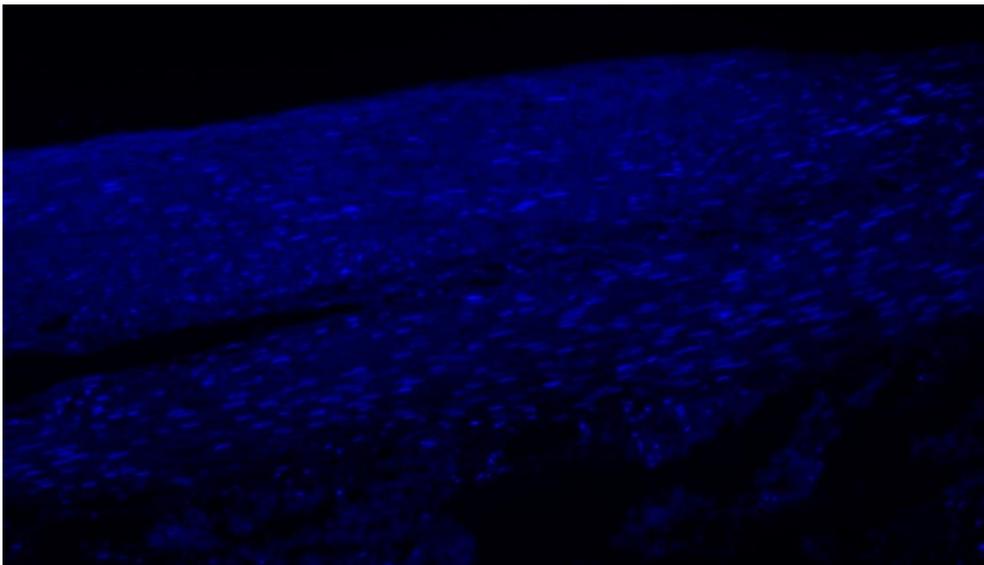


Abbildung 46: Tiernummer 18 aus der mittel dosierten Shikoningruppe. Stentende. DAPI-Färbung.

Im Gegensatz zu den Abbildungen 43 und 44 waren in den Abbildungen 45 und 46 bei einem anderen Tier aus der mittleren Shikonindosisgruppe ein hohes Ausmaß an proliferierenden Zellen in der Intima zu beobachten. Der Index erschien hier mäßig ausgeprägt zu sein.

III Ergebnisse

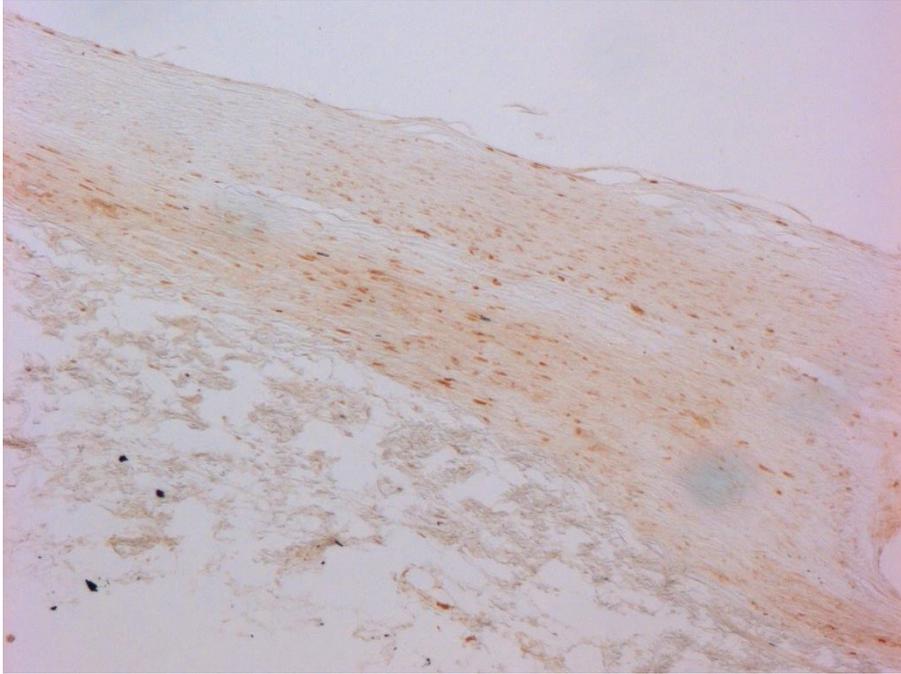


Abbildung 47: PCNA-Färbung, Stentende, Tiernummer 32 aus der hoch dosierten Shikoningruppe.

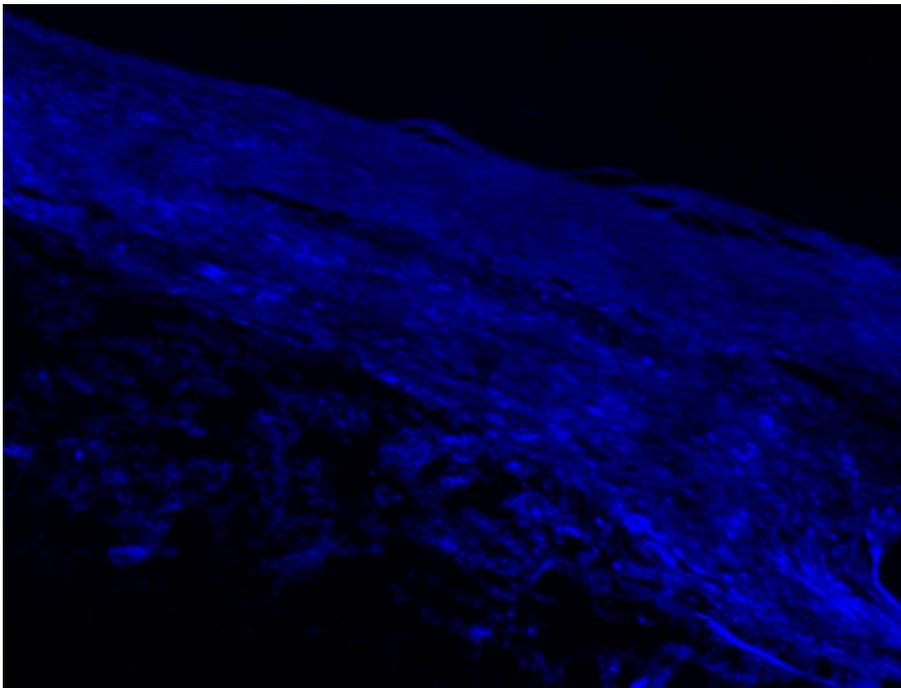


Abbildung 48: DAPI-Färbung, Stentende, Tiernummer 32 aus der hoch dosierten Shikoningruppe.

3.2.2.2 Media

3.2.2.2.1 Proliferationsindex in der Stentmitte

In der Stentmitte zeigte die Kontrollgruppe bei einem Median von 0,52 den größten Proliferationsindex in der Media. Der Index der niedrigen und hohen Shikonindosisgruppe war kleiner als der der Rapamycingruppe. In der niedrig dosierten Shikoningruppe betrug er im Median 0,22 mit dem kleinsten Wert gegenüber allen anderen Gruppen und in der hochdosierten Gruppe 0,30. Die mittel dosierte Shikoningruppe zeigte eine Proliferationsrate von 0,37 im Median und war höher als die aus der Rapamycingruppe mit 0,33. Siehe Abbildung 49. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

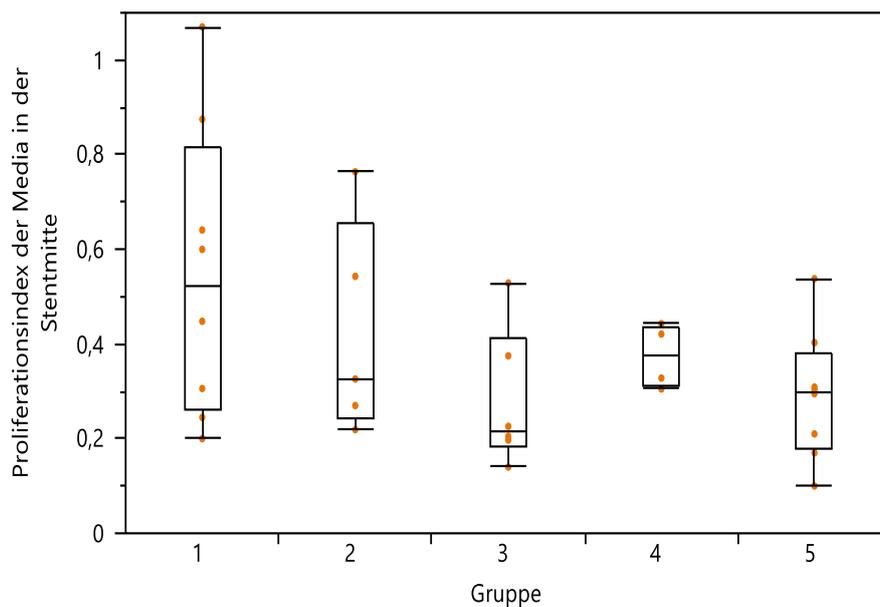


Abbildung 49: Proliferationsindex der Media in der Stentmitte. 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.2.2.2 Proliferationsindex am Stentende

Auch am Stentende zeigte Rapamycin die kleinste Proliferationsrate mit 0,47 im Median in der Media. Nach Rapamycin war der nächst kleinste Index bei einem Median von 0,50 in der mittleren Shikonindosisgruppe zu beobachten. In der niedrig dosierten Shikoningruppe war der Proliferationsindex mit einem Median von 0,67 höher als der der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe bei 0,56 im Median. Die hoch dosierte Shikoningruppe zeigte bei überschießend hohem Zellumsatz den größten Proliferationsindex bei einem Median von 2,24. Siehe hierzu Abbildung 50. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

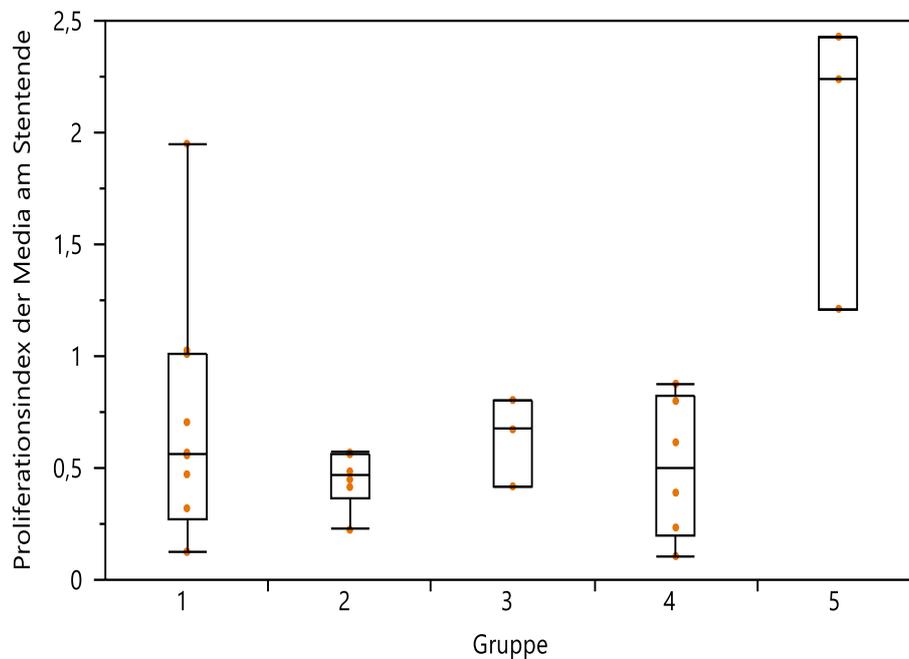


Abbildung 50: Proliferationsindex der Media am Stentende. 1 = Kontrollgruppe. 2 = Rapamycin. 3 = Shikonin Dosisgruppe I mit 2,5 µg/ml. 4 = Shikonin Dosisgruppe II mit 5 µg/ml. 5 = Shikonin Dosisgruppe III mit 10 µg/ml.

3.2.3 Makrophagenverteilung

Zur Darstellung der Makrophagen wurde die immunhistochemische RAM-11-Färbung durchgeführt. Anhand dieser Färbung wurde die Beurteilung der Makrophagen in der Neointima und der Media im Bereich der gestenteten Aorta abdominalis ermöglicht. Als Grundlage für die Bewertung wurde auch hier die semiquantitative Skala angewendet.

3.2.3.1 Makrophagen in der Neointima im Bereich der Stentstreben

In der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe waren bei 36% der Gefäßschnitte keine Makrophagen um die Stentstreben herum zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten die übrigen Tiergruppen eine geringere Makrophagenfreiheit. Die Rapamycingruppe zeigte eine Makrophagenfreiheit von 33% um die Stentstreben herum. Auch die hoch dosierte Shikoningruppe zeigte mit nahezu 29% keine Makrophagen. Der Großteil der Präparate, bei einem Prozentsatz von 75%, aus der niedrig dosierten Shikoningruppe zeigte eine ausgeprägt hohe Makrophagenanzahl. Auch um die 14% der Tiere aus der mittel dosierten Shikoningruppe zeigte eine ausgeprägt hohe Zahl an Makrophagen um die Stentstreben. Zur Veranschaulichung siehe das Mosaikdiagramm in Abbildung 51. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

III Ergebnisse

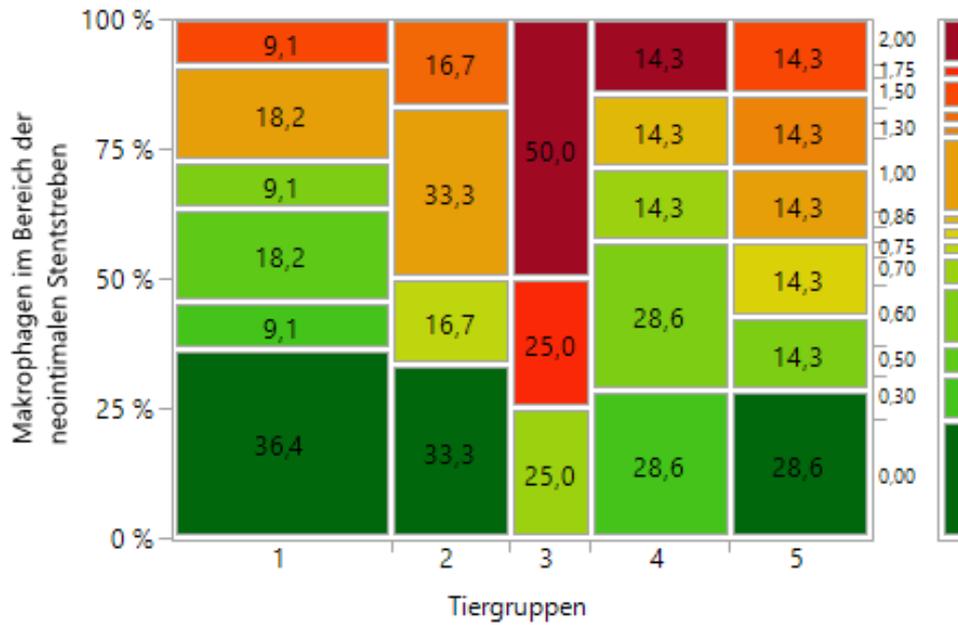


Abbildung 51: Mosaikdiagramm der Makrophagenanzahl im Bereich der neointimalen Stentstreben aus semiquantitativer Messung. Farbverteilung von geringer Makrophagenzahl (grün) über mäßige (gelb) auf hohe Makrophagenzahl (rot). Dunkelgrün bedeutet makrophagenfrei und dunkelrot maximale Makrophagenzahl. 1 = Kontrollgruppe, 2 = Rapamycingruppe, 3 = niedrig dosierte Shikoningruppe, 4 = mäßig dosierte Shikoningruppe, 5 = hoch dosierte Shikoningruppe.

Bei einer 10-fachen Vergrößerung im Mikroskop zeigte ein Gefäßpräparat aus der Mitte der gestenteten Aorta, anhand der immunhistochemischen RAM-Färbung, die Makrophagen als Braunfärbung um die Stentstreben herum. Siehe Abbildung 52.

III Ergebnisse

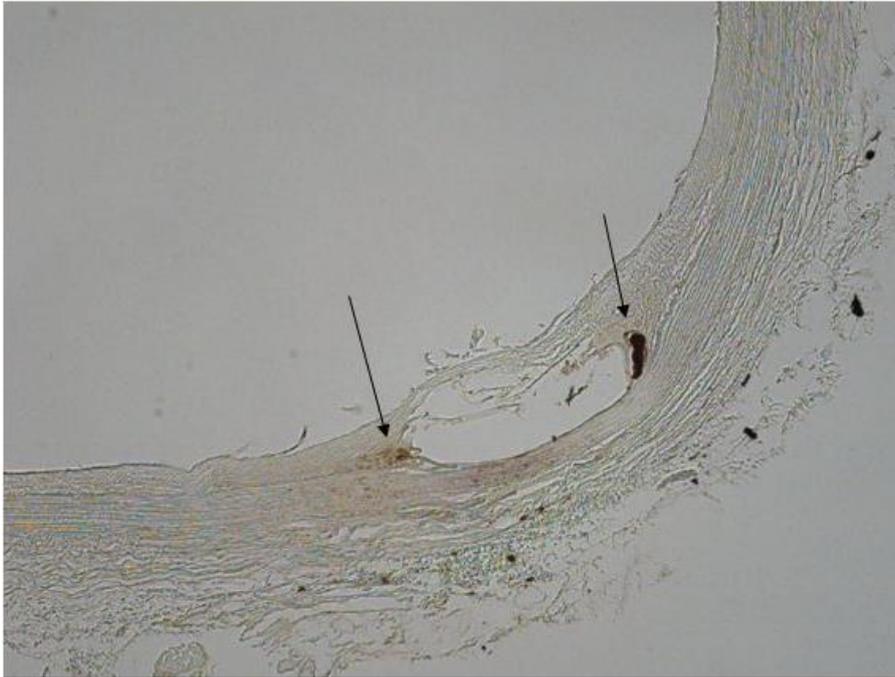


Abbildung 52: 10-fache Vergrößerung eines histologischen Bildes aus der Stentmitte in der Aorta abdominalis des Tieres mit der Nummer 5 aus der mittleren Shikonindosisgruppe (5 µg/ml). Immunhistochemische Färbung zur Sichtbarmachung von Makrophagen um die Stentstreben (Pfeile).

3.2.3.2 Makrophagen in der übrigen Neointima

In der übrigen Neointima waren mit Ausnahme der niedrig dosierten Shikoningruppe die überwiegende Anzahl der Präparate frei von Makrophagen. Am deutlichsten erkennbar war die Makrophagenfreiheit in der Rapamycingruppe mit knapp 67%, gefolgt von den Präparaten in der Kontrollgruppe (60%) und der mittel dosierten Shikoningruppe mit 57%. In der hoch dosierten Shikoningruppe waren knapp 29% der Gefäße makrophagenfrei. Ausgeprägt hohe Makrophagenzahlen waren bei 14 % der Präparate aus der niedrig dosierten Shikoningruppe zu beobachten. Zur Veranschaulichung siehe das Mosaikdiagramm in Abbildung 53. Die Daten im Einzelnen finden sich im Anhang.

III Ergebnisse

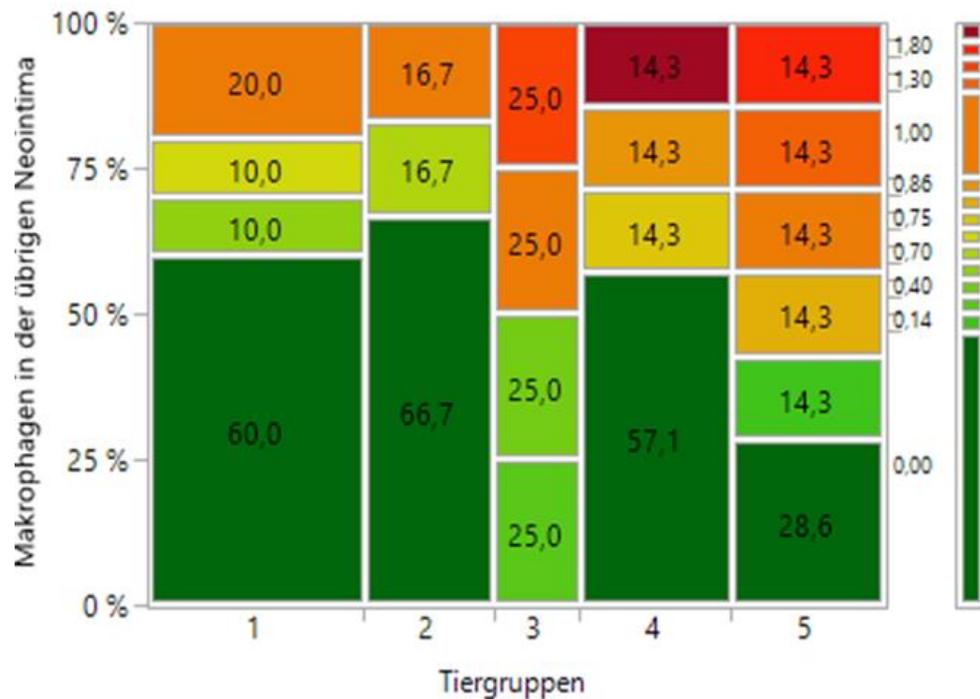


Abbildung 53: Mosaikdiagramm der Makrophagenanzahl in der übrigen Neointima aus semiquantitativer Messung. Farbverteilung von geringer Makrophagenzahl (grün) über mäßige (gelb) auf hohe Makrophagenzahl (rot). Dunkelgrün bedeutet makrophagenfrei und dunkelrot maximale Makrophagenzahl. 1 = Kontrollgruppe, 2 = Rapamycingruppe, 3 = niedrig dosierte Shikoningruppe, 4 = mäßig dosierte Shikoningruppe, 5 = hoch dosierte Shikoningruppe.

3.2.3.3 Makrophagen in der Media

Auch in der Media konnte bei mehreren Gruppen eine Makrophagenfreiheit nachgewiesen werden. Eine Makrophagenfreiheit war in der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe mit rund 73%, in der Rapamycingruppe mit nahezu 67%, in der Shikoningruppe der mittleren Konzentration mit rund 57% und der hohen Konzentration mit 14% der Fall. In keinem Tier aus der Shikoningruppe der niedrigen Konzentration war eine Makrophagenfreiheit zu beobachten. Eine ausgeprägt hohe Makrophagenanzahl war mit rund 29% in der hoch dosierten Shikoningruppe und mit 17 % in der Rapamycingruppe zu beobachten. Siehe hierzu das Mosaikdiagramm in Abbildung 54.

III Ergebnisse

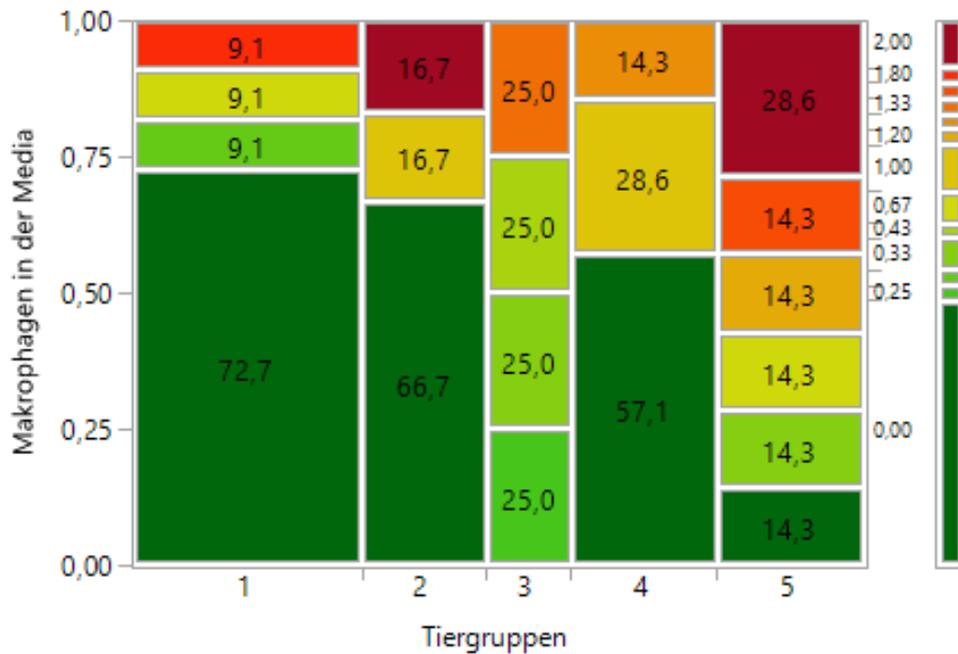


Abbildung 54: Mosaikdiagramm der Makrophagenanzahl in der Media aus semiquantitativer Messung. Farbverteilung von geringer Makrophagenzahl (grün) über mäßige (gelb) auf hohe Anzahl (rot). 1 = Kontrollgruppe, 2 = Rapamycingruppe, 3 = niedrig dosierte Shikoningruppe, 4 = mäßig dosierte Shikoningruppe, 5 = hoch dosierte Shikoningruppe.

3.2.4 Nachweis von Kollagen Typ I und Typ III

Im Verlauf der Gefäßreaktion nach Verletzung verändern sich die Menge und die Zusammensetzung einzelner Kollagentypen durch Umbauprozesse, um eine möglichst ursprüngliche Bindegewebssituation wiederherzustellen. Das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III ist maßgeblich für den Prozess der Einheilung und spiegelt die Festigkeit des entstandenen Gewebes in der gestenteten Aorta abdominalis wider. Ein natives Gewebe war bei einem Quotienten von > 2 gegeben und narbiges Gewebe bei einem Quotienten von < 2 gegeben. Bei einem Wert von < 1 entsprach dies einem schwachen Bindegewebe. Als Grundlage für die Bewertung wurde die Fläche in mm^2 des Kollagen Typ I im Verhältnis zur Fläche in mm^2 des Kollagen Typ III gesetzt.

III Ergebnisse

Von den Verum-Gruppen wurden in diesem Versuch die niedrig dosierte und die hoch dosierte Shikonin-Gruppe ausgewertet. Hierzu war die Ratio des Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III bei den Tieren der Rapamycin-Gruppe mit einem Median von 2,38 und der niedrig dosierten Shikonin-Gruppe mit einem Median von 2 nachzuweisen und entsprachen einem nativen Gewebe. Die Tiere aus der Kontrollgruppe zeigten einen Median von 1,19 und die hoch dosierte Shikonin-Gruppe einen Median von 1,43 und entsprachen einem narbigen Gewebe. Allerdings war bei jeweils 25% der Tiere aus diesen beiden Gruppen ein schwaches Bindegewebe zu beobachten. Die Rapamycin-Gruppe zeigte das größte Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ III. Die Kontrollgruppe wies das kleinste Verhältnis auf. Shikonin zeigte bei steigender Dosis eine zunehmende Abnahme der Ratio, wobei die Ausprägung bei Shikonin insgesamt geringer als bei Rapamycin ausfiel. Das Diagramm findet sich in Abbildung 55 und die Daten im Einzelnen im Anhang.

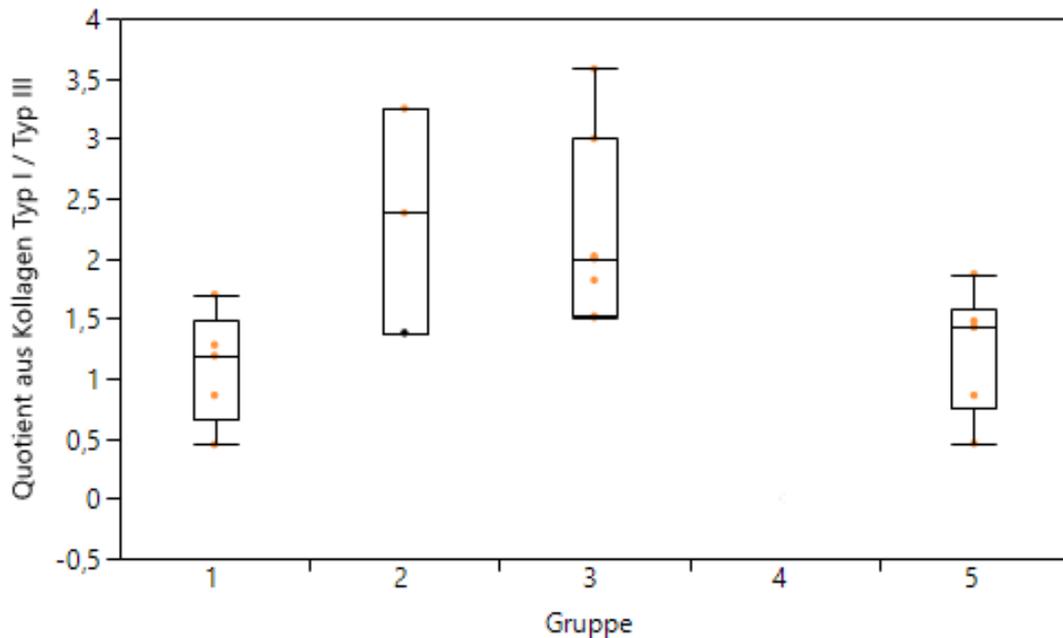


Abbildung 55: Verhältnis Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III. 1 = Kontrollgruppe, 2 = Rapamycin-Gruppe, 3 = niedrig dosierte Shikonin-Gruppe (2,5 µg/ml), 5 = hoch dosierte Shikonin-Gruppe (10 µg/ml).

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend waren die DES mit Shikonin in der Flächenbildung der Neointima in der gestenteten Aorta den Vergleichsgruppen der DES mit Rapamycin und BMS unterlegen. Korrelierend zur größeren Neointimafläche zeigten sie als direktes Zeichen auch ein häufigeres Auftreten von Gefäßwandverletzungen und Entzündungsreaktionen gegenüber den Vergleichsgruppen.

Die hoch dosierte Shikoningruppe zeigte in der Stentmitte die größte Neointimafläche und zeigte einen signifikanten Unterschied gegenüber der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe ($p=0,0275$).

In der nativen Aorta wies Rapamycin neben der mittleren Shikonindosis die größte Neointimafläche auf. Hier war die niedrige Shikonindosis mit dem niedrigsten Wert gegeben, auch wenn keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen auffiel.

Im Rahmen der Neointimafläche war Rapamycin nur am Stentende den BMS überlegen. Wie erwartet fiel die Proliferationsrate bei Rapamycin in beiden Gefäßschichten (Neointima und Media) der gestenteten Aorta kleiner aus als bei den BMS. Auffällig war, dass die hohe Shikonindosis in der neointimalen Stentmitte den geringsten Zellumsatz zeigte, wobei keine Korrelation mit der Neointimafläche bestand.

Am Stentende wies die Proliferationsrate bei Shikonin eine Dosisabhängigkeit in beiden Gefäßschichten auf, wobei Shikonin gegenüber den Vergleichsgruppen Rapamycin und BMS dennoch nicht unterlegen war. Je niedriger die Konzentration, desto geringer ist die Proliferationsrate, was einen dosisabhängigen Proliferationsreiz zeigt. Der Zellumsatz bei der hohen Shikoninkonzentration war am Stentende in beiden Gefäßschichten am größten, zugleich war aber die Mediafläche am kleinsten.

III Ergebnisse

Im Rahmen der Reendothelialisierung war insbesondere die hohe Shikoninkonzentration in der gestenteten und nativen Aorta gegenüber der Rapamycinbeschichtung deutlich höher. Auch die mittlere Shikoninkonzentration zeigte weitgehend eine deutlichere Reendothelialisierung gegenüber Rapamycin. Eine Ausnahme bildete der Bereich des Endstückes der gestenteten Aorta bei etwa gleicher Ausprägung der Reendothelialisierung der mittleren Shikoninkonzentration und Rapamycin. In der nativen Aorta waren alle Shikoningruppen den Vergleichsgruppen überlegen. Rapamycin war außerdem bei der Endothelzellbildung der BMS unterlegen.

IV Diskussion

4.1 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Studie wurde als Tiermodell das weiße Neuseelandkaninchen verwendet, um die Effektivität von DES mit Shikonin zu untersuchen. Dazu wurde der Effekt der entzündungshemmenden Substanz auf den Grad der In-Stent-Restenose im zeitlichen Verlauf nach PTA mit Stentimplantation untersucht. Ziel der Arbeit war, Entzündungsreaktionen und Gefäßwandverletzungen nach Stentapplikation und die Auswirkung der verwendeten Substanz auf die neointimale und sowie mediale Proliferation hin zu untersuchen und drei unterschiedliche Konzentrationen von Shikonin auf eine Dosisabhängigkeit hin zu überprüfen.

4.2 Tiermodell

Die atherosklerotische Gefäßschädigung beim Menschen entwickelt sich über einen langen Zeitraum und ist, wie auch in Kapitel 1.3 beschrieben, multifaktoriell bedingt. Um eine Atherosklerose in einem kurzen Zeitraum auszulösen, Einflussfaktoren gut kontrollieren und Ergebnisse schnell liefern zu können, werden häufig Tiermodelle eingesetzt [62]. Es bedarf bei der Entwicklung neuartiger Verfahren zunächst immer Forschungen an Tiermodellen, bevor diese am Menschen angewendet werden dürfen. Bei Verwendung der DES mit Shikonin ist ein aussagekräftiges Tiermodell notwendig, um eine mögliche Hemmung der In-Stent-Restenose und damit der Entzündung und Proliferation nachweisen zu können. Außerdem muss das Tiermodell in Bezug auf Morphologie, Pathogenese und Beeinflussbarkeit der Atherosklerose und Restenose weitgehend analog zum menschlichen Organismus sein. Grundsätzlich gibt es viele Tiermodelle, die für die Erforschung der Atherosklerose und auch der Restenose in Frage kommen. Darunter fallen unter

IV Diskussion

anderem Kleintiere wie Mäuse, Ratten und Kaninchen, sowie größere Tiere wie Schweine, Affen und Hunde. Neben Schweinen sind Kaninchen die am häufigsten eingesetzten Versuchstiere und waren auch die ersten, die in der Atheroskleroseforschung eingesetzt wurden [63]. Anitschow et al. induzierten bei Kaninchen bereits 1913 atherosklerotische Plaques durch Gabe einer cholesterinreichen Nahrung [62–65]. Kaninchen haben sich für die Atherosklerose- und Restenoseforschungen etabliert, da sie Vorteile wie eine gute Induktion von atherosklerotischen Läsionen durch entsprechende Fütterung und Ähnlichkeit der menschlichen Gefäße in Bezug auf die Atherosklerosemorphologie haben [50, 66, 67]. Gegenüber beispielsweise Schweinen sind Kaninchen deutlich einfacher zu halten, deren Anschaffungspreis ist wesentlich geringer und sie sind für einen Versuchsaufbau mit einer größeren Tierzahl praktikabler [49].

Im vorliegenden Versuch wurden Kaninchen der Rasse weiße Neuseeländer als Tiermodell gewählt. Die Tiere wurden alle gleich behandelt und bekamen identische Nahrung. Der Umgang mit den weißen Neuseeländern war einfach und die Kosten waren tragbar. Es gibt sehr viele erfolgreich durchgeführte Studien mit diesen Tieren wie im Bereich der Ballonangioplastie oder Stentimplantation. Gewählt wurde die infrarenale Aorta abdominalis der Kaninchen, da sie groß genug für den Zugang mittels Katheter und für die Stentimplantation ist. Die Größe des Gefäßabschnittes entspricht ungefähr einer humanen Koronararterie. Wie auch in diesem Versuch durchgeführt, ist für die Produktion großer Plaques die Kombination aus PTA mit Stentimplantation und Cholesterindiät erfolgreich [68]. Nach alleiniger Stentimplantation, also ohne zusätzliche Cholesterindiät, entstehen nicht zwingend große Plaques, weshalb die alleinige Stentimplantation für die In-Stent-Restenoseforschung nicht geeignet ist.

Aufgrund dieser Eigenschaften sind Kaninchen in der Atherosklerose- und In-Stent-Restenoseforschung als Modell etabliert. Auch wenn die Morphologie der

Plaques nicht eins zu eins mit denen des Menschen übereinstimmt, kann dieses Modell neue Erkenntnisse bezüglich einer möglichen Therapie der In-Stent-Restenose geben. Ausgehend von den obigen Begründungen ist dieses Kaninchenmodell dem menschlichen Modell vergleichbar und erscheint gerechtfertigt.

4.3 Gruppeneinteilung und Auswertungsstrategie

Im vorliegenden Versuch wurde allen Tieren im Anschluss an eine Gefäßschädigung mittels Denudation ein Stent in die infrarenale Aorta abdominalis implantiert. Von 52 Tieren erreichten 40 Tiere das Versuchsende und gingen in die Auswertung mit ein. 12 Tiere verstarben periinterventionell an Blutungen und systemischen Infektionen. Diese Tiere waren einer bestimmten Gruppe nicht zuzuordnen und standen somit mit der Stentbeschichtung nicht im Zusammenhang. Die Tiere wurden in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt die Stentimplantation mit Wirkstoff-freier Lösungsbeschichtung im Sinne einer BMS als Kontrollgruppe. Eine zweite Gruppe erhielt eine Stentimplantation mit Rapamycinbeschichtung als Vergleichsgruppe. Und die dritte Gruppe, die Verum-Gruppe, erhielt Stents mit Shikoninbeschichtung. Diese Gruppe wurde bei drei Shikoninkonzentrationen in drei Untergruppen aufgeteilt. Durch diese Aufteilung konnten die Gefäßreaktionen nach Stentimplantation untereinander verglichen werden. Das Ziel war, die Auswirkung von Shikonin auf die Gefäßantwort zu erforschen und auf eine Dosisabhängigkeit zu überprüfen. Die Gruppe mit Kontrolllösung diente als Aussage über den alleinigen Effekt des Trägerproteins auf die Entzündung. Die Gruppe mit Rapamycin diente als Vergleich, da Rastan et al. Langzeitergebnisse aus einer randomisierten humanen Studie vorlegen konnte, dass mit dieser Substanzbeschichtung die klinische Ereignisrate im Vergleich zu BMS reduzieren konnte [32].

Die Untersuchungszeit wurde in diesem Versuch auf sechs Wochen festgelegt, da der Versuch auf langfristige Ergebnisse abgezielt hat. Schwartz et al. konnten 1992 über die Gefäßreaktion auf die PTA und Stentimplantation am Schweinmodell belegen, dass eine deutliche Korrelation zwischen vessel injury score und Neointima nach vier Wochen besteht [25]. Hofma et al. konnten die Entzündungsreaktionen am Schweinmodell auch noch nach 12 Wochen nachweisen [61]. Am Kaninchenmodell konnten Tominga et al. nach vierundzwanzig Wochen immer noch Effekte bezüglich der Restenose nachweisen [69].

Wie im Kapitel 2.7.3 beschrieben wurden die Präparate pro Färbung unter Randomisierung kontinuierlich auf möglichst aufeinanderfolgenden Tagen ausgewertet. Jeder Objektträger umfasste drei Präparatschnitte und alle drei wurden einzeln betrachtet. Bei der Auswertung wurden repräsentative Parameter für die Bewertung der Ergebnisse bestimmt. Sowohl Flächen, als auch Dicken wurden ausgewertet. Da sich in vielen Präparaten unregelmäßige Plaques zeigten, wurden als repräsentative Parameter letztendlich die Flächen und die Graduierungen in die Ergebnisse miteinbezogen, um mögliche Fehler so gering als möglich zu halten. Die Gefäßwandverletzung, Entzündungsreaktion, Endothelzellbestimmung und Makrophagenverteilung wurden zur groben Einschätzung in semiquantitativen Skalaeinteilungen ausgewertet. Der Proliferationsindex wurde aus dem Verhältnis der proliferierenden Zellen pro mm² zur Gesamtzellzahl pro mm² herangezogen.

4.4 Problem und Prävention einer Restenosierung

Wie in 1.4.1.1 beschrieben, wird die Restenose im Interventionsgebiet als ein Gefäßdurchmesser definiert, der angiographisch um 50% reduziert ist [70, 71]. Je nach Behandlungsstrategie nach wiederholter Revaskularisation wie beispielsweise Ballonangioplastie, Cutting-Ballonangioplastie,

IV Diskussion

Rotationsatherektomie, Laserangioplastie, Stentimplantation oder Brachytherapie liegt die Restenoserate sehr variabel zwischen 11 bis 80% [22]. Nach Implantation eines BMS liegt die Häufigkeit einer In-Stent-Restenose zwischen 20 und 40% [17, 18]. Der Reiz für die Ausbildung einer Restenose nach der PTA entsteht durch die Dilatation und durch die Gefäßverletzung, die mit elastischen Rückstellkräften (elastic recoil), Umbauprozessen in der Gefäßwand (negative remodeling) und neointimaler Proliferation als Gefäßantwort verbunden ist [14]. Diese drei Schritte bewirken eine langsame Einengung des Gefäßes mit Verlust des Gefäßdurchmessers. Heilungsprozesse werden unter anderem vorwiegend von Thrombozyten und Entzündungszellen gesteuert.

Hauptursache der In-Stent-Restenose ist der Stent als Fremdkörper an sich, da sich durch diesen die Entzündung aggraviert und eine deutliche intimale Hyperplasie zur Folge hat [25, 28].

Viele Faktoren erhöhen das Risiko der In-Stent-Restenose. Darunter fallen die Wohlstandskrankheit Diabetes mellitus, genetische Faktoren und Bewegungsmangel. Aber auch die Anzahl der Stents sowie die Stentlänge und der Stentdurchmesser und stattgehabte Restenosen.

Gegen diese unerwünschten Wirkungen wurden auch Modifizierungen getestet, wie zum Beispiel die Veränderung der Beschaffenheit der Stentoberflächen und Legierungen, die jedoch keine durchgreifende Verbesserungen erzielten [20].

Zur Prävention einer Restenose sind viele Techniken erforscht und entwickelt worden. Sowohl bei der Ballonangioplastie als auch nach der Stentimplantation entstehen lokale Reaktionen mit Thrombozyten- und Leukozytenablagerungen. Weiterhin kommt es zur Proliferation glatter Muskelzellen, gefolgt von Zellmigration und Produktion von extrazellulärer Matrix. Schlussendlich führt der Prozess zur intimalen Hyperplasie. Aufgrund ihrer Formstabilität bieten Stents Vorteile. Im Vergleich zur Angioplastie treten bei den Stents keine elastischen Rückstellkräfte und keine der oben erwähnten Umbauprozesse auf [14]. Durch

Fortschritte bei der Entwicklung von Stents in Bezug auf Material und Verwendung, sowie bei der Pharmakotherapie sind perkutane Koronarinterventionen in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit den Bypassoperationen überlegen [14]. Hiatt et al. und Degertekin et al. beschrieben sehr hohe Restenoseraten bei wiederholter PTA, Laser- und Rotationsangioplastie [21, 22]. Eine signifikante Reduktion der Restenoserate konnte bei der Therapie mit Stents nachgewiesen werden [14].

In vergangenen Studien wurde zur Prävention der Restenose an systemisch medikamentösen Therapien geforscht, die jedoch keine nachhaltigen Ergebnisse aufzeigten [26]. Eine neue Idee der medikamentösen Therapie war, anstatt einer systemischen Form eine lokale Form der Therapie einzusetzen. Dieser Therapieansatz entsprach einer Kombination von Stent und Medikament, was einerseits mechanisch den elastic recoil und das negative remodeling sowie andererseits pharmakologisch die Neointimaprolieration im Sinne der biologischen Reaktion auf die Gefäßverletzung steuert [14]. Der Ansatz bestand darin, Stents als Arzneimittelträger zu verwenden und so durch lokale Abgabe des Pharmakons die In-Stent-Restenosen zu hemmen [14]. So kam es zur Einführung der DES. Die ersten erfolgreich eingesetzten Substanzen in klinischen Studien waren Rapamycin und Paclitaxel, welche heute noch in Verwendung sind [32, 72]. Studien verglichen die In-Stent-Restenoseraten zwischen herkömmlichen Stents (BMS) und Rapamycin- oder Paclitaxel-beschichteten Stents und konnten eine signifikante Senkung der In-Stent-Restenosen mit diesen Beschichtungen nachweisen [14, 32, 72]. Auch konnten Fusaro et al. eine Senkung der Restenose der fokalen Erkrankungen der infrapoplitealen Arterien mittels DES im Vergleich zur Ballonangioplastie oder Implantation von BMS nach einem Jahr nachweisen [73].

In Kenntnis dieser vorherigen Studien wurde dieser Versuch mit Drug-eluting Stents durchgeführt.

4.5 Wahl des Stents und der Beschichtung

Im vorliegenden Versuch wurden als Stents die Yukon-Stents der Marke Yukon® Choice^{DES} von der Firma translumina GmbH aus Rangendingen in Deutschland verwendet. Diese bestehen aus medizinischem Edelstahl und sind polymerfrei. Polymere wurden bei frühen Produkten wegen ihrer retardierten Substanzfreisetzung eingesetzt, rufen jedoch chronische Entzündungsreaktionen hervor und erhöhen das Thromboserisiko [74, 75].

Über Führungsdrähte werden sie in die peripheren Arterien implantiert. Damit der Zugang über ein Gefäß gelingt, besitzen sie eine flexible Form. Sobald sie im Gefäß appliziert wurden, gelten diese als bleibende Stütze im stenotischen Gefäßabschnitt.

Da die Stents dauerhafte Fremdkörper für den menschlichen, aber auch für den tierischen Organismus darstellen, verursachen diese lokalen Wandverletzungen der Gefäße und führen zu chronischen Abwehrreaktionen. Im Jahr 2000 wurde eine Studie über biologisch abbaubare Stents veröffentlicht, die sich im Laufe der Zeit auflösen und so die chronische Abwehrreaktion verhindert werden soll [76]. Die in diesem Versuch angewendeten Yukon-Stents enthalten Mikroporen in ihrer Oberfläche zur Adsorption verschiedener organischer Substanzen. Ihre Poren werden durch Applikation von Beschichtungen ausgefüllt und begünstigen die Adhäsion von Endothelzellen. Vorteil der Mikroporen ist, dass die Substanzen auf ihrer Stentoberfläche retardiert freigesetzt werden. Durch die Mikroporen der Yukon-Stentoberfläche wird der Effekt des Polymers ersetzt und senkt die chronische Entzündungsreaktion, die sich auch bei Ohlow et al. 2014 bestätigt haben [74, 77]. 2013 konnte King et al. vorlegen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den polymerfreien Rapamycin beschichteten Stents und den polymerhaltigen Paclitaxel-Stents nach 5 Jahren bestand, und dass das erweiterte Follow-up die Wirksamkeit und Sicherheit von polymerfreien Rapamycin beschichteten Stents unterstützt [78]. Wessely et al. belegten, dass mehrere Medikamente auf einen Stent aufgebracht werden können [79].

IV Diskussion

In den letzten Jahren haben DES an Bedeutung gewonnen. Die In-Stent-Restenosen sind insbesondere auf Wandverletzungen mit darauffolgenden Entzündungsreaktionen zurückzuführen. Die bisher erfolgversprechendsten Substanzen sind Rapamycin und Paclitaxel. Rapamycin ist ein Immunsuppressivum mit antientzündlichen und antiproliferativen Eigenschaften, das in Kombination mit anderen Präparaten gegen Organabstoßung nach Nierentransplantation sowie bei der Stentimplantation der Koronararterien in der Kardiologie eingesetzt wird [21, 32]. Paclitaxel ist eine antineoplastische Substanz, die die Zellteilung stoppt.

Rastan et al. verglichen Yukon-Stents als BMS mit Rapamycin beschichteten Yukon-Stents (Sirolimus, Synonym für Rapamycin, sirolimus-eluting stent, SES) in infrapoplitealen Arterien und konnten eine signifikante Reduktion der Restenosen nach der Revaskularisation nachweisen [32]. Auch im vorliegenden Versuch wurden die Yukon-Stents als BMS und mit Rapamycinbeschichtung als Vergleich angewendet. Die ereignisfreie Überlebensrate betrug in der SES-Gruppe 65,8% und in der BMS-Gruppe 44,6% [32]. Auch beschrieben Rastan et al., dass die SES bezüglich der Durchgängigkeitsraten signifikant der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) überlegen sind. Allerdings konnte Rastan et al. und Canaud et al. den Vorteil der SES bezogen auf die Extremitätenamputationen und Mortalität keinen Vorteil bestätigen [32, 80]. Auch Siablis et al. konnten für SES in infrapoplitealen Arterien eine langfristig signifikante Verbesserung der Gefäßdurchgängigkeit nach 3 Jahren und Verringerung der Restenoserate mit Reduktion von Reinterventionen gegenüber BMS nachweisen [81].

Drachmann et al. konnten im Jahr 2000 erstmals positive Ergebnisse für Paclitaxel beschichtete Stents (PES) in Iliakalarterien am Kaninchenmodell nachweisen [82]. Zeller et al. und Krankenberger et al. konnten 2013 und 2015 günstige Ergebnisse für PES in menschlichen femoropoplitealen Arterien im akuten und langfristigen Verlauf nachweisen [72, 83]. Nach 6 Monaten betrug die ereignisfreie Überlebensrate 96,2% [72].

Im vorliegenden Versuch wurde die Substanz Shikonin untersucht. Wie in Kapitel 1.4.2.3 beschrieben, hemmt sie unter anderem Entzündungsprozesse, das menschliche Cholesterin-Enzym ACAT, die Schaumzellbildung, TNF- α , die Proliferation und Invasion der vaskulären glatten Muskelzellen und hat sich so bei der Hemmung der Atherosklerose als wirksam erwiesen [39]. Zum Vergleich wurden als Kontrolluntersuchung die Stents mit Rapamycin-Beschichtung (SES) und Stents mit Wirkstoff-freien Lösungsmitteln (BMS) in die Studie miteinbezogen [72].

4.6 Ausmaß der Gefäßwandreaktion auf die unterschiedlichen Beschichtungen

4.6.1 Fläche der Neointima und Media

Für das Auftreten einer In-Stent-Restenose ist die Stärke der neointimalen Flächenbildung entscheidend. In diesem Versuch konnte nach 6 Wochen die Bildung einer Neointima in der Stentmitte in allen Gruppen nachgewiesen werden. Dieses spricht für eine durch eine Stentimplantation induzierte Reaktion. Durch die Substanz Shikonin konnte in diesem Experiment keine Verminderung der Neointimafläche erreicht werden. Alle drei Shikoninkonzentrationen zeigten in der gestenteten Aorta mehr Neointimafläche gegenüber der derzeit etablierten Rapamycinbeschichtung und auch gegenüber der Wirkstoff-freien Stentgruppe (BMS). Dabei bestand keine Dosisabhängigkeit. Die Neointimafläche der Shikoningruppen war im Median zwischen 0,83 und 1,01 mm² in der Mitte der gestenteten Aorta, die der Rapamycin- und der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe lag bei 0,68 und 0,6 mm². Am Ende der gestenteten Aorta war die Neointimafläche der Shikoningruppe zwischen 0,93 und 1,16 mm² im Median und die der Vergleichsgruppen zwischen 0,68 und 0,91 mm² im Median. Dies

bedeutet, dass eine erhöhte Restenoserate durch Shikonin gegenüber den Vergleichsgruppen besteht.

Die Gefäßweite einer gesunden Arterie wird durch die glatten Muskelzellen der Media zur Kreislaufregulierung gesteuert. Durch die Formstabilität der Stents geht lokal die vasomotorische Funktion der Media verloren und führt nach einer gewissen Zeit zur Hypo- bis Atrophie der glatten Muskelzellen, wodurch eine Gefäßperforation entstehen kann. Eine Gefäßperforation ist in dieser Studie bei keinem der Tiere nach 6 Wochen nachweisbar gewesen. Das Ausmaß der Mediafläche zeigt sich in diesem Versuch zwischen den Dosisgruppen und Vergleichsgruppen innerhalb der gestenteten und der nativen Aorta in unterschiedlichen Ausprägungen. Ein dosisabhängiger Effekt der Substanz Shikonin ist hier nicht zu beobachten. Insgesamt war bei der hohen Shikoninkonzentration eine geringere Fläche der Media als bei Rapamycin zu beobachten. Am Stentende war bei der hoch dosierten Shikoningruppe die geringste Mediafläche zu beobachten. Diese ist wohl darauf zurückzuführen, dass es durch die hohe Schichtdicke aufgrund der hohen Substanzkonzentration zu einem hohen Druck zwischen dem Stent und der Gefäßwand mit nachfolgender Druckatrophie der Media kam.

4.6.2 Zellproliferation

Eine erhöhte Zellproliferation trägt zur Entstehung einer Atherosklerose bei. Anhand der PCNA-Färbung ist die Zellproliferation nachweisbar, die als Kofaktor der DNA-Polymerase dient. Mittels der DAPI-Färbung werden Zellkerne zur Visualisierung der Gesamtzellzahl präsentiert. Der Proliferationsindex resultiert aus der Zahl der positiv gefärbten Zellkerne im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

Im vorliegenden Versuch ist beobachtbar, dass der Proliferationsindex der Rapamycingruppe erwartungsgemäß kleiner ist als der der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe und mit einer geringeren Zellproliferation innerhalb der

gestenteten Aorta in beiden Gefäßschichten (Neointima und Media) einhergeht. Die geringste Zellproliferation besteht bei der Neointima in der hoch dosierten Shikonin-Gruppe und bei der Media in der niedrig und hoch dosierten Shikonin-Gruppe. Diese Gruppen wiesen eine geringere Zellproliferation gegenüber den BMS und interessanterweise auch gegenüber dem Rapamycin auf. Der Proliferationsindex der niedrig dosierten Shikonin-Gruppe in der Neointima war ähnlich ausgeprägt wie derjenige der Rapamycin-Gruppe. Eine Dosisabhängigkeit der Zellproliferation in der Neointima liegt im vorliegenden Versuch nicht vor. Am Stentende zeigt die hoch dosierte Shikonin-Gruppe in beiden Gefäßschichten eine erheblich hohe Zellproliferation. In dieser Gruppe besteht eine positive Korrelation zwischen der hohen Zellproliferation und der großen Neointimafläche.

In der Zusammenschau lässt sich durch Shikonin vorwiegend in der Stentmitte ein gutes Ergebnis mit einer geringen Proliferation bei kleinem Index erzielen. Vor allem bei dem niedrig und hoch dosierten Shikonin ist dies der Fall. Gegenüber Rapamycin erzielt der Einsatz von Shikonin auch teilweise eine geringere Zellproliferation. Insgesamt ist in diesem Versuch die Hemmung der Proliferation in der Stentmitte möglich, jedoch am Stentende nicht effektiv.

4.6.3 Entzündungsreaktion in der Gefäßwand

1998 beschrieben Kornowski et al. zusätzlich eine positive Korrelation sowohl zwischen dem Entzündungsausmaß und der Größe der Neointimafläche als auch zwischen dem Entzündungsausmaß und dem Verletzungsgrad [60]. In der vorliegenden Studie ist ebenso eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Gefäßverletzung und dem Ausmaß der Entzündung zu beobachten. Ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Entzündung und der Größe der Neointimafläche ist in der Verum-Gruppe nicht festzustellen.

4.6.4 Makrophagenverteilung

Im ersten Schritt einer Atherosklerose infiltrieren Makrophagen die arterielle Gefäßwand und spielen für den Progress der Atherosklerose und Restenose eine essentielle Rolle. Die Makrophagen können durch eine RAM-11-Färbung nachgewiesen werden. Die Stentstreben reizen die Gefäßwand, wodurch reaktiv mehr Makrophagen aufzufinden sind. Je größer der Reiz, desto mehr Makrophagen lassen sich in den äußeren Anteilen der Gefäßwand finden. In diesem Versuch sind die Makrophagen in der Wirkstoff-freien Kontrollgruppe und in der Rapamycingruppe erwartungsgemäß vorwiegend um die Streben herum verteilt, weniger in der übrigen Neointima und in der Media. Auch die niedrig dosierte Shikoningruppe zeigt dieses Muster. Jedoch weist die Rapamycingruppe gegenüber den BMS eine geringere Makrophagenfreiheit auf, was auf die Reizung der Gefäßwand durch die Substanz zurückzuführen ist. Bei niedriger Shikoninkonzentration wird in keiner Gefäßschicht ein Fehlen von Makrophagen erzielt. Die mittlere Shikonindosis führt um die Stentstreben herum zu keinem Fehlen von Makrophagen, nach außen hin erwartungsgemäß besteht eine höhere Rate ein fehlendes Einwandern der Makrophagen. Bei der hohen Shikonindosis kommt es zwar stellenweise zur Makrophagenfreiheit, jedoch nicht bis in die äußeren Wandschichten der Gefäße. Bei der niedrigen Shikonindosis ist die höchste Makrophagenkonzentration in der Neointima festgestellt worden (annähernd 37% um die Stentstreben und 31% in der übrigen Neointima), die insgesamt höher als bei Rapamycin und bei den BMS ausfiel. Bei einer hohen Shikonindosis kommt es zur zunehmenden Ausbreitung der Makrophagenkonzentration in die äußeren Wandschichten der Gefäße hinein. Grund für die verstärkte Ausbreitung der Makrophagen um die Streben herum ist, dass der mechanische Reiz und die Substanzfreisetzung eine Gefäßreaktion auslöst und eine Makrophagenfreisetzung zur Folge hat. Die BMS erweisen sich als vorteilhaft in Bezug auf die Makrophagenanzahl und -verteilung im Vergleich zu Rapamycin. Die eben angesprochene Erkenntnis ist auf die fehlende Reizung durch Substanzen auf die Gefäßwand zurückzuführen.

4.6.5 Gefäßwandverletzung

Schwartz et al. beschrieben 1992 einen proportionalen Zusammenhang zwischen dem Grad der Gefäßverletzung durch den Stent und der daraus hervorgehenden Neointimaprolieration [25]. Wie in Kapitel 3.1.3 erwähnt, wurde der vessel injury score nach Schwartz et al. in diesem Versuch in modifizierter Form angewendet. In der Verum-Gruppe ist ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Verletzungsgrad und der Neointimafläche nicht festzustellen. In der Mitte der gestenteten Aorta war die Gefäßwandverletzung bei der Verum-Gruppe insgesamt höher als bei den Vergleichsgruppen. Die Rapamycingruppe zeigte erwartungsgemäß ein geringes Verletzungsausmaß.

4.7. Unterschiede der Gefäßbeschaffenheit nach Implantation der Stents

4.7.1 Endothel

Die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen bilden vWF, der anhand einer immunhistochemischen Färbung markiert werden kann. Die Endothelzellen bilden eine natürliche Barriere zwischen dem Gewebe und der Blutbahn und sind unter anderem an inflammatorischen, gerinnungsbeeinflussenden Prozessen beteiligt [84]. Durch die perkutane transluminale Angioplastie entsteht über die Denudation eine Endothelverletzung mit endothelialer Funktionsstörung, was die Gefahr einer Thrombosierung erhöht [84]. In diesem Versuch ist nach 6 Wochen eine zunehmende Reendothelialisierung in der gestenteten Aorta der Verum-Gruppe zu beobachten. Dieses zeigt einen leichten dosisabhängigen Effekt zugunsten der Mittel- und Hochdosierung und hat ein besseres Ergebnis gegenüber der klinisch angewendeten Rapamycingruppe. Das Rapamycin führte in der Mitte der gestenteten Aorta vorwiegend zu einem Endothelzellverlust bzw. -defekt, was den Ergebnissen bei der Anwendung dieser Substanz entspricht. Auch gegenüber der Kontrollgruppe, bei der in der gestenteten Aorta vorwiegend

eine geringe Reendothelialisierung festzustellen ist, zeigt die Substanz Shikonin ein besseres Ergebnis. Finn et al. belegten, dass bei dem Einsatz von SES weniger reendothelialisierte Zellen gegenüber dem Einsatz von BMS entstanden [75]. Joner et al. wiesen in ihrer Studie nach, dass der Einsatz von BMS gegenüber DES mit Rapamycin, Paclitaxel, Everolimus und Zotarolimus zu einer vollständigen Reendothelialisierung führte, und dass es bei Anwendung von Rapamycin und Paclitaxel insgesamt zu einer geringen Endothelzellbildung kam [85]. Auch im vorliegenden Versuch bestätigte sich eine geringere Reendothelialisierung bei Einsatz von SES gegenüber dem Einsatz von BMS.

4.7.2 Kollagen Typ I und Typ III

Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, verändern sich Kollagentypen durch die Gefäßverletzung im Rahmen der Umbauprozesse, damit die Gefäße ihre ursprüngliche Bindegewebsstütze wiederherstellen können. Das Gefäß reagiert auf die Verletzung mit der Bildung reparativer Kollagene vom Typ III und ist im Rahmen eines Heilungsprozesses an der Restenosierung beteiligt [86]. So bestimmt das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III maßgebend den Prozess der Einheilung und spiegelt die Festigkeit des entstandenen Gewebes in der gestenteten Aorta abdominalis wider. Der Kollagen Typ III akkumuliert früher als der Kollagen Typ I, wobei der Kollagen Typ I vermutlich zu einer schnelleren und kräftigeren Gewebekontraktion als Typ III führt, so nehmen die beiden Kollagentypen also eine unterschiedliche Rolle bei den Wundheilungsprozessen ein [87, 88]. Daher ist Diskrimination zwischen den beiden Typen wichtig, um die Pathophysiologie bei Narbenkontrakturen zu verstehen [89]. Krishnan et al. belegten, dass Kollagenablagerungen zur Neointimaprolieration beitragen [86]. Auch Rodriguez et al. belegten, dass während des neointimalen Wachstums eine Kollagensynthese stattfindet [90]. Aus der Implantation von BMS resultiert eine hohe Kollagensynthese. Rapamycin hemmt diesen Prozess, so dass vorwiegend natives Gewebe verbleibt und die

Rate an In-Stent-Restenosen sinkt. Im vorliegenden Versuch ist erwartungsgemäß bei den BMS vorwiegend narbiges Gewebe und bei der Rapamycingruppe vorwiegend natives Gewebe zu beobachten. Auch die niedrige Shikonindosis zeigt bei hauptsächlich nachgewiesenem Kollagen Typ I ein gutes Ergebnis mit vorwiegend nativem Gewebe. Bei steigender Shikoninkonzentration ist mehr narbiges Gewebe zu beobachten, was wie bei einer Wundheilung als proliferativer Reiz verstanden werden kann. Die hohe Shikoninkonzentration trägt somit wohl eher zur Bildung einer Restenose bei. Die Entstehung einer Restenose ist damit einerseits abhängig von der Dosis, andererseits sollte hier auch die Auswirkung der hohen Beschichtungsdicke des Stents, was durch die hohe Konzentration an Shikonin bedingt ist, als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden.

4.8 Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Der vorliegende Versuch zeigte, dass die Implantation von Shikoninbeschichteten Stents in die Aorta abdominalis der Kaninchen durchführbar ist und in einem Zeitraum von sechs Wochen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen oder Spätfolgen zu erwarten sind.

Nach einer Stentimplantation entsteht durch den starken Reiz auf das Gefäß eine Inflammation in der Gefäßwand. Diese ist mit einem hohen Proliferationsindex und einer größeren Neointimafläche verbunden. Die gewählte Substanzbeschichtung supprimiert zwar die Entzündungsantwort, jedoch nicht so effektiv wie die Rapamycinbeschichtung. Im Rahmen des modifizierten vessel inflammation score von Kornowski et al. ist die Supprimierung der Entzündungsreaktion bei der niedrigen Shikoninkonzentration in ähnlichem Ausmaß wie bei Rapamycin ausgeprägt. Jedoch zeigen die beiden höheren Shikoninkonzentrationen schlechtere Ergebnisse in Bezug auf eine Restenosierung. In der Stentmitte lässt sich ein gutes Ergebnis mit einer geringen Proliferation bei kleinem Index in der niedrig- und hochdosierten Shikoningruppe

IV Diskussion

feststellen. Am Stentende ist der Proliferationsindex bei Anwendung von Shikonin mit steigender Konzentration zunehmend größer im Vergleich zu Rapamycin und somit prognostisch schlechter. Auch gegenüber den BMS ist der Proliferationsindex bei Anwendung von Shikonin schlechter. Eine geringe Shikoninkonzentration hemmt die Synthese von Kollagen Typ III mit Vorhandensein von vorwiegend nativem Gewebe. Eine hohe Shikoninkonzentration führt zu einer hohen Kollagensynthese mit Entstehung von vorwiegend narbigem Gewebe, die bei einer Wundheilung als proliferativer Reiz verstanden werden kann, aber auf diese Weise gleichzeitig die Atherosklerose begünstigt. Bezogen auf die Neointimafläche zeigen die Stents in Form eines BMS in der Stentmitte das beste Ergebnis, gefolgt von den Rapamycin beschichteten Stents. Die gewählte Stentbeschichtung mit Shikonin zeigt sowohl gegenüber der Rapamycinbeschichtung als auch gegenüber dem unbeschichteten Material keine effektive Verminderung der Neointimafläche. Die geringere Mediafläche in der gestenteten Aorta ist auf den Druck des Stents mit folgendem Funktionsverlust der Vasomotorik der Media zurückzuführen. Durch den mechanischen Reiz der Stents und durch die Substanzfreisetzung entsteht eine Gefäßreaktion, welche eine Infiltration von Makrophagen zur Folge hat, die an der In-Stent-Restenosis beteiligt sind. Die Makrophagen befinden sich in der Regel vorwiegend im Bereich der Stentstreben. Bei Shikonin besteht bezüglich der Makrophagen eine Dosisabhängigkeit zum Nachteil der hohen Konzentration. Folglich zeigt diese bezüglich der Makrophageninfiltration keinen Benefit gegenüber Rapamycin. Der mangelnde Erfolg der Hemmung der Zellproliferation, Hemmung der Kollagensynthese und Hemmung der Makrophageninfiltration ist möglicherweise zurückführbar auf die hohe Beschichtungsdicke, die die hohe Shikoninkonzentration nötig macht, so dass es zu einer hohen mechanischen Reizung der Gefäßwände kommt und somit der Vorteil des Shikonins durch die hohe Schichtdicke antagonisiert wird.

Der im Rahmen der Gefäßwandverletzung entstehende Endothelschaden kann eine Thrombose begünstigen und auf eine später erhöhte In-Stent-

IV Diskussion

Restenosierung hindeuten. Nach sechs Wochen kommt es durch Shikonin jedoch interessanterweise zu einer deutlichen Regeneration des Endothels, obwohl der Versuch darauf hindeutet, dass Shikonin zu einer vermehrten Gefäßwandverletzung führt. Auch ist die Reendothelialisierung mit einer Dosisabhängigkeit verbunden. Bereits eine geringe Substanzkonzentration führt zu geringeren Endotheldefekten, als dies durch Rapamycin erreicht werden kann. Mit zunehmender Shikoninkonzentration wird eine noch bessere Reendothelialisierung erreicht. Es ist davon auszugehen, dass das spätere Thromboserisiko durch die gewählte Substanz deutlich gesenkt werden kann.

Das hier verwendete Tiermodell mit den weißen Neuseelandkaninchen zeigt, dass mit Hilfe von Shikonin beschichteten Stents eine Veränderung der Gefäßwandreaktionen nach Angioplastie zwar grundsätzlich zu erzielen ist, die In-Stent-Restenose aber nur begrenzt reduziert werden kann. Die Behandlung mit Shikonin-beschichteten DES zur Reduktion einer In-Stent-Restenose bietet einen geringeren Vorteil als die Behandlung mittels den etablierten DES mit Rapamycin und den in diesem Versuch verwendeten BMS. In Bezug auf die Reendothelialisierung zeigt Shikonin jedoch ein deutliches Benefit im direkten Vergleich zu Rapamycin. Es besteht hierbei auch eine Dosisabhängigkeit. Je höher die Shikoninkonzentration, desto höher ist die Reendothelialisierung.

Da dieses Tiermodell eine Vorstufe für den klinischen Einsatz darstellt, sollte der Versuch an weiteren Tiermodellen durchgeführt werden, wie beispielsweise am Schwein, dessen Pathomechanismen dem Menschen näher sind. Darüber hinaus könnte eine Kombination aus Shikonin mit einer anderen Substanz wie beispielsweise Rapamycin als Beschichtung in Betracht gezogen werden, da das Shikonin Vorteile im Hinblick auf die Reendothelialisierung und das Rapamycin auf die In-Stent-Restenose zeigt. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgelegten Erkenntnis, dass eine hohe Shikoninkonzentration mit vermehrter Gefäßreizung einhergeht, sollte ein Augenmerk auf die Beschichtungsdicke des Stents gelegt werden.

V Zusammenfassung

Zur Behandlung von atherosklerotisch bedingten Gefäßstenosen ist der lokale Einsatz von Stents etabliert und eine Restenosierung nach einer perkutanen transarteriellen Angioplastie kann dadurch gesenkt, aber nicht verhindert werden. Die Ursache für die Restenose ist die Hyperplasie der Intima. Eine Unterdrückung der Neointimabildung ist zur Vorbeugung der In-Stent-Restenose notwendig. Daher wurden Versuche mit verschiedenen Substanzen als Beschichtung auf den Stents (drug eluting stents, DES) durchgeführt. Histologisch spielen vor allem die Gefäßwandverletzung, die Inflammation, die Proliferation, der Endothelschaden mit erhöhtem Thromboserisiko und das Einwandern von Makrophagen eine wesentliche Rolle für die In-Stent-Restenosen. In diesem Versuch wurden die polymerfreien Yukon-Stents mit Shikonin beschichtet und am Tiermodell der weißen Neuseelandkaninchen untersucht. Die neuartige Beschichtung wurde mit der bisher etablierten Rapamycinbeschichtung und mit dem reinen BMS verglichen. Die Stents wurden in die infrarenale Aorta implantiert. Es wurden 40 Tiere ausgewertet. Diese Tiere wurden in Gruppen eingeteilt: DES mit einer Shikoninkonzentration von 2,5µg/ml (Dosisgruppe I, n=7), 5 µg/ml (Dosisgruppe II, n=8) und 10 µg/ml (Dosisgruppe III, n=8), DES mit Rapamycin (n = 6) und BMS (n = 11). Mit Durchführung einer sechswöchigen Cholesterindiät wurde die Induktion einer Intimahyperplasie beschleunigt. Der Versuchszeitraum endete mit dem Ende der Cholesterindiät und es folgte die Aufarbeitung und Auswertung der Präparate.

Eine Reendothelialisierung eines Gefäßes spricht für eine Gefäßheilung mit verminderten Raten an späteren In-Stent-Restenosen. Die Substanz Shikonin erzielte hierbei eine deutliche Reendothelialisierung, wohingegen dies bei DES mit Rapamycin und bei BMS nicht in vergleichbarem Ausmaß der Fall war. Eine zunehmende Konzentration an Shikonin geht hierbei mit einer zunehmenden Reendothelialisierung einher. Morphologisch erzielte Shikonin jedoch keine effektive Verminderung der intimalen Hyperplasie vergleichend zu den BMS und den DES mit Rapamycin. Immunhistochemisch führte Shikonin insgesamt zu

V Zusammenfassung

einer moderat bis stark ausgeprägten Gefäßwandverletzung, Entzündungsreaktion, Makrophageninfiltration und narbigen Veränderungen. Shikonin zeigte in der Stentmitte einen niedrigeren Proliferationsindex gegenüber Rapamycin und korreliert nicht mit dem Ausmaß der Flächenbildung der Neointima. Erwartungsgemäß zeigte Rapamycin die geringste Gefäßwandverletzung. Die geringste Inflammation wurde jedoch bei Anwendung der BMS beobachtet. Die hohe Shikoninkonzentration hatte eine hohe Zellproliferation, deutliche narbige Veränderungen und deutliche Makrophageninfiltration zur Folge. Möglicherweise ist es auf die hohe Beschichtungsdicke zurückzuführen, die die hohe Shikoninkonzentration nötig macht, so dass es zu einer hohen mechanischen Reizung der Gefäßwand kommt und somit der Vorteil des Shikonins durch die hohe Schichtdicke antagonisiert wird. Ferner induziert die Substanz beispielsweise im Rahmen der wundheilenden Eigenschaften selbst sogar einen Proliferationsreiz.

In Bezug auf die Restenoserate in-vivo sind die DES mit Shikonin den DES mit Rapamycin und den konventionellen Stentprodukten unterlegen, auch wenn die Substanz bezüglich der Reendothelialisierung ein besseres Outcome aufzeigt. Dabei besteht eine Dosisabhängigkeit des Grades der Reendothelialisierung, wobei mit steigender Shikoninkonzentration eine zunehmende Reendothelialisierung erkennbar wird.

VI Literatur

- 1 Vögele J (Hrsg.). Stadt, Krankheit und Tod. Berlin: Duncker & Humblot; 2000
- 2 Scheuermann A-M. Statistisches Bundesamt Pressemitteilung 2015: 465
- 3 Bruckenberg E. Deutscher Herzbericht 2009
- 4 Dipl.-Geograph Torsten Schelhase, Dipl.-Volkswirt Stefan P. Rübenach und Mitarbeiterinnen. Die Todesursachenstatistik –Methodik und Ergebnisse 2004. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt Wirtschaft und Statistik, 2006: 614–630
- 5 Yeniel AO, Ergenoglu AM, Meseri R, Ari A, Sancar C, Itil IM. Systemic atherosclerosis and voiding symptom. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2017; 210: 306–309
- 6 Baudet M, Daugareil C, Ferrieres J. Prevention des maladies cardiovasculaires et regles hygieno-dietetiques. Ann Cardiol Angeiol (Paris) 2012; 61 (2): 93–98
- 7 Fontaine R, Fontaine JL. Le indicazioni terapeutiche, rispettivamente mediche e chirurgiche, nelle oblitterazioni arteriose periferiche da arteriosclerosi. Minerva Med 1967; 58 (101): 4648–4655
- 8 Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, Jones DN. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. J Vasc Surg 1997; 26 (3): 517–538
- 9 Proudfit WL. Grading angina pectoris: comment on the Canadian system. Can J Cardiol 1986; 2 (2): 62–63
- 10 Campeau L. The Canadian Cardiovascular Society grading of angina pectoris revisited 30 years later. Can J Cardiol 2002; 18 (4): 371–379
- 11 Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application. 1964. Radiology 1989; 172 (3 Pt 2): 904–920

- 12** Grüntzig A (Hrsg.). Die perkutane transluminale Rekanalisation chronischer Arterienverschlüsse mit einer neuen Dilatationstechnik. Baden-Baden, Köln, New York: Witzstrock; 1977
- 13** Roskamm H, Neumann F-J, Kalusche D, Bestehorn H-P (Hrsg.). Herzkrankheiten: Pathophysiologie Diagnostik Therapie. 5 Aufl. Berlin: Springer Berlin; 2014
- 14** 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 (5): 443–453
- 15** Dotter CT. Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery. *Invest Radiol* 1969; 4 (5): 329–332
- 16** Sutton CS, Tominaga R, Harasaki H, Emoto H, Oku T, Kambic HE, Skibinski C, Beck G, Hollman J. Vascular stenting in normal and atherosclerotic rabbits. Studies of the intravascular endoprosthesis of titanium-nickel-alloy. *Circulation* 1990; 81 (2): 667–683
- 17** Serruys PW, van Hout B, Bonnier H, Legrand V, Garcia E, Macaya C, Sousa E, van der Giessen W, Colombo A, Seabra-Gomes R, Kiemeneij F, Ruygrok P, Ormiston J, Emanuelsson H, Fajadet J, Haude M, Klugmann S, Morel M-A. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). *The Lancet* 1998; 352 (9129): 673–681
- 18** Fischman David L., Leon Martin B., Baim Donald S., Schatz Richard A., Savage Michael P., Penn Ian, Detre Katherine, Veltri Lisa, Ricci Donald, Nobuyoshi Masakiyo, Cleman Michael, Heuser Richard, Almond David, Teirstein Paul S., Fish R. David, Colombo Antonio, Brinker Jeffrey, Moses Jeffrey, Shaknovich Alex, Hirshfeld John, Bailey Stephen, Ellis Stephen, Rake Randal, Goldberg Sheldon. A Randomized Comparison of Coronary Stent Placement and Balloon Angioplasty in the Treatment of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*; 1994; 331 (8): 496–501

- 19** Edelman ER, Rogers C. Pathobiologic Responses to Stenting 11 Supported in part by grants from the National Institutes of Health (GM/HL49039 and HL03104), the Burroughs Wellcome Fund for Experimental Therapeutics, Durham, North Carolina, and the Whitaker Foundation, Rosslyn, Virginia. *The American Journal of Cardiology* 1998; 81 (7): 4E-6E
- 20** Kastrati A, Schömig A, Dirschinger J, Mehilli J, Welser NV, Pache J, Schühlen H, Schilling T, Schmitt C, Neumann F-J. Increased Risk of Restenosis After Placement of Gold-Coated Stents Results of a Randomized Trial Comparing Gold-Coated With Uncoated Steel Stents in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 2000; 101 (21): 2478–2483
- 21** 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 (5): 405–418
- 22** Hiatt BL, Ikeno F, Yeung AC, Carter AJ. Drug-eluting stents for the prevention of restenosis: In quest for the holy grail. *Cathet. Cardiovasc. Intervent.* 2002; 55 (3): 409–417
- 23** 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 (1): 23–28
- 24** Scott NA. Restenosis following implantation of bare metal coronary stents: Pathophysiology and pathways involved in the vascular response to injury. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58 (3): 358–376
- 25** 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 (2): 267–274

- 26** 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 (10): 1312–1318
- 27** Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24 (5): 1398–1405
- 28** 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 (3): 224–233
- 29** Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* 2002; 105 (25): 2974–2980
- 30** Mehran R, Mintz GS, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Brahim A, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Validation of the in vivo intravascular ultrasound measurement of in-stent neointimal hyperplasia volumes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32 (3): 794–799
- 31** Pschyrembel W, Witzel S, Dornblüth O (Hrsg.). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 261 Aufl. Berlin: de Gruyter; 2007
- 32** Rastan A, Brechtel K, Krankenberg H, Zahorsky R, Tepe G, Noory E, Schwarzwälder U, Macharzina R, Schwarz T, Bürgelin K, Sixt S, Tübler T, Neumann F-J, Zeller T. Sirolimus-Eluting Stents for Treatment of Infrapopliteal Arteries Reduce Clinical Event Rate Compared to Bare-Metal Stents. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60 (7): 587–591
- 33** Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Howard MZ. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother Res* 2002; 16 (3): 199–209
- 34** Chang I-C, Huang Y-J, Chiang T-I, Yeh C-W, Hsu L-S. Shikonin induces apoptosis through reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase pathway in osteosarcoma cells. *Biol Pharm Bull* 2010; 33 (5): 816–824

- 35** Chen X, Yang L, Zhang N, Turpin JA, Buckheit RW, Osterling C, Oppenheim JJ, Howard OMZ. Shikonin, a component of chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (9): 2810–2816
- 36** Chen X, Oppenheim J, Howard OM. Shikonin, a component of antiinflammatory Chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. *Int Immunopharmacol* 2001; 1 (2): 229–236
- 37** Hayashi M. Pharmacological studies of Shikon and Tooki. (2) Pharmacological effects of the pigment components, Shikonin and acetylshikonin. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 1977; 73 (2): 193–203
- 38** Wang L, Li Z, Zhang X, Wang S, Zhu C, Miao J, Chen L, Cui L, Qiao H. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF- κ B, TNF- α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability. *Neurochem Res* 2014; 39 (1): 97–106
- 39** Ishida T, Sakaguchi I. Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. *Biol Pharm Bull* 2007; 30 (5): 928–934
- 40** Weng XC, Xiang GQ, Jiang AL, Liu Y, Wu LL, Dong XW, Duan S. Antioxidant properties of components extracted from puccoon (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.). *Food Chemistry* 2000; 69 (2): 143–146
- 41** Lin ZB, Wang P, Ruan Y, Guo QX. Anti-inflammatory effect of beta, beta-dimethylacrylshikonin (author's transl). *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1980; 1 (1): 60–63
- 42** Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol Pharm Bull* 2002; 25 (5): 669–670

- 43** Ueba N, Otake T, Yamazaki K, Mori H, Morimoto M. Anti-HIV-1 activities of crude drug, shikon (*Lithospermi radix*), in vitro. *Nihon Rinsho* 1993; 51 Suppl: 207–212
- 44** An S, Park Y-D, Paik Y-K, Jeong T-S, Lee WS. Human ACAT inhibitory effects of shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17 (4): 1112–1116
- 45** Zhang X, Hu W, Wu F, Yuan X, Hu J. Shikonin inhibits TNF-alpha-induced growth and invasion of rat aortic vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2015; 93 (8): 615–624
- 46** Zhang ZQ, Cao XC, Zhang L, Zhu WL. Effect of shikonin, a phytochemical from *Lithospermum erythrorhizon*, on rat vascular smooth muscle cells proliferation and apoptosis in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85 (21): 1484–1488
- 47** Hashimoto S, Xu Y, Masuda Y, Aiuchi T, Nakajo S, Uehara Y, Shibuya M, Yamori T, Nakaya K. β -Hydroxyisovalerylshikonin Is a Novel and Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Kinases. *Japanese Journal of Cancer Research* 2002; 93 (8): 944–951
- 48** Baumgartner HR, Studer A. Folgen des Gefäßkatheterismus am normo- und hypercholesterinaemischen Kaninchen. *Pathol Microbiol (Basel)* 1966; 29 (4): 393–405
- 49** Ferrell M, Fuster V, Gold HK, Chesebro JH. A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis. *Circulation* 1992; 85 (4): 1630–1631
- 50** Marshall M. Tiermodelle zur Atheroskleroseforschung. *VASA* 1978; 7 (3): 313–321
- 51** Donath K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien 1988; 34: 197–206
- 52** Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 3 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009

- 53** Welsch U, Deller T. Lehrbuch Histologie. 3 Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010
- 54** Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27 (8): 1131–1139
- 55** Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29 (4): 577–580
- 56** Falini B, Solas I de, Halverson C, Parker JW, Taylor CR. Double labeled-antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 1982; 30 (1): 21–26
- 57** Ternynck T, Avrameas S. Avidin-biotin system in enzyme immunoassays. In: Wilchek M (Hrsg.). *Avidin-biotin technology*. San Diego, Calif.: Acad. Press; 1990: 469–481
- 58** Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1990; 10 (5): 680–687
- 59** Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, Inoue N, Hirata K-i, Matsukawa A, Morishita R, Kaneda Y, Yokoyama M. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22 (1): 115–120
- 60** Kornowski R, Hong MK, Leon MB. Direct myocardial revascularization in ischemic heart disease. *Int J Cardiovasc Intervent* 1998; 1 (1): 3–9
- 61** Hofma SH, Whelan DM, van Beusekom HM, Verdouw PD, van der Giessen, W J. Increasing arterial wall injury after long-term implantation of two types of stent in a porcine coronary model. *European Heart Journal* 1998; 19 (4): 601–609

- 62** Konstantinov IE, Mejevoi N, Anichkov NM. Nikolai N. Anichkov and His Theory of Atherosclerosis. *Tex Heart Inst J* 2006; 33 (4): 417–423
- 63** Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997; 135 (1): 1–7
- 64** Buja LM. Nikolai N. Anitschkow and the lipid hypothesis of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2014; 23 (3): 183–184
- 65** Schönheimer R. Über die experimentelle Cholesterinkrankheit der Kaninchen. *Virchows Arch. path Anat.*; 249 (1): 1–42
- 66** McPherson R, Lau P, Kussie P, Barrett H, Tall AR. Plasma Kinetics of Cholesteryl Ester Transfer Protein in the Rabbit: Effects of Dietary Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (1): 203–210
- 67** Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 1980; 36 (2): 261–268
- 68** Tepe G, Duda SH, Hagmeier S, Brehme U, Kalinowski M, Bruck B, Schmahl FW, Claussen CD. Plaquemorphologie nach arteriellen Interventionen am Weissen Neuseelandkaninchen--Wann ist welches Restenosemodell geeignet? *Rofo* 1998; 168 (1): 84–89
- 69** 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 (5): 1049–1058
- 70** Rassaf T, Steiner S, Kelm M. Postoperative care and follow-up after coronary stenting. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110 (5): 72-81; quiz 82
- 71** Tienush Rassaf, Stephan Steiner, Malte Kelm. Ausgabe_A: Deutsches Ärzteblatt, Jg. 111, 26.Mai 2014, Seite 3
- 72** Zeller T, Dake MD, Tepe G, Brechtel K, Noory E, Beschorner U, Kultgen PL, Rastan A. Treatment of femoropopliteal in-stent restenosis with paclitaxel-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv* 2013; 6 (3): 274–281
- 73** Fusaro M, Cassese S, Ndrepepa G, Tepe G, King L, Ott I, Nerad M, Schunkert H, Kastrati A. Drug-eluting stents for revascularization of

- infrapopliteal arteries: updated meta-analysis of randomized trials. *JACC Cardiovasc Interv* 2013; 6 (12): 1284–1293
- 74** O'Brien B, Zafar H, Ibrahim A, Zafar J, Sharif F. Coronary Stent Materials and Coatings: A Technology and Performance Update. *Ann Biomed Eng* 2016; 44 (2): 523–535
- 75** Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27 (7): 1500–1510
- 76** Colombo A, Karvouni E. Biodegradable Stents: "Fulfilling the Mission and Stepping Away". *Circulation* 2000; 102 (4): 371–373
- 77** Ohlow M-A, Korn H von, Gunkel O, Farah A, Fuhrmann JT, Lauer B. Incidence of adverse cardiac events 5 years after polymer-free sirolimus eluting stent implantation: Results from the prospective Bad Berka Yukon Choice registry. *Catheter Cardiovasc Interv* 2014; 84 (7): 1080–1086
- 78** King L, Byrne RA, Mehilli J, Schomig A, Kastrati A, Pache J. Five-year clinical outcomes of a polymer-free sirolimus-eluting stent versus a permanent polymer paclitaxel-eluting stent: final results of the intracoronary stenting and angiographic restenosis - test equivalence between two drug-eluting stents (ISAR-TEST) trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2013; 81 (1): E23-8
- 79** Wessely R, Hausleiter J, Michaelis C, Jaschke B, Vogeser M, Milz S, Behnisch B, Schratzenstaller T, Renke-Gluszko M, Stover M, Wintermantel E, Kastrati A, Schomig A. Inhibition of neointima formation by a novel drug-eluting stent system that allows for dose-adjustable, multiple, and on-site stent coating. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (4): 748–753
- 80** Canaud L, Ozdemir BA, Belli A-M, Loftus IM, Thompson MM, Hinchliffe RJ. Infringuinal angioplasty with drug-eluting stents and balloons. *J Vasc Surg* 2014; 59 (6): 1721–1736
- 81** Siablis D, Karnabatidis D, Katsanos K, Diamantopoulos A, Spiliopoulos S, Kagadis GC, Tsolakis J. Infrapopliteal application of sirolimus-eluting versus

- bare metal stents for critical limb ischemia: analysis of long-term angiographic and clinical outcome. *J Vasc Interv Radiol* 2009; 20 (9): 1141–1150
- 82** 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 (7): 2325–2332
- 83** Krankenberg H, Tübler T, Ingwersen M, Schlüter M, Scheinert D, Blessing E, Sixt S, Kieback A, Beschorner U, Zeller T. Drug-Coated Balloon Versus Standard Balloon for Superficial Femoral Artery In-Stent Restenosis: The Randomized Femoral Artery In-Stent Restenosis (FAIR) Trial. *Circulation* 2015; 132 (23): 2230–2236
- 84** Cheneau E, John MC, Fournadjiev J, Chan RC, Kim H-S, Leborgne L, Pakala R, Yazdi H, Ajani AE, Virmani R, Waksman R. Time course of stent endothelialization after intravascular radiation therapy in rabbit iliac arteries. *Circulation* 2003; 107 (16): 2153–2158
- 85** Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, Wilson PS, Skorija K, Cheng Q, Xu X, Gold HK, Kolodgie FD, Virmani R. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52 (5): 333–342
- 86** Krishnan P, Purushothaman K-R, Purushothaman M, Baber U, Tarricone A, Vasquez M, Wiley J, Kini A, Sharma SK, O'Connor WN, Moreno PR. Relation of Internal Elastic Lamellar Layer Disruption to Neointimal Cellular Proliferation and Type III Collagen Deposition in Human Peripheral Artery Restenosis. *The American Journal of Cardiology* 2016; 117 (7): 1173–1179
- 87** Pešáková V, Štol M, Gillery P, Maquart FX, Borel JP, Adam M. The effect of different collagens and of proteoglycan on the retraction of collagen lattice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 1994; 48 (5-6): 261–266
- 88** Cohen K (Hrsg.). *Wound healing: Biochemical & [and] clinical aspects*. Philadelphia: Saunders; 1992

- 89** Schmidt MR, Maeng M, Kristiansen SB, Andersen HR, Falk E. The natural history of collagen and alpha-actin expression after coronary angioplasty. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13 (5): 260–267
- 90** Rodriguez M, Pascual G, Cifuentes A, Perez-Kohler B, Bellon JM, Bujan J. Role of lysyl oxidases in neointima development in vascular allografts. *J Vasc Res* 2011; 48 (1): 43–51

VII Erklärung zum Eigenanteil

VII Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Benjamin Wiesinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie und die Durchführung der Tierversuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Jörg Schmehl.

Die Einbettung der Präparate erfolgte durch Prof. Dr. med. Bruno Scheller aus der Abteilung Klinische und Experimentelle Interventionelle Kardiologie der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg.

Die histologische Aufarbeitung erfolgt durch Jürgen von der Ruhr aus dem anatomischen Institut Tübingen

Die gesamte Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Herrn Prof. Dr. Martin Eichner aus dem Institut für Klinische Epidemiologie und Angewandte Biometrie eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 07.03.2017

Pegah Müller-Mahdavi

VIII Anhang

Tabelle 8: Neointimafläche in der Stentmitte in mm².

Intimafläche in der Stentmitte in mm ²							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,30	0,32	0,44	0,60	0,77	1,05	1,08
2	0,58	0,58	0,60	0,68	0,81	0,95	0,95
3	0,45	0,45	0,57	0,98	1,30	1,42	1,42
4	0,44	0,44	0,63	0,83	1,24	1,31	1,31
5	0,65	0,65	0,76	1,01	1,38	1,66	1,66

Tabelle 9: Neointimafläche am Stentende.

Intimafläche am Stentende in mm ²							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,37	0,37	0,56	0,91	1,22	1,43	1,43
2	0,40	0,40	0,56	0,68	0,79	0,87	0,87
3	0,70	0,70	0,79	0,95	1,57	1,61	1,61
4	0,53	0,53	0,70	1,16	1,45	1,50	1,50
5	0,81	0,81	0,87	0,93	1,15	1,32	1,32

Tabelle 10: Neointimafläche in der nativen Aorta.

Intimafläche in der nativen Aorta in mm ²							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,40	0,40	0,40	0,77	0,90	1,19	1,19
2	0,21	0,21	0,34	1,01	1,35	1,37	1,37
3	0,30	0,30	0,33	0,59	1,07	1,72	1,72
4	0,20	0,20	0,44	1,02	1,23	1,31	1,31
5	0,28	0,28	0,60	0,79	0,94	1,12	1,12

Tabelle 11: Mediafläche in der Stentmitte.

Mediafläche in der Stentmitte in mm ²							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,45	0,46	0,50	0,64	1,00	1,09	1,11
2	0,69	0,69	0,73	0,77	0,96	1,14	1,14
3	0,52	0,52	0,52	0,58	0,80	1,07	1,07
4	0,51	0,51	0,64	0,82	1,05	1,28	1,28
5	0,63	0,63	0,66	0,74	0,75	1,02	1,02

VIII Anhang

Tabelle 12: Mediafläche am Stentende.

Mediafläche am Stentende in mm²							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,58	0,59	0,76	0,88	0,99	1,06	1,07
2	0,60	0,60	0,68	0,87	0,98	1,20	1,20
3	0,61	0,61	0,71	0,88	1,06	1,20	1,20
4	0,55	0,55	0,62	0,88	1,19	1,27	1,27
5	0,51	0,51	0,65	0,76	0,82	0,86	0,86

Tabelle 13: Mediafläche in der nativen Aorta.

Mediafläche in der nativen Aorta in mm²							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,79	0,79	0,87	1,08	1,30	1,71	1,71
2	0,80	0,80	0,89	1,12	1,22	1,31	1,31
3	0,43	0,43	0,70	0,78	0,98	1,26	1,26
4	0,63	0,63	0,87	1,13	1,21	1,51	1,51
5	0,65	0,65	0,93	1,02	1,09	1,23	1,23

Tabelle 14: Proliferationsindex der Neointima in der Stentmitte.

Proliferationsindex der Intima in der Stentmitte							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,18	0,18	0,27	0,62	1,91	2,26	2,26
2	0,20	0,20	0,28	0,39	0,83	0,86	0,86
3	0,02	0,02	0,05	0,40	0,46	1,30	1,30
4	0,39	0,39	0,44	0,67	0,79	0,81	0,81
5	0,19	0,19	0,26	0,29	0,49	1,28	1,28

Tabelle 15: Proliferationsindex der Neointima am Stentende.

Proliferationsindex der Intima am Stentende							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,13	0,14	0,22	0,66	1,59	2,96	2,99
2	0,36	0,36	0,40	0,46	0,68	0,73	0,73
3	0,44	0,44	0,44	0,80	0,94	0,94	0,94
4	0,30	0,30	0,49	0,77	1,46	1,53	1,53
5	1,68	1,68	1,68	2,07	2,28	2,28	2,28

VIII Anhang

Tabelle 16: Proliferationsindex der Media in der Stentmitte.

Proliferationsindex der Media in der Stentmitte							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,20	0,20	0,26	0,52	0,82	1,07	1,07
2	0,22	0,22	0,24	0,33	0,65	0,76	0,76
3	0,14	0,14	0,18	0,22	0,41	0,53	0,53
4	0,31	0,31	0,31	0,37	0,44	0,44	0,44
5	0,10	0,10	0,18	0,30	0,38	0,54	0,54

Tabelle 17: Proliferationsindex der Media am Stentende.

Proliferationsindex der Media am Stentende							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,13	0,13	0,27	0,56	1,01	1,86	1,95
2	0,22	0,22	0,37	0,47	0,56	0,57	0,57
3	0,42	0,42	0,42	0,67	0,80	0,80	0,80
4	0,11	0,11	0,20	0,50	0,82	0,88	0,88
5	1,21	1,21	1,21	2,24	2,43	2,43	2,43

Tabelle 18: Makrophagenverteilung im Bereich der Stentstreben.

	Gruppe				
	1	2	3	4	5
RAM 11 um die Strebe °	Verteilung	Verteilung	Verteilung	Verteilung	Verteilung
0,00	36 %	33 %	0 %	0 %	29 %
0,30	9 %	0 %	0 %	29 %	0 %
0,50	18 %	0 %	0 %	0 %	0 %
0,60	9 %	0 %	0 %	29 %	14 %
0,70	0 %	0 %	25 %	14 %	0 %
0,75	0 %	17 %	0 %	0 %	0 %
0,80	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
0,86	0 %	0 %	0 %	14 %	0 %
1,00	18 %	33 %	0 %	0 %	14 %
1,30	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
1,40	0 %	17 %	0 %	0 %	0 %
1,50	9 %	0 %	0 %	0 %	14 %
1,75	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
2,00	0 %	0 %	50 %	14 %	0 %

VIII Anhang

Tabelle 19: Makrophagenverteilung in der übrigen Neointima.

	Gruppe				
	1	2	3	4	5
Ram 11 übrige Neointima °	Verteilung	Verteilung	Verteilung	Verteilung	Verteilung
0,00	60 %	67 %	0 %	57 %	29 %
0,14	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
0,30	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
0,40	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
0,43	10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
0,70	0 %	17 %	0 %	0 %	0 %
0,73	10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
0,75	0 %	0 %	0 %	14 %	0 %
0,80	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
0,86	0 %	0 %	0 %	14 %	0 %
1,00	20 %	17 %	25 %	0 %	14 %
1,30	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
1,63	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
1,80	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
2,00	0 %	0 %	0 %	14 %	0 %

Tabelle 20: Makrophagenverteilung in der Media.

	Gruppe				
	1	2	3	4	5
RAM 11 Media °	Verteilung	Verteilung	Verteilung	Verteilung	Verteilung
0,00	73 %	67 %	0 %	57 %	14 %
0,25	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
0,29	9 %	0 %	0 %	0 %	0 %
0,33	0 %	0 %	25 %	0 %	14 %
0,43	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
0,67	9 %	0 %	0 %	0 %	14 %
1,00	0 %	17 %	0 %	29 %	0 %
1,20	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
1,25	0 %	0 %	0 %	14 %	0 %
1,33	0 %	0 %	25 %	0 %	0 %
1,50	0 %	0 %	0 %	0 %	14 %
1,80	9 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2,00	0 %	17 %	0 %	0 %	29 %

Tabelle 21: Verhältnis Kollagen I zu Kollagen III.

Verhältnis Kollagen Typ I zu Typ III							
Gruppe	Minimum	10 %	25 %	Median	75 %	90 %	Maximum
1	0,45	0,45	0,66	1,19	1,49	1,70	1,70
2	1,38	1,38	1,38	2,38	3,25	3,25	3,25
3	1,51	1,51	1,52	2,00	3,00	3,58	3,58
5	0,46	0,46	0,76	1,43	1,58	1,87	1,87