

Aus der Medizinischen Klinik II, Kardiologie und Pulmologie  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

eingereicht über das

Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin

Einfluss lokaler Peroxisome proliferator-activated receptor  
gamma (PPAR $\gamma$ ) – Aktivierung der Restenose/In-Stent-  
Restenose nach experimenteller Koronarintervention im  
porcinen Stent-Modell

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Jens Klinowski  
Tierarzt  
aus Potsdam

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3444

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Klaus Pels  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Corinna Eule

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

animal model, arteries, atherosclerosis, cell growth, coronary vessels,  
diabetes mellitus, endothelium, immunohistochemistry, morphometrics,  
pathogenesis, peroxisomes, pigs, stenosis, vascular diseases

Tag der Promotion: 03.02.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-914-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild © Eric Isselée - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>10</b>
2.1	Das Schwein als Versuchstier in der kardiovaskulären Forschung	10
2.2	Vergleichende Anatomie des Herzens	10
2.2.1	Blutversorgung des Herzens	10
2.2.2	Versorgungstypen des Herzens	12
2.2.3	Anastomosen und Kollateralen	12
2.2.4	Histologie der Koronararterien	13
2.3	Die Atherosklerose des Menschen	14
2.3.1	Die Pathophysiologie der Atherosklerose	14
2.4	Die Koronare Herzkrankheit (KHK)	16
2.5	Risikofaktoren der Atherosklerose	16
2.5.1	Risikofaktor Typ-2-Diabetes	16
2.6	Perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA)	17
2.7	Der Stent in der Kardiologie	18
2.7.1	Einteilung der koronaren Stents	19
2.7.2	Drug Eluting Stent (DES)	20
2.8	Die Koronare Restenose	20
2.9	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )	22
2.10	Thiazolidindione (TZD)	24
2.10.1	Rosiglitazon	24
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
4.1	Material	28
4.1.1	Medikamente	28
4.1.2	Material für Vorbereitung, Narkoseeinleitung und Intervention	28
4.1.3	Material für Weiterverarbeitung und digitale Bildanalyse	29
4.1.4	Futter und Einstreu	30

4.2	Methoden	31
4.2.1	Tierexperiment	31
4.2.1.1	Versuchstiere, Haltungsbedingungen	31
4.2.1.2	Intervention - Vorbereitung und Narkoseeinleitung	31
4.2.1.3	Koronare Intervention	32
4.2.2	Beschreibung des Drug-Eluting-Stentsystems	35
4.2.2.1	Der Koronar-Stent	35
4.2.2.2	Das Trägersystem	36
4.2.3	Behandlungsprotokoll	37
4.2.4	Euthanasie, Präparation und Perfusionsfixation	38
4.2.5	Einbettung und Schneiden	39
4.2.6	Färbung der Schnitte	41
4.2.6.1	Färbung für die Histomorphometrie - Elastica van Gieson (EvG)	41
4.2.6.2	Hämatoxylin und Eosin - Färbung	42
4.2.6.3	Immunhistologische Färbungen	42
4.2.6.3.1	5-Bromo-2'-Deoxyuridine für proliferierende Zellen	42
4.2.6.3.2	Ki-67 für proliferierende Zellen	43
4.2.6.3.3	Endothelfärbung	44
4.2.7	Digitale Bildanalyse	46
4.2.7.1	Histomorphometrie	46
4.2.7.2	Gefäßwandverletzung (Injury Score)	48
4.2.7.3	Neointimadicke (NI-Dicke) über den Stentstruts / Lineare Regression	49
4.2.7.4	Messungen an HE gefärbten / immunhistologisch gefärbten Schnitten	49
4.2.7.4.1	Gesamtzellzahlbestimmung	49
4.2.7.4.2	Proliferierende Zellen	50
4.2.7.4.2.1	Messungen an 5-Bromo-2'-Deoxyuridine gefärbten Zellen	50
4.2.7.4.2.2	Messungen an Ki-67 gefärbten Zellen	51
4.2.7.4.3	Messungen an gefärbten Endothelzellen (CD31-Antikörper)	51

4.2.8	Statistik	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
5.1	Histomorphometrie	54
5.1.1	Neointimafläche (NI-Fläche)	54
5.1.2	Neointimadicke (NI-Dicke) über den Stentstruts	55
5.1.3	Gefäßwandverletzung (Injury Score), mittlerer Verletzungsindex	56
5.1.4	Lineare Regression	56
5.1.5	Stenoserate	57
5.1.6	Lumenverlust (Lumen Loss)	58
5.1.7	Media-Fläche	59
5.1.8	Adventitiafläche	60
5.1.9	Gesamtarterienfläche (Gesamt-Fläche)	60
5.1.10	Residuallumenfläche (RL-Fläche)	61
5.1.11	LEI-Fläche	62
5.1.12	LEE-Fläche	62
5.2	Immunhistologie	63
5.2.1	Proliferationsindex 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (%)	63
5.2.2	Proliferationsindex Ki-67 (%)	64
5.2.3	Endothelialisierung (%)	66
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>12</b>	<b>Publikationen</b>	<b>100</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>14</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>103</b>

*„They looked from pig to man, and from man to pig, and from pig to man again; but already it was impossible to say which was which.”*

G. Orwell. Animal Farm. 1946





## 1 Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist unverändert die Hauptursache der Sterblichkeit der Menschen in den Industrieländern. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 2008 363.785 Menschen an Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems. Das sind etwa 45% der Gesamtsterbefälle. 129.458 Todesfälle entfielen allein auf ischämische Herzkrankheiten (Statistisches Bundesamt 2009). Die hohe Mortalität aufgrund der KHK zeigt den Bedarf für bessere Therapiemöglichkeiten auf.

In der Behandlung der KHK nimmt die interventionelle Koronartherapie (perkutane koronare Intervention; PCI) einen immer höheren Stellenwert ein (Kautz-Freimuth 1997). 2001 wurden in Deutschland 195.280 perkutane transluminale Koronarangioplastien (PTCA) durchgeführt. Bei 75,23% aller Koronarinterventionen wurde eine adjuvante Stent-Implantation vorgenommen. Demgegenüber fällt die alleinige Ballon-PTCA kaum noch ins Gewicht (Mannebach, Hamm et al. 2002).

Die Implantation von Bare Metal Stents (BMS) seit Beginn der 1990er Jahre war lange als Alternativmethode umstritten. Gründe hierfür waren zahlreiche Akutkomplikationen, Stentverluste, die subakute Thromboserate, die Notwendigkeit einer Langzeit-Antikoagulation und die In-Stent-Restenose (ISR), die als limitierender Faktor dieser Methode verbleibt. Versuche zur Restenoseprophylaxe mittels begleitender medikamentöser Therapiekonzepte blieben unbefriedigend (Hofling, Gonschior et al. 1997).

Mit der Einführung medikamentenfreisetzender Drug Eluting Stents (DES) 2001 konnte nachgewiesen werden, dass die Ergebnisse der DES im Vergleich zu BMS günstiger sind (Moses, Leon et al. 2003). Seit dem gewinnen die DES auf dem Gebiet der interventionellen Kardiologie an Bedeutung.

Dennoch kann die Restenoseproblematik keinesfalls als gelöst betrachtet werden. Wenngleich die Anwendung verbesserter DES und wirksamere Medikamente die ISR deutlich reduziert haben, erscheint ein differenzierterer Einsatz von DES in der Koronartherapie notwendig zu sein. So stellen die Typ-2-Diabetiker ein definiertes Kollektiv mit einem signifikant höheren Risiko für koronare Restenosen nach koronarer Intervention als die Gesamtbevölkerung dar. Langfristig könnten Typ-2-Diabetiker von den Vorteilen neuer medikamentenbeschichteter Stents profitieren (Jacob und Marx 2006).

Seit dem Jahr 2000 stehen in Deutschland mit den Thiazolidindionen orale Antidiabetika als wirksame Mittel zur Therapie der Insulinresistenz zur Verfügung (Miyazaki, Glass et al. 2001). Thiazolidindione aktivieren den Transkriptionsfaktor „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma“ (PPAR $\gamma$ ) und regulieren somit verschiedene Zielgene, die in Blutzuckerkontrolle, Lipidmetabolismus, Inflammation, Apoptose und Zellproliferation involviert sind (Wang und Tafuri 2003).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Schwein als Versuchstier in der kardiovaskulären Forschung

Das Interesse am Schwein als Tiermodell zur Erforschung menschlicher Krankheiten ist in den anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten von Mensch und Schwein begründet. Auf Grund der morphologischen Gemeinsamkeiten ist das Schweineherz ein gut geeignetes Modell für das Erforschen neuer Therapieoptionen im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen des Menschen (Payton 1932; Douglas 1972). Das Schwein besitzt die für minimalinvasive Techniken erforderliche Körpergröße. Außerdem ähnelt die Herzkranzgefäßverteilung der des Menschen (Lee 1986; Allwork 1987). So sind die Durchmesser der linken und der rechten Koronararterie des Schweines ähnlich denen des Menschen (2,0-4,0 mm) (Lowe, Schwartz et al. 2003). Ähnlichkeiten zeigen sich auch in der Herzphysiologie. Die Herzfrequenz des Menschen in Ruhe beträgt etwa 70 Schläge/min (Klinke und Silbernagl 2001). Die Ruheherzfrequenz des Schweins liegt bei etwa 80 Schlägen/min (Engelhardt und Breves 2000). Schweine sind wie Menschen Omnivoren, können spontane atherosklerotische Veränderungen mit zunehmendem Alter entwickeln (Skold, Getty et al. 1966) und besitzen einen ähnlichen Stoffwechsel wie der Mensch (Reitman, Mahley et al. 1982). In vergleichenden Studien konnte festgestellt werden, dass das Schwein nach Dilatation einer Koronararterie mit anschließender Stentimplantation ein geeignetes Tiermodell zur Erforschung der Restenoseentwicklung in Koronarien beim Menschen darstellt (Carter, Laird et al. 1994; Scott, Cipolla et al. 1996).

### 2.2 Vergleichende Anatomie des Herzens

#### 2.2.1 Blutversorgung des Herzens

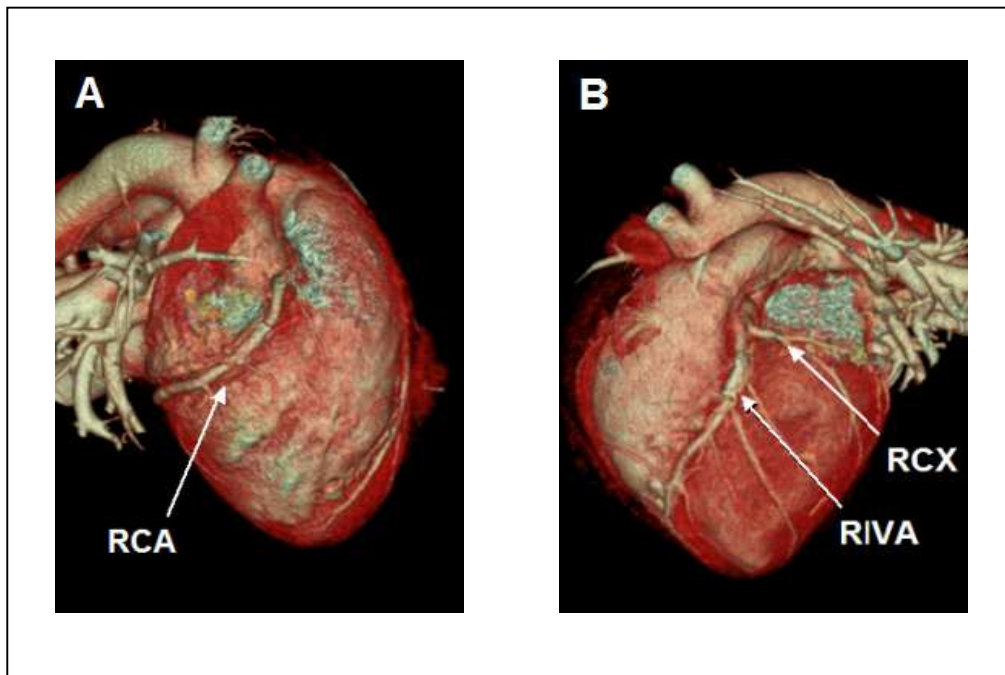
Sowohl die Gefäßwände, als auch der Herzmuskel selbst besitzen ein eigenes Gefäßsystem (*Vasa vasorum*). Die Herzkranzgefäße sind jene Gefäße, die den Herzmuskel mit arteriellem Blut versorgen. Der Ausstoß der linken Herzkammer an sauerstoffreichem Blut für die Eigenversorgung des Myokards erfolgt beim Menschen in Ruhe mit etwa 5% des Herzminutenvolumens (HMV) (Schooser, Ricker et al. 2004). Beim Schweineherz beträgt das in der Systole von dem Organ ausgeworfene Blut für den Koronarkreislauf in Ruhe 5-10% des HMV (Scheunert und Trautmann 1987). Die Koronararterien entspringen sowohl beim Schwein als auch beim Menschen aus zwei der drei *Sinus* der Aorta. Die *Arteriae (Aa.) coronariae* versorgen als *A. coronaria sinistra* (LCA = left coronary artery) und *A. coronaria dextra* (RCA = right coronary artery) das Gesamtorgan (Benninghoff und Drenckhahn 2004). Beim Schwein gabelt sich die nicht so stark ausgebildete LCA nach kurzem Verlauf in den *Ramus (R.) interventricularis paraconalis*, der die linke Herzwand, einen großen Teil des

Septums und einen Teil der rechten Herzkammer versorgt, sowie in den *R. circumflexus* (RCX) (Seedat und Mayet 1993). Der RCX ist ein Seitenast, der in der Herzkranzfurche (*Sulcus coronarius*) verlaufend um die Basis des linken Ventrikels zieht und so auf die Hinterfläche des Herzens gelangt. Vom RCX gehen Äste zum linken Vorhof, zum Seitenrand und zur Hinterfläche der linken Kammer ab (Sievert, Rauber et al. 1987).

Die linke Herzkranzarterie des Menschen teilt sich in der Regel in zwei große Äste auf, in den *R. interventricularis anterior* (RIVA) und den *R. circumflexus* (RCX). Dabei versorgt der im *Sulcus interventricularis anterior* verlaufende RIVA mit seinen Diagonalästen die anterolaterale Vorderwand des linken Ventrikels sowie die ventralen und apikalen Septumanteile. Der RCX verläuft in der linken AV-Grube und versorgt die freie Wand des linken Ventrikels nach lateral (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Der RCA entspringt beim Schwein aus dem rechten Sinus des *Bulbus aortae* und zieht als *R. circumflexus dexter* in den rechten Teil des *Sulcus coronarius*. Dieser erreicht die rechte Längsfurche des Herzens (*Sulcus interventricularis subsinuosus*) und zieht als *R. interventricularis subsinuosus* zur Herzspitze (Nickel, Schummer et al. 1984).

Die rechte Herzkranzarterie des Menschen entspringt ebenfalls der Aorta und verläuft im rechten *Sulcus coronarius* auf die Rückseite des Herzens und erstreckt sich bis in das apikale Drittel des *Sulcus interventricularis posterior* (Benninghoff und Drenckhahn 2004). Dort angelangt zieht der eigentliche Endast als *R. descendens posterior* abwärts zur *Incisura cordis*, während ein gleichstarker Seitenast in der Herzkranzfurche verbleibt.



**Abb. 1:** Das Schweineherz in computergestützter Bildanalyse (64-Zeilen-CT-Technik). Ansicht der rechten Herzseite mit RCA (A) und Ansicht der linken Herzseite mit RCX und RIVA (B).

### **2.2.2 Versorgungstypen des Herzens**

Beim Schwein beteiligen sich beide Herzkranzarterien etwa zu gleichen Teilen an der Versorgung des Herzens. Aus diesem Grund spricht man beim Schwein vom „beidseitig-koronaren Herzversorgungstyp“ (König und Liebich 2002). Zur Versorgung der Ventrikel teilen sich die beiden Herzkranzarterien so, dass die linke Koronararterie den größeren Teil des linken Ventrikels übernimmt, die rechte den größeren Teil des rechten Ventrikels. Jedoch greift ventral die linke Herzkranzarterie ein Stück weit auf den rechten Ventrikel über. Das Kapillargeflecht der einzelnen Ventrikeläste im Versorgungsgebiet des Herzens nimmt keine Verbindung miteinander auf. Die Arterien des Herzens beim Schwein sind somit funktionelle Endarterien (Nickel, Schummer et al. 1984; Weaver, Pantely et al. 1986).

Beim Menschen dominiert mit etwa 75% der balancierte, ausgeglichene Versorgungstyp. Hierbei sind die proximale rechte und proximale linke Koronararterie ähnlich stark ausgebildet. Der mit ca. 12% anzutreffende rechtsdominante Versorgungstyp zeigt einen proximal stärker ausgebildeten RCA gegenüber der LCA. Beim linksdominanten Versorgungstyp (ca. 12%) ist die proximale LCA kaliberstärker als der proximale RCA (Stierle und Niederstadt 2003).

### **2.2.3 Anastomosen und Kollateralen**

Inwiefern ein Herzinfarktmodell für die Humanmedizin geeignet ist, zeigt sich unter anderem an der Ähnlichkeit der Ausbildung von Kollateralgefäßen und Anastomosen der Koronararterien. Definitionsgemäß versteht man unter Kollateralen eine Verbindung kleinerer Blutgefäße, die neben der Hauptbahn dasselbe Versorgungsgebiet erreichen (Wiesner und Ribbeck 2000), wohingegen eine arterioarterielle Anastomose als Verbindung zwischen zwei Ästen unterschiedlicher Arterien zu verstehen ist (Wiesner und Ribbeck 2000). Durch eine Regulation der Blutverteilung mit Hilfe dieser beiden Arterienverbindungen kann nicht nur die Entstehung einer Nekrose distal einer Koronararterienstenose verhindert werden, sondern auch das Überleben zumindest eines Teils der Muskulatur in einem Infarktgebiet gesichert werden (Strauer 1991). Nach König und Liebich fehlen dem Schweineherzen Anastomosen vollständig (König und Liebich 2002). Kollateralen sind beim Schweineherzen hingegen zu 5% zu finden (Nickel, Schummer et al. 1984). Kollateralen beim Schweineherzen bilden sich generell nur bei ischämischen Zuständen als dünnwandige intramyokardiale Kapillaren aus. Doch selbst bei weitlumigen Kollateralen bleibt die Myokardversorgung eingeschränkt (Schaper 1995; Meyer, Bokisch et al. 2000).

Beim Menschen bestehen zwischen linker und rechter Koronararterie zahlreiche Anastomosen, die so fein sind (20-300 µm), dass die Herzkranzarterien funktionell als Endarterien angesehen werden müssen (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

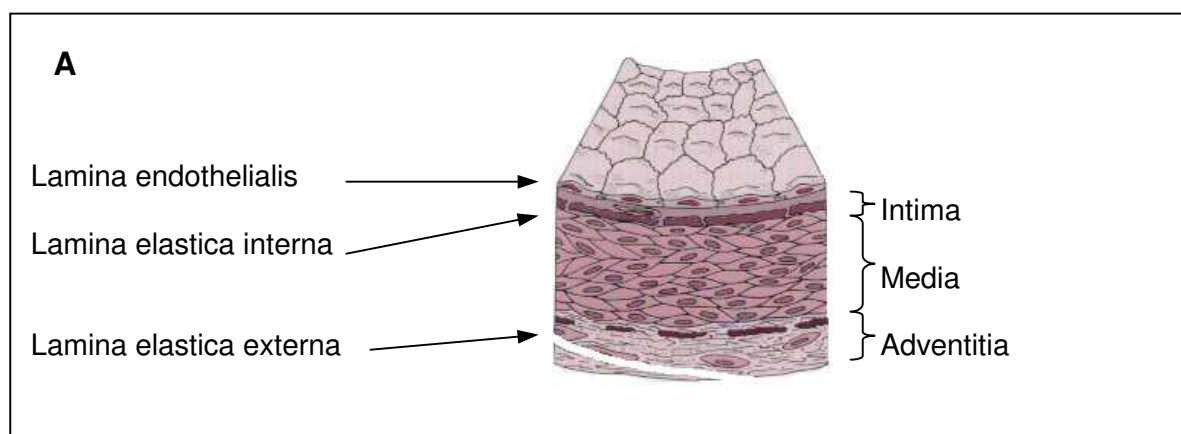
## 2.2.4 Histologie der Koronararterien

Die Herzkranzarterien des Schweins und des Menschen gehören, obwohl sie direkt aus der Aorta entspringen, dem muskulösen Bautyp an (Nickel, Schummer et al. 1984; Bucher und Wartenberg 1989). Die Koronararterien weisen einen dreischichtigen Wandbau auf. Von innen nach außen unterscheidet man die *Tunica interna (Intima)*, die *Tunica media (Media)* und die *Tunica externa (Adventitia)* (Bucher und Wartenberg 1989; Liebich 2003).

Die *Intima* bildet die innere Wandauskleidung der Gefäße. Diese Schicht lässt sich in eine einschichtige *Lamina endothelialis (Endothel)*, ein bindegewebiges *Stratum subendotheliale* und eine *Lamina elastica interna* unterteilen (Ross und Glomset 1976). Die *Lamina endothelialis* ist durch Fortsätze mit unterlagerten, glatten Muskelzellen verbunden, von denen auch eine Reendothelisierung der Gefäßwand ausgehen kann. Die *Lamina elastica interna* ist im Schnittbild als mäanderartig verlaufendes Band deutlich ausgebildet.

Die *Media* besteht aus mehreren Schichten, vorwiegend zirkulär und leicht spiralförmig verlaufenden glatten Gefäßmuskelzellen, in die in variierender Zahl und Dichte elastische Fasern und Kollagen vom Typ I und III, sowie Proteoglykane und Fibronectin eingelagert sind (Ross und Glomset 1976). Der *Media* liegt in sämtlichen größeren Gefäßen außen eine *Lamina elastica externa* an (Liebich 2003).

Die *Adventitia* schließt in großer Zahl und Dichte vorzugsweise längsverlaufende elastische Fasern ein. Zusammen mit einem dichten Kollagenfasernetz bildet sie die strukturelle Grundlage der *Lamina elastica externa*. Die *Adventitia* steht als lockere Verschiebeschicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung. Die in ihr verlaufenden vegetativen Nervenfasern und kleinere Gefäße dienen der Versorgung der Gefäßwand (Bucher und Wartenberg 1989; Liebich 2003).



**Abb. 2:** A: Schematische Darstellung des Wandaufbaus einer gesunden Arterie (Ross 1993).

## 2.3 Die Atherosklerose des Menschen

Die Atherosklerose ist eine chronisch-progrediente, in erster Linie fokale, aber auch diffuse Veränderung der Arterienwand, die von der Gefäßintima ausgeht. Kennzeichnend für die fortgeschrittene Atherosklerose ist ein Elastizitätsverlust des Gefäßes, eine Einengung des Gefäßvolumens und Veränderungen des Gefäßendothels. Die „response-to-injury“ Hypothese geht davon aus, dass die Gefäßwandläsion die spezielle Form einer protektiven, entzündlich-fibroproliferativen Antwort auf verschiedene Arten der Arterienwandschädigung ist. In Abhängigkeit von der Art und Dauer der Schädigung wird aus dem protektiven Mechanismus ein Krankheitsprozess (Ross 1993). Die Bestandteile des Begriffs „Atherosklerose“ stammen aus dem Griechischen (athära = Grütze, skleros = hart). Der Begriff wurde erstmalig 1904 von Marchand (Leipzig) benutzt. „Arteriosklerose“ ist ein gebräuchlicher, aber wenig spezifischer Begriff für eine Verhärtung von Arterienwänden. Er wird nicht nur in Laienkreisen häufig als Synonym für „Atherosklerose“ benutzt, umfasst jedoch auch Arterienverhärtungen anderer Genese, wie z.B. die kalzifizierende Mediasklerose, proliferative und hyaline Verhärtungen der Wände kleiner Arterien und Arteriolen (Kreuzer und Tiefenbacher 2003).

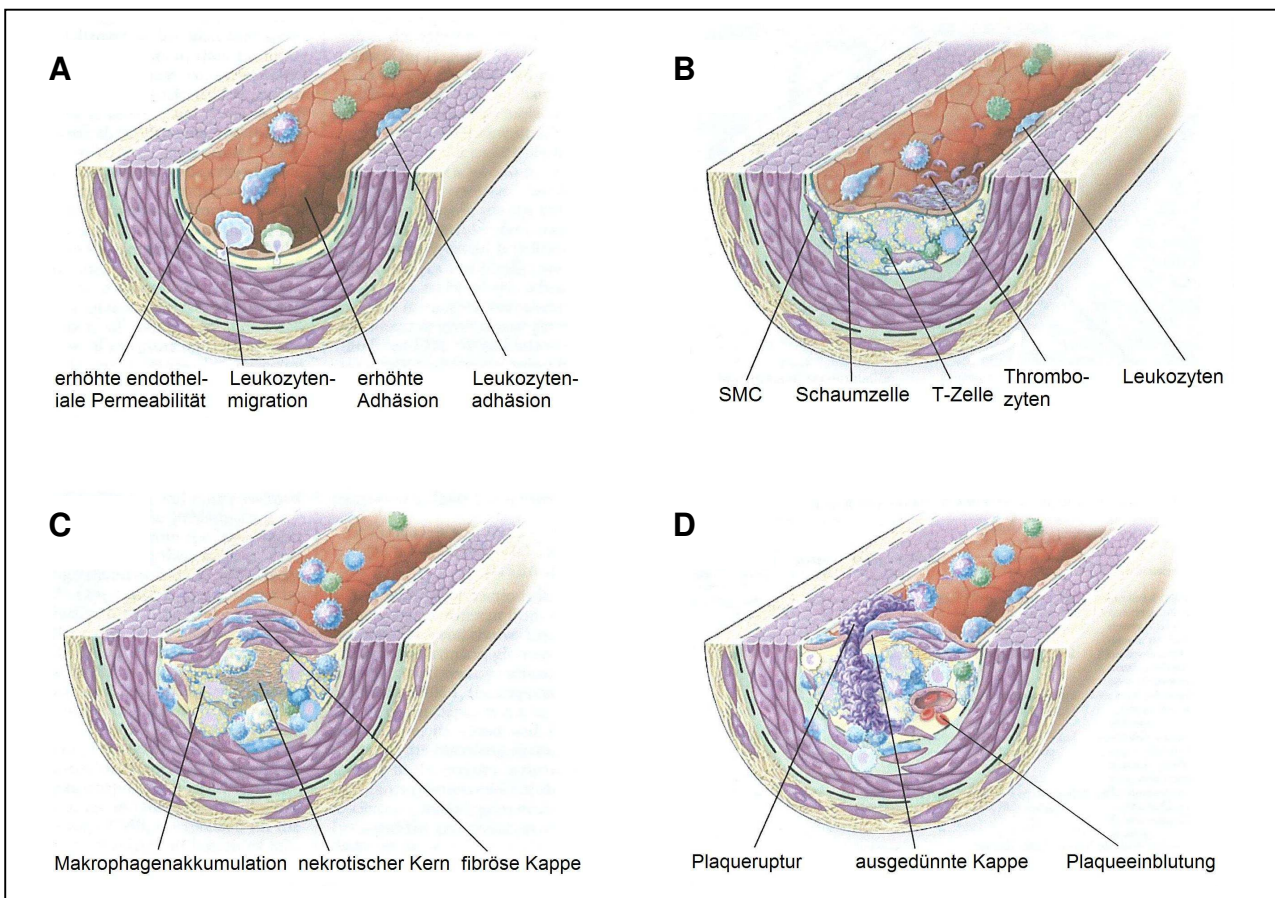
### 2.3.1 Die Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Atherogenese beginnt häufig schon im Kindes- und Jugendalter (Berenson, Srinivasan et al. 1998; Gaziano 1998). Hämodynamische Belastungen führen zur adaptiven Intimaverdickung, einer Prädilektionsstelle für spätere Entwicklungen atherosklerotischer Läsionen. Ross und Harker sehen in der mechanischen Verletzung der *Intima* die Initiierung des atherosklerotischen Geschehens (Ross und Harker 1976). Cowan und Langille unterstreichen den Einfluss der mechanischen Kräfte, wonach atherosklerotische Veränderungen überwiegend an Stellen mit erschwertem Blutfluss wie Bifurkationen und Krümmungen entstehen (Cowan und Langille 1996). Die durch erhöhte mechanische Beanspruchung entstehende Endotheldysfunktion führt zur vermehrten Bildung von Chemokinen und endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. dem platelet-endothelial-cell adhesion molecule (Muller, Weigl et al. 1993), L-Selectin und Integrin (Eppihimer, Russell et al. 1998). Unter diesem Einfluss kommt es zur Einwanderung von Leukozyten und Monozyten in den subendothelialen Raum (Rajavashisth, Andalibi et al. 1990) (Abb. 3-A). Zusätzlich bedingt die Endotheldysfunktion eine erhöhte Permeabilität für atherogene Plasmalipide (Low Density Lipoprotein; LDL). Diese LDL werden von Matrixkomponenten der *Intima* gebunden und von eingewanderten Makrophagen aufgenommen, welche sich bei erhöhtem LDL Angebot zu Schaumzellen umbilden. Der Untergang dieser Schaumzellen führt zur extrazellulären Ablagerung von Lipiden, die zusammenfließen und den Lipidkern („fatty streak“) des atherosklerotischen Plaques bilden. Die Akkumulation von extrazellulären Matrixkomponenten (Kollagen, elastische Fasern, Proteoglykane), T-Lymphozyten, die

Migration von Gefäßmuskelzellen (VSMC = vascular smooth muscle cells) aus der *Tunica Media* in die *Tunica Intima*, ihr Funktionswandel und ihre Proliferation, sowie die Umwandlung der *Tunica Intima* in einen rigiden, calciumreichen Plaque sind weitere wichtige Elemente der Atherogenese (Ross und Glomset 1976; Ross 1993) (Abb. 3-B).

Die fortschreitende Anhäufung von Lipiden, Endothelzellschädigungen und Fissuren der *Tunica Intima* können hier bereits zur Ablagerung von thrombotischem Material und zur Stenosierung des Gefäßlumens führen. Der hauptsächlich aus Leukozyten, Lipiden und Zelldebris bestehenden Plaque tendiert, durch fortwährendes Anhaften von Leukozyten und Monozyten zur weiteren Ausdehnung an der Endothelwand (Eppihimer, Russell et al. 1998). Am Ende dieser Entwicklung steht das Fibroatherom („fibrous plaque“) als komplexe atherosklerotische Läsion (Wagner 1991; Antman und Braunwald 2001) (Abb. 3-C).

Die von den VSMC gebildete fibröse Plaquekappe kann sich unter dem Einfluss von durch Makrophagen gebildeten Matrixmetalloproteinasen (MMP) und anderer proteolytischer Enzyme verdünnen (Galis, Sukhova et al. 1994). Die meisten Myokardinfarkte sind die Folge einer Ruptur der den Plaque bedeckenden fibrösen Schicht (Davis und Thomas 1984; Fuster 1994; Lee und Libby 1997) (Abb. 3-D).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Atherogenese (Ross 1995).

## **2.4 Die Koronare Herzkrankheit (KHK)**

Die Koronare Herzkrankheit ist die häufigste Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen. Die KHK tritt als eine unterschiedlich schnell, chronisch-progredient verlaufende Erkrankung der Herzkranzgefäße auf. Eine Koronare Herzkrankheit entwickelt sich oft unbemerkt über Jahre und Jahrzehnte (Buja und Willerson 1991). Bedingt durch flusslimitierende Koronarstenosen kommt es zu einer mangelnden Sauerstoffversorgung des Myokards. Nach dem klinischen Bild werden eine stabile *Angina pectoris*, eine stumme Myokardischämie, eine ischämisch bedingte Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und ein akuter Myokardinfarkt unterschieden (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 1998). Die klinisch bedeutsamste Folge der KHK ist der akute Myokardinfarkt, der innerhalb von Minuten zum Tode führen kann (Assmann und Schulte 1987).

## **2.5 Risikofaktoren der Atherosklerose**

Risikofaktoren sind definiert als Bedingungen, die in Bevölkerungsstudien bei der Untersuchung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen als krankheitsfördernde Umstände statistisch gesichert wurden (Pschyrembel 2002).

Zahlreiche empirische Studien zeigen, dass kardiovaskuläre Krankheiten multifaktoriell bedingt sind. Insgesamt sind mehr als 300 Risikofaktoren bekannt (Skrabaneck 1994). Zu den primären, modifizierbaren Risikofaktoren, deren Beeinflussung prognostisch relevant ist zählen Hypertonie, Hyperlipidämie und Zigarettenrauch (Allhoff und Laaser 1989; Lindsay, Hebert et al. 1997; Gray, Fabsitz et al. 1998). Nicht modifizierbare, primäre Risikofaktoren sind Alter (Männer > 45 Jahre; Frauen > 55 Jahre), männliches Geschlecht und familiäre Vorbelastung mit kardiovaskulären Krankheiten. Bedeutende sekundäre, modifizierbare Risikofaktoren sind Typ-2-Diabetes, ungenügende körperliche Bewegung, Disstress, anhaltende psychische Frustrationen und Hyperurikämie (NECP 1993).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren existieren nicht unabhängig voneinander, sondern verstärken sich synergistisch (Lindsay, Hebert et al. 1997). Zur Bestimmung eines individuellen kardiovaskulären Risikos ist es daher nicht ausreichend, einzelne Risikofaktoren zu analysieren. Es müssen vielmehr Methoden angewandt werden, die der Vielzahl der Risikofaktoren Rechnung tragen und die das Risiko als kontinuierliche Größe quantifizieren.

### **2.5.1 Risikofaktor Typ-2-Diabetes**

Der Typ-2-Diabetes ist weltweit eines der großen Gesundheitsprobleme. Im Jahr 2004 betrug die Zahl der Betroffenen in Deutschland etwa vier bis fünf Millionen (Erdmann, Erland et al. 2004). Circa 80% aller Todesfälle in dieser Patientengruppe beruhen auf kardiovaskulären Erkrankungen (Pyorala, Laakso et al. 1987; McGill und McMahan 1998; Wilson 1998; Wilson, D'Agostino et al. 1998). Der Typ-2-Diabetes stellt eine heterogene Erkrankung dar. Er ist durch Insulinresistenz und relativen Insulinmangel vor dem



Hintergrund genetischer und erworbener Defekte gekennzeichnet (Bonadonna und De Fronzo 1991; Gerich 1998; Facchini, Hua et al. 2001). Als problematisch gilt heutzutage weniger die drohende hyperglykämische Entgleisung des Organismus durch verminderte Insulinsensitivität in Leber, Fettgewebe und Muskulatur, sondern vielmehr Begleit- und Folgekrankheiten, wie vaskuläre Ereignisse, welche die Prognose des Patienten bestimmen (Jacob und Marx 2006). Insulinresistenz und relativer Insulinmangel sind ein wichtiges Bindeglied zwischen Typ-2-Diabetes und kardiovaskulärer Morbidität bzw. Mortalität (Bonora, Formentini et al. 2002). Basierend auf dieser Erkenntnis hat das Amerikanische National Institute of Health (NIH) im Jahr 2001 den Typ-2-Diabetes als KHK-Risiko-Äquivalent (= mehr als 20% Risiko in den nächsten 10 Jahren ein ernstes KHK-Ereignis zu bekommen) definiert (Haffner, Alexander et al. 1999). Nach Haffner et al. sind Typ-2-Diabetiker im Vergleich zu Nichtdiabetikern mit einem zwei bis vierfach erhöhten Risiko für eine koronare Herzerkrankung belastet (Haffner, Lehto et al. 1998). Mancher Autor sieht das Risiko gegenüber den Nicht-Diabetikern für kardiovaskuläre Gefäßerkrankungen sogar auf das Sechsfache erhöht (Eastman, Cowie et al. 1997).

## **2.6 Perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA)**

Die Dilatation von atherosklerotischen Stenosen wurde erstmalig von Dotter im Jahr 1964 beschrieben, der die Atherome mit Kathetern zunehmender Kaliber passierte und so die Engstelle erweiterte (Dotter und Judkins 1964). 1976 wurde von Gruntzig eine neue Technik eingeführt, bei der die Kraft auf das Atherom über einen Ballon an der Spitze eines feinen Katheters ausgeübt wird. Ein Jahr später setzte er diese Technik erstmalig am Koronargefäßsystem ein (Gruntzig 1978; Gruntzig, Senning et al. 1979).

Das Prinzip der Ballon-PTCA besteht in der Dilatation stenosierter Gefäßbereiche zur Wiederherstellung der Myokardperfusion durch einen Ballonkatheter. Im Gegensatz zu früheren Annahmen, dass die Gefäßdilatation allein durch Kompression des Plaquematerials zu erreichen ist (Gruntzig und Kumpe 1979) stehen Untersuchungen, die ein Aufbrechen oder Einreißen des Plaquematerials in Richtung Gefäßwand mit einer lokalen plastischen Überdehnung der *Media* und *Adventitia* nachweisen. Diese Vorgänge stellen gleichzeitig die Grundlage für Komplikationen (okklusive Dissektion, Q-Infarkt, Tod) dar (Strauer 1999). Perforationen der Gefäßwand nach PTCA treten in weniger als 1% auf (Jungbluth, Duber et al. 1988; Ajluni und Safian 1996).

Schon mit Einführung der Ballondilatation wurde eine medikamentöse Begleit- und Nachbehandlung angestrebt, die vorwiegend aus einer Antikoagulation sowie einer vasodilatierenden Behandlung mit Kalzium-Antagonisten bestand. Die Effektivität der eingesetzten Medikamente war nicht eindeutig zu belegen (Thornton, Gruntzig et al. 1984; Corcos, David et al. 1985). Als Begründung für die Ineffektivität der systemisch-medikamentösen Therapie wurde angenommen, dass die am gewünschten Wirkort

(Dilatationsstelle) zu erreichende Medikamentenkonzentration zu niedrig sei, um die Mechanismen der Restenoseentstehung wesentlich zu beeinflussen (Hofling, Huehns et al. 1995). Die Rate der Restenose nach Ballon-PTCA scheint abhängig vom Ausmaß der Gefäßwandverletzung zu sein und ist besonders hoch, wenn ausgedehnte Dissektionen vorliegen. Um die Rate der Notfall-Bypassoperationen und die Gefahr von Restenosen zu reduzieren, kam es zur Entwicklung von koronaren Gefäßstützen (Erbel, Haude et al. 1998).

## **2.7 Der Stent in der Kardiologie**

Bereits von Dotter wurde die Idee formuliert, dilatierte Gefäße intraluminal zu schienen (Dotter und Judkins 1964). Er berichtete über erste Ergebnisse im Tierversuch (Dotter 1969). Im Jahr 1986 wurden die ersten koronaren Stents von Jaques Puel in Frankreich und Ulrich Sigwart in der Schweiz implantiert (Puel, Joffre et al. 1987; Sigwart, Urban et al. 1988).

Unter dem Begriff „Stent“ werden expandierbare Endoprothesen aus verschiedenen Materialien und in unterschiedlichen Formen zum Offenhalten gangartiger Strukturen verstanden. Bei der ballonexpandierbaren Stentimplantation wird ein feines Metallgeflecht auf einen PTCA-Ballon eines Dilatationskatheters aufgedrückt und durch einen großlumigen Führungskatheter über einen Führungsdraht in die zu dilatierende Stenose oder an den Ort des drohenden Gefäßverschlusses vorgeschoben. Nach der Kontrolle des richtigen Sitzes wird dieses Metallgeflecht über die Inflation des Ballons mit hohem Druck vollständig expandiert, plastisch deformiert und in die Gefäßwand hineingedrückt. Aufgrund der Metalleigenschaften und der Geometrie des Gitters bleibt der Stent gespreizt. Die Wandschichten werden dadurch dauerhaft offen gehalten. Nach Deflation kann der Ballon problemlos zurückgezogen werden. Durch den implantierten Stent werden elastische Rückstellkräfte der Gefäßwand (elastic recoil) und das späte negative Remodeling verhindert (Hoffmann, Mintz et al. 1996). Da Koronarstents jedoch Fremdkörper sind, induzieren sie eine entsprechende Gewebereaktion im Sinne einer Hyperplasie modifizierter, glatter Gefäßmuskelzellen. Sie entsteht als Reaktion auf das Einpressen der Streben eines Stents in die *Intima*. Die Intimahyperplasie ist oft überschießend und führt zu einer letztendlich iatrogenen Krankheit: der In-Stent-Restenose (ISR) (Silber 2007). Auch hier zeigt sich, dass die Gefäße diabetischer Patienten eine überdurchschnittliche hohe neointimale Reaktion auf die koronare Stentimplantation zeigen (Kornowski, Mintz et al. 1997).

Die Implantation von Bare Metal Stents (BMS) zeigte sich bei Patienten mit akuten Myokardinfarkten als eine sichere und effektive Therapiemöglichkeit (Neumann, Walter et al. 1996). Bei den meisten Studien mit Drug Eluting Stents (DES) wiederum galt ein akuter Myokardinfarkt als Ausschlusskriterium. Es wird der Verdacht einer verzögerten Endothelheilung durch den Einsatz von DES zusammen mit dem prothrombotischen Geschehen im Rahmen eines akuten Infarktes angenommen (Matiasek 2006).

### **2.7.1 Einteilung der koronaren Stents**

Seit dem ersten selbst expandierbaren Wall-Stent durch Sigwart werden weltweit jährlich mehr als eine Million Stents verwendet. Zahlreiche Stentmodelle sind auf dem Markt erhältlich. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen den selbstexpandierbaren und den ballonexpandierbaren Stents, die unterschiedlich eingesetzt werden (Kutryk und Serruys 1999).

#### *1. Selbstexpandierende Stents*

Die Selbstexpansion wird ausschließlich durch die elastische Rückstellung eines vorher zusammengedrückten und verriegelten Stents bewerkstelligt. Dies bedeutet, dass der Stent so konstruiert sein muss, dass der Werkstoff im elastischen Bereich eine ausreichende Verformung zulässt. Da aber unter einer Zug- oder Biegebeanspruchung der elastische Bereich sehr klein ist, sind in Bezug auf die Stentstruktur einige Grenzen gesetzt. Derartige Stents zeigen eine geringere Stabilität in der Umfangsrichtung. Anwendung finden sie hauptsächlich in Bypassgefäßen und Arterien, die einen Durchmesser von mindestens 3 mm haben (Fischer, Wieneke et al. 2001).

#### *2. Ballonexpandierbare Stents*

Der derzeit am häufigsten im Koronarbereich eingesetzte ballonexpandierbare Stent wird aus einer dünnwandigen Edelstahlröhre gefertigt (Al Suwaidi, Berger et al. 2000). Die mittels Laser-Schneidemaschine herausgeschnittenen Felder zwischen den späteren Stentstreben („Struts“) führen zu einer multizellularen Stentstruktur. Einerseits ermöglichen die Metallstreben eine Reduzierung der Metalloberfläche, andererseits macht die reduzierte Flexibilität dieser Stentbauweise die Implantation in Bereichen schwer zugängiger Läsionen kompliziert (Sigwart 1990).

Große Bedeutung haben bei der Fertigung neben der Kantenabrundung auch die Oberflächenbehandlung. Insbesondere sind die Thrombogenität und Qualität der inneren Stentoberfläche dabei von Interesse (De Feyter und Foley 1996). Besonders glatte Oberflächen werden mit elektrochemischen Verfahren erzielt (Fischer, Wieneke et al. 2001). Nahezu alle Stents sind in verschiedenen Längen und für verschiedene Gefäßdurchmesser verfügbar. Das Spektrum der angebotenen Längen reicht von 8 bis 38 mm und von 2,25 bis 5,0 mm Durchmesser. Als Material dient überwiegend rostfreier, nicht magnetisierbarer Edelstahl mit ca. 2% Molybdänanteil bzw. Materialien aus Tantal, Nickel-Titanium-Legierungen (Nitinol), Cobalt- sowie Platin-Iridium-Legierungen (Fischer, Wieneke et al. 2001).

### **2.7.2 Drug Eluting Stent (DES)**

Seit der ersten Vorstellung der RAVEL-Studie im September 2001 in Stockholm stehen Drug Eluting Stents im Mittelpunkt des Interesses der interventionellen Koronartherapie (Morice, Serruys et al. 2002).

In zahlreichen Studien wurde die Wirkung unterschiedlicher Substanzen erprobt, die für eine Beschichtung von DES geeignet erschienen. Die etablierten DES sind mit Wirkstoffen beschichtet, die gezielt das Zellwachstum hemmen, ohne dabei die Regeneration der Gefäßwand wesentlich zu behindern (Matiasek 2006). Substanzen mit antiproliferativen Eigenschaften, wie Sirolimus (Moses, Leon et al. 2003), Paclitaxel (Stone, Ellis et al. 2004), ABT-578, Tacrolimus (Scheller, Grandt et al. 2005; Matter, Rozenberg et al. 2006), Everolimus, Dexamethason, Actinomycin-D, Methotrexat und Vincristin wurden erprobt. Auch Statine, Carvedilol, Abciximab und Trepidil wurden als Medikamente zur Freisetzung aus Stents vorgeschlagen (Kim, Jeong et al. 2005; Miyauchi, Kasai et al. 2008).

Im Allgemeinen besteht ein DES aus einem Drahtgerüst, das mit einer Trägersubstanz (zumeist ein Polymer, z.B. Phosphorylcholin, Polylactid, Silikon) beschichtet wurde (Bestehorn 1998). Von der körperlichen Beschaffenheit des Gerüsts (z.B. Anzahl und Breite der Stent-Streben), der chemischen Zusammensetzung und der räumlichen Struktur des verwendeten Polymers und dessen Verträglichkeit mit dem aufzubringenden Medikament hängt ab, wie die Medikamentenfreisetzung hinsichtlich der Pharmakokinetik und -dynamik *in vivo* ablaufen wird. Der Einfluss eines Polymers auf beispielsweise inflammatorische Vorgänge in der Arterienwand und damit zusammenhängende fördernde oder hemmende Faktoren, die zur Entstehung einer In-Stent-Restenose beitragen, muss für jedes Polymer angenommen werden (Lemos, Mc Fadden et al. 2004; Virmani, Guagliumi et al. 2004).

Der Einsatz der etablierten DES wird durch das mögliche Auftreten später In-Stent-Thrombosen limitiert (Bavry, Kumbhani et al. 2006). Gründe hierfür sind Endotheldysfunktionen und Entzündungsvorgänge in der Gefäßwand (Finn, Nakazawa et al. 2007). Die späte In-Stent-Thrombose stellt eine lebenslange Komplikation dar. Das Bestreben ist daher groß, Stents zu entwickeln, die die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen maximal hemmen, jedoch die Endothelproliferation und Endothelfunktion unbeeinträchtigt lassen (Miyauchi, Kasai et al. 2008). Darüber hinaus ist bis heute noch nichts über eventuelle kummulative (Neben-)Effekte bei Mehrfachimplantation solcher Stents bekannt.

### **2.8 Die Koronare Restenose**

Unter Koronarer Restenose versteht man die erneute Lumeneinengung eines Koronararteriensegments nach einer zuvor erfolgreich durchgeführten perkutanen koronaren Intervention (PCI). Die Koronare Restenose stellt das zentrale Problem interventioneller Maßnahmen dar (Hombach, Kochs et al. 1997; Rupprecht, Nowak et al. 1997). Sie ist

bedingt durch einen Heilungsprozess der arteriellen Gefäßwand, der auf das Trauma der PTCA folgt. Erfolgt die Wiederverengung in einem Bereich, in dem ein Stent implantiert wurde, so spricht man von einer In-Stent-Restenose (ISR). Die Koronare Restenose nach konventioneller Ballon-PTCA ist eine Folge der durch die Dilatation verursachten Gefäßverletzungen, die mit der Ausbildung einer subintimalen oder submedialen Dissektion verbunden ist (Erbel, Ge et al. 1995). Der pathologische Prozess, der zur Restenose führt, beginnt mit der physikalischen Verletzung des Endothels der Gefäßwand durch den Ballon oder Stent. Im weiteren Ablauf werden Rückstellkräfte aktiv, es kommt zur Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie zu einer Aktivierung von Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten. Durch die komplexen zellulären Vorgänge werden im Zusammenhang mit Zelladhäsion und -infiltration eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt, die ihrerseits zu einer Aktivierung der glatten Gefäßmuskelzellen führen (Gonschior, Gerheuser et al. 1995; Nikol und Hofling 1995). Die proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen zeigen zusätzlich eine Migration in Richtung *Intima* und erfahren eine Transformation vom kontraktilen zum sekretorischen Phänotyp (Liu, Roubin et al. 1989; Raines und Ross 1993). Darüber hinaus legen experimentelle Studien nahe, dass Myofibroblasten aus der *Adventitia* in die *Intima* einwandern und an der Neointimabildung wesentlich beteiligt sind (O'Brien, Shi et al. 1997). Schließlich entsteht ein raumgreifender Prozess, die Formierung der *Neointima*, die wesentlich zur Restenosierung beiträgt (Ross 1995; Schwartz 1997). Insgesamt sind für den erneuten Lumenverlust nach erfolgreicher Dilatation im wesentlichen fünf verschiedene Komponenten beteiligt (Currier und Faxon 1995; Bauriedel, Hutter et al. 1997):

1. frühe elastische Rückstellkräfte (elastic recoil)
2. Thrombusbildung und Thrombusintegration
3. Neointimabildung (Gefäßwandhyperplasie)
4. verminderte Apoptose der glatten Gefäßmuskelzellen / Myofibroblasten
5. später lumenreduzierender Umbau der Gefäßwand (negatives Remodeling)

Die Gefäßreaktionen nach konventioneller PTCA entwickeln sich in den ersten Stunden nach dem Eingriff (Gonschior, Gerheuser et al. 1995) und gelten nach 4-6 Monaten beim Menschen als abgeschlossen. Im klinischen Gebrauch wird unter Restenose eine mehr als 50%ige Stenose verstanden. Wenn der Stenosegrad nach Ballon-PTCA weniger als 50% des Referenzdurchmessers beträgt und keine flussbehindernden Dissektionen oder andere Komplikationen auftreten, wird die Intervention als erfolgreich angesehen. Rezidivstenosen ereignen sich nach angiographischer Definition zu 30-50% nach Ballon-PTCA und zu 20-

30% nach BMS-Implantation. Klinisch bedeutsam sind sie bei 20-50% in Patienten nach erfolgreich durchgeführter konventioneller Ballon-PTCA (Reifart 1995).

Die ursprünglich ausgelöste Vorstellung von „Null Restenose“ nach DES-Implantation konnte sich nicht bestätigen. Prinzipiell kommt es auch nach jeder Stentimplantation zu den beschriebenen Gefäßwandreaktionen. Die frühen elastischen Rückstellkräfte der Gefäßwand und das späte arterielle Remodeling sind jedoch bedingt durch die Stentaufweitung nicht möglich (Lemos, Serruys et al. 2004). Die In-Stent-Restenose (ISR) hingegen ist allein durch die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und Myofibroblasten und die Produktion von extrazellulärer Matrix auf der luminalen Seite bzw. zur luminalen Seite des Stents bedingt (Labinaz, Pels et al. 1999).

## **2.9 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )**

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptor-Familie, ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, welcher die Expression spezifischer Zielgene reguliert (Schoonjans, Staels et al. 1996; Schoonjans, Staels et al. 1996; Debril, Renaud et al. 2001). PPAR $\gamma$  besitzt eine Liganden- sowie eine DNA-Bindungsdomäne. Nach Aktivierung im Zytoplasma durch seine Liganden bildet PPAR $\gamma$  Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie dem RXR/RAR (Retinoid X Receptor/Retinoid Acid Receptor) (Finck, Han et al. 2003). Die Bildung dieser heterodimeren Komplexe ermöglicht den Transport in den Nukleus und die Bindung an spezifische Sequenzen, den PPRE (PPAR-response elements) in der Promotorregion der Zielgene (Tugwood, Issemann et al. 1992).

Neben PPAR $\gamma$  sind bislang 2 weitere PPAR-Formen bekannt. PPAR-alpha (PPAR $\alpha$ ) und PPAR-delta (PPAR $\delta$ ) (Consoli und Devangelio 2005). Die drei Formen weisen zwar eine 60–80% Homologie in ihren Liganden- bzw. DNA-Bindungsdomänen auf, unterscheiden sich jedoch durch die Zielgene, deren Transkription sie regulieren (Schoonjans, Staels et al. 1996). Zu den Aktivatoren für PPAR $\gamma$  zählen neben den Thiazolidindionen (TZD) (Lehmann, Moore et al. 1995) das ProstaglandinD2-Derivat, 15-desoxy- $\Delta$ 12,14-ProstaglandinJ2 (Kliwer, Lenhard et al. 1995) und bestimmte Formen oxidiertes Linolensäure (9[S]-, und 13[S]HODE) (Nagy, Tontonoz et al. 1998; Tontonoz, Nagy et al. 1998). Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch TZD scheint die Stoffwechselforgänge in Fettgewebe, Skelettmuskulatur und Leber dahingehend zu ändern, dass Blutglukosewerte durch eine Erhöhung der Insulinsensitivität in peripheren Organen gesenkt werden (Schoonjans, Peinado-Onsurbe et al. 1996; Way, Harrington et al. 2001; Berger und Moller 2002; Carey, Cowin et al. 2002). Initial wurde PPAR $\gamma$  als zentraler Mediator der Genregulation im Lipidstoffwechsel bzw. der Adipogenese charakterisiert (Tontonoz, Hu et al. 1994). PPAR $\gamma$ -aktivierende TZD bewirken ferner einen Anstieg des High Density Lipoprotein (HDL) sowie eine Reduktion der

Triglyzeride (Balfour und Plosker 1999). Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass PPAR $\gamma$  von Adipozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) exprimiert wird (Willson, Lambert et al. 2001) und in diesen Zellen nicht nur die Genexpression von Schlüsselproteinen des Lipidmetabolismus, sondern auch die vaskuläre Inflammation und Zellproliferation reguliert (Jiang, Ting et al. 1998; Marx, Sukhova et al. 1998; Ricote, Huang et al. 1998; Ricote, Li et al. 1998; Marx, Bourcier et al. 1999). So reduzieren PPAR $\gamma$ -Agonisten im Rattenmodell die Expression Angiogenese-fördernder Wachstumsfaktoren, wie VEGF-1 und VEGF-2 (Vascular Endothelial Growth Factor) in Endothelzellen (Xin, Yang et al. 1999). Durch diesen Effekt scheint eine antiinflammatorische Wirkung in Gefäßen erzielt zu werden. Darüber hinaus hemmen PPAR $\gamma$ -Aktivatoren die Interferon- $\gamma$ -induzierte Freisetzung chemotaktisch-wirksamer Proteine, sogenannter Chemokine, was im *in vitro* Migrationsassay zu einer verminderten chemotaktischen Aktivität der T-Zellen führte (Marx, Mach et al. 2000). Durch eine Hemmung der Expression von iNOS („inducible nitric oxide synthase“), Scavengerrezeptor A und Gelatinase A in Monozyten und Makrophagen konnten verschiedene Studien antiinflammatorische und potentiell antiatherogene Effekte von PPAR $\gamma$ -Aktivatoren in diesen Zellen zeigen (Ricote, Li et al. 1998). Einige Arbeitsgruppen konnten PPAR $\gamma$ -mRNA und Proteinexpression in isolierten humanen VSMC der *Vena saphena* und der Koronararterien nachweisen (Marx, Schonbeck et al. 1998; Law, Goetze et al. 2000). Law et al. zeigten, dass PPAR $\gamma$ -Aktivatoren die Intimahyperplasie nach arterieller Gefäßverletzung in der Ratte inhibierten (Law, Meehan et al. 1996), so dass schon hier ein Effekt von PPAR $\gamma$  auf die Migration und Proliferation von VSMC vermutet werden kann. Neben diesem Effekt auf die VSMC-Migration reduzieren PPAR $\gamma$ -Aktivatoren in diesen Zellen die Expression und Aktivität matrixdegradierender Enzyme, sogenannten Matrixmetalloproteinasen (MMP) (Marx, Schonbeck et al. 1998). MMP führen im Rahmen der VSMC-Migration dazu, dass die extrazelluläre Matrix, welche die Zelle wie einen Käfig umgibt, verdaut wird und die Zelle so erst migrieren kann (Marx und Hombach 2001). *In vitro* Studien konnten belegen, dass eine Behandlung von Makrophagen mit PPAR $\gamma$ -Aktivatoren die Freisetzung und enzymatische Aktivität von MMP-9 hemmen (Marx, Sukhova et al. 1998; Li, Pascual et al. 2000). In Typ-2-Diabetes Patienten konnte der Effekt von Rosiglitazon auf die Reduktion von MMP-9 nachgewiesen werden (Haffner, Greenberg et al. 2002; Marx, Froehlich et al. 2003).

Nachdem vor Jahren schon die Expression von PPAR $\gamma$  in der Gefäßwand gezeigt werden konnte, legen verschiedene experimentelle Daten nahe, dass TZD entscheidende Prozesse in allen Phasen der Atherogenese beeinflussen. So wird durch PPAR $\gamma$  in der frühen Phase der Atherogenese die endothelvermittelte Rekrutierung von Leukozyten wie Monozyten und CD4-positiven Lymphozyten moduliert. In der darauf folgenden Phase, der „fatty streak“-Formation, wird die Aktivierung von Lymphozyten mit konsekutiver Freisetzung

proinflammatorischer Zytokine sowie die Migration und Proliferation von VSMC durch TZD gehemmt. In der Phase fortgeschrittener Läsionen könnte eine Reduktion der Freisetzung matrixdegradierender Enzyme aus Makrophagen zur Plaquestabilisierung beitragen (Walcher und Marx 2006).

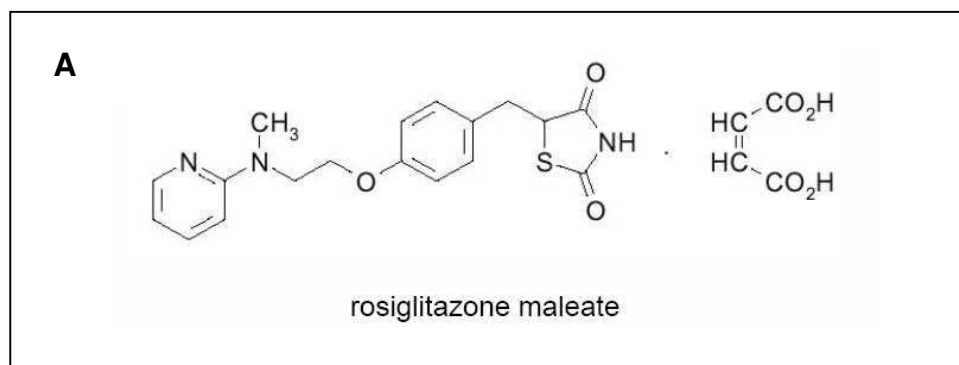
## 2.10 Thiazolidindione (TZD)

Thiazolidindione (synonym: Glitazone) stellen eine neue Substanzklasse zur oralen Therapie des Typ-2-Diabetes dar (Yki-Jarvinen 2004). Ciglitazon, einer der ersten Vertreter dieser Substanzklasse, wies im Tierversuch ein insulinresistenzminderndes Potential auf (Fujita, Sugiyama et al. 1983). Die Nachfolgesubstanzen Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon und Darglitazon erreichten zunächst das Stadium klinischer Studien. Mittlerweile sind europaweit Rosiglitazon und Pioglitazon zur oralen Kombinationsbehandlung des Typ-2-Diabetes zugelassen (Meisner, Walcher et al. 2006).

TZD bewirken über eine Aktivierung der  $\gamma$ -Isoform des Transkriptionsfaktor „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma“ (PPAR $\gamma$ ) eine Modulation der Transkription spezifischer, aktivierbarer Gene, die zur Steigerung der Insulinempfindlichkeit führt (Lehmann, Moore et al. 1995). TZD beeinflussen im Kohlenhydratstoffwechsel Prozesse wie Glucosetransport, Glykogensynthese und Gluconeogenese (Staels und Fruchart 2005). Neben diesen Effekten sind eine Reihe von PPAR $\gamma$ -vermittelten Effekten beschrieben worden (Vamecq und Latruffe 2000; Marx, Duez et al. 2004).

### 2.10.1 Rosiglitazon

Rosiglitazon ist ein weißes, kristallines Pulver, löslich in Ethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF). Unter dem Namen Avandia® (GlaxoSmithKline, München, Deutschland) war Rosiglitazon als orales Antidiabetikum in Deutschland pharmazeutisch zugelassen (Lehmann, Moore et al. 1995).



**Abb. 4:** A: Strukturformel von Rosiglitazon (Behnisch 2006).



Aus der Literatur ist bekannt, dass Rosiglitazon nach etwa 1 Stunde den maximalen Blutplasmaspiegel durch Absorption aus dem Verdauungstrakt erreicht. Die biologische Verfügbarkeit wird mit 99% angegeben. Die Plasmaproteinbindung von Rosiglitazon beträgt 99%. Rosiglitazon wird in der Leber über das Zytochrom-P450-System abgebaut, wobei vor allem die CYP2C8- und daneben die CYP2C9-Isoform verantwortlich sind (Baldwin, Clarke et al. 1999). Die Metaboliten, obschon teilweise pharmakologisch aktiv, scheinen nicht zur Wirkung von Rosiglitazon beizutragen. Die Halbwertszeit von Rosiglitazon liegt zwischen 3 und 4 Stunden. Bei Leberinsuffizienz fand sich eine Verlängerung der Halbwertszeit etwa um das 1½-fache. Die Ausscheidung erfolgt zu 75% renal, über den Darm werden nur 25% eliminiert (Mohr und Herzig 2001).

Bisher sind in kontrollierten Studien mehr als 5000 Patienten mit Rosiglitazon behandelt worden. Es sind zwei Fallberichte bekannt, wonach sich unter der Einnahme von Rosiglitazon ein reversibler Leberzellschaden entwickelte (Al-Salman, Arjomand et al. 2000; Freid, Everitt et al. 2000). Weiterhin könnten als Nebenwirkung bei der Einnahme von Rosiglitazon periphere Ödeme, Anämie, sowie eine leichte Gewichtszunahme (1-3 kg) auftreten. Durch die Flüssigkeitsretention kann eine Herzinsuffizienz ausgelöst oder verschlimmert werden (Mohr und Herzig 2001). Es wurde zwischenzeitlich eine mit Rosiglitazon verbundene Erhöhung der Mortalität diskutiert (Nissen et al. 2007), die sich aber in Langzeitstudien nicht bestätigte (Home, Pocock et al. 2009).

Wolffenbittel et al. zeigten, dass im Rahmen einer 52-Wochen-Studie unter Rosiglitazoneinnahme der diastolische Blutdruck signifikant um 2,3 mmHG gesenkt werden konnte (Wolffenbittel, Gomis et al. 2000). Es ist bekannt, dass bei nicht-diabetischen Patienten dieser Wirkstoff Einfluss nimmt auf die Plaque-Zusammensetzung innerhalb einer Arterie und entzündliche Reaktionen reduzieren kann (Meisner, Walcher et al. 2006). Bei oraler Gabe an Typ-2-Diabetiker mit implantiertem Stent hat Rosiglitazon einen präventiven Effekt auf die ISR-Rate (Choi, Kim et al. 2004). *In vivo* Daten von LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen zeigten, dass oral verabreichtes Rosiglitazon die Plaquegröße und die Plaqueausdehnung in diesem Mäusemodell der Atherosklerose signifikant reduziert (Li, Brown et al. 2000). In einer randomisierten, placebo-kontrollierten Studie wurden 24 Patienten mit hochgradiger symptomatischer Karotisstenose vor Karotisendatherektomie mit Rosiglitazon oder Placebo behandelt. Nach 4 Wochen wurden die Plaques zum Zeitpunkt der Operation entnommen und mittels immunhistologischer Färbung untersucht. In dieser Studie zeigte sich, dass es zu einer Reduktion der Plaquegröße von rosiglitazonbehandelten Patienten kam. Konsekutiv führte dies über eine Verminderung der Expression matrixdegradierender Enzyme zu einem Anstieg des Kollagengehalts in den Plaques. Das kann als Veränderung der Plaquekomposition zugunsten eines stabileren Plaquetyps gewertet werden (Meisner, Walcher et al. 2006). Auf der anderen Seite wurde das

Plaquevolumen in Koronarien nicht durch Rosiglitazon reduziert (Ratner, Cannon et al. 2008). Aufgrund der überwiegend positiven systemisch-metabolischen Eigenschaften könnte der PPAR $\gamma$ -Aktivator Rosiglitazon für eine lokale antiatherogene Therapie mittels Stentimplantation geeignet sein.

### **3 Zielsetzung**

Aufgrund seiner verschiedenen antiatherogenen Eigenschaften erscheint Rosiglitazon als ideale Substanz im Hinblick auf eine Stentbeschichtung zur Verhinderung von In-Stent-Restenosen (ISR) nach kathetergestützten Koronarinterventionen.

Durch die vorliegende Arbeit soll untersucht werden, inwieweit in einem präklinisch relevanten porcinen Stent-Modell die lokale Freisetzung des PPAR $\gamma$ -Liganden Rosiglitazon aus einem DES (nachfolgend als RDES bezeichnet) die Restenoseformation nach intrakoronarer Stentimplantation beeinflusst und ob die lokal verlängerte Rosiglitazonfreisetzung zu einer Verringerung der Restenose führt.

Um den Einfluss der lokalen Applikation von Rosiglitazon auf die Restenoseentwicklung nach Stentimplantation zu untersuchen, wird ein mit Rosiglitazon beschichteter polymerfreier Drug Eluting Stent (RDES) im Vergleich zu einem baugleichen Bare Metal Stent (BMS) getestet. Es erfolgt eine histomorphometrische und immunhistologische Auswertung der Koronargefäße.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Medikamente

<u>Handelsname</u>	<u>Wirkstoff</u>	<u>Gehaltsangabe</u>	<u>Form</u>	<u>Hersteller</u>
ASS 100 TAH	Acetylsalicylsäure	100 mg/Tabl.	Tabletten	Ratiopharm
ASS 500	Acetylsalicylsäure	500 mg/Tabl.	Tabletten	Ratiopharm
Atropinsulfat	Atropinsulfat	10 mg/ml	Lösung	Dr. F. Köhler GmbH
Cordarex	Amiodaronhydrochlorid	50 mg/ml	Lösung	Sanofi aventis
Dopram	Doxapramhydrochlorid	20 mg/ml	Lösung	Riemser Arzneimittel
Heparin	Heparin-Natrium	5.000 I.E./ml	Lösung	Rotexmedica
HAES 6%	Hydroxethylstärke	60 g/l	Lösung	Fresenius Kabi
Isoptin	Verapamilhydrochlorid	120 mg/Tabl.	Tabletten	Abbott
Ketamin 10%	Ketaminhydrochlorid	100 mg/ml	Lösung	WDT
Ketamin 500	Ketaminhydrochlorid	50 mg/ml	Lösung	Delta Select
NaCl 0,9%	Natriumchlorid	9 g/l	Lösung	Fresenius Kabi
Nitrolingual	Glyceroltrinitrat	1 mg/ml	Lösung	Pohl Boskamp
Plavix	Clopidogrel	75 mg/Tabl.	Tabletten	Sanofi Pharma
Rompun 2%	Xylazinhydrochlorid	20 mg/ml	Lösung	Bayer
Stresnil	Azaperon	40 mg/ml	Lösung	Janssen
Suprarenin	Epinephrinhydrochlorid	1,2 mg/ml	Lösung	Aventis
T 61	Embutramid (Hauptanteil)	200 mg/ml	Lösung	Intervet
Xenetix 350	lobitridol	0,768 mg/ml	Lösung	Guerbet

#### 4.1.2 Material für Vorbereitung, Narkoseeinleitung und Intervention

Abdeckhaube	100 x 80 cm, flach, pub Medizintechnik GmbH
Abdecktuch (Steri-Drape)	100 x 150 cm, 3M Health Care
Abdecktuch, selbstklebend	75 x 75 cm, Hartmann
Angiographie-Set, Coro-Set	Smith Medical GmbH, Kirchseeon, Deutschland
Arterielle Blutdruckmessung	Set, Charité Basis Rot, Medex Medical Ltd.
Blutentnahmeröhrchen	Heparin, Citrat, Serum, BD-Plymouth UK
Braunüle	Vasocan Braunüle, 1,1 x 33 mm, Braun
C-Bogen	Typ: 980720020001, Phillips
EKG/Sauerstoffsättigung	Hewlett Packard GmbH, 78354 C

Führungskatheter	Amplatz Rechts (AR-2,0), 8 F, Cordis
Führungskatheter	Judkins Rechts (JR-2,0), 8 F, Cordis
Heidelberger Verlängerung	75 cm, Fresenius Kabi
Hochdruckhahnbank	3-fach, 600 psi, RA rechts, Smith Medical GmbH
Hochdruckleitung	25 cm, 1200 psi, PU, RA, Smith Medical GmbH
Infusionsbesteck	Kontrast-Infusionsbesteck, Smith Medical GmbH
Kontrastspritze	Kontrastspritze, 20 ml, Merit Medical
Priority Pack	20/30 with CoPilot, Accessory Kit Guidant Corporation, Temecula, USA
Punktionskanüle	Intradyn Punktionskanüle, 1,3 x 70 mm, Braun
Sauerstoff-Flasche	Conoxia med. O <sub>2</sub> , Linde, Deutschland
Saugkompresse	75 x 75 cm, Hartmann
Schleuse	Ultimum, 8 F, 12 cm, St. Jude Medical
Stent - Bare Metal Stent (BMS)	YUKON® Choice, 4,0 x 18 mm, Translumina
Stent - Drug Eluting Stent (RDES)	YUKON® Choice, 3,5 x 18 mm, Translumina
Stent - Drug Eluting Stent (RDES)	YUKON® Choice, 4,0 x 18 mm, Translumina
Stent Coating Machine	T-SCM2003 , Translumina
Tip Flexibility Floppy	180 cm x 0,36 mm, Cordis
Überwachungselektrode	Red Dot, 3M Health Care
Videokassettenrekorder	Umatic, VO5800PS, Sony

#### 4.1.3 Material für Weiterverarbeitung und digitale Bildanalyse

2-MEA	2-Metoxyethylacetat, Sigma, Deutschland
Biotin (Anti-Rabbit-Biotin)	Dako, UK
BrDu (Antikörper)	Maus anti BrDu, GE Healthcare, UK
BrDu Diluent	GE Healthcare, UK
Citratpuffer (pH 6)	Dako, UK
Deckgläser	Menzel-Gläser, VWR
Eindeckmedium (Glyceringelatine)	Merck
Einwegskalpell	Nr. 11, Nr. 21, Feather
Ethanol 70%	J.T. Baker
Falcon Tubes	Sarstedt
Flachtubes	Kartell, Italien
Formalin Solution	10%, neutral buffered, 10 L, Sigma Diagnostics
Glasröhrchen	Tubo Ensayorosca
Hämatoxylin-Lösung nach Gill III	Merck

Handmotor mit Sägeblatt	XENOX, Deutschland
Kamera Olympus C-4040Z Digital	Olympus Optical Co. GmbH, Deutschland
Ki-67 (Antikörper)	Maus anti human Ki-67 (Dako) Clone: MIB-1
Ki-67 Diluent	Dako, UK
Kühlplatte	National Lab
Kühlschrank	Bosch, Deutschland
Mikroskop BX51	Olympus Optical Co. GmbH, Deutschland
Perfusionspumpe	Typ M80, Nr. 721713, Multifix, A. Schwinherr
Pipette	Eppendorf, Deutschland
Plastikröhrchen	Sarstedt, 15 ml, Falcon, 50 ml
Polyethylenfolie	Heraeus Kulzer
Poly-L-Lysine, Solution 0,1%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Polysine Objektträger	Menzel-Gläser, VWR
Presswalze	Speedball
Proteinase K	Dako, UK
Rotationsmikrotom	HM 355 S, Fa. MICROM, Walldorf, Deutschland
Schnellkleber	Cyanacrylkleber, Omnient, Rodgau
Schraubdeckeldose	1250 ml, 159 x 106 mm, neoLab GmbH
Software	DP-Soft Version 3.2, Olympus Optical Co. GmbH
Strept Avidin	Dako, UK
Substrat (Färbemittel)	Dako, UK
TRIS-Puffer (pH 7,5)	Sigma, Deutschland

#### 4.1.4 Futter und Einstreu

Die Tiere wurden über den gesamten Zeitraum des Versuches mit dem Futter „V44133-000 ssniff MPig–H, 4 mm, Alleinfutter für Minipigs“ der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH gefüttert.

Zusammensetzung: Getreide und Getreidenebenerzeugnisse, Ölsaaten, Bierhefe, Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente

Energiegehalt der Nahrung: 62% Kohlenhydrate, 29% Protein, 9% Fett

Zusatzstoffe: Vit. A: 15000 I.E./kg, Vit. D3: 1000 I.E./kg, Vit. E: 100 mg/kg, Cu: 5 mg/kg

Die Stallungen wurden mit „Lignocel“, einem Hartholzgranulat der Fa. J. Rettenmaier und Söhne GmbH, eingestreut.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Tierexperiment

#### 4.2.1.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen

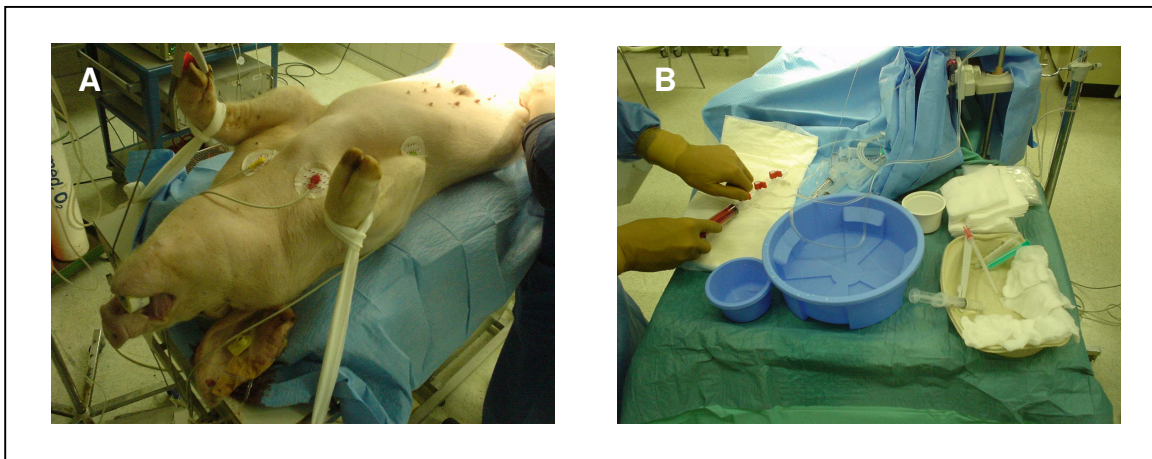
Sieben männlich-kastrierte Hausschweine (Hybriden der Deutschen Landrasse und Pietrain) wurden eine Woche vor Beginn der Untersuchungen in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF) eingestellt. Die Tiere wurden einzeln auf Hartholzgranulat gehalten und erfuhren ein mit maximal 300 Lux geregeltes Lichtprogramm mit 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit. Das Wasser war für alle Schweine frei zugänglich, die Fütterung erfolgte morgens und nachmittags mit handelsüblichem, pelletiertem Futter für Minipigs. Die Raumtemperatur betrug 18-21 °C, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei ca. 60%. Die durchgeführten Versuche mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 12 Wochen waren vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (G 0106/06).

#### 4.2.1.2 Intervention - Vorbereitung und Narkoseeinleitung

Am Tag vor der Intervention wurde den jeweiligen Tieren mittags eine Prämedikation aus 500 mg Acetylsalicylsäure (ASS) und 300 mg Clopidogrel *per os* verabreicht, um intrakoronaren Thromben im Zusammenhang mit der Intervention vorzubeugen. Am Morgen der Intervention blieben die Tiere nüchtern und erhielten 120 mg des Calciumantagonisten Verapamilhydrochlorid *per os* zur Prophylaxe eventueller Koronarspasmen. Nach der Intervention erhielten die Tiere weiterhin täglich bis zu dem Tag ihrer Euthanasie 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel über das Futter, zur Verhinderung subakuter Stentthrombosen und ischämischer Komplikationen nach der Intervention.

Vor der Operation wurden die Tiere adspektorisch auf ihre Narkosefähigkeit hin untersucht, mit besonderer Berücksichtigung auf Kreislaufprobleme und Atemwegsinfektionen. Das Gewicht der Tiere für die Narkosedosierung wurde vor Einleitung der Narkose bestimmt. Zur Einleitung erhielten die Tiere mit einer auf eine Perfusorleitung aufgesetzten Spritze eine Injektion in die Nackenmuskulatur (Ketamin: 25 mg/kg, Xylazin: 20 mg/kg, Azaperon: 6 mg/kg, Atropin: 0,2 mg/kg). Nach dem exzitationslosen Einschlafen konnten die Schweine 15 min später in den Operationssaal gebracht werden. Hier erfolgte die weitere Untersuchung der Tiere (Auskultation von Herz und Lunge, Inspektion der Maulhöhle, kapilläre Rückfüllungszeit am Zahnfleisch), Palpation der *V. saphena medialis*, das Wiegen und die Reinigung der Tiere in der Leiste. An der linken Brustwand, an der rechten Brustwand sowie an der rechten Bauchseite wurden nach Rasur EKG-Klebelektroden angebracht, außerdem bekam jedes Tier einen Venenkatheter in die *V. auricularis lateralis*. Auf einem mit einem

Luftkissen gepolsterten OP-Tisch wurden die Schweine in Rückenlage ausgebunden, an den EKG-Monitor angeschlossen und mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) infundiert. Ein Pulsoxymeter wurde an einer Klaue einer Vordergliedmaße angebracht; bei einer Sauerstoffsättigung von weniger als 93% wurde 100%iger Sauerstoff nasal verabreicht. Die Leistengegend wurde desinfiziert und steril abgedeckt. Eine OP-fähige Narkose wurde über die wiederholte intravenöse Verabreichung von 25 mg/kg Ketamin und 80 mg/kg Xylazin im Abstand von 20 Minuten erreicht. Die Tiere atmeten während der gesamten Narkosedauer spontan. Die Flüssigkeitssubstitution erfolgte *intra operationem* mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) in einer Dosierung von ca. 10 ml/kgKGW/h. Bei Operationszeiten über 90 Minuten wurde zusätzlich Hydroxethylstärke (HES 6%) zur Kreislaufstabilisierung verwendet.



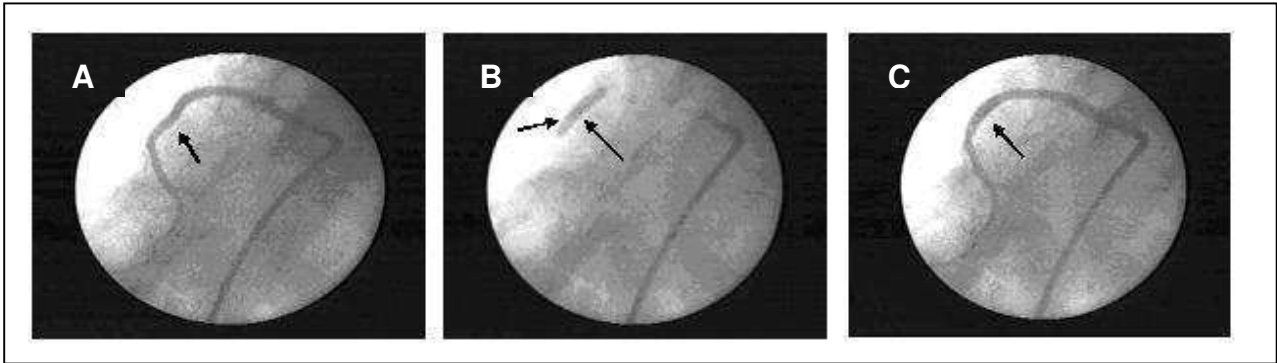
**Abb. 5:** Schwein in Narkose vor Intervention (A), Vorbereitung der OP-Utensilien (B).

#### 4.2.1.3 Koronare Intervention

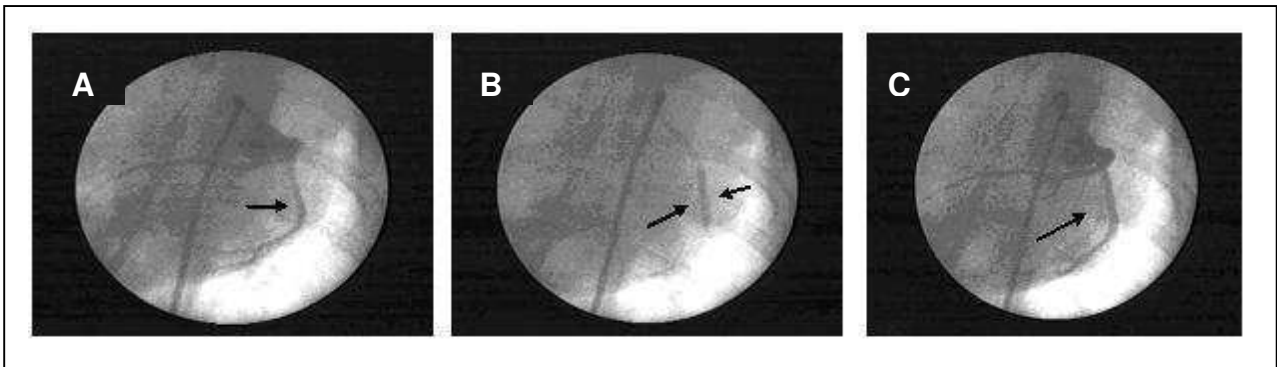
Zur Punktion der rechten oder linken *A. femoralis* wurde das jeweilige Bein losgebunden. Mit einer Punktionsnadel wurde die Leiste punktiert und ein J-Draht (j-wire) in Seldinger Technik in das Gefäß eingeführt. Nach Entfernung der Punktionsnadel wurde die Einstichstelle durch einen kleinen Hautschnitt erweitert, worauf eine 8 French Gefäßschleuse in die Arterie vorgeschoben wurde. Der J-Draht wurde entfernt und die sichere arterielle Lage der Gefäßschleuse durch Öffnen des Hahns überprüft. Über die Gefäßschleuse wurde Blut für weitere Untersuchungen entnommen. Die Tiere erhielten als Antikoagulans 5000 I.E. Heparin-Natrium intravenös. Unter Durchleuchtungskontrolle wurde zunächst ein langer J-Draht bis in die *Aorta ascendens* vorgeschoben, um dem gekrümmten Führungskatheter als Leitschiene zu dienen. Als Führungskatheter für die rechte und linke Koronararterie wurde je nach Gefäß entweder ein Judkins rechts 3.5 mit Seitenlöchern oder ein Amplatz rechts 2.0 mit Seitenlöchern verwendet. Der J-Draht wurde entfernt, sobald der Führungskatheter im *Bulbus aortae*, kurz oberhalb der Koronarostien positioniert war. Nach der Intubation des



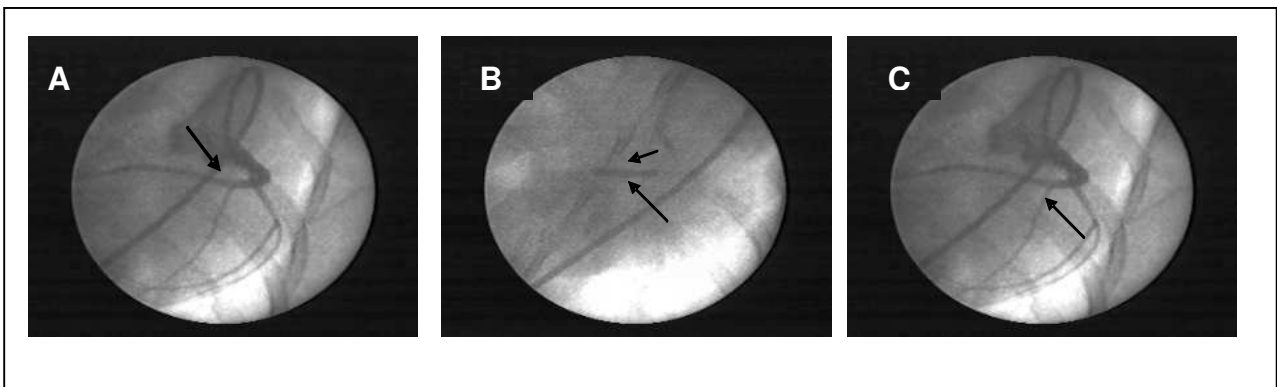
Ostiums der Koronararterien konnten der Verlauf und das Ausmaß des Gefäßes mittels Kontrastmittel-Angiographie in einer RAO (right artery oblique) Projektion dargestellt und zur Dokumentation auf Video aufgezeichnet werden. Der Führungskatheter wurde über die Hahnenbank des Angiographie-Sets an einen Druckaufnehmer angeschlossen, der seitlich am Operationstisch auf Herzhöhe des Tieres angebracht wurde. Der Druckaufnehmer war mit dem Monitor verbunden, um eine arterielle Blutdruckmessung über die Spitze des Führungskatheters zu ermöglichen. Um den Führungskatheter innerhalb der Koronarie zu platzieren, wurde ein 0,035-inch-Führungsdraht mit flexibler Spitze tief in das Koronargefäß vorgeschoben, um dem nun folgenden Ballonkatheter mit aufgestecktem Stent als Leitschiene zu dienen. Die Größe des Ballonkatheters (ausgehend von einem Inflationsdruck von 8 bar) richtete sich dabei nach der angiographisch festgestellten Größe der Arterie. Das Ziel war das Gefäß während der Stentimplantation auf das 1,3- bis 1,5-fache seiner ursprünglichen Größe zu dilatieren. Dieser Verletzungsreiz der Arterienwand ist die Voraussetzung für eine adäquate Gewebsreaktion und die Stenoseentwicklung. Koronarspasmen wurden vor der Dilatation über den Führungskatheter mittels Glyceroltrinitrat-Lösung (50-150 µg) intrakoronar vorgebeugt. Für die Stentimplantation wurde ein Gefäßbereich von 3-4 mm Durchmesser ausgewählt. Dieser Abschnitt war frei von Gefäßabgängen. Unter manuellem Monitoring erfolgte die Implantation der RDES (Yukon®, Translumina) bzw. der BMS (Yukon®, Translumina) in die rechten und linken Koronararterien aller Schweine so, dass die Stents möglichst gleichmäßig verteilt wurden (siehe Behandlungsprotokoll). Die Stents wurden auf einem Ballon-Dilatationskatheter in deflatiertem Zustand unter Durchleuchtung an die vorgesehene Implantationsstelle eingeführt. Die Aufdehnung des Ballons erfolgte über einen Drehinflator, wobei durch Kontrastmittel ein Druck von 12 bis 20 bar erzeugt wurde. Während der Dilatation wurde die korrekte Lage und die vollständige Entfaltung des Ballons angiographisch überprüft. Nach erfolgter Dilatation und Implantation des Stents wurde der Ballon deflatiert. Der Ballonkatheter und der Führungsdraht wurden unter Durchleuchtungskontrolle entfernt und eine weitere Kontrastmitteldarstellung durchgeführt, um mögliche Dissektionen der Gefäße rechtzeitig erkennen zu können. Das gestentete Koronargefäß wurde nochmals auf Video aufgezeichnet.



**Abb. 6:** Angiographische Darstellung des RCA im Verlauf der OP vor der Stentimplantation (A), während der Implantation (B; BMS, 4 mm x 18 mm) und nach der Implantation (C).



**Abb. 7:** Angiographische Darstellung des RCX im Verlauf der OP vor der Stentimplantation (A), während der Implantation (B; RDES, 4 mm x 18 mm) und nach der Implantation (C).



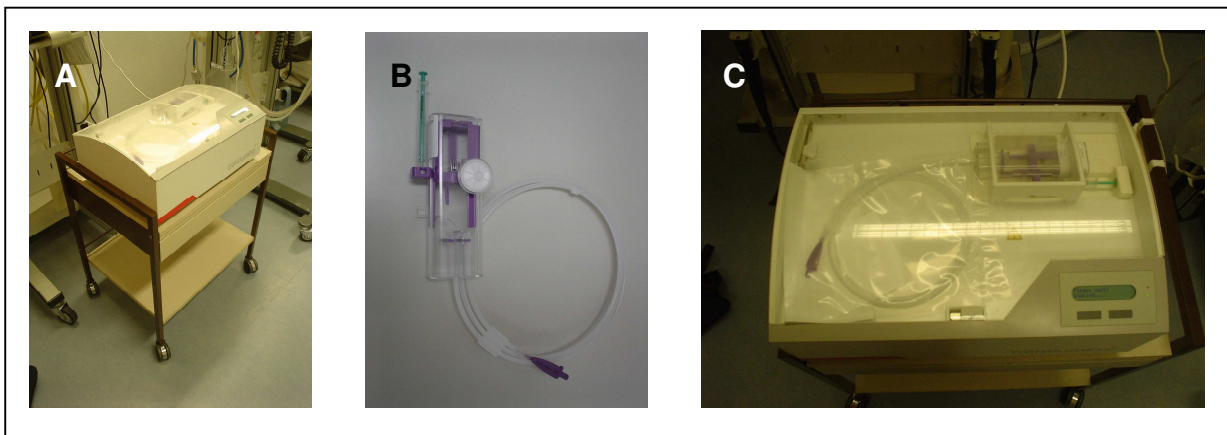
**Abb. 8:** Angiographische Darstellung des RIVA im Verlauf der OP vor der Stentimplantation (A), während der Implantation (B; RDES, 4 mm x 18 mm) und nach der Implantation (C).

Nach Abschluss der Intervention und Entfernung des Katheters wurde die arterielle Schleuse entfernt und durch mindestens 20-minütige manuelle Kompression auf die Einstichstelle eine Blutung auf die Einstichstelle verhindert. Danach wurden die Tiere weitere 10 Minuten auf dem Operationstisch beobachtet, um Nachblutungen rechtzeitig zu erkennen und eingreifen zu können. Anschließend wurden die Tiere zum Aufwachen in ihren Stall zurückgebracht und in Seitenlage mit tief gelagertem Kopf auf Holzeinstreu gebettet. Alle 15 Minuten wurde die punktierte Leiste auf Hämatome untersucht, bis die Tiere diese Untersuchung aufgrund des zurückkehrenden Bewusstseins nicht mehr tolerierten.

Am ersten Tag nach der Operation wurden die Tiere auf Allgemeinbefinden, Futteraufnahme, Körpertemperatur und Wundveränderungen untersucht. Drei Tage *post operationem* wurden nochmals Blutproben entnommen.

#### 4.2.2 Beschreibung des Drug-Eluting-Stentsystems

Das YUKON® Coronary Stent System (Fa. Translumina) bestand aus drei Komponenten: dem Koronar-Stent (Yukon®), mit einer speziell behandelten Oberfläche (PEARL surface), dem PTCA Katheter (CURARE Cathy N° 3) als Trägersystem mit einem speziellen Kartuschensystem und der Stent-Coating-Machine (T-SCM-2003). Das Kartuschensystem bietet zusammen mit der Stent-Coating-Machine die Möglichkeit, das Stentsystem individuell mit verschiedenen Medikamenten zu beschichten. Durch manuelle Entriegelung des Stentsystems konnte der Stent auch als unbeschichteter Koronar-Stent verwendet werden (Bare Metal Stent; BMS).



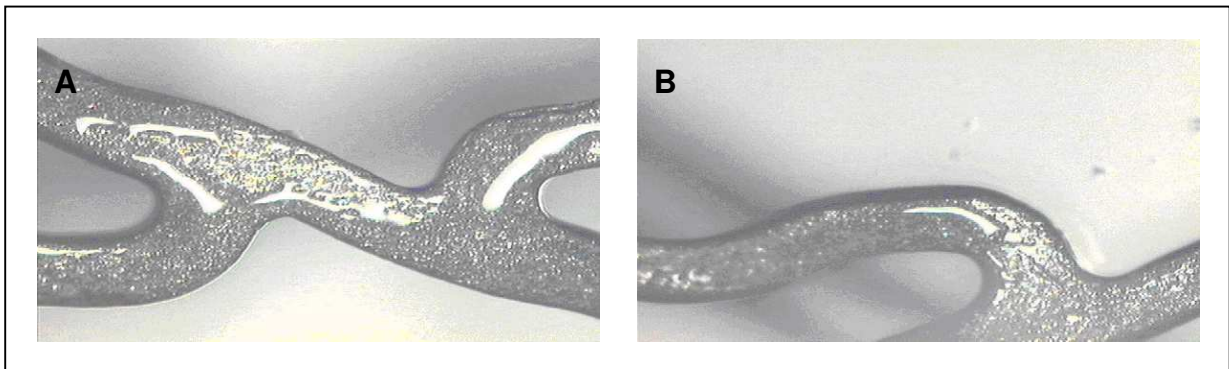
**Abb. 9:** Stent-Coating-Machine (A), Kartuschensystem (B), Kartuschensystem in Stent-Coating-Machine (C).

##### 4.2.2.1 Der Koronar-Stent

Der hier verwendete Stent war ein ballonexpandierbarer, polymerfreier koronarer Stent von 18 mm Länge. Er wurde unter Verwendung eines Präzisions-Lasers aus implantierbarem chirurgischen Edelstahl gefertigt.

Der Begriff „PEARL surface“ steht für eine neu entwickelte mikroporöse Oberfläche. Sie weist etwa 1 Millionen Poren pro cm<sup>2</sup> mit einer Tiefe von ca. 2 µm auf. Durch diese

Oberflächenstruktur sollen Endothelzellen besser anhaften können, wodurch ein schnelleres Einwachsen des Stents in die Gefäßwand möglich wird. Andererseits erhält man durch diese spezielle Oberfläche die Möglichkeit, gezielt antirestenotische Medikamente aufzubringen. In *in vitro*-Experimenten mit porcinen glatten Muskelzellen wurde die geeignete lokale Konzentration von Rosiglitazon bestimmt (Behnisch 2006). Mittels der Stent-Coating-Machine wurde die Rosiglitazonlösung mit Hilfe eines Lösungsmittels (Ethanol) auf den Stent aufgetragen (5 mg Rosiglitazon / ml Ethanol). Nach Verdampfung des Lösungsmittels waren die Poren des Stents vollständig mit dem Wirkstoff aufgefüllt und stellten eine mikroskopisch glatte Oberfläche dar. Nach Dilatation verblieben 200 µg Rosiglitazon auf dem Stent. Bei dieser Dosierung war von einer ausschließlich lokalen Wirkung ohne systemische Nebenwirkungen oder zytotoxische Effekte auf Endothelzellen auszugehen (Behnisch 2006). Diese neue Technologie ermöglichte eine Stentbeschichtung in der Klinik vor Ort mit unterschiedlichen Wirkstoffen ohne Beeinträchtigung durch ein Polymer.



**Abb. 10:** RDES, (YUKON®, Translumina), dilatiert mit 16 bar (A und B) (Behnisch 2006).

#### 4.2.2.2 Das Trägersystem

Der PTCA Katheter CURARE Cathy N° 3 besaß ein Schaftsystem, an dessen distalem Ende ein Ballon integriert wurde. Der Schaft bestand aus einem Schlauch, der sich distal aufteilte: Über das kurze distale Ende wurde der Katheter über den Führungsdraht eingeführt, der die genaue Positionierung des Katheters erlaubte. Über das weiterführende Ende wurde der Ballon mit Kontrastmittel inflatiert. Der Ballon wurde so entwickelt, dass er sich bei einem bestimmten Druck auf einen genau definierten Durchmesser ausdehnt (semi-compliant). Um den Ballon lokalisieren zu können, waren auf dem Katheterschlauch zwei röntgendichte Markierungen angebracht. Die dem Lueranschluss des Dilatationskatheters am nächsten gelegene Markierung wurde beim femoralen Zugang des Führungskatheters verwendet.

## 4.2.3 Behandlungsprotokoll

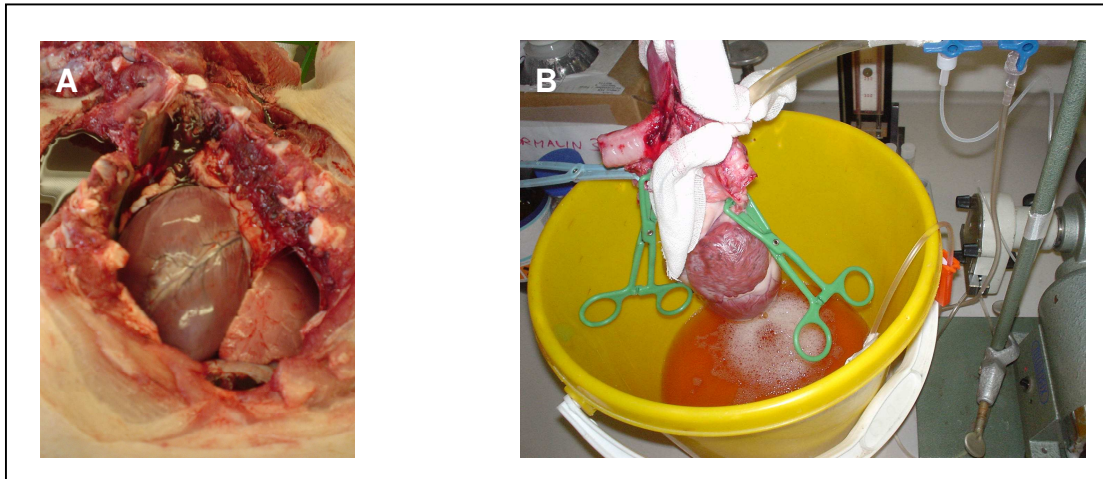
Tier	Datum Intervention	Gewicht in kg vor OP	Punktion	Ballondilatation und Stentimplantation 1. Gefäß	Ballondilatation und Stentimplantation 2. Gefäß	Komplikationen	Datum Sektion, Gewicht in kg
1	03.05.07	30,0	<i>A. femoralis</i> , links, rechts	/	/	Art. Punktion nicht möglich	/
2	03.05.07	38,0	<i>A. femoralis</i> , links	<b>RCX</b> BMS, 4 mm, 18 mm 20 s, 14 bar	<b>RCA</b> RDES, 4 mm, 18 mm 20 s, 14 bar	–	22.07.07 106,0
3	03.05.07	35,0	<i>A. femoralis</i> , rechts	<b>RCX</b> RDES, 4 mm, 18 mm 20 s, 16 bar	<b>RCA</b> BMS, 4 mm, 18 mm 20 s, 18 bar	–	25.07.07 95,0
4	03.05.07	36,0	<i>A. femoralis</i> , rechts	<b>RCX</b> BMS, 4 mm, 18 mm 20 s, 20 bar	<b>RIVA</b> RDES, 4 mm, 18 mm 30 s, 14 bar	–	25.07.07 107,0
5	04.05.07	37,0	<i>A. femoralis</i> , rechts	<b>RIVA</b> BMS, 4 mm, 18 mm 35 s, 18 bar	<b>RCA</b> RDES, 4 mm, 18 mm 35 s, 13 bar	–	27.07.07 111,0
6	04.05.07	36,0	<i>A. femoralis</i> , rechts	<b>RCA</b> BMS, 4 mm, 18 mm 30 s, 17 bar	<b>RIVA</b> RDES, 4 mm, 18 mm 45 s, 13 bar	–	27.07.07 107,0
7	08.05.07	30,0	<i>A. femoralis</i> , rechts	<b>RIVA</b> BMS, 4 mm, 18 mm 35 s, 12 bar	<b>RCA</b> RDES, 4 mm, 18 mm 35 s, 14 bar	–	30.07.07 87,0

Tab. 1: Behandlungsprotokoll.

#### 4.2.4 Euthanasie, Präparation und Perfusionsfixation

Am Tag der geplanten Sektion blieben die Tiere nüchtern und wurden wie zuvor beschrieben in Narkose gelegt. Die Schweine wurden gewogen und über die Ohrvene je eine Blutprobe entnommen. Nachdem die Tiere auf der Seite liegend ausgebunden wurden, erhielten sie über eine zuvor gelegte Venenverweilkanüle zur Markierung proliferierender Zellen eine Infusion mit frisch angesetzttem 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrDu; 1 g Bromo-Deoxyuridin pro 20 Kilogramm Körpergewicht, gelöst in 200 ml 37°C warmer NaCl-Lösung). BrDu wird von proliferierenden Zellen aufgenommen und während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Dies ermöglicht nach immunhistologischer Färbung mit einem spezifischen Antikörper eine Aussage über die Anzahl proliferierender Zellen im Gewebe. Nach abgeschlossener Infusion wurden die Tiere eine Stunde in Narkose gehalten, um den proliferierenden Zellen Gelegenheit zum Einbau der markierten Base zu geben. Während dieser Zeit wurden die Tiere mittels EKG und der Sauerstoffsättigungsmessung überwacht und eine OP-fähige Narkose über die wiederholte intravenöse Verabreichung von 25 mg/kg Ketamin und 80 mg/kg Xylazin im Abstand von 20 Minuten erreicht. Anschließend erhielten die Tiere 25.000 I.E. Heparin i.v. und wurden 90 Sekunden darauf durch eine schnelle intravenöse Injektion mit T61 (18 – 25 ml) noch in Narkose euthanasiert. Nach der Feststellung des Todes wurde die Rüsselscheibe mit einem Einmalhandschuh überzogen, um ein Ausbluten des heparinisierten Tieres zu verhindern. Die Schweine wurden auf den Sektionstisch gehoben und auf dem Rücken liegend ausgebunden. Mit einem medianen Schnitt vom Manubrium sterni bis 2 cm kaudal des Xiphoids wurden Haut, Unterhaut und die Muskulatur durchtrennt. Die Muskeln und die Haut wurden rippennah von der Medianen in latero-dorsaler Richtung abpräpariert. Das Zwerchfell wurde entlang der Rippe abgetrennt und dabei die Brusthöhle eröffnet. Mit einem Skalpell wurden die Rippen an der Rippen-Knorpelgrenze von kaudal nach kranial aufgeschnitten. Der Herzbeutel wurde vorsichtig und stumpf vom Sternum getrennt und das Sternum entfernt. Anschließend wurde die *V. cava caudalis* abgeklemmt und nach kaudal abgebunden. Die Lunge wurde stumpf vom Zwerchfell gelöst und nach kranial verlagert. Aorta und die *V. azygos dextra* wurden nach kranial abgeklemmt und ligiert. Der *Oesophagus* und die *Trachea* wurden ebenfalls durchtrennt. Kranial des Herzens wurde das Geschlinge stumpf freigelegt. Die *Aa. subclavia sinstra* und *dexter* und die *V. cava cranialis* wurden abgeklemmt. Das jeweilige Schweineherz wurde aus dem Thorax entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült und auf pathologische Veränderungen untersucht. Anschließend wurden die Herzen über eine an der *Aorta ascendens* befestigten Arterienklemme unter einen Abzug über einem 5 Liter Plastikeimer aufgehängt und mit einer zyklischen Perfusionspumpe zunächst mit Ringer-Lösung 10 Minuten gespült. Im nächsten Schritt wurden die Herzen mit der gleichen Pumpe für eine Stunde mit 10% neutral gepuffertem Formalin bei einem

physiologischen Druck von ca. 100 mmHg fixiert. Vor der Präparation wurden die Herzen für eine halbe Stunde gewässert. Die mit einem Stent behandelten Abschnitte des jeweiligen Herzkranzgefäßes sowie ein repräsentativer Abschnitt des Kontrollgefäßes wurden mitsamt der sie umgebenden *Adventitia* vorsichtig herauspräpariert und für mindestens 12 Stunden in 10%igem Formalin immersionsfixiert.



**Abb. 11:** Eröffneter Brustkorb (A), Perfusionsfixation (B).

#### 4.2.5 Einbettung und Schneiden

Am Tag nach der Herzentnahme wurden die entnommenen Proben in Technovit 9100 NEU® eingebettet, ein Kunststoff auf der Basis von Methylmethacrylat. Es wurde speziell zur Einbettung von mineralisierten Geweben in der Lichtmikroskopie entwickelt und ist für histomorphometrische und immunhistologische Auswertungen von Gefäßen geeignet (Yang, Davies et al. 2003; Li und Risnes 2004). Die Proben wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert:

1. 70% Ethanol für 1h
2. 80% Ethanol für 1h
3. 96% Ethanol für 1h
4. 96% Ethanol für 1h
5. 100% Ethanol für 1h
6. 100% Ethanol für 1h
7. 100% Ethanol für 1h

Danach wurden die einzelnen Proben in ein 10 ml Glasröhrchen gegeben und verblieben über Nacht in Xylol. Es folgen die Schritte:

1. Präinfiltration mit Xylol (50 ml) + Basislösung (50 ml) für 1h
2. Präinfiltration mit Basislösung (100 ml) + Härter 1 (0,5 g) für 1h
3. Präinfiltration mit Basislösung (100 ml) + Härter 1 (0,5 g) für 1h
4. Infiltration mit Basislösung (125 ml) + Härter 1 (1 g) + PMMA-Pulver (Polymethylmethacrylat-Pulver) (10 g) bei 4°C

Daraufhin wurden die Proben in die zuvor angesetzten Stammlösungen verbracht:

Stammlösung A:

1. 400 ml Basislösung mit 80 g PMMA-Pulver
2. 4 g Härter 1
3. auf 500 ml mit Basislösung auffüllen

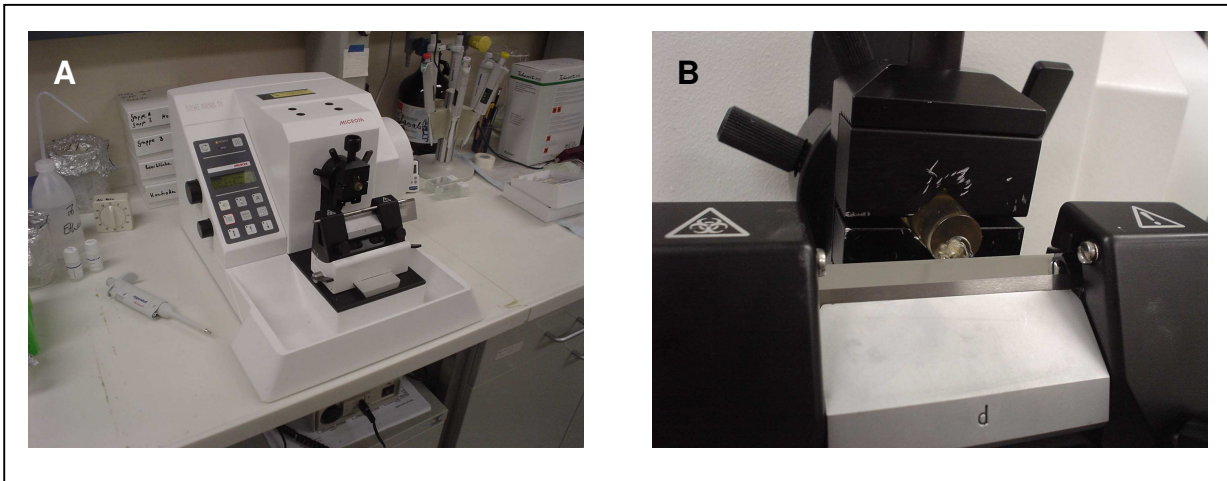
Stammlösung B:

1. 30 ml Basislösung mit 4 ml Härter 2
2. 2 ml Regler
3. auf 50 ml mit Basislösung auffüllen

Die fertig angesetzten Lösungen (Verhältnis 9:1) wurden in beschriftete 5 ml Plastikröhrchen mit der bereits enthaltenen Probe übertragen. Das gefüllte Plastikröhrchen wurde anschließend in einen auf 4°C vorgekühlten Exsikkator (Unterdruckerzeuger) überführt, um Luft aus dem System und den Proben zu entfernen. Dadurch wurden eventuell gebildete Mikrobläschen aus den Röhrchen gelöst. Gleichzeitig wurde die Härtung der vermischten Stammlösungen im Röhrchen eingeleitet. In den darauffolgenden 24 h härteten die Proben bei -7°C auf einer Kälteplatte endgültig aus.

Mit Hilfe eines elektronischen Rotationsmikrotoms (HM 355 S, Fa. MICROM, Walldorf, Deutschland) wurden von jedem Gefäßabschnitt (proximal, medial, distal) mindestens 10 Querschnitte à 7 µm gefertigt. Dabei wurden nach jedem Schnitt für die Histomorphometrie ca. 40 Schnitte für andere Färbungen (Immunhistologie) geschnitten, so dass der Abstand zwischen den Histomorphometrieschnitten jeweils ca. 300 µm betrug.





**Abb. 12:** Rotationsmikrotom HM 355 S (Fa. Microm, Walldorf, Deutschland), Gerät (A) und Vergrößerung (B).

Die Schnitte wurden bei 30%igem Ethanol mit einem Pinsel nach dem Schneiden abgehoben und auf Poly-L-Lysin-Objektträgern (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Auf dem Objektträger wurde 70%iger Ethanol aufgebracht, um eine Streckung des Schnittes zu ermöglichen und damit eine Faltenbildung als Artefakt zu verhindern. Anschließend wurde der Objektträger mit einer gleichformatigen Polyethylenfolie (Fa. Heraeus-Kulzer) abgedeckt, gewalzt und in eine Objektträgerpresse (Fa. Heraeus-Kulzer) gegeben. Die Schnitte wurden in der Objektträgerpresse über Nacht bei 45°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Danach mussten die Schnitte zur weiteren Verarbeitung entplastet werden. Nach der Entfernung der Polyethylenfolien durchliefen die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur ein Bad aus 2-Methoxyethylacetat (2-MEA), kamen für 10 Minuten in Aceton und anschließend in destilliertes Wasser (4 Minuten). Es folgte eine Trocknungsphase und die entsprechende Weiterverarbeitung (Färbung) der Schnitte.

#### 4.2.6 Färbung der Schnitte

##### 4.2.6.1 Färbung für die Histomorphometrie - Elastica van Gieson (EvG)

In der der Pathologie der Charité – Campus Benjamin Franklin wurden die Schnitte mittels einer Elastica van Gieson-Färbung (EvG) angefärbt. Dadurch wurden die elastischen Fasern und damit die *Lamina elastica interna* und *Lamina elastica externa* rotbraun dargestellt. Dies ermöglicht eine Differenzierung der einzelnen Wandschichten (Weyrauch, Smollich et al. 1998).

- 2 min. Xylol

- absteigende Alkohol-Reihe bis 70% (d.h. 1 min 100% Ethanol, 1 min 96% Ethanol, 1 min 80% Ethanol, 1 min 70% Ethanol)

- 10 min Resorcinfuchsin
- 5 min Aqua dest. waschen
- 5 min unter fließendem Leitungswasser bläuen
- 1 min Aqua dest.
- 10 min Domagk (frisch !), 25 ml 1% Thiazinrot-Lsg. auf 250 ml gesättigter Pikrinsäure auffüllen + 2 kleine Spatel Zitronensäure
- 96% Alkohol (zur Entwässerung der Schnitte)
- 100% Alkohol (zur Entwässerung der Schnitte)
- 2 min. Xylol

#### **4.2.6.2 Hämatoxylin und Eosin - Färbung**

- 2 min. Xylol
- 1 min. Xylol
- 1 min. 100% Ethanol
- 1 min. 96% Ethanol
- 1 min. 80% Ethanol
- 1 min. 70% Ethanol
- 1 min. Aqua dest.
- 2 min. Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III (Fa. Merck)
- 1 min. in Leitungswasser bläuen
- 1 min. 80% Ethanol
- 1 min. 96% Ethanol
- 1 min. Eosin
- 1 min. 96% Ethanol
- 1 min. 100% Ethanol
- 3 min. Xylol
- Eindecken

#### **4.2.6.3 Immunhistologische Färbungen**

##### **4.2.6.3.1 5-Bromo-2'-Deoxyuridine für proliferierende Zellen**

- Entplasten (Protokoll nach Technovit), Trocknen (RT) der Schnitte auf dem Objektträger
- Beschriftung der Objektträger
- Umrandung der Schnitte mit Fettstift (Vector Laboratories)
- Einlegen der Schnitte in feuchte Kammer
- Demaskierung: Aufspaltung des „Harznetzes“ mittels Proteinase K
- Vorbereitung Proteinase K, recombinant (Roche Diagnostics GmbH)
- Aufpipettieren auf Objektträger (20 µl / ml / Schnitt) für 2 min

- Spülung der Objektträger in Wasser
- Wässern der Objektträger in TRIS-Puffer für 1 min
- Objektträger aus TRIS-Puffer nehmen und abschütteln
- BrDu-Antikörper (Dako) auf REAL Antibody Diluent (Dako) geben (1:50)
- Auftragen des verdünnten BrDu-Antikörpers auf Schnitt (50 µl)
- 1 h inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 2x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Biotin (Dako) in einer Verdünnung von 1:400 auf Schnitt geben (50 µl)
- 30 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 1x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Streptavidin (Dako) in einer Verdünnung von 1:200 auf Schnitt geben (50 µl)
- 30 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 1x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Chromogen (Dako) auf Objektträger geben (50 µl)
- 5 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 2x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Hämatoxylin nach Gill III für Hintergrundfärbung (lila) auf Objektträger geben
- 1 min inkubieren (RT)
- Bläuen
- 5 min inkubieren
- Eindecken: Glycingelantine (Kaisers) erwärmen (wird flüssig) in Mikrowelle (10 s, 800 W)
- Glycingelantine auf Objektträger pipettieren (100 µl)
- Deckgläschen auf Objektträger geben
- Trocknen lassen bei RT

#### **4.2.6.3.2 Ki-67 für proliferierende Zellen**

- Entplasten (Protokoll nach Technovit), Trocknen (RT) der Schnitte auf dem Objektträger
- Beschriftung der Objektträger
- Umrandung der Schnitte mit Fettstift (Vector Laboratories)
- Einlegen der Schnitte in feuchte Kammer
- Demaskierung: Aufspaltung des „Harznetzes“
- 20 min in Citratpuffer bei pH 6 in Mikrowelle kochen
- Spülung der Objektträger in Wasser
- Wässern der Objektträger in TRIS-Puffer für 1 min
- Objektträger aus TRIS-Puffer nehmen und abschütteln
- Ki-67 (Dako) auf REAL Antibody Diluent (Dako) geben (1:50)
- Auftragen des verdünnten Ki-67 auf Schnitt (50 µl)
- 1 h inkubieren (RT)

- Waschen der Objektträger 2x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Biotin (Dako) in einer Verdünnung von 1:400 auf Schnitt geben (50 µl)
- 30 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 1x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Streptavidin (Dako) in einer Verdünnung von 1:200 auf Schnitt geben (50 µl)
- 30 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 1x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Chromogen (Dako) auf Objektträger geben (50 µl)
- 5 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 2x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Hämatoxylin nach Gill III für Hintergrundfärbung (lila) auf Objektträger geben
- 1 min inkubieren (RT)
- Bläuen
- 5 min inkubieren
- Eindecken: Glycingelantine (Kaisers) erwärmen (wird flüssig) in Mikrowelle (10 s, 800 W)
- Glycingelantine auf Objektträger pipettieren (100 µl)
- Deckgläschen auf Objektträger geben
- Trocknen lassen bei RT

#### **4.2.6.3.3 Endothelfärbung**

- Entplasten (Protokoll nach Technovit), Trocknen (RT) der Schnitte auf dem Objektträger
- Beschriftung der Objektträger
- Umrandung der Schnitte mit Fettstift (Vector Laboratories)
- Einlegen der Objektträger in feuchte Kammer
- Demaskierung: in kochfester Küvette
- 2 min in Citratpuffer bei pH 6 in Mikrowelle kochen
- Spülung der Objektträger in Wasser
- Wässern der Objektträger in TRIS-Puffer für 1 min
- Objektträger aus TRIS-Puffer nehmen und abschütteln
- CD 31 (Pecam, Fa. Santa Cruz) auf Antibody Diluent (Dako) geben (1:150)
- Auftragen des verdünnten CD 31-Antikörpers (1:150) auf Schnitt (50 µl)
- 1 h inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 2x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Biotin (Dako) in einer Verdünnung von 1:400 auf Schnitt geben (50 µl)
- 30 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 1x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Streptavidin (Dako) in einer Verdünnung von 1:200 auf Schnitt geben (50 µl)
- 30 min inkubieren (RT)

- Waschen der Objektträger 1x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Chromogen (Dako) auf Objektträger geben (50 µl)
- 5 min inkubieren (RT)
- Waschen der Objektträger 2x in Aqua dest. und 1x in TRIS Puffer
- Hämatoxylin nach Gill III für Hintergrundfärbung (lila) auf Objektträger geben
- 1 min inkubieren (RT)
- Bläuen
- 5 min inkubieren
- Eindecken: Glyceringelantine (Kaisers) erwärmen (wird flüssig) in Mikrowelle (10 s, 800 W)
- Glyceringelantine auf Objektträger pipettieren (100 µl)
- Deckgläschen auf Objektträger geben
- Trocknen lassen bei RT

## 4.2.7 Digitale Bildanalyse

### 4.2.7.1 Histomorphometrie

Zur Bestimmung der einzelnen Flächen wurden insgesamt 270 Elastica van Gieson gefärbte (EvG) Schnitte der Koronargefäße ohne Kenntnis des Gewebeansprungs analysiert. Die drei Koronargefäße (RCA, RIVA, RCX) der sechs Schweine wurden in je drei Abschnitte (proximal, medial, distal) unterteilt. Von jedem Abschnitt wurden drei repräsentative Querschnitte untersucht. Anschließend wurden alle daraus hervorgehenden Daten zu einem Mittelwert zusammengefasst. Alle Schnitte wurden mit einem Mikroskop (Olympus System Mikroskop BX51, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) betrachtet, das Bild mit einer Kamera (Olympus C-4040Z Digital Zoom Camera, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) gespeichert, auf einen Computer übertragen und digitalisiert. Mit Hilfe einer Software (DP-Soft Version 3.2, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde das zweidimensionale Objekt auf dem Monitor fixiert und vollständig manuell erfasst. Hierfür wurde die zu vermessende Fläche umfahren, unter Einbeziehung der Vergrößerungen berechnet und in mm<sup>2</sup> ausgedrückt (siehe Abb. 13).

Zur Bestimmung der Lumenfläche diente die Lumengrenze des Gefäßes. Sie wurde als Residuallumenfläche (RL-Fläche) bezeichnet. Neben der Flächenangabe durch die Software (DP-Soft Version 3.2), wurde der Umfang der Lumengrenze in mm ausgedrückt und dieser für die Auswertung in Punkt 4.2.7.4.3 verwendet.

Die Fläche innerhalb der *Lamina elastica interna* (LEI) entspricht dem Gefäßlumen unmittelbar nach der Stentimplantation (LEI-Fläche). Falls die LEI durch die Stentstruts zerstört war und die Gefäßwandschichtung an dieser Stelle nicht mehr erkennbar war, wurden ersatzweise die direkten Verbindungslinien zwischen den Struts als Grenzlinie angenommen.

Zur Bestimmung der LEE-Fläche wurde die Fläche innerhalb der *Lamina elastica externa* (LEE) gemessen.

Zur Bestimmung der Gesamtarterienfläche wurde die Grenze zwischen dichter und lockerer *Adventitia* bestimmt. Die innerhalb dieser Grenzlinie befindliche Fläche wurde gemessen.

Die Adventitiafläche wurde rechnerisch ermittelt. Die Gesamtarterienfläche abzüglich der LEE-Fläche ergab die Adventitiafläche.

Die Neointimafläche (NI-Fläche) wurde durch den Abzug der Residuallumenfläche (RL-Fläche) von der LEI-Fläche errechnet:

$$\text{NI-Fläche [mm}^2\text{]} = \text{LEI-Fläche} - \text{RL-Fläche.}$$

Die Media-Fläche wurde ebenfalls rechnerisch ermittelt. Zur Berechnung dieses Parameters wurde die LEI-Fläche von der LEE-Fläche subtrahiert:

$$\text{Media-Fläche [mm}^2\text{]} = \text{LEE-Fläche} - \text{LEI-Fläche.}$$

Die flächenbezogene Stenoserate (SF in %) ist ein Maß für die Veränderung der Gefäßlumenfläche des Gefäßes vom Zeitpunkt der Implantation bis zum Versuchsende (drei Monate).

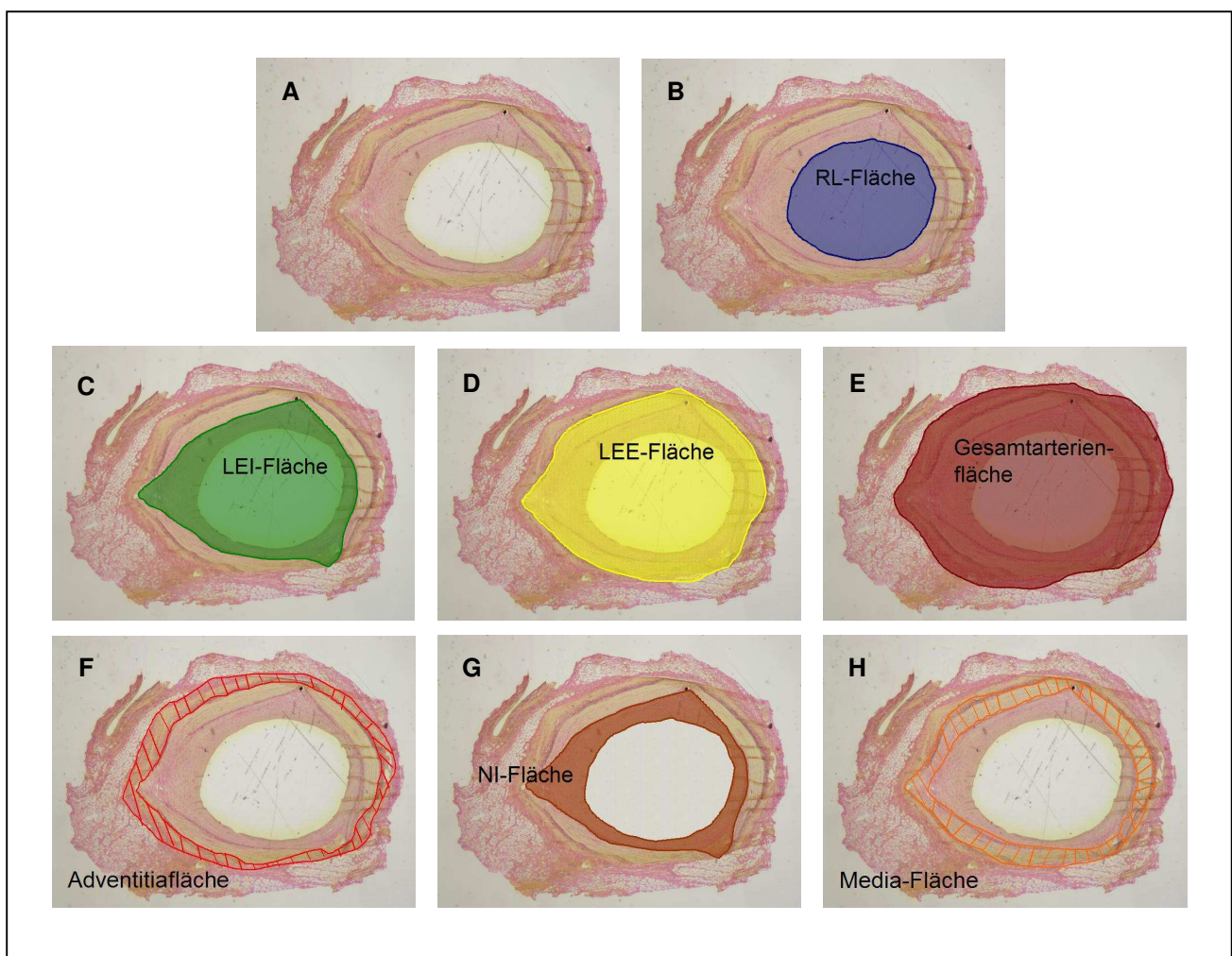
Die SF wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Stenoserate [\%]} = 100 - (\text{RL-Fläche}/\text{LEI-Fläche} \times 100).$$

Der Lumenverlust (Lumen Loss) wurde über den Gefäßdurchmesser berechnet. Die Diameter wurden als Quotient von Umfang (Ursprungsumfang und Residualumfang) und der Zahl  $\pi$  berechnet. Er drückt den Verlust bzw. die Zunahme der Lumenfläche in Prozent aus:

$$\text{Lumen Loss [\%]} = 100 - (\text{RL-Fläche}/\text{LEE-Fläche} \times 100).$$

Die aus den Messungen resultierenden Daten wurden in eine Excel-Tabelle (Version 9.0.2812) exportiert.



**Abb. 13:** Histomorphometrie. Flächenmessung und Bestimmung an routinemäßig Elastica van Gieson-gefärbten Querschnitten. Nativ (A), Residuallumenfläche (B), LEI-Fläche (C), LEE-Fläche (D), Gesamtarterienfläche (E), Adventitiafläche (F), NI-Fläche (G), Media-Fläche (H). 20 x Vergrößerung.

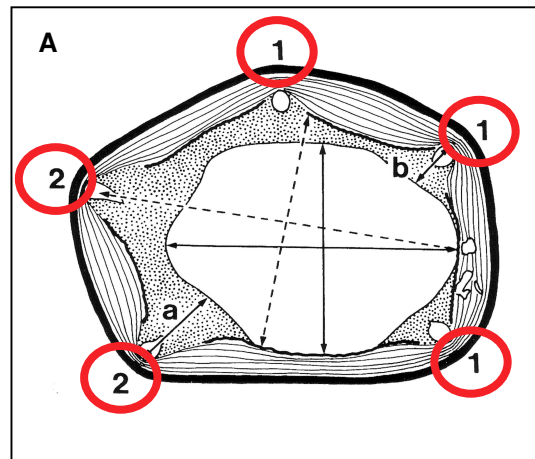
#### 4.2.7.2 Gefäßwandverletzung (Injury Score)

Um am histologischen Präparat den Verletzungsgrad der Gefäßwand im Bereich jeder einzelnen Metallstrebe (Strut) des Stents zu beurteilen, wurden drei Schnittebenen (proximal, medial, distal) untersucht. Hierzu wurde von jedem Gefäß bzw. jedem Gefäßsegment (ohne Kenntnis von dessen Ursprung) der Elastica van Gieson-gefärbte Querschnitt ausgesucht, der die schwersten Verletzungen der elastischen Laminae und die größte Neointimabildung aufwies (sogenannter „Masterquerschnitt“).

Jeder durch die Struts hervorgerufenen Gefäßwandverletzung wurde ein numerischer Wert als Verletzungsgrad (Injury Score) von 0 bis 3 zugeordnet (Schwartz, Huber et al. 1992). Für jeden Grad gilt eine histologische Definition, die aus Tabelle 2 zu entnehmen ist.

Die Verletzungsscores der Struts einer Schnittebene wurden addiert und durch die Anzahl der bewerteten Struts geteilt. Der mittlere Verletzungsindex des ganzen Stents errechnete sich als arithmetischer Mittelwert der mittleren Verletzungsindizes der proximalen, medialen und distalen Schnittebene.

Grad	histologische Definition
0	LEI intakt, Media nicht komprimiert
1	LEI intakt, Media komprimiert, nicht lazeriert
2	LEI lazeriert, Media lazeriert, Adventitia intakt
3	Adventitia lazeriert, kann Struts beinhalten



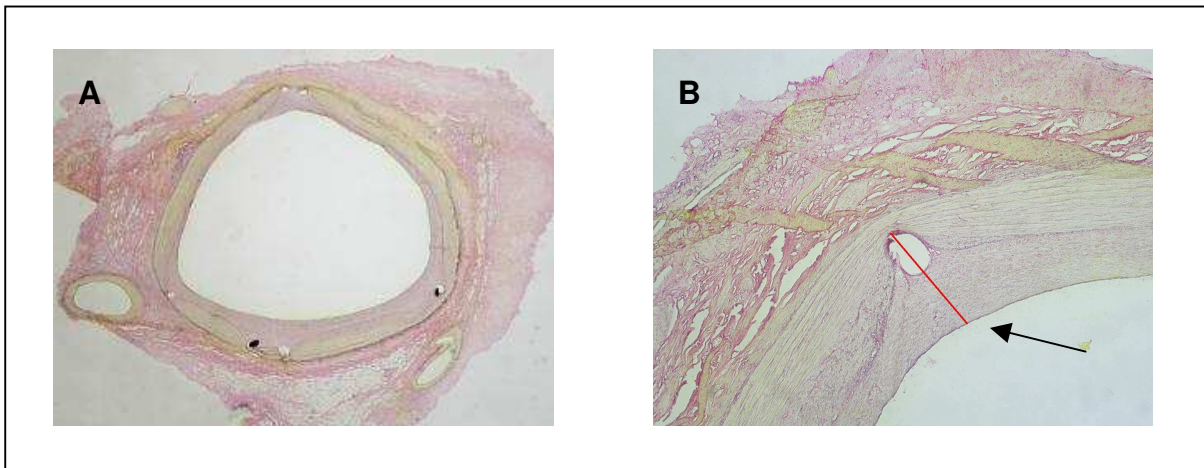
**Tab. 2:** Injury Score (0-3) nach Schwartz, Huber et al. (1992). **Abb. 14:** A: Schematische Darstellung des Injury Score und neointimale Reaktion nach PTCA (Schwartz, Huber et. al 1992).



#### 4.2.7.3 Neointimadicke (NI-Dicke) über den Stentstruts / Lineare Regression

Um am histologischen Präparat die Neointimadicke über den Stentstruts zu messen, wurden drei Schnittebenen (proximal, medial, distal) untersucht. Hierzu wurde der für die Messung des Injury Score verwendete Masterquerschnitt verwendet.

Die Neointimadicke über den Struts wurde vom Lumen abgewandten Rand des jeweiligen Stentstrut zur Lumenmitte hin senkrecht gemessen und durch die jeweilige Anzahl der Struts geteilt (Schwartz, Huber et al. 1992).



**Abb. 15:** Schwein 7 RCA (RDES), 20 x Vergrößerung (A) und Schwein 7 RCA (RDES), 100 x Vergrößerung (B), EvG gefärbter Schnitt. Pfeil deutet auf NI-Proliferation über einem Stentstrut.

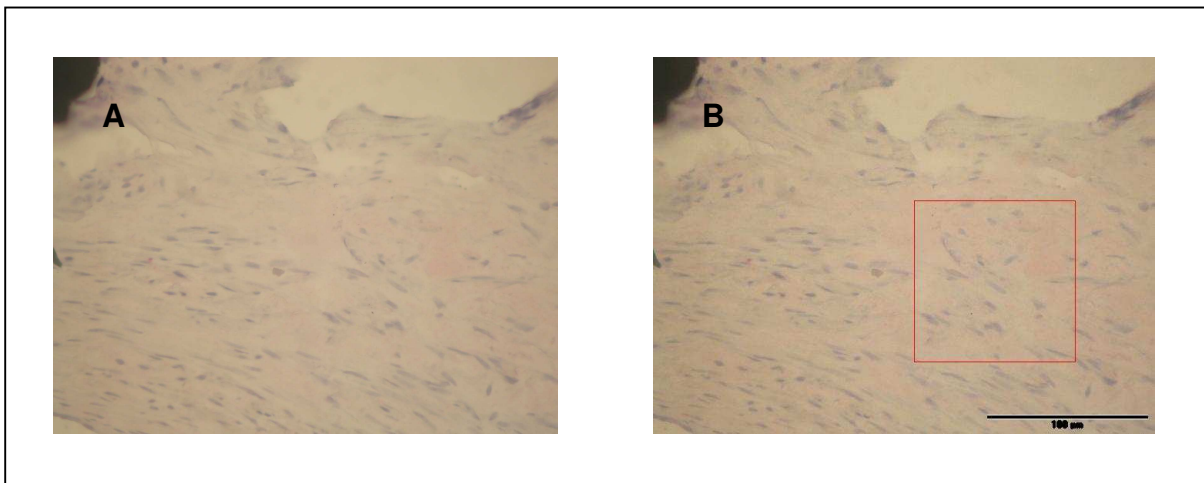
Zur Darstellung der Kopplung dieser beiden Parameter (Injury Score und NI-Dicke über den Stentstruts) wurde für die Auswertung eine Lineare Regression gewählt (Schwartz, Huber et al. 1992). Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist das Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten (R) und zeigt an, in welchem Maß die Varianz einer Variablen durch die Varianz einer anderen Variablen bestimmt wird.  $R^2$  gibt den Zusammenhang von untersuchten Datenreihen (Variablen) an. Die Werte für  $R^2$  können zwischen 0 (kein Zusammenhang) und 1 (starker Zusammenhang) liegen.

#### 4.2.7.4 Messungen an HE gefärbten / immunhistologisch gefärbten Schnitten

##### 4.2.7.4.1 Gesamtzellzahlbestimmung

Um am histologischen Präparat die Gesamtzellzahl zu messen, wurden drei Schnittebenen (proximal, medial, distal) untersucht. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte an Hämatoxylin und Eosin (HE; Hintergrund) gefärbten Masterquerschnitten manuell. Der Masterquerschnitt war der unter den qualitativ besten, zufällig gewählte Schnitt. Dazu wurde für jeden Gefäßwandabschnitt (*Neointima*, *Media*, *Adventitia*) ein repräsentativer vergrößerter Abschnitt (400 x Vergrößerung) auf dem Monitor eingestellt und die Zellzahl

innerhalb eines 0,1 mm x 0,1 mm großen Messrasters (DP-Soft 3.2) ausgezählt. Diese Zellzahl wurde auf die zuvor erhobenen Flächen von *Neointima*, *Media* und *Adventitia* hochgerechnet, um die Gesamtzellzahl für diese Flächen zu erhalten. Danach wurden die positiv gefärbten Zellen in *Neointima*, *Media* und *Adventitia* manuell ausgezählt und als prozentuales Ergebnis (bezogen auf die Gesamtzellzahl) ausgewertet. Wann immer es problematisch war, den Grenzverlauf von *Neointima*, *Media* und *Adventitia* zu bestimmen, wurden die entsprechenden Elastica van Gieson gefärbten Querschnitte zur Überprüfung herangezogen.



**Abb. 16:** Schwein 5 RCA (RDES), 400 x Vergrößerung, Neointima (A) und Neointima mit Messraster (B), Hämatoxylin und Eosin gefärbter Schnitt.

#### 4.2.7.4.2 Proliferierende Zellen

##### 4.2.7.4.2.1 Messungen an 5-Bromo-2'-Deoxyuridine gefärbten Zellen

5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrDu) gehört zu den exogenen Proliferationsmarkern. Als Thymidin-Analog wird BrDu kompetitiv während der S-Phase in die DNA integriert. Da mit Hilfe der immunhistologischen Verfahren BrDu bei erhaltener Gewebemorphologie nachgewiesen werden kann, hat sich diese Methode in vielen Bereichen gegenüber den zytochemischen Nachweismethoden (BrDu-Hoechst-Quenching Technik, Flow-Zytometrie) durchgesetzt. Gratzner entwickelte sowohl den ersten polyklonalen (1975) als auch später den ersten monoklonalen (1982) Antikörper gegenüber BrDu (Gratzner 1982). Proliferierende Zellen wurden mittels 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-Färbung angefärbt und Zellen in *Neointima*, *Media* bzw. *Adventitia* der in 4.2.7.4.1 gewählten Masterquerschnitte manuell gezählt (Johnson, Schofield et al. 2004). Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und anschließend ein Proliferationsindex (Prozent der proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl) berechnet.

#### 4.2.7.4.2 Messungen an Ki-67 gefärbten Zellen

Ki-67, ein proliferationsassoziiertes Antigen ist in Zellen zu finden, die sich in einer Phase der Zellteilung befinden. Es wird im Zellkern und im Nucleolus exprimiert. Das Protein wird während aller aktiver Phasen des Zellzyklus exprimiert, das heißt Ki-67 ist während der G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase sowie während der Mitose vorhanden, aber immer abwesend in der Ruhephase (G<sub>0</sub>) (Scholzen und Gerdes 2000). Ki-67 gehört zu den endogenen Proliferationsmarkern. Die proliferierende Zellen wurden mittels Ki-67-Färbung angefärbt (siehe 4.2.6.3.2 Ki-67 für proliferierende Zellen) und in der *Neointima*, *Media* bzw. *Adventitia* der in 4.2.7.4.1 gewählten Masterquerschnitte manuell gezählt (Farb, Weber et al. 2002). Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und anschließend ein Proliferationsindex (Prozent der proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl) berechnet.

#### 4.2.7.4.3 Messungen an gefärbten Endothelzellen (CD31-Antikörper)

Semiquantitative histopathologische Auswertungen der Endothelialisierung wurden bereits an Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Präparaten durchgeführt (Schwartz, Edelman et al. 2002). Um die Bereiche intakter Endothelialisierung des jeweiligen Masterquerschnitts zu messen, wurde der Masterquerschnitt in vier Quadranten unterteilt. Der Masterquerschnitt war der unter den qualitativ besten, zufällig gewählte Schnitt (proximal, medial, distal). Mit Hilfe einer Software (DP-Soft Version 3.2) wurde der Bereich vollständiger Endothelialisierung des jeweiligen Quadranten in einer 100-fachen Vergrößerung manuell umfahren und in mm ausgedrückt. Die Werte der Quadranten wurden in eine Excel-Tabelle übertragen, addiert und anschließend ins Verhältnis zum totalen luminalen Umfang gesetzt (Berg, Aragon et al. 2007).



**Abb. 17:** Masterquerschnitt, 20 x Vergrößerung (A). Ausschnitt aus Bild A, Erfassung des Bereiches vollständiger Endothelialisierung, 100 x Vergrößerung (B). Grüne und rote Linie markieren den Bereich vollständigen Endothels.

#### **4.2.8 Statistik**

Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Die Daten wurden zunächst in SPSS (Version 11.5) übertragen. Zuerst erfolgte mit Hilfe des "Kolmogorov-Smirnov-Test" die Überprüfung auf Normalverteilung.

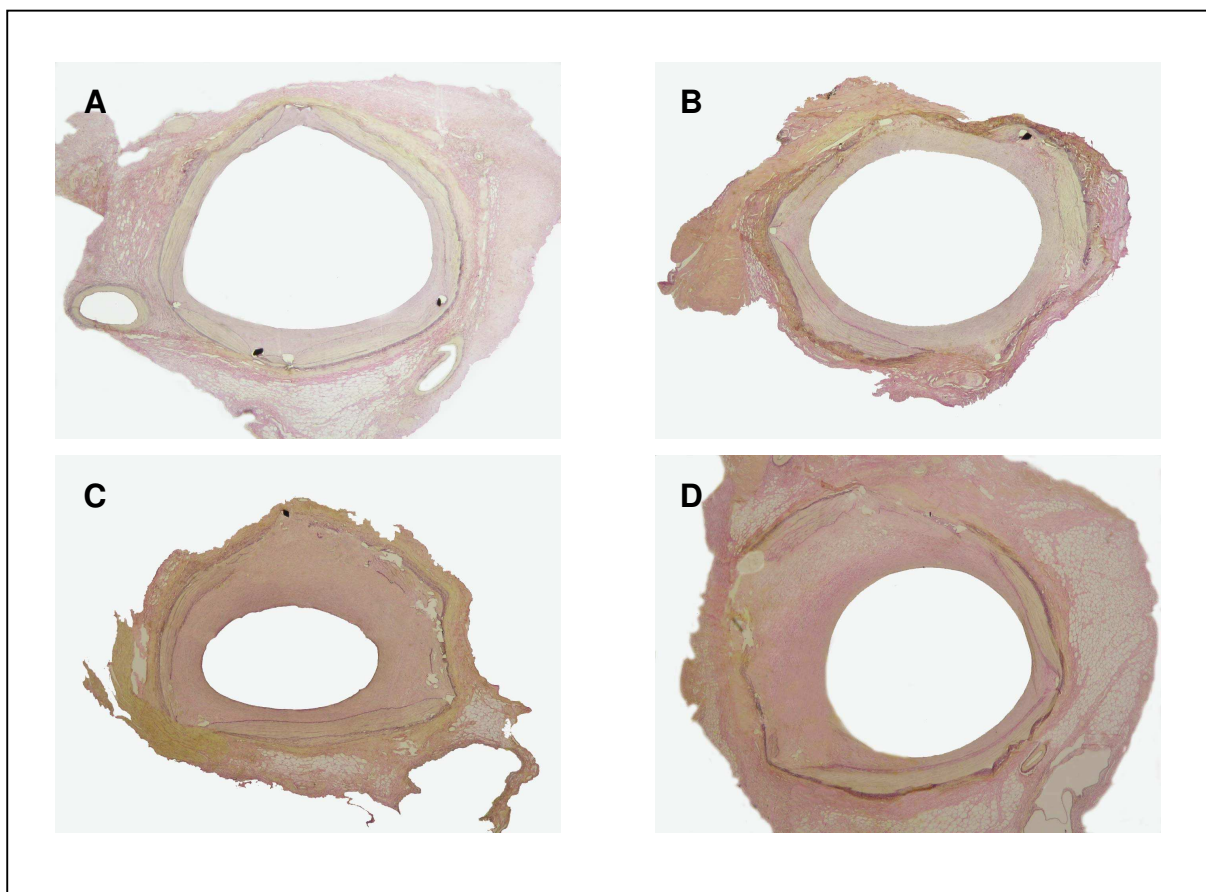
Zur Signifikanzberechnung bei Normalverteilung wurde der "paired Student-t-Test" für gepaarte Stichproben angewandt. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde der "Wilcoxon-Smith-Test" für nicht-parametrisch verbundene Stichproben angewandt. Ein p-Wert von kleiner 0,05 ( $p < 0,05$ ) wurde als statistisch signifikant angenommen.

Für die Auswertung der Gefäßwandverletzung (Injury Score) wurden die Verletzungsscores der Struts einer Schnittebene addiert und durch die Anzahl der bewerteten Struts geteilt. Der mittlere Verletzungsindex des ganzen Stents errechnete sich als arithmetischer Mittelwert der mittleren Verletzungsindizes der proximalen, medialen und distalen Schnittebene. Zur Darstellung der Kopplung der Parameter Injury Score und NI-Dicke über den Stentstruts wurde für die Auswertung eine Lineare Regression gewählt.

## 5 Ergebnisse

Alle Stents konnten ohne Schwierigkeiten platziert werden (fünf in RCA, drei in RCX, vier in RIVA). Bei einem Schwein war die perkutane Punktion der *A. femoralis* nicht möglich. Als Grund hierfür wurde ein abnormer Verlauf der *A. femoralis* angenommen. Die koronare Intervention von sechs Tieren verlief erfolgreich in zwölf Koronararterien. Abbildung 18 zeigt vier repräsentative Aufnahmen von Elastica van Gieson gefärbten Querschnitten drei Monate nach der Intervention.

Bezüglich der Parameter Residuallumenfläche, LEI-Fläche, Media-Fläche, LEE-Fläche und Injury Score gab es keine statistisch-signifikanten Differenzen zwischen den sechs RDES und sechs BMS Stents (neun Querschnitte pro Stent wurden untersucht).



**Abb. 18:** Repräsentative Querschnitte von gestenteten Koronargefäßen der Schweine drei Monate nach der Intervention. Schwein 2 RCA (RDES; A) und Schwein 4 RIVA (RDES; B). Schwein 5 RIVA (BMS; C) und Schwein Schwein 6 RCA (BMS; D). EvG-Färbung, 20 x Vergrößerung.

## 5.1 Histomorphometrie

Zur Bestimmung der morphometrischen Parameter wurden neun Messungen pro Stent (drei proximal, drei medial und drei distal) einer jeden Koronararterie durchgeführt, die in den folgenden Darstellungen als Mittelwert aus den drei Segmenten (proximal, medial und distal) und den jeweils sechs Stents der sechs untersuchten Schweine zusammengefasst wurden.

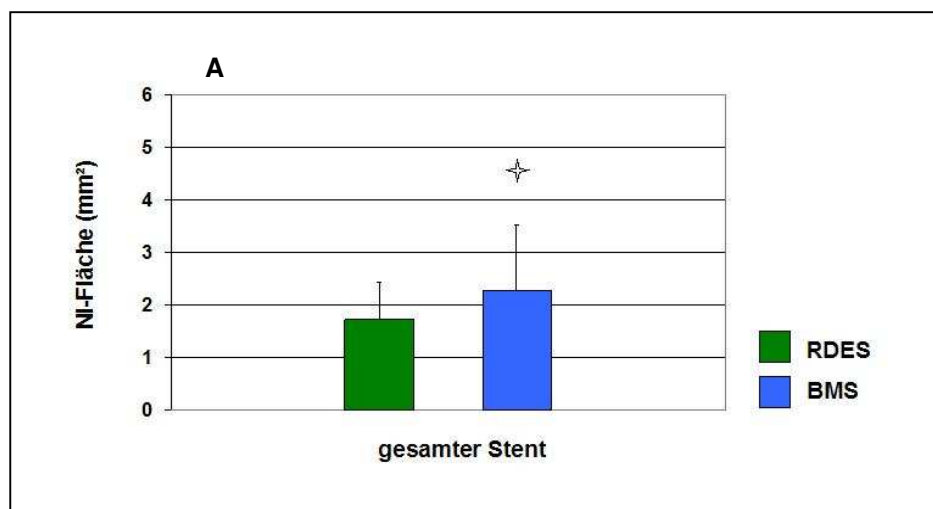
### 5.1.1 Neointimafläche (NI-Fläche)

Die mittlere Neointimafläche ist ein allgemein anerkannter Parameter zur Beschreibung der Neointimaproliferation (siehe Abb. 13-G) mit hohem Aussagewert über eine durch die Stentstruts induzierte Gefäßwandverletzung mit nachfolgender Neointimaproliferation.

Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Neointimafläche (NI-Fläche) wurde durch den Abzug der Residuallumenfläche (RL-Fläche) von der LEI-Fläche errechnet: NI-Fläche [mm<sup>2</sup>] = LEI-Fläche – RL-Fläche.

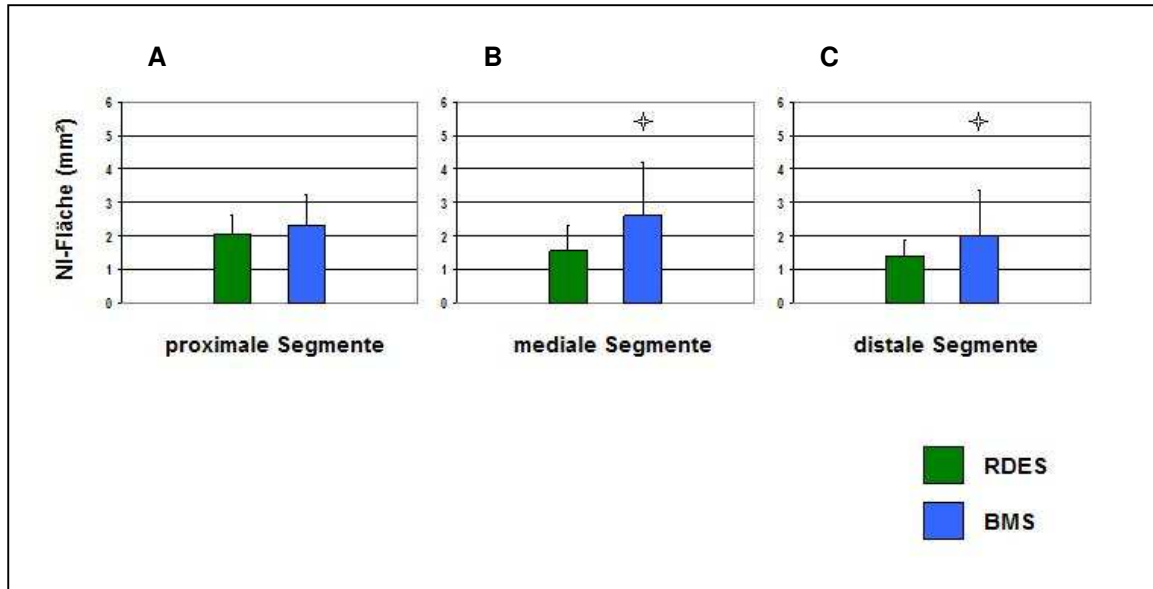
Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent: 1,72 mm<sup>2</sup> ± 0,70 vs. 2,28 mm<sup>2</sup> ± 1,24 (p < 0,05).



**Abb. 19:** A: Neointimafläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Die Neointimafläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS signifikant erniedrigt.

Es wurden insgesamt drei Schnittebenen pro Stentbereich (für alle sechs Schweine zusammengefasst) ausgewertet, um mögliche Abweichungen im ganzen Stentbereich erfassen zu können. Das Einbeziehen der proximalen sowie der distalen Schnittebene soll zeigen, ob die Stententfaltung gleichmäßig erfolgt und konstant bleibt, denn man geht davon aus, dass an den Stentenden die elastischen Rückstellkräfte der Gefäßwand auf die Strutsenden höher sind als in der Stentmitte, wo sie auf die größere Stentoberfläche verteilt sind.

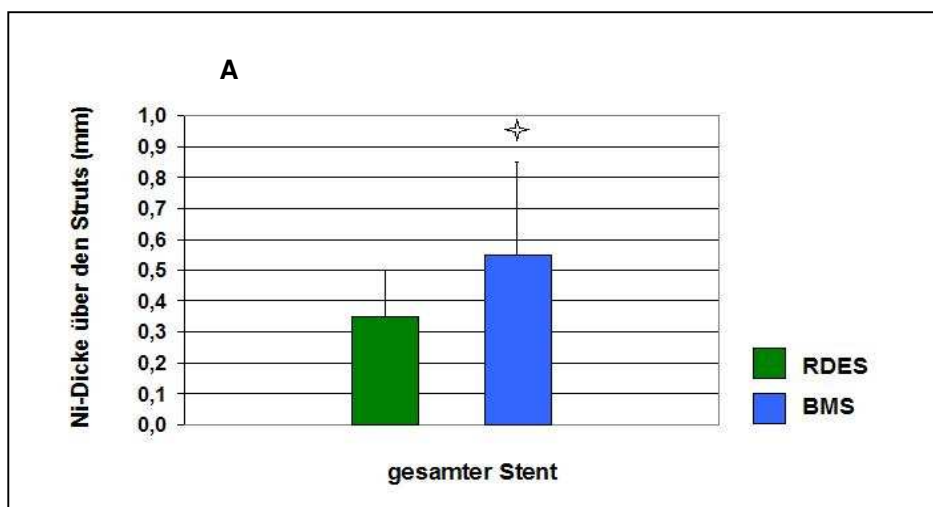
Die Auswertung der einzelnen Segmente aller Schweine ergab folgende Werte: proximal  $2,06 \text{ mm}^2 \pm 0,64$  vs.  $2,27 \text{ mm}^2 \pm 0,91$  ( $p = \text{nicht signifikant; n.s.}$ ); medial  $1,61 \text{ mm}^2 \pm 0,77$  vs.  $2,56 \text{ mm}^2 \pm 1,49$  ( $p < 0,05$ ); distal  $1,48 \text{ mm}^2 \pm 0,68$  vs.  $2,01 \text{ mm}^2 \pm 1,31$  ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 20:** A, B, C: Neointimafläche der proximalen, medialen und distalen Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Bei den RDES der medialen und distalen Abschnitte war die Neointimafläche im Vergleich zu den BMS signifikant erniedrigt.

### 5.1.2 Neointimadicke (NI-Dicke) über den Stentstruts

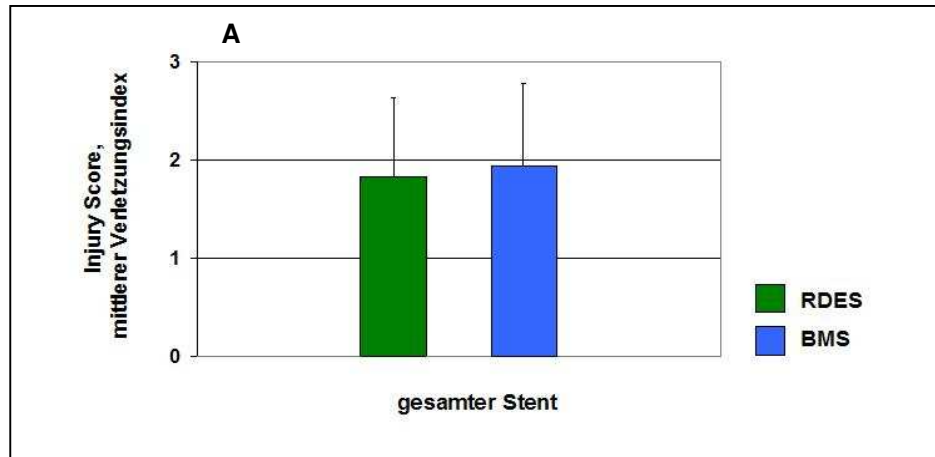
Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $0,35 \text{ mm} \pm 0,15$  vs.  $0,55 \text{ mm} \pm 0,30$  ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 21:** A: NI-Dicke über den Struts der RDES (grün) und BMS (blau). Die NI-Dicke war bei den RDES im Vergleich zu den BMS signifikant erniedrigt.

### 5.1.3 Gefäßwandverletzung (Injury Score), mittlerer Verletzungsindex

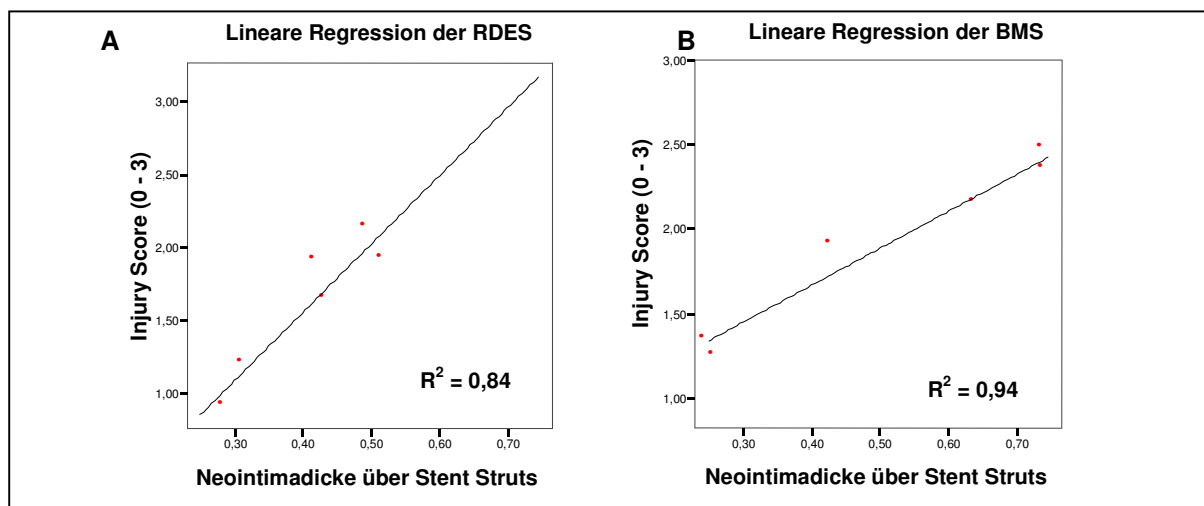
Im Experiment ist eine Gefäßwandverletzung zweckmäßig, um eine den klinischen Umständen ähnliche Situation simulieren zu können und die Stenoseentwicklung hervorzurufen. Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $1,83 \pm 0,80$  vs.  $1,93 \pm 0,84$  ( $p = \text{n.s.}$ ).



**Abb. 22:** A: Mittlerer Verletzungsindex des Injury Score der RDES (grün) und BMS (blau). Der Injury Score war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erniedrigt. Eine stärkere Verletzung der Gefäßwand an den Stentenden im Vergleich zur Stentmitte konnte nicht festgestellt werden.

### 5.1.4 Lineare Regression

Nach Auswertung des Injury Scores und der jeweiligen Neointimadicke über den einzelnen Stentstruts an den jeweiligen Masterquerschnitten wurde eine Lineare Regression durchgeführt. Die Korrelation zwischen Injury Score und Neointimadicke über den Stentstruts beträgt für den RDES 0,84, was auf einen starken Zusammenhang hinweist. Bei den BMS beträgt  $R^2 = 0,94$  und impliziert damit eine noch engere Korrelation.



**Abb. 23:** Lineare Regression der Injury Score und Neointimadicke über den Struts für RDES (A) und BMS (B).



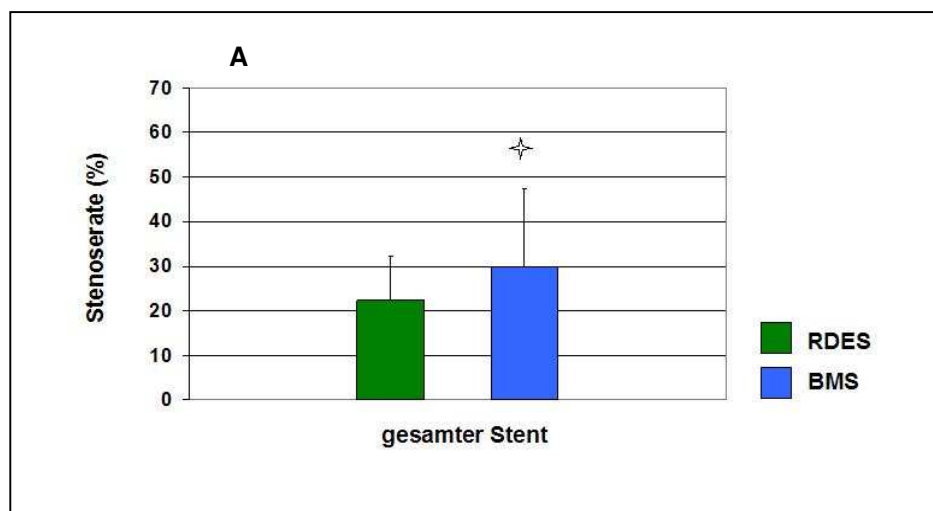
### 5.1.5 Stenoserate

Die flächenbezogene Stenoserate (%) ist ein Maß für die Veränderung der Gefäßlumenfläche des Gefäßes vom Zeitpunkt der Implantation bis zum Versuchsende (3 Monate). Die SF wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Stenoserate [\%]} = 100 - (\text{RL-Fläche/LEI-Fläche} \times 100).$$

Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent: 22,40% ± 9,88 vs. 29,74% ± 17,72 ( $p < 0,05$ ).

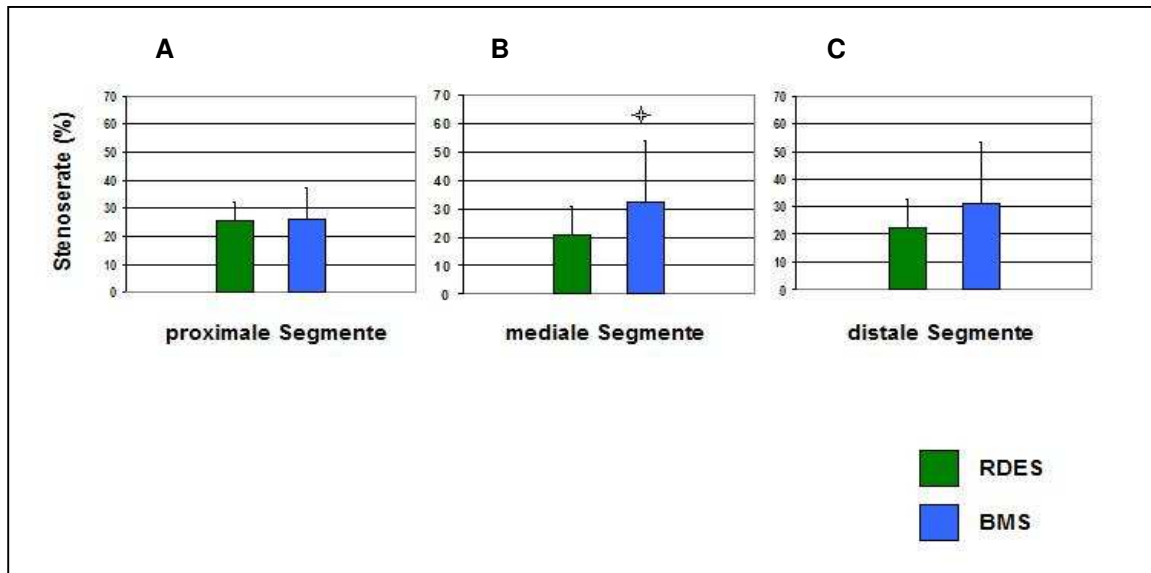


**Abb. 24:** A: Stenoserate aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau).

Die Stenoserate war bei den RDES im Vergleich zu den BMS signifikant erniedrigt.

Die Stenoserate ist ein von der nativen Gefäßgröße abhängiger Parameter. Sie beschreibt die prozentuale Verkleinerung des Gefäßdurchmesserfläche zur Fläche am Implantationstag.

Die Auswertung der einzelnen Segmente aller Schweine ergab folgende Werte: für die proximalen Segmente  $24,56\% \pm 7,95$  vs.  $26,06\% \pm 11,53$  ( $p = \text{n.s.}$ ); für die medialen Segmente  $20,63\% \pm 10,94$  vs.  $32,19\% \pm 20,89$  ( $p < 0,05$ ); für die distalen Segmente  $21,99\% \pm 10,87$  vs.  $30,97\% \pm 20,74$  ( $p = \text{n.s.}$ ).



**Abb. 25:** A, B, C: Stenoserate der proximalen, medialen und distalen Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Bei den RDES der medialen Abschnitte war die Stenoserate im Vergleich zu den BMS signifikant erniedrigt.

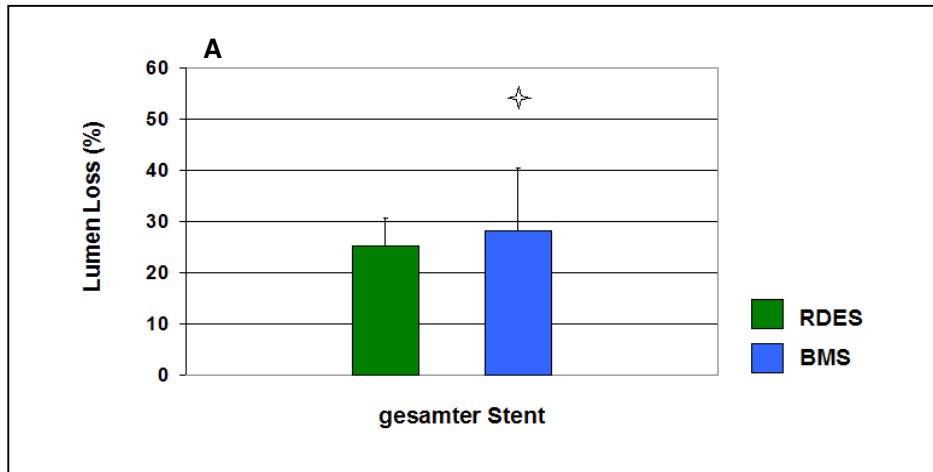
### 5.1.6 Lumenverlust (Lumen Loss)

Der Lumenverlust (Lumen Loss) wurde über den Gefäßdurchmesser berechnet. Die Diameter wurden als Quotient von Umfang (Ursprungsumfang und Residualumfang) und der Zahl  $\pi$  berechnet. Er drückt den Verlust bzw. die Zunahme der Lumenfläche in Prozent aus:  

$$\text{Lumen Loss [\%]} = 100 - (\text{RL-Fläche} / \text{LEE-Fläche} \times 100).$$

Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $24,98\% \pm 8,56$  vs.  $28,30\% \pm 13,97$  ( $p < 0,05$ ).



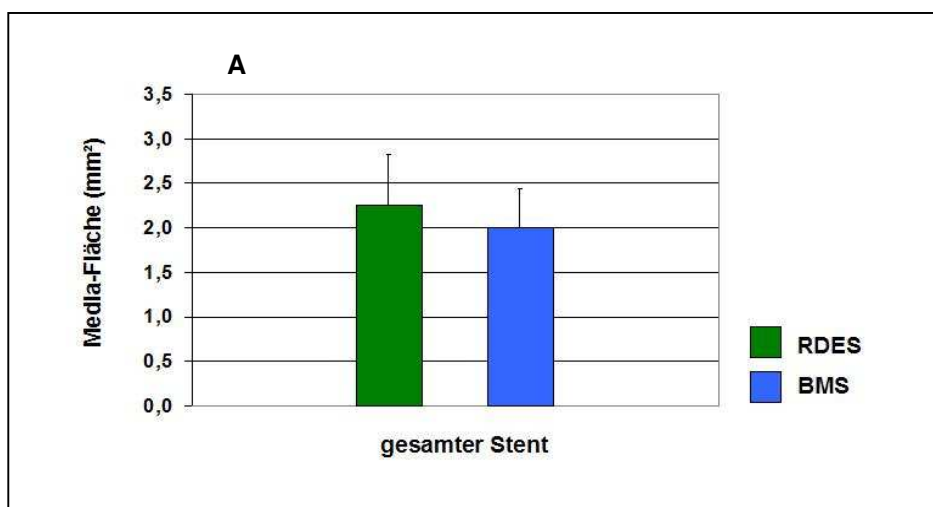
**Abb. 26:** A: Lumenverlust aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Der Lumenverlust war bei den RDES im Vergleich zu den BMS signifikant erniedrigt.

### 5.1.7 Media-Fläche

Die Media-Fläche wurde ebenfalls rechnerisch ermittelt. Zur Berechnung dieses Parameters wurde die LEI-Fläche von der LEE-Fläche subtrahiert:

Media-Fläche [mm<sup>2</sup>] = LEE-Fläche – LEI-Fläche (siehe Abb. 13-H). Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent: 2,25 mm<sup>2</sup> ± 0,57 vs. 2,00 mm<sup>2</sup> ± 0,44 (p = n.s.).

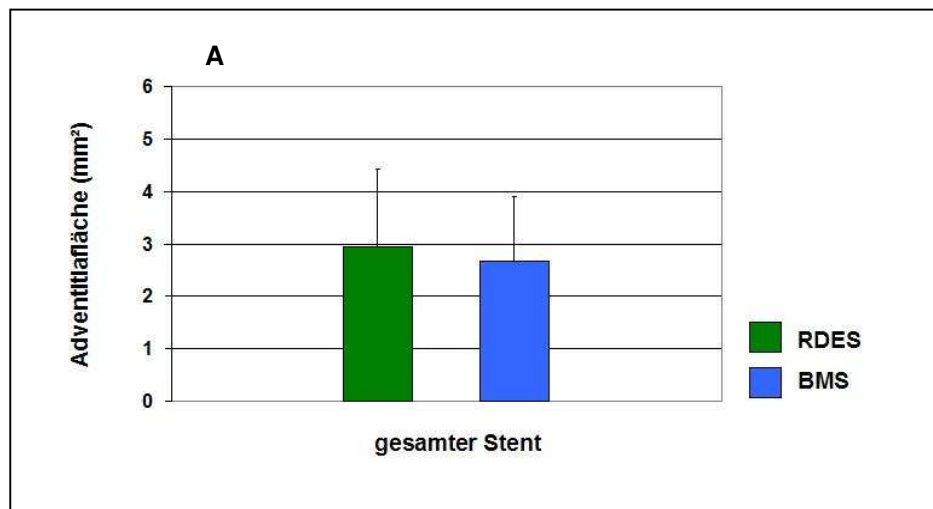


**Abb. 27:** A: Media-Fläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Die Media-Fläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erhöht.

### 5.1.8 Adventitiafläche

Die Adventitiafläche wurde rechnerisch ermittelt. Die Gesamtarterienfläche minus LEE-Fläche ergab die Adventitiafläche (siehe Abb. 13-F). Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $2,96 \text{ mm}^2 \pm 1,48$  vs.  $2,68 \text{ mm}^2 \pm 1,21$  ( $p = \text{n.s.}$ ).

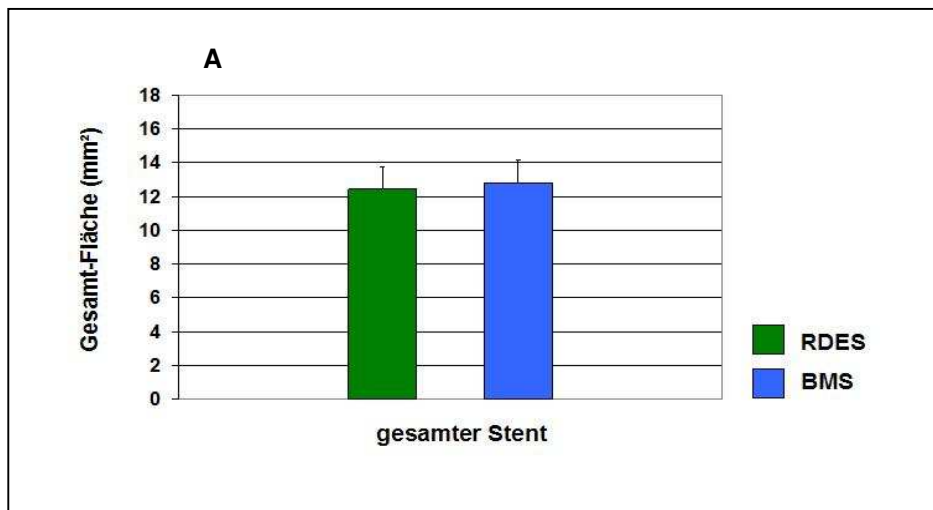


**Abb. 28:** A: Adventitiafläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Die Adventitiafläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erhöht.

### 5.1.9 Gesamtarterienfläche (Gesamt-Fläche)

Zur Bestimmung der Gesamtarterienfläche wurde die Grenze zwischen dichter und lockerer *Adventitia* bestimmt. Die innerhalb dieser Grenzlinie befindliche Fläche wurde gemessen (siehe Abb. 13-E). Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $12,45 \text{ mm}^2 \pm 1,57$  vs.  $12,80 \text{ mm}^2 \pm 2,17$  ( $p = \text{n.s.}$ ).

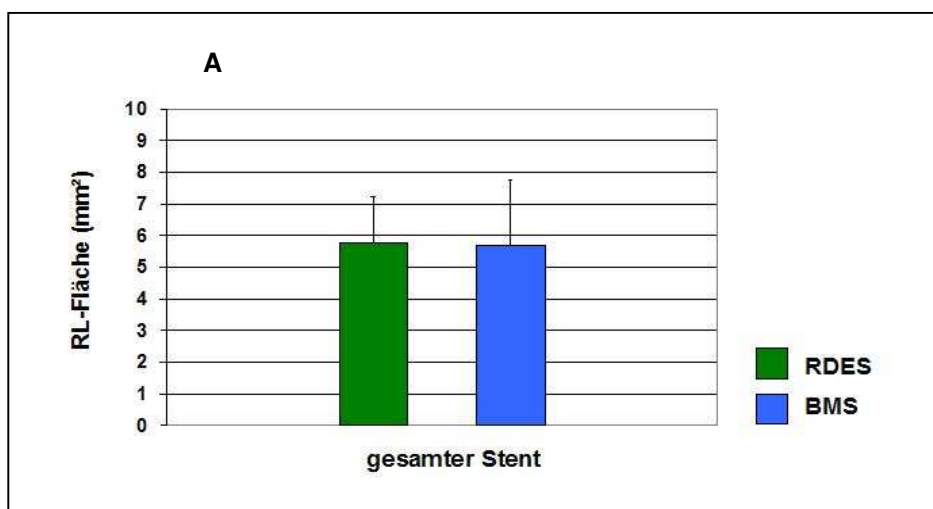


**Abb. 29:** A: Gesamtarterienfläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Die Gesamtarterienfläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erniedrigt.

#### 5.1.10 Residuallumenfläche (RL-Fläche)

Zur Bestimmung der Lumenfläche diente die Lumengrenze des Gefäßes. Sie wurde als Residuallumenfläche (RL-Fläche) bezeichnet (siehe Abb. 13-B). Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $5,78 \text{ mm}^2 \pm 1,45$  vs.  $5,68 \text{ mm}^2 \pm 2,08$  ( $p = \text{n.s.}$ ).

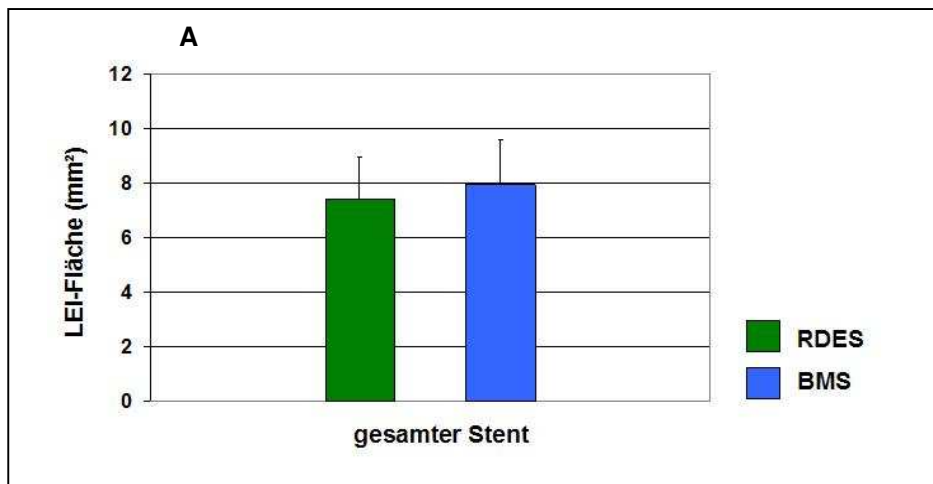


**Abb. 30:** A: Residuallumenfläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau). Die RL-Fläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erniedrigt.

### 5.1.11 LEI-Fläche

Die Fläche innerhalb der *Lamina elastica interna* (LEI) entspricht dem Gefäßlumen unmittelbar nach der Stentimplantation (LEI-Fläche; siehe Abb. 13-C). Es dienten drei Messungen pro Segment (proximal, medial, distal) und Schwein als Rohdaten, die in der folgenden Darstellung als Mittelwert aus diesen drei Segmenten und den sechs untersuchten Schweinen zusammengefasst wurden.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $7,43 \text{ mm}^2 \pm 1,53$  vs.  $7,95 \text{ mm}^2 \pm 1,65$  ( $p = \text{n.s.}$ ).



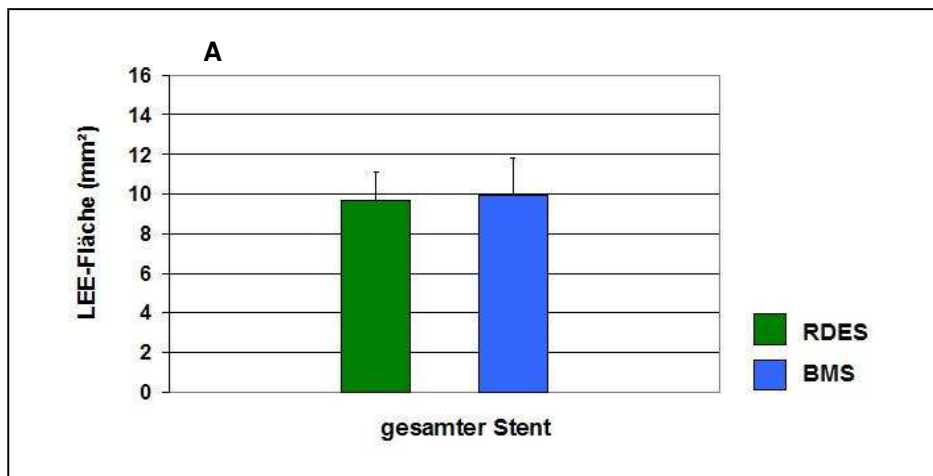
**Abb. 31:** A: LEI-Fläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau).

Die LEI-Fläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erniedrigt.

### 5.1.12 LEE-Fläche

Zur Bestimmung der LEE-Fläche wurde die Fläche innerhalb der *Lamina elastica externa* (LEE) gemessen (siehe Abb. 13-D).

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:  $9,68 \text{ mm}^2 \pm 1,42$  vs.  $9,95 \text{ mm}^2 \pm 1,85$  ( $p = \text{n.s.}$ ).



**Abb. 32:** A: LEE-Fläche aller Segmente der RDES (grün) und BMS (blau).

Die LEE-Fläche war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erniedrigt.

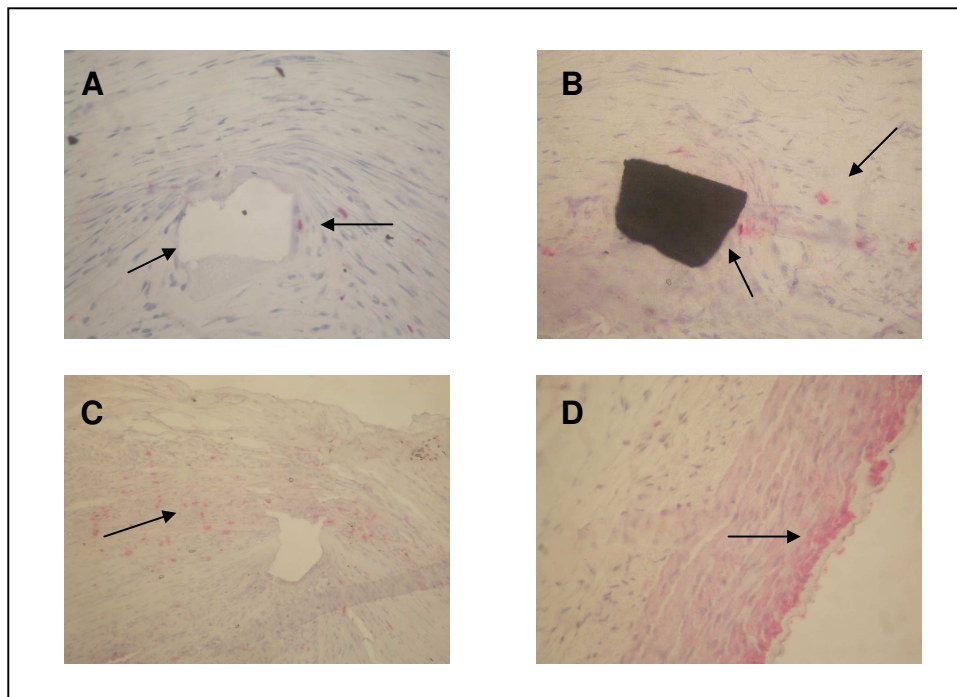
## 5.2 Immunhistologie

Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden für die jeweiligen Schichten (*Adventitia*, *Media*, *Neointima*) neun Messungen pro Stent (drei proximal, drei medial, drei distal) einer jeden Koronararterie durchgeführt, die in den folgenden Darstellungen als Mittelwert aus den drei Segmenten (proximal, medial, distal) und den jeweils sechs Stents der sechs untersuchten Schweine zusammengefasst wurden.

### 5.2.1 Proliferationsindex 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (%)

Als Thymidin-Analogon wird BrDu kompetitiv ausschließlich während der S-Phase in die DNA integriert. Proliferierende Zellen wurden mittels 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-Färbung angefärbt und Zellen in der *Neointima*, *Media* bzw. *Adventitia* der in 4.2.7.4.1 gewählten Masterquerschnitte manuell gezählt (Johnson, Schofield et al. 2004). Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und anschließend ein Proliferationsindex (Prozent der proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl) berechnet.

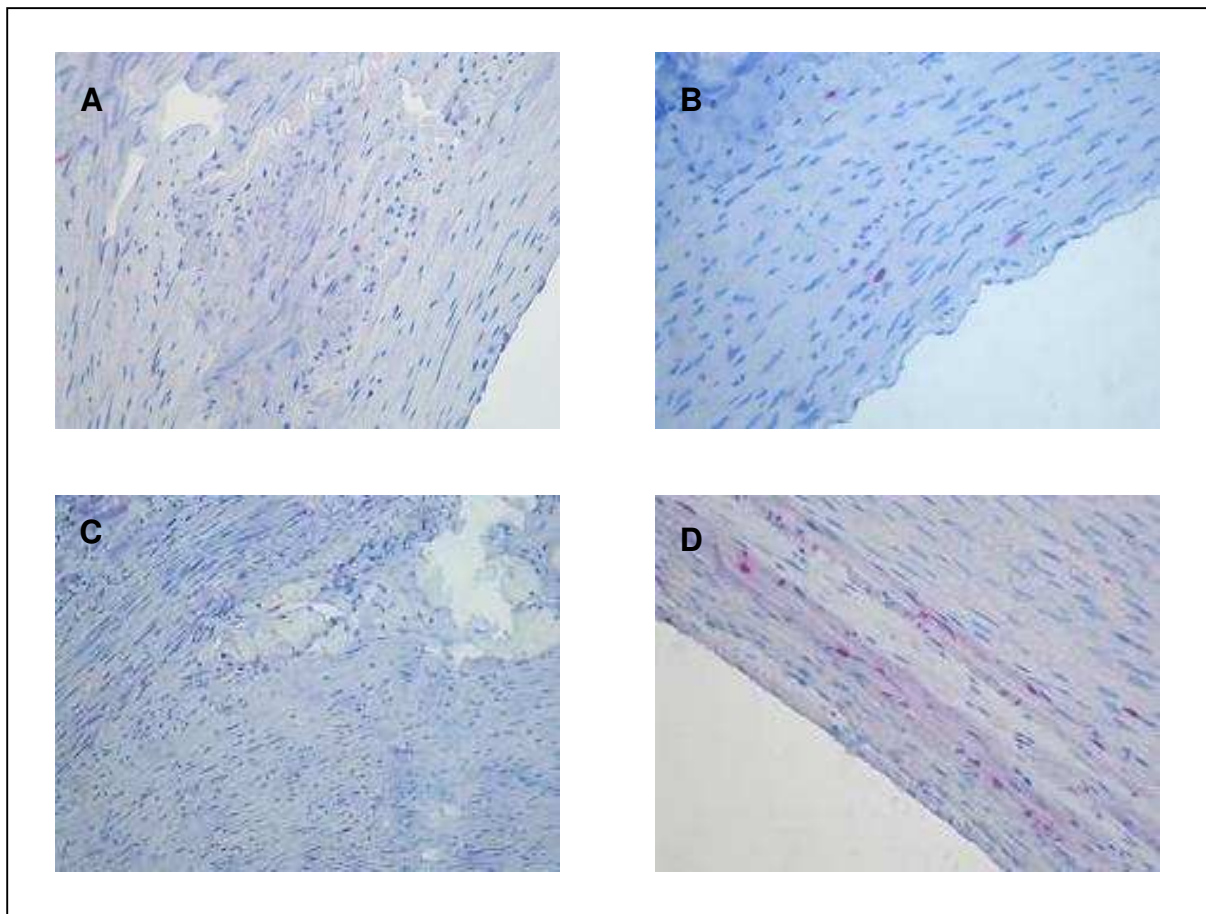
In einigen Schnitten traten starke Hintergrundfärbungen auf (siehe Abb. 33-C und Abb. 33-D), die die spezifische Färbung nahezu völlig maskierten oder schwache Signale sehr undeutlich wurden. Dadurch war die BrDu-Färbung nicht reproduzierbar durchführbar. Die Variabilität der einzelnen Schnitte war zu groß, so dass auf eine Auswertung verzichtet wurde. Stattdessen wurde eine neue Proliferationsanalyse mit dem Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt, der reproduzierbare Messergebnisse erbrachte.



**Abb. 33:** Schwein 5 RCA (RDES), 400 x Vergrößerung (A) und Schwein 4 RCX (BMS), 400 x Vergrößerung (B). Pfeile deuten auf BrDu-positive Zellkerne (rot) und auf Stentstrut in A (ausgewaschen) und B (schwarz). Viele rote, positiv angefärbte Zellen C und D (400 x Vergrößerung) mit hoher Hintergrundfärbung.

### 5.2.2 Proliferationsindex Ki-67 (%)

Die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, Myofibroblasten und die Produktion von extrazellulärer Matrix auf der luminalen Seite des Stents zeichnet die ISR aus. In dieser Arbeit wurden mittels des Zellzyklus assoziierten Proliferationsmarkers Ki-67 die proliferativen Zellen in den RDES und BMS untersucht. Während in der *Adventitia* ( $0,14\% \pm 0,04$  vs.  $0,19\% \pm 0,02$ ;  $p = \text{n.s.}$ ) keine signifikant erhöhte Proliferation in den zu untersuchenden Gefäßen ermittelt wurde, zeigten die Ausschnitte der *Media* ( $0,07\% \pm 0,06$  vs.  $0,30\% \pm 0,18$ ;  $p < 0,05$ ) und *Neointima* ( $0,04\% \pm 0,04$  vs.  $0,20\% \pm 0,15$ ;  $p < 0,05$ ) ein ganz anderes Bild. In den Gefäßen der BMS zeigte sich ein signifikant erhöhter Proliferationsindex in der *Media* und *Neointima* im Vergleich zu den Gefäßen mit Rosiglitazon beschichteter Stents. Somit zeigt Rosiglitazon einen antiproliferativen Effekt auf die Zellen der *Media* und *Neointima*.



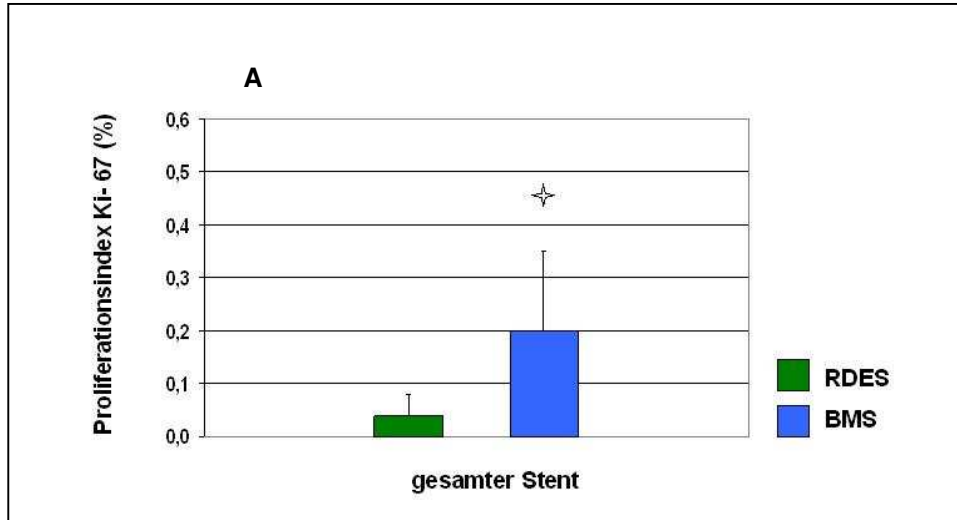
**Abb. 34:** Immunohistochemische Färbung von proliferierenden Zellen (Ki-67) drei Monate nach PCI.

Querschnitt von RDES, 200 x Vergrößerung (A) und RDES, 400 x Vergrößerung (B) mit wenig rötlich-gefärbten Zellen. Querschnitt von BMS, 200 x Vergrößerung (C) und BMS, 400 x Vergrößerung (D) mit rötlich-gefärbten Zellen.



Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS bezogen auf die *Neointima* folgende Werte für den gesamten Stent:

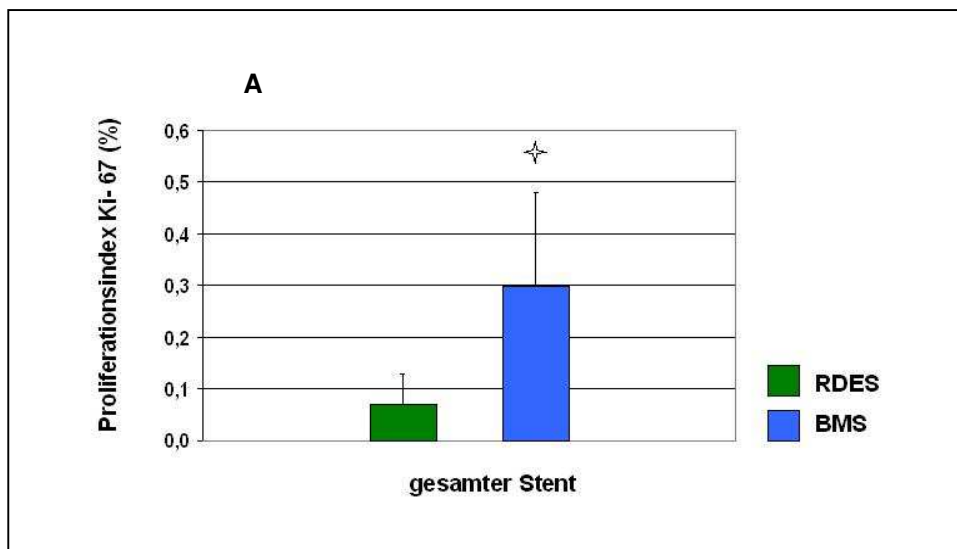
0,04% ± 0,04 vs. 0,20% ± 0,15 (p < 0,05).



**Abb. 35:** A: Proliferationsindex (Prozent der proliferierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl) von Ki-67 für die *Neointima* der RDES (grün) und BMS (blau). Positiv gefärbte Zellen zeigen eine signifikante Erhöhung in den Koronarien mit BMS Stent.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS bezogen auf die *Media* folgende Werte für den gesamten Stent:

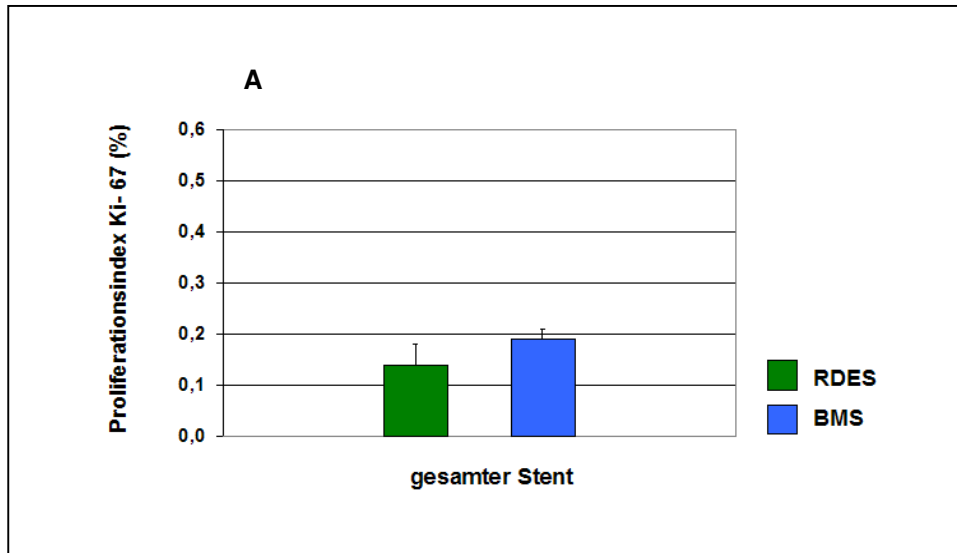
0,07% ± 0,06 vs. 0,30% ± 0,18 (p < 0,05).



**Abb. 36:** A: Proliferationsindex Ki-67 (%) für die *Media* der RDES (grün) und BMS (blau). Positiv gefärbte Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung in den Koronarien mit BMS Stent.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS bezogen auf die *Adventitia* folgende Werte für den gesamten Stent:

0,14% ± 0,04 vs. 0,19% ± 0,02 (p = n.s.).

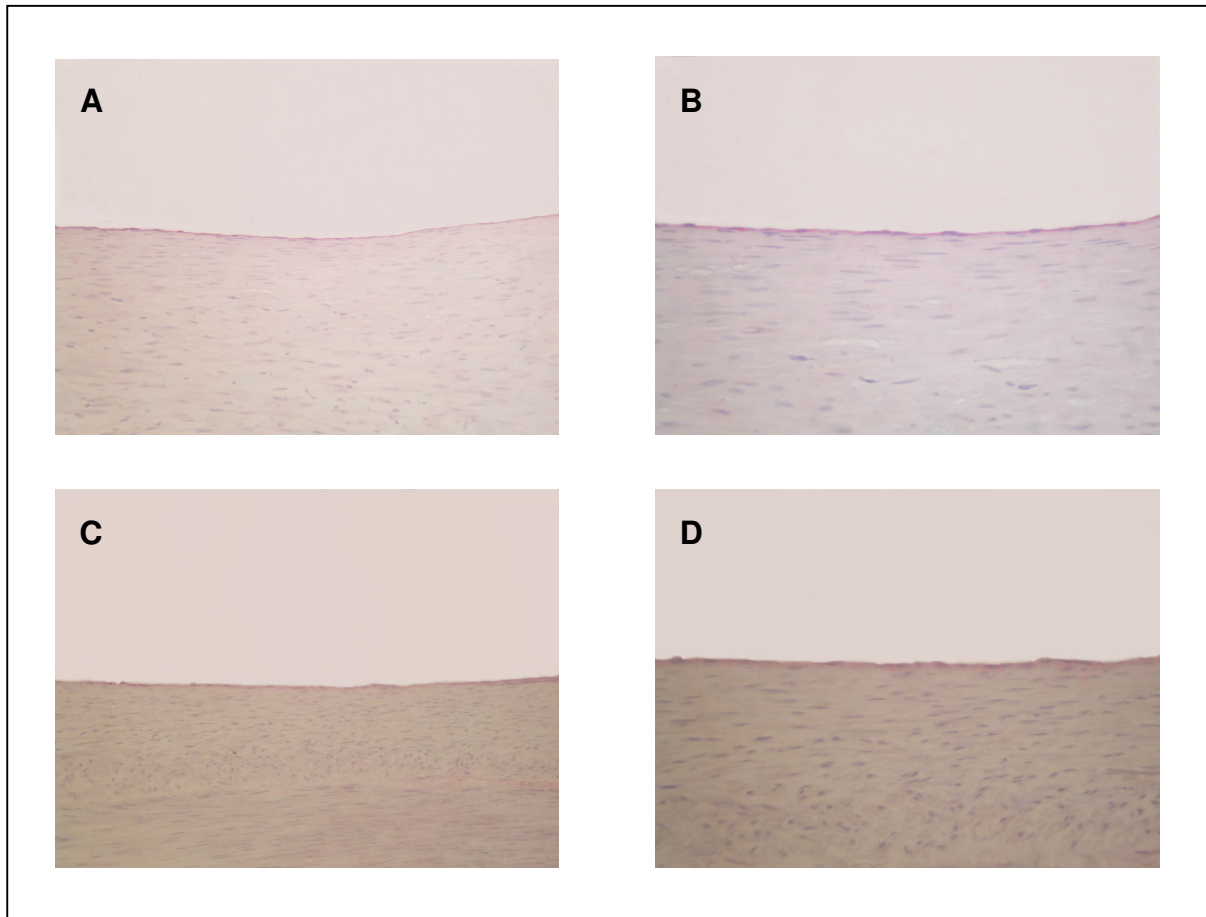


**Abb. 37:** A: Proliferationsindex Ki-67 (%) für die *Adventitia* der RDES (grün) und BMS (blau). Der Proliferationsindex war bei den RDES im Vergleich zu den BMS nicht signifikant erhöht.

### 5.2.3 Endothelialisierung (%)

Um die Bereiche intakter Endothelialisierung des jeweiligen Masterquerschnitts zu messen, wurde der Masterquerschnitt in vier Quadranten unterteilt. Der Masterquerschnitt war der unter den qualitativ besten, zufällig gewählte Schnitt. Mit Hilfe einer Software (DP-Soft Version 3.2) wurde der Bereich vollständiger Endothelialisierung des jeweiligen Quadranten in einer 100-fachen Vergrößerung manuell umfahren und in mm ausgedrückt. Die Werte der Quadranten wurden in eine Excel-Tabelle übertragen, addiert und anschließend ins Verhältnis zum totalen luminalen Umfang gesetzt (Berg, Aragon et al. 2007).

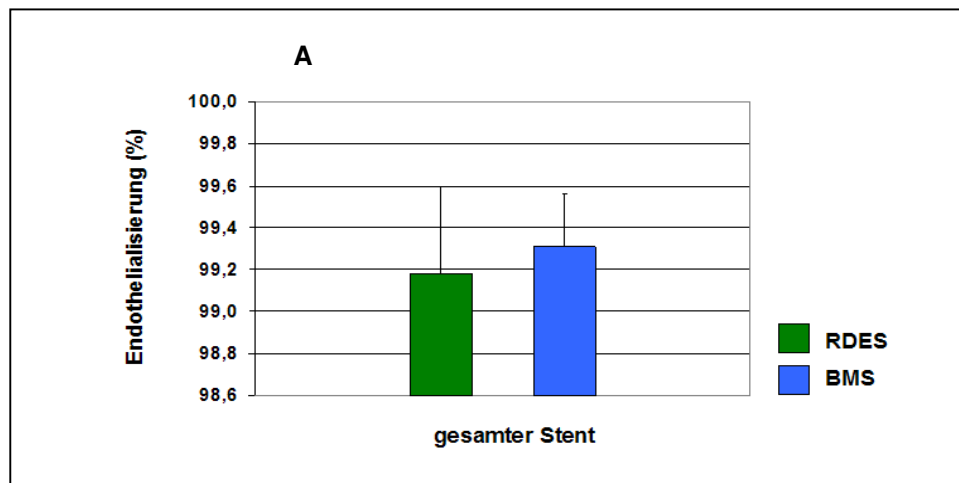
Wie in der Abbildung 38 zu sehen ist, waren sowohl die Gefäße mit RDES als auch die Gefäße mit BMS nahezu vollständig endothelialisiert.



**Abb. 38:** Immunhistochemische Färbung von Endothelzellen von Schwein 6 BMS (RCA), 200 x Vergrößerung (A) und Schwein 6 BMS (RCA), 400 x Vergrößerung (B) sowie von Schwein 4 RDES (RIVA), 200 x Vergrößerung (C) und Schwein 4 RDES (RIVA), 400 x Vergrößerung (D). Drei Monate nach PCI.

Die Auswertung ergab drei Monate nach der Intervention für die RDES vs. BMS folgende Werte für den gesamten Stent:

99,18% ± 0,42 vs. 99,31% ± 0,25 (p = n.s.).



**Abb. 39:** A: Endothelialisierung (%) der RDES (grün) und BMS (blau).

Innerhalb der Gruppe unterschieden sich die behandelten Gefäße nicht signifikant.

## 6 Diskussion

### Etablierung des Schweinmodells

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem präklinischen porcinen Stenose-Modell der Effekt einer lokalen Freisetzung des PPAR $\gamma$ -Liganden Rosiglitazon auf die In-Stent-Restenose (ISR) nach intrakoronarer Stentimplantation untersucht.

Das koronare Schweinmodell stellt aufgrund der dem Menschen ähnlichen Koronarmorphologie und der vergleichbaren „response-to-injury“ Hypothese das aussagekräftigste präklinische Modell zur Untersuchung der koronaren Restenosepathophysiologie dar. Eine Reihe der für die Atherosklerose und Restenose wichtigen Pathomechanismen werden durch eine Ballondilatation oder Stentimplantation induziert. Darüber hinaus sind auch beim Schwein längere Beobachtungszeiträume nach koronarer Intervention und insbesondere nach Implantation von Stents möglich, um eine bessere Vergleichbarkeit und einen größeren prädiktiven Wert der experimentellen Untersuchungen zu gewährleisten (Schwartz, Edelman et al. 2002). In diesem Langzeitversuch wurde ein Schweinmodell mittels perkutaner koronarer Intervention unter Verwendung eines wirkstoff- und polymerfreien Yukon®-Stent (BMS) und eines mit Rosiglitazon beschichteten polymerfreien Yukon®-Stent (RDES) verwendet. Ein Nachbeobachtungszeitraum von drei Monaten wurde gewählt, um Spätfolgen besser beurteilen zu können. *In vitro* Studien stellen keinen adäquaten Ersatz dar, da für die Entstehung einer Stenose neben der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen auch andere Parameter (wie z. B. entzündliche Prozesse, Heilungsreaktionen der Gefäßwand nach Verletzungen, Blutfluss im Hinblick auf Thrombosen und die Anpassung an veränderte Strömungsverhältnisse, etc.) eine entscheidende Rolle spielen (Schwartz, Chronos et al. 2004). Diese Vorgänge lassen sich weder in einer Zellkultur noch in anderen *in vitro* Experimenten sinnvoll simulieren.

Um ein Tiermodell zu verwenden, dessen Gefäße den atherosklerotisch veränderten Koronargefäßen des Menschen so ähnlich wie möglich sind, sollten in einem Vorversuch Schweine durch atherogene Lipidfütterung und/oder Induktion eines Diabetes, mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen erzeugt werden (Artinger, Deiner et al. 2009). Um ein reproduzierbares atherosklerotisches Schweinmodell zu entwickeln, wurde in dieser Studie eine Kombination aus Induktion einer Hyperlipidämie und einer Hyperglykämie gewählt. Hierzu wurden zwei Hausschweine mit einer speziell angereicherten Fettdiät (2% Cholesterin, 17% Kokosnussfett) für 8 bzw. 13 Wochen gefüttert. Zwei weitere Schweine erhielten für 13 bzw. 14 Wochen neben einem Spezialfutter (4% Cholesterin, 17% Kokosnussfett) in drei Portionen an drei aufeinander folgenden Tagen verteilt insgesamt 150 mg/kg Streptozotocin (STZ). STZ zerstört die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas und induziert so einen Diabetes (Gerrity et al. 2001). In dieser Studie zeigten die Schweine

jedoch weder eine anhaltende Hyperglykämie, noch wiesen ihre Koronargefäße humanoide atherosklerotische Veränderungen auf. Die histopathologische Untersuchung der entnommenen Koronargefäße der Schweine zeigten „fatty streaks“ mit Schaumzellen als frühe atherosklerotische Veränderungen. Atherosklerotische Plaques sind nicht entstanden. Dieser Versuch zeigte einerseits, dass eine atherogene Diät von Hausschweinen initiale Stadien der KHK verursachen kann. Andererseits werden die Grenzen in der Erschaffung eines reproduzierbaren atherosklerotischen und diabetischen Großtiermodells, das für Versuche auf dem Gebiet der kardiologischen oder vaskulären Interventionen geeignet ist, aufgezeigt (Artinger, Deiner et al. 2009).

### **Lokale Rosiglitazon-Induktion im koronaren In-Stent-Restenose Modell**

Thiazolidindione (Insulinsensitizer) bewirken über eine Aktivierung der  $\gamma$ -Isoform des nukleären Peroxisome Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR $\gamma$ ) eine Modulation der Transkription spezifischer, aktivierbarer Gene, die zur Steigerung der Insulinempfindlichkeit führt. Das zu der Substanzgruppe der Thiazolidindione gehörende orale Antidiabetikum Rosiglitazon aktiviert diesen Transkriptionsfaktor und reguliert somit verschiedene Zielgene, die über die Blutzucker-Kontrolle hinaus in Lipidmetabolismus, Inflammation, Apoptose und Zellproliferation involviert sind (Touyz und Schiffrin 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften erscheint Rosiglitazon als geeignete Substanz im Hinblick auf eine Stentbeschichtung zur Verhinderung von In-Stent-Restenosen (ISR). PPAR $\gamma$ -Liganden werden bereits seit einiger Zeit erfolgreich bei Typ-2-Diabetikern eingesetzt, greifen in mehrere Pathomechanismen der Restenose ein und könnten sich somit eventuell hervorragend für die adjunktive Pharmakotherapie zur Behandlung der koronaren Restenose bei Diabetikern aber auch Nicht-Diabetikern eignen (Tao, Liu et al. 2003).

Mit der Verringerung der Insulinresistenz durch eine Thiazolidindionbehandlung werden über die blutzuckersenkende Wirkung hinaus auch die Nüchtern- und postprandialen Plasma-Insulinspiegel gesenkt (Actos 2003). Man geht davon aus, dass Thiazolidindione die Betazellen entlasten und so den diabetestypischen progredienten Betazellverlust zumindest verlangsamen. Im Tierexperiment wurden für Rosiglitazon positive Effekte auf das Pankreas beobachtet, wie zum Beispiel eine Zunahme von Fläche, Zahl und Insulingehalt der Betazellen (Lister, Boam et al. 1998). Der Mechanismus, über den Thiazolidindione die Betazellen beeinflussen, ist bisher nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Interessanterweise wurden an den pankreatischen Betazellen sowohl Insulinrezeptoren als auch der Zielrezeptor der Thiazolidindione - PPAR $\gamma$  - nachgewiesen (Lupi, Del Guerra et al. 2004). Für die Beurteilung der Verträglichkeit von Thiazolidindione liegen mittlerweile Therapieerfahrungen von weltweit ca. zehn Millionen Patienten vor. Zu den häufigsten unerwünschten Effekten einer Thiazolidindionbehandlung zählen leicht bis

mäßig ausgeprägte Knöchelödeme und eine Körpergewichtszunahme. Beide Effekte sind auch von der Insulintherapie bekannt und spiegeln wahrscheinlich das Funktionsprinzip der Substanzgruppe wieder: die Verbesserung der Insulinwirkung. In Abhängigkeit vom Essverhalten wird unter der Behandlung mit einem Thiazolidindion häufig eine Gewichtszunahme beobachtet. Diese korreliert eng mit der Verbesserung des Glucosestoffwechsels und kann als Folge der zunehmenden Ansprechbarkeit der Gewebe auf das anabole Hormon Insulin interpretiert werden (Diamant und Heine 2003). Die Zunahme des Plasmavolumens unter einer Glitazonbehandlung bedingt einen Hämodilutionseffekt, der mit einer leichten – in der Regel klinisch nicht relevanten – Abnahme von Hämatokrit und Hämoglobin verbunden ist. Die Tatsache, dass bei einigen Thiazolidindionpatienten Ödeme beobachtet werden, wirft die Frage auf, in welchem Ausmaß die Flüssigkeitsretention eine Herzinsuffizienz begünstigen beziehungsweise verschlechtern könnte. Tatsächlich wurde nach Markteinführung vor allem in den USA über seltene Fälle von kongestiver Herzinsuffizienz und Lungenödemem berichtet (Actos 2003). Solche Ereignisse traten vorzugsweise im Rahmen einer kombinierten Behandlung mit Insulin auf. In Deutschland und den anderen Ländern der EU ist daher eine Thiazolidindion-Insulin-Kombinationstherapie nach wie vor nicht zugelassen. Einerseits werden die Effekte einer Flüssigkeitsretention auf die kardiale Verträglichkeit nach wie vor kontrovers diskutiert. Andererseits häufen sich Hinweise aus zell-tierexperimentellen und mittlerweile auch ersten klinischen Studien, dass Thiazolidindione die Herzfunktion möglicherweise positiv beeinflussen (Wang, Weisel et al. 2003). Langzeitdaten aus derzeit noch laufenden Studien sollen künftig die kardiale Verträglichkeit hinsichtlich der Herzinsuffizienz beziehungsweise einer verbesserten kardiovaskulären Prognose absichern. Die Insulinresistenz ist ein zentrales Bindeglied zwischen Typ-2-Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen. Die Zahl der Forschungsarbeiten, die sich mit Veränderungen des kardiovaskulären Risikos durch Modulation der Insulinresistenz befassen, ist in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen. Dyslipidämie und Bluthochdruck gelten als schwerwiegende kardiovaskuläre Risikofaktoren, von denen zahlreiche Typ-2-Diabetiker betroffen sind. Klinische Untersuchungen belegen, dass Thiazolidindione das Lipidprofil von Patienten mit Insulinresistenz verbessern. Das kardioprotektive HDL-Cholesterin (HDL, „high density lipoprotein“) steigt an und die als besonders atherogen eingestufteten small dense LDL-Partikel (LDL, „low density lipoprotein“) werden gesenkt (Aronoff, Rosenblatt et al. 2000; Freed, Ratner et al. 2002). Tierexperimentelle Arbeiten zeigen für Glitazone eine blutdrucksenkende Wirkung, die sowohl auf eine Verbesserung der Insulinsensitivität als auch auf direkte Effekte an der Gefäßwand zurückzuführen ist und für die primär eine vasodilatatorische Komponente angenommen wird (Diamant und Heine 2003). Um die klinische Relevanz dieser Befunde abschließend beurteilen zu können, werden weitere prospektive Langzeitstudien benötigt.

Tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen, in denen eine Thiazolidindiongabe zur signifikanten Verringerung atherosklerotischer Läsionen führte, lassen direkte Effekte der Substanzklasse auf das Gefäßsystem vermuten (Li, Brown et al. 2000). Tatsächlich wird der Zielrezeptor der Thiazolidindione - PPAR $\gamma$  - auch in Zellen exprimiert, die eine Schlüsselrolle beim Atheroskleroseprozess einnehmen. Unter anderem gelang der Nachweis von PPAR $\gamma$  in Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten (Marx, Mach et al. 2000). Einer der frühesten Indikatoren der Atherosklerose ist eine gestörte Endothelfunktion. Das Endothel ist bedeutsam bei der Regulierung von Tonus, Durchlässigkeit und Wachstum der Gefäße. Es bildet sowohl vasokonstriktorische, als auch vasodilatatorische Substanzen und beeinflusst die Monozytenadhäsion an der Gefäßwand, die Thrombozytenaggregation und die Blutgerinnung. Bei einer endothelialen Dysfunktion geraten diese Mechanismen ins Ungleichgewicht. Typischerweise ist die endothelabhängige Vasodilatation, die einen wichtigen Adaptationsmechanismus bei vermehrtem Blutstrom (z.B. durch Stress oder körperliche Belastung) darstellt, abgeschwächt. Verschiedene Studien belegen, dass sich die Endothelfunktion bei Typ-2-Diabetikern unter einer Thiazolidindiontherapie deutlich verbessert. Dies spiegelt sich unter anderem in einer Zunahme der endothelabhängigen Vasodilatation und in der Abnahme endothelialer Aktivierungsmarker wie E-Selektin wieder (Natali, Baldeweg et al. 2004). Morphologisch lässt sich die Progression der Atherosklerose anhand einer zunehmenden Intima-Media-Dicke (IMT) an den Karotiden nachvollziehen. Die IMT wird mit Ultraschall gemessen und korreliert positiv mit dem Ausmaß der Atherosklerose in den Koronararterien (Wofford, Kahl et al. 1991). In einer placebokontrollierten Studie mit 106 Typ-2-Diabetikern wurde dargestellt, dass bereits während einer dreimonatigen Behandlung mit täglich 30 mg Pioglitazon die Intima-Media-Dicke signifikant abnahm (Koshiyama, Shimono et al. 2001). Ähnliche Befunde hat eine aktuelle Untersuchung bei Nicht-Diabetikern mit koronarer Herzerkrankung für Rosiglitazon gezeigt (Sidhu, Kaposzta et al. 2004). Ein typischer Befund im fortgeschrittenen Atherosklerosestadium sind erhöhte Serumspiegel sogenannter matrixdegradierender Metalloproteinasen (MMP). MMP fördern die gefürchtete Plaqueruptur, indem sie die (schützende) fibröse Kappe an den atherosklerotischen Plaques ausdünnen. *In vitro* Daten belegen, dass Thiazolidindione die Freisetzung matrixdegradierender Enzyme aus Makrophagen hemmen (Marx, Sukhova et al. 1998). Klinische Studien mit Rosiglitazon behandelten Patienten bestätigen die Verringerung der MMP-Serumspiegel und stützen damit die experimentellen Befunde, dass Glitazone zur Stabilisierung atherosklerotischer Plaques beitragen können (Marx, Froehlich et al. 2003).

In einer Meta-Analyse fassen die Autoren die Ergebnisse von 42 Rosiglitazon-Studien mit insgesamt mehr als 28.000 Patienten zusammen. Hierbei wurde nicht nur die publizierte Literatur, sondern auch die Website der Food and Drug Administration (FDA) und das

klinische Studienregister der Herstellerfirma GlaxoSmithKline ausgewertet. Bei der Gesamtbeurteilung aller Daten kamen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass Rosiglitazon im Vergleich zu einem Placebo oder im Vergleich zu anderen Diabetesmedikamenten das Herzinfarktisiko statistisch signifikant erhöht (Nissen und Wolski 2007). Auch bei den herzkreislaufbedingten Todesfällen wurde ein leichter, allerdings nicht-signifikanter Anstieg unter der Therapie mit Rosiglitazon errechnet. Die Autoren räumen in ihrer Arbeit allerdings selber ein, dass ihre Analyse kein abschließendes Urteil über die Sicherheit von Rosiglitazon ermöglicht. Zum einen ist die Aussagekraft von Meta-Analysen generell eingeschränkt, da die Studien nicht genau dieselben Methoden, Definitionen und Patienten benutzen. Zum anderen waren die hier analysierten Einzelstudien dazu angelegt, Stoffwechseleränderungen zu untersuchen. Aussagen zu eventuellen Nebenwirkungen im Herzkreislaufbereich lassen diese Studien aufgrund ihres Designs nur unter Vorbehalt zu. Die zuletzt publizierte RECORD-Studie konnte zeigen, dass es unter Rosiglitazon zu keiner kardiovaskulären Übersterblichkeit kommt (Home, Pocock et al. 2009).

### **Die Bedeutung lokaler Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) auf die Stenoserate / Neointima**

Postmortal entnommene stenttragende Herzkranzgefäße wurden nach dem Verfahren der Hartschnitthistologie weiterbearbeitet. Diese Methode ermöglichte eine Probenaufbereitung ohne Entfernung der Metallstreben (Li und Risnes 2004). Die anschließende Histomorphometrie gilt als Standardmethode zur Beurteilung der Gefäßwandverletzung sowie zur Quantifizierung der neointimalen Proliferation nach Stentimplantation (Buchwald, Unterberg et al. 1992).

Die Neointimabildung stellt eine pathophysiologische Säule der koronaren Restenose dar. Nach koronarer Stentimplantation ist die In-Stent-Restenose ausschließlich auf die Neointimaformation zurückzuführen. Die durchschnittliche Fläche der *Neointima* wird als absolutes Maß für die gesamte Neointimabildung betrachtet (Konrad 2002). Bezüglich der Neointimafläche in den medialen und distalen Stentsegmenten konnte statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen den RDES behandelten Gefäßen und den BMS behandelten Gefäßen festgestellt werden. Die Neointimafläche aller Segmente war bei den RDES im Vergleich zu den BMS ebenfalls signifikant erniedrigt. Dies deutet darauf hin, dass die Beschichtung des Stents mit Rosiglitazon, wahrscheinlich durch einen antiproliferativen Effekt von Rosiglitazon auf glatte Muskelzellen bzw. Myofibroblasten, die Neointimaformation signifikant reduziert. In einem Typ-2-Diabetes-Rattenmodell konnte mit Troglitazon ein ähnlicher Effekt gezeigt werden (Min, Park et al. 2002). Hierbei wurden Ratten mit Troglitazon behandelt. Anschließend wurde an diesen Tieren eine Ballonverletzung der *A. carotis communis* (Ballonendotheldenudation mittels Fogarty-Katheter) vorgenommen. Die



Neointimaformation der *A. carotis communis* zeigte sich in einer histomorphometrischen Auswertung signifikant reduziert. In einer kürzlich publizierten klinischen Studie wurde gezeigt, dass bei nichtdiabetischen Patienten mit stabiler KHK eine systemische Behandlung mit Rosiglitazon die Progression der Intima-Media-Dicke in der *A. carotis communis* reduziert, und es wird postuliert, dass pathophysiologische Vorgänge in der *A. carotis communis* parallel zu koronaren Gefäßwandveränderungen verlaufen (Sidhu, Kaposzta et al. 2004). Diese Studie ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da der postulierte Benefit einer antiatherosklerotischen Behandlung mit Rosiglitazon jetzt auch für Nichtdiabetiker nachgewiesen wurde.

Die flächenbezogene Stenoserate ist abhängig von der jeweiligen „ursprünglichen“ Gefäßgröße. Als native Gefäßgröße wurde das nach der Stentimplantation entstandene sogenannte Originallumen zur Berechnung verwendet. Die ursprüngliche Gefäßgröße (vor der Stentimplantation) war histomorphometrisch nicht erfassbar. Dementsprechend war der Aussagewert dieser Parameter nur im Rahmen der breiteren Betrachtung mehrerer Aspekte (Originallumengröße, Verletzungsindex) von Bedeutung. Es konnte eine signifikant niedrige flächenbezogene Stenoserate bei den RDES nachgewiesen werden [RDES<sub>gesamt</sub> 22,40% ± 9,88 vs. BMS<sub>gesamt</sub> 29,74% ± 17,72 (p < 0,05)]. Die Auswertung der Stenoserate der einzelnen Segmente zeigte, dass die medialen Segmente den größten und auch statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen [RDES<sub>medial</sub> 20,63% ± 10,94 vs. BMS<sub>medial</sub> 32,19% ± 20,89 (p < 0,05)]. Dabei zeigten die Daten des mittleren Verletzungsindex (Injury Score), dass der Aufdehnungsreiz, bezogen auf alle Segmente (proximal, medial, distal) bei den RDES und den BMS vergleichbar war [RDES<sub>gesamt</sub> 1,83 ± 0,80 vs. BMS<sub>gesamt</sub> 1,93 ± 0,84 (p = n.s.)]. Die Werte der NI-Proliferation (NI-Fläche) zeigten, wie bereits erwähnt einen signifikanten Unterschied [RDES<sub>gesamt</sub> 1,72 mm<sup>2</sup> ± 0,70 vs. BMS<sub>gesamt</sub> 2,28 mm<sup>2</sup> ± 1,24 (p < 0,05)]. Man kann daraus schlussfolgern, dass Rosiglitazon die NI-Proliferation in Koronargefäßen hemmt. Die Hypothese, dass eine lokal verlängerte Rosiglitazonfreisetzung aus einem RDES zu einer Verringerung der Restenose führt, konnte somit bestätigt werden. Der in dieser Studie verwendete Yukon®-Stent der Fa. Translumina ist ein polymerfreier Stent, wie er derzeit auch beim Menschen eingesetzt wird (Peters, Behnisch et al. 2009). Flueckiger et al. stellten in ihrer Studie ausgeprägte entzündliche und neointimale Reaktionen eines Taxus-Stent (mit Polymerbeschichtung) im Vergleich zu einem BMS fest (Flueckiger, Strahm et al. 2009). Die höheren entzündlichen Reaktionen des Taxus-Stents in dieser Studie können der aminoparylen Schicht, einem Polymer-Gerüst, zugeschrieben werden. Polymere, besonders nichtabsorbierende Polymere, sind als Verursacher entzündlicher Reaktionen bekannt und verzögern die Wundheilung (Virmani, Guagliumi et al. 2004). In einigen Studien an Tieren zeigte sich, dass die Polymere selbst eine verstärkte Inflammation und Neointimabildung hervorrufen können (van der Giessen, Lincoff et al.

1996). Folglich ist der Gebrauch einer polymerfreien Stentbeschichtung vorteilhaft. Eine weitere mögliche Erklärung für die höhere entzündliche Reaktion im Vergleich zu der vorliegenden Studie könnte im gewählten Untersuchungszeitraum liegen. Der von Flueckiger et al. gewählte Beobachtungszeitraum betrug nur sechs Wochen. In der vorliegenden Arbeit sollten die Langzeitprozesse untersucht werden. Eine seltene, jedoch folgenschwere Komplikation der Stenteinlagen ist die Stentthrombose, eine partielle oder vollständige Obstruktion des Implantats. Durch das potentiell prothrombotische Risiko wird in den ESC-Leitlinien die duale Thrombozytenaggregationshemmung für 12 Monate zur Nachbehandlung empfohlen (Bassand, Hamm et al. 2007). Untersuchungen von Virmani, Kolodgie et al. bestätigten, dass das porcine Stent-Modell Antworten voraus gibt, nach denen Tierstudien mit Menschen vergleichbar sind. Ihre Arbeiten belegten, dass Heilungsprozesse nach experimenteller Koronarintervention mit DES, in 90 bis 180-tägigen Tierstudien einem Heilungsprozess von zwei bis drei Jahren in Menschen entsprechen (Virmani, Kolodgie et al. 2003). Demnach entspricht der gewählte Nachbeobachtungszeitraum der vorliegenden Arbeit von drei Monaten einem geeigneten Zeitraum, um Spätfolgen beobachten zu können.

### **Einfluss von Rosiglitazon auf die Proliferation und Reendothelisierung**

Die In-Stent-Restenose (ISR) ist gekennzeichnet durch Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und Myofibroblasten sowie durch die Produktion extrazellulärer Matrix auf der luminalen Seite des Stents (Labinaz, Pels et al. 1999). Unter Zellproliferation wird die aktive Teilung von Zellen und damit die Zunahme der Zellpopulation durch Zellverdoppelung verstanden. Dabei durchlaufen Zellen nacheinander die einzelnen Phasen des Zellzyklus:  $G_0/G_1$ -, S-,  $G_2$ - und M-Phase. Die Zellproliferation ist in Vielzellern ein durch zahlreiche molekulare Mechanismen streng regulierter Prozess. Eine häufig verwendete Möglichkeit die Proliferationsaktivität einer Zelle zu bestimmen, ist über die Messung der DNA-Synthese (Profit und Unteregger 2001).

In dieser Arbeit sollten mittels des Zellzyklus assoziierten Proliferationsmarkers BrDu die proliferativen Zellen in RDES und BMS untersucht werden. Da in einigen Schnitten starke Hintergrundfärbungen auftraten, die die spezifische Färbung nahezu völlig maskierten oder schwache Signale sehr undeutlich wurden, war die BrDu-Färbung nicht reproduzierbar durchführbar. Die Variabilität der einzelnen Schnitte war zu groß, so dass auf eine Auswertung verzichtet wurde. Stattdessen wurde eine neue Proliferationsanalyse mit dem Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt, der reproduzierbare Messergebnisse erbrachte. Das Protein Ki-67 wird in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert, das heißt Ki-67 ist während der Mitose ( $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase) vorhanden aber immer abwesend in der Ruhephase ( $G_0$ ) (Scholzen und Gerdes 2000). Die Proliferation von Zellen kann mit Hilfe verschiedener monoklonaler Antikörper, die gegen das Ki-67-Antigen gerichtet sind

nachgewiesen werden, wobei nur Zellen in bestimmten Phasen der Proliferation detektiert werden (Gerdes, Lemke et al. 1984; Falini, Flenghi et al. 1989). Die Ergebnisse zeigten, dass in der *Adventitia* ( $RDES_{Adventitia} 0,14\% \pm 0,04$  vs.  $BMS_{Adventitia} 0,19\% \pm 0,02$ ;  $p = n.s.$ ) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellproliferation zu ermitteln waren. Die Auswertung der *Media* ( $RDES_{Media} 0,09\% \pm 0,01$  vs.  $BMS_{Media} 0,27\% \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ) und *Neointima* ( $RDES_{Neointima} 0,07\% \pm 0,01$  vs.  $BMS_{Neointima} 0,18\% \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ) zeigten jedoch signifikante Unterschiede. In den BMS-Gefäßen zeigte sich ein signifikant erhöhter Proliferationsindex in der *Media* und *Neointima* im Vergleich zu den RDES-Gefäßen. Somit demonstriert ein mit Rosiglitazon beschichteter Stent unter Verwendung des Ki-67 Antikörpers in dieser Studie einen antiproliferativen Effekt auf die Zellen der *Media* und *Neointima*. Eine mögliche Erklärung für die antiproliferativen Effekte von Rosiglitazon könnte sein, dass die Substanz durch die Hochregulation von Bax und Bcl-2-assoziierten X-Proteinen zellzyklusarrest-Effekte besitzt (Liu und Dai 2010).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch spezifische Agonisten zu einem Arrest in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus führt. Die Art des Zellzyklus-Arrest war jeweils abhängig von dem verwendeten TZD (Wakino, Kintscher et al. 2001; Bruemmer, Blaschke et al. 2005). Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR $\gamma$  auf das Cytokin p27 wirkt, welches zu den Cyklinabhängigen Kinasen (CDK) Inhibitoren zählt und die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (RBP-p) vermindert, was zu einem Zellarrest führt und somit die Proliferation vaskulärer Muskelzellen inhibiert (Touyz und Schiffrin 2006). Der Proliferationsindex fällt in dieser Studie niedrig aus, was wahrscheinlich daran liegt, dass der Zeitpunkt der Untersuchung drei Monate nach der Intervention gewählt wurde und zu diesem Zeitpunkt die proliferative Aktivität insgesamt niedrig ist.

Aufgrund seiner Eigenschaften erscheint Rosiglitazon nicht nur als ideale Substanz im Hinblick auf eine Stentbeschichtung zur Verhinderung von In-Stent-Restenosen (ISR) sondern auch im Hinblick auf die Thrombosebildung, eine mögliche Spätkomplikation nach kathetergestützten Koronarinterventionen. Die immunhistologische Auswertung der Endothelialisierung ergab drei Monate nach der Intervention folgende Werte für den gesamten Stent:  $RDES_{gesamt} 99,18\% \pm 0,42$  vs.  $BMS_{gesamt} 99,31\% \pm 0,25$  ( $p = n.s.$ ), was eine nahezu komplette Reendothelialisierung der Gefäße für RDES und den BMS bedeutet. Der vollständige Einbau der Stents durch die Neoendothelschicht sowie das Fehlen von thrombotischer Komplikationen sind als Zeichen der guten biologischen Verträglichkeit und niedriger Thrombogenität der Rosiglitazonbeschichtung zu werten. In einer Studie mit Paclitaxel-beschichteten Stents zeigte sich in einer Langzeitstudie bei Ratten ein eingeschränktes endotheliales Wachstum während der Reendothelialisierung, was möglicherweise aufgrund eines antiproliferativen Effektes von Paclitaxel auf das Endothel zurückzuführen ist (Drachman, Edelman et al. 2000). Trotz der antiproliferativen Wirkung von

Rosiglitazon konnte eine nahezu komplette Reendothelialisierung der Gefäße für RDES gezeigt werden. In Endothelzellen inhibieren PPAR $\gamma$ -Aktivatoren wie Rosiglitazon nachweislich die Expression des Tumor Nekrose Faktors (TNF) $\alpha$ , Interleukin (IL)-6 und IL-1 $\beta$  und schwächen die TNF-induzierte VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)- und ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) Expression. Dabei schützen PPAR $\gamma$ -Aktivatoren die Gefäßwand vor entzündlichen Prozessen (Bruemmer, Blaschke et al. 2005). Darüber hinaus stimulieren PPAR $\gamma$ -Aktivatoren die endotheliale Stickstoffmonoxidbildung (NO) und haben so relaxierende Wirkung auf Blutgefäße (Calnek, Mazzella et al. 2003). Zudem zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Beschichtung eines Stents mit Rosiglitazon eine gute neointimale Verträglichkeit aufweist.

Das Maß der Gefäßwandverletzung wird von folgenden Faktoren bestimmt: Einerseits verursacht eine übermäßige Aufdehnung des Ballons eine Verletzung des darunterliegenden Gefäßes (Schwartz, Huber et al. 1992). Andererseits verursachen die Stentstruts eines jeden Stents bei der Aufdehnung tiefere Einrisse in der Gefäßwand. Auch eine ungleichmäßige Strutexpansion trägt vermutlich zur erhöhten Neointimaproliferation bei (Robinson, Roubin et al. 1988). Aus diesen Überlegungen leiten sich die Anforderungen an eine optimale Gefäßstütze ab. Eine ausreichende Standfestigkeit des Implantates sowie ein optimiertes Design verbessern signifikant die langfristigen Resultate nach der koronaren Stentimplantation. Die aktuellen Komplikationen sind dagegen wesentlich durch das Stentmaterial verursacht, das thrombogen wirkt. Ein thrombogener Effekt von Rosiglitazon konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Im Beobachtungszeitraum von drei Monaten wurde keine Stentthrombose in den RDES und auch nicht in den BMS beobachtet. Die glatte Oberfläche eines rosiglitazonbeschichteten Stents beeinflusst womöglich die rheologischen Bedingungen im Stentbereich positiv und trägt somit zur Verringerung der Thrombosegefahr bei. Die Ergebnisse dieser Studie manifestieren eine gute Biokompatibilität der erstmals im Tierversuch eingesetzten RDES. Dennoch muss sich in weiteren Untersuchungen und im klinischen Einsatz deren Effektivität und Sicherheit bestätigen.

## 7 Zusammenfassung

### **Einfluss lokaler Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) – Aktivierung der Restenose/In-Stent-Restenose nach experimenteller Koronarintervention im porcinen Stent-Modell**

**Hintergrund:** Die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist unverändert die Hauptursache der Sterblichkeit der Menschen in den industrialisierten Ländern.

In etwa 80% aller Koronarinterventionen werden koronare Stents eingesetzt. Bare Metal Stents (BMS) zeigen eine Restenoserate von etwa 10 – 30%, mit Drug Eluting Stents (DES) sinkt die Restenoserate auf 5 – 10%.

Die Koronare Restenose nach perkutaner koronarer Intervention (PCI) ist sowohl ein großes klinisches, als auch ein volkswirtschaftliches Problem. Patienten mit Diabetes mellitus haben ein weitaus größeres Risiko eine In-Stent-Restenose (ISR) zu erleiden (18% und 35% für insulinabhängige Diabetiker) (Virmani, Guagliumi et al. 2004). Die ISR bleibt ein klinisches Problem, aktuelle Probleme wie späte Thrombosen sind im Fokus derzeitiger Forschungsbestrebungen.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptor-Familie, ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, welcher die Expression spezifischer Zielgene reguliert und in Proliferation, Migration und Entzündungsreaktionen (Guan, Zhang et al. 2002) involviert ist. Rosiglitazon ist ein Aktivator von PPAR $\gamma$  (Touyz und Schiffrin 2006).

**Zielsetzung:** Ziel dieser Studie war es, die Reaktion der Gefäßwand nach Koronarimplantation eines polymerfreien Rosiglitazon-beschichteten Stents (RDES) im Vergleich zu einem unbeschichteten Stent (BMS) im Tiermodell zu untersuchen.

**Methoden:** In 12 Schweinekoronararterien von sechs Schweinen (30 – 38 kg) wurden in einem randomisierten Verfahren je Schwein ein RDES und ein BMS eingesetzt.

Der PPAR $\gamma$ -Aktivator Rosiglitazon wurde auf einen Yukon®-Stent der Fa. Translumina aufgebracht. Zur Induktion inflammatorischer Reaktionen und neointimaler Hyperplasie wurden die Koronargefäße durch Ballondilatation jeweils im Verhältnis von 1,3 – 1,5 : 1 überdehnt. Zwei Koronararterien je Schwein wurden mit je einem RDES bzw. BMS gestentet. Die Tiere wurden über drei Monate nachbeobachtet. Danach erfolgte die histomorphometrische und immunhistologische Auswertung der Gefäße.

**Ergebnisse:** Bei allen erfolgreich durchgeführten Interventionen konnten alle Stents ohne Schwierigkeiten platziert werden. In den Schweinen mit RDES kam es zu einer signifikanten Reduktion der Neointimafläche im Vergleich zum BMS (RDES<sub>gesamt</sub> 1,72 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0,70 vs. BMS<sub>gesamt</sub> 2,28 mm<sup>2</sup>  $\pm$  1,24; p < 0,05) und zu einer signifikanten Reduktion der Stenoserate

(RDES<sub>gesamt</sub> 22,40% ± 9,88 vs. BMS<sub>gesamt</sub> 29,74% ± 17,72; p < 0,05). Die Proliferationsanalyse mittels Ki-67 zeigte für die *Media* (RDES<sub>Media</sub> 0,09% ± 0,01 vs. BMS<sub>Media</sub> 0,27% ± 0,02; p < 0,05) und *Neointima* (RDES<sub>Neointima</sub> 0,07% ± 0,01 vs. BMS<sub>Neointima</sub> 0,18% ± 0,02; p < 0,05) eine signifikant reduzierte Proliferation für die RDES im Vergleich zu den BMS. Die Endothelialisierung war auch bei den RDES nach drei Monaten vollständig (RDES<sub>gesamt</sub> 99,18% ± 0,42 vs. BMS<sub>gesamt</sub> 99,31% ± 0,25; p = n.s.)

**Schlussfolgerung:** Die lokale Rosiglitazonbehandlung reduzierte die neointimale Reaktion und die Stenoserate drei Monate nach der Intervention. Rosiglitazon zeigte einen antiproliferativen Effekt auf die Zellen der *Media* und *Neointima*. Der RDES hat die Endothelialisierung nicht behindert.

Die Daten dieser Studie zeigen, dass im präklinischen Modell am Schwein die lokale koronare Rosiglitazonfreisetzung über den RDES durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung zur lokalen Reduktion der Restenose via Proliferationshemmung in der Gefäßwand und dabei zu keiner Beeinträchtigung der Reendothelialisierung führt. Der klinische Einsatz von Rosiglitazonbeschichteten Stents könnte eine therapeutische Alternative zur gegenwärtigen antiproliferativen DES-Therapie in der Behandlung der Restenose nach Stentimplantation darstellen.

## 8 Summary

### **Influence of local peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) activation of restenosis/in-stent restenosis following experimental coronary intervention in the porcine stent model**

**Background:** Coronary heart disease (CHD) remains the main cause of mortality in the industrial countries.

In approximately 80% of all coronary interventions, coronary stents are inserted. Bare metal stents (BMS) show a restenosis rate of around 10 – 30%, and with drug eluting stents (DES) the restenosis rate drops to 5 – 10%.

Coronary restenosis following percutaneous coronary intervention (PCI) represents a serious problem, both clinically and economically. Patients with Diabetes mellitus have a far greater risk of suffering an in-stent restenosis (ISR) (18% compared with 35% for insulin-dependent diabetics) (Virmani, Guagliumi et al. 2004). ISR remains a clinical problem, and current problems such as subsequent thromboses are at present in the focus of research efforts.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), belonging to the nuclear hormone receptor family, is a ligand-activated transcription factor which regulates the expression of specific target genes and is involved in proliferation, migration and inflammatory responses (Guan, Zhang et al. 2002). Rosiglitazone is an activator of PPAR $\gamma$  (Touyz and Schiffrin 2006).

**Objective:** The objective of this study was to investigate the reaction of the arterial wall following the coronary implantation of a polymer-free rosiglitazone-coated stent (RDES) in comparison with the uncoated stent (BMS) in the animal model.

**Methods:** In a random procedure, one RDES and one BMS were inserted in each of 12 porcine coronary arteries taken from six pigs (30 – 38 kg).

The PPAR $\gamma$  activator rosiglitazone was applied to a Translumina Yukon® stent. For the induction of inflammatory reactions and neointimal hyperplasia, each coronary artery was overstretched in the ratio of 1.3 – 1.5 : 1. For each pig, two coronary arteries were tested, one with an RDES and one with a BMS. The animals were observed over a period of three months. The histomorphometric and immunohistological evaluation of the arteries then followed.

**Results:** With all successfully performed interventions, all stents could be placed without difficulties. In the pigs with RDES, compared with BMS a significant reduction of the neointimal area (RDES<sub>total</sub> 1.72 mm<sup>2</sup>  $\pm$  0.70 vs. BMS<sub>total</sub> 2.28 mm<sup>2</sup>  $\pm$  1.24;  $p < 0.05$ ) and a significant reduction of the stenosis rate (RDES<sub>total</sub> 22.40%  $\pm$  9.88 vs. BMS<sub>total</sub> 29.74%  $\pm$  17.72;  $p < 0.05$ ) were found. The proliferation analysis with Ki-67 indicated a significantly

reduced proliferation for RDES compared with BMS for the *media* (RDES<sub>media</sub> 0.09% ± 0.01 vs. BMS<sub>media</sub> 0.27% ± 0.02; p < 0.05) and *neointima* (RDES<sub>neointima</sub> 0.07% ± 0.01 vs. BMS<sub>neointima</sub> 0.18% ± 0.02; p < 0.05). With the RDES, the endothelialisation was also complete after three months (RDES<sub>total</sub> 99.18% ± 0.42 vs. BMS<sub>total</sub> 99.31% ± 0.25; p = n.s.)

**Conclusion:** The local rosiglitazone treatment reduces the neointimal reaction and the rate of stenosis three months after the intervention. Rosiglitazone exhibits an antiproliferative effect on the cells of the *media* and *neointima*. The RDES did not impair endothelialisation. The data from this study show that, in the preclinical model, in the pig the local release of rosiglitazone via the RDES by PPAR $\gamma$ -activation leads to a local reduction of restenosis via the inhibition of proliferation in the arterial wall and therefore to no impairment of re-endothelialisation. The clinical use of rosiglitazone-coated stents could offer a therapeutic alternative to the present anti-proliferative DES therapy for the treatment of restenosis following stent implantation.



## 9 Literaturverzeichnis

- Actos, F. (2003). "21. Fachinformation Actos 45 mg Tabletten." *Takeda Global Research and Development Centre* (Europe) Ltd, London, UK: 1-24.
- Ajluni S. C. und R. D. Safian (1996). "Perforations after percutaneous coronary interventions: clinical, angiographic, and therapeutic observations." *Cathet Cardiovasc Diagn*; 32: 206–12.
- Al-Salman, J., H. Arjomand, et al. (2000). "Hepatocellular injury in a patient receiving rosiglitazone. A case report." *Ann Intern Med* 132(2): 121-4.
- Al Suwaidi, J., P. B. Berger, et al. (2000). "Coronary artery stents." *JAMA* 284(14): 1828-36.
- Allhoff, P. G. und U. Laaser (1989). "Management of increased cholesterol values in general practice-results of a survey of established primary care physicians." *Klin Wochenschr* 67(22): 1147-51.
- Allwork, S. P. (1987). "The applied anatomy of the arterial blood supply to the heart in man." *J Anat* 153: 1-16.
- Antman, E. M. und E. Braunwald (2001). "Acute Myocardial Infarction." *Heart Disease, A Textbook of cardiovascular medicine*, Philadelphia: 1184-207.
- Aronoff, S., S. Rosenblatt, et al. (2000). "Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group." *Diabetes Care* 23(11): 1605-11.
- Artinger, S., C. Deiner, et al. (2009). "Complex porcine model of atherosclerosis: induction of early coronary lesions after long-term hyperlipidemia without sustained hyperglycemia." *Can J Cardiol* 25(4): e109-14.
- Assmann, G. und H. Schulte (1987). "The Prospective Cardiovascular Munster Study: prevalence and prognostic significance of hyperlipidemia in men with systemic hypertension." *Am J Cardiol* 59(14): 9G-17G.
- Baldwin, S. J., S. E. Clarke, et al. (1999). "Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone." *Br J Clin Pharmacol* 48(3): 424-32.
- Balfour, J. A. und G. L. Plosker (1999). "Rosiglitazone." *Drugs* 57(6): 921-930.
- Bassand, J. P., C. W. Hamm, et al. (2007). "Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes." *Eur Heart J* 28(13): 1598-660.
- Bauriedel, G., R. Hutter, et al. (1997). "Decreased apoptosis as a pathogenic factor in intimal hyperplasia of human arteriosclerosis lesions." *Z Kardiol* 86(8): 572-80.
- Bavry, A. A., D. J. Kumbhani, et al. (2006). "Late thrombosis of drug-eluting stents: a meta-analysis of randomized clinical trials." *Am J Med* 119(12): 1056-61.

- Behnisch, B. (2006). "Translumina. Projekt Report." Batch Number: 20060115. Issue Date: 20050116. *Projekt Report*: 01-07.
- Benninghoff, A. und D. Drenckhahn (2004). "Anatomie-Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie." *Verlag Urban und Fischer Band 2*, 16. Auflage: 66-70.
- Berenson, G. S., S. R. Srinivasan, et al. (1998). "Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study." *N Engl J Med* 338(23): 1650-6.
- Berg, R., J. Aragon, et al. (2007). "Pimecrolimus and dual pimecrolimus-paclitaxel eluting stents decrease neointimal proliferation in a porcine model." *Catheter Cardiovasc Interv* 70(6): 871-9.
- Berger, J. und D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." *Annu Rev Med* 53: 409-35.
- Bestehorn, H. P. (1998). "Interventionelle Kardiologie. Koronarangiographie und PTCA-Indikation, Technik, Nachsorge." *Thieme*: 52-53.
- Bonadonna, R. C. und R. A. De Fronzo (1991). "Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes." *Diabete Metab* 17(1 Pt 2): 112-35.
- Bonora, E., G. Formentini, et al. (2002). "HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study." *Diabetes Care* 25(7): 1135-41.
- Bruemmer, D., F. Blaschke, et al. (2005). "New targets for PPARgamma in the vessel wall: implications for restenosis." *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1: S26-30.
- Bucher, O. und H. Wartenberg (1989). "Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen." *Verlag Hans Huber* 11. Auflage: 325-340.
- Buchwald, A. B., C. Unterberg, et al. (1992). "Low-molecular-weight heparin reduces neointimal proliferation after coronary stent implantation in hypercholesterolemic minipigs." *Circulation* 86(2): 531-7.
- Buja, L. M. und J. T. Willerson (1991). "Relationship of ischemic heart disease to sudden death." *J Forensic Sci* 36(1): 25-33.
- Calnek, D. S., L. Mazzella, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1): 52-7.
- Campbell, I. W. (2005). "The Clinical Significance of PPAR Gamma Agonism." *Curr Mol Med* 5(3): 349-63.
- Carey, D. G., G. J. Cowin, et al. (2002). "Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients." *Obes Res* 10(10): 1008-15.
- Carter, A. J., J. R. Laird, et al. (1994). "Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model." *J Am Coll Cardiol* 24(5): 1398-405.

- Choi, D., S. K. Kim, et al. (2004). "Preventative effects of rosiglitazone on restenosis after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Care* 27(11): 2654-60.
- Colombo, A., D. Orlic, et al. (2003). "Preliminary observations regarding angiographic pattern of restenosis after rapamycin-eluting stent implantation." *Circulation* 107(17): 2178-80.
- Consoli, A. und E. Devangelio (2005). "Thiazolidinediones and inflammation." *Lupus* 14(9): 794-7.
- Corcos, T., P. R. David, et al. (1985). "Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty." *Am Heart J* 109(5 Pt 1): 926-31.
- Cowan, D. B. und B. L. Langille (1996). "Cellular and molecular biology of vascular remodeling." *Curr Opin Lipidol* 7(2): 94-100.
- Currier, J. W. und D. P. Faxon (1995). "Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target?" *J Am Coll Cardiol* 25(2): 516-20.
- Davis, M. J. und A. Thomas (1984). "Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death." *N. Engl. J. Med* 310: 1137-1140.
- De Feyter, P. und D. Foley (1996). "Coronary stenting: has the rubicon been crossed?" *Heart* 75(2): 109-10.
- Debril, M. B., J. P. Renaud, et al. (2001). "The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *J Mol Med* 79(1): 30-47.
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, H.-u. K. (1998). "Leitlinie: Koronare Herzkrankheit, Angina pectoris." *Zeitschrift für Kardiologie* 87: 907-911.
- Diamant, M. und R. J. Heine (2003). "Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: current clinical evidence." *Drugs* 63(13): 1373-405.
- Dotter, C. T. (1969). "Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery." *Invest Radiol* 4(5): 329-32.
- Dotter, C. T. und M. P. Judkins (1964). "Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application." *Circulation* 30: 654-70.
- Douglas, W. R. (1972). "Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research." *Space Life Sci* 3(3): 226-34.
- Drachman, D. E., E. R. Edelman, et al. (2000). "Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months." *J Am Coll Cardiol* 36(7): 2325-32.
- Eastman, R. C., C. C. Cowie, et al. (1997). "Undiagnosed diabetes or impaired glucose tolerance and cardiovascular risk." *Diabetes Care* 20(2): 127-8.
- Engelhardt, v. W. und G. Breves (2000). "Physiologie der Haustiere." *Enke Verlag* 137, 283.

- Eppihimer, M. J., J. Russell, et al. (1998). "Differential expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in murine tissues." *Microcirculation* 5(2-3): 179-88.
- Erbel, R., J. Ge, et al. (1995). "Alternative methods in interventional therapy of coronary heart disease." *Z Kardiol* 84 Suppl 2: 53-64.
- Erbel, R., M. Haude, et al. (1998). "Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. Restenosis Stent Study Group." *N Engl J Med* 339(23): 1672-8.
- Erdmann, E., Erland, et al. (2004). "Glitazone - eine antidiabetische Substanzklasse aus kardiologischer Sicht: Neue Aspekte für eine gefäßorientierte Behandlung bei Diabetes mellitus Typ 2." *Deutsches Ärzteblatt* 101(44): A-2954 / B-2499 / C-2383.
- Facchini, F. S., N. Hua, et al. (2001). "Insulin resistance as a predictor of age-related diseases." *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3574-8.
- Falini, B., L. Flenghi, et al. (1989). "Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody." *J Histochem Cytochem* 37(10): 1471-8.
- Farb, A., P. F. Heller, et al. (2001). "Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent." *Circulation* 104(4): 473-9.
- Farb, A., D. K. Weber, et al. (2002). "Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans." *Circulation* 105(25): 2974-80.
- Finck, B. N., X. Han, et al. (2003). "A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3): 1226-31.
- Finn, A. V., G. Nakazawa, et al. (2007). "Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(7): 1500-10.
- Fischer, A., H. Wieneke, et al. (2001). "Metallic biomaterials for coronary stents." *Z Kardiol* 90(4): 251-62.
- Flueckiger, A., Y. Strahm, et al. (2009). "Intimal proliferation and restenosis in paclitaxel-eluting stents with aminoparylene as carrier substance in swines." *J Invasive Cardiol* 21(3): 128-32.
- Freed, M. I., R. Ratner, et al. (2002). "Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus." *Am J Cardiol* 90(9): 947-52.
- Freid, J., D. Everitt, et al. (2000). "Rosiglitazone and hepatic failure." *Ann Intern Med* 132(2): 164.
- Fujita, T., Y. Sugiyama, et al. (1983). "Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent." *Diabetes* 32(9): 804-10.
- Fuster, V. (1994). "Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology." *Circulation* 90(4): 2126-46.

- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." *J Clin Invest* 94(6): 2493-503.
- Gaziano, J. M. (1998). "When should heart disease prevention begin?" *N Engl J Med* 338(23): 1690-2.
- Gerdes, J., H. Lemke, et al. (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." *J Immunol* 133(4): 1710-5.
- Gerich, J. E. (1998). "The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity." *Endocr Rev* 19(4): 491-503.
- Gerrity, R. G., R. Natarajan, J. L. Nadler, and T. Kimsey. 2001. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes* 50:1654-1665.
- Gonschior, P., F. Gerheuser, et al. (1995). "Experimental directional atherectomy injury in arterial vessels: impact of trauma depth on cellular response." *Am Heart J* 129(6): 1067-77.
- Gratzner, H. G. (1982). "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." *Science* 218(4571): 474-5.
- Gray, R. S., R. R. Fabsitz, et al. (1998). "Risk factor clustering in the insulin resistance syndrome. The Strong Heart Study." *Am J Epidemiol* 148(9): 869-78.
- Gruntzig, A. (1978). "Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis." *Lancet* 1(8058): 263.
- Gruntzig, A. und D. A. Kumpe (1979). "Technique of percutaneous transluminal angioplasty with the Gruntzig ballon catheter." *AJR Am J Roentgenol* 132(4): 547-52.
- Gruntzig, A. R., A. Senning, et al. (1979). "Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty." *N Engl J Med* 301(2): 61-8.
- Guan, Y., Y. Zhang, et al. (2002). "The Role of PPARs in the Transcriptional Control of Cellular Processes." *Drug News Perspect* 15(3): 147-154.
- Haffner, S. M., C. M. Alexander, et al. (1999). "Reduced coronary events in simvastatin-treated patients with coronary heart disease and diabetes or impaired fasting glucose levels: subgroup analyses in the Scandinavian Simvastatin Survival Study." *Arch Intern Med* 159(22): 2661-7.
- Haffner, S. M., A. S. Greenberg, et al. (2002). "Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus." *Circulation* 106(6): 679-84.
- Haffner, S. M., S. Lehto, et al. (1998). "Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction." *N Engl J Med* 339(4): 229-34.
- Hoffmann, R., G. S. Mintz, et al. (1996). "Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study." *Circulation* 94(6): 1247-54.

- Hofling, B., P. Gonschior, et al. (1997). "Restenosis after angioplasty. Clinical significance, pathobiology, future developments for suppression of recurrent stenoses." *Internist (Berl)* 38(1): 31-43.
- Hofling, B., T. Y. Huehns, et al. (1995). "Drug and instrumental therapeutic approaches for prevention of restenosis." *Z Kardiol* 84 Suppl 4: 151-8.
- Hombach, V., M. Kochs, et al. (1997). "Alternatives to balloon angioplasty. Radio frequency angioplasty, directional coronary atherectomy, high frequency rotational angioplasty and coronary extraction atherectomy." *Internist (Berl)* 38(1): 11-9.
- Home, P. D., S. J. Pocock, et al. (2009). "Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial." *Lancet* 373(9681): 2125-35.
- Jacob, S. und N. Marx (2006). "Pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2. From the glucocentric tradition towards cardiovascular risk management." *Internist (Berl)* 47(4): 434, 436-40.
- Jiang, C., A. T. Ting, et al. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* 391(6662): 82-6.
- Johnson, L. L., L. M. Schofield, et al. (2004). "Uptake of <sup>111</sup>In-Z2D3 on SPECT imaging in a swine model of coronary stent restenosis correlated with cell proliferation." *J Nucl Med* 45(2): 294-9.
- Jungbluth, A., C. Duber, et al. (1988). "Morphology of the coronary arteries following percutaneous transluminal coronary angioplasty with hemopericardium." *Z Kardiol* 77(2): 125-9.
- Kautz-Freimuth, S. (1997). "Das akute koronare Syndrom." *Medizin Forum aktuell* 41: 1-4.
- Kim, W., M. H. Jeong, et al. (2005). "Effect of anti-oxidant (carvedilol and probucol) loaded stents in a porcine coronary restenosis model." *Circ J* 69(1): 101-6.
- Kliwer, S. A., J. M. Lenhard, et al. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." *Cell* 83(5): 813-9.
- Klinke, R. und S. Silbernagl (2001). "Lehrbuch der Physiologie. 3. vollständig überarbeitete Auflage." *Thieme Verlag*: 126.
- König, H. E. und H. G. Liebich (2002). "Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Organe, Kreislauf -und Nervensystem." *Schattauer Verlag Band II, 2. Auflage*: 160-161.
- Konrad, I. (2002). "Untersuchungen zum Einfluß der Koronar-Stent-Beschichtung mit Dexamethasonacetat-Dexamethason auf die Restenoserate im Schweinmodell." *Dissertation*: 85-99.
- Kornowski, R., G. S. Mintz, et al. (1997). "Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study." *Circulation* 95(6): 1366-9.

- Koshiyama, H., D. Shimono, et al. (2001). "Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 86(7): 3452-6.
- Kreuzer J., Tiefenbacher C (2003). "Atherosklerose - Taschenatlas spezial. Klinik und Therapie." *Thieme*: 62.
- Kutryk, M. J. und P. W. Serruys (1999). "Coronary Stenting. Current Perspectives." *Martin Dunitz Ltd., London, UK*: 311-319.
- Labinaz, M., K. Pels, et al. (1999). "Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries." *Cardiovasc Res* 41(1): 255-66.
- Law, R. E., S. Goetze, et al. (2000). "Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells." *Circulation* 101(11): 1311-8.
- Law, R. E., W. P. Meehan, et al. (1996). "Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia." *J Clin Invest* 98(8): 1897-905.
- Lee, K. T. (1986). "Swine as animal models in cardiovascular research." *Swine in biomedical research*(Tumbleson ME, Ed. New York, Plenum Publishing): 1481-1496.
- Lee, R. T. und P. Libby (1997). "The unstable atheroma." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(10): 1859-67.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, et al. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." *J Biol Chem* 270(22): 12953-6.
- Lemos, P. A., E. P. Mc Fadden, et al. (2004). "Sirolimus-releasing coronary stent: lessons from the Rotterdam experience." *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 53 Suppl 1: 32s-35s.
- Lemos, P. A., P. W. Serruys, et al. (2004). "Unrestricted utilization of sirolimus-eluting stents compared with conventional bare stent implantation in the "real world": the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry." *Circulation* 109(2): 190-5.
- Li, A. C., K. K. Brown, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice." *J Clin Invest* 106(4): 523-31.
- Li, C. und S. Risnes (2004). "A comparison of resins for embedding teeth, with special emphasis on adaptation to enamel surface as evaluated by scanning electron microscopy." *Arch Oral Biol* 49(1): 77-83.
- Li, M., G. Pascual, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene." *Mol Cell Biol* 20(13): 4699-707.
- Liebich, H. G. (2003). "Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis." *Schattauer Verlag* 4. Auflage: 133-135.
- Liistro, F., G. Stankovic, et al. (2002). "First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome." *Circulation* 105(16): 1883-6.

- Lindsay, J., R. Hebert, et al. (1997). "The Canadian Study of Health and Aging: risk factors for vascular dementia." *Stroke* 28(3): 526-30.
- Lister, Boam, et al. (1998). "Rosiglitazone increases pancreatic islet area, number and insulin content, but not insulin gene expression." *Diabetologia Abstract*(41): 7.
- Liu, M. W., G. S. Roubin, et al. (1989). "Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia." *Circulation* 79(6): 1374-87.
- Liu, Y., B. Dai, et al. (2010). "Rosiglitazone inhibits cell proliferation by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis in ADPKD cyst-lining epithelia cells." *Basic Clin Pharmacol Toxicol*: abstract [ahead of print].
- Lowe, H. C., R. S. Schwartz, et al. (2003). "The porcine coronary model of in-stent restenosis: current status in the era of drug-eluting stents." *Catheter Cardiovasc Interv* 60(4): 515-23.
- Lupi, R., S. Del Guerra, et al. (2004). "Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPARgamma2 in the modulation of insulin secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(4): E560-7.
- Mannebach, H., C. Hamm, et al. (2002). "18th report of the statistics of heart catheter laboratories in Germany. Results of a combined survey by the Committee of Clinical Cardiology and the Interventional Cardiology and Angiology Working Group (for ESC) of the German Society of Cardiology-Heart- and Cardiovascular Research 2001." *Z Kardiol* 91(9): 727-9.
- Marx, N., T. Bourcier, et al. (1999). "PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 546-51.
- Marx, N., H. Duez, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells." *Circ Res* 94(9): 1168-78.
- Marx, N., J. Froehlich, et al. (2003). "Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2): 283-8.
- Marx, N. und V. Hombach (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the vessel wall: new regulators of gene expression in vascular cells." *Z Kardiol* 90(7): 470-7.
- Marx, N., F. Mach, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells." *J Immunol* 164(12): 6503-8.
- Marx, N., U. Schonbeck, et al. (1998). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 83(11): 1097-103.
- Marx, N., G. Sukhova, et al. (1998). "Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma)." *Am J Pathol* 153(1): 17-23.



- Matiasek, J. (2006). "Drug-eluting-Stents - Entwicklung und Ausblick." *Journal für Kardiologie* 13(3-4): 85-89.
- Matter, C. M., I. Rozenberg, et al. (2006). "Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells." *J Cardiovasc Pharmacol* 48(6): 286-92.
- McGill, H. C., Jr. and C. A. McMahan (1998). "Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group." *Am J Cardiol* 82(10B): 30T-36T.
- Meisner, F., D. Walcher, et al. (2006). "Effect of rosiglitazone treatment on plaque inflammation and collagen content in nondiabetic patients: data from a randomized placebo-controlled trial." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4): 845-50.
- Meyer, J., A. Bokisch, et al. (2000). "Anatomie und Pathologie des Koronargefäßsystems. Physiologie und Pathophysiologie der Koronardurchblutung, Pathogenese der Atherosklerose." *Klinische Kardiologie*, E. Erdmann, eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 295-325.
- Min, K. M., S. W. Park, et al. (2002). "Troglitazone improves blood flow by inhibiting neointimal formation after balloon injury in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats." *Metabolism* 51(8): 998-1002.
- Miyauchi, K., T. Kasai, et al. (2008). "Effectiveness of statin-eluting stent on early inflammatory response and neointimal thickness in a porcine coronary model." *Circ J* 72(5): 832-8.
- Miyazaki, Y., L. Glass, et al. (2001). "Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients." *Diabetologia* 44(12): 2210-9.
- Mohr, K. und S. Herzig (2001). "Glitazone-eine neue Substanzklasse in der Behandlung des Typ-2-Diabetes." *Der Arzneistoff*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 126.Jg(Nr. 34/35): 951-953.
- Morice, M. C., P. W. Serruys, et al. (2002). "A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization." *N Engl J Med* 346(23): 1773-80.
- Moses, J. W., M. B. Leon, et al. (2003). "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery." *N Engl J Med* 349(14): 1315-23.
- Muller, W. A., S. A. Weigl, et al. (1993). "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." *J Exp Med* 178(2): 449-60.
- Nagy, L., P. Tontonoz, et al. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." *Cell* 93(2): 229-40.
- Natali, A., S. Baldeweg, et al. (2004). "Vascular effects of improving metabolic control with metformin or rosiglitazone in type 2 diabetes." *Diabetes Care* 27(6): 1349-57.
- NECP (1993). "State-specific changes in cholesterol screening--behavioral risk factor surveillance system, 1988-1991." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42(34): 663-4, 667-8.

- Neumann, F. J., H. Walter, et al. (1996). "Coronary Palmaz-Schatz stent implantation in acute myocardial infarction." *Heart* 75(2): 121-6.
- Nickel, R., A. Schummer, et al. (1984). "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere." *Verlag Paul Parey Band III, Zweite Auflage*: 43.
- Nickel, R., A. Schummer, et al. (1984). "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere." *Verlag Paul Parey Band III, Zweite Auflage*: 53-58.
- Nikol, S. und B. Hofling (1995). "Regulation of smooth muscle cell proliferation and its possible role in preventing restenosis post-angioplasty." *Wien Klin Wochenschr* 107(13): 379-89.
- Nissen, S. E. und K. Wolski (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med* 356(24): 2457-71.
- O'Brien, J. E., Jr., Y. Shi, et al. (1997). "Wound healing around and within saphenous vein bypass grafts." *J Thorac Cardiovasc Surg* 114(1): 38-45.
- Payton, C. G. (1932). "The Growth in Length of the Long Bones in the Madder-fed Pig." *J Anat* 66(Pt 3): 414-425.
- Peters, S., B. Behnisch, et al. (2009). "First-in-man use of polymer-free valsartan-eluting stents in small coronary vessels: a comparison to polymer-free rapamycin (2%)-eluting stents." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10(2): 91-5.
- Profit, S. und U. Unteregger (2001). "Quantitative measurement of cell proliferation using the Brdu ELISA." *Biochemica* 04(1): 33-35
- Pschyrembel (2002). "Klinisches Wörterbuch." *Verlag de Gruyter 259. Auflage*: 1458.
- Puel, J., F. Joffre, et al. (1987). "Self-expanding coronary endoprosthesis in the prevention of restenosis following transluminal angioplasty. Preliminary clinical study." *Arch Mal Coeur Vaiss* 80(8): 1311-2.
- Pyorala, K., M. Laakso, et al. (1987). "Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view." *Diabetes Metab Rev* 3(2): 463-524.
- Raines, E. W. und R. Ross (1993). "Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis." *Br Heart J* 69(1 Suppl): S30-7.
- Rajavashisth, T. B., A. Andalibi, et al. (1990). "Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins." *Nature* 344(6263): 254-7.
- Ratner, R. E., C. P. Cannon, et al. (2008). "Assessment on the Prevention of Progression by Rosiglitazone on Atherosclerosis in diabetes patients with Cardiovascular History (APPROACH): study design and baseline characteristics." *Am Heart J* 156(6): 1074-9.
- Reifart, N. (1995). "PTCA or alternative techniques? Balloon angioplasty remains dominant." *Z Kardiol* 84 Suppl 2: 43-52.
- Reitman, J. S., R. W. Mahley, et al. (1982). "Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis." *Atherosclerosis* 43(1): 119-32.

- Ricote, M., J. Huang, et al. (1998). "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7614-9.
- Ricote, M., A. C. Li, et al. (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* 391(6662): 79-82.
- Robinson, K. A., G. S. Roubin, et al. (1988). "Intra-arterial stenting in the atherosclerotic rabbit." *Circulation* 78(3): 646-53.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* 362(6423): 801-9.
- Ross, R. (1995). "Cell biology of atherosclerosis." *Annu Rev Physiol* 57: 791-804.
- Ross, R. und J. A. Glomset (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." *N Engl J Med* 295(7): 369-77.
- Ross, R. und L. Harker (1976). "Hyperlipidemia and atherosclerosis." *Science* 193(4258): 1094-100.
- Rupprecht, H. J., B. Nowak, et al. (1997). "PTCA in unstable angina pectoris." *Internist (Berl)* 38(1): 3-10.
- Schaper, W. (1995). "Control of coronary angiogenesis." *Eur Heart J* 16 Suppl C: 66-8.
- Scheller, B., A. Grandt, et al. (2005). "Comparative study of tacrolimus and paclitaxel stent coating in the porcine coronary model." *Z Kardiol* 94(7): 445-52.
- Scheunert, A. und A. Trautmann (1987). "Lehrbuch der Veterinär-Physiologie." *Verlag Paul Parey 1987 7. Auflage*: 258-260.
- Schöffmann, G. (2005). "Anästhesie beim Schwein." *VMU Wien* 1(1): 1-45.
- Scholzen, T. und J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-22.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, et al. (1996). "PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPARE in the lipoprotein lipase gene." *Embo J* 15(19): 5336-48.
- Schoonjans, K., B. Staels, et al. (1996). "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation." *Biochim Biophys Acta* 1302(2): 93-109.
- Schoonjans, K., B. Staels, et al. (1996). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression." *J Lipid Res* 37(5): 907-25.
- Schoser, B. G., K. Ricker, et al. (2004). "Sudden cardiac death in myotonic dystrophy type 2." *Neurology* 63(12): 2402-4.
- Schwartz, R. S., N. A. Chronos, et al. (2004). "Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn." *J Am Coll Cardiol* 44(7): 1373-85.

- Schwartz, R. S., E. R. Edelman, et al. (2002). "Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group." *Circulation* 106(14): 1867-73.
- Schwartz, R. S., K. C. Huber, et al. (1992). "Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model." *J Am Coll Cardiol* 19(2): 267-74.
- Schwartz, S. M. (1997). "Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis." *J Clin Invest* 100(11 Suppl): S87-9.
- Scott, N. A., G. D. Cipolla, et al. (1996). "Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries." *Circulation* 93(12): 2178-87.
- Seedat, Y. K. und F. G. Mayet (1993). "Coronary heart disease in South African Indians: role of insulin resistance and hypertension." *J Hum Hypertens* 7(6): 525-7.
- Sidhu, J. S., Z. Kaposzta, et al. (2004). "Effect of rosiglitazone on common carotid intima-media thickness progression in coronary artery disease patients without diabetes mellitus." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(5): 930-4.
- Sievert, H., K. Rauber, et al. (1987). "Imaging of aortocoronary bypasses with intravenous digital subtraction angiography." *Z Kardiol* 76(12): 733-6.
- Sigwart, U. (1990). "Coronary endoprostheses (stents)." *Herz* 15(5): 319-28.
- Sigwart, U., P. Urban, et al. (1988). "Emergency stenting for acute occlusion after coronary balloon angioplasty." *Circulation* 78(5 Pt 1): 1121-7.
- Silber, S. (2007). "Wirksamkeit und Sicherheit von Medikamenten-freisetzenden Koronarstents (DES)-ein Positionspapier der DGK." *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK) Presstext DGK 04/2007*.
- Skold, B. H., R. Getty, et al. (1966). "Spontaneous atherosclerosis in the arterial system of aging swine." *Am J Vet Res* 27(116): 257-73.
- Skrabanek, P. (1994). "The emptiness of the black box." *Epidemiology* 5(5): 553-5.
- Staels, B. und J. C. Fruchart (2005). "Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists." *Diabetes* 54(8): 2460-70.
- Statistisches Bundesamt (2009). "Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland." *Metzel-Poeschel*: 247.
- Stierle, U. und C. Niederstadt (2003). "Klinikleitfaden Kardiologie." *Urban & Fischer (3.Aufl. 2003)*: 185.
- Stone, G. W., S. G. Ellis, et al. (2004). "A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease." *N Engl J Med* 350(3): 221-31.
- Strauer, B. E. (1991). "Development of cardiac failure by coronary small vessel disease in hypertensive heart disease?" *J Hypertens Suppl* 9(2): 11-20.
- Strauer, B. E. (1999). "Klinische Kardiologie." *3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg*: 357-471.

- Tao, L., H. R. Liu, et al. (2003). "Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia." *Circulation* 108(22): 2805-11.
- Thornton, M. A., A. R. Gruentzig, et al. (1984). "Coumadin and aspirin in prevention of recurrence after transluminal coronary angioplasty: a randomized study." *Circulation* 69(4): 721-7.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." *Cell* 79(7): 1147-56.
- Tontonoz, P., L. Nagy, et al. (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* 93(2): 241-52.
- Touyz, R. M. und E. L. Schiffrin (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications." *Vascul Pharmacol* 45(1): 19-28.
- Tugwood, J. D., I. Issemann, et al. (1992). "The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene." *Embo J* 11(2): 433-9.
- Vamecq, J. und N. Latruffe (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their implications in diseases." *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 7(1): 8-18.
- van der Giessen, W. J., A. M. Lincoff, et al. (1996). "Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries." *Circulation* 94(7): 1690-7.
- Virmani, R., FD Kolodgie, et al. (2003). "Drug eluting stents: are human and animal studies comparable?" *Heart* 89(2): 133-8.
- Virmani, R., G. Guagliumi, et al. (2004). "Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious?" *Circulation* 109(6): 701-5.
- Wagner, J. (1991). "Koronare Herzkrankheit." *Praktische Kardiologie*, J. Wagner, ed., de Gruyter, Berlin: 242-267.
- Wakino, S., U. Kintscher, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit mitogenic induction of p21(Cip1) by modulating the protein kinase Cdelta pathway in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 276(50): 47650-7.
- Walcher, D. und N. Marx (2006). "Glitazone 2006-ein Update." *J Kardiol* 2006 13(5-6): 140-143.
- Wang, C. H., R. D. Weisel, et al. (2003). "Glitazones and heart failure: critical appraisal for the clinician." *Circulation* 107(10): 1350-4.
- Wang, M. und S. Tafuri (2003). "Modulation of PPARgamma activity with pharmaceutical agents: treatment of insulin resistance and atherosclerosis." *J Cell Biochem* 89(1): 38-47.

- Way, J. M., W. W. Harrington, et al. (2001). "Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression." *Endocrinology* 142(3): 1269-77.
- Weaver, M. E., G. A. Pantely, et al. (1986). "A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man." *Cardiovasc Res* 20(12): 907-17.
- Weyrauch, K. D., A. Smollich, et al. (1998). "Histologie-Kurs für Veterinärmediziner." *Enke-Verlag Stuttgart*: 154.
- Wiesner, E. und R. Ribbeck (2000). "Lexikon der Veterinärmedizin." *Enke-V. 4. Auflage*: 67.
- Wiesner, E. und R. Ribbeck (2000). "Lexikon der Veterinärmedizin." *Enke-V. 4. Auflage*: 794.
- Willson, T. M., M. H. Lambert, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease." *Annu Rev Biochem* 70: 341-67.
- Wilson, P. W. (1998). "Diabetes mellitus and coronary heart disease." *Am J Kidney Dis* 32(5 Suppl 3): 89-100.
- Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, et al. (1998). "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." *Circulation* 97(18): 1837-47.
- Wofford, J. L., F. R. Kahl, et al. (1991). "Relation of extent of extracranial carotid artery atherosclerosis as measured by B-mode ultrasound to the extent of coronary atherosclerosis." *Arterioscler Thromb* 11(6): 1786-94.
- Wolffenbuttel, B. H., R. Gomis, et al. (2000). "Addition of low-dose rosiglitazone to sulphonylurea therapy improves glycaemic control in Type 2 diabetic patients." *Diabet Med* 17(1): 40-7.
- Xin, X., S. Yang, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro." *J Biol Chem* 274(13): 9116-21.
- Yang, R., C. M. Davies, et al. (2003). "Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections." *Eur Cell Mater* 6: 57-71.
- Yki-Jarvinen, H. (2004). "Thiazolidinediones." *N Engl J Med* 351(11): 1106-18.

## 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Das Schweineherz in computergestützter Bildanalyse (64-Zeilen-CT-Technik).	11
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des Wandaufbaus einer gesunden Arterie.	13
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung der Atherogenese.	15
<b>Abb. 4:</b> Strukturformel von Rosiglitazon.	24
<b>Abb. 5:</b> Schwein in Narkose vor Intervention (A), Vorbereitung der OP-Utensilien (B).	32
<b>Abb. 6:</b> Angiographische Darstellung des RCA.	34
<b>Abb. 7:</b> Angiographische Darstellung des RCX.	34
<b>Abb. 8:</b> Angiographische Darstellung des RIVA.	34
<b>Abb. 9:</b> Stent-Coating-Machine (A), Kartuschensystem (B), Kartuschensystem (C).	35
<b>Abb. 10:</b> RDES, (YUKON®), dilatiert mit 16 bar (A und B).	36
<b>Abb. 11:</b> Eröffneter Brustkorb (A), Perfusionsfixation (B).	39
<b>Abb. 12:</b> Rotationsmikrotom HM 355 S, Gerät (A) und Vergrößerung (B).	41
<b>Abb. 13:</b> Histomorphometrie.	47
<b>Abb. 14:</b> Schematische Darstellung des Injury Score und neointimale Reaktion.	48
<b>Abb. 15:</b> Schwein 7 RCA (RDES), 20 x Vergrößerung (A) und Schwein 7 RCA (RDES), 100 x Vergrößerung (B), NI-Proliferation über einem Stentstrut.	49
<b>Abb. 16:</b> Schwein 5 RCA (RDES), 400 x Vergrößerung, Neointima (A) und Neointima mit Messraster (B), Gesamtzellzahlbestimmung.	50
<b>Abb. 17:</b> Masterquerschnitt, der in vier Quadranten eingeteilt wurde, 20 x Vergrößerung (A). Ausschnitt aus Bild A, Erfassung des Bereiches vollständiger Endothelialisierung, 100 x Vergrößerung (B).	51
<b>Abb. 18:</b> Repräsentative Querschnitte drei Monate nach der Intervention.	53
<b>Abb. 19:</b> Neointimafläche aller Segmente der RDES und BMS.	54
<b>Abb. 20:</b> Neointimafläche der proximalen, medialen und distalen Segmente.	55
<b>Abb. 21:</b> NI-Dicke über den Struts der RDES und BMS.	55
<b>Abb. 22:</b> Mittlerer Verletzungsindex des Injury Score der RDES und BMS.	56

---

<b>Abb. 23:</b> Lineare Regression der Injury Score und NI-Dicke über den Stentstruts.	56
<b>Abb. 24:</b> Stenoserate aller Segmente der RDES und BMS.	57
<b>Abb. 25:</b> Stenoserate der proximalen, medialen und distalen Segmente.	58
<b>Abb. 26:</b> Lumenverlust aller Segmente der RDES und BMS.	59
<b>Abb. 27:</b> Media-Fläche aller Segmente der RDES und BMS.	59
<b>Abb. 28:</b> Adventitiafläche aller Segmente der RDES und BMS.	60
<b>Abb. 29:</b> Gesamtarterienfläche aller Segmente der RDES und BMS.	61
<b>Abb. 30:</b> Residuallumenfläche aller Segmente der RDES und BMS.	61
<b>Abb. 31:</b> LEI-Fläche aller Segmente der RDES und BMS.	62
<b>Abb. 32:</b> LEE-Fläche aller Segmente der RDES und BMS.	62
<b>Abb. 33:</b> Schwein 5 RCA (RDES), 400 x Vergrößerung (A) und Schwein 4 RCX (BMS), 400 x Vergrößerung (B), BrDu-positive Zellkerne.	63
<b>Abb. 34:</b> Immunohistochemische Färbung von proliferierenden Zellen (Ki-67).	64
<b>Abb. 35:</b> Proliferationsindex Ki-67 (%) für die <i>Neointima</i> .	65
<b>Abb. 36:</b> Proliferationsindex Ki-67 (%) für die <i>Media</i> .	65
<b>Abb. 37:</b> Proliferationsindex Ki-67 (%) für die <i>Adventitia</i> .	66
<b>Abb. 38:</b> Immunhistochemische Färbung von Endothelzellen.	67
<b>Abb. 39:</b> Endothelialisierung (%).	67
<b>Tab. 1:</b> Behandlungsprotokoll.	37
<b>Tab. 2:</b> Injury Score (0-3) nach Schwartz, Huber et al. (1992).	48



## 11 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
AV	atrioventrikular
bar	gesetzliche Einheit für den Druck
Bax	proapoptotische Protein
Bcl-2	protektiv mitochondriales Protein
BMS	Bare Metal Stent
BrDu	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBF	Campus Benjamin Franklin
CDK	Cyklinabhängige Kinase
CHD	Coronary heart disease
cm	Zentimeter
DES	Drug Eluting Stent
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
et al.	et altera (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Administration
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
°C	Grad Celsius
h	hora (Stunde)
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin und Eosin
HES	Hydroxethylstärke

HMV	Herzminutenvolumen
ICAM	Inter Cellular Adhesion Molecule
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IMT	Intima-Media-Dicke
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
ISR	In-Stent-Restenose
i.v.	intra venös
kg	Kilogramm
KGW	Kilogramm Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LAD	Left Anterior Descending
LCA	Arteria Coronaria Sinistra
LDL	Low Density Lipoprotein
LEE	Lamina Elastica Externa
LEI	Lamina Elastica Interna
Lsg.	Lösung
MEA	Metoxyethylacetat
med.	medizinisch
mg	Milligramm
mind.	mindestens
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuklear Faktor Kappa B
NI	Neointimafläche
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
OP	Operation
PCI	Perkutane Koronare Intervention

pH	pondus Hydrogenii
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Acivated Receptor Gamma
PPRE	PPAR-response elements
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty
R.	Ramus
RAR	Retinoid Acid Receptor
RAO	Right Artery Oblique
RBP	Retinoblastomprotein
RCA	Right Coronary Artery
RCX	Ramus Circumflexus (der linken Koronararterie)
RDES	Rosiglitazon-beschichteter Drug Eluting Stent
RL	Residuallumen
resp.	respektive
RIVA	Ramus interventricularis anterior (der linken Koronararterie)
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Receptor
s	Sekunde
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
Tabl.	Tablette
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZD	Thiazolidindione
u.a.	unter anderem
V.	Vena
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF-1	Vascular Endothelial Growth Factor-1
VEGF-2	Vascular Endothelial Growth Factor-2
Vit.	Vitamin
vs.	versus
VSMC	Gefäßmuskelzelle
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ m	Mikrometer

## 12 Publikationen

### Kongressbeiträge und Artikel

1. Artinger, S., Klinowski, J., Dang-Heine, C., Bösel, D., Utchil, S., Loddenkemper, C., Pels, K. "Einfluss eines Rosiglitazon-beschichteten Stents auf die In-Stent-Restenose im porcinen koronaren Restenosemodell." Angenommen für die 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2008, Mannheim.
2. Dang-Heine, C., Utchil, S., Artinger, S., Bösel, D., Klinowski, J., Loddenkemper, C., Pels, K. "Antiinflammatorische Effekte nach lokaler koronarer Rosiglitazontherapie im Stentmodell am Schwein." Angenommen für die 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2008, Blaubeuren.
3. Dang-Heine, C., Utchil, S., Artinger, S., Bösel, D., Klinowski, J., Loddenkemper, C., Schultheiss, H. P., Pels, K. "Identification of differentially expressed genes after local rosiglitazone treatment of in-stent-restenosis in a porcine coronary model." Angenommen für den Kongress der European Society of Cardiology (ESC) 2008, München.
4. Artinger, S., Klinowski, J., Dang-Heine, C., Utchil, St., Loddenkemper, C., Schultheiss, H. P., Pels, K. "Reduction of in-stent-restenosis after local rosiglitazone treatment in a porcine coronary restenosis model." Angenommen für den Kongress der European Society of Cardiology (ESC) 2008, München.
5. Pels, K., Utchil, S., Bösel, D., Klinowski, J., Loddenkemper, C., Schultheiss, H. P., Dang-Heine, C. "Beneficial gene profile after local rosiglitazone treatment of in-stent-restenosis in a porcine coronary model." Angenommen für den Kongress der European Society of Cardiology (ESC) 2009, München.
6. Artinger, S., Klinowski, J., Dang-Heine, C., Bösel, D., Utchil, S., Loddenkemper, C., Schultheiss, H. P., Pels, K. (2009). "Reduction of in-stent-restenosis after local rosiglitazone treatment in a porcine coronary model." *Eur Heart J* (Suppl 1), P428, 29.
7. Utchil, S., Dang-Heine, C., Klinowski, J., Bösel, D., Deiner, C., Schultheiss, H. P., Pels, K. "Local intracoronary rosiglitazone treatment induces a vasoprotective gene expression profile and complete reendothelialization in a porcine in-stent-restenosis

model.“ Angenommen für den 59. Jahreskongress der American College of Cardiology (ACC) 2010, Atlanta.

8. Pels, K., Utchil, S., Bösel, D. Klinowski, J., Loddenkemper, C., Schultheiss, H. P., Dang-Heine, C. "Modulation of lipid metabolism after local rosiglitazone treatment of in-stent-restenosis in a porcine coronary model." Angenommen für den Kongress der European Society of Cardiology (ESC) 2010, Stockholm.

### **Manuskripte in Vorbereitung**

1. Carolin Deiner, Jens Klinowski, Chantip Dang-Heine, Stefanie Utchil, Bori Behnisch, Martin Kolisek, Nikolaus Marx, Heinz-Peter Schultheiss, Klaus Pels. "A polymer-free rosiglitazone-eluting stent is superior to a bare metal stent in non-diseased porcine coronary arteries."
2. Chantip Dang-Heine, Stefanie Utchil, Sandra Artinger, Jens Klinowski, Diana Bösel, Carolin Deiner, Christoph Loddenkemper, Heinz-Peter Schultheiss, Klaus Pels. "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulates gene expression after local rosiglitazone treatment of in-stent-restenosis in a porcine coronary model."

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Dr. Klaus Pels danke ich für die Überlassung des Themas, sowie das in mich gesetzte Vertrauen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die gewährte Förderung und Unterstützung bedanken.

Für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin engagiert zu vertreten, danke ich Herrn Prof. Dr. Achim Gruber.

Dr. Sandra Artinger danke ich für die freundschaftliche und gute Betreuung innerhalb und außerhalb des Institutes und dafür, dass sie mir bei aufgetretenen Schwierigkeiten immer wieder den Rücken gestärkt hat. Besonders bedanke ich mich bei dir Sandra für deine Beratung hinsichtlich der Laborarbeit und der statistischen Bearbeitung des umfangreichen Datenmaterials.

Besonderen Anteil an der Beschaffung finanzieller Mittel hat Dr. Carolin Deiner, die mir darüber hinaus von Beginn an der Arbeit eine hilfsbereite Ansprechpartnerin gewesen ist.

Ich bedanke mich bei Dr. Chantip Dang-Heine, die mich insbesondere bei der Fertigstellung der Diskussion begleitet und unterstützt hat.

Ferner gilt mein Dank Diana Bösel, die mir bei der Anfertigung der histologischen Präparate und der Thematik rund um die Immunhistologie eine wichtige Hilfe war.

Gudrun und Hilmar Guntowski danke ich für die rechtschreibliche Überprüfung des Textes.

Mein Dank gilt auch den Tierpflegerinnen der FEM für ihre hingebungsvolle Pflege der Schweine.

Ebenso herzlich zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. Matthias Ladeburg, durch den es erst möglich wurde, diese interessante und bereichernde Arbeit am Institut wahrzunehmen.

Was aus einem zufälligen Gespräch so entstehen kann..

## **14 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Diese Arbeit war in keinem Fall schon einmal Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens.

Berlin, den 01.09.2010

Jens Klinowski