

Aus der Klinik für Angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des  
Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

Orales Everolimus inhibiert neointimale Proliferation in  
transkutan implantierten Herzklappenstents  
in der pulmonalen Position bei Schweinen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Klaus Pietzner

aus Speyer

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. T. A. Kühne

2. Prof. Dr. med. H. Abdul-Khaliq

3. Prof. Dr. med. S. Dittrich

Datum der Promotion: 27.03.2009

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>- 6 -</b>
2.1	PERKUTANER ERSATZ VON HERZKLAPPEN .....	- 7 -
2.2	LANGLEBIGKEIT VON HERZKLAPPENSTENTS.....	- 9 -
2.3	THERAPIEANSÄTZE IM RAHMEN VON INTIMAHYPERPLASIE NACH STENTIMPLANTATION.....	- 10 -
2.4	EINSATZ VON EVEROLIMUS ZUR UNTERDRÜCKUNG VON NEOINTIMALER PROLIFERATION .....	- 13 -
<b>3</b>	<b>HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>- 16 -</b>
4.1	DESIGN DES HERZKLAPPENSTENTS .....	- 16 -
4.2	EVALUIERUNG DER PROTHETISCHEN HERZKLAPPE IN-VITRO (FLUSSPHANTOM) .....	- 17 -
4.3	ABLAGESYSTEM .....	- 18 -
4.4	DESIGN DER TIERSTUDIE .....	- 19 -
4.5	DURCHFÜHRUNG VON EINGRIFFEN .....	- 20 -
4.6	INTERVENTIONELLE IMPLANTATION .....	- 21 -
4.7	PERI- UND POSTINTERVENTIONELLE MEDIKATION .....	- 22 -
4.8	BEHANDLUNG MIT EVEROLIMUS UND POSTINTERVENTIONELLER VERLAUF .....	- 22 -
4.9	HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN: INITIAL UND NACH DREI MONATEN.....	- 23 -
4.10	MAKROSKOPISCHE INSPEKTION, HISTOLOGIE UND REM.....	- 24 -
4.11	STATISTIK.....	- 25 -
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 25 -</b>
5.1	EVALUIERUNG DER PROTHETISCHEN HERZKLAPPE IN-VITRO (FLUSSPHANTOM) .....	- 25 -
5.2	ABLAGESYSTEM .....	- 26 -
5.3	DURCHFÜHRUNG VON EINGRIFFEN .....	- 26 -
5.4	INTERVENTIONELLE IMPLANTATION .....	- 26 -
5.5	PERI- UND POSTINTERVENTIONELLE MEDIKATION .....	- 27 -
5.6	BEHANDLUNG MIT ORALEM EVEROLIMUS UND POSTINTERVENTIONELLER VERLAUF ....	- 28 -
5.7	HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN: INITIAL UND NACH 3 MONATEN .....	- 29 -
5.8	MAKROSKOPISCHE INSPEKTION, HISTOLOGIE UND REM.....	- 32 -
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>- 38 -</b>
6.1	URSACHEN FÜR IMPLANTATVERSAGEN BEI HERZKLAPPENSTENTS .....	- 39 -
6.2	ENTSTEHUNG VON INTIMAHYPERPLASIE NACH IMPLANTATION VON HERZKLAPPENSTENTS .....	- 41 -
6.3	NEOINTIMALE PROLIFERATION ALS STÖRFAKTOR DER KLAPPENFUNKTION BEIM HERZKLAPPENSTENT .....	- 44 -
6.4	INHIBIERENDE WIRKUNG VON EVEROLIMUS AUF NEOINITMALE PROLIFERATION.....	- 46 -
6.5	EINSCHRÄNKUNGEN .....	- 50 -
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>- 52 -</b>

8.1	EINLEITUNG .....	- 52 -
8.2	MATERIAL UND METHODEN .....	- 52 -
8.3	ERGEBNISSE.....	- 53 -
8.4	SCHLUSSFOLGERUNG.....	- 54 -
<b>9</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>- 54 -</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>- 62 -</b>
10.1	PUBLIKATIONSLISTE.....	- 63 -
<b>11</b>	<b>ERKLÄRUNG DER EIGENSTÄNDIGKEIT .....</b>	<b>- 66 -</b>

## **1 Abkürzungsverzeichnis**

MRT: Magnetresonanztomographie

HKS: Herzklappenstent

RV: Rechter Ventrikel

RVOT: Rechtsventrikulärer Ausflusstrakt

SV: Schlagvolumen

HMV: Herzminutenvolumen

PA: Pulmonalarterie

REM: Rasterelektronenmikroskopie

PTA: Periphere transluminale Angioplastie

IH: Intimahyperplasie

VEC: velocity encoded cine

DES: drug eluting stents

BMS: bare metal stent

i.v.: intravenös

kgKG: Kilogramm Körpergewicht

## 2 Einleitung

Der große Fortschritt der interventionellen Kardiologie ermöglicht dem Interventionisten heutzutage die Behandlung von Erkrankungen des Herzens, die früher ausschließlich dem Chirurgen vorbehalten war. Die minimalinvasive perkutane Therapie mit kathetergestützten Methoden macht dabei in der modernen Medizin in bestimmten Situationen einen chirurgischen Eingriff unnötig und birgt enorme Vorteile. Die Liegedauer des Patienten ist kürzer und die Akzeptanz verbessert. Aus diesen Gründen konnten sich interventionelle Behandlungsansätze bei bestimmten Krankheitsbildern durchsetzen.

Auch Erkrankungen der Herzklappen können seit langer Zeit mit interventionellen Therapiestrategien behandelt werden. Ein Beispiel ist die Valvuloplastie mit Ballonkathetern, welche zwar schon seit den achtziger Jahren bekannt ist, aber bis heute mit Erfolg eingesetzt wird.

Der chirurgische Ersatz von Herzklappen ist eine häufig durchgeführte Therapie und der Goldstandard für Herzklappenerkrankungen im Endstadium. Die Technik der Implantation von künstlichen Herzklappen hat sich seit ihrer Einführung stark verbessert. Dieser Fortschritt konnte durch neue Generationen von Implantaten, verbesserte Operationstechnik und eine Optimierung der extrakorporalen Zirkulation erreicht werden. Trotzdem bleibt die chirurgische Implantation von Herzklappen unter Kardioplegie und extrakorporaler Zirkulation ein massiver Eingriff mit nicht zu unterschätzenden Risiken.(1) Diese Tatsache ist gerade bei pädiatrischen Patienten ein Problem. Kinder mit angeborenen Herzfehlern erreichen heute Dank verbesserter Diagnostik und optimierten Therapiestrategien ein immer höheres Alter. (2) Die begrenzte Haltbarkeit von bioprothetischen Herzklappen und die Problematik eines teils noch nicht ausgewachsenen Patienten macht besonders in diesem Patientenkollektiv im Laufe der Zeit einen oft mehrfachen chirurgischen Austausch des Implantats nötig.(2) Mit jedem erneuten Wechsel wird der Eingriff jedoch komplizierter und die damit verbundenen Risiken steigen an.(3)

## 2.1 *Perkutaner Ersatz von Herzklappen*

Bis vor einigen Jahren gab es bei gestellter Indikation zum Herzklappenersatz keine Alternative zum chirurgischen Vorgehen bei der Implantation einer prothetischen Klappe. Seit ersten Machbarkeitsstudien im Jahr 2000 entwickelt sich jedoch auch der perkutane Ersatz von Herzklappen mittels Kathetertechnik zu einem dynamischen Schwerpunkt interventioneller kardiologischer Forschung.

Die Pionierarbeit in diesem neuartigen Feld des Klappenersatzes leisteten P. Bonhoeffer und seine Mitarbeiter. Das von ihnen vorgestellte System basiert auf einem ballonexpandierbaren Platin-Iridium Stent, in welchen eine bovine jugulare Venenklappe (Contegra) eingenäht ist.(4) Die gleiche Art von biologischer Klappe wird auch in der Kardiochirurgie als biologisches Klappenimplantat seit einiger Zeit verwendet und zeigt dort zufriedenstellende Ergebnisse.(5) Dieser neuartige Herzklappenstent kann anschließend mittels konventioneller Stentablagetechnik durch ein Kathetersystem implantiert werden und verspricht enorme Vorteile im Management des Herzklappenersatzes, von denen nicht nur der pädiatrische Patient profitieren könnte. Auf eine Operation mit extrakorporaler Zirkulation und den damit behafteten Risiken könnte verzichtet werden und die Herzklappe bei schlagendem Herzen in einem relativ kurzen interventionellen Eingriff ersetzt werden. Im Tiermodell konnte die Machbarkeit dieser Methode bewiesen werden.(4) Es zeigte sich die Sicherheit des Konzepts während der Implantation und exzellente hämodynamische Eigenschaften der prothetischen Klappe in vitro und in vivo.(6-8) Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden HKS mit integrierten Contegra-Klappen neuerdings in den klinischen Gebrauch eingeführt. Herzklappenstents mit diesem Design wurden erfolgreich in ein größeres Patientenkollektiv implantiert.(9) Der Großteil dieser Patienten hatte zuvor schon einen rekonstruierenden chirurgischen Eingriff des rechtsventrikulären Ausflußtraktes hinter sich („right ventricle to pulmonary artery conduit“) und wies nun eine Fehlfunktion des „conduits“ auf. Der erste klinische Einsatz beschränkte sich auf einen rekonstruierten Ausflusstrakt als Implantationsort, mittlerweile werden aber auch HKS in den nativen Ausflusstrakt implantiert.(10) Die Methode der perkutanen Transkathetertechnik wurde für den Ersatz der Pulmonalklappe entwickelt und in dieser Position initial erprobt. In folgenden Arbeiten konnte aber auch über den erfolgreichen Einsatz dieser Methode in der wegen wesentlich höheren Drücken und der Gefahr der Verlegung des

Koronararterienabgangs anspruchsvolleren Aortenposition berichtet werden. (8, 11, 12) Der Einsatzschwerpunkt dieser Technik ist heute die pulmonale und aortale Position und immer mehr erfolgreiche Implantationen klappentragender Stents im Tiermodell und im Menschen werden berichtet.(13-16) Aber auch die erfolgreiche perkutane Implantation von Atrioventrikularklappen wurde veröffentlicht.(17)

Erste Analysen der klinischen Anwendung zeigten, dass diese neue Art des Klappenersatzes der chirurgischen Implantation von Pulmonalklappen bei einem eingeschränkten Kollektiv (z.B. ohne Patienten mit aneurysmatischem RVOT) in Bezug auf Todesfälle und Komplikationsrate nicht unterlegen ist.(18) Wenn sich auch in zukünftigen Studien die Sicherheit der Methode und die zumindest Gleichwertigkeit in punkto Komplikationsrate während des Eingriffs bestätigt, kann diese interventionelle Strategie durchaus zu einem Standardverfahren im Management des Herzklappenersatzes aufsteigen. Denn aufgrund der wesentlich geringeren Invasivität ergebend sich große Vorteile für dieses Verfahren. So erweitert sich die Möglichkeit des Klappenersatzes auch auf Hochrisikopatienten mit Kontraindikation für eine Operation. Da keine Thorakotomie nötig ist, kann außerdem von einer erheblichen Verminderung postinterventioneller Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Infektionen und Thrombosen ausgegangen werden. Zudem verspricht dieses Verfahren wesentlich kürzere Liegezeiten und eine erhebliche Kostenersparnis. Aus diesen Gründen und einer sehr wahrscheinlich großen Popularität beim Patienten wird dieser Methode ein großes Potential und eine stark steigende Anwendung in der Zukunft vorausgesagt.

Noch weist die Contegra-Klappe einige Einschränkungen auf. Sie ist, limitiert durch den maximalen Durchmesser der bovinen Vena jugularis, nur bis zu einer Größe von circa 20 mm verfügbar. Durch diese Limitierung ist das Implantat zwar in pädiatrischen und ausgesuchten erwachsenen Patienten einsetzbar, viele Patienten benötigen aber prothetische Herzklappen mit einem deutlich größeren Durchmesser. Bei erwachsenen männlichen Patienten mit entsprechender Konstitution können Implantate mit Durchmessern von 30 mm und mehr notwendig werden. Eine weitere Beschränkung stellt die geringe Langlebigkeit der Contegra-Klappe dar.(19) Zudem benötigt die Contegra-Klappe im Rahmen der transkutanen Implantation ein relativ großlumiges Ablagesystem, da die Klappe von einem Venensegment umgeben ist. Die Venenwand stellt zusätzliches Material im Lumen des Stents dar und dieser kann nicht beliebig komprimiert werden, ohne eine Beschädigung der Klappe zu riskieren und die



Entlassung des Stents aus dem System zu erschweren. Diese Faktoren machen große Ablagesysteme mit Durchmessern von mindestens 22 French nötig.

Um diese Limitationen zu umgehen und die Implantation zu verbessern, stellten verschiedene Forschungsgruppen alternative HKS-Designs (z.B. selbstexpandierende Stents) mit unterschiedlichen biologischen und synthetischen Klappenmaterialien vor.(11, 13, 20-22) So unterliegen Materialien wie Perikard und Kunststoffe keinen Größenbeschränkungen und Klappen aus diesen Stoffen können in beliebiger Größe und Menge hergestellt werden. Auch diese neuen Designs zeigten gute Ergebnisse im Tiermodell und erste Berichte von erfolgreichen Implantationen im Menschen wurden veröffentlicht. (12, 13)

## *2.2 Langlebigkeit von Herzklappenstents*

Trotz zunehmendem klinischen Einsatz im Patienten und intensiver Forschung im Tiermodell gibt es nur sehr wenige mittel- und langfristige Daten zu potentiellen Degenerationsvorgängen und Versagensursachen von HKS. Die Langlebigkeit von Herzklappenimplantaten ist aber ein zentraler Punkt im Management des Klappenersatzes und essentiell wichtig für die Indikationsstellung und die Entscheidung für ein spezielles Implantat. In der kardiochirurgischen Forschung werden große Anstrengungen unternommen, um die Langlebigkeit von bioprothetischen Herzklappen zu erhöhen und die Degeneration von Implantaten zu verhindern.

Eine längerfristig angelegte Tierstudie von C. Ruiz et al mit selbstexpandierenden Herzklappenstents und einem Klappenmaterial aus porciner Dünndarmmukosa beschreibt eine Proliferation von Gefäßintima als einen potentiellen degenerativen Faktor, welcher eine Verkürzung und Verdickung der Klappensegel verursachen kann.(20)

Neointimale Proliferation ist ein großes Problem beim Einsatz von endovaskulären Stents. Die Tunica Intima von Gefäßen besteht aus polygonalen Endothelzellen, einer endothelialen Basalmembran und lockerem Bindegewebe, welches Fibroblasten, elastische Fasern und vereinzelte glatte Muskelzellen enthält. Die Intima und besonders das Endothel werden heute als stoffwechselaktiver und hochdifferenzierter Mediator verschiedener Funktionen wie Austauschvorgängen und Beeinflussung der Blutgerinnung angesehen. Die Intima ist in der Lage, Interaktionen sowohl mit dem Blut als auch mit der umgebenden Gefäßwand (Tunica media) einzugehen und so zum

Beispiel Einfluss auf die Fibrinolyse und den Gefäßtonus zu nehmen.(23) Dieses komplizierte System reagiert empfindlich auf Verletzung.

Der Entstehung von neointimaler Proliferation nach Implantation eines Stents liegt eine komplizierte Entzündungskaskade zugrunde, welche als Reaktion auf die Verletzung der Gefäßwand durch den Stent auftritt. Die Neubildung und Verdickung von Intima ist verantwortlich für Stenosen im Lumen von Stents, bzw. Restenosen nach Stentimplantation zur Revaskularisierung von Gefäßen und stellt die häufigste Komplikation dieser Behandlung dar. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Intimaproliferation auch ein häufiges Phänomen nach Implantation von HKS darstellen wird. Dabei ist nicht der eigentliche Lumenverlust entscheidend, der die entscheidende Größe bei endovaskulären Stents darstellt. Der Implantationsort von HKS weist einen um ein vielfaches größeren Durchmesser auf als zum Beispiel Koronararterien. Im koronaren Stromgebiet stellt ein proliferationsbedingter Lumenverlust aufgrund des Verhältnisses von Koronarlumen zu Neointimadicke eine Gefährdung für die Durchgängigkeit des Gefäßes dar. Dies gilt nicht für den Implantationsort der HKS. Hier ist vielmehr die Störung der Klappenfunktion durch einwachsendes Gewebe von Bedeutung. Die Studie von C. Ruiz zeigt, dass Intimahyperplasie einen implantierten HKS in seiner Funktion beeinträchtigen kann.(20) Es ist deshalb anzunehmen, dass der Inhibierung von Intimaproliferation bei wachsendem klinischen Einsatz von perkutanem Herzklappenersatz eine wichtige Rolle in der Behandlungsstrategie zur Vermeidung einer Degeneration des Implantats zukommen wird. Modelle zur Inhibierung von neointimaler Proliferation nach Implantation eines Herzklappenstents existieren bis heute nicht. Hier muss ein Weg gefunden werden diese Proliferation zu minimieren, um die Integrität des Implantats zu gewährleisten und dessen Langlebigkeit maximal zu steigern.

### *2.3 Therapieansätze im Rahmen von Intimahyperplasie nach Stentimplantation*

Im Rahmen der Implantation von endovaskulären Stent existieren bereits verschiedene Konzepte zur Behandlung von neointimaler Proliferation nach Stentimplantation. Es wurden zahlreiche Ansätze entwickelt, um der Intimaproliferation entgegenzuwirken und die Restenoserate zu senken, bzw. zu therapieren. Diese können in mechanische, physikalische und medikamentöse Strategien unterteilt werden. Mechanische Therapiekonzepte wie Laserangioplastie und Ballonangioplastie mit Schneideklingen

(cutting balloon) zeigten sich anderen Methoden nicht überlegen.(24, 25) Zudem sind diese Strategien in herzkloppentragenden Stents nicht anwendbar, da eine direkte Schädigung der Klappe resultieren würde.

Physikalische Methoden wie die perkutane intravaskuläre Brachytherapie mit Beta- und Gammastrahlern zeigten bessere Ergebnisse und konnte die Restenoserate in mehreren Studien senken.(26, 27) Jedoch ist bei dieser Methode in HKS-Systemen, die mit biologischen Klappenmaterialien wie bovinen Venenklappen oder Perikard arbeiten, eine Schädigung des Klappenmaterials durch die Strahlung mit anschließender Degenerierung der Klappe zu erwarten.

Medikamentöse Strategien zur Unterdrückung von neointimaler Proliferation nach Stentimplantation sind ein sehr erfolgversprechendes und in den letzten Jahren zunehmend populäres Konzept. Dabei zeigten verschiedene immun- und proliferations-supprimierende Pharmaka eine inhibierende Wirkung auf die Intimahyperplasie, darunter vornehmlich Paclitaxel, Tacrolimus und Sirolimus (Rapamycin).(28) Die Wirkstoffe können dabei auf unterschiedlichem Weg an den Wirkort transportiert werden, wobei lokale und systemische Applikationsarten unterschieden werden können.

Lokale Applikationsstrategien waren in der Vergangenheit wegen der Hoffnung auf Vermeidung von systemischen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva ein populärer Ansatz in der internationalen Forschung. Es wurden mehrere Applikationsformen entwickelt, die gute Ergebnisse zeigten. Scheller et al.(29) setzten einen mit Paclitaxel beschichteten Ballon-Katheter zur Revaskularisierung von Stenosen ein und berichteten in ihrer Studie von einer signifikant niedrigeren Restenoserate in der Paclitaxel- als in der Kontrollgruppe. Die populärste und am häufigsten eingesetzte Methode des Wirkstofftransports zur Gefäßintima war in den letzten Jahren jedoch die Implantation von medikamentenbeschichteten Stents (DES-drug eluting stents). Verschiedene Studien zeigten eine erhebliche Senkung der Restenoserate bei allen drei Präparaten, sowohl im Tierexperiment, als auch beim klinischen Einsatz in großen Patientenkollektiven. (30-33)

Jedoch weist die lokale Anwendung dieser Medikamente einige Nachteile gegenüber der systemischen Applikation auf. Die Beschichtung der Stents mit den Wirkstoffen ist aufwendig und teuer. Außerdem ist die Wirkstoffmenge, die auf einen Stent aufgebracht

werden kann, begrenzt und es ist nach Implantation und Entladung des Medikaments nach einiger Zeit nicht möglich, den Stent mit Wirkstoff nachzubeladen. Da DES nur eine begrenzte Beladungskapazität für ein Medikament vorweisen können, erschöpft sich die Wirkstofffreisetzung nach einem bestimmten Zeitraum. Die Zeitspanne der Medikamentenwirkung hängt dabei vom Präparat und Art der Beschichtung, zum Beispiel von der Verwendung verschiedener Verbundpolymere, die zur Beschichtung benutzt werden, ab und variiert zwischen 30 und 90 Tagen.(34) Ebenso kann die Medikamentenfreigabe aus dem Stent bei eventuell auftretenden allergischen Reaktionen nach Implantation nicht mehr gestoppt werden. Als wichtigster Punkt konnte jedoch gezeigt werden, dass lokale antiproliferative Therapie mit DES die Heilung der Gefäßwand beeinflusst. Es wurde berichtet, dass die Medikamentenwirkung eine vollständige Endothelialisierung der Stentmaschen verhindert und somit die Proliferation von Neointima eher verzögert als verhindert.(34) Durch diese von DES induzierte verzögerte Proliferation von Neointima kann es nach vollständiger Entladung des DES und Sistieren der Medikamentenwirkung zu einem Nachholphänomen von neointimaler Proliferation (neointimal catch up) kommen.(35) Auch diese verzögert auftretende Gewebseinwachsung könnte im Rahmen des perkutanen Herzklappenersatzes zu einer Degeneration des Implantats führen.

Systemische Therapieansätze zur Senkung der Restenoserate nach Implantation von endovaskulären Stents sind nicht so umfangreich veröffentlicht wie Arbeiten zu DES. Dennoch zeigen Studien sowohl für Paclitaxel als auch für Sirolimus bei oraler Applikation eine Unterdrückung von neointimaler Proliferation.(36, 37) Tiermodelle zu oral applizierten Paclitaxel zeigt nach iatrogenen Verletzung der Gefäßwand eine deutliche inhibierende Wirkung von Paclitaxel auf die Intimahyperplasie. (38) Auch im klinischen Einsatz nach Implantation von Stents konnte gezeigt werden, dass orale Administration von immun- und proliferationshemmenden Substanzen die Neubildung von Intima inhibiert. Rodriguez et al. berichten in ihrer klinischen Studie an 100 Patienten von einer signifikanten Senkung der Restenoserate nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (BMS) durch orale Gabe von Sirolimus.(36) In der Studie von Rodriguez et al. wurde jedoch keine histologische Aufarbeitung postmortem durchgeführt und es konnte so keine Aussage über den Verlauf der Gefäßwandheilung getroffen werden.

#### 2.4 Einsatz von Everolimus zur Unterdrückung von neointimaler Proliferation

Als Alternative zur lokalen Therapie mit DES schlugen Farb et al. orales Everolimus (Certican, Novartis) zur Senkung der Restenoserate vor. In einem Kaninchenmodell berichten sie nach iliacalear Stentimplantation von einer signifikant geringeren Intimadicke im Stentlumen der Everolimustiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem konnte in dieser Studie durch histologische Aufarbeitung der gestenteten Gefäßteile gezeigt werden, dass nach Ablauf von nur 28 Tagen eine vollständige Ausheilung der Gefäßwand, trotz Behandlung mit oralem Everolimus, eingetreten war. Dieses Modell zeigt also einen Vorteil gegenüber dem Konzept medikamentenbeschichteter Stents. Joner et al. zeigten, dass die fehlende Ausheilung der Gefäßwand zu Thrombenbildung im Lumen des implantierten Stents führt.(34) Das orale Everolimusmodell erreicht deshalb durch eine abgeschlossene Heilung des Gefäßes nicht nur eine Verminderung der Thrombenbildung, sondern es besteht die Hoffnung, dass durch vollständige Endothelialisierung des Stents und eine abgeschlossene Heilung der Gefäßwand ein Aufholphänomen von neointimaler Proliferation nach Aussetzen der Medikamentenapplikation vermieden werden kann.

Der Wirkstoff Everolimus ist strukturell mit dem etablierten Immun- und Proliferationssuppressivum Sirolimus verwandt und zeigt einen fast identischen Aufbau. Everolimus wurde entdeckt als Ergebnis von Bemühungen, ungünstige Aspekte in der Pharmakokinetik von Sirolimus, vor allem die zu hohe Verteilung im Gewebe, zu verbessern, ohne die Wirkung zu vermindern. Obwohl die immunsupprimierende Aktivität in vitro zwei- bis fünfmal niedriger ist als die von Sirolimus, zeigt das Präparat in Modellen zu Organtransplantation und Autoimmunkrankheiten die gleiche Wirksamkeit.(39, 40) Klinisch wird Everolimus heute in der Transplantationschirurgie, wegen der durch den Wirkstoff vermittelten Hemmung der T-Zell Proliferation, zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen eingesetzt. Hier zeigt das Präparat gute Ergebnisse mit vergleichsweise geringen Nebenwirkungen.(41) Jedoch wirkt es nicht nur hemmend auf die Vermehrung von T-Lymphozyten, sondern inhibiert ebenso wie Paclitaxel und Sirolimus die Proliferation glatter Muskelzellen.(42) Dabei ist die Wirksamkeit von Everolimus und Sirolimus im Hinblick auf die Inhibierung von glatter Muskelzellproliferation annähernd gleich. (39)

Die Einwanderung und Vermehrung von glatten Muskelzellen in die Intima wird als eine

Hauptursache für die Verdickung von Intima nach Stentimplantation verantwortlich gemacht.(43) Aus diesem Grund wird auch Everolimus seit einiger Zeit zur Unterdrückung von Intimahyperplasie nach der Implantation von endovaskulären Stents eingesetzt und zeigte nicht nur in der tierexperimentellen Studie von A. Farb gute Ergebnisse. Auch in anderen Tiermodellen, die mit Everolimus-beschichteten Stents arbeiteten, konnte eine signifikante Verminderung der Neointimadicke im Stentlumen demonstriert werden. Nach der klinischen Einführung von Everolimus-beschichteten Stents konnten Studien (FUTURE I und II) die Sicherheit dieses neuen DES-Konzepts demonstrieren und berichten eine 87% Reduktion des neointimalen Volumens.(44)

Diese klinischen Studien zur lokalen anti-proliferativen Therapie mit Everolimus-beschichteten Stents zeigen vielversprechende Ergebnisse. Doch existieren hier, im Gegensatz zu der von A. Farb vorgestellten systemischen Therapie, noch keine histologischen Daten zu der Heilungsreaktion der Gefäßwand.

Die systemische anti-proliferative Therapie bietet viele Vorteile gegenüber dem lokalen stent-basierten Einsatz. Sie ist technisch nicht so aufwändig wie die Beschichtung eines Stents und weniger kostenintensiv. Der Wirkstoffspiegel kann beliebig lange aufrecht erhalten und jede gewünschte Dosis eingesetzt werden. Dies ist beim DES wegen einer Limitierung durch die Beladungskapazität der Stents nicht möglich. Weiterhin kann bei der oralen Applikationsform nach Aussetzen der Medikamentengabe und einem behandlungsfreien Intervall ein zweiter Zyklus begonnen werden, um einem eventuell auftretenden proliferativen Nachholphänomen entgegenzuwirken. Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil sind allerdings die zu erwartenden systemischen Nebenwirkungen der Therapie. Der klinische Einsatz von Everolimus in der Transplantationschirurgie identifizierten die wichtigsten unerwünschten Wirkungen als Infektion (4,7%), gastrointestinale Störungen (2,4%), Leuko- (2,4%) sowie Thrombozytopenie(1,9%) und renale Beeinträchtigung mit Erhöhung der Kreatininwerte (3,8%) bei einer Dosis von 3 mg pro Tag.(41) Auch A. Farb beschreibt in seiner Kaninchenstudie ein häufiges Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen. Kaninchen, die eine hohe Dosis von Everolimus erhielten zeigten zu einem großen Teil (83%) gastrointestinale Störungen mit einem Gewichtsverlust von über 10% des Körpergewichts und Störung der Nahrungsaufnahme. Es ist bewiesen, dass eine höhere Dosis mit einer höheren Inzidenz von Nebenwirkungen einhergeht.(41) Dabei ist eine hohe Dosierung von Everolimus im Rahmen der Proliferationssupprimierung von

Neointima gegenüber einer niedrigen Dosierung nicht klar im Vorteil. Ein Kaninchenmodell demonstrierte nach Stentimplantation die erfolgreiche Unterdrückung von Intimaverdickung durch eine Langzeitbehandlung (31Tage) mit einer niedrigeren Dosis von oral appliziertem Everolimus.(40). Eine wesentlich höhere Dosis über einen kürzeren Zeitraum (7 Tage) zeigte hingegen in dieser Studie keine signifikante Verbesserung gegenüber der Placebogruppe.

Die Dosis von oral appliziertem Everolimus ist im klinischen Einsatz durch die Transplantationschirurgie wesentlich geringer als in tierexperimentellen Modellen zur Unterdrückung von neointimaler Proliferation nach Stentimplantation.(41, 45) Doch auch im klinischen Einsatz zeigt Everolimus bei 1,5 mg bis 3 mg per os pro Tag eine deutliche Inhibierung neointimaler Proliferation.(41) Ein signifikanter Unterschied zwischen einer täglichen Dosis von 1,5 mg und 3, 0 mg im Hinblick auf die Intimadicke konnte dagegen im klinischen Einsatz nicht beobachtet werden. Diese Tatsache lässt vermuten, dass auch durch eine kleinere Dosis ein antiproliferativer Effekt nach Implantation von endovaskulären Stents zu erreichen und damit die Inzidenz von Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie gering zu halten wäre.

Unter diesen Voraussetzungen bietet sich die orale Gabe von Everolimus im Rahmen der antiproliferativen Therapiestrategien nach der Implantation endovaskulärer Stents als ernstzunehmende Alternative zu lokal wirkenden Konzepten wie DES an. Der inhibierende Effekt von Everolimus auf die Neubildung und Verdickung von Intima nach perkutaner Implantation von klappentragenden Stents wurde bis heute noch nicht untersucht und bleibt zu beweisen.

### **3 Herleitung der Aufgabenstellung**

Der perkutane Herzklappenersatz durch transkutane Kathetertechnik entwickelte sich in den letzten Jahren zu einer ernstzunehmenden zukünftigen Alternative zur chirurgischen Implantation prothetischer Klappen. Trotz intensiver Forschung, steigender klinischer Anwendung und einem großen Potential für zukünftigen Einsatz fehlen ausreichende Langzeitergebnisse zu Versagensmustern dieser neuen Generation von prothetischen Herzklappen.

Es wurde berichtet, dass Wachstumsfaktor-induzierte Zellproliferationen bei perkutan

implantierten Herzklappenstents Funktionsstörung des Implantats führen können. Diese Ergebnisse wurden als Nebenbeobachtung einer längerfristigen Studie aufgeführt. Studienmodelle, die sich auf die Intimahyperplasie als Ursache für das Versagen von Herzklappenstents fokussieren, existieren bis heute nicht. Diese Ergebnisse sollen in der vorliegenden Studie überprüft werden, da die Langlebigkeit von Implantaten und die Identifizierung von Degenerationsursachen einen elementar wichtigen Faktor im Management des Klappenersatzes darstellt.

Erfolgreiche Konzepte zur Inhibierung einer degenerativen Intimahyperplasie existieren bereits im Rahmen des Behandlungskonzeptes von endovaskulären Stents. Everolimus zeigt eine erfolgreiche Unterdrückung von neointimaler Proliferation im Tiermodell und in klinischen Studien. Es konnte gezeigt werden, dass die orale Gabe von Everolimus in vielen Punkten Vorteile gegenüber der lokalen Stent-basierten Applikation bietet. Dabei gibt es Hinweise, dass auch eine Behandlung mit niedrig dosiertem Everolimus einen proliferationshemmenden Effekt zeigt und systemische Nebenwirkungen so reduziert werden können.

Dieser Ansatz ist ein vielversprechendes Konzept zur Inhibierung von Intimahyperplasie in endovaskulären Stents. Jedoch kann diese Methode nicht direkt auf Herzklappenstents als Strategie zur Vermeidung von Implantatdegeneration übertragen werden und muss für diese neue Anwendung gesondert überprüft werden.

Die vorliegende Studie evaluiert, ob (1) die Proliferation von Neointima die Funktion von perkutan implantierten Herzklappenstents beeinträchtigt und weiterhin, ob (2) die orale Gabe von Everolimus zu einer Inhibition der im Zusammenhang mit der Implantation von Herzklappenstents auftretenden Intimaproliferation führt.

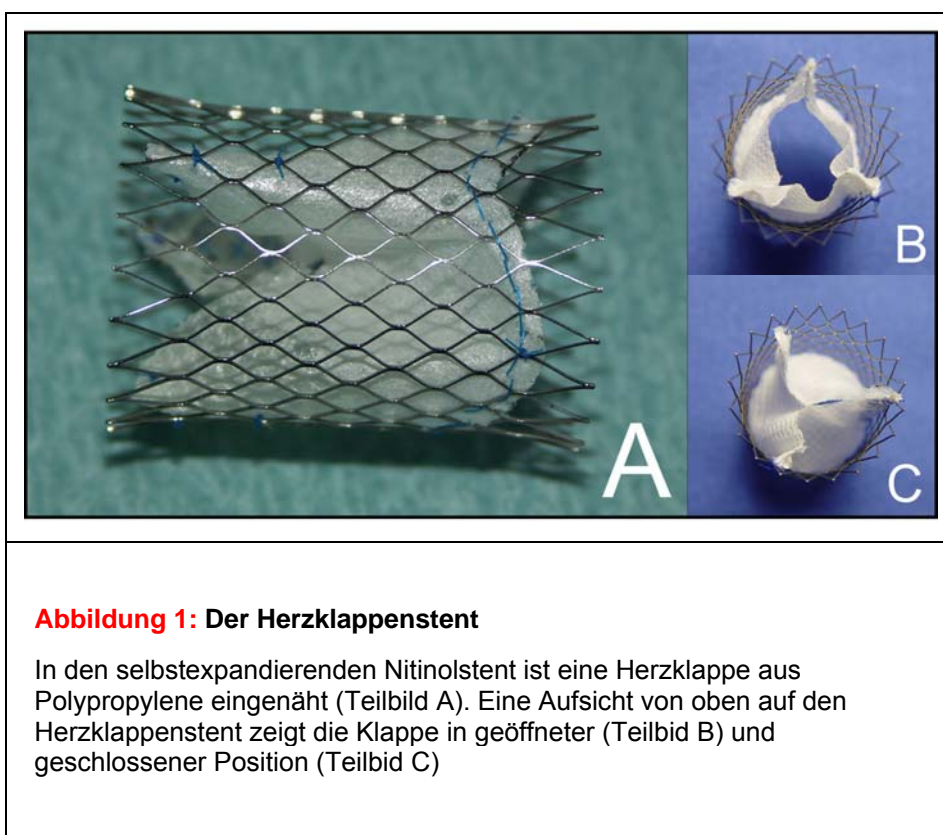
## **4 Material und Methodik**

### *4.1 Design des Herzklappenstents*

In einen selbstexpandierenden Nitinolstent mit auskragenden Stentenden, einer Länge von 25 mm und einem Durchmesser von 20 mm (Memotherm, Angiomed, Karlsruhe) wurde eine trikuspidale Herzklappe mit einer Membranstärke von 0,1 mm eingenäht (Abbildung 1). Das Klappenmaterial besteht aus Polypropylene und wurde im



Vakuumverfahren mit einer 10 µm dicken Schicht Titatium überzogen (GFE, Erlangen). Das beschichtete Material wurde mit Hilfe einer Schablone in die richtige Form geschnitten, an den Enden zusammengeführt und mit einer fortlaufenden Naht (6-0 Prolene) fixiert. Anschließend wurde die Klappe in das Lumen des Stents eingebracht und der untere Teil, der später den Anulus der Klappe bilden sollte, mit einer doppelten, zirkulär laufenden Naht am Stent befestigt. Die drei Eckpunkte der trikuspiden Klappe wurden an jeweils drei Punkten mit Einzelknopfnähten an den Maschen des Stents fixiert (Abbildung 1).



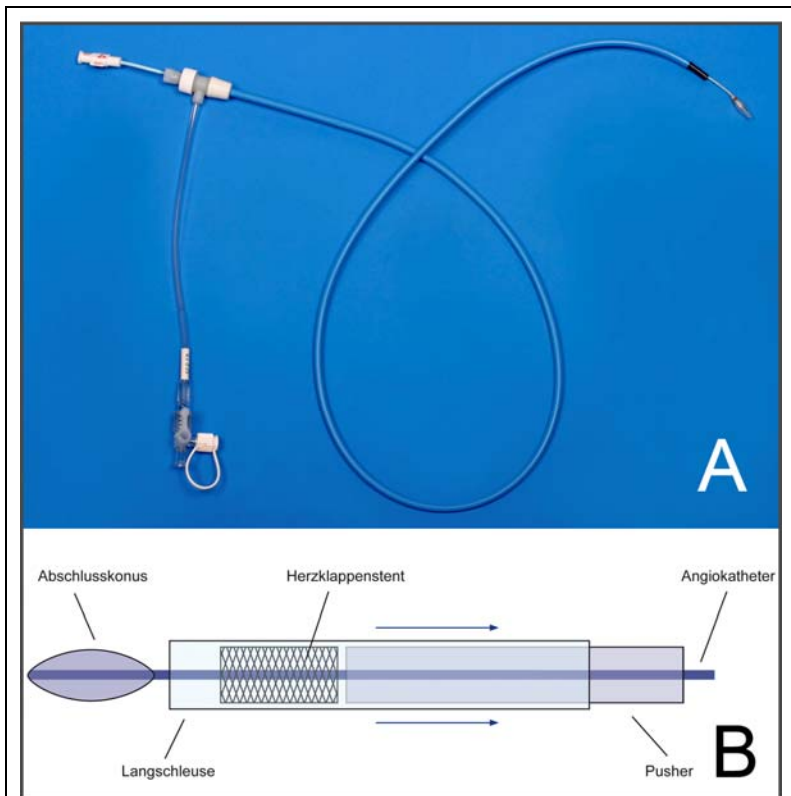
#### 4.2 Evaluierung der prothetischen Herzklappe In-Vitro (Flussphantom)

Vor Implantation wurde der Herzklappenstent in-vitro unter physiologischen Bedingungen in einem Flussphantom getestet. Peak-to-peak-Druckgradienten, Schlussdruck, Öffnungs-/Schluss-Zeitverzögerung und Leckage durch die Klappe wurden erfasst und für verschiedene Schlagvolumina und Herzfrequenzen ermittelt. Die Tests wurden in einem Herzklappenprüfstand (Institut für medizinische Physik und Biophysik, Charité-Universitätsmedizin Berlin) nach Affeld und Schichl durchgeführt.(46)

Dabei wurde eine spezielle Halterung angefertigt, um den Herzklappenstent im Flussphantom optimal positionieren zu können. Für jeden Messwert wurden 7 Herzzyklen mit Klappenöffnung und –schluss durchgeführt. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten sind die Mittelwerte aus diesen jeweils 7 Zyklen. Als Testfluid wurde isotonische Natriumchloridlösung verwendet.

#### *4.3 Ablagesystem*

Bei der Wahl des Ablagesystems war zu beachten, dass dieses durch den RVOT in die bei Schweinen sehr steil abgehende PA vorgebracht werden musste. Um diesen Anforderungen zu entsprechen musste ein sehr flexibles Ablagesystem eingesetzt werden, welches auch bei starker Biegung den Stent noch problemlos entlassen konnte. Das eingesetzte System besteht aus einer Langschleuse (Cook, Mullins Transseptal Check-Flow-Introducer, Radiopaque Tip, 12 French, 85 cm Länge, .038“, Cook, Bloomington, USA) als stenttragende Außenhülle, einem feinen Angiokatheter (Diagnostic Catheter, 4 F, 100 cm, .038“, Cordis, Waterloo, Belgien) als drahtführendes Element und einem Pusher (Abbildung 2). Den Abschluss an der Spitze des Stentablagesystems bildete ein 12 French messender Kunststoffkonus, der ein möglichst atraumatisches Einführen des Systems in das Gefäßlumen gewährleisten sollte. Nach der Gassterilisation durch Ethylenoxid wurden die Herzklappenstents manuell komprimiert und frontal in die Langschleuse geladen. Die manuelle Komprimierung des Stents garantierte eine schonende Beladung des Systems und verhinderte Beschädigungen der integrierten Herzklappe.



**Abbildung 2. Das Ablagesystem**

Fotographie des Ablagesystems (Teilbild A) und schematischer Aufbau (Teilbild B).

#### 4.4 Design der Tierstudie

Die Tiere wurden in zwei Gruppen zu je 6 Tieren geteilt. Eine Gruppe wurde mit oralem Everolimus behandelt, die restlichen Tiere dienten als Kontrollgruppe (siehe 4.8). Bei den Tieren handelte es sich um junge Schweine (DL-Deutsche Landrasse) mit einem Gewicht von  $25 \pm 4$  kg. In beiden Gruppen wurde eine identische Behandlung mit Antikoagulanzen vor der Implantation begonnen und bis zum Ende der Studienlaufzeit fortgesetzt (siehe 4.7).

Allen Tieren wurde ein Herzklappenstent mittels transkutaner Kathedertechnik in pulmonaler Position implantiert und anschließend die Klappenfunktion im Herzkatheterlabor überprüft. Die Laufzeit der Studie betrug 3 Monate. Nach Ablauf der Studienzeit wurde bei allen Tieren eine Nachfolgeuntersuchung durchgeführt und die Klappenfunktion erneut im Herzkatheterlabor überprüft. Zusätzlich wurde der Zustand der prothetischen Klappe im MRT untersucht.

Danach wurden die Tiere euthanasiert. Die Stents wurden explantiert und makroskopisch-visuell, histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

Alle Eingriffe wurden nach amtlichen Richtlinien zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren vollzogen und von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Aktenzeichen G0233/03; behördlich genehmigt im Jahr 2003).

#### 4.5 Durchführung von Eingriffen

Zur Einleitung von Narkosen oder zum Entnehmen von Blutproben wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Injektion mit 20-25 mg / 10 kg KG Ursotamin (Ketaminhydrochlorid; Serumwerk Bernburg; Bernburg, Deutschland), 3-5 mg / kg KG Stressnil (Azaperon; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 1 mg Atropin (Atropinsulfat; B. Braun Melsungen AG) sediert. Zur Implantation der Klappe wurden die Tiere nach Gabe von intravenösen Hypnotika (0,15-0,3 mg/kg/KG Etomidat Lipuro) unter Sicht endotracheal intubiert. Die Beatmung erfolgte maschinell mit einer Atemfrequenz von 10-12 Zügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 10-15 ml/kg KG. Dabei wurden ein EtCO<sub>2</sub> von 32-36 mmHg angestrebt und der Beatmungsdruck lag bei  $\leq$  20-25 cm H<sub>2</sub>O. Aufrechterhaltung der Hypnose, sowie Analgesie während des Eingriffs wurden durch die Zugabe von 1,5-2% Isofluran, Lachgas (N<sub>2</sub>O) und Sauerstoff (O<sub>2</sub>) im Verhältnis von 60 % / 40 % (N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub>) zur Atemluft gewährleistet. Kardiovaskuläre Funktion und Sauerstoffsättigung aller Tiere wurden während der Intervention fortlaufend überwacht. Nach Beendigung der Intervention wurde die Narkose ausgeleitet und das Tier nach Wiedereinsetzen einer suffizienten Atmung unter Kontrolle der Sauerstoffsättigung extubiert.

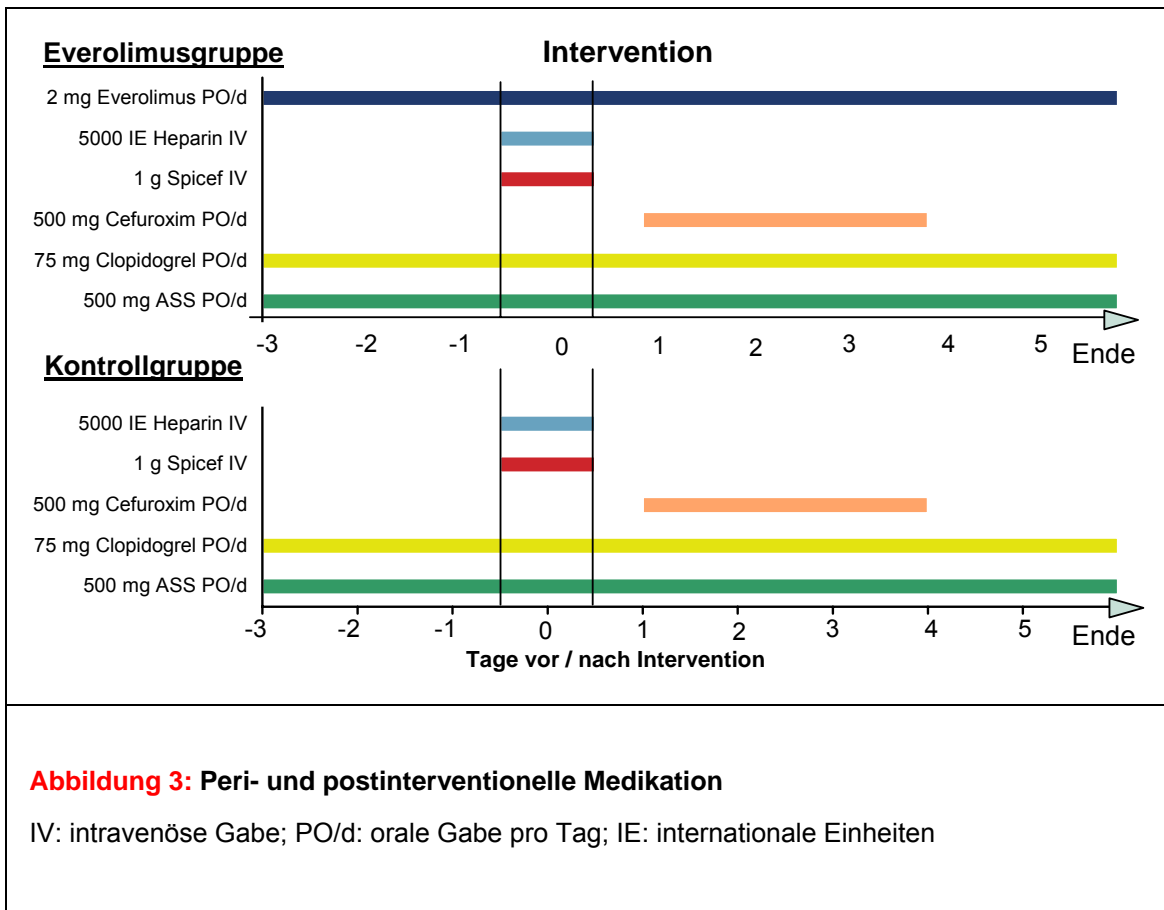
Zu Untersuchungen im MRT wurden die Tiere sediert, die Narkose mit einem Bolus Propofol ( 2-4 mg/kg Propofol 1% MCT; Fresenius Kabi AG) eingeleitet und anschließend intubiert. Während der Scans wurde die Sauerstoffsättigung überwacht und bei Bedarf manuell beatmet. Die Aufrechterhaltung der Hypnose wurde durch die kontinuierliche intravenöse Gabe von 8-12 mg/kg KG/h Propofol über einen Perfusor gewährleistet.

Zum Zeitpunkt der Euthanasie am Studienende wurden die Tiere mit einem intravenösen Bolus von 2000 IE / 10 kg KG Heparin (Liqueminin) antikoaguliert und

durch Gabe von 1,0 g Trapanal (Thiopental-Natrium) i.v. in eine maximal tiefe Narkose versetzt. Anschließend erfolgte eine Muskelrelaxation mit 1 mg / 10 kg KG Pankuronium (Pankuroniumbromid) und zuletzt die Tötung der Tiere durch eine intravenöse Gabe von 40 mVal Kaliumchlorid (7,5 %).

#### 4.6 *Interventionelle Implantation*

Mittels Seldinger-Technik wurde eine Schleuse (Catheter Introducer Set, Input Sheath, 7F, Bard, Convinton, USA) in die Vena Femoralis eingeführt und ein Einschwemmkatheter (Wedge-Catheter, 6F, Arrow, Reading, USA) in den rechtsventrikulären Ausflusstrakt vorgebracht. Durch den liegenden Katheter konnte mittels Angiographie die Lage der Pulmonalklappe und der Durchmesser der Pulmonalarterie bestimmt, sowie eine ventrikuläre und eine pulmonalarterielle Druckmessung durchgeführt werden. Anschließend wurde der Einschwemmkatheter gegen einen steifen Führungsdraht (Amplatz Extra Stiff Wire Guide, 260 cm, .035“ Cook, Bloomington, USA) ausgetauscht und dieser in einen der Pulmonalarterienäste vorgebracht. Nach Entfernung der Einführschleusen und der Dilatation der Vena Femoralis bis auf 16 French, konnte eine ausreichend große Schleuse (Check-Flo-Introducer, Radiopaque Tip, 16 F, Cook, Bloomington, USA) im Gefäß platziert werden. Das Tier wurde antikoaguliert und schließlich das Ablagesystem über den Führungsdraht bis in den rechtsventrikulären Ausflusstrakt vorgebracht. Der Stent wurde unter Durchleuchtung an der Position der nativen Pulmonalklappe entlassen, indem die äußere Hülle des Ablagesystems (Mullins Transseptal Check-Flo-Introducer, Radiopaque Tip, Cook, Bloomington, USA) vorsichtig zurückgezogen wurde, während der Pusher den Stent in Position hielt. Nach der Implantation des Herzklappenstents wurden Ablagesystem und Führungsdraht entfernt und erneut ein Einschwemmkatheter zur angiographischen Kontrolle eingebracht. Geprüft wurden die Klappenfunktion in Bezug auf relevante Stenosen, bzw. Regurgitationen, sowie die korrekte Position des Stents. Außerdem wurden erneut invasive Druckmessungen distal und proximal des Stents durchgeführt.



#### 4.7 Peri- und postinterventionelle Medikation

Um Thrombenbildung am Implantat und während der Intervention zu verhindern, erhielten die Tiere eine adjuvante antikoagulative Therapie (Abbildung 3), welche bis zum Ende der Studienlaufzeit bei allen Tieren durchgeführt wurde. Zudem wurde zur Intervention ein Heparinbolus verabreicht. Zur Prophylaxe von Infektion erhielten die Tiere eine intra- und postoperative Antibiose. (Abbildung 3).

#### 4.8 Behandlung mit Everolimus und postinterventioneller Verlauf

Die Tiere der Everolimusgruppe erhielten drei Tage vor Implantation eine Behandlung mit 2 mg Everolimus (Certican, Novartis) per os pro Tag in zwei Einzeldosen (1-0-1) gestartet und bis zum Ende der Studie fortgeführt. Die angestrebten Plasmaspiegel von Everolimus waren mit 3-6 ng/ml relativ niedrig angesetzt, um unerwünschte Nebenwirkungen der Behandlung zu vermeiden. Fünf Tage nach erster

Medikamentengabe erfolgte in dieser Gruppe eine peripher-venöse Blutentnahme, um den Vollblut-Talspiegel von Everolimus zu bestimmen. Der Zeitpunkt wurde gewählt, um die Spiegelbestimmung im Bereich des steady state des Wirkstoffspiegels durchzuführen.(47) Das Blut wurde morgens vor der ersten Medikamentengabe entnommen (Talspiegel). Die Spiegelbestimmung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (kommerzielles Kit, Seradyn, Indianapolis) durchgeführt. Zudem wurden im Anschluss die Anzahl der Thrombozyten und Leukozyten ermittelt, um Thrombozytopenien oder Leukopenien als Nebenwirkung von Everolimus zu erfassen. Zudem wurden die Tiere regelmäßig gewogen, um Everolimusbedingte Gewichtsverluste erkennen zu können.

Nach der Implantation des HKS wurde die Körpertemperatur bis zum sechsten postinterventionellen Tag täglich rektal gemessen und die Tiere auf klinische Infektionszeichen überprüft. Die Tiere waren in Gemeinschaftsställen untergebracht und lebten unter denselben Bedingungen.

#### *4.9 Hämodynamische Messungen: Initial und nach drei Monaten*

Vor und nach Implantation der Klappe wurden invasive Druckmessungen proximal und distal des Implantats durchgeführt. Zur Durchführung dieser Messungen wurde ein Einschwemmkatheter benutzt. Ebenfalls über diesen Katheter wurde Kontrastmittel eingebracht und das Implantat angiographisch auf seine korrekte Lage, bzw. eventuell aufgetretene Migrationen überprüft, sowie der Grad der paravalvulären- und zentralen Leckage bestimmt.

Nach Ablauf von 3 Monaten wurde erneut ein Gefäßzugang mittels Seldinger-Technik geschaffen und sowohl die invasiven Druckmessungen proximal und distal des HKS, als auch die angiographische Evaluierung der Klappenfunktion wiederholt. Danach wurden die Tiere ins MRT-Labor gebracht und folgende Untersuchungen durchgeführt: Darstellung des rechten Ventrikels und des Stents, Volumenmessung des rechten Ventrikels, Flussvolumen durch den Stent, sowie pulmonale Regurgitationsfraktion. Rechtsventrikuläre Volumen wurden mittels multiphase-multislice steady state free precession cine MRT in der Ebene der kurzen Herzachse erstellt (retrospective gating, TR=3,5 ms; TE=1,6 ms; slice thickness=6mm; matrix=192x256).(48) Das Blutflussverhalten und die Anatomie in der Umgebung des implantierten Stents wurden

mittels eines paraaxialen „in plane“ velocity encoded cine (VEC) MRT visualisiert (TR=9 ms; TE=4 ms; flip angle=15°; slice thickness=6 mm, matrix=256x256). Anschließend wurden quantitative Blutflussvolumen durch die prothetische Pulmonalklappe mittels VEC-MRT in einer Ebene bestimmt, die senkrecht zur dominierenden Flussrichtung gewählt worden war.(48, 49) Rechtsventrikuläre Volumina wurden berechnet, indem auf cine MR Bildern der Umriss des Endokards manuell markiert und zum Ende der Systole sowie Diastole vermessen wurde.(48) Die pulmonale Regurgitationsfraktion wurde berechnet als der Quotient von retrogradem zu antegradem Blutfluss durch den implantierten Stent.(48) Alle Scans wurden im 1.5 T Philips Scanner (Intera, release 10, Philips, Eindhoven, NL) des Deutschen Herzzentrums Berlin durchgeführt.

#### *4.10 Makroskopische Inspektion, Histologie und REM*

Zur Explantation der Herzklappenstents wurde ein Hautschnitt angebracht und bis auf das Sternum vorpräpariert. Nach Sternotomie und Eröffnung der parietalen Pleura und des Perikards, wurde der Gefäßbereich mit dem implantierten Herzklappenstent entnommen, vorsichtig mit isotonischer Kochsalzlösung gespült, photographiert und anschliessend in vierprozentigem Formaldehyd fixiert. Bei der Inspektion wurde das Explantat auf pathologische Veränderungen untersucht. Dabei wurde auf eine makroskopisch sichtbare Intimahyperplasie der PA im Bereich der Arterienwand, die Kontakt mit dem Stent hatte, und auf Frakturen und Deformierungen des Stents geachtet. Die Klappe, Nähte und das angrenzende Gewebe wurden auf Defekte überprüft.

Zur feingeweblichen Untersuchung wurden aus den fixierten Explantaten Gewebsschnitte durch den Herzklappenstent zur Bestimmung des Grades der Intimahyperplasie und histologischen Aufarbeitung angefertigt. Hierzu wurden die explantierten und in Formalin fixierten Gefäßsegmente mit dem enthaltenen Stent in abgestuften Serien mit Alkohol dehydriert und mit einem Kunststoff (Methylmetacrylate) ausgegossen. Der Kunststoff konnte durch Zuführen von Wärme zur Polymerisation gebracht und nach Aushärtung im Bereich der Klappenbasis mehrere Schnitte (4-6 µm dick) angefertigt werden. Diese wurden auf Objektträger aufgebracht, getrocknet und die angeschnittenen Stentmaschen vorsichtig aus dem Gewebe entfernt. Nach Entfernung des Kunststoffs konnten die Gewebeschnitte rehydriert und mit Van Gieson-



Färbung (EvG) und Hämatoxylin-eosin (HE) eingefärbt werden. Anschliessend wurde die Intimadicke gemessen und die Zusammensetzung des Gewebes untersucht. Diese Untersuchungen wurden sowohl bei Tieren der Everolimusgruppe, als auch bei Tieren der Kontrollgruppe durchgeführt.

Zuletzt wurde den mit Formaldehyd fixierten Explantaten aus der Everolimusgruppe Klappenmaterial im Bereich des Klappensegels entnommen und mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die REM wurde eingesetzt, um zu klären, ob in der Everolimusgruppe eine Endothelialisierung des Klappenmaterials nach drei Monaten abgeschlossen, oder ob durch den Wirkstoff ein zellulärer Überzug des Klappenmaterials verhindert wurde. Ausserdem sollte die strukturelle Integrität des titanbeschichteten Klappenmaterials nach dreimonatiger Belastung überprüft werden.

#### *4.11 Statistik*

Um die Daten der invasiven Druckmessung bei der initialen Untersuchung mit den Messungen der Folgeuntersuchung zu vergleichen, wurde der gepaarte student's t test mit der Bereinigung nach Bonferroni für multiple Analysen eingesetzt. Die Unterschiede zwischen im MRT gewonnenen Funktionsparameter der prothetischen Herzklappe wurden mit ungepaartem student's t test festgelegt. Auch die Unterschiede zwischen Werten für die Intimadicke gemessen in der Everolimus- und der Kontrollgruppe wurden mit Hilfe eines ungepaarten student's t test ermittelt. Ein Wert für p unter 0,05 wurde als signifikant erachtet. Die im Ergebnisteil aufgeführten Messwerte werden als Mittelwert±Standardabweichung (SD) dargestellt.

## **5 Ergebnisse**

### *5.1 Evaluierung der prothetischen Herzklappe In-Vitro (Flussphantom)*

Die Untersuchungen des HKS im Herzklappenprüfstand vor Implantation zeigten gute hämodynamische Eigenschaften des Systems. Klappenausrisse aus dem Stent oder Ruptur von Nahtmaterial traten nicht auf. Der maximale peak-to-peak Druckgradient über dem klappentragenden Stent erreichte einen Wert von  $1,57 \pm 0,4$  mmHg bei einem Herzminutenvolumen von 1,4 l/min, entsprechend einem Schlagvolumen von 19,6 ml.

Der Druckgradient erhöhte sich mit steigendem Herzminutenvolumen und erreichte ein Maximum von  $6,4 \pm 0,8$  mmHg bei einem Herzminutenvolumen von 3,5 l/min, entsprechend einem Schlagvolumen von 49,4 ml. Während des Klappenschlusses wurden bei einem Herzminutenvolumen von 1,4 l/min eine maximale Leckage von  $6,5 \pm 0,6$  ml gemessen. Bei maximalem Herzminutenvolumen von 3,5 l/min trat eine Leckage von  $6,6 \pm 0,4$  mL auf. Die Leckage errechnete sich aus retrograder Kolbenbewegung des Prüfstands bei geschlossener Klappe, eine Unterscheidung zwischen paravalvulärer- und zentraler Regurgitation kann bei diesem Prüfstand nicht getroffen werden. Da die speziell angefertigte Halterung für den HKS jedoch dicht mit dem Anulus der Klappe abschließt, kann die hier aufgetretene Leckage als zentral gewertet werden.

### 5.2 *Ablagesystem*

Das System zeigte bei der Intervention gute elastische Eigenschaften und konnte bei allen Eingriffen in den RVOT und die PA vorgebracht werden. Auch die Bergung des Systems nach Stententlassung bereitete keine Probleme.

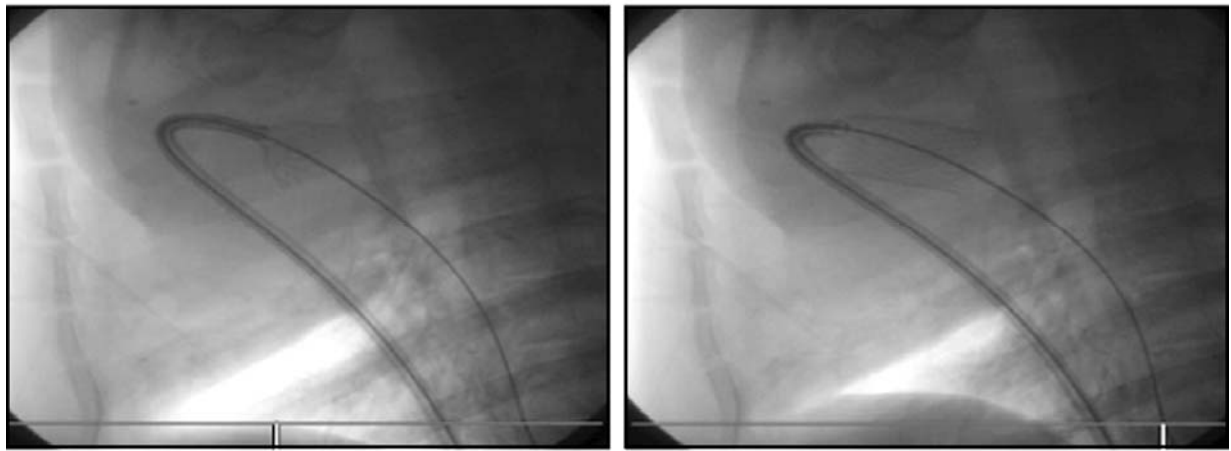
### 5.3 *Durchführung von Eingriffen*

Das anästhesiologische Management der Tiere bereitete keine Probleme. Sowohl die Gasnarkose mit Isofluran zur Intervention als auch die total-intravenöse Anästhesie mit Propofol während der Untersuchungen im MRT ließen sich gut steuern. Die mechanische und manuelle Ventilation der Tiere war ohne Probleme durchführbar. Signifikante Hypoxien oder Komplikationen der Narkose traten nicht auf.

### 5.4 *Interventionelle Implantation*

Die Implantation des HKS war bei allen Tieren durchführbar. In den 12 Interventionen konnte die prothetische Herzklappe ohne schwerwiegende Komplikationen implantiert werden. Verletzungen von kardiovaskulären Strukturen, bzw. Perforationen traten bei keinem Eingriff auf. Die vor der Implantation mittels Angiographie ausgemessenen Durchmesser der nativen Pulmonalklappe zeigten einen Mittelwert von  $18,1 \pm 2,2$  mm.

Alle 12 Stents entfalteten sich nach Entlassung aus dem Ablagesystem selbstständig durch die Expansionskräfte des Stentmaterials (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Interventionelle Implantation**

Ablage des selbstexpandierenden Herzklappenstents im rechtsventrikulären Ausflusstrakt der Schweine unter Fluoroskopie. Linkes Teilbild: Beginn der Expansion des HKS aus dem Ablagesystem. Rechtes Teilbild: Vollständig explantierter HKS im rechtsventrikulären Ausflusstrakt.

Dabei wurde während der Stentablage die native Klappe durch die Radialkräfte des Nitinolstents an die Wand der Pulmonalarterie gedrückt. Nach Implantation zeigte die Angiographie einen guten Sitz aller 12 HKS und Lage des proximalen Stentanteils über der nativen Klappe. Die in den Nitinolstent integrierte prothetische Herzklappe entfaltete sich während der Expansion des Stents an der Position der nativen Pulmonalklappe. Frühe Stentmigrationen oder Embolien des Stents in die PA konnten im Bereich der fluoroskopischen Kontrolle der Erstintervention nicht beobachtet werden. Bei keiner Intervention traten bedrohliche Herzrhythmusstörungen auf. Thrombenbildung am System mit nachfolgender Lungenarterienembolie konnten klinisch weder während der Intervention, noch in der Aufwachphase beobachtet werden.

### 5.5 Peri- und postinterventionelle Medikation

Spontane Blutungen durch die antikoagulative Behandlung oder allergische Reaktionen auf die Antibiose wurden nicht beobachtet. Bei einem Tier trat trotz Kompression und Druckverband eine Nachblutung der Punktionsstelle circa 30 Minuten nach Entfernen

der Schleusen und Ausleitung der Narkose auf. Es wurde nachsediert und die Punktionsstelle weitere 15 Minuten von außen manuell komprimiert. Danach stand die Blutung zuverlässig. Der Blutverlust war gering und das Tier erwachte ohne weitere Komplikationen.

#### 5.6 *Behandlung mit oralem Everolimus und postinterventioneller Verlauf*

Nach Implantation konnten bei den Schweinen keine Zeichen für eine lokale Infektion im Bereich der Punktionsstelle beobachtet werden. Ebenso konnten keine klinischen Zeichen für eine Infektion im Bereich des Implantats oder für eine Sepsis gefunden werden. Keines der Tiere zeigte zu irgendeinem Zeitpunkt im überwachten Intervall Fieber. Anzeichen für eine Lungenarterienembolie, ausgelöst durch Thrombenbildung am Implantat wurden klinisch nicht beobachtet. Die Gewichtsentwicklung der Everolimusgruppe zeigte keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrollgruppe. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere lag bei  $25,2 \pm 5$  kg vor der Implantation. Nach Ablauf der Studienzzeit wogen die Tiere der Everolimusgruppe  $43,5 \pm 5,5$  kg im Vergleich zu  $44,1 \pm 4,8$  kg in der Kontrollgruppe. Die gemessenen Everolimus-Talspiegel lagen bei  $4,2 \pm 2,4$  ng/mL. Die Kontrolle der Thrombozyten und Leukozytenzahlen zu Beginn und am Ende der Studien zeigten keine signifikanten Unterschiede. Thrombozytopenien oder Leukopenien traten in dem von uns untersuchten Kollektiv nicht auf.

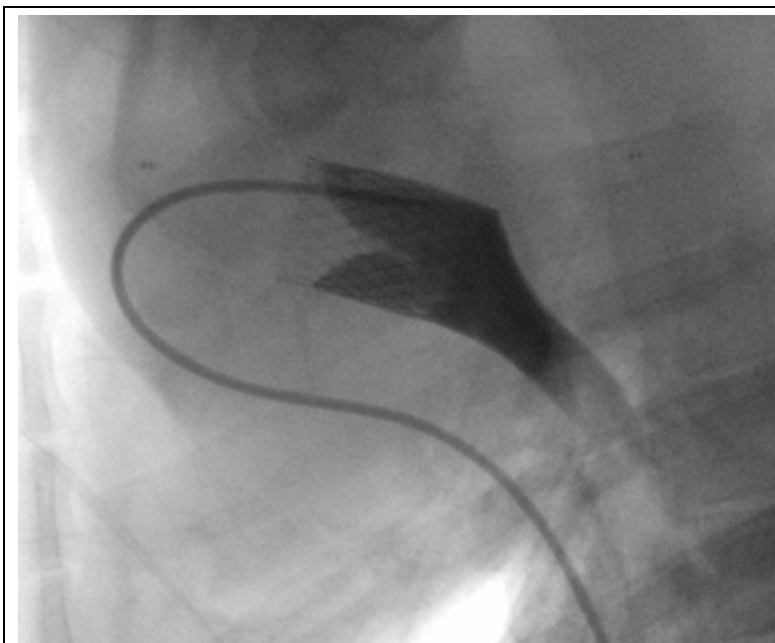
Ein Tier der Everolimusgruppe entwickelte eine drei Tage andauernde Diarrhoeepisode am zehnten postinterventionellen Tag. Alle anderen Tiere waren in Bezug auf Fressverhalten und Aktivitätsgrad unauffällig. Während dieser Zeit wurde ein Plasmalevel von 5 ng/ml bei dem betroffenen Tier gemessen. Es wurde aus dem Gemeinschaftsbereich in einen separaten Stall verbracht und erhielt eine orale Antibiose mit 1000 mg Ciprobay (Ciprofloxacin) als Tagesdosis (500 mg, 1-0-1), ansonsten wurde das Protokoll unverändert fortgeführt. Die initiale Körpertemperatur des Tieres betrug  $38,1$  °C und lag somit innerhalb des Referenzbereiches für Schweine. (35) Das Tier entwickelte zu keiner Zeit febrile oder subfebrile Temperaturen. Nach Beginn der antibiotischen Behandlung zeigte das Schwein rasche klinische Besserung. Zwei Tage nach Behandlungsbeginn wurde wieder fester Stuhl ausgeschieden. Die Antibiose wurde nach dem fünften Tag bei vollständiger klinischer Remission abgesetzt. Die Tiere im Gemeinschaftsstall zeigten zu keiner Zeit eine erhöhte Körpertemperatur

oder klinische Zeichen einer Infektion.

#### 5.7 Hämodynamische Messungen: Initial und nach 3 Monaten

Invasive Druckmessungen direkt vor Implantation des Herzklappenstents zeigten eine gute Funktion der nativen Pulmonalklappe in allen 12 Tieren. Der Druckgradient über der nativen Pulmonalklappe lag bei  $2,1 \pm 3,1$  mmHg (siehe Tabelle 1).

Nach Implantation des Herzklappenstents zeigten invasive Druckmessungen ein Druckgradient von  $3,5 \pm 2,8$  mmHg über der implantierten Klappe. In der Angiographie konnte keine oder nur eine sehr milde zentrale Regurgitation beobachtet werden (Abbildung 5). Paravalvuläre Lecks wurden nicht beobachtet (Abbildung 5).



**Abbildung 5. Angiographische Kontrolle der Klappenfunktion**

Nach Implantation wurde die Kompetenz der Klappe bestätigt. Die Angiographie zeigte keine paravalvulären oder zentralen Leckagen.

Bei den Kontrolluntersuchungen nach drei Monaten konnte mittels MRT eine korrekte Position von allen 12 Herzklappenstents dargestellt werden (Abbildung 6). Stentmigrationen oder paravalvuläre Leckagen konnten bei keinem der Tiere

beobachtet werden. Die Fluoroskopie zeigte keine Frakturen der Herzklappenstents.

Sowohl invasive als auch magnetresonanztomographisch gewonnene Funktionsparameter zeigten bei der Kontrolluntersuchung nach 3 Monaten eine weiterhin zufriedenstellende Klappenfunktion der Implantate in beiden Gruppen.

Die invasive Druckmessung proximal und distal des Stents ergab in der Everolimusgruppe einen Druckgradienten von  $4,3 \pm 3,4$  mmHg über der implantierten Pulmonalklappe und zeigte somit keine große Veränderung zur initialen Messung nach Implantation ( $p=0,58$ ). Mittels MRT wurde in der Everolimusgruppe eine Regurgitationsfraktion von  $4,3 \pm 3,1\%$  durch die implantierte Pulmonalklappe ermittelt.

In der Kontrollgruppe zeigten sich nach 3 Monaten ebenfalls nur ein leichter Anstieg des Druckgradienten über der implantierten Klappe im Vergleich zur initialen Messung nach Implantation. Der Druckgradient lag hier bei  $5,5 \pm 4,5$  mmHg und zeigte somit keinen signifikanten Unterschied zur Everolimusgruppe. Bezüglich der rechtsventrikulären und pulmonalen Spitzendruck (systolisch und enddiastolisch) zeigte sich nach 3 Monaten kein signifikanter Unterschied zwischen Everolimusgruppe und Kontrollgruppe ( $p=0,87$ , Tabelle 1).

Nach 3 Monaten zeigte die MRT jedoch eine signifikant höhere pulmonale Regurgitationsfraktion durch die implantierte Herzklappe in der Kontrollgruppe als in der Everolimusgruppe. In der Kontrollgruppe wurde eine Regurgitationsfraktion von  $7,3 \pm 4,2\%$  gemessen, in der Everolimusgruppe hingegen  $4,3 \pm 3,1\%$  ( $p < 0,01$ , Tabelle 1).

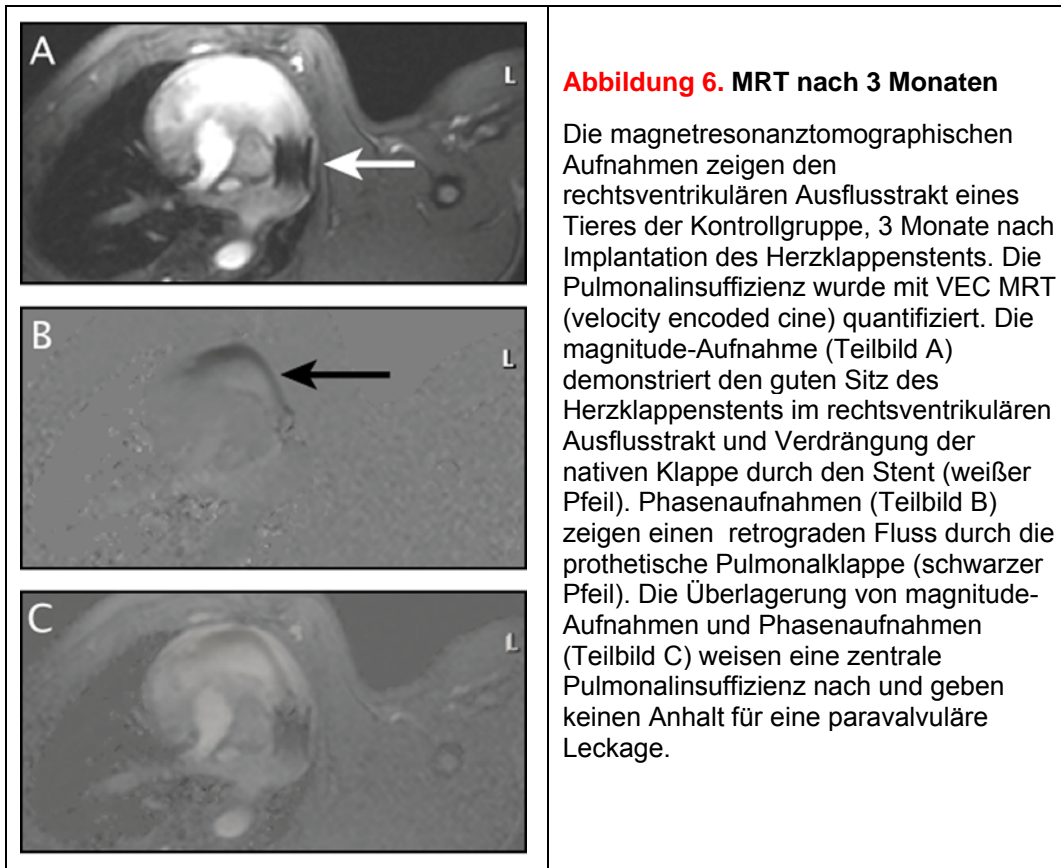
**Tabelle 1: Hämodynamische Messungen: Initial und nach 3 Monaten**

	<u>Initiale Untersuchung</u>		<u>Nachfolgeuntersuchung</u>	
	Vor der Implantation	Nach der Implantation	Everolimus- gruppe	Kontroll- gruppe
	(n=12)	(n=12)	(n=6)	(n=6)
<b>Invasive Druckmessung</b>				
(mmHg)				
Rechtsventrikuläre Spitzendrücke				
(Spitzendruck systolisch / enddiastolisch)	26,3±8,4 / 3,2±2,2	27,4±9 / 3,9±3,0	28,4±6,3 / 3,8±3,0	30,3±9,6 / 4,3±2,3
Pulmonalarterielle Spitzendrücke				
(Spitzendruck systolisch / enddiastolisch)	24,2±6,4 / 10,5±4,2	23,8±7,5 / 11,1±4,2	24,7±4,6 / 4,9±4,2	24,1±4,4 / 4,8±5,2
Druckgradient über der Pulmonalklappe	2,1±3,1	3,5±2,8	4,3±3,4	5,5±4,5
<b>MRT- Untersuchung</b>				
Pulmonale Regurgitationsfraktion (%)				
	n.u.	n.u.	4,3±3,1%	7,3±4,2%*
RV Schlagvolumina (mL)	n.u.	n.u.	31,8±7,9	36,5±6,2*

Hämodynamische Daten aus den Messungen im Herzkatheterlabor und MRT. Zum Zeitpunkt der Nachfolgeuntersuchung nach 3 Monaten zeigten die Tiere der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte pulmonale Regurgitation verbunden mit gesteigerten enddiastolischen rechtsventrikuläre Volumina im Vergleich zu der Everolimusgruppe (\*p<0,01). n. u.: nicht untersucht

\* p<0,05 (Daten, die Unterschiede zwischen Kontroll- und Everolimusgruppe vergleichen)

† p<0,05 (Werte, die Unterschiede zwischen Initial- und Nachfolgeuntersuchung vergleichen)



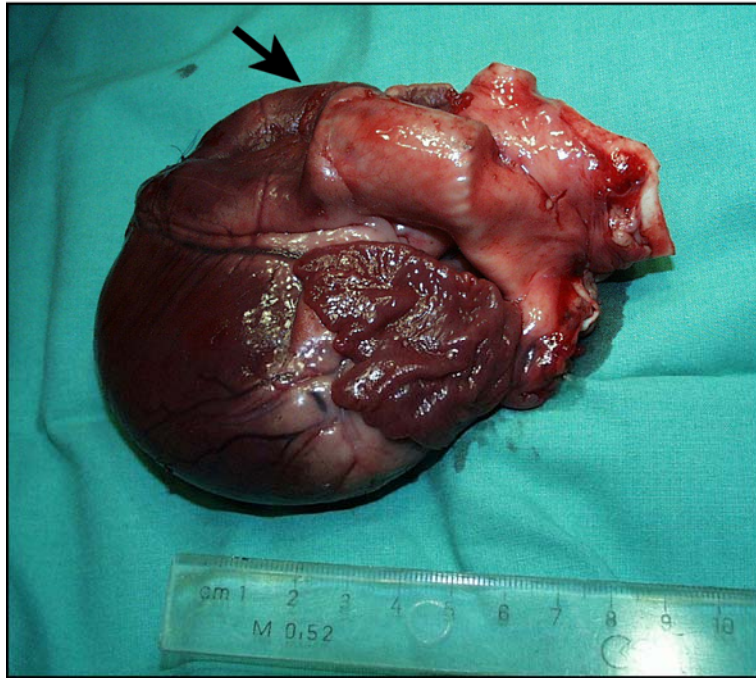
**Abbildung 6. MRT nach 3 Monaten**

Die magnetresonanztomographischen Aufnahmen zeigen den rechtsventrikulären Ausflusstrakt eines Tieres der Kontrollgruppe, 3 Monate nach Implantation des Herzklappenstents. Die Pulmonalinsuffizienz wurde mit VEC MRT (velocity encoded cine) quantifiziert. Die magnitude-Aufnahme (Teilbild A) demonstriert den guten Sitz des Herzklappenstents im rechtsventrikulären Ausflusstrakt und Verdrängung der nativen Klappe durch den Stent (weißer Pfeil). Phasenaufnahmen (Teilbild B) zeigen einen retrograden Fluss durch die prothetische Pulmonalklappe (schwarzer Pfeil). Die Überlagerung von magnitude-Aufnahmen und Phasenaufnahmen (Teilbild C) weisen eine zentrale Pulmonalinsuffizienz nach und geben keinen Anhalt für eine paravalvuläre Leckage.

### 5.8 Makroskopische Inspektion, Histologie und REM

Bei Explantation der prothetischen Klappen konnten weder in der Everolimusgruppe noch in der Kontrollgruppe Thrombusformationen im Bereich der Klappe oder umliegenden Anatomie festgestellt werden. Ebenso wurden bei der makroskopischen Inspektion der Explantate und der umliegenden Strukturen keinerlei Anzeichen für eine Infektion im Bereich des Stents oder Veränderungen des Endokards im Rahmen einer aktiven oder abgelaufenen Endokarditis, wie z.B. endokarditische Vegetationen gefunden. Die korrekte Lage aller Implantate über der nativen Pulmonalklappe konnte bei Explantation der HKS bestätigt werden (Abbildung 7).

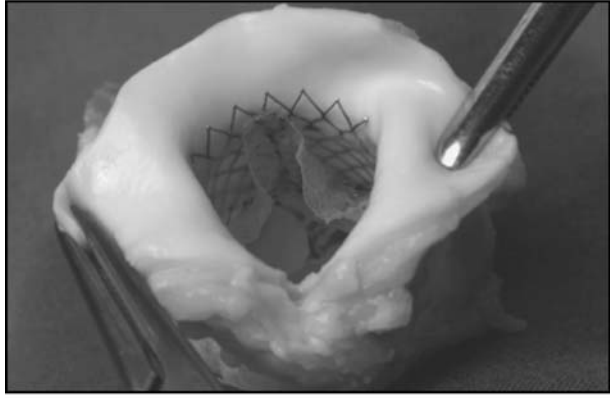




**Abbildung 7. Implantierter Herzklappenstent**

Explantiertes Herz eines Tieres aus der Everolimusgruppe 3 Monate nach Implantation. Beachte die korrekte Lage des Herzklappenstents (Pfeil) im rechtsventrikulären Ausflusstrakt über der nativen Pulmonalklappe.

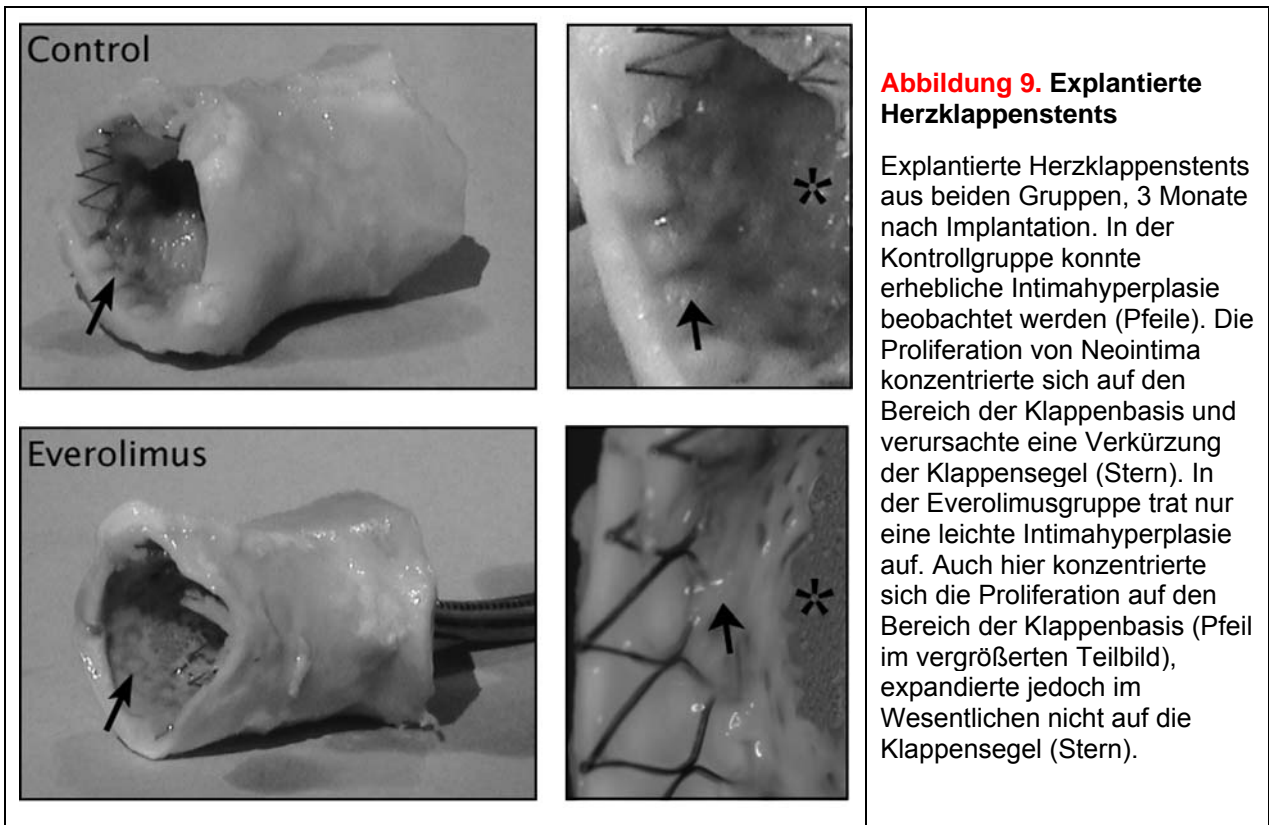
Migration wurde bei keinem der Explantate festgestellt. Alle Nitinolstents waren, soweit beurteilbar und nicht von Gewebe überwachsen, intakt. Stentfrakturen oder Deformierungen konnten nicht beobachtet werden. Die Explantate zeigten eine Neubildung von Gewebe innerhalb des Stents bei beiden Gruppen, jedoch waren schon in der makroskopischen Inspektion deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Bei Explantaten der Everolimusgruppe zeigten die Stents einen leichten Überzug mit Gewebe (Abbildung 8). Die Maschen der Stents waren in dieser Gruppe unter dem zellulären Überzug noch an fast allen Stellen zu erkennen. Die Klappe lag frei von Einwachsungen im Lumen des Stents und zeigte keine Bedrängung durch einwachsendes Gewebe (Abbildung 8).



**Abbildung 8. Explantierter Herzklappenstent aus einem Tier der Everolimusgruppe**

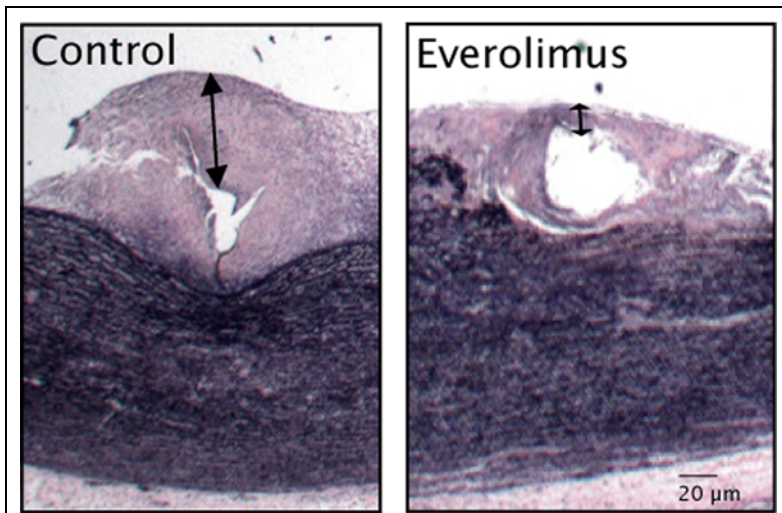
Explantierter Herzklappenstent aus der Everolimusgruppe 3 Monate nach Implantation. Trägerstent und Segel der prothetischen Herzklappe sind weitgehend frei von Intimahyperplasie.

Die Explantate der Kontrollgruppe zeigten dagegen eine erhebliche Gewebsneubildung die sich auf den Bereich der Klappenbasis fokussierte, an dem das Klappengewebe in den Stent eingewachsen ist und Kontakt zu den Stentmaschen hat (Abbildung 9).



Proliferiertes Gewebe expandierte in diesem Bereich auf die Klappensegel und führte zu einer Verkürzung und Verdickung der Segel. Jedoch waren auch Großteile des Nitinolstents in Bereichen, die keinen direkten Kontakt zu Klappenmaterial und Nahtstellen hatten, von Gewebsneubildung stärker überwachsen als Vergleichsexemplare der Everolimusgruppe. Die Stentmaschen waren in der Kontrollgruppe in vielen Bereichen unter dem Zellüberzug makroskopisch nicht mehr zu erkennen.

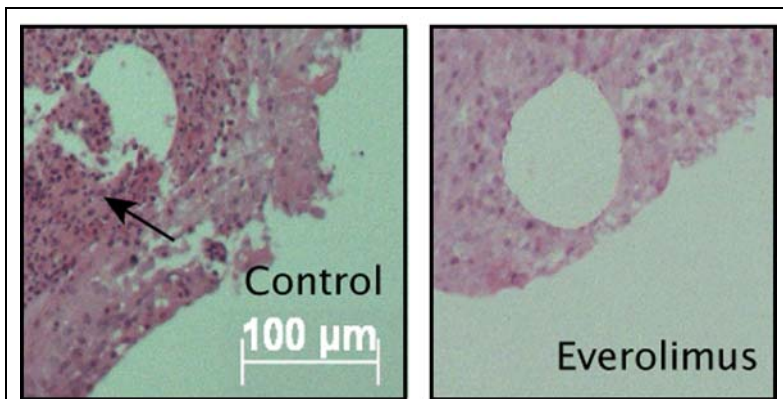
In der histologischen Untersuchung der Explantate wurde eine Neogenese von Intima in beiden Versuchsgruppen festgestellt, die sich bei allen Stents auf den Bereich der Klappenbasis fokussierte. Die Intimadicke wurde dabei bestimmt als Abstand zwischen Endothelium und oberem Rand der entfernten Stentmaschen. Jedoch zeigte sich in mit EvG gefärbten Gewebsschnitten ein signifikanter Unterschied in der Intimadicke der beiden Gruppen (Abbildung 10).



**Abbildung 10. Messung der Intimadicke im histologischen Schnitt**

Histologische Gewebsschnitte (Färbung mit EvG, 12,5 fache Vergrößerung) durch den Trägerstent aus dem Bereich der Klappenbasis (siehe Pfeil in Abbildung 9) mit Darstellung der Intima und Media. Im Bereich der Ausparung von Gewebe innerhalb der Intima wurde die angeschnittene Masche des Trägerstents entfernt. Beachte die erhebliche Verdickung der Intima in der Kontrollgruppe verglichen mit der Everolimusgruppe. Zu beachten ist außerdem die vollständige Endothelialisierung der Stentmasche in der Everolimusgruppe.

In der Everolimusgruppe erreichte die Gewebsneubildung im Lumen des Stents eine Stärke von  $13,2 \pm 10,2 \mu\text{m}$ , verglichen mit  $120,3 \pm 49,6 \mu\text{m}$  in den explantierten Stents der Kontrollgruppe. Diese Werte sind Ergebnisse aus Gewebsschnitten im Bereich der Klappenbasis, in denen Neointima frei über den Stentmaschen lag und so gut dargestellt und ausgemessen werden konnte. In den Bereichen, in denen Klappenmaterial mit Nähten an dem Trägerstent befestigt wurde, konnte eine wesentlich stärkere Neubildung von Gewebe beobachtet werden. Auch hier zeigte sich wie in der Inspektion beschrieben ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Jedoch konnten die Schnitte durch Klappen- und Nahtmaterial nicht sauber dargestellt und ausgemessen werden. Auch im Aufbau des Gewebes konnten Unterschiede beobachtet werden. In der HE-Färbung konnten zahlreiche Lymphozyten im Proliferationsgewebe der Kontrollgruppe identifiziert werden, nicht jedoch im Gewebe der Everolimusgruppe (Abbildung 11).



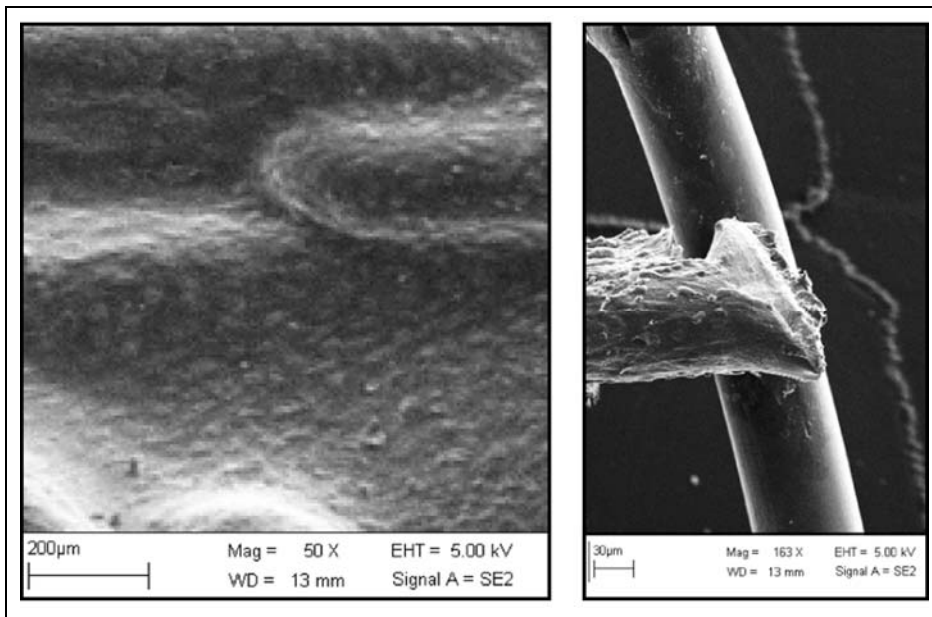
**Abbildung 11. Zellanalyse im histologischen Schnitt**

Histologische Gewebsschnitte (Färbung mit HE, 12,5 fache Vergrößerung) durch den Trägerstent aus dem Bereich der Klappenbasis (siehe Pfeil in Abbildung 9). Die Aussparung von Gewebe innerhalb der Intima entstand durch die Entfernung der angeschnittenen Masche des Trägerstents. Beachte die Infiltration mit zahlreichen Lymphozyten in der Kontrollgruppe.

Formationen von wandständigen Thromben konnten in der histologischen Untersuchung in keiner der beiden Gruppen beobachtet werden.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von repräsentativen Proben des Klappenmaterials aus der Everolimusgruppe zeigten einen dünnen und kontinuierlichen Überzug von Zellen, was auf endotheliale Zellen hinweist (Abbildung 12). Thrombozytenaggregate auf dem Klappenmaterial konnten im REM nicht identifiziert werden. Außerdem zeigten Bilder des REM die erhaltene strukturelle Integrität des titanbeschichteten Klappenmaterials. Anzeichen für eine Schrumpfung des Materials, Risse in der Beschichtung oder Deformitäten konnten nicht beobachtet werden (Abbildung 12).





### Abbildung 12. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Representative Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie von Klappenmaterial eines Explantats aus der Everolimusgruppe 3 Monate nach Implantation (Klappenmaterial wurde aus dem mit einem Stern markierten Bereich in Abbildung 9 entnommen). Links: Abbildung zeigt komplette und kontinuierliche Endothelialisierung des Klappenmaterials. Rechts: Representatives Polymer-Filament nach Befreiung von Endothel bei hoher Auflösung (163 fache Vergrößerung). Es ist keine Schrumpfung oder anderweitiger struktureller Schaden des Materials zu erkennen.

## 6 Diskussion

Die vorliegende Studie ist, nach unserer Kenntnis, der erste Bericht über den hemmenden Einfluss von oralem Everolimus auf die Intimaproliferation in herzklaipentragenden Stents in der Pulmonalposition von Schweinen. Die zwei bedeutenden Ergebnisse dieser Tierstudie sind, dass (1) die Neubildung und Proliferation von Intima ein möglicher Grund für die Degeneration und das Implantatversagen von Herzklappenstents im nativen rechtsventrikulären Ausflusstrakt sind und weiterhin, dass (2) die orale Gabe von Everolimus die Intimaproliferation in Herzklappenstents, bestehend aus einem Nitinolträgerstent und einer trikuspiden, titanbeschichteten Klappe aus Polymer, effektiv inhibiert.

Aktuell werden zum Herzklappenersatz verschiedene Verfahren angewandt. Der chirurgische Ersatz der Klappe unter Einsatz der extrakorporalen Zirkulation ist zur Zeit

der Goldstandard, wobei zwischen mechanischen oder biologischen Implantaten gewählt werden kann. Die im Gegensatz zu den mechanischen Implantaten geringere Langlebigkeit biologischer Herzklappen stellt ein Problem dar, das gerade beim Management von jungen Patienten den wiederholten Ersatz einer Herzklappe notwendig macht. Prozesse, die zu einer Degeneration von Herzklappenimplantaten führen, sind multifaktoriell und können bislang nur schwer beeinflusst werden. Verantwortlich gemacht werden unter anderem Kalzifikation, Immunogenität des biologischen Materials, strukturelle Abnutzung der Klappe durch andauernde mechanische Belastung, sowie enzymatische Reaktionen.(50-53)

### *6.1 Ursachen für Implantatversagen bei Herzklappenstents*

In den letzten Jahren wurde die perkutane Implantation von Herzklappenstents entdeckt und entwickelte sich zu einer äußerst vielversprechenden minimalinvasiven Methode des Klappenersatzes mit großem Anwendungspotential. Allerdings bietet diese neue Methode zusätzliche Angriffspunkte, die zu einer Degeneration des Implantats führen können. Außer den oben genannten „klassischen“ Degenerationsursachen für biologische Herzklappenimplantate wurden Stentfrakturen, Stentmigrationen, Intimahyperplasie und paravalvuläre Leckage als zusätzliche Faktoren identifiziert, die zum Versagen des Implantats führen können.(9, 10, 54) Diese Faktoren stellen bis auf die paravalvuläre Leckage auch ein Problem bei der Implantation von endovaskulären Stents im koronaren oder distalen Stromgebiet dar. Erste längerfristige Daten über den klinischen Einsatz von Herzklappenstents beschränken sich zum Großteil auf die Implantation im „conduit“ und nur zu einem geringen Prozentsatz im nativen rechtsventrikulären Ausflusstrakt. Die Implantation im rechtsventrikulären Ausflusstrakt oder in anderen kardialen Klappenpositionen verschärfen diese Faktoren jedoch. Es ist zu erwarten, dass bei besserer Datenlage die Degeneration von Herzklappenstents durch diese Situation zu einem wichtigen Thema im Management des perkutanen Klappenersatzes werden wird. Doch trotz zahlreicher aktueller Veröffentlichungen zum Thema perkutaner Herzklappenersatz beschränken sich die meisten Publikationen auf Machbarkeitsstudien. Mittel- und längerfristige Daten zur Implantation von Herzklappenstents im nativen rechtsventrikulären Ausflusstrakt und Degeneration dieser neuartigen prothetischen Herzklappen stehen bis jetzt nur in

sehr geringen Ausmaß zur Verfügung.

Das Auftreten von Stentfrakturen ist abhängig von Design und Material des Stents und tritt verstärkt in Situationen auf, in denen der Stent mechanischen Belastungen ausgesetzt ist.(55) Der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt stellt durch ständige Bewegung und Kompression eine Umgebung dar, die einen Stent mechanisch wesentlich mehr beansprucht als das koronare oder distale Stromgebiet. Folglich sind hier mehr Stentfrakturen zu erwarten als bei endovaskulären Stents. Nordmeyer et al untersuchten ein Kollektiv von 123 Patienten nach perkutanem Ersatz der Pulmonalklappe auf das Auftreten von Stentfrakturen und berichtete eine Inzidenz von 21% bei einer Laufzeit von 3 Jahren.(10) Über 80% (21 von 26) der Stentfrakturen traten dabei im ersten Jahr nach Implantation auf. In der von uns durchgeführten Tierstudie wurden keine Stentfrakturen beobachtet. Es ist anzunehmen, dass der Trägerstent durch die elastischen Eigenschaften und gute Kompressionsfähigkeit des Nitinols im Umfeld des rechtsventrikulären Ausflusstrakts, wo er hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt ist, besser vor Frakturen geschützt ist, als ein ballon-expandierbares Platin-Iridium Modell. Diese Annahme müsste jedoch mit längeren Laufzeiten und höheren Fallzahlen untersucht werden.

Stentmigrationen stellen besonders beim perkutanen Klappenersatz in Aortenposition ein Problem dar. Viele Arbeitsgruppen setzten deshalb Herzklappenstents mit besonderen Verankerungsmethoden vor allem bei Implantation in aortaler Position ein.(11) Laborde et al. berichten in ihrer Tierstudie zum perkutanen Aortenklappenersatz von 4 frühen Stentmigrationen bei einem Kollektiv von 12 Tieren.(11) Doch auch bei Herzklappenstent-Implantation im rechtsventrikulären Ausflusstrakt werden Stentmigrationen berichtet. Khambadkone et al. beobachteten bei ihrer klinischen Studie an 59 Patienten eine Spätmigration des Implantats nach 9 Monaten mit Stentembolisation in die rechte Pulmonalarterie.(9) Der Herzklappenstent wurde im Herzkatheterlabor mit einer Schlinge gefasst und in den rechten Ventrikel zurückgezogen, um im Anschluss im Rahmen der chirurgischen Implantation einer Ersatzklappe geborgen werden zu können. In dem wesentlich kleineren Kollektiv unserer Studie traten keine Migrationen der Implantate auf. Der von uns benutzte Nitinolstent weist als Verankerung zusätzlich zu den selbstexpandierenden Radialkräften auskragende Stentenden auf, welche den Stent nach Expansion am Implantationsort fixieren. Ohne zusätzliche Verankerungsmechanismen (spikes, etc.)



gewährleisten nur die Radialkräfte des Stents eine stabile Position im Gefäß. Der von Khambadkone et al benutzte Platin-Iridium Stent ist ein ballonexpandierbarer Stent, der zwar nach Expansion sehr resistent gegen komprimierenden Druck ist, jedoch nach Komprimierung keine Radialkräfte mehr ausüben kann. In dieser Situation kann es dadurch in seltenen Fällen wie von Khambadkone et al zur Embolisation des Implantats kommen.(9)

Auch die Intimahyperplasie ist als Ursache von Implantatdegeneration beim perkutanen Klappenersatz noch kaum untersucht. Sehr gut bekannt und Gegenstand zahlreicher Studien ist die Intimahyperplasie jedoch bei der Implantation von endovaskulären Stents im Rahmen der Restenoseproblematik. Die Restenosierung von Stents durch einwachsendes Gewebe stellt ein großes Problem dar, besonders beim Einsatz im koronaren Stromgebiet, und ist die häufigste Komplikation dieser Behandlung.

## 6.2 *Entstehung von Intimahyperplasie nach Implantation von Herzklappenstents*

Ursächlich liegt der Restenosierung nach Stentimplantation eine Entzündungskaskade mit anschließender Ausbildung von Neointima zugrunde. Die Verletzung der Gefäßwandintegrität durch Einschneiden der Stentmaschen und Abtragung von Endothel bei Expansion des Stents führt zur Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand. Im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion nach Stentimplantation sind diese adherenten Leukozyten hauptsächlich Granulozyten und Monozyten, welche nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine (z.B. monocyte-chemoattractant-protein-1) in die Gefäßintima einwandern.(56) Diese frühe Rekrutierung von Monozyten wird als ein wichtiger Faktor zur Entstehung von Restenosen nach Stentimplantation gesehen.(56) Mori et al. blockierten in ihrer Studie die frühe Monozyteneinwanderung mit entzündungshemmenden Substanzen und berichteten von einer geringeren Intimaverdickung als in der Kontrollgruppe.(56) Eine andere Studie zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl von zirkulierenden Monozyten nach Stentimplantation und Restenoserate im Menschen.(57) Intimaständige Monozyten differenzieren sich im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion nach Wochen zu Makrophagen, bzw. Schaumzellen.(58) Ebenfalls einwandernde T-Lymphozyten bilden Zytokine (Gamma-Interferon und TNF-beta) die vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen stimulieren.(58) Die vorhandenen Leukozyten, sowie Zellen der

Gefäßwand schütten in der Folge Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor) aus, welche für eine Proliferation von glatten Muskelzellen sorgen und deren Migration in die Gefäßintima unterstützen. Zudem wird extrazelluläre Matrix in der Intima deponiert, welche aus Hyaluronan, Vesican und Kollagen (Typ III der Akutphase und Typ I nach Wochen) besteht und somit Ähnlichkeiten zur dermalen Wundheilung zeigt.(58)

Diese Deposition von extrazellulärer Matrix und Einwanderung sowie Proliferation von glatten Muskelzellen sind zusammen mit der Vermehrung von Endothelzellen verantwortlich für die Zunahme der Intimadicke und Restenose nach Stentimplantation im Menschen. Dabei unterscheidet sich der zugrunde liegende Mechanismus der Restenose in einem gestenteten Gefäßteil deutlich vom spätem Lumenverlust in nicht-gestenteten Läsionen (z.B. periphere transluminale Angioplastie). Im Gegensatz zum arteriellen Remodeling (Veränderung der Gefäßdicke) in nicht-gestenteten Gefäßen, zeichnet sich die Gewebsproliferation im Lumen von Stents durch die Ausbildung von Neointima aus und somit durch zelluläre Proliferation und Ansammlung von extrazellulärer Matrix.(59)

Auf die Inzidenz der Restenose nach Stentimplantation nehmen verschiedene Faktoren Einfluss. Das Alter und Geschlecht des Patienten, die Länge des Stents, der Durchmesser des Gefäßes und ein vorhandener Diabetes mellitus beeinflussen die Restenoserate.(60-62) Aber auch das jeweilige Design des Stents ist von Bedeutung. Hoffmann et al. zeigten in ihrer intravaskulären Ultraschallstudie, dass unterschiedliche Designs der Stents einen signifikanten Einfluss auf die neointimale Gewebsproliferation und somit die Restenoserate haben.(63) Es wurde berichtet, dass die Bauart des Stents das Ausmaß der Abtragung von Endothel während der Expansion des Stents festlegt, sowie dafür verantwortlich ist, wie tief die Stentmaschen in die Gefäßwand einschneiden. Eine erhöhte Abtragung von Intima sowie ein tieferes Einschneiden der Stentmaschen in die Gefäßwand induzieren eine verstärkte inflammatorische Reaktion und erhöhen somit den Grad der Gewebsproliferation. Auch eine eventuelle Thrombusbildung an Gefäßwand und Stentmaschen fördert eine Proliferation von Neointima und erhöht das Risiko einer Restenose. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Thrombusbildung die Proliferation fördert, indem der wandständige Thrombus eine Matrix bereitstellt, in die glatte Muskelzellen einwandern und proliferieren können.(64)

Noch stehen keine umfangreichen Langzeitergebnisse zur Verfügung, welche Faktoren aufzeigen, die zum Versagen von Herzklappenstent-Implantaten führen. Doch auf Grund der Pathophysiologie der Restenose nach Implantation von endovaskulären Stents ist zu vermuten, dass der Intimahyperplasie eine große Bedeutung als Versagensursache von Herzklappenstent-Implantaten zukommen wird. Beim Einsatz des transkutanen Herzklappenersatzes im pädiatrischen Patient ist von einer noch größeren Problematik auszugehen, da im jungen Patienten grundsätzlich immunologische Antworten stärker ausfallen als im adulten Patienten. Schon im nicht-klappentragenden Stent im Koronarbett oder in distalen Gefäßen ist die Intimahyperplasie ein massives Problem. Ellis et al. untersuchten in ihrer Studie über 5000 Patienten nach Implantation eines unbeschichteten Metallstents (bare metal stent) auf das Auftreten von Restenose und berichten von einer interventionswürdigen Restenoserate von 13,4% nach nur 9 Monaten.(65) Die Restenose ist die häufigste Komplikation nach Implantation von endovaskulären Stents. Im Gegensatz zu diesen bieten die klappentragenden Stents jedoch mehrere zusätzlich Gründe, die Anlass zum Entwickeln einer Intimahyperplasie geben. Beim Herzklappenstent sind größere Radialkräfte nötig, um die sichere Position des klappentragenden Stents zu gewährleisten, als zum Beispiel beim Koronarstent. Es müssen daher bei selbstexpandierenden Modellen im Verhältnis zum Gefäßdurchmesser größere Stents gewählt werden, oder bei ballonexpandierbaren Stents größere Kräfte bei der Expansion aufgewendet werden. In beiden Fällen resultiert eine vermehrte Verletzung der Intima, was eine verstärkte Intimahyperplasie als Folge vermuten lässt. Es wird jedoch angenommen, dass selbstexpandierende Stents schonender implantiert werden können als ballon-expandierbare Modelle.(66) Doch auch bei selbstexpandierenden Stents kommt es im Rahmen der größeren notwendigen Radialkräfte bei Herzklappenstents zur Verletzungen der Intima und des Endothels. Attmann et al. stellen in ihrem Artikel einen selbstexpandierenden Herzklappenstent aus Nitinol und berichten von nennenswerten Intima- und Endothelverletzungen.(67)

Durch die mechanische Aktivität des Herzzyklus werden außerdem Bewegungen und Scherkräfte des Stents gegen die Gefäßintima erzeugt, die eine erhöhte Abtragung von Gefäßendothel durch die Stentmaschen und eine erschwerte vollständige Endothellialisierung vorstellbar machen. Die integrierte Herzklappe erzeugt durch den notwendigen Schluss- und Öffnungsdruck zusätzliche Microbewegungen des Stents

und Scherkräfte gegen die Gefäßwand. Bei den bisher veröffentlichten Studien zur perkutanen Implantation von Herzklappenstent sind die Herzklappen mit Nahtmaterial, meist Prolene, in das Lumen der verschiedenen Stentmodelle integriert.(4, 67) Dieses Nahtmaterial sorgt für zusätzliche Reibung und Verletzung des Endothels während der Stentbewegung an der Basis der Klappe, wo ein Großteil der Nähte zur Befestigung angebracht werden müssen. Zudem ist anzunehmen, dass an dem Herzklappenstent mehr Turbulenzen im Blutstrom entstehen als an einer chirurgisch implantierten Klappe. Es wurde gezeigt, dass turbulenter Fluss durch Schädigung von Wandzellen ebenfalls eine Proliferation von Gefäßintima verursachen kann.(68)

Die aus diesen Faktoren resultierende Intimahyperplasie in klappentragenden Stents stellt ein Problem dar, weil mit Funktionseinschränkungen der im Lumen integrierten Herzklappe gerechnet werden muss. Das zu erwartende Störungsprofil der Klappenfunktion ist dabei vielseitig. Stark einwachsendes Gewebe kann zu Stenosen im Bereich der Klappe führen. Entstehende starke Turbulenzen des Blutfluss können die hemodynamischen Eigenschaften der Klappe in großem Ausmaß stören. Außerdem kann auf- bzw. in die Klappensegel einwachsendes Gewebe eine Verkürzung oder einen Elastizitätsverlust der Segel verursachen. In der Folge wären dann verstärkte zentrale Regurgitationen oder Stenosen der prothetischen Herzklappe zu erwarten. Diese Komplikationen könnten vermehrt auftreten, wenn perkutaner Herzklappenersatz sich zu einer populären Methode entwickelt, die nicht nur bei angeborenen Herzfehlern im pädiatrischen Patienten, sondern auch vermehrt bei älteren Patienten mit erworbenen Erkrankungen der Herzklappen eingesetzt wird. Denn diese Patienten haben durch Alter und erhöhte Inzidenz an Diabetes mellitus ein höheres Risiko für die Entwicklung einer Intimahyperplasie nach Stentimplantation.(43)

### *6.3 Neointimale Proliferation als Störfaktor der Klappenfunktion beim Herzklappenstent*

In der Tierstudie von Ruiz et al. wurde übereinstimmend mit diesen Vermutungen eine signifikante Intimahyperplasie beobachtet, welche die Klappenfunktion beeinträchtigt.(20) C. Ruiz stellte in seinem Artikel ein neuartiges Herzklappenstent-System vor, welches aus einem selbstexpandierenden Stent mit einer bikuspiden Klappe aus porciner Dünndarmmukosa besteht und in ein Ablagesystem mit einem sehr

geringen Außendurchmesser (8 French) geladen werden kann. Das Ziel der Studie war die Machbarkeit der Implantation des Herzklappenstents zu beweisen, aber vor allem die Langlebigkeit von Dünndarmmukosa als neuartiges Klappenmaterial zu überprüfen. C. Ruiz beschreibt eine Segelverdickung der explantierten Klappen bereits nach 3 Monaten. Nach 6 Monaten wurde eine weitere Segelverdickung und Versteifung beobachtet. Außerdem wurde eine Hyperplasie von Gefäßintima beschrieben, die sich auf den Bereich der Klappenbasis konzentriert. Gewebe wuchs auf die Basis der Klappensegel und verjüngte sich konisch zur Spitze der Klappensegel. Intimadicken von bis zu 150 µm im Bereich der Klappenbasis wurden gemessen. Zudem wurde eine Verkürzung der Segel beschrieben. Nach 1 Jahr waren zwei von drei Herzklappenstents frakturiert und die Klappen in diesen Stents gerissen. Die Segel der Klappen waren stark verkürzt und verdickt. Über die Dicke der Gefäßintima wird nicht berichtet.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus der Versuchsreihe von C. Ruiz, zeigte sich in der Kontrollgruppe unserer Studie nach 3 Monaten starke Proliferation von Gewebe im Bereich des implantierten Stents. Die Gewebsneubildung konzentrierte sich auch in unserer Studie auf die Klappenbasis. Jedoch zeigte der Teil der Gefäßwand die Kontakt mit dem restlichen Teil des Stents hatte ebenfalls eine starke Intimahyperplasie. Die von uns gemessene Intimadicke im Stentlumen der Kontrollgruppe nach 3 Monaten korreliert in etwa mit den Werten, die C. Ruiz nach 6 Monaten berichtet (120 vs. 150 µm).

Die Klappenfunktion in der Kontrollgruppe zeigte sich bei der Kontrolluntersuchung im MRT nach 3 Monaten beeinträchtigt. Magnetresonanztomographische Flussmessungen zeigten eine Insuffizienz der Implantate in der Kontrollgruppe mit einer signifikant höheren Regurgitation als in der Everolimusgruppe ( $7,3 \pm 4,2\%$  vs.  $4,3 \pm 3,1\%$ ). Die Kombination des erhöhten rechtsventrikulären Schlagvolumens mit einem leichten Anstieg des Druckgradienten über der Klappe wies auf das Vorliegen einer hämodynamisch nicht relevanten „funktionellen“ Stenose (im Gegensatz zu einer morphologisch bedingten Stenose) der prothetischen Pulmonalklappe hin. Diese funktionelle Stenose ist Ausdruck des erhöhten rechtsventrikulären Volumens und ein weiterer Hinweis auf eine Störung der Klappenfunktion.

#### 6.4 *Inhibierende Wirkung von Everolimus auf neointimale Proliferation*

Verschiedene große Studien konnten belegen, dass eine verstärkte Proliferation von Intima nach Stentimplantation durch Einsatz von immunsupprimierenden Pharmaka inhibiert werden kann. Sowohl die lokale Applikation (drug-eluting stents) als auch der systemische Einsatz (orale Medikation) zeigten gute Ergebnisse sowohl im Tierversuch als auch in klinischen Studien. (30-31, 36, 38, 69-70) Everolimus (Certican, Novartis), ein neuartiges immunsupprimierendes und proliferationshemmendes Medikament wird seit kurzem mit großem Erfolg zur Senkung der Restenoserate nach Stentimplantation eingesetzt. Erste Studien mit medikamentenbeschichteten Stents (everolimus-eluting stent, Biosensors International Inc.) demonstrierten die Sicherheit des Medikaments und eine signifikant gesenkte Intimadicke nach 6 Monaten, die sich im Vergleich mit etablierten Systemen (Sirolimus-eluting stent, Paclitaxel-eluting stent) als nicht unterlegen zeigten.(71-72)

Everolimus (Entwicklungsname: RAD) ist ein immun- und proliferationshemmender Wirkstoff und findet klinisch Anwendung als Medikament zur Verhinderung von Abstoßungsreaktion bei Herz- und Nierentransplantaten.(41) Das Präparat wirkt am Signaltransduktionsweg der Zellzyklusprogression. Hier inhibiert es die p 70 S6 Kinase und blockiert so die Interleukin-2- und Interleukin-15 vermittelte T- und B-Lymphozytenproliferation, sowie die durch Wachstumsfaktoren induzierte Proliferation von gefäßstämmigen glatten Muskelzellen. Everolimus (40-O-[hydroxy]ethyl-rapamycin) unterscheidet sich strukturell nur wenig von Sirolimus (Rapamycin, Rapamune, Wyett). Beide Wirkstoffe bestehen aus beinahe identischen makrozyklischen Molekülen, wobei bei Sirolimus eine Hydroxylgruppe als Seitenkette angehängt ist, bei Everolimus jedoch eine Hydroxy-Ethoxy-Gruppe. Trotz dieser geringen strukturellen Unterschiede zeichnen sich die beiden Wirkstoffe durch eine unterschiedliche Pharmakokinetik und –dynamik aus. Verglichen mit Sirolimus erreicht Everolimus schneller ein Fließgleichgewicht (4 Tage im Vergleich zu 6 Tagen) und zeigt eine fast dreimal so niedrige Halbwertszeit (19 Stunden verglichen mit 60 Stunden).(47, 73) Durch diese Eigenschaften können Dosisänderungen bei Patienten einfacher durchgeführt werden. In einem placebo-kontrollierten Tiermodell demonstrierte oral verabreichtes Everolimus eine verminderte Neubildung von Intima im Lumen von Stents im Vergleich zu Tieren

der Placebogruppe.(45) In dieser Studie von Farb et al wurden ballon-expandierbare Stents (Multi-Link) bilateral in die A. iliaca von Kaninchen implantiert und die Tiere danach in einer Hoch- und einer Niedrigdosisgruppe mit Everolimus behandelt und mit einer Placebogruppe verglichen. Die Auswertung erfolgte nach 28 Tagen. In beiden Everolimusgruppen zeigte sich ein signifikant vermindertes neointimales Wachstum von Gewebe im Lumen der Stents im Vergleich zur Placebogruppe. A. Farb beschreibt in der Niedrigdosisgruppe eine gute Ausheilung der Gefäßwand, charakterisiert durch komplette Endothelialisierung und einen dünnen, aber vollständigen Überzug von neointimalen Zellen. In der Hochdosisgruppe bleibt diese komplette Endothelialisierung und Zellüberzug der Stentmaschen teilweise aus und zeigt eine nicht vollständig abgeschlossene Ausheilung der Gefäßwand. Außerdem wurden in der Hochdosisgruppe Nebenwirkungen der Everolimusbehandlung beobachtet. Fünf von sechs Kaninchen zeigten Appetitlosigkeit und einen Gewichtsverlust von über 10% des Körpergewichts in den ersten fünf Tagen nach Intervention. In beiden Everolimusgruppen werden deutlich weniger Entzündungszellen (vorwiegend Makrophagen) in der Neointima vorgefunden als in der Placebogruppe. Das Ausmaß der von A. Farb berichteten Inhibierung von neointimaler Proliferation ist vergleichbar mit den Ergebnissen von etablierten lokalen Systemen wie den Sirolimus-beschichteten Stents.(70)

Die Ergebnisse unserer Studie in der Everolimusgruppe unterstützen die Beobachtungen der Kaninchenstudie von A. Farb. In unsere Schweinestudie mit klappentragenden Stents in Pulmonalposition, zeigte orales Everolimus eine signifikante Inhibierung von neointimaler Proliferation, verbunden mit einer guten Ausheilung der Gefäßwand. Die implantierten Stents zeigten bei den Tieren der Everolimusgruppe nach 3 Monaten eine Überdeckung der Stentmaschen mit einer dünnen neointimalen Schicht und einen vollständigen Überzug mit Endothel, vergleichbar mit den Beobachtungen von A. Farb. Auch die Klappensegel des Herzklappenstents zeigten nach 3 Monaten Behandlung mit Everolimus einen kontinuierlichen Überzug von Zellen. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe wurde eine erhebliche Inhibierung von Neointimabildung und ein klar zu beobachtender Erhalt der Klappenfunktion in der Everolimusgruppe beobachtet. Nach Ablauf von drei Monaten waren peak-to-peak Druckgradienten und magnetresonanztomographische Flussmessungen in der Everolimusgruppe nahezu auf dem gleichen Niveau wie zum Zeitpunkt der Implantation,

während in der Kontrollgruppe eine deutliche Verschlechterung der Klappenfunktion gemessen wurde. Diese Ergebnisse demonstrieren den degenerierenden Einfluss von neointimaler Proliferation auf unser Implantat und belegen die inhibierende Wirkung von oralem Everolimus auf diese Entwicklung.

In unserem Tiermodell wurden, im Vergleich mit der Studie von Farb et al, die proliferationshemmende Behandlung mit einer geringeren Everolimusdosis erreicht. Die in unserer Versuchsreihe erreichten Plasmalevel lagen bei  $4,2 \pm 2,4$  ng/ml und somit im unteren Bereich der empfohlenen Level bei Herz- und Nierentransplantationen.(74) A. Farb führte keine Plasmaspiegelbestimmung von Everolimus durch, jedoch lag die verabreichte Dosis mit 0,75-1,0 mg/kg/d als Erhaltungsdosis wesentlich höher als in unserem Tiermodell. Nebenwirkungen der Everolimusbehandlung traten in unserem Kollektiv nicht auf. A. Farb beschrieb in seiner Kaninchenstudie einen signifikanten Appetits- und Gewichtsverlust der Tiere in der Hochdosisgruppe. Die Gewichtsentwicklung der Schweine unserer Everolimusgruppe zeigte keine Auffälligkeiten. Schwerwiegende Infektionen konnten nicht beobachtet werden. Auch im besonders kritischen postinterventionellen Bereich zeigten sich keine Infektionen der Punktionsstellen und keines der Tiere entwickelte eine Sepsis. Ein Tier der Everolimusgruppe entwickelte milden Durchfall. Da sich das Tier aber trotz weiterlaufender Behandlung mit einer gleich bleibenden Dosis Everolimus rasch klinisch besserte, ist diese gastrointestinale Störung eher nicht als direkte Nebenwirkung zu werten. Nach durchgeführter Antibiose trat eine rasche klinische Besserung ein. Ob eine Immunsupprimierung durch Everolimus und ein infektiöses Geschehen grundlegend für diese Störung war, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Eisen et al beschreiben im Menschen bei ähnlichen Plasmaleveln wie in der von uns durchgeführten Studie, die Inzidenz von Infektion, Thrombozytopenie und Leukopenie mit 4,7%, 1,9% und 2,4% der mit Everolimus behandelten Patienten.(41) In unserer Studie konnten kein Abfall der Thrombozyten- oder Leukozytenzahlen beobachtet werden.

Die perkutane Implantation des Herzklappenstents war mit unserer Methode ohne Verlust von Tieren und ohne Komplikationen durchführbar. In der Vergangenheit durchgeführte Akutversuche mit dem selben Trägerstent zeigten eine hohe Sicherheit bei der Implantation und gute Handhabung des Systems.(49) Das von uns entwickelte Ablagesystem hat einen Außendurchmesser von 12 French. Etablierte Ablagesysteme



anderer Forschungsgruppen, welche sich bereits im klinischen Einsatz befinden, sind mit Durchmessern von 16-20 French wesentlich dicker.(6, 7) Obwohl diese Systeme sehr gute Ergebnisse und eine hohe Sicherheit unter Beweis gestellt haben, ist ein System mit einem geringeren Außendurchmesser von Vorteil. Der Einsatz in pädiatrischen Patienten wird durch ein dünneres System wesentlich vereinfacht. Beim Ersatz der Pulmonalklappe wird das System durch Trikuspidal- und Pulmonalklappe geführt und verhindert während der Implantation den vollständigen Klappenschluss. Ein zu ungünstiges Verhältnis von Systemdurchmesser zu Klappendurchmesser kann zu signifikanten Insuffizienzen während der Intervention führen. Im Tierversuch wurden Herzrhythmusstörungen während der perkutanen Implantation von klappentragenden Stents in Pulmonalposition beschrieben.(75) Diese Komplikation ist neben der Ostienverlegung der Koronararterien beim perkutanen Aortenklappenersatz und der Perforation von kardiovaskulären Strukturen eine potentielle Komplikation, die beim Klappenersatz mit Transkathetertechnik akut letal verlaufen kann. Diese Komplikationen wurden in unserem Kollektiv nicht beobachtet.

Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse ist noch ein erheblicher Forschungsaufwand nötig. In weiteren Studien muss nun das Minimum der benötigten Dauer und Plasmalevel der Everolimusbehandlung bestimmt werden, welches nötig ist, um die erzielte Inhibierung von neointimaler Proliferation zu erreichen. Außerdem müssen die Proliferationsvorgänge nach Beendigung der Everolimusbehandlung beleuchtet werden und die Wirksamkeit einer Folgebehandlung mit Everolimus auf einen eventuell auftretenden neointimalen Aufholeffekt überprüft werden. Diese Themen sollten in zukünftigen systematischen Tierstudien mit langer Laufzeit überprüft werden.

Der Heilvorgang nach Verletzung der Gefäßwand läuft beim Menschen und im Tiermodell nicht vollständig gleich ab. Es existieren erhebliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf des Heilvorgangs.(76) Im Tiermodell scheinen proliferative Vorgänge sehr viel schneller abzulaufen, wobei in der menschlichen Gefäßwand die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media oder der verletzten Intima in die expandierende Neointima, neben einer einfachen proliferativen Reaktion, wesentlich zur Neubildung von Gewebe beiträgt.(64, 66, 77) In der Kontrollgruppe unserer Studie wurden in neointimalem Proliferationsgewebe nach 3 Monaten eine große Anzahl von Lymphozyten gefunden. Diese chronischen Entzündungszellen sind in der Neointima nach Stentimplantation beim Menschen entweder direkt nach Implantation (3 bis 7

Tage), oder nach Ablauf von mehr als 6 Monaten zu finden.(77) Dieser Befund in der Kontrollgruppe ist ein Anzeichen für eine chronische Inflammation der Gefäßwand, wobei das im Vergleich zum Menschen sehr frühe Auftreten von chronischen Entzündungszellen in der Neointima die schnelleren Proliferationsprozesse im Tiermodell widerspiegelt.(77)

Es verdichten sich die Hinweise, dass prothetische Herklappen aus biologischen Materialien Antigen-Eigenschaften besitzen und eine chronische Abstoßungsreaktion auslösen.(78-79) Diese Immunreaktion ist einer der Faktoren, welcher für die Degeneration und das frühzeitige Versagen von biologischen Implantaten verantwortlich gemacht wird.(53) Dabei wurden Lymphozyten, vornehmlich T-Zellen, als Träger der Abstoßungsreaktion ausgemacht.(80) Es wurde gezeigt, dass T-Zellen das Klappenmaterial infiltrieren und dass diese Invasion von Lymphozyten mit einem strukturellen Versagen und einer Destruktion der Klappensegel einhergeht.(80) Im Tiermodell wurde an Ratten demonstriert, dass durch die Gabe von Ciclosporin oder durch eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen alpha4-/beta2-Integrin die Infiltration von Macrophagen und T-Lymphozyten in das Klappenmaterial signifikant gesenkt werden kann und dass in der Folge die strukturelle Integrität des Klappenmaterials erhalten bleibt.(80)

In der Kontrollgruppe unserer Studie wurden in Verbindung mit starker neointimaler Proliferation deutlich mehr Lymphozyten in dem neugebildeten Gewebe beobachtet als in der Everolimusgruppe. Orales Everolimus scheint die Infiltration von Lymphozyten in neointimales Proliferationsgewebe zu vermindern. Diese Beobachtung ist von potentiell Interesse für die Prävention von immunogener Degeneration von biologischen Herzklappenimplantaten. In unserer Studie wurde kein biologisches Klappenmaterial eingesetzt. Deshalb kann nur spekuliert werden, ob orales Everolimus in der Lage ist, auch die Infiltration von Lymphozyten in dieses Klappenmaterial zu inhibieren und so der Degeneration von biologischen Klappenimplantaten entgegenzuwirken. Diese Vermutung sollte in erneuten Tiermodellen überprüft werden.

## 6.5 *Einschränkungen*

Unsere Studie zeigt klare und signifikante Ergebnisse. Trotzdem sind Einschränkungen vorhanden und unsere Ergebnisse nicht universell auf andere Modelle übertragbar.

Einerseits handelt es sich bei unserer Versuchsreihe um ein Tiermodell, in dem, wie bereits beschrieben, Proliferationsvorgänge der geschädigten Gefäßwand nicht ganz deckungsgleich zum Heilungsprozess beim Menschen ablaufen. Andererseits ist anzunehmen, dass die Proliferationsreaktion der Gefäßintima auf klappentragende Stents bei verschiedenen Methoden und Implantaten einen nicht ganz synchronen Heilungsablauf aufweisen wird. In einem vergleichbaren Modell kann erwartet werden, dass ein ballon-expandierbarer Stent durch vermehrte Verletzung der Gefäßwand bei der Expansion eine verstärkte Proliferation auslöst.(66) Auch das Design des Trägerstents wird durch die Anordnung von Maschen und unterschiedliche Stabilität am Implantationsort einen Einfluss auf die Heilung der Gefäßwand nehmen. Zuletzt wird voraussichtlich das Klappendesign durch verschiedene Öffnungs- und Schlussdrücke und sich daraus ergebende Microbewegungen des Stents, sowie durch die Wahl des Klappenmaterials und eventuell auftretenden Immunreaktionen auf biologisches Klappenmaterial die Proliferation von Neointima beeinflussen. Auf Grund dieser Vermutungen können unsere Ergebnisse nicht für andere mechanische oder biologische Herzklappenprothesen gelten und diese benötigen eine individuelle Evaluation. In unserer Studie wurden die Herzklappenstents in junge, wachsende Schweine implantiert. Ein Gewicht von 35 kg entspricht dabei in etwa einem Alter von 3-4 Monaten. Die Geschwindigkeit des somatischen Wachstums, die Tierspezies und das Alter sind ebenfalls Faktoren, die immunogene und proliferative Prozesse beeinflussen.

Unsere Ergebnisse müssen in Langzeitstudien mit größeren Tierzahlen bestätigt werden. Ein wichtiges Ziel zukünftiger Studien sollte die systematische Evaluierung des Minimalwerts für Everolimus-Plasmaspiegel sein, die notwendig sind, um eine effektive anti-proliferative Antwort zu erhalten. In diesen Untersuchungen muss außerdem die Frage beantwortet werden, ob ein proliferativen Nachholeffekt (neointimal catch-up) nach Beendigung der Everolimusgabe existiert.

## **7 Schlussfolgerungen**

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass neointimale Proliferation nach Implantation eines Herzklappenstents die Klappenfunktion beeinträchtigen und einen potentiellen Grund für das Versagen des Implantats darstellen kann. Dies ist die erste Studie, die

den inhibierenden Effekt des Immunsuppressivums Everolimus auf die neointimale Proliferation nach der Implantation von klappentragenden Stents in Schweinen beschreibt. Die orale Gabe einer vergleichsweise geringen Dosis Everolimus schränkte die Proliferation von Neointima im Lumen des Herzklappenstents ein. Außerdem führte die Behandlung mit oralem Everolimus zu einer verringerten Infiltration von Lymphozyten in das Gewebe in der Umgebung des klappentragenden Stents. Diese Vorgehensweise könnte eine zukünftige Anwendung im Management von perkutanem Ersatz der Pulmonalklappe finden und als Behandlungsstrategie zur Vermeidung von Degeneration von Herzklappenstents eingesetzt werden. Unsere Ergebnisse rechtfertigen weiterführende Studien.

## **8 Zusammenfassung**

### *8.1 Einleitung*

Wachstumsfaktor-assoziierte Proliferation von Zellen kann nach Stentimplantation eine Intimaverdickung im Lumen des Stents verursachen. Der perkutane Ersatz von Herzklappen mittels Transkathetertechnik ist eine neu entwickelte alternative Methode zur chirurgischen Implantation von prothetischen Herzklappen mit vielversprechenden Aussichten. Erste Langzeitdaten lassen vermuten, dass die Proliferation von Neointima einen negativen Einfluss auf die Funktion von klappentragenden Stents zeigt. Viele Studien demonstrieren den erfolgreichen Einsatz von immunsupprimierenden Medikamenten zur Senkung der neointimalen Proliferation in endovaskulären Stents. Die Zielsetzung dieser Studie war die Überprüfung der Frage, ob orales Everolimus inhibierend auf die neointimale Gewebeproliferation wirkt, welche mit der Implantation eines klappentragenden Stents in Pulmonalposition verbunden ist.

### *8.2 Material und Methoden*

In 12 Schweine wurden prothetische Herzklappen mittels einer transkutanen Kathetertechnik implantiert. Die trikuspidale Herzklappen wurden aus einem Polymer gefertigt, mit Titan beschichtet und in einen selbstexpandierenden Nitinolstent eingenäht. Der Herzklappenstent wurde in-vitro auf seine hämodynamischen

Eigenschaften in einem Flussphantom getestet. Anschließend wurde der HKS mittels transkutaner Kathetertechnik in die Pulmonalposition der Tiere implantiert und unmittelbar nach Implantation die Klappenfunktion angiographisch überprüft, sowie eine invasive Messung des Druckgradienten über der prothetischen Klappe durchgeführt. Das Implantat verblieb für 3 Monate in situ. Bei 6 Tieren wurde eine orale Behandlung mit täglich 2 mg Everolimus durchgeführt. Die verbleibenden 6 Tiere erhielten kein Everolimus und bildeten die Kontrollgruppe. Bei beiden Gruppen wurde eine antikoagulative Behandlung mit Aspirin und Clopidogrel per os durchgeführt. Nach 3 Monaten wurde erneut die Klappenfunktion der Implantate invasiv hämodynamisch evaluiert. Zusätzlich wurden mittels MRT Blutflussmessungen durch die protethischen Herzklappen durchgeführt. Postmortem wurden die Herzklappenstents explantiert und makroskopisch, histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

### 8.3 *Ergebnisse*

Die in vitro Testung der prothetischen Herzklappe demonstrierte gute hämodynamische Eigenschaften. Die Implantation des HKS war bei allen 12 Tieren erfolgreich. Initiale hämodynamische Messungen im Herzkatheterlabor nach Implantation zeigten eine gute Klappenfunktion des Implantats. Die Behandlung mit Everolimus zeigte keine unerwünschten Nebenwirkungen. Gemessene Everolimus-Talspiegel im Vollblut der Tiere waren  $4,2 \pm 2,4$  ng/ml. Die Folgeuntersuchung im Herzkatheterlabor nach 3 Monaten zeigte eine gut erhaltene Klappenfunktion in der Everolimusgruppe und eine nur wenig schlechtere Klappenfunktion in der Kontrollgruppe. Stenosen konnten bei der invasiven Evaluation der Klappenfunktion in keiner Gruppe beobachtet werden. Magnetresonanztomographische Messungen zeigten ebenfalls eine intakte Klappenfunktion der Everolimusgruppe mit einer Regurgitationsfraktion von  $4,3 \pm 3,1\%$ , aber demonstrierten eine gestörte Funktion in der Kontrollgruppe mit einer Regurgitationsfraktion von  $7,3 \pm 4,2\%$  ( $p < 0.01$ ). Postmortem zeigten die explantierten Stents der Everolimusgruppe in der makroskopischen und histologischen Untersuchung nur einen dünnen Überzug der Stentmaschen mit Gewebe. Die Klappensegel waren frei von funktionsstörenden Ansammlungen von Proliferationsgewebe und die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte lediglich einen dünnen und kontinuierlichen Überzug mit Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in der Kontrollgruppe

erhebliche Neuf ormation und Verdickung von Gefäßintima festgestellt. Die Gewebsneubildung war am deutlichsten an der Basis der prothetischen Klappe, dehnte sich auf die Klappensegel aus und verursachte eine Verdickung und Verkürzung der Segel.

#### 8.4 Schlussfolgerung

Die nach Stentimplantation auftretende Proliferation von Neointima hat in der vorliegenden Studie einen negativen Einfluss auf die Klappenfunktion von perkutan implantierten Herzklappenstents. Zudem wurde gezeigt, dass die orale Gabe von Everolimus effektiv die Neubildung von Gewebe in klappentragenden Stents in der Pulmonalposition von Schweinen inhibiert.

## 9 Referenzen

1. Edwards FH, Peterson ED, Coombs LP, et al. Prediction of operative mortality after valve replacement surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(3):885-92.
2. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(12):1890-900.
3. Pansini S, Ottino G, Forsennati P, et al. Reoperations on heart valve prostheses: An analysis of operative risks and late results. *Ann Thorac Surg.* 1990;50:590-6.
4. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, et al. Transcatheter Implantation of a Bovine Valve in Pulmonary Position : A Lamb Study. *Circulation.* 2000 August 15, 2000;102(7):813-6.
5. Carrel T. Bovine valved jugular vein to reconstruct the right ventricular outflow tract. *Expert Rev Med Devices.* 2004;1(1):11-9.
6. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, et al. Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *Lancet.* 2000 Oct 21;356(9239):1403-5.

7. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Qureshi SA, et al. Percutaneous insertion of the pulmonary valve. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(10):1664-9.
8. Boudjemline Y, Bonhoeffer P. Steps toward percutaneous aortic valve replacement. *Circulation*. 2002 Feb 12;105(6):775-8.
9. Khambadkone S, Coats L, Taylor A, et al. Percutaneous pulmonary valve implantation in humans: results in 59 consecutive patients. *Circulation*. 2005 Aug 23;112(8):1189-97.
10. Nordmeyer J, Khambadkone S, Coats L, et al. Risk Stratification, Systematic Classification, and Anticipatory Management Strategies for Stent Fracture After Percutaneous Pulmonary Valve Implantation. *Circulation*. 2007 March 20;115(11):1392-7.
11. Laborde J, Borenstein N, Behr L, Farah B, Fajadet J. Percutaneous implantation of an aortic valve prosthesis. *Catheter Cardiovasc Intervent*. 2005;65(2):171-4.
12. Grube E, Laborde JC, Gerckens U, et al. Percutaneous implantation of the CoreValve self-expanding valve prosthesis in high-risk patients with aortic valve disease: the Siegburg first-in-man study. *Circulation*. 2006 Oct 10;114(15):1616-24.
13. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, et al. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis: First Human Case Description. *Circulation*. 2002 December 10;106(24):3006-8.
14. Lamarche Y, Cartier R, Denault AY, et al. Implantation of the CoreValve Percutaneous Aortic Valve. *Ann Thorac Surg*. 2007;83(1):284-7.
15. Chandavimol M, McClure S, Carere R, et al. Percutaneous aortic valve implantation: a case report. *Can J Cardiol*. 2006;22(13):1159-61.
16. Feinstein J, Kim N, Mohan V, et al. Percutaneous pulmonary valve placement in a 10-month-old patient using a hand crafted stent-mounted porcine valve. *Catheter Cardiovasc Intervent*. 2006;67(4):644-9.
17. Boudjemline Y, Agnoletti G, Bonnet D, et al. Steps Toward the Percutaneous Replacement of Atrioventricular Valves: An Experimental Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(2):360-5.

18. Coats L, Tsang V, Khambadkone S, et al. The potential impact of percutaneous pulmonary valve stent implantation on right ventricular outflow tract re-intervention. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;27(4):536-43.
19. Gober V, Berdat P, Pavlovic M, et al. Adverse Mid-Term Outcome Following RVOT Reconstruction Using the Contegra Valved Bovine Jugular Vein. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(2):625-31.
20. Ruiz C, Lemura M, Medie S, et al. Transcatheter placement of a low-profile biodegradable pulmonary valve made of small intestinal submucosa: A long-term study in a swine model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 2005;130(2):477-84.
21. Attmann T, Steinseifer U, Cremer J, Lutter G. Percutaneous valve replacement: a novel low-profile polyurethane valved stent. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Aug;30(2):379.
22. Yamagishi M, Kurosawa H, Nomura K, Kitamura N. Fan-shaped expanded polytetrafluoroethylene valve in the pulmonary position. *J Cardiovasc Surg.* 2002 Dec;43(6):779-86.
23. Sueishi K, Yasunaga C, Murata T, Kumamoto M, Makagawa K, Kono S. Endothelial function in thrombosis and thrombolysis. *Jpn Circ J.* 1992 Feb;56(2):192-8.
24. Giris S, Ito S, Lansky A, et al. Clinical and angiographic outcome in the laser angioplasty for restenotic stents (LARS) multicenter registry. *Catheter Cardiovasc Intervent.* 2001;52(1):24-34.
25. Albiero R, Silber S, Di Mario C, et al. Cutting balloon versus conventional balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis: Results of the restenosis cutting balloon evaluation trial (RESCUT). *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(6):943-9.
26. Saleem MA, Aronow WS, Ravipati G, et al. Intracoronary brachytherapy for treatment of in-stent restenosis. *Cardiol Rev.* 2005 May-Jun;13(3):139-41.
27. Waksman R, Cheneau E, Ajani AE, et al. Intracoronary Radiation Therapy Improves the Clinical and Angiographic Outcomes of Diffuse In-Stent Restenotic Lesions: Results of the Washington Radiation for In-Stent Restenosis Trial for Long Lesions (Long WRIST) Studies. *Circulation.* 2003 April 8, 2003;107(13):1744-9.
28. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A, et al. Effects of tacrolimus or sirolimus on



proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Dec;48(6):286-92.

29. Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, et al. Treatment of Coronary In-Stent Restenosis with a Paclitaxel-Coated Balloon Catheter. *N Engl J Med.* 2006 November 16, 2006;355(20):2113-24.

30. Mehilli J, Kastrati A, Wessely R, et al. Randomized trial of a nonpolymer-based rapamycin-eluting stent versus a polymer-based paclitaxel-eluting stent for the reduction of late lumen loss. *Circulation.* 2006 Jan 17;113(2):273-9.

31. Dibra A, Kastrati A, Mehilli J, et al. Paclitaxel-eluting or sirolimus-eluting stents to prevent restenosis in diabetic patients. *N Engl J Med.* 2005 Aug 18;353(7):663-70.

32. Windecker S, Remondino A, Eberli FR, et al. Sirolimus-Eluting and Paclitaxel-Eluting Stents for Coronary Revascularization. *N Engl J Med.* 2005 August 18, 2005;353(7):653-62.

33. Tepe G, Muschick P, Laule M, et al. Prevention of Carotid Artery Restenosis After Sirolimus-Coated Stent Implantation in Pigs. *Stroke.* 2006 February 1, 2006;37(2):492-4.

34. Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jul 4;48(1):193-202.

35. Park D-W, Hong M-K, Mintz GS, et al. Two-Year Follow-Up of the Quantitative Angiographic and Volumetric Intravascular Ultrasound Analysis After Nonpolymeric Paclitaxel-Eluting Stent Implantation: Late "Catch-Up" Phenomenon From ASPECT Study. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(12):2432-9.

36. Rodriguez AE, Granada JF, Rodriguez-Alemparte M, et al. Oral Rapamycin After Coronary Bare-Metal Stent Implantation to Prevent Restenosis: The Prospective, Randomized Oral Rapamycin in Argentina (ORAR II) Study. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8):1522-9.

37. Brito Jr F, Werther C, Airtton R, Tedesco A, Pestana J, Lima V. Efficacy and safety of oral sirolimus to inhibit in-stent intimal hyperplasia. *Catheter Cardiovasc Intervent.* 2005;64(4):413-8.

38. Kim D-W, Kwon J-S, Kim Y-G, et al. Novel Oral Formulation of Paclitaxel Inhibits

Neointimal Hyperplasia in a Rat Carotid Artery Injury Model. *Circulation*. 2004 March 30, 2004;109(12):1558-63.

39. Schuler W, Sedrani R, Cottens S, et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation*. 1997 Jul 15;64(1):36-42.

40. Waksman R, Pakala R, Baffour R, et al. Optimal dosing and duration of oral everolimus to inhibit in-stent neointimal growth in rabbit iliac arteries. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006 Jul-Sep;7(3):179-84.

41. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003 Aug 28;349(9):847-58.

42. Grube E, Buellesfeld L. Rapamycin Analogs for Stent-Based Local Drug Delivery. *Herz*. 2004;29(2):162-6.

43. Scott NA. Restenosis following implantation of bare metal coronary stents: Pathophysiology and pathways involved in the vascular response to injury. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(3):358-76.

44. Tsuchiya Y, Lansky AJ, Costa RA, et al. Effect of everolimus-eluting stents in different vessel sizes (from the pooled FUTURE I and II trials). *Am J Cardiol*. 2006 Aug 15;98(4):464-9.

45. Farb A, John M, Acampado E, et al. Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation*. 2002 Oct 29;106(18):2379-84.

46. Schichl K, Affeld K. Computer controlled versatile duplicator for precision testing of artificial heart valves. *Int J Artif Organs*. 1993;16:722-8.

47. Ferron GM, Mishina EV, Zimmerman JJ, et al. Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*. 1997 1997;4;61(4):416-28.

48. Kuehne T, Saeed M, Higgins CB, et al. Endovascular stents in pulmonary valve and artery in swine: feasibility study of MR imaging-guided deployment and postinterventional assessment. *Radiology*. 2003 Feb;226(2):475-81.

49. Kuehne T, Yilmaz S, Meinus C, et al. Magnetic resonance imaging-guided

transcatheter implantation of a prosthetic valve in aortic valve position:: Feasibility study in swine. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(11):2247-9.

50. Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissues is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. *J Heart Valve Dis.* 2003 Mar;12(2):226-34.

51. Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration. *J Heart Valve Dis.* 2003 Mar;12(2):217-25.

52. Green MK, Walsh MD, Dare A, et al. Histologic and immunohistochemical responses after aortic valve allografts in the rat. *Ann Thorac Surg.* 1998 Dec;66(6 Suppl):S216-20.

53. Legare JF, Ross DB, Issekutz TB, et al. Prevention of allograft heart valve failure in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Aug;122(2):310-7.

54. Lutter G, Kuklinski D, Berg G, et al. Percutaneous aortic valve replacement: an experimental study. I. Studies on implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Apr;123(4):768-76.

55. Iida O, Nanto S, Uematsu M, et al. Effect of Exercise on Frequency of Stent Fracture in the Superficial Femoral Artery. *Am J Cardiol.* 2006;98(2):272-4.

56. Mori E, Komori K, Yamaoka T, et al. Essential Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Development of Restenotic Changes (Neointimal Hyperplasia and Constrictive Remodeling) After Balloon Angioplasty in Hypercholesterolemic Rabbits. *Circulation.* 2002 June 18, 2002;105(24):2905-10.

57. Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, et al. Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(1):18-23.

58. Farb A, Kolodgie FD, Hwang J-Y, et al. Extracellular Matrix Changes in Stented Human Coronary Arteries. *Circulation.* 2004 August 24, 2004;110(8):940-7.

59. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, et al. Patterns and Mechanisms of In-Stent Restenosis: A Serial Intravascular Ultrasound Study. *Circulation.* 1996, 1996;94(6):1247-54.

60. Goldberg SL, Loussararian A, De Gregorio J, et al. Predictors of diffuse and aggressive intra-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(4):1019-25.
61. Mehran R, Dangas G, Abizaid AS, et al. Angiographic Patterns of In-Stent Restenosis : Classification and Implications for Long-Term Outcome. *Circulation.* 1999 November 2, 1999;100(18):1872-8.
62. Cutlip DE, Chhabra AG, Baim DS, et al. Beyond Restenosis: Five-Year Clinical Outcomes From Second-Generation Coronary Stent Trials. *Circulation.* 2004 September 7, 2004;110(10):1226-30.
63. Hoffmann R, Jansen C, Konig A, et al. Stent design related neointimal tissue proliferation in human coronary arteries; an intravascular ultrasound study. *Eur Heart J.* 2001 November 1, 2001;22(21):2007-14.
64. Carter AJ, Laird JR, Farb A, et al. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Nov 1;24(5):1398-405.
65. Ellis S, Bajzer S, Bhatt D, et al. Real-world bare metal stenting: Identification of patients at low or very low risk of 9-month coronary revascularization. *Catheter Cardiovasc Intervent.* 2004;63(2):135-40.
66. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation.* 1999 Jan 5-12;99(1):44-52.
67. Attmann T, Jahnke T, Quaden R, et al. Advances in Experimental Percutaneous Pulmonary Valve Replacement. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(3):969-75.
68. Haruguchi H, Teraoka S. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs.* 2003;6:227-35.
69. Kolodgie FD, John M, Khurana C, et al. Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel. *Circulation.* 2002 Sep 3;106(10):1195-8.
70. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S-i, et al. Stent-Based Delivery of Sirolimus Reduces Neointimal Formation in a Porcine Coronary Model. *Circulation.* 2001 September 4, 2001;104(10):1188-93.

71. Grube E, Sonoda S, Ikeno F, et al. Six- and twelve-month results from first human experience using everolimus-eluting stents with bioabsorbable polymer. *Circulation*. 2004 May 11;109(18):2168-71.
72. Carter A, Brodeur A, Collingwood R, et al. Experimental efficacy of an everolimus eluting cobalt chromium stent. *Catheter Cardiovasc Intervent*. 2006;68(1):97-103.
73. Kahan BD, Wong RL, Carter C, et al. A phase I study of a 4-week course of SDZ-RAD (RAD) quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 1999 Oct 27;68(8):1100-6.
74. Lehmkuhl H, Hetzer R. Clinical Experience With Certican (Everolimus) in De Novo Heart Transplant Patients at the Deutsches Herzzentrum Berlin. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(4, Supplement 1):S201-S5.
75. Attmann T, Quaden R, Jahnke T, et al. Percutaneous Pulmonary Valve Replacement: 3-Month Evaluation of Self-Expanding Valved Stents. *Ann Thorac Surg*. 2006;82(2):708-13.
76. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, et al. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart*. 2003 February 1, 2003;89(2):133-8.
77. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, et al. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002 Jun 25;105(25):2974-80.
78. Moustapha A, Ross DB, Bittira B, et al. Aortic valve grafts in the rat: Evidence for rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997;114(6):891-902.
79. el Khatib H, Lupinetti F. Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts. *Transplantation*. 1990 Apr;49(4):765-7.
80. Legare JF, Lee TDG, Creaser K, Ross DB. T lymphocytes mediate leaflet destruction and allograft aortic valve failure in rats. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(4):1238-45.

## **10 Danksagung**

Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. Titus Kühne und Prof. Dr. Felix Berger, die mich jederzeit geleitet und motiviert haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. Peter E. Lange und seinem Team des Kompetenznetzes für angeborene Herzfehler, sowie dem Team der tierexperimentellen Einrichtungen der Charité - Campus Virchow Klinikum um PD. Dr. Unger, für Ihre Hilfsbereitschaft und angenehme Zusammenarbeit.

Mein innigster Dank gilt an dieser Stelle auch meinen Eltern Alexa und Rainer, für Ihre großzügige und liebevolle Unterstützung, meiner Freundin Sina und meinen Geschwistern Vera und Jörg für Ihren Rückhalt.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 10.1 Publikationsliste

### **Publizierte Artikel:**

Pietzner K, Noske A, Cho CH, Kiecker F, Sehouli J.  
Amelanotic metastasis of melanoma mimicking ovarian cancer: A case report and review of the literature.  
Anticancer Res. 2008 Jan-Feb; 28(1B): 563-66.

Kentenich H, Pietzner K.  
Qualitätssicherung in der assistierten Reproduktion auf der Grundlage einer qualifizierten Beratung.  
Gynäkologische Endokrinologie. 2007; 5:187-192.

Unger JK, Pietzner K, Francis RC, Birnbaum J, Theisen MM, Lemke AJ, Niehues SM.  
Dual-lumen catheters for continuous venovenous hemofiltration: limits for blood delivery via femoral vein access and a potential alternative in an experimental setting in anesthetized pigs.  
Crit Care. 2007 Feb 15;11(1):R18.

Krueger JJ, Ewert P, Yilmaz S, Gelernter D, Peters B, Pietzner K, Bornstedt A, Schnackenburg B, Abdul-Khaliq H, Fleck E, Nagel E, Berger F, Kuehne T.  
Magnetic Resonance Imaging-Guided Balloon Angioplasty of Coarctation of the Aorta: A Pilot Study.  
Circulation. 2006 Feb 28;113(8):1093-100.

### **Artikel in Druck:**

Kuehne T, Pietzner K, Lehmkuhl HB, Gelernter D, Peters B, Krueger JJ, Meinus C, Klimes, Brinkert F, Ewert P, Berger F.  
Oral everolimus inhibits neointimal proliferation in prosthetic pulmonary valved stents in pigs.  
Eingereicht: Februar 2008, Revision: März/April 2008  
Im Juni 2008 angenommen zur Publikation bei: The Journal of Heart Valve Disease

### **Abstracts:**

Kentenich H, Kölm P, Pietzner K.  
Reproduktion ohne/und Sexualität.  
In: Kästner R, Debus G, Rauchfuß M. (Hrsg): Dialog zwischen Klinik und Praxis – Kommunikation zum Nutzen der Patientin.  
Beiträge der 36. Jahrestagung 2007 der DGPF. Mabuse Verlag. 61-75

Kuehne T, Lunze K, Maarouf N, Rahmzadeh P, Pietzner K, Meinus C, Krüger J, Schulze-Neick I, Berger F.  
Determination of biventricular diastolic compliance and myocardial contractility using real-time MRI: In-vivo validation study.  
42nd Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology.  
Warschau, 16.-19.05.2007.  
Cardiology in the Young. 2007; 17(Suppl 1):33-34.

Kuehne T, Lehmkuhl HB, Pietzner K, Elsässer E, Blank T, Peters B, Ewert P, Klimes K, Krueger JJ, Berger F.  
Orales Everolimus inhibiert Klappendegeneration prothetischer Pulmonalklappen in Schweinen.  
72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie,  
Mannheim, 20.-22.04.2006  
Clinical Research in Cardiology. 95: Suppl 5 (2006)

Krueger JJ, Ewert P, Gelernter D, Bornstedt A, Schnackenburg B, Klimes K, Pietzner K, Nagel E, Berger F, Kuehne T.  
MRT kontrollierte Ballonangioplastie bei Patienten mit Aortenisthmusstenosen: Eine klinische Pilotstudie.  
72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung.  
Mannheim, 20.-22.04.2006.  
Clinical Research in Cardiology. 2006;95(Suppl 5):P1299.

Linneweber J, Dohmen PM, Pietzner K, Affeld K, Kerzschner U, Konertz W.  
Development And Initial In-vitro And In-vivo Testing Of A Valved Stent For Percutaneous Valve Replacement.  
52nd Annual Meeting of the American Society for Artificial Internal Organs,  
Chicago, 08.-10.07.2006  
ASAIO Journal. March/April 2006;52(2):9A.

Kuehne T, Krueger JJ, Lunze K, Rentzsch A, Pietzner K, Klimes K, Fröhlich C, Schulze-Neick I, Abdul-Khaliq H, Berger F.  
Bestimmung biventrikulärer Druck-Volumenrelationen mit einer Echtzeit MRT-Methode: Eine in-vivo Validierungsstudie.  
38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie,  
Neu-Ulm, 07.-10.10.2006  
Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V., Ed. Abstracts zur 38. Jahrestagung. 2006; 32.

Kühne T, Pietzner K, Lehmkuhl H, Peters B, Ewert P, Klimes K, Fröhlich C, Krueger JJ, Berger F.  
Orales Everolimus inhibiert Klappendegeneration prothetischer Pulmonalklappen in Schweinen.  
38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie,



Neu-Ulm, 07.-10.10.2006,  
Abstracts zur 38 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie.  
2006;3.

Krueger JJ, Ewert P, Schnackenburg B, Gelernter D, Pietzner K, Nagel E, Berger F, Kuehne T.

MRI guided balloon angioplasty of coarctation of the aorta: Assessment of feasibility and first clinical results.

World Congress of Cardiology,  
Barcelona, 02.-06.09.2006.

European Heart Journal. 2006;27(Abstract-Suppl):234.

Kuehne T, Lehmkuhl HP, Pietzner K, Peters B, Ewert P, Klimes K, Krueger JJ, Berger F.

Oral everolimus inhibits degeneration in prosthetic pulmonary valves in pigs.

World Congress of Cardiology.

Barcelona, 02.-06.09.2006.

European Heart Journal. 2006;27(Abstract-Suppl):436.

Kuehne T, Krüger JJ, Blank T, Elsässer E, Schnackenburg B, Bornstedt A, Klimes K, Gelernter D, Pietzner K, Berger F.

Nicht-invasive Quantifizierung von Stentstenosen mit der MRT.

72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung.

Mannheim, 20.-22.04.2006.

Clinical Research in Cardiology. 2006; 95(Suppl 5):P145.

Kuehne T, Lehmkuhl HB, Pietzner K, Elsässer E, Blank T, Peters B, Ewert P, Klimes K, Krüger JJ, Berger F.

Oral everolimus inhibits degeneration in prosthetic pulmonary valves in pig.

41st Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology.

Basel, 24.-27.05.2006.

Cardiology in the Young. 2006; 16(Suppl 2):17-18.

Ewert P, Krueger JJ, Yilmaz S, Bornstedt A, Schnackenburg B, Gelernter D, Pietzner K, Nagel E, Lange PE, Kuehne T, Berger F.

MRI-guided balloon angioplasty of aortic coarctation.

40th Annual General Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology,  
Copenhagen, 18.-21.05.2005.

Cardiology in the Young. 2005;15(Suppl 2):80.

Yilmaz S, Krueger JJ, Ewert P, Schnackenburg B, Bornstedt A, Gelernter D, Pietzner K, Nagel E, Lange PE, Kuehne T, Berger F.

Non-invasive quantification of in-stent stenosis using MRI.

40th Annual General Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology,  
Copenhagen, 18.-21.05.2005.

Cardiology in the Young. 2005;15(Suppl 2):88.

## 11 Erklärung der Eigenständigkeit

Ich, Klaus Pietzner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Orales Everolimus inhibiert neointimale Proliferation in transkutan implantierten Herzklappenstents in der pulmonalen Position bei Schweinen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift