

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Studiendesign**

Es wurden vier experimentelle Gruppen in randomisierter Reihenfolge untersucht:

- 10 Stent-PTA mit unbeschichteten Ballons und Iopromid-370 ohne Zusatz als Kontrolle
- 10 Stent-PTA mit 480 µg Paclitaxel beschichtete Ballons mit der Methode EEE und Iopromid-370
- 10 Stent-PTA mit 330 µg Paclitaxel beschichtete Ballons mit der Methode Ac und Iopromid-370
- 14 Stent-PTA mit unbeschichtete Ballons mit 6,4 mg Paclitaxel in 50 ml Iopromid-370

Nach fünf Wochen wurden die Tiere reangiographiert. Die quantitative Auswertung erfolgte anhand der Reangiographien. Dabei wurden die Ergebnisse der drei Behandlungsgruppen mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Primärer Endpunkt war der Grad der Restenose nach fünf Wochen.

Die eingesetzten Stents waren nicht beschichtet und dienten im Wesentlichen zur Markierung des behandelten Gefäßsegments für die Reangiographie.

#### **3.2. Material**

##### **3.2.1. Tiere**

Die vorliegende Studie wurde an Hausschweinen aus landwirtschaftlicher Züchtung (V.B Zucht und Mast GmbH, Kleindemsin) der Rasse Pig Linie 23 durchgeführt. Um eventuell vorhandene geschlechtsspezifische Wirkungen von Paclitaxel auf die Schweine auszuschließen, wurden ausschließlich männlich kastrierte Schweine ver-

wendet. Die Versuchstiere hatten ein initiales Gewicht von 27 kg bis 35 kg (Mittelwert  $30,9 \pm 2,4$  kg) und waren ca. 3 Monate alt.

Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet: 42502/2-522 IMTM

### **3.2.2. Beschichtung der Ballons**

Für die Studie wurden herkömmliche Ballonkatheter (Meo-Flex™, MeoMedical GmbH, Augsburg) verwendet. Diese wurden in zwei unterschiedlichen Verfahren mit Paclitaxel beschichtet. Es wurde bei der einen Gruppe der Ballons Aceton als Lösungsmittel verwendet, bei dem anderen Ethylacetat. Die Dosis von Paclitaxel betrug  $1,2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$  bei der Gruppe Ac und  $1,8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$  bei der Gruppe EEE auf den Ballonkathetern. Nach der Beschichtung der Ballons wurden unbeschichtete Standardstents aus rostfreiem Stahl auf den Ballons montiert und die gesamte Ballon-Stent-Einheit wie üblich sterilisiert.

## **3.3. Methoden**

### **3.3.1. Versuchsvorbereitung der Tiere**

Die Schweine erhielten beginnend drei Tage vor dem Ersteingriff täglich 100 mg ASS (ASS 100, Ratiopharm GmbH, Ulm) und 250 mg Ticlopidin (Tiklyd, Sanofi Winthrop, Frankreich), diese Medikation wurde bis zur Reangiographie fünf Wochen nach der Intervention beibehalten.

### **3.3.2. Präparation für den Eingriff**

Alle Tiere wurden im Rahmen der ersten interventionellen Prozedur identisch behandelt.

Die Schweine sind im Stall, durch eine intramuskuläre Injektion von 6 ml Ketamin (Ketanest®, Parke-Davis GmbH, Karlsruhe) und 4 ml Xylazin (Rompun®, Bayer AG,

Leverkusen) sediert worden. Diese Applikation erfolgte über eine Kanüle mit Infusionsschlauch (HLZ Logistik GmbH, Gallin) in die Nackenmuskulatur. Dadurch konnte eine Fixierung des Tieres zur intramuskulären Injektion vermieden werden.

#### **3.3.2.1. Lagerung**

Die sedierten Tiere sind in den Angiographieraum gebracht worden. Dort wurden sie gewogen und dann in Rückenlage auf dem Angiographietisch gelagert. Danach wurden sie durch Bänder an den Vorder- und Hinterfüßen fixiert. Es folgte die Platzierung einer Venenverweilkanüle (Medex Medical Ltd., Haslingden, Großbritannien) in die Ohrvene.

#### **3.3.2.2. Narkoseeinleitung**

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch eine intravenöse Injektion von 2 mg pro kg Körpergewicht Propofol (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.) Dann wurden sie orotracheal intubiert (Tubus, Rüscher, Deutschland) und volumenkontrolliert mit 30 Volumen-Prozent Sauerstoff beatmet.

#### **3.3.2.3. Maßnahmen während der Narkose**

Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgte mit 1 bis 2 Volumen-Prozent Isofluran (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) und 70 Volumen-Prozent Lachgas durch das Narkosegerät (Romulus 800 V, Dräger Medizintechnik GmbH, Deutschland). Zusätzlich erfolgte eine Analgesie mit 5 ml Tomanol (Essex Tierarzt, München) intramuskulär. Während der gesamten Narkose erfolgte kontinuierlich die Messung von Herzfrequenz, EKG, Blutdruck und Sauerstoff-Sättigung.

#### **3.3.3. Interventionsablauf**

Sämtliche Eingriffe während der perkutanen transluminalen Angioplastie mit Stentimplantation erfolgten unter aseptischen Bedingungen.

### 3.3.3.1. Gefäßzugang

Die Haut wurde mit Jodlösung (B. Braun, Melsungen) desinfiziert. Der arterielle Zugang erfolgte über die linke Arteria carotis. Dazu wurde eine Längsinzision paramedian links der ventralen Halsseite vorgenommen. Danach wurde stumpf weiter präpariert, um die Halsgefäße freizulegen und um die Arteria carotis zu identifizieren. Diese wurde mit zwei Seidenfäden (Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) angeschlungen. Es folgte eine distale Ligatur und Punktion der Arteria carotis unter Sicht in Seldinger-Technik mit Einbringen einer 6 French Gefäßschleuse (A.D. Krauth GmbH & Co., Hamburg). Das distale Ende wurde in Richtung des Aortenbogens vorgeschoben. Im Anschluss erfolgte eine Ligatur des proximalen Fadens um die Schleuse, zur Stillung der Blutung. Die Tiere wurden danach heparinisiert durch eine intravenöse Applikation von 5.000 internationalen Einheiten Heparin (Heparin-Natrium, Ratiopharm GmbH, Ulm). Zusätzlich wurden 250 mg Aspirin (Aspisol®, Bayer AG, Leverkusen) intravenös gegeben.

### 3.3.3.2. Angiographie

Der zentrale Dilatator der Gefäßschleuse wurde entfernt und ein 6 French JR Führungskatheter mit Führungsdraht (Galeo® Floppy, Fa. Biotronik, Berlin) unter Röntgenkontrolle (Poly DIAGNOST C, Philips, Niederlande) in die Aorta vorgeschoben. Als erstes erfolgte eine Koronarangiographie und Implantation von Stents in die Koronararterien, welche im Rahmen einer zusätzlichen Studie untersucht wurden.

Die Darstellung der Becken-Bein-Strombahn geschah nach Positionierung eines Führungskatheters in der Aorta descendens mit 5 – 8 ml Iopromid-370 (Ultravist®, Schering AG, Berlin). Danach wurden die Arteria iliaca bzw. Arteria poplitea selektiv sondiert und dargestellt. Dabei wurde ein Gefäßareal identifiziert, welches sich optimal darstellen ließ. Es sollte keine Überlappung von Seitenästen oder anderen Gefäßen zu sehen sein. In dieses Areal sollten dann die Stents implantiert werden.

### 3.3.3.3. Stentimplantation und Randomisierung der Tiere

Nach Passage des Zielgefäßes mit dem Führungsdraht wurde der Angiographiekatheter entfernt und der Ballonkatheter mit einem 4 mm durchmessenden und 20 mm langen unbeschichteten prämontiertem Stent (Meo-Flex<sup>TM</sup>, MeoMedical GmbH, Augsburg) über den Führungsdraht platziert und in den ausgewählten Abschnitt der Arteria iliaca interna bzw. der Arteria poplitea vorgeschoben.

Die Stents wurden mit einem mittleren Ballondruck von 10 atm und einer Überdehnung des Gefäßlumens von ca. 20% eingesetzt. Dabei erfolgte die Inflation durch eine Insufflationspumpe (Medex Medical Ltd., Haslingden, Großbritannien) mit einem Iopromid-370-Kochsalz-Gemisch (1:1). Die Überdehnung des Gefäßes und die Implantation des Stents erfolgten mit demselben Ballon in einem Arbeitsgang mit einer singulären Balloninflation (beschichteter Ballon in den entsprechenden Behandlungsgruppen). Die Intimahyperplasie wurde durch die Überdehnung des Gefäßes induziert, hierbei handelt es sich um ein etabliertes Stenosemodell.<sup>78</sup> Die eingesetzten Stents waren nicht beschichtet und dienten im Wesentlichen zur Markierung des behandelten Gefäßsegments für die Reangiographie.

Insgesamt sind bei der Stent-PTA der Arteria poplitea vier unbeschichtete Ballons, fünf beschichtete Ballons mit der Methode EEE und vier mit der Methode Ac verwendet worden. Bei der Stent-PTA der Arteria iliaca kamen sechs unbeschichtete Ballons, fünf mit der Beschichtung EEE und sechs mit Ac zum Einsatz. Bei diesen drei Gruppen wurden 20 ml Iopromid-370 verwendet. Die letzte Behandlungsgruppe waren 14 unbeschichtete Ballons, davon wurden sechs in der Arteria poplitea und acht in der Arteria iliaca benutzt. Hier wurde zusätzlich 6,4 mg Paclitaxel (Interpharma Praha, Prag, Tschechische Republik) in 50 ml Iopromid-370 und 0,5 ml Ethanol gelöst. Ethanol wurde eingesetzt, um Paclitaxel im Kontrastmittel zu lösen. Dabei wurden 20 ml des Kontrastmittel-Paclitaxel-Gemisches während der Intervention verwendet. Die verbleibenden 30 ml wurden nach der Kontrollangiographie durch den Führungskatheter, der sich proximal des Stents befand, langsam über eine Mi-

nute lang in die Arterie injiziert. Die Kontrollgruppe bildeten die zehn unbeschichteten Ballons.

#### **3.3.3.4. Aufzeichnung der Angiographie**

Nach der Implantation der Stents erfolgte eine erneute Kontrollangiographie. Dabei wurde die initial gewählte optimale Projektion verwendet (siehe Punkt 3.3.3.2.). Es wurde zusätzlich darauf geachtet, dass ausreichend Gefäßareal proximal und distal des Stents zu sehen war. Die gesamte Angiographie vor, während und nach der Intervention wurde auf einem Videoband und digital (Quicktime-Format, Apple Computer, Inc, USA) aufgezeichnet.

#### **3.3.3.5. Beendigung der Intervention**

Nach der Stentimplantation wurde zur Infektionsprophylaxe Streptomycin und Penicillin (Ursocyclin 10%, Serumwerk Bernburg) gegeben. Dann wurde der Ballonkatheter zurückgezogen und in die Transportschnecke zurückgeschoben. Die Ballone wurden auf eine Länge von ca. 3 cm abgetrennt und in 1,5 ml Ethanol überführt. Später wurde dann der Paclitaxelgehalt mittels high-performance liquid chromatography (HPLC) bestimmt. Die Gefäßschleuse wurde entfernt. Die Punktionsstelle der Arteria carotis wurde durch eine Ligatur mit 2/0 Faden (Vicryl®, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verschlossen. Der Wundverschluss erfolgte in zwei Schichten. Die Subkutannaht wurde mit einem resorbieren 3/0 Faden (Vicryl®, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) in fortlaufender Naht verschlossen. Die Haut wurde mit nichtresorbierbarem 3/0 Faden (Prolene®, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) in Einzelknopfnahnt vernäht.

#### **3.3.3.6. Narkosebeendigung**

Für die Ausleitung der Narkose wurden Isofluran und Lachgas abgedreht und die Tiere mit 100 Volumen-Prozent Sauerstoff beatmet. Wenn eine stabile Spontanat-

mung vorhanden war, wurden die Tiere extubiert. Sobald sie sich selbstständig aus der Seitenlage wegbewegen konnten, wurden sie wieder in den Stall gebracht.

#### **3.3.4. Behandlung der Tiere während der fünf Wochen**

Alle Tiere wurden in den nächsten fünf Wochen identisch behandelt. Die Haltung der Schweine erfolgte einzeln in Stallboxen bei einer Raumtemperatur zwischen 10,7°C – 14,8°C und einer relativen Luftfeuchte von 60,0 % - 88,9%. Sie hatten einen 12-Stunden-Zyklus, der morgens 8.00 Uhr mit Einschalten des Lichtes begann.

Ihre Ernährung bestand aus 2 x tgl. 600 g Ferkelaufzuchtsfutter (pelletiertes Alleinfuttermittel, deuka Deutsche Krafffutterwerke GmbH & Co. Düsseldorf, Werk Könnern) und unbeschränkter Wasserzufuhr aus einer Trinkanlage. Zusätzlich bekamen sie jeden Tag 100 mg ASS und 250 mg Ticlopidin.

#### **3.3.5. Zweiteingriff**

Nach fünf Wochen wurden, wie unter den Punkten 3.3.2. bis 3.3.3.2. beschrieben, das Anästhesieverfahren und die Angiographie erneut durchgeführt. Der arterielle Gefäßzugang erfolgte diesmal über die rechte Arteria carotis. Es folgte eine angiographische Darstellung des therapierten Gefäßareals, die wieder auf ein Videoband und digital (Quicktime-Format, Apple Computer, Inc, USA) aufgezeichnet wurde.

Die Tiere wurden danach durch eine Injektion von 3 mol/l Kaliumchlorid in vertiefter Narkose getötet. Der Tod trat durch Kammerflimmern mit folgender Asystolie ein.

#### **3.3.6. Auswertung der Studie**

##### **3.3.6.1. Zielparameter**

Zielparameter der Auswertung der Experimente war das Ausmaß der Neointimabilisation in den gestenteten peripheren Gefäßen. Dieses wurde mittels einer quantitativen Angiographie bestimmt.

Dabei wurden folgende Kriterien beurteilt:

- MLD – Minimaler Gefäßdurchmesser, gemessen nach der Stentimplantation und nach fünf Wochen
- Stenosegrad
- Gefäßlumenverlust (lumen late loss) – Differenz zwischen dem Stentdurchmesser nach der Implantation und dem minimalen Gefäßdurchmesser im Stent nach fünf Wochen

#### **3.3.6.2. Quantitative Angiographie**

Vor, während und nach der Intervention (Ersteingriff) sowie bei der Kontrollangiographie (Zweiteingriff) wurde die initial gewählte optimale Projektion zur Auswertung verwendet.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch zwei Beobachter mit dem CAAS-II System (Pie Medical, Maastricht, Niederlande) ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Die Kalibrierung erfolgte anhand des nicht mit Kontrastmittel gefüllten Führungskatheters.

#### **3.3.7. Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mit dem Standardsoftware-Paket SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Von den jeweils zehn Stents der Kontroll- und Behandlungsgruppen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Zielparameter (siehe Punkt 3.3.6.1.) berechnet.

Darüber hinaus wurden sämtliche Größen mittels unabhängigen T-Tests nach vorheriger Varianzanalyse verglichen.

Als statistisch signifikant wurde ein Ergebnis von  $p < 0,05$  angesehen.