

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Diagnostische und Interventionelle
Radiologie

**Auswirkung einer Stentbeschichtung mit dem
Naphthochinon-Derivat Shikonin auf die Restenose
nach Angioplastie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Dobratz, Markus Michael

2016

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. Dominik Ketelsen
2. Berichtstatter: Professor Dr. B. Balletshofer

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABI	Ankle-brachial-index
AVK	Arterielle Verschlusskrankheit
BMS	Bare-metal stent
DES	Drug eluting stent
EES	Everolimus eluting stent
EvG	Elastica-van-Gieson
HDL	High density lipoprotein
HE	Haematoxilin-Eosin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PES	Paclitaxel eluting stent
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
SES	Sirolimus eluting stent
TBS	Tris-buffered saline
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZES	Zotarolimus eluting stent

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Stadieneinteilung nach Fontaine und Rutherford [12]	14
Abbildung 2:	Gruppeneinteilung der Koronar- und Iliakalgefäße	23
Abbildung 3:	Minimaler Durchmesser der Koronargefäße	35
Abbildung 4:	Mittlerer Durchmesser der Koronargefäße	36
Abbildung 5:	Lumenfläche der Koronargefäße	37
Abbildung 6:	Intimafläche der Koronargefäße	38
Abbildung 7:	Mediafläche der Koronargefäße	39
Abbildung 8:	Berechneter Stenosegrad der Koronargefäße	40
Abbildung 9:	Histologie Koronargefäß nach Beschichtung mit 2 x 5 mg/ml Shikonin (ShikoninA); Elastica-van-Gieson-Färbung	41
Abbildung 10:	Histologie Koronargefäß nach Beschichtung mit 2 x 2,5 mg/ml Shikonin (ShikoninB); Elastica-van-Gieson-Färbung	41
Abbildung 11:	Histologie Koronargefäß der Kontrollgruppe; Elastica-van-Gieson-Färbung	42
Abbildung 12:	Histologie Koronargefäß nach Beschichtung mit Rapamycin; Elastica-van-Gieson-Färbung	42
Abbildung 13:	Proliferationsindex Koronargefäße	44
Abbildung 14:	Immunhistologisches Präparat (PCNA) eines Koronargefäßes der Kontrollgruppe	45
Abbildung 15:	Immunhistologisches Präparat (DAPI) eines Koronargefäßes der Kontrollgruppe	45
Abbildung 16:	Immunhistologisches Präparat (PCNA) eines Koronargefäßes nach Beschichtung mit Rapamycin	46
Abbildung 17:	Immunhistologisches Präparat (DAPI) eines Koronargefäßes nach Beschichtung mit Rapamycin	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 18: Immunhistologisches Präparat (PCNA) eines Koronargefäßes nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 5 mg/ml)	47
Abbildung 19: Immunhistologisches Präparat (DAPI) eines Koronargefäßes nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 5 mg/ml)	47
Abbildung 20: Immunhistologisches Präparat (PCNA) eines Koronargefäßes nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 2,5 mg/ml)	48
Abbildung 21: Immunhistologisches Präparat (DAPI) eines Koronargefäßes nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 2,5 mg/ml)	48
Abbildung 22: Reendothelialisierung der Koronargefäße	49
Abbildung 23: Referenzdiameter der Iliakalgefäße vor Implantation der Stents.	50
Abbildung 24: Angiographischer maximaler Diameter der Iliakalgefäße im Anschluss an die Implantation der Stents.	51
Abbildung 25: Angiographischer minimaler Diameter der Iliakalgefäße nach Implantation der Stents.	52
Abbildung 26: Angiographische Diameterreduktion der Iliakalgefäße 4 Wochen nach Implantation der Stents.	53
Abbildung 27: Angiographische prozentuale Diameterreduktion der Iliakalgefäße 4 Wochen nach Implantation der Stents.	54
Abbildung 28: Angiographische Darstellung der Iliakalgefäße 4 Wochen nach Stentimplantation. (BMS und ShikoninA)	55
Abbildung 29: Angiographische Darstellung der Iliakalgefäße 4 Wochen nach Stentimplantation. (BMS und ShikoninB)	56
Abbildung 30: Minimaler Diameter der Iliakalgefäße	57
Abbildung 31: Mittlerer Diameter der Iliakalgefäße	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 32: Lumenfläche der Iliakalgefäße	59
Abbildung 33: Intimafläche der Iliakalgefäße	60
Abbildung 34: Mediafläche der Iliakalgefäße	61
Abbildung 35: Berechneter Stenosegrad der Iliakalgefäße	62
Abbildung 36: Histologie Iliakalarterie der Kontrollgruppe; Elastica-van-Gieson-Färbung	63
Abbildung 37: Histologie linke Iliakalarterie nach Beschichtung mit Rapamycin; Elastica-van-Gieson-Färbung	64
Abbildung 38: Histologie linke Iliakalarterie nach Beschichtung mit 2 x 5 mg/ml Shikonin (ShikoninA); Elastica-van-Gieson-Färbung	64
Abbildung 39: Histologie linke Iliakalarterie nach Beschichtung mit 2 x 2,5 mg/ml Shikonin (ShikoninB); Elastica-van-Gieson-Färbung	65
Abbildung 40: Proliferationsindex in der Intima der Iliakalgefäße	66
Abbildung 41: Immunhistologisches Präparat (PCNA) einer Iliakalarterie der Kontrollgruppe	67
Abbildung 42: Immunhistologisches Präparat (DAPI) einer Iliakalarterie der Kontrollgruppe	67
Abbildung 43: Immunhistologisches Präparat (PCNA) einer Iliakalarterie nach Beschichtung mit Rapamycin	68
Abbildung 44: Immunhistologisches Präparat (DAPI) einer Iliakalarterie nach Beschichtung mit Rapamycin	68
Abbildung 45: Immunhistologisches Präparat (PCNA) einer Iliakalarterie nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 5 mg/ml)	69
Abbildung 46: Immunhistologisches Präparat (DAPI) einer Iliakalarterie nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 5 mg/ml)	69
Abbildung 47: Immunhistologisches Präparat (PCNA) einer Iliakalarterie nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 2,5 mg/ml)	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 48: Immunhistologisches Präparat (PCNA) einer Iliakalarterie nach Beschichtung mit Shikonin (2 x 2,5 mg/ml)	70
Abbildung 49: Reendothelialisierung der Iliakalgefäße.	71

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Atherosklerose	11
1.2	Durch Atherosklerose bedingte Krankheitsbilder	12
1.2.1	KHK.....	12
1.2.2	pAVK.....	13
1.3	Therapieansätze und ihre Einschränkungen.....	14
1.4	Pathomechanismus der Restenose.....	17
1.5	Prophylaxe und Therapie der Restenose	18
1.6	Das Naphthochinonderivat Shikonin	19
1.7	Fragestellung.....	20
2	Material und Methodik.....	21
2.1	Versuchsablauf und Versuchsmaterialien	21
2.1.1	Beschichtungsverfahren	21
2.1.2	Tiermodell	21
2.1.3	Gruppeneinteilung	22
2.1.4	Thromboseprophylaxe und Narkose	23
2.1.5	Operationstechnik und postoperative Versorgung	24
2.1.6	Nachuntersuchung und Versuchsende	25
2.2	Aufarbeitung und Färbung der Präparate.....	26
2.2.1	Fixieren der Gefäße	26
2.2.1.1	Paraffinschnitte	26
2.2.1.2	Methacrylatschnitte	27
2.2.2	Färbungen zur histologischen Untersuchung.....	27
2.2.2.1	Haematoxilin-Eosin-Färbung (HE).....	27
2.2.2.2	Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG)	28
2.2.3	Färbungen zur immunhistologischen Untersuchung.....	28
2.2.3.1	CD-31-Antikörper.....	28
2.2.3.2	PCNA und DAPI.....	29
2.3	Untersuchungsmethoden	30
2.3.1	Quantitative Angiographie.....	30
2.3.2	Morphometrische Auswertung.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.3.3	Semiquantitative Auswertung der Reendothelialisierung.....	31
2.3.4	Proliferationsindex in der Intima.....	31
2.4	Statistische Auswertung.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Prozedur.....	33
3.2	Ergebnisse der KoronargefäÙe	34
3.2.1	Morphometrische Ergebnisse	34
3.2.1.1	Minimaler Durchmesser im untersuchten Segment	34
3.2.1.2	Mittlerer Durchmesser im untersuchten Segment	35
3.2.1.3	LumenfläÙe	36
3.2.1.4	IntimafläÙe	37
3.2.1.5	Stenosegrad	39
3.2.2	Ergebnisse der histopathologischen Auswertung	43
3.2.2.1	Proliferationsindex in der Intima.....	43
3.2.2.2	Reendothelialisierung	49
3.3	Ergebnisse der IliakalgefäÙe	50
3.3.1	Ergebnisse der quantitativen Angiographie.....	50
3.3.1.1	Referenzdiameter vor dem Eingriff.....	50
3.3.1.2	Maximaler Diameter nach Stentimplantation	51
3.3.1.3	Minimaler Diameter im untersuchten Segment.....	52
3.3.1.4	Reduktion des Diameters im untersuchten Segment.....	53
3.3.1.5	Prozentuale Reduktion des durchflossenen Querschnitts	54
3.3.2	Morphometrische Ergebnisse	56
3.3.2.1	Minimaler Durchmesser im untersuchten Segment	56
3.3.2.2	Mittlerer Durchmesser im untersuchten Segment	57
3.3.2.3	LumenfläÙe	59
3.3.2.4	IntimafläÙe	60
3.3.2.5	MediafläÙe	61
3.3.2.6	Stenosegrad	62
3.3.3	Ergebnisse der histopathologischen Auswertung	65
3.3.3.1	Proliferationsindex der Intima	65
3.3.3.2	Reendothelialisierung	71
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	72

Inhaltsverzeichnis

4	Diskussion	73
4.1	Hintergrund des vorliegenden Versuches	73
4.2	Stentbeschichtungen zur Reduktion der Restenose.....	74
4.3	Beschichtung peripherer Stents	76
4.4	Verwendung von Shikonin	78
4.5	Stentbeschichtung mit Sirolimus und Paclitaxel	81
4.5.1	Antikoagulantien	82
4.6	Experimentelles Modell.....	83
4.6.1	Tiermodelle zur Erforschung der Restenose.....	83
4.6.2	Wahl des Schweinmodells	84
4.7	Immunhistologische Veränderungen nach Stentimplantation	85
4.8	Gefäßreaktion und Restenose.....	86
4.9	Schlussfolgerungen.....	89
5	Zusammenfassung.....	91
6	Literaturverzeichnis	93
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	103
8	Danksagung	104
9	Lebenslauf	105

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose, sowie die aus ihr entstehenden Krankheitsbilder wie koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Schlaganfall, gehören zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. [1] Trotz immer besserer Erkenntnisse über Risikofaktoren und prophylaktische Maßnahmen, steigt in der westlichen Gesellschaft die Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse stetig an, weshalb die Verbesserung therapeutischer Optionen im Mittelpunkt der Forschung steht. Laut Definition der WHO ist die Atherosklerose „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [2]. Nach der Response-to-injury Theorie von Ross und Glomset steht am Beginn der Atherosklerosebildung ein Endothelschaden. Dieser kann durch unterschiedliche Einflussfaktoren entstehen, wie zum Beispiel durch eine Hyperlipidämie oder verschiedene chemische Faktoren wie Homozystein, Harnsäure oder Zytokine im Rahmen von entzündlichen Prozessen. Je nach Region kann auch ein mehr oder weniger stark ausgeprägter mechanischer Endothelschaden durch Scherkräfte hinzukommen, welcher zum Beispiel bei einer arteriellen Hypertonie besonders stark ausgeprägt ist. Durch den lokalen Endothelschaden kommt es zu einer Anlagerung von Thrombozyten an subendotheliales Bindegewebe und damit zu deren Aktivierung und Freisetzung von Zytokinen. Der hierin enthaltene sogenannte platelet-derived growth factor (PDGF) ist eines der stärksten Mitogene glatter Gefäßmuskelzellen [3]. Es kommt zu einer Migration und Proliferation von in der Gefäßmedia liegenden glatten Muskelzellen und damit zu einer Verdickung der Intima. Durch Reparaturprozesse kommt es zu einer erneuten Deckung mit Endothelzellen, durch dauerhaft oder rezidivierend einwirkende Schädigungen des Endothels, wie zum Beispiel bei ständig erhöhten LDL-Werten (low density lipoprotein)

Einleitung

oder anderen chemischen Noxen, wiederholt sich dieser Prozess jedoch über Jahre immer wieder. Hierdurch kommt es zu einer zunehmenden Einengung des Gefäßlumens und damit einhergehend zu einem zusätzlichen Scherstress aufgrund der an der Engstelle erhöhten Fließgeschwindigkeit des Blutes. Es bildet sich somit eine Art circulus vitiosus. [4-6]

Gegenstand neuerer Forschung ist die Schlüsselrolle der Entzündungsreaktion in der Entstehung der Atherosklerose [7, 8]. Demnach führt die Retention von LDL in der Intima zu einer Entzündungsreaktion. Dies führt zur Endothelzellaktivierung sowie zur Freisetzung von Chemokinen und folglich zur Leukozyteninfiltration. Durch freigesetzte Zytokine werden die Monozyten zur Differenzierung zu Makrophagen stimuliert. Diese nehmen akkumulierendes Cholesterin aus oxidierten LDL-Partikeln auf und werden zu den für die Atherosklerose typischen Schaumzellen. Als Grund für die Einlagerung von LDL in der Intima wird eine endotheliale Dysfunktion angenommen, die durch Risikofaktoren wie inhalatives Zigarettenrauchen, Diabetes Mellitus und Hypertonie ausgelöst werden kann.

Neben den genannten Risikofaktoren der endothelialen Dysfunktion sind aus experimentellen und epidemiologischen Studien, wie der bekannten Framingham-Studie, weitere Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose bekannt. Dazu gehören als wohl wichtigste und bekannteste Vertreter erhöhte Blutfette (LDL, Triglyceride, Cholesterin), erniedrigtes high density lipoprotein (HDL), Adipositas, Hyperurikämie, psychische Faktoren sowie hormonelle Bedingungen. Neben diesen beeinflussbaren Größen, gibt es auch unbeeinflussbare Risikofaktoren wie Alter, familiäre Belastungen und das Geschlecht, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. [9]

1.2 Durch Atherosklerose bedingte Krankheitsbilder

1.2.1 KHK

Herz-/Kreislaufkrankungen sind in Deutschland noch vor bösartigen Neubildungen die häufigste Todesursache. Laut statistischem Bundesamt

Einleitung

wurden im Jahr 2014 39% aller Sterbefälle hierdurch verursacht [10]. Die koronare Herzkrankheit äußert sich durch verschiedene klinische Verlaufsformen, die zum Teil ineinander übergehen können. Diese sind die chronisch stabile Angina Pectoris, die instabile Angina Pectoris, die stumme Myokardischämie und hypoxiebedingte Herzrhythmusstörungen. Im Falle eines Kompletverschluss resultiert ohne adäquate Notfallbehandlung ein Myokardinfarkt mit irreversiblen Untergang von Herzmuskelgewebe und fibrösem Umbau.

Die Symptome der Angina Pectoris werden nach der Canadian Cardiovascular Society in die Grade 0 bis IV unterteilt, wobei Grad 0 keine Einschränkung der körperlichen Aktivität und Angina Pectoris-Beschwerden nur bei starken, anhaltenden Belastungen bedeutet, Grad IV hingegen Angina Pectoris bei jeder körperlichen Belastung oder auch in Ruhe auslöst. [11]

1.2.2 pAVK

Die pAVK ist die Manifestation der Atherosklerose an peripheren Gefäßen, meistens den Beinarterien, im Gegensatz zur arteriellen Verschlusskrankheit (AVK) im Allgemeinen, zu der auch die KHK, die Nierenarterienstenose, sowie die Karotisstenose gehören.

Symptomatisch wird die pAVK oft erst ab einer starken Einengung von bis zu 90% des Gefäßlumens. Die Prävalenz der Erkrankung wird also stark unterschätzt, wenn nur symptomatische Patienten berücksichtigt werden. Wird hingegen der Knöchel-Arm-Index (ABI) ermittelt, bei dem der systolische Blutdruck am Knöchel im Liegen durch den systolischen Blutdruck am Oberarm geteilt wird, kann die pAVK bei einem ABI kleiner 0,9 schon im Frühstadium diagnostiziert werden. Mit dieser Diagnostik ergibt sich in Screeninguntersuchungen eine Prävalenz von mindestens 10% in der Altersgruppe der über 45-jährigen, wobei Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. [12]

Einleitung

Die Symptome erstrecken sich von blassen, kalten Extremitäten, über Schmerzen bei Belastung, bis hin zum hypoxiebedingten Gewebeuntergang, der Gangrän. Die Symptome werden, wie in Abbildung 1 ersichtlich, zur Einteilung in verschiedene Stadien angewandt. Im deutschsprachigen Raum erfolgt diese Einteilung meist nach Fontaine [13], im angloamerikanischen Sprachraum häufiger nach Rutherford [14], wobei nach Rutherford auch dopplersonographische Untersuchungen mit einbezogen werden können.

Fontaine		Rutherford	
Stadium	Symptome	Stadium	Symptome
I	Keine Symptome	0	Keine Symptome
IIa	Claudicatio Intermittens Gehstrecke > 200m	1	Leichte Claudicatio intermittens, Dopplersonographie > 50mmHg
		2	Mittelgradige Claudicatio intermittens
IIb	Claudicatio Intermittens Gehstrecke < 200m	3	Schwere Claudicatio intermittens, Dopplersonographie < 50mmHg
III	Ruhschmerz	4	Ruhschmerz
IV	Trophische Störungen, Nekrose, Gangrän	5	Distale trophische Läsionen
		6	Über das metatarsale Niveau reichende Läsionen

Abbildung 1: Vergleichende Stadieneinteilung nach Fontaine und Rutherford [14]

1.3 Therapieansätze und ihre Einschränkungen

Als wichtigste Therapie- und Präventionsmaßnahmen der Atherosklerose sind körperliche Aktivität und die Vermeidung von Risikofaktoren zu nennen. Dabei

Einleitung

beeinflusst die körperliche Aktivität, neben der metabolischen Situation und direkter Wirkungen auf das Herz, vor allem die Entzündungskomponente der Atherosklerose positiv, indem es zu einer Abnahme atherogener Zytokine und einer Zunahme atheroprotektiver Zytokine führt. [15]

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Behandlung von Grundkrankheiten, um die Häufigkeit von Komplikationen zu senken. Dazu gehören die Behandlung einer arteriellen Hypertonie (β -Blocker, ACE-Hemmer, AT1-Blocker, Diuretika, Kalziumantagonisten), eines bestehenden Diabetes Mellitus (Metformin, Sulfonylharnstoffe, Insulin), Lipid- und Cholesterinsenkung (Fibrate, Statine) und die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern (ASS, Clopidogrel).

Die Behandlung symptomatischer Stenosen mit einer pharmakologischen Systemtherapie hat sich als nicht wegweisend erwiesen, da der Therapeutikaspiegel am Läsionsort bei akzeptabler systemischer Belastung zu niedrig war.

Zur Behandlung symptomatischer Stenosen und akuter Ereignisse wie akutes Koronarsyndrom oder Beinarterienverschluss, gibt es neben operativen Methoden in den letzten Jahrzehnten zunehmend minimalinvasive endovaskuläre Behandlungsmöglichkeiten.

Als operative Verfahren gibt es die Endarteriektomie sowie Bypass-Operationen, wobei die Endarteriektomie auf große Gefäße wie die Karotiden beschränkt ist.

Die endovaskuläre Therapie hat ihren Ursprung in der Entwicklung der selektiven Koronarangiographie Ende der 50er Jahre und der damit einhergehenden Möglichkeit der Katheterisierung unter Durchleuchtung. Im Jahr 1964 wurden erste Ergebnisse mit Ballonkathetern von dem Radiologen Charles Dotter veröffentlicht. [16]

In sechs großen, randomisierten Studien zum Vergleich der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) mit aortokoronarem Bypass, [17-22] erzielte die perkutane Ballondilatation recht gute Ergebnisse mit

Einleitung

vergleichbarer Mortalitätsrate wie bei der Bypass-Operation, jedoch signifikant erhöhter Restenoserate und damit verbundener Reinterventionen, die in knapp 50% der Fälle nicht interventionell, sondern operativ erfolgen mussten.

Eine deutliche Verbesserung der Restenoseraten bei PTCA konnte erst mit der Einführung von Stents erreicht werden. Dabei handelt es sich um ein Metallgitter, das mittels Katheter in das Gefäß eingebracht wird und so den elastischen Rückstellkräften, dem sogenannten „elastic recoil“, entgegenwirkt und das Gefäß von innen offenhält. Häufig verwendete Materialien sind chirurgischer Edelstahl oder eine Kobalt-Chrom-Legierung (CoCr), peripher auch Nitinol, eine Legierung mit „Memory-Effekt“. Durch diesen Effekt kann der vorgefertigte Stent auf einen Katheter aufgebracht werden und entfaltet im Gefäß nach dem Entfernen einer Schutzkappe wieder seine ursprüngliche Form, ist also selbstexpandierend. [23] Der von Palmaz und Schatz entwickelte Edelstahlstent ist dagegen auf einem Ballonkatheter vormontiert und wird durch Inflation des Ballons im Gefäß expandiert. [24]

Mit der Verwendung von Stents konnten die Restenoseraten zwar reduziert werden, Reinterventionen sind jedoch noch immer häufiger als nach Bypass-Operationen. [25, 26]

Eine Weiterentwicklung dieser sogenannten bare metal stents (BMS) sind medikamentenbeschichtete Stents (drug eluting stent, DES). Dabei wird ein meist antiproliferatives und/oder immunsuppressives Medikament (z.B. Sirolimus) verwendet, um die Intimahyperplasie als einen Grund der Restenose zu verhindern. [27] Die Überlegenheit der DES im Vergleich zu BMS konnte in vielen Studien gezeigt werden und führte zu einem raschen Anstieg der Nutzung von beschichteten Stents. Diese Behandlung setzt jedoch eine lange Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern (ASS und Clopidogrel) voraus und ist dadurch mit einem erhöhten Blutungsrisiko verbunden. Dadurch steht der Einsatz beschichteter Stents nicht allen Patienten zur Verfügung und muss sorgfältig gegen die Risiken abgewogen werden. Durch eine späte Restenose nach Absetzen der Thrombozytenaggregationshemmer steigt die

Einleitung

Mortalitäts- und Reinterventionsrate im Gegensatz zu BMS deutlich an und reduziert die anfänglichen Vorteile gegenüber unbeschichteten Stents. [28, 29]

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der Restenose ist die intravasale Brachytherapie. Dabei werden radioaktiv beschichtete Stents eingesetzt. Erste Ergebnisse zur Prävention der Restenose nach Stentimplantation durch Brachytherapie zeigten sich sehr vielversprechend [30], jedoch ist die Methode auch mit Problemen behaftet. Der Umgang mit ionisierenden Strahlen erfordert ein hohes Maß an logistischen und infrastrukturellen Sicherheitsmaßnahmen und ist damit auch teuer. Außerdem konnte je nach Isotop eine verminderte Reendothelialisierung sowie ein sogenannter „edge-effect“ nachgewiesen werden, bei dem vermutlich durch eine niedrige Strahlendosis im Randbereich der gestenteten Gebiete eine vermehrte, klinisch relevante Intimahyperplasie zu beobachten ist. [31] Bei anderen Isotopen wie zum Beispiel Rhenium188 bleibt dieser edge-effect aus. [32] Aufgrund der genannten Einschränkungen und der Verfügbarkeit von medikamentenbeschichteten Stents spielt die Brachytherapie für die Primärtherapie einer Atherosklerose nur noch eine sehr untergeordnete Rolle. Sie wird jedoch noch zur sekundären Therapie bei Restenosen eingesetzt. [33]

1.4 Pathomechanismus der Restenose

Die Restenose ist eine erneute Lumeneinengung und stellt das wesentlichste Problem nach interventionellen Behandlungen sowohl bei koronaren, als auch bei peripheren Eingriffen dar. Der Pathomechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch sind drei pathophysiologische Reaktionen bekannt, denen je nach Eingriff eine unterschiedliche Bedeutung beizumessen ist. Dies sind elastische Rückstellkräfte [34] nach Aufdehnung des Gefäßes (elastic recoil), ein lumenreduzierender Umbau der Gefäßwand (negatives Remodeling) [35], sowie die durch Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und Myofibroblasten bedingte Neointimaformation. Dabei spielt das negative Remodeling die Hauptrolle nach konventioneller PTCA mittels Ballonkatheter [36], während nach Stentimplantation das elastic recoil und das negative

Einleitung

Remodeling durch den Stent verhindert werden und die hier problematische in-Stent-Restenose hauptsächlich durch die Intimahyperplasie bedingt ist. Wie oben bereits erwähnt, steht nach der „response-to-injury“ - Hypothese des Pathologen Russel Ross ein Endotheldefekt am Beginn der Entstehung einer Atherosklerose. Übertragen auf die Stentimplantation entsteht durch die Schädigung der Gefäßwand im Zuge der Aufdehnung des Gefäßes eine entzündlich-proliferative Antwort, die primär einen protektiven Effekt hat. In Abhängigkeit der Art und Dauer der Einwirkung wird aus dieser Reaktion jedoch ein Krankheitsprozess [4-6]. Durch die Aktivierung von Thrombozyten kann es zu einer akuten Gefäßthrombose kommen. Aufgrund von durch die Thrombozyten freigesetzten Zytokinen wie beispielsweise PDGF kommt es wie oben bereits erwähnt zu einer Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. Außerdem kommt es zu einer Einwanderung von Monozyten, welche zu Makrophagen differenzieren und weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen. [37, 38]. Entgegen früherer Vorstellungen spielt auch die Adventitia eine wichtige Rolle im Entstehungsmechanismus der Restenose. Einerseits als Ursprungsort von Zellen, die Richtung Lumen migrieren und zur Neointimaformation beitragen, andererseits durch die Synthese von Prokollagen Typ I durch Fibroblasten, was zur mechanischen Konstriktion des Gefäßes führt [39, 40].

1.5 Prophylaxe und Therapie der Restenose

Die Therapie eines Wiederverschlusses besteht sowohl koronar, als auch peripher in einer erneuten Aufdehnung mittels Ballon oder Stent. In einer nicht unerheblichen Zahl der Fälle ist aber auch eine Operation nötig. Dies ist mit zusätzlichen Risiken und Kosten verbunden. Das Hauptaugenmerk liegt deshalb auf der Verbesserung der Prophylaxemöglichkeiten. Da die gut wirksame intravaskuläre Strahlentherapie wie oben beschrieben sehr aufwendig ist, wird vor allem an DES intensiv geforscht. Sowohl an der Architektur, als auch an den Materialien der Stents wird ständig gearbeitet. Besonders wichtig scheint jedoch die medikamentöse Beschichtung zu sein. So wird beispielsweise in der großen TAXUS I Studie die Überlegenheit einer

Einleitung

Beschichtung mit Paclitaxel gegenüber unbeschichteten Stents sowohl bei de-novo-Läsionen, als auch bei Restenosen, gezeigt. Das Risiko der späten Restenose nach Absetzen der Thrombozytenaggregationshemmer konnte mit neuen Beschichtungen wie Zotarolimus zwar verringert werden, bleibt aber dennoch bestehen [41].

1.6 Das Naphthochinonderivat Shikonin

Shikonin ist ein Naphthochinonderivat und, ebenso wie sein Enantiomer Alkannin, in den Wurzeln der asiatischen Pflanze *Lithospermum erythrorhizon* sowie in der europäischen Pflanze *Alkanna tinctoria* enthalten. Beide Pflanzen werden unabhängig voneinander schon seit über 2000 Jahren als natürlicher Farbstoff sowie als wundheilungsförderndes Medikament eingesetzt. Schon im fünften Jahrhundert vor Christus wurden die getrockneten Wurzeln von *Alkanna tinctoria* von Hippocrates zur Behandlung des Ulcus verwendet. Auch Paracelsus (Theophrastus Bombastus Philippus von Hohenheim) verwendete im dritten Jahrhundert vor Christus diese Pflanze als Färbemittel und Heilkraut.

Erst 1976 versuchte Papageorgiou die wirksamen Inhaltsstoffe aus *Alkanna tinctoria* zu isolieren [42], konnte jedoch nur verschiedene Derivate vom Shikonin nachweisen. 1977 wies Hayashi anti-inflammatorische Effekte bei topischer Anwendung von Shikonin nach. Es handelte sich hierbei jedoch um eine topische kutane Anwendung, weshalb die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf einen intravasalen Einsatz fraglich ist [43]. Ein Vergleich der beiden Enantiomere Alkannin und Shikonin ergab, dass die Konfiguration die biologische Aktivität nur gering beeinflusst [44]. Eine wichtige Rolle für die anti-inflammatorische Wirkung scheint die Synthesehemmung von Leukotrien B4 zu spielen [45], da Leukotrien B4 konzentrationsabhängig zu einer chemotaktischen Migration von Leukozyten führt und deren Aktivierung sowie die Anlagerung an das Endothel begünstigt und dadurch ein wichtiger Mediator bei einer lokalen Entzündungsreaktion ist. [46] Es konnte gezeigt werden, dass Shikonin die Synthese von Leukotrien B4 effektiv hemmen kann [47]. Neuesten Studien zufolge greift Shikonin auch am Proteasom an und wirkt auf diese

Einleitung

Weise ähnlich effektiv entzündungshemmend wie Dexamethason [48]. Außerdem wurden auch eine antitumoröse, antimikrobielle und antithrombotische Aktivität nachgewiesen [49]. Auch eine hemmende Wirkung auf das HI-Virus wurde gefunden [50].

1.7 Fragestellung

Die Möglichkeit der Prophylaxe und Therapie der Restenose mittels beschichteter Stents wurde schon vielfach gezeigt. Das Hauptproblem beschichteter Stents stellt die späte Restenose nach Absetzen der Thrombozytenaggregationshemmer dar. Um eine lebenslange Therapie mit ASS und Clopidogrel zu vermeiden und das Risiko der späten Restenose zu reduzieren, spielt die Verbesserung der medikamentösen Beschichtung eine wichtige Rolle.

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war, die Auswirkung einer Stentbeschichtung mit Shikonin auf den Restenoseprozess zu untersuchen. Da die wichtigsten Ursachen der Restenose der Entzündungsprozess sowie die Thrombozytenaggregation sind, ist Shikonin durch seine antiinflammatorische und antithrombotische Wirkung eine sehr vielversprechende Substanz, um dieses Ziel zu erreichen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Ist eine polymerfreie Beschichtung mit Shikonin in der Lage, Restenose zu verhindern?
- Besteht dabei eine Dosis-Wirkungs-Beziehung?
- Findet eine Reendothelialisierung als Zeichen für die Einheilung des Stents statt?
- Welche Auswirkungen hat eine potentiell heilungsverbessernde Substanz auf die Gefäßwand im Vergleich zu Standardstent und Rapamycin?

Material und Methodik

2 Material und Methodik

2.1 Versuchsablauf und Versuchsmaterialien

2.1.1 Beschichtungsverfahren

Die Beschichtung der Stents und Ballons erfolgte mit einer speziellen Beschichtungsapparatur (SCM7; Translumina GmbH, Hechingen, Deutschland). Hierzu wurde der Katheter in einer Einweg-Kassette platziert und in die Beschichtungsmaschine eingelegt. Der schon auf dem Katheter vormontierte Stent besitzt eine mikroporöse Oberfläche, wodurch eine Retardierung der Medikamentenfreisetzung möglich ist und dadurch auf die Verwendung von Polymeren verzichtet werden kann. Das Beschichtungsverfahren dauert lediglich 8 Minuten und kann direkt im Katheterlabor unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Durch den Sprühmechanismus kann eine homogene Schicht auf der Oberfläche der vormontierten Stents aufgebracht werden. Da die Apparatur transportabel ist, war keine Lagerung nötig, weshalb bis zur Implantation kein Wirkstoffverlust anzunehmen ist. Im vorliegenden Versuch wurden die Stents in zwei Zyklen hintereinander beschichtet. Dabei erfolgte die Beschichtung in der hochdosierten Shikonin-Gruppe mit 2 x 5 mg/ml Shikonin, in der niedrigdosierten Gruppe mit 2 x 2,5 mg/ml Shikonin. Die Rapamycin-Beschichtung erfolgte mit einer 0,75% Rapamycin-Lösung.

2.1.2 Tiermodell

Für die Tierversuche wurde das Schweinemodell gewählt, das sich, gerade bezüglich des Herz- Kreislaufsystems aufgrund dessen Ähnlichkeit zum menschlichen, für derartige Versuche bewährt hat.

Hierzu wurden 19 weibliche Mastschweine mit einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von $35,9 \pm 6,4$ kg verwendet. Als Zielgefäße dienten bei 5 Tieren der RIVA und RCX der linken Koronararterie, bei den restlichen Tieren zusätzlich beide Iliakalarterien.

Material und Methodik

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen (Antragsnummer 14/09) und nach den Kriterien der FELASA im Tier-OP des Instituts für experimentelle Chirurgie in Tübingen unter tierärztlicher Aufsicht durchgeführt.

2.1.3 Gruppeneinteilung

In RIVA und RCX wurden Abschnitte mit vergleichbarem Diameter gewählt, um gruppenübergreifend beide Gefäße als Koronargefäße zu verallgemeinern. Der Vergleich des Diameters erfolgte angiographisch mittels C-Bogen Fluoroskopie. Hierbei wurde die Messung anhand der Katheterspitze kalibriert, deren Durchmesser bekannt war. So konnte der Gefäßdurchmesser gemessen werden. Aufgrund der hohen Lipophilie sowohl von Shikonin als auch Rapamycin kann eine schnelle Aufnahme in die Gefäßwand angenommen werden. Somit existiert nahezu keine systemische Wirkung, sodass in jedem Tier alle Versuchsgruppen gleichzeitig existieren konnten. Sowohl die Implantation, als auch die spätere Auswertung verliefen randomisiert und verblindet. Abbildung 2 zeigt schematisch die Gruppeneinteilung. Zu Beginn des Versuchs wurden die peripheren Stents femoral implantiert. Nach der Behandlung der ersten drei Tiere fiel jedoch auf, dass es in diesem Segment zu einem Abknicken der Stents bei Bewegung der Tiere kommt. Daraufhin wurde das Modell abgeändert und bei den folgenden Tieren wurden die peripheren Stents in die Iliakalarterien implantiert, weshalb diese Gruppe kleiner ausfällt. Die betroffenen Stents aus den Femoralgefäßen wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Material und Methodik

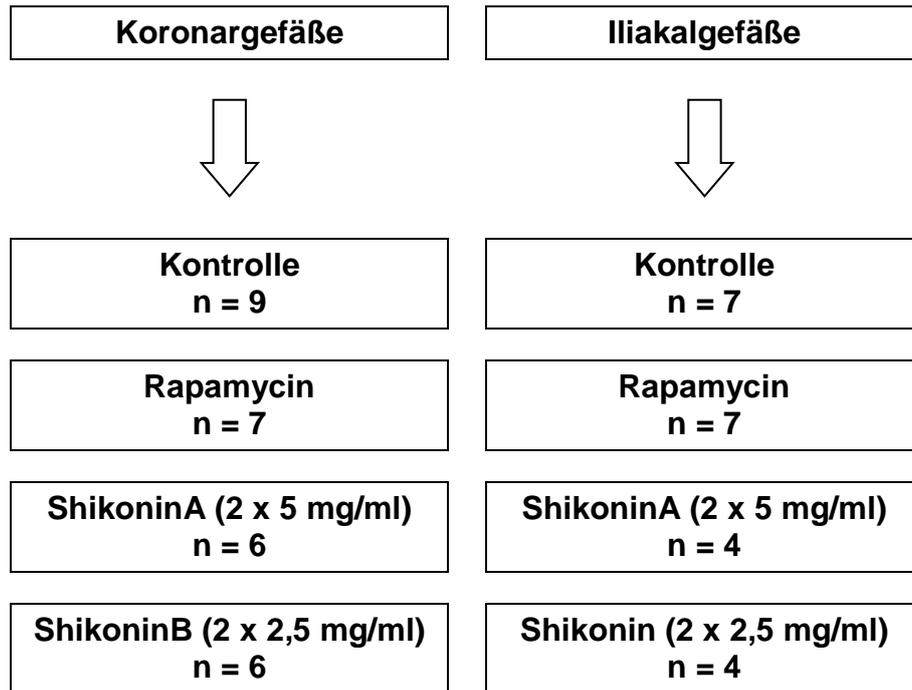


Abbildung 2: Gruppeneinteilung der Koronar- und Iliakalgefäße

2.1.4 Thromboseprophylaxe und Narkose

Zur Thromboseprophylaxe erhielten alle Tiere 24 Stunden vor der Intervention 300 mg Clopidogrel. Postinterventionell wurde die Prophylaxe mit täglich 75 mg Clopidogrel p.o. und 250 mg Acetylsalicylsäure p.o. bis zum geplanten Tod nach 28 Tagen fortgeführt.

Zur Prämedikation erfolgte die Gabe von 0,05 mg pro Kilogramm Körpergewicht Atropin sowie 2,0 mg pro Kilogramm Körpergewicht Azaperon, gefolgt von 0,2 mg pro Kilogramm Körpergewicht Midazolam und 14,0 mg pro Kilogramm Körpergewicht Ketamin als intramuskuläre Injektion. Zur endotrachealen Intubation wurden 2,0 – 5,0 mg pro Kilogramm Körpergewicht Propofol intravenös verabreicht. Die Einleitung der Allgemeinanästhesie erfolgte mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran mit 1,8-2,5 Vol% per inhalationem und 0,02 - 0,15 mg pro Kilogramm Körpergewicht Fentanyl intravenös. Aufrechterhalten wurde die Narkose mit 0,8 – 2,4 Vol% Isofluran per inhalationem und 30 – 100 µg pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde Fentanyl intravenös.

Material und Methodik

2.1.5 Operationstechnik und postoperative Versorgung

Nach Freipräparation der linken Arteria carotis communis wurde eine 6F Schleuse (Terumo, Leuven, Belgien) in die Arterie eingebracht und darüber 100-200 IU Heparin pro Kilogramm Körpergewicht injiziert, nachdem ein 0,0035 Zoll Führungsdraht (Terumo, Leuven, Belgien) durch die Schleuse bis in den Aortenbogen eingeführt wurde. Zuerst wurden die Koronarien, dann die Iliakalarterien behandelt. Dazu wurde ein 6F JR4 - Führungskatheter (Cordis, Warren, USA) bis in die Aorta ascendens nachgeschoben und mittels eines 0,014“ Führungsdrahtes selektiv die linke Koronararterie und über sie der RIVA sondiert. Unter angiographischer Kontrolle mittels C-Bogen Fluoroskop (Philips Pulsera Mobile C-Arm, Philips Healthcare, Best, Niederlande) wurde der Führungskatheter in den RIVA geschoben und eine Ausgangsangiographie mit 10 ml Iopromid 370 (Ultravist, Bayer Healthcare, Grenzach, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde eine geeignete Position für die Stentimplantation ausgewählt und der Durchmesser gemessen, um den Inflationsdruck für eine entsprechende Überdehnung zu berechnen. Hauptkriterien für eine geeignete Position waren ein möglichst gerader Gefäßabschnitt und das Fehlen von großen Gefäßabgängen. Anschließend wurden auf geeigneten Ballons aufgebrachte Stents (Yukon Choice, Translumina GmbH, Hechingen, Deutschland), je nach Gefäßdurchmesser mit den Größen 2.5 x 16 mm, 3.0 x 16 mm bzw. 3.5 x 16 mm, über den Führungsdraht in das Gefäß eingebracht. Durch Inflation des stenttragenden Ballons mit einem Kontrastmittel/NaCl-Gemisch wurde das Gefäß mit dem Faktor 1,2 überdehnt und dabei der Stent entfaltet. Kardial wurde der Ballon 30 Sekunden inflatiert, peripher 120 Sekunden. Danach wurde eine erneute Angiographie durchgeführt und bei starkem Gefäßspasmus 200 µg Nitroglycerin verabreicht.

Nach dem RIVA wurde auf dieselbe Weise ein weiterer Stent in den RCX implantiert.

Anschließend wurde der Führungsdraht durch einen 6F MPA Führungskatheter (Cordis, Warren, USA) ersetzt und dieser über die Aorta descendens in die A. Iliaca eingeführt. Hier wurden nach demselben Prinzip wie koronar geeignete

Material und Methodik

Gefäßabschnitte ausgewählt und Stents mit den Maßen 3,5 x 40 mm implantiert. Die Stentimplantation erfolgte hier beidseits, die Überdehnung erfolgte ebenfalls mit dem Faktor 1,2 und der Ballon wurde für 120 Sekunden inflatiert.

Nach der Stentimplantation erfolgte eine erneute Angiographie zum Ausschluss eines Vasospasmus oder einer Dissektion, außerdem diente diese als Ausgangsbefund für die quantitative angiographische Evaluation am Versuchsende.

Postoperativ erfolgte die Analgesie mit 0,4 mg/kg KG Meloxicam intramuskulär alle 24 Stunden für einen Zeitraum von 3-5 Tagen, je nach Schwere des Eingriffs und klinischem Zustand. Außerdem erfolgte eine prophylaktische Gabe von Duphamox LA® (Amoxicillin-Trihydrat, 2 Gaben im Abstand von 2 Tagen intramuskulär) zur antibiotischen Abdeckung.

2.1.6 Nachuntersuchung und Versuchsende

Nach 28 Tagen wurde eine erneute Angiographie durchgeführt. Dazu wurde eine Allgemeinanästhesie nach oben genannter Vorgehensweise eingeleitet. Dann wurde die rechte A. carotis freipräpariert, die Schleuse eingelegt und der Führungskatheter mittels Führungsdraht in die behandelten Gefäße gebracht. Die Angiographien wurden, ebenso wie die Angiographien der Erstintervention, zur späteren Auswertung digital gespeichert (QuantQA, Leonardo, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Die Software erkennt hierzu automatisch den Umriss der kontrastierten Gefäße und ermittelt den Stenosegrad. Anschließend wurde dieser durch einen erfahrenen Radiologen validiert. Noch während der Narkose wurden die Tiere nach Abschluss der Angiographien euthanasiert. Die Euthanasierung erfolgte, nach Vertiefung der Anästhesie mit Ketamin, durch die intravenöse Injektion von 4-6 ml T61® (Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid, Embutramid) pro 50 kg Körpergewicht. Das Herz wurde entnommen und zunächst jede Koronararterie über das Ostium mit 250 ml einer isotonen Kochsalzlösung gespült und dann mittels 4% Formaldehydlösung perfusionsfixiert. Anschließend wurden die

Material und Methodik

behandelten Gefäßabschnitte sofort explantiert, erneut mit einer 0,9-prozentigen Kochsalzlösung gespült und durch Perfusion mit einer 4-prozentigen Paraformaldehydlösung fixiert. Ein Teil der gestenteten Gefäßabschnitte wurde in Methacrylat eingebettet und nach Masson-Goldner angefärbt, um sie ohne Gewebeschaden mitsamt Stent präparieren zu können. Der Rest des Abschnittes wurde vorsichtig von den Stentstreben befreit und für die histologischen Untersuchungen und immunhistochemische Färbungen in Paraffin eingebettet.

2.2 Aufarbeitung und Färbung der Präparate

2.2.1 Fixieren der Gefäße

Nach der Entnahme der Gefäße wurden diese zur Fixierung zuerst für 24 Stunden in Paraformaldehyd (PFA) und anschließend in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gegeben. Für die Einbettung in Paraffin und Methacrylat wurden die fixierten Gefäße unter laufendem Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50%, 70%, 90%, 96%, 2x100%; jeweils 30 Minuten) entwässert.

2.2.1.1 Paraffinschnitte

Zuerst wurden die Stentstreben mittels Pinzette entfernt. Danach konnten die entwässerten Gefäßsegmente in Paraffin eingebettet werden. Die Dehydrierung und die Überführung in Paraffin erfolgten über Nacht in einer ThermoShandon Citadel 100, die Ausbettung in einer Paraffinausgießstation (Leica EG1160). Aus den fertigen Paraffinblöcken wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica DSC1) 6µm dicke Semidünnschnitte geschnitten und für 45 Sekunden in ein Warmwasserbad mit 40°C gelegt, um die Schnitte zu strecken. Anschließend wurden immer mehrere Schnitte (zwischen 4 und 6) auf einen Objektträger (SuperFrost® plus Objektträger, Mattrand weiß, 25x75x1mm. Material: Glas. Art.Nr. 03-0060) aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet.

Material und Methodik

2.2.1.2 Methacrylatschnitte

Für die Einbettung in Methacrylat wurde Technovit[®] 7200 verwendet, der erste lichthärtende Einbettkunststoff auf Methacrylatbasis. Dazu wurden die Gefäße zuerst für 30 Minuten in einer 1:1-Mischung aus Technovit[®] 7200 und Ethanol, anschließend über Nacht bei 3°C in reinem Technovit[®] 7200 vorinfiltriert. Mit dem Fixierungs-Kleber Technovit[®] 7230 wurden die Gefäße auf dem Boden der Einbettformen fixiert und mit Technovit[®] 7200 aufgegossen. Die Aushärtung erfolgte in einem speziellen Lichtgerät (Exakt 520) der Firma EXAKT. Dabei wurde eine Temperatur von 40°C nicht überschritten, um die Denaturierung von Proteinen zu vermeiden.

Die ausgehärteten Blöcke wurden mit dem Präzisionskleber Technovit[®] 7210 auf Akrylglas-Objekträgern befestigt, und konnten mit einer Diamantbandsäge (Exakt 300) geschnitten werden. Dabei war es möglich, eine Dicke von weniger als 30µm zu erreichen.

2.2.2 Färbungen zur histologischen Untersuchung

2.2.2.1 Haematoxilin-Eosin-Färbung (HE)

Für die HE-Färbung wurden die Präparate zuerst zehn Minuten in Xylol und anschließend jeweils zwei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert und rehydriert. Danach wurden die Schnitte eine Minute in TBS gewässert und anschließend für 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert, bevor sie dann ca. zehn Sekunden in Mayer-Hämalaun (1:2 in H₂O) gefärbt und anschließend unter Leitungswasser gespült wurden. Schließlich wurden die Schnitte zehn Sekunden mit Eosin (0,1% in H₂O) gefärbt und mit Leitungswasser gespült. Abschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol (umgekehrte Reihenfolge wie oben) entwässert und mit einem Tropfen HiCo-Mic (Fa. Hirtz&Co.) eingedeckelt (Deckgläser: Art. Nr. 01-2250/x, 22x50mm; Art. Nr. 01-2260/x, 22x60mm; je nach Objektextension).

Material und Methodik

Bei dieser Färbemethode werden die Zellkerne durch das Hämalaun blau und das Bindegewebe durch Eosin rot gefärbt.

2.2.2.2 Elastica-van-Gieson-Färbung (EvG)

Für die EvG-Färbung wurden die Schnitte analog zu der HE-Färbung zuerst entparaffiniert. Anschließend wurden sie 20 Minuten in Resorcinfuchsinlösung gefärbt, danach mit destilliertem Wasser gespült und in 80% Ethanol differenziert, bis keine Farbwolken mehr abgingen. Danach wurde fünf Minuten in frisch gemischtem Eisenhämatoxin gefärbt und dann zehn Minuten unter fließendem Wasser gespült. Nach kurzer Differenzierung in HCL-Alkohol (100 ml 70% Ethanol und 1ml konzentrierte Salzsäure) wurde wieder unter fließendem Wasser gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte sechs Minuten in van Giesson-Gemisch (1%ige wässrige Säurefuchsinlösung und gesättigte, wässrige Pikrinsäure im Verhältnis 1:10) gefärbt und dann kurz mit 96% Ethanol gespült. Abschließend wurde wie bei der HE-Färbung (s.o.) wieder entwässert und eingedeckelt.

Bei dieser Färbung werden die Zellkerne durch das Eisenhämatoxin schwarz, elastische Fasern dunkelviolet, Muskulatur braun bis gelb und kollagenes Bindegewebe rot gefärbt.

2.2.3 Färbungen zur immunhistologischen Untersuchung

2.2.3.1 CD-31-Antikörper

CD31 (Synonym: PECAM-1 = platelet endothelial cell adhesion molecule 1) ist ein Oberflächenmolekül, das hauptsächlich auf Endothelzellen, jedoch auch diffus auf der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, verschiedenen Leukozyten und Tumorzellen exprimiert wird.

Da CD31 hauptsächlich an den Verbindungsstellen von Endothelzellen (tight junctions) exprimiert wird, ist es vor allem auf kontinuierlichen Endothelien großer und kleiner Blutgefäße nachweisbar, weshalb es besonders gut zum Nachweis einer unbeschädigten Endothelschicht geeignet ist. [51] Dadurch

Material und Methodik

kann es als Marker für den Heilungsprozess nach Stenteinlage herangezogen werden.

2.2.3.2 PCNA und DAPI

Um den Proliferationsindex zu ermitteln, wurden in einer immunhistochemischen Färbung die in Teilung befindlichen Zellen mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen) angefärbt. Dieselben Präparate wurden zusätzlich mit dem fluoreszierenden DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) behandelt, welches Zellkerne generell anfärbt.

Bei PCNA handelt es sich um ein für die Zellteilung essenzielles, nukleäres Protein, welches fast ausschließlich in der späten G1-Phase und in der S-Phase des Zellzyklus gebildet wird und aufgrund seiner Halbwertszeit von 48-72 Stunden auch noch kurze Zeit nach vollendeter Zellteilung nachzuweisen ist. Hierdurch eignet es sich sehr gut als Markierung für mitotische Zellen. Zur immunhistologischen Färbung wurde die avidin-biotin-complex-Methode verwendet. Hierbei wird das gesuchte Antigen mittels Primärantikörper (hier Maus-Ani-PCNA-Antikörper) gebunden, in einem zweiten Schritt wird dieser von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Aufgrund der starken Bindungskapazität von Avidin an Biotin kann durch die Hinzugabe einer an Avidin gebundenen Peroxidase in Verbindung mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) eine Farbreaktion erreicht werden.

Zur Markierung mitotischer Zellen wurden die Paraffinschnitte wie bei der HE-Färbung zuerst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte anschließend in einem 10 mM Citratpuffer mit einem pH von 6,0 für 20 Minuten bei 500 Watt in der Mikrowelle behandelt. Nach Abkühlung folgte die dreimalige Waschung in PBS. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren wurden die Schnitte danach für 30 Minuten in eine 0,87-prozentige H₂O₂-Lösung in Methanol gebracht und anschließend wieder dreimalig mit PBS gespült. Die so vorbehandelten Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit einem Maus-Antikörper gegen humanes PCNA inkubiert und dann wieder mit PBS

Material und Methodik

gewaschen. Anschließend wurde ein biotinylierter Anti-Maus-Sekundärantikörper hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Waschung in PBS erfolgte die Zugabe des ABC-Reagenz und anschließend die Farbreaktion mit DAB.

Zur Gegenfärbung aller Zellkerne mit DAPI wurden die Schnitte nach abgeschlossener Farbreaktion erneut mit PBS gespült und anschließend für 5 Minuten mit einer DAPI-Lösung inkubiert. Nach erneuter Waschung wurden die Schnitte wenige Minuten getrocknet und anschließend wie bei der HE-Färbung beschrieben, eingedeckelt.

2.3 Untersuchungsmethoden

2.3.1 Quantitative Angiographie

Die zum Zeitpunkt der Abschlussangiographie gespeicherten Daten wurden im DICOM – Format gespeichert und auf eine Leonardo Workstation übertragen. Die Kalibrierung für die quantitative Angiographie erfolgte anhand der durch eine röntgendichte Markierung gekennzeichneten Spitze des Führungskatheters. Zunächst wurde der Referenzdiameter des Gefäßabschnittes vor und nach dem gestenteten Abschnitt bestimmt. Die Konturmarkierung innerhalb des behandelten Segments erfolgt automatisch durch das Programm und wurde bei erkennbaren Abweichungen und Fehlern manuell korrigiert. Die bestimmten Parameter bestanden in minimalem Gefäßdurchmesser (MLD), Referenzdiameter, der prozentualen Stenose im Durchmesser, die errechnete prozentuale Stenose der Fläche sowie der maximale Diameter.

Aufgrund der Bewegungsartefakte bei der Angiographie der Koronargefäße im Vergleich zu den Iliakalgefäßen war mit dieser Methode koronar keine valide Messung möglich, weshalb auf eine angiographische Auswertung der Koronargefäße verzichtet wurde.

Material und Methodik

2.3.2 Morphometrische Auswertung

Für die morphometrische Beurteilung wurden die Methacrylatschnitte in HE-Färbung verwendet. Da die Stentstreben in den Methacrylatschnitten nicht entfernt wurden, waren die Gefäßanschnitte sehr gut beurteilbar.

Betrachtet wurden die Präparate mit einem Lichtmikroskop (Leica, Modell Leitz DM RBE; Quantimet 600; Bensheim, Deutschland) und mit dem Programm LEICA QWin V 2.8 (Bild und Analysesystem; Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd.; Cambridge, Großbritannien) am Computer vermessen. Hierzu wurde ein 2,5-fach Objektiv und ein 10-fach Okular mit einer resultierenden Vergrößerung von 25-fach verwendet. Gemessen wurden die Fläche der Tunica Media, der Intima und des verbliebenen Lumens in Quadratmillimetern, außerdem der minimale und der durchschnittliche Diameter im untersuchten Segment in Millimetern. Der Stenosegrad wurde aus Intima und Restlumenfläche nach der Formel $((\text{Intima} / (\text{Intima} + \text{Lumen})) \times 100)$ berechnet.

2.3.3 Semiquantitative Auswertung der Reendothelialisierung

Als ein Zeichen für den Heilungsprozess nach Stenteinlage wurde die Reendothelialisierung des betroffenen Gefäßabschnittes semiquantitativ bestimmt. Dabei wurden die immunhistochemischen Präparate verwendet, bei denen CD31, ein Oberflächenmolekül, das hauptsächlich auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, immunhistochemisch markiert wurde. [52] Hierbei wurde eine semiquantitative Einteilung vorgenommen, wobei der Endothelzellschicht bei einer Bedeckung von 0-25% der Oberfläche der Wert 0 zugeteilt wurde, bei einer Bedeckung von 25,1-50% der Wert 1, bei 50,1-75% der Wert 2 und bei 75,1-100% der Wert 3. Bei grenzwertigen Ergebnissen wurden teilweise auch Zwischenwerte wie 1,5 oder 2,5 vergeben.

2.3.4 Proliferationsindex in der Intima

Der Proliferationsindex gibt den prozentualen Anteil der Zellen, die sich gerade in Teilung befinden, an der Gesamtheit aller Zellen in der Tunica Media an. Um

Material und Methodik

ihn zu bestimmen, wurden zuerst alle Zellen in einem repräsentativen Bildausschnitt gezählt. Dazu wurde der Ausschnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die fluoreszierenden Zellkerne ausgezählt. Anschließend wurden im selben Ausschnitt unter dem Lichtmikroskop die braun angefärbten Zellkerne der sich in Teilung befindenden Zellen gezählt. Diese wurden anschließend ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen gesetzt. Hierzu wurden Mikroskop und Software entsprechend der morphometrischen Auswertung verwendet, es wurde jedoch ein 5-fach Objektiv und ein 10-fach Okular mit einer resultierenden Vergrößerung von 50-fach genutzt.

2.4 Statistische Auswertung.

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Graphen erfolgte mit Hilfe des Softwarepaketes JMP (Version 10.0.0, SAS Institute, Cary, USA).

Nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilks-Test wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert von 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Prozedur

Wie oben bereits erwähnt, wurden bei den ersten drei Versuchstieren die peripheren Stents femoral gelegt. Hierbei fiel auf, dass es aufgrund der Position schnell zu einem Abknicken der Gefäße mit einer daraus resultierenden deutlichen Lumeneinengung kam. Diese Stents wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen, außerdem wurde das Modell geändert und die peripheren Stents wurden anschließend in der Arteria iliaca implantiert.

Bei insgesamt fünf Versuchstieren kam es zu einem vorzeitigen Verlust aufgrund von Komplikationen.

Ein Tier verstarb noch am Tag der Stentimplantation mehrere Stunden postoperativ, am ehesten durch eine akute Gefäßthrombose.

Bei zwei Tieren kam es intraoperativ noch vor Stentimplantation beim Kathetervorschub zu Kammerflimmern.

Ein Tier starb 3 Stunden postoperativ, bei der Autopsie ergab sich ein Hämoperikard, am ehesten durch eine intraoperative Verletzung eines Koronargefäßes bedingt.

Ein weiteres Tier verstarb am Folgetag der Operation, ebenfalls am ehesten aufgrund eines akuten Gefäßverschlusses.

In keinem der Fälle konnte ein Zusammenhang mit einer bestimmten Beschichtung hergestellt werden.

Bei zwei weiteren Versuchstieren kam es intraoperativ zu einem Gefäßspasmus im RCX, weshalb dann jeweils ein zweiter Stent in den LAD implantiert wurde. Hierbei wurde darauf geachtet, jeweils dieselbe Beschichtung zu verwenden, um eine Verfälschung durch eventuell im Blut gelöste Medikamente zu vermeiden. Dies wurde durch eine von der Durchführung und Auswertung des

Ergebnisse

Versuchs unabhängige Person organisiert, um die Verblindung nicht zu gefährden.

3.2 Ergebnisse der Koronargefäße

3.2.1 Morphometrische Ergebnisse

3.2.1.1 Minimaler Durchmesser im untersuchten Segment

Bezüglich des minimalen Diameters im betrachteten Stentabschnitt, welcher maßgeblich die Fließeigenschaften beeinflusst, ergab sich für die Kontrollgruppe ein Wert von $2,07 \pm 0,60$ mm und in der Rapamycin-Gruppe ein Wert von $2,01 \pm 0,44$ mm. Damit sind die minimalen Gefäßdurchmesser in beiden Shikonin-Gruppen geringer, wobei sich bei der hochdosierten Gruppe mit $1,09 \pm 0,66$ mm ein signifikant geringerer Durchmesser verglichen mit den BMS ($p=0,003$) und den Rapamycinbeschichteten Stents ($p=0,011$) zeigte, wohingegen das Ergebnis der niedrigdosierten Gruppe mit $1,50 \pm 0,35$ mm nicht signifikant ausfiel ($p=0,06$ bzw. $p=0,135$, siehe Abbildung 03).

Ergebnisse

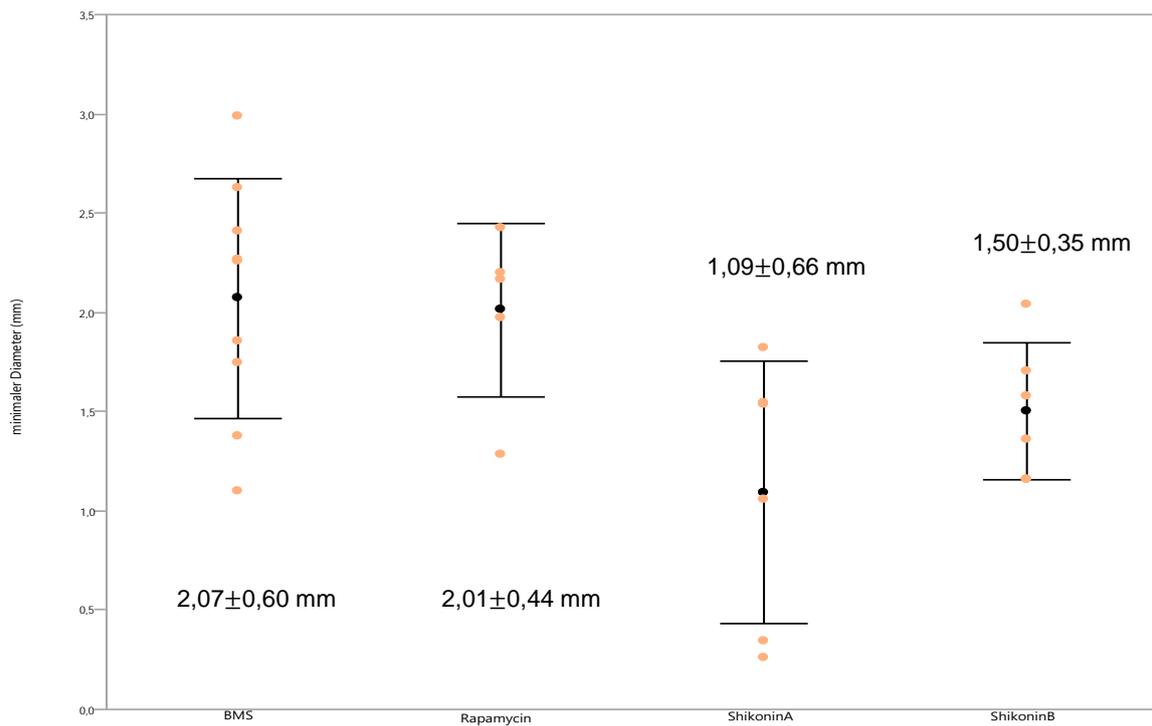


Abbildung 3: Morphometrische Messung des minimalen Durchmessers der Koronargefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

3.2.1.2 Mittlerer Durchmesser im untersuchten Segment

Der mittlere Durchmesser im untersuchten Segment ergab korrelierend zum minimalen Durchmesser geringere Werte für die Shikonin-Gruppen, verglichen mit der Kontroll- und der Rapamycin-Gruppe. Dabei zeigte die hochdosierte Shikonin-Gruppe mit $1,38 \pm 0,62$ mm einen signifikant geringeren Durchmesser als die Kontrollgruppe mit $2,34 \pm 0,63$ mm ($p=0,004$) und die Rapamycin-Gruppe mit $2,66 \pm 0,41$ mm ($p=0,001$). Der mittlere Durchmesser der niedrigdosierte Shikonin-Gruppe war mit $1,84 \pm 0,51$ mm signifikant kleiner ($p=0,026$) als der Durchmesser der Rapamycin-Gruppe (Siehe Abbildung 4).

Ergebnisse

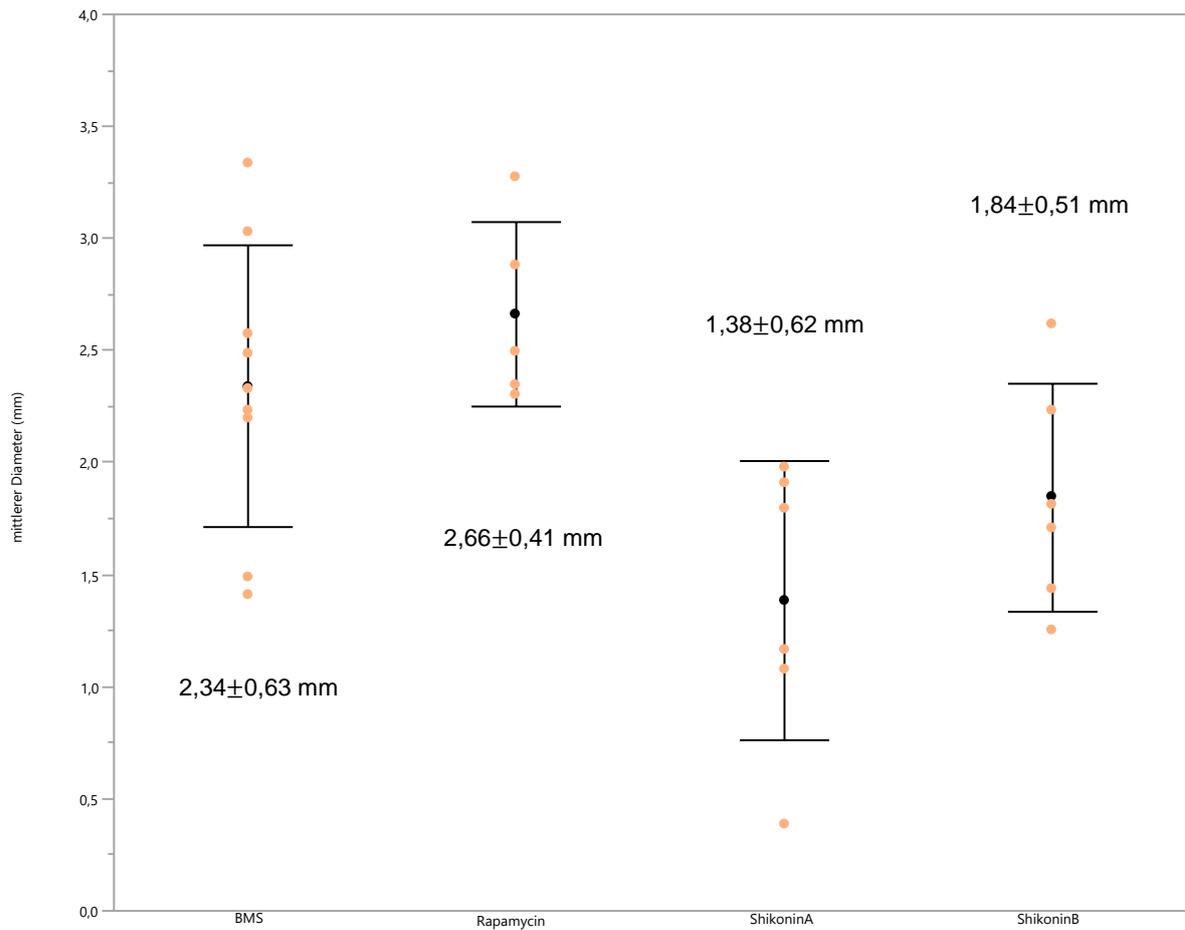


Abbildung 4: Morphometrische Messung des mittleren Durchmessers der Koronargefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

3.2.1.3 Lumenfläche

Bei der morphometrischen Auswertung der Koronarien ergab sich für das durchflossene Restlumen in der Kontrollgruppe eine mittlere Fläche von $4,61 \pm 2,33 \text{ mm}^2$. Diese war signifikant größer als diejenige sowohl der hochdosierten Shikonin-Gruppe mit $1,73 \pm 1,27 \text{ mm}^2$ ($p=0,006$), als auch der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mit $2,62 \pm 1,19 \text{ mm}^2$ ($p=0,047$). Auch die Lumenfläche in der Rapamycin-Gruppe war mit einer mittleren Fläche von $5,44 \pm 1,72 \text{ mm}^2$ signifikant größer als in der niedrigdosierten ($p=0,017$) und der hochdosierten Shikonin-Gruppe ($p=0,003$). Zwischen Rapamycin und BMS ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,416$, siehe Abbildung 5).

Ergebnisse

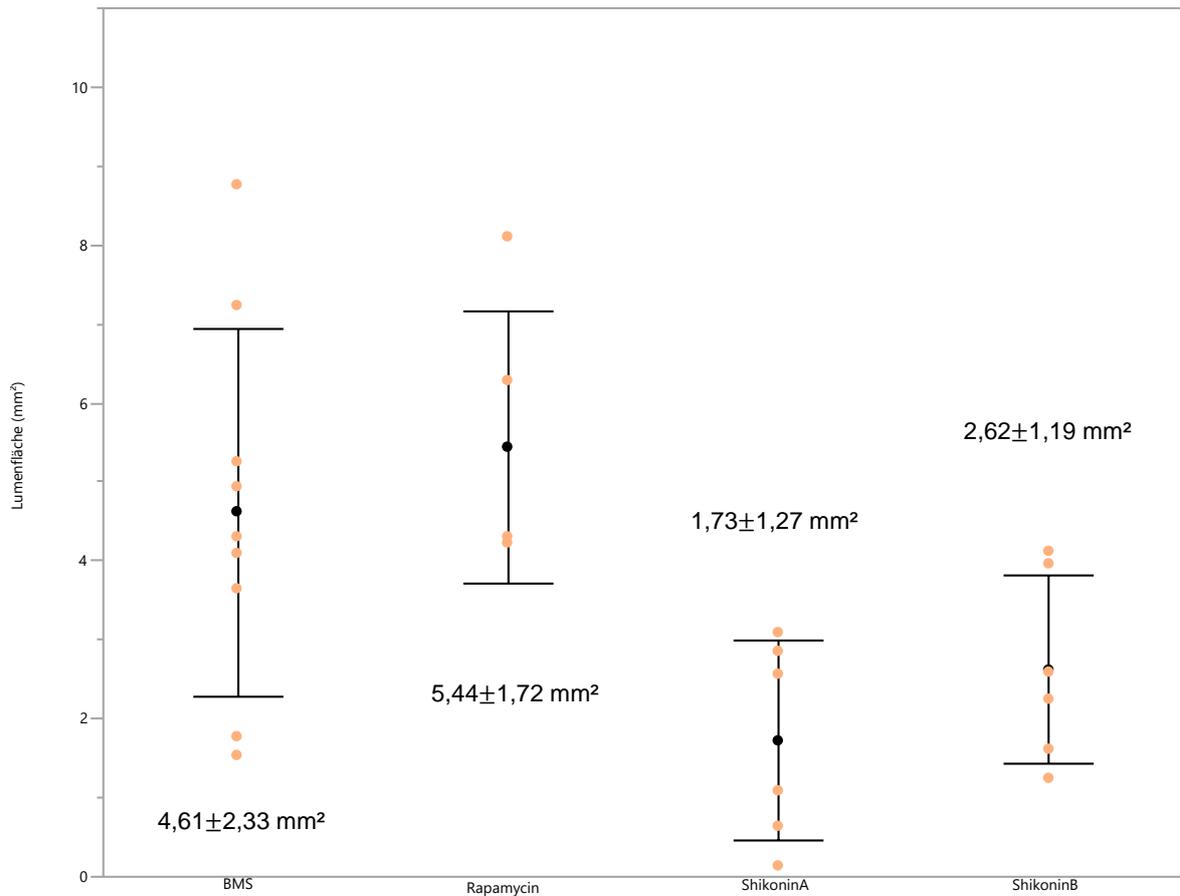


Abbildung 5: Morphometrische Messung der Lumenfläche der Koronargefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

3.2.1.4 Intimafläche

Bezüglich der Neointima ergaben sich mit einer mittleren Fläche von $3,56 \pm 0,87$ mm² in der höher dosierten und $3,99 \pm 2,11$ mm² in der niedrig dosierten Shikonin-Gruppe signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe mit $1,18 \pm 0,67$ mm² ($p=0,0008$ bzw. $p=0,0001$) und der Rapamycin-Gruppe mit $0,76 \pm 0,32$ mm² ($p=0,0006$ bzw. $p=0,0001$). Zwischen den Shikonin-Gruppen untereinander ($p=0,528$) sowie zwischen der Kontroll- und der Rapamycin-Gruppe ($p=0,521$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. (Siehe Abbildung 6)

Ergebnisse

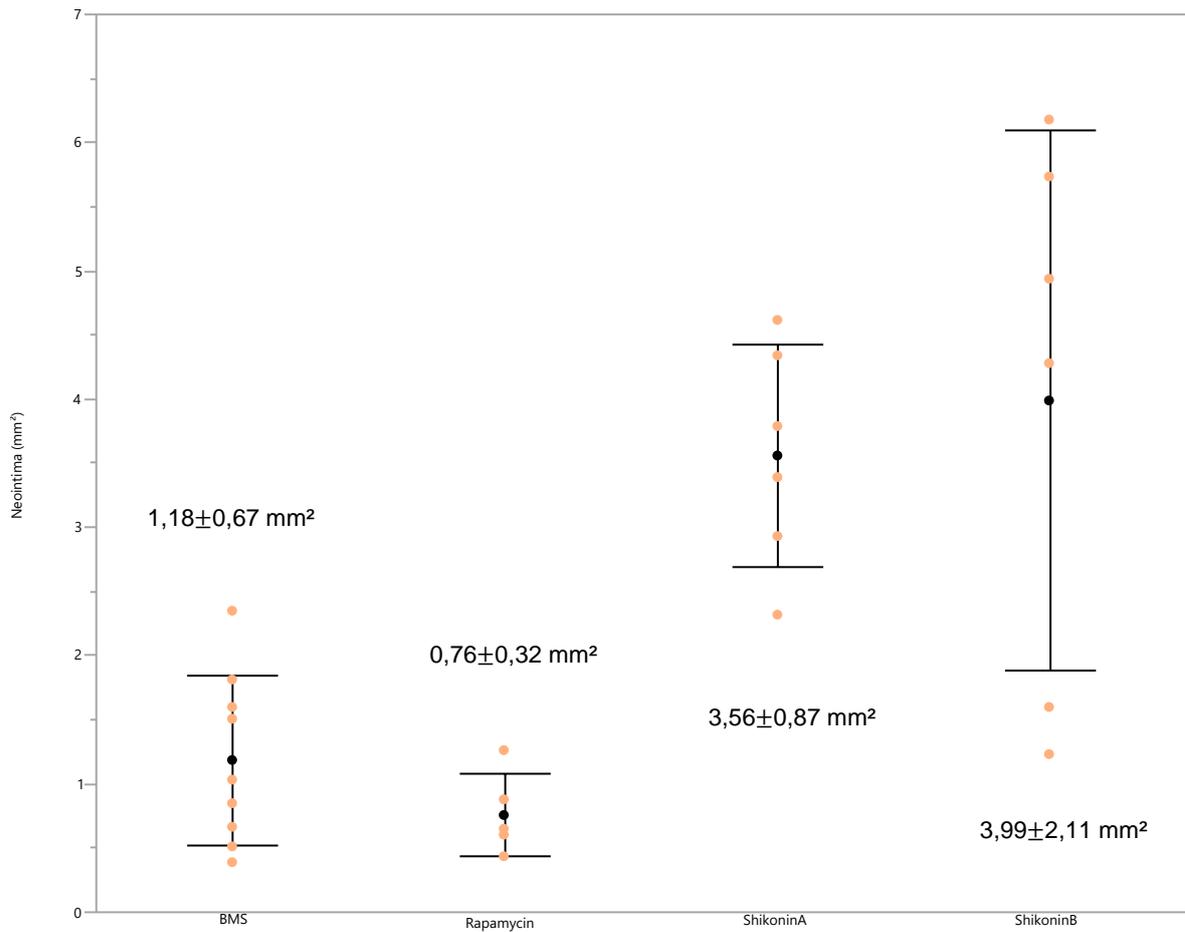


Abbildung 6: Morphometrische Messung der Intimafläche der Koronargefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Die Mediafläche betrug in der Kontrollgruppe $1,07 \pm 0,66 \text{ mm}^2$. Hier zeigte sich weder in der hochdosierten Shikonin-Gruppe mit $1,44 \pm 0,55 \text{ mm}^2$ ($p=0,39$), noch in der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mit $1,27 \pm 0,46 \text{ mm}^2$ ($p=0,64$) ein signifikanter Unterschied. In der Rapamycin-Gruppe ergab sich mit $1,67 \pm 1,48 \text{ mm}^2$ ein etwas höherer Wert für die Mediafläche, jedoch zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied ($p=0,65$ bzw. $p=0,43$). Die Ergebnisse der Messung der Mediafläche sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

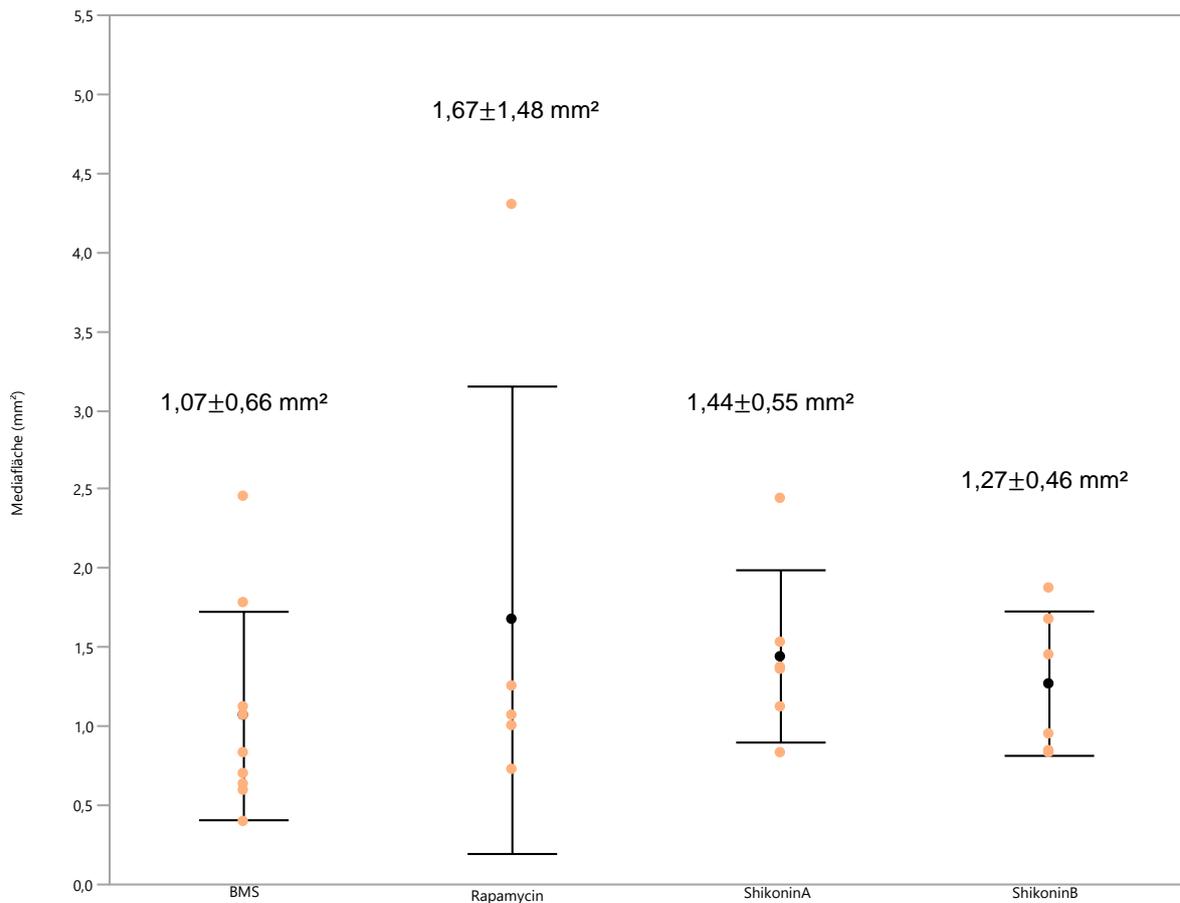


Abbildung 7: Morphometrische Messung der Mediafläche der Koronargefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

3.2.1.5 Stenosegrad

Aus Neointima und Restlumenfläche wurde der Stenosegrad in Prozent vom Ausgangslumen berechnet. Dabei war der Stenosegrad mit $71,00 \pm 16,20\%$ in der hochdosierten Shikonin-Gruppe am größten und zeigte einen signifikanten Unterschied sowohl zu den Stents der Rapamycin-Gruppe mit $12,60 \pm 5,80\%$ ($p < 0,0001$), als auch zu den Kontrollstents mit $23,15 \pm 15,97\%$ ($p < 0,0001$). Auch die niedrigdosierte Shikonin-Gruppe mit $57,72 \pm 25,17\%$ zeigte einen signifikant höheren Stenosegrad ($p = 0,0003$ bzw. $p = 0,0011$). Sowohl zwischen den beiden Shikonin-Gruppen ($p = 0,1995$), als auch zwischen Rapamycin und BMS ($p = 0,2886$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 8).

Ergebnisse

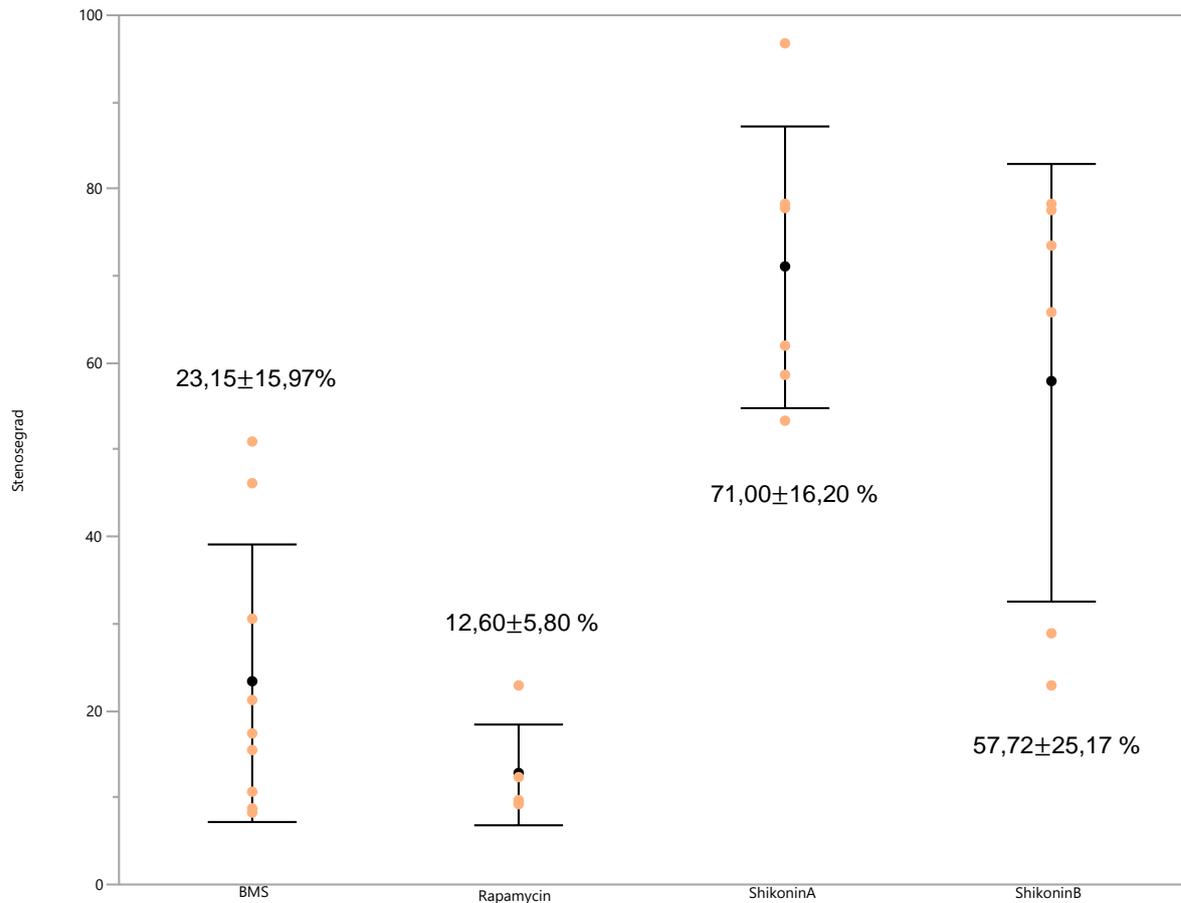


Abbildung 8: Berechneter Stenosegrad der Koronargefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

In Abbildung 9 bis 12 sind exemplarisch Beispielbilder der verschiedenen Gruppen zu sehen. Während bei den beiden Shikoningruppen (Abb. 9 für die hochdosierte und Abb. 10 für die niedrigdosierte Gruppe) eine deutliche Lumeneinengung durch die Neointima zu sehen ist, ist diese beim Kontrollstent (Abb. 11) bereits deutlich schwächer ausgeprägt. Nach Rapamycinbeschichtung (Abb. 12) trat nur eine sehr geringe Neointimabildung ohne relevante Lumeneinengung auf.

Ergebnisse

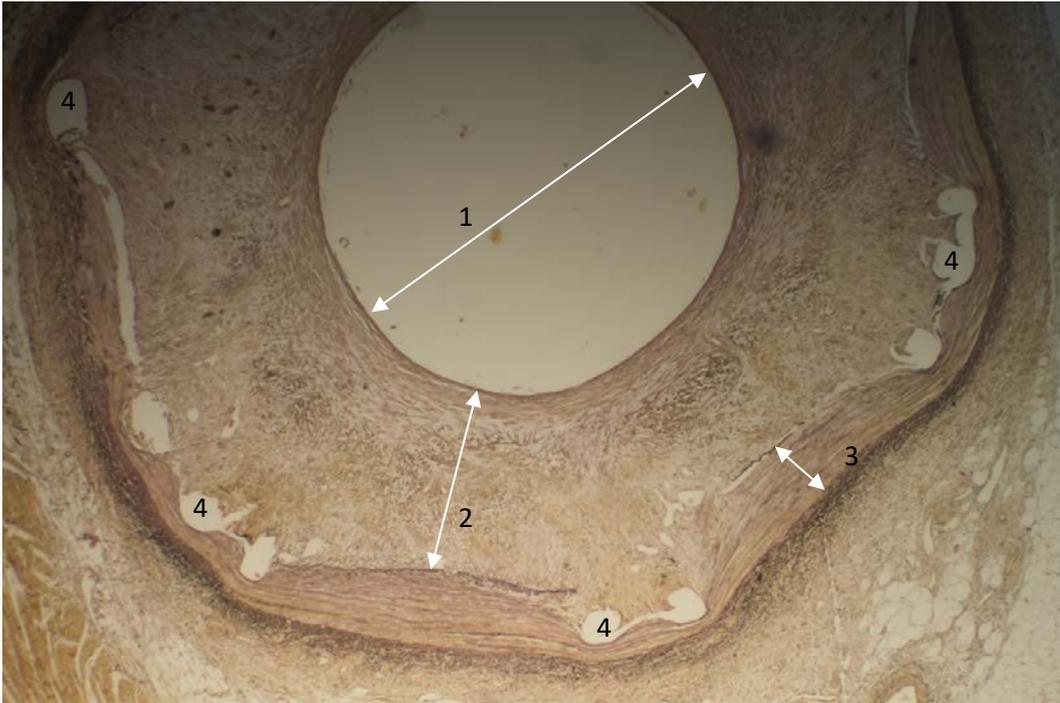


Abbildung 9: LAD Tier Nr. 6, Beschichtung mit 2 x 5 mg/ml Shikonin (ShikoninA); Elastica-van-Gieson-Färbung, 6,25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine ausgeprägte Neointimabildung mit daraus resultierender Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

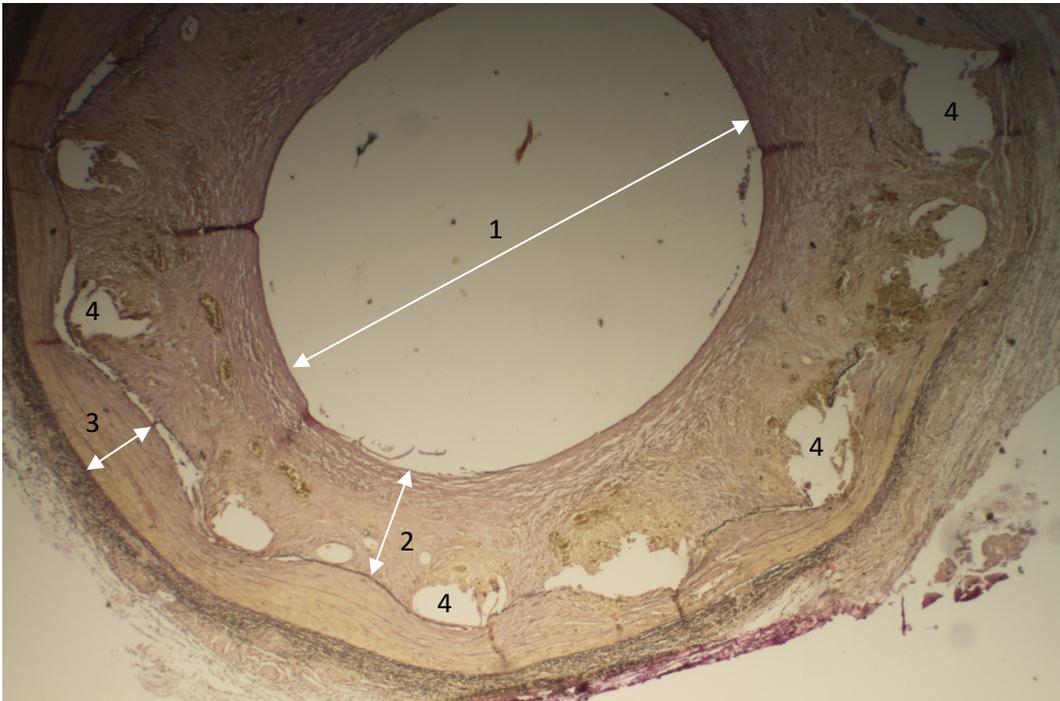


Abbildung 10: LAD Tier Nr. 14, Beschichtung mit 2 x 2,5 mg/ml Shikonin (ShikoninB); Elastica-van-Gieson-Färbung, 6,25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine ausgeprägte Neointimabildung mit daraus resultierender Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

Ergebnisse



Abbildung 11: RCX Tier Nr. 4, BMS; Elastica-van-Gieson-Färbung, 6,25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine mäßige Neointimabildung mit daraus resultierender geringer Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

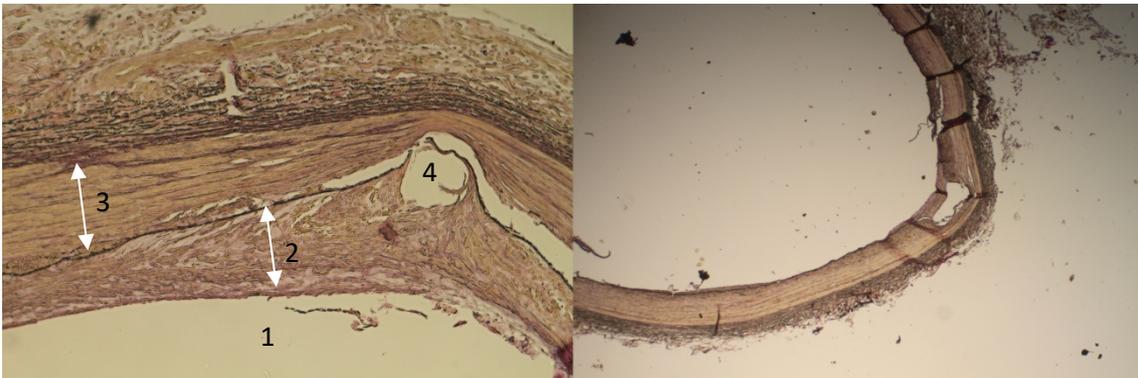


Abbildung 12: LAD Tier Nr. 19, Rapamycin; Elastica-van-Gieson-Färbung, rechts 6,25-fache Vergrößerung, links 25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine sehr geringe Neointimabildung ohne relevante Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

Ergebnisse

3.2.2 Ergebnisse der histopathologischen Auswertung

3.2.2.1 Proliferationsindex in der Intima

Der Proliferationsindex gibt den Anteil der Zellen, die sich in Teilung befinden, an der Gesamtzahl aller Zellen in der Intima an. Ein hoher Proliferationsindex spricht für ein ausgeprägtes Proliferationsgeschehen.

Hierbei zeigte sich der geringste Proliferationsindex für die Kontrollgruppe mit einem Wert von $41 \pm 34\%$. In der Rapamycin-Gruppe ergab sich ein Index von $51 \pm 30\%$, ein signifikanter Unterschied bestand hier nicht ($p=0,56$). In der hochdosierten Shikonin-Gruppe war der Proliferationsindex mit $81 \pm 14\%$ am höchsten und damit auch signifikant größer als bei den Kontrollstents ($p=0,0298$). In der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe war der Proliferationsindex mit $72 \pm 36\%$ ebenfalls größer als bei den BMS, jedoch nicht signifikant ($p=0,0679$). Siehe hierzu Abbildung 13.

Ergebnisse

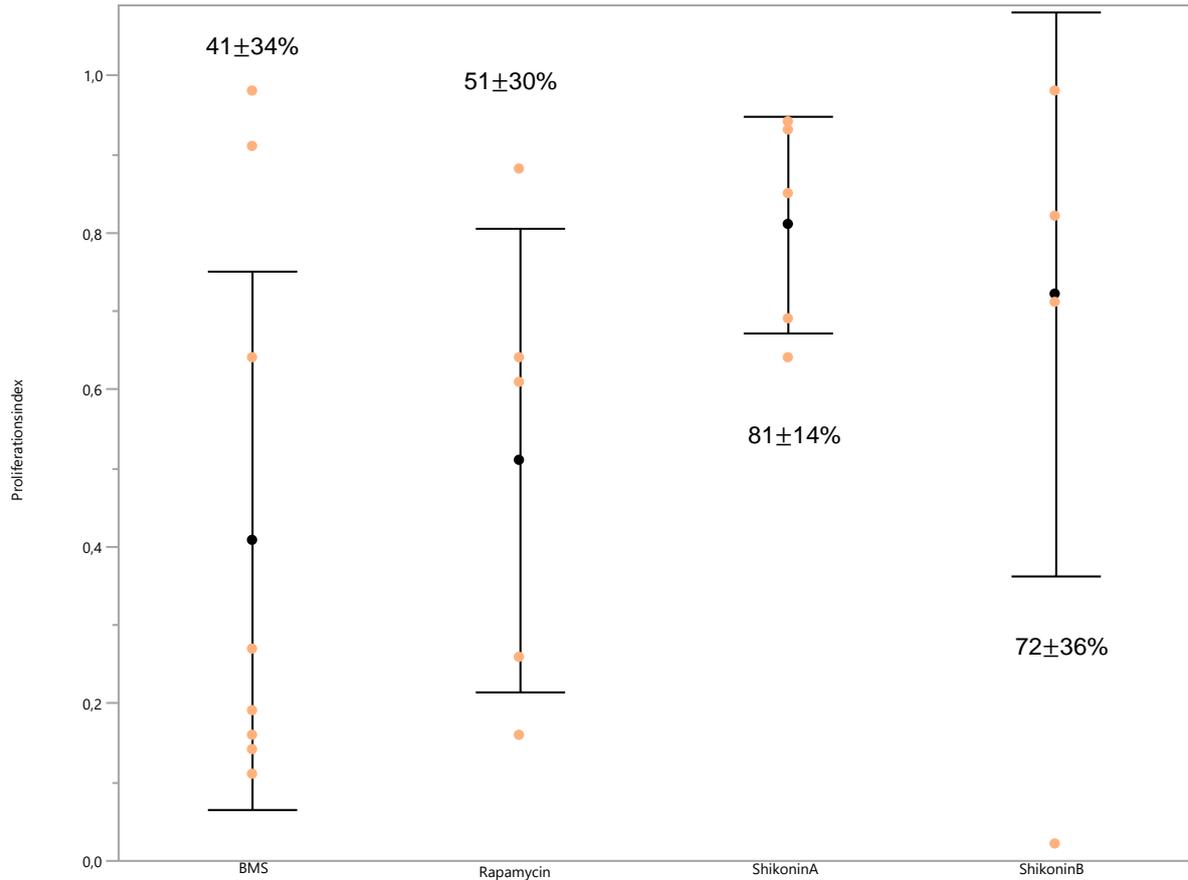


Abbildung 13: Proliferationsindex in der Intima der KoronargefäÙe mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Im immunhistologischen Präparat zeigte sich der unterschiedliche Proliferationsindex in einem verhältnismäßig hohen Anteil PCNA-positiver Zellkerne an der DAPI-positiven Gesamtzellzahl in den Shikoningruppen (Abb. 18 und 19 in der hochdosierten Gruppe, Abb. 20 und 21 in der niedrigdosierten Gruppe). Sowohl in der Kontrollgruppe (Abb. 14 und 15), als auch in der Rapamycingruppe (Abb. 16 und 17) zeigt sich ein deutlich geringerer PCNA-Anteil. Auffällig ist auch eine sehr hohe Zelldichte im Bereich der Stentstreben bei den Shikoningruppen.

Ergebnisse

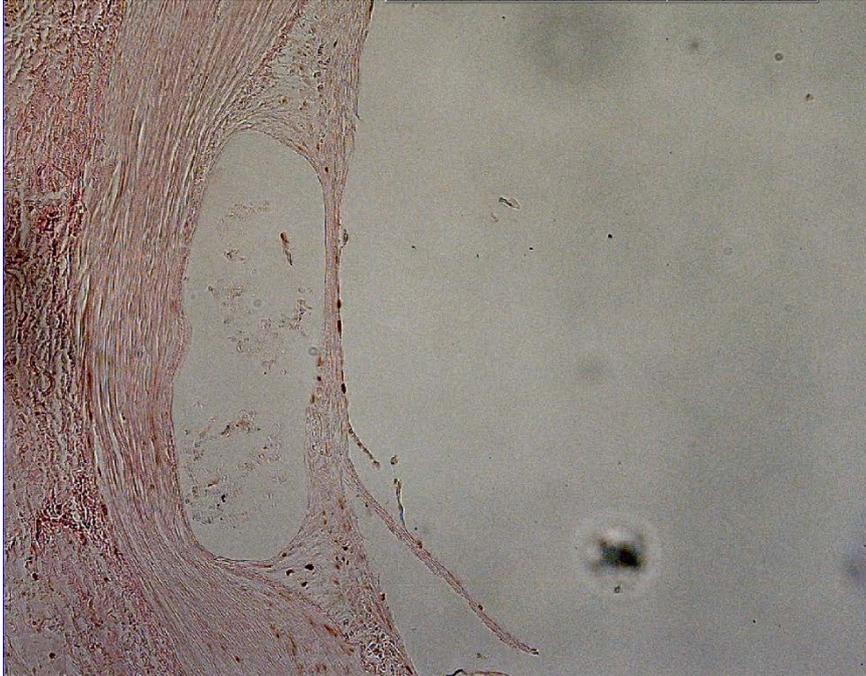


Abbildung 14: RCX Tier Nr. 8, BMS; Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen hier braun. Es sind nur wenige Zellen zu sehen, die sich in Proliferation befinden. Der Proliferationsindex beträgt hier 27%.

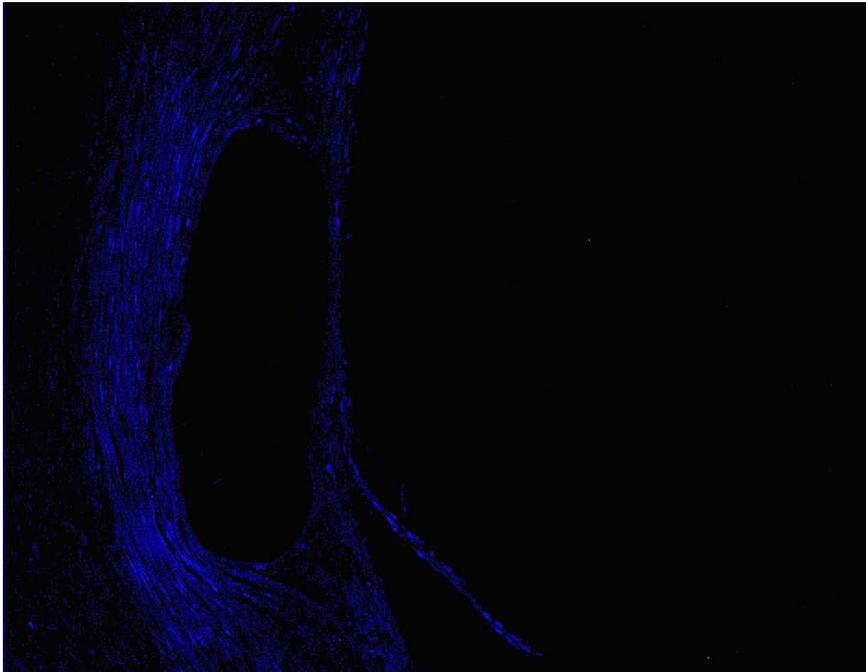


Abbildung 15: RCX Tier Nr. 8, BMS, Ausschnitt wie in Abbildung 13; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI). Die Zellkerne erscheinen hier blau.

Ergebnisse

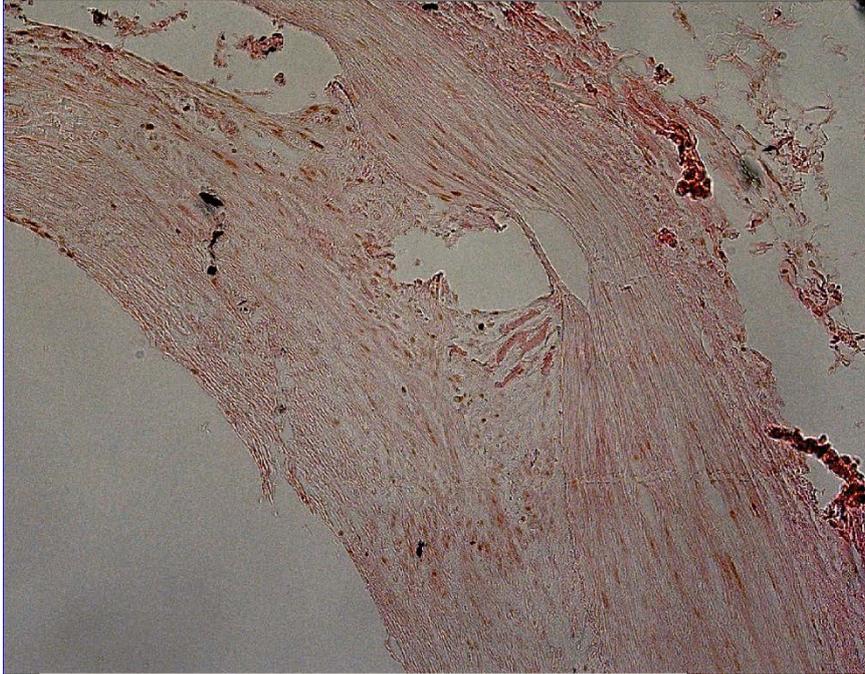


Abbildung 16: LAD Tier Nr. 10, Beschichtung mit Rapamycin; Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen hier braun. Der Proliferationsindex beträgt hier 61%.

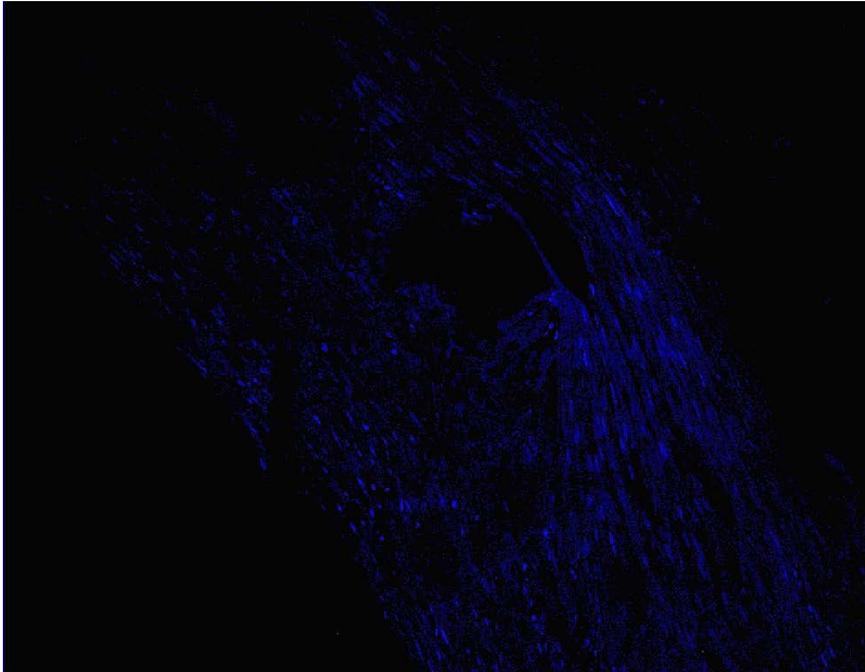


Abbildung 17: LAD Tier Nr. 10, Beschichtung mit Rapamycin, Ausschnitt wie in Abbildung 15; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI). Die Zellkerne erscheinen hier blau.

Ergebnisse

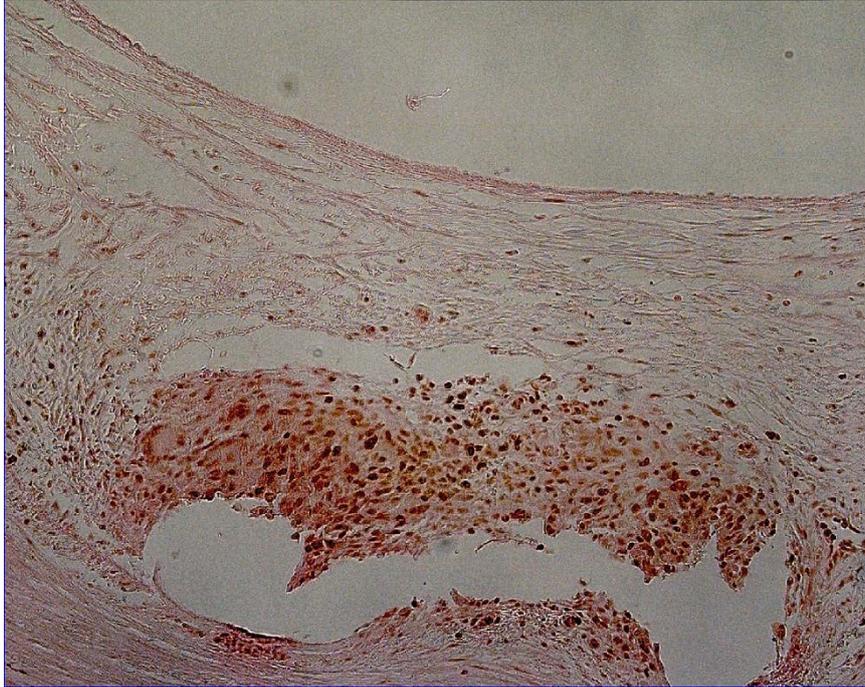


Abbildung 18: LAD Tier Nr. 9, Beschichtung mit Shikonin (hohe Dosis, 2 x 5 mg/ml); Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen hier braun. Besonders im Bereich der Stentstrebe zeigt sich eine sehr hohe Dichte proliferierender Zellen.

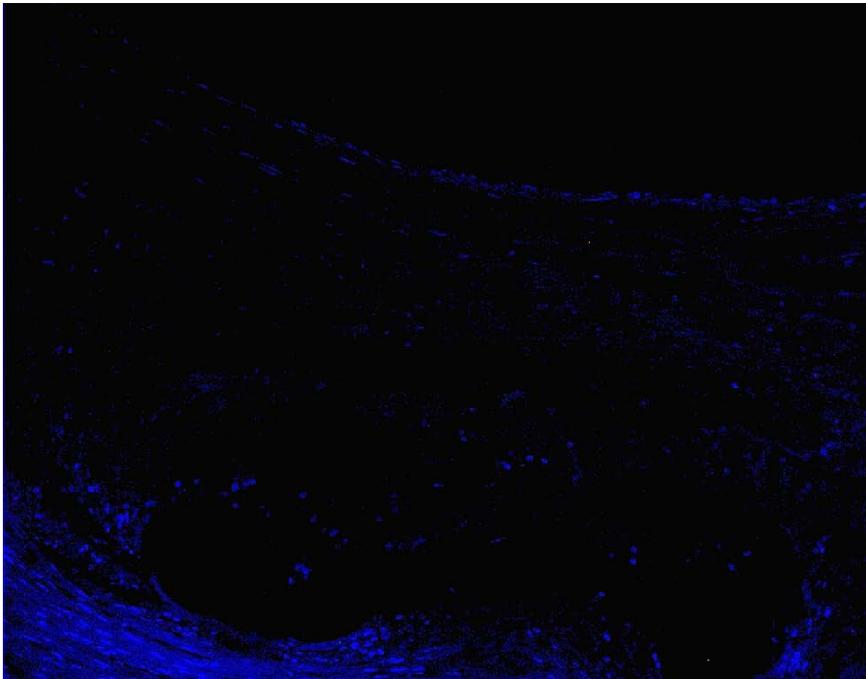


Abbildung 19: LAD Tier Nr. 9, Beschichtung mit Shikonin (hohe Dosis, 2 x 5 mg/ml), Ausschnitt wie in Abbildung 17; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI).

Ergebnisse

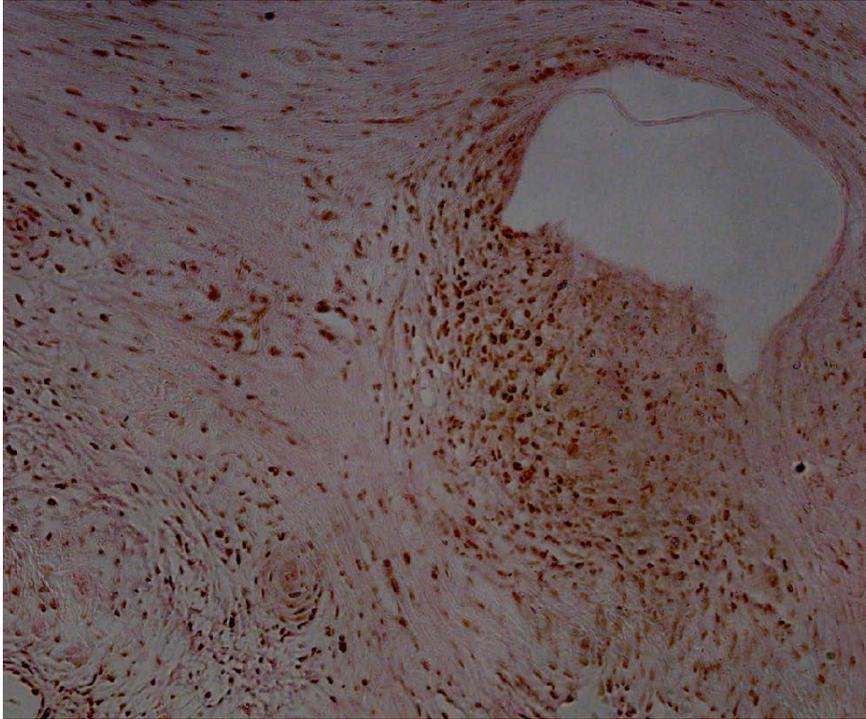


Abbildung 20: RCX Tier Nr. 17, Beschichtung mit Shikonin (niedrige Dosis, 2 x 2,5 mg/ml); Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen hier braun. Besonders im Bereich der Stentstrebe zeigt sich eine sehr hohe Dichte proliferierender Zellen.

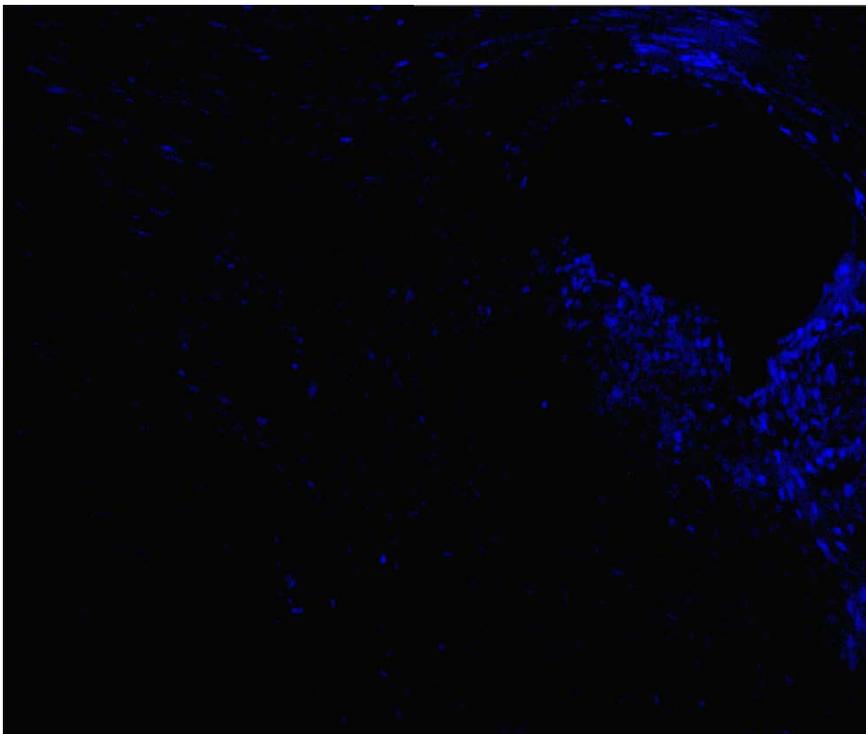


Abbildung 21: RCX Tier Nr. 17, Beschichtung mit Shikonin (niedrige Dosis, 2 x 2,5 mg/ml), Ausschnitt wie in Abbildung 19; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI).

Ergebnisse

3.2.2.2 Reendothelialisierung

Bezüglich der Reendothelialisierung erfolgte wie oben bereits beschrieben eine semiquantitative Bewertung zur groben Einschätzung. Hier zeigten sich in der Gruppe der BMS und in der hochdosierten Shikonin-Gruppe mengenmäßig die meisten Gefäße mit vollständiger Reendothelialisierung, während in der Rapamycin- und der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mehr unvollständige Reendothelialisierung zu sehen war. Reendothelialisierungen von weniger als der Hälfte der Gefäßwand traten nur in diesen Gefäßen auf (Abbildung 22).

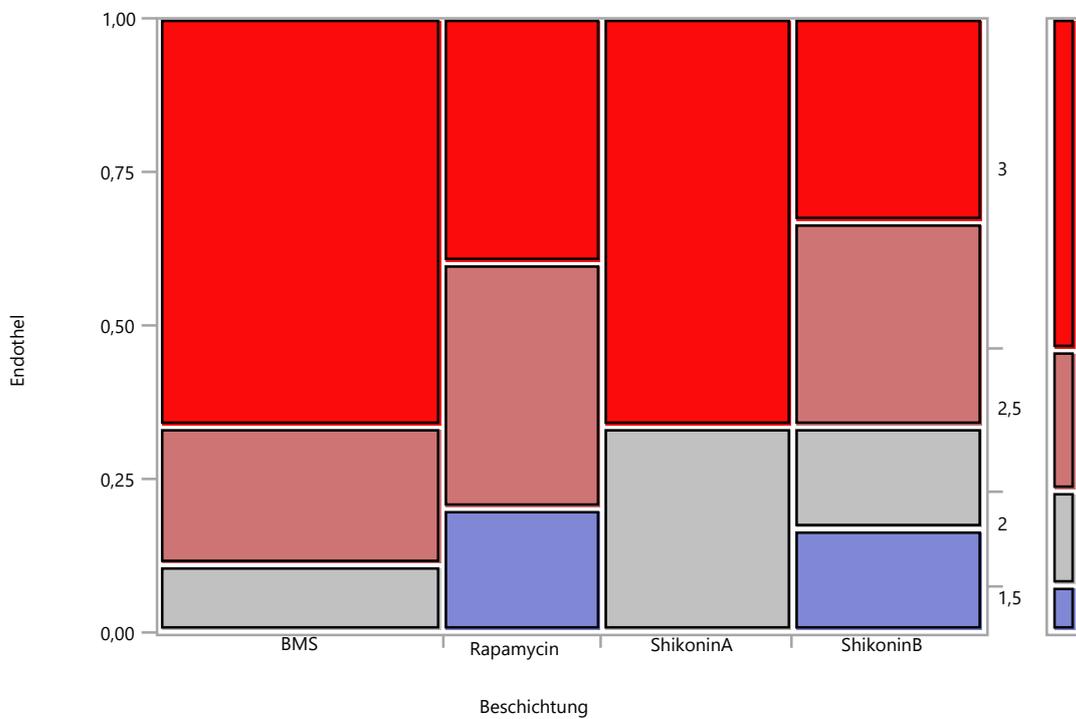


Abbildung 22: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung der Koronargefäße. 0 = 0-25% der Oberfläche, 1 = 25,1-50%, 2 = 50,1-75%, 3 = 75,1-100%. Bei grenzwertigen Ergebnissen wurden Zwischenwerte gebildet.

Ergebnisse

3.3 Ergebnisse der Iliakalgefäße

3.3.1 Ergebnisse der quantitativen Angiographie

3.3.1.1 Referenzdiameter vor dem Eingriff

Um einen möglichen Fehler aufgrund unterschiedlicher Ausgangsdurchmesser der Gefäße zu vermeiden, wurde vor der Stentimplantation der Referenzdiameter angiographisch bestimmt. Weiterhin diente diese Angiographie dazu, einen geeigneten Ort für die Implantation zu finden.

Erwartungsgemäß zeigte der Referenzdiameter keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23).

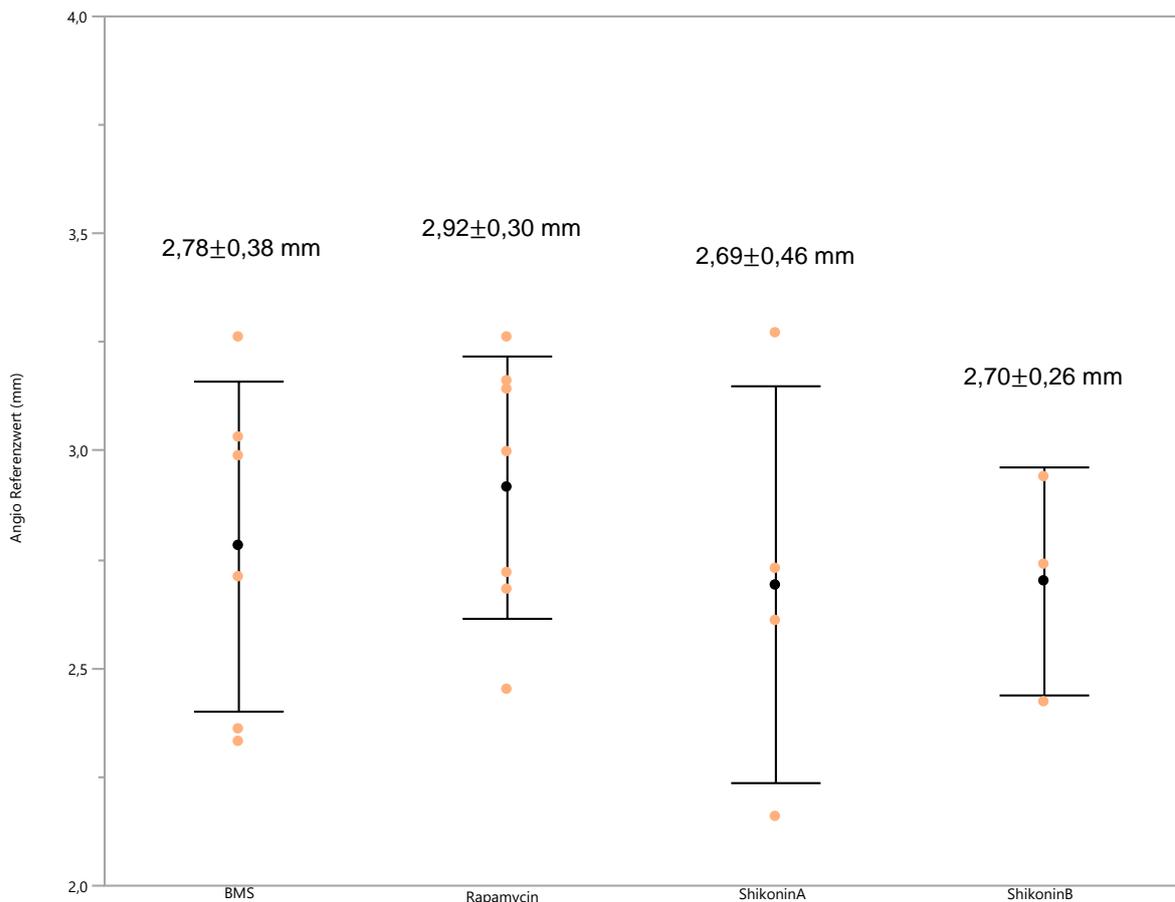


Abbildung 23: Angiographischer Referenzdiameter der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung vor Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.1.2 Maximaler Durchmesser nach Stentimplantation

Um einen gewissen Gefäßschaden und damit eine Gefäßreaktion zu erzielen, wurden die Gefäße bei Stentimplantation um den Faktor 0,2 überdehnt. Anschließend wurde erneut angiographisch der Durchmesser gemessen, welcher dann größer war als vor Implantation. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 24).

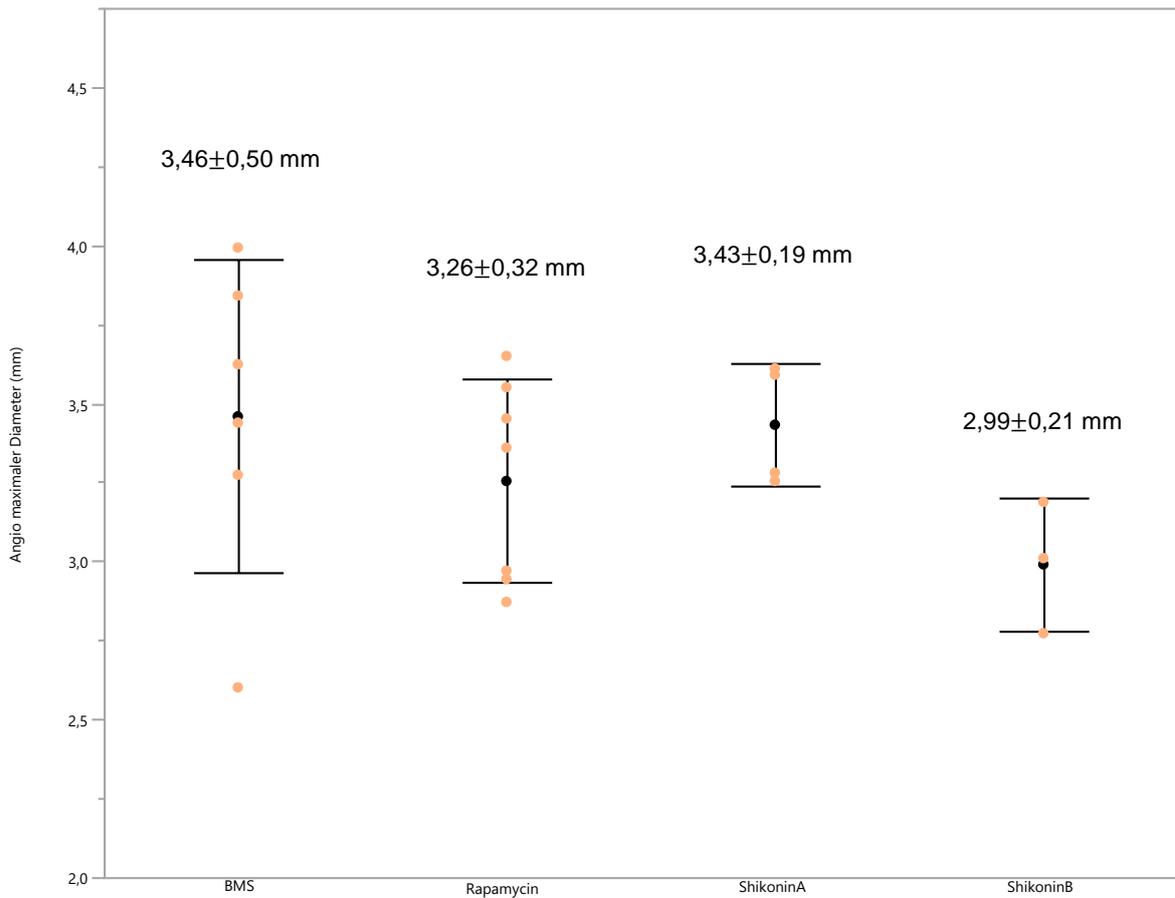


Abbildung 24: Angiographischer Durchmesser der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung im Anschluss an die Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.1.3 Minimaler Diameter im untersuchten Segment

Die angiographische Auswertung der Iliakalgefäße 4 Wochen nach Behandlung erbrachte korrelierende Ergebnisse zur morphometrischen Auswertung. Mit $2,54 \pm 0,28$ mm an der engsten Stelle des untersuchten Abschnittes zeigte sich der größte Restdurchmesser bei den Gefäßen, die mit Rapamycin beschichteten Stents behandelt wurden. Die Kontrollgruppe erbrachte mit $2,43 \pm 0,44$ mm eine ähnlich gering ausfallende Restenose ($p=0,6287$). Sowohl die mit hochdosiertem Shikonin beschichteten Stents mit $1,17 \pm 0,63$ mm Restdurchmesser ($p < 0,0001$ bzw. $p=0,0002$), als auch die mit niedrigdosiertem Shikonin beschichteten Stents mit $1,67 \pm 0,25$ mm ($p=0,0076$ bzw. $p=0,0197$) erbrachten signifikant schlechtere Ergebnisse (Abbildung 25).

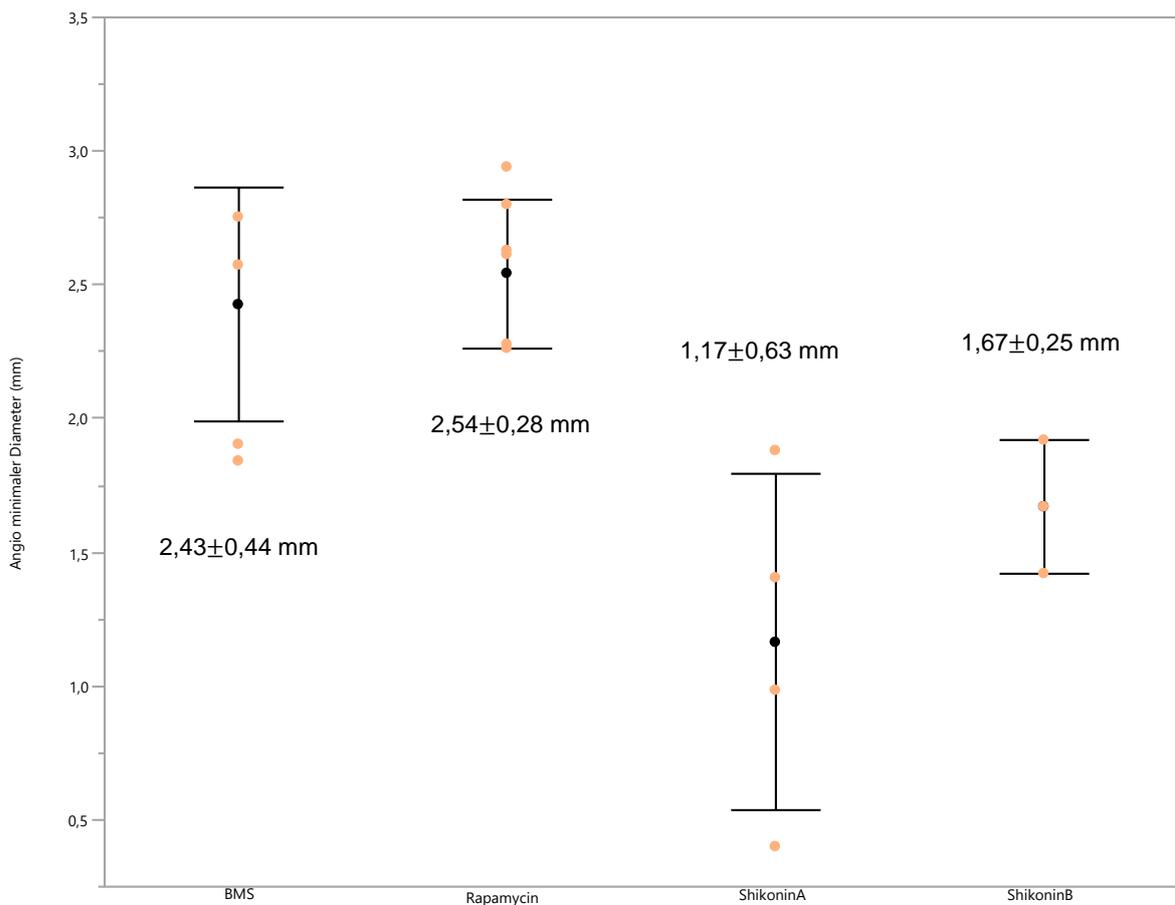


Abbildung 25: Angiographischer minimaler Diameter der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.1.4 Reduktion des Diameters im untersuchten Segment

Um die angiographischen Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurden sie mit den vor Therapie erhobenen Daten verglichen. Die Diameter vor Behandlung zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die prozentuale Reduktion des Diameters nach Therapie war für die mit hochdosiertem Shikonin beschichteten Stents mit $56,5 \pm 22,7$ % am höchsten. In der Gruppe mit niedrigdosierter Shikonin-Beschichtung fiel das Ergebnis mit $37,3 \pm 14,4$ % deutlich, jedoch nicht signifikant, geringer aus. In beiden Gruppen war die Reduktion des Diameters jedoch signifikant größer als in der Kontrollgruppe mit $13,2 \pm 6,7$ % ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0115$) und der Rapamycin-Gruppe mit $12,9 \pm 4,3$ % ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0092$, siehe Abbildung 26).

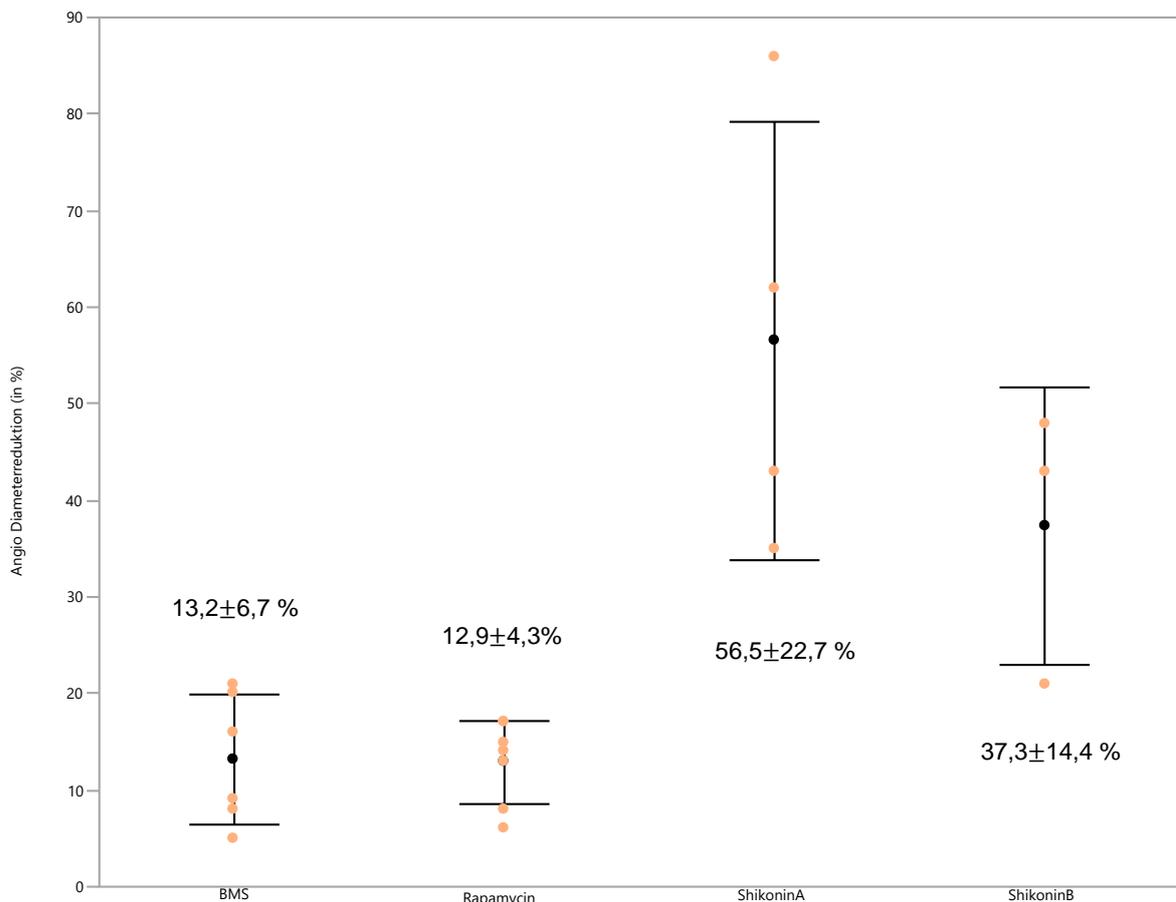


Abbildung 26: Angiographische Diameterreduktion der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.1.5 Prozentuale Reduktion des durchflossenen Querschnitts

Der durchflossene Querschnitt als wichtigstes Kriterium für die Durchflussmenge wurde 4 Wochen nach Therapie ins Verhältnis zum Querschnitt vor Therapie gesetzt. Daraus wurde die prozentuale Reduktion des durchflossenen Querschnitts berechnet. Diese war bei den Iliakalgefäßen korrelierend zum minimalen Diameter in der hochdosierten Shikonin-Gruppe mit $77,3\pm 18,1\%$ sowie der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mit $59,3\pm 19,5\%$ signifikant größer als in der Kontrollgruppe mit $24,0\pm 11,2\%$ ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0015$) und der Rapamycin-Gruppe mit $23,9\pm 7,6\%$ ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0012$, siehe Abbildung 27). Exemplarisch sind in Abbildung 28 und 29 angiographische Bilder 4 Wochen nach Stentimplantation gezeigt. Das reduzierte durchflossene Lumen ist darauf deutlich erkennbar.

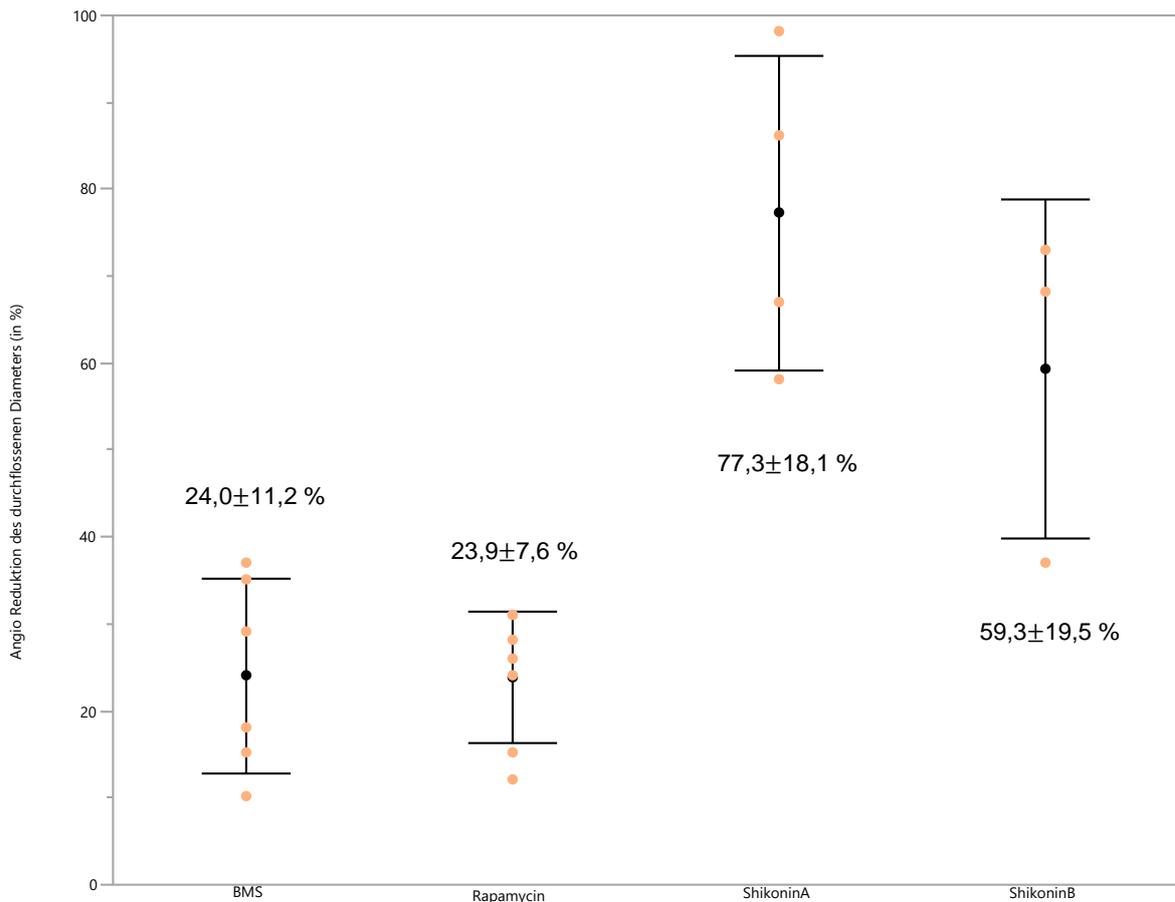


Abbildung 27: Angiographische prozentuale Diameterreduktion der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

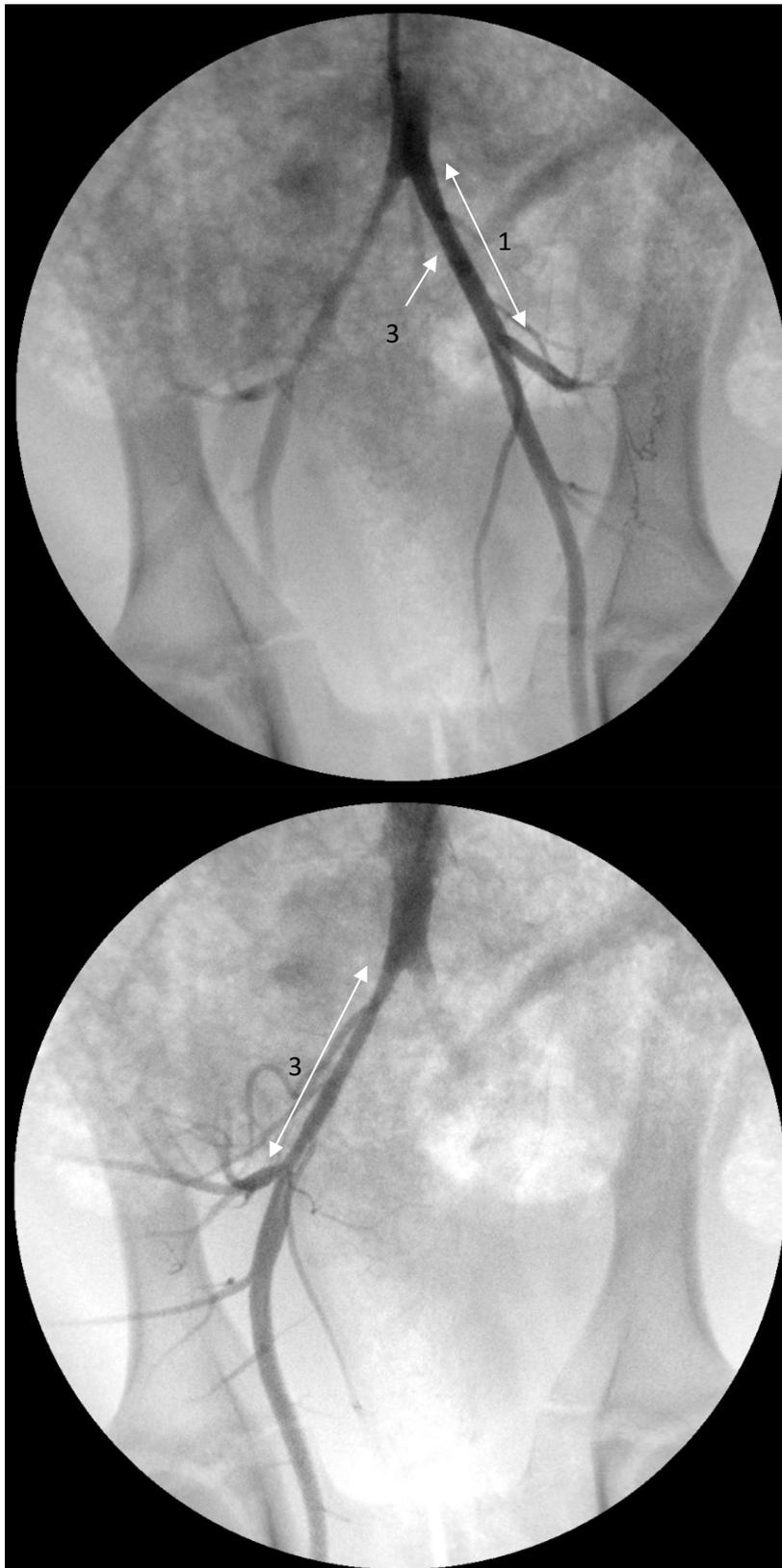


Abbildung 28: Angiographische Darstellung 4 Wochen nach Stentimplantation. Zu sehen sind die beiden Iliakalarterien desselben Tieres. oben: Linke Iliakalarterie, BMS, 1 = Bereich mit einliegendem Stent, es ist lediglich in der Mitte (2) eine leichte Lumeneinengung zu sehen. unten: Rechte Iliakalarterie, Shikonin 2 x 5 mg/ml (hochdosierte Gruppe), 3 = Bereich mit einliegendem Stent, es ist eine deutliche Lumeneinengung über den gesamten Stentbereich zu sehen.

Ergebnisse



Abbildung 29: Angiographische Darstellung der beiden Iliakalarterien 4 Wochen nach Stentimplantation. 1 = Einliegender Shikoninstent (niedrigdosierte Gruppe) mit ausgeprägter, langstreckiger Lumeneinengung; 2 = Einliegender Kontrollstent (BMS) ohne erkennbare Lumeneinengung

3.3.2 Morphometrische Ergebnisse

3.3.2.1 Minimaler Durchmesser im untersuchten Segment

Bei der iliakalen Auswertung zeigten sich ähnliche Verteilungen des minimalen Durchmessers wie bei den Koronargefäßen. Der geringste Durchmesser wurde mit $1,36 \pm 0,80$ mm bei den Stents mit der hochdosierten Shikoninbeschichtung gemessen. Dies ist ein signifikant niedrigeres Ergebnis, als das der Rapamycinbeschichteten Stents mit $2,71 \pm 0,60$ mm ($p=0,001$). Die unbeschichteten Kontrollstents mit $2,28 \pm 0,53$ mm, sowie die die Stents mit der niedrigdosierten Shikonin-Dosis mit $2,26 \pm 0,84$ mm befinden sich in der Mitte. Für diese Stents zeigte sich keine Signifikanz verglichen mit den Rapamycinstents ($p=0,243$ bzw. $p=0,307$). Siehe Abbildung 30.

Ergebnisse

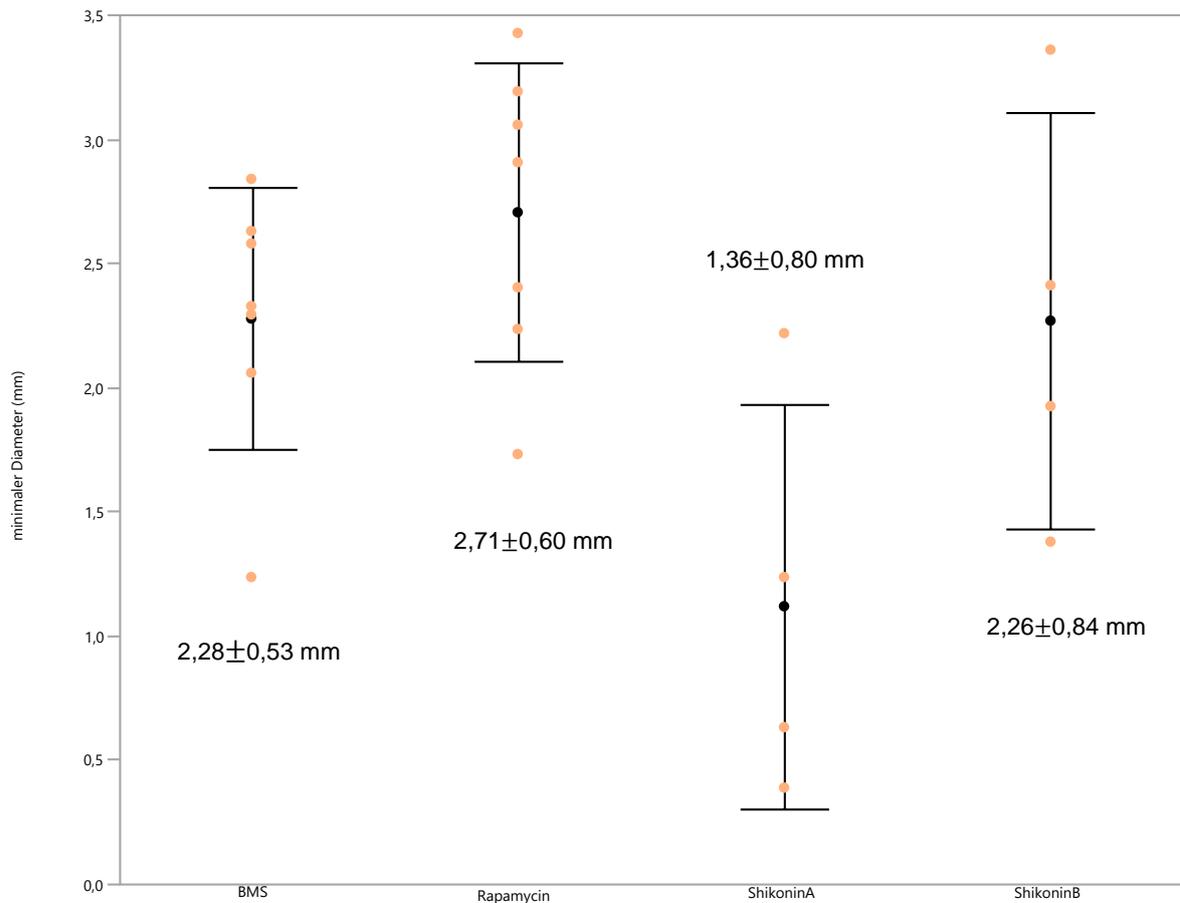


Abbildung 30: Minimaler Durchmesser der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

3.3.2.2 Mittlerer Durchmesser im untersuchten Segment

Wie schon bei den Koronargefäßen ergaben sich für den mittleren Durchmesser auch iliakal die kleinsten Werte für die hochdosierte Shikonin-Gruppe mit $1,29 \pm 0,92$ mm. Dieses Ergebnis war signifikant niedriger als das der Kontrollgruppe mit $2,99 \pm 0,41$ mm ($p=0,0002$), das der Rapamycin-Gruppe mit $3,13 \pm 0,36$ mm ($<0,0001$) und auch das der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mit $2,50 \pm 0,79$ mm ($p=0,009$). Siehe Abbildung 31.

Ergebnisse

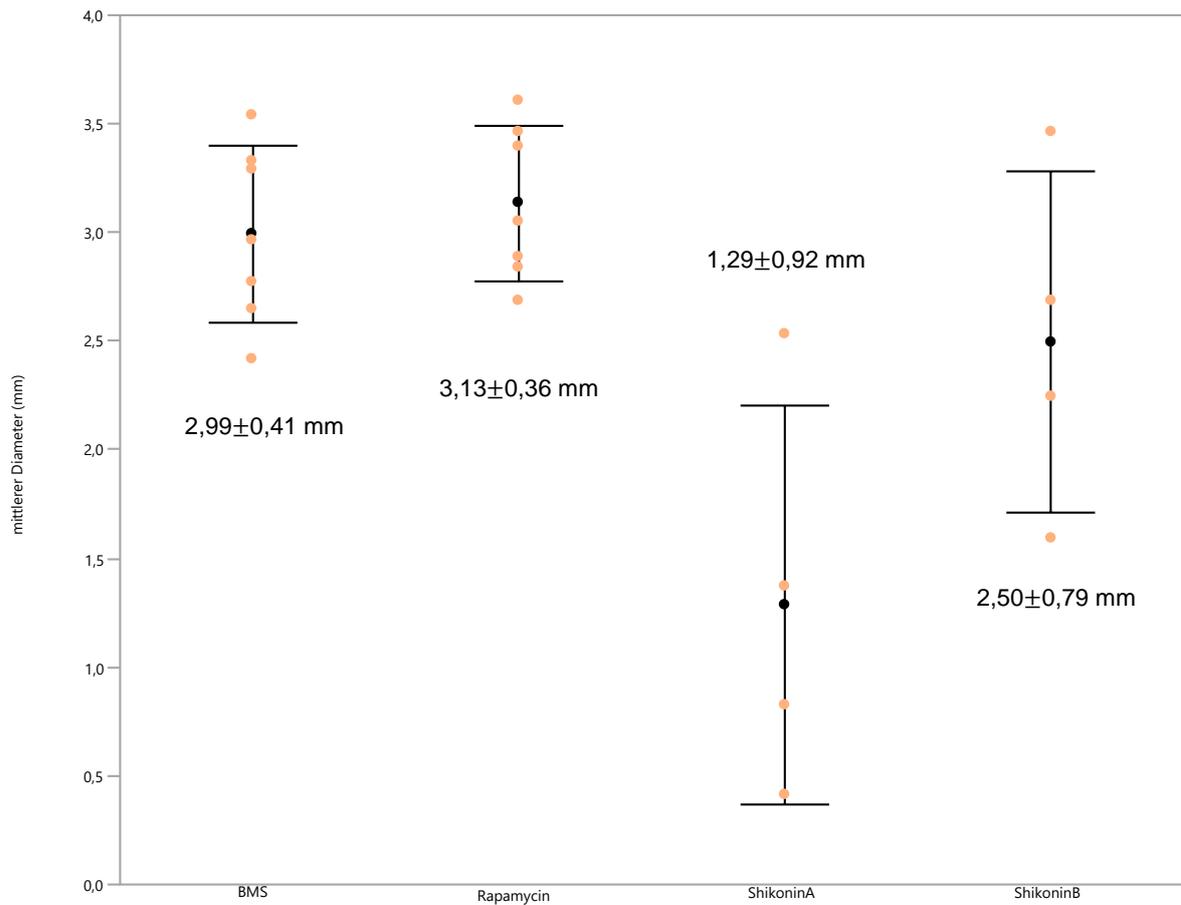


Abbildung 31: Mittlerer Diameter der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.2.3 Lumenfläche

Auch die Restlumenfläche der Iliakalgefäße zeigte mit $1,82 \pm 2,25 \text{ mm}^2$ in der hochdosierten Shikonin-Gruppe signifikant niedrigere Ergebnisse als in der Kontrollgruppe mit $6,32 \pm 2,82 \text{ mm}^2$ ($p=0,011$) und der Rapamycin-Gruppe mit $7,77 \pm 1,97 \text{ mm}^2$ ($p=0,002$). Die Stents mit der niedrigdosierten Shikonin-Beschichtung ergaben mit $5,24 \pm 3,18 \text{ mm}^2$ ebenfalls niedrigere Restlumina als die Rapamycin- und die Kontrollstents, jedoch war das Ergebnis nicht signifikant ($p=0,129$ bzw. $p=0,504$). Siehe Abbildung 32.

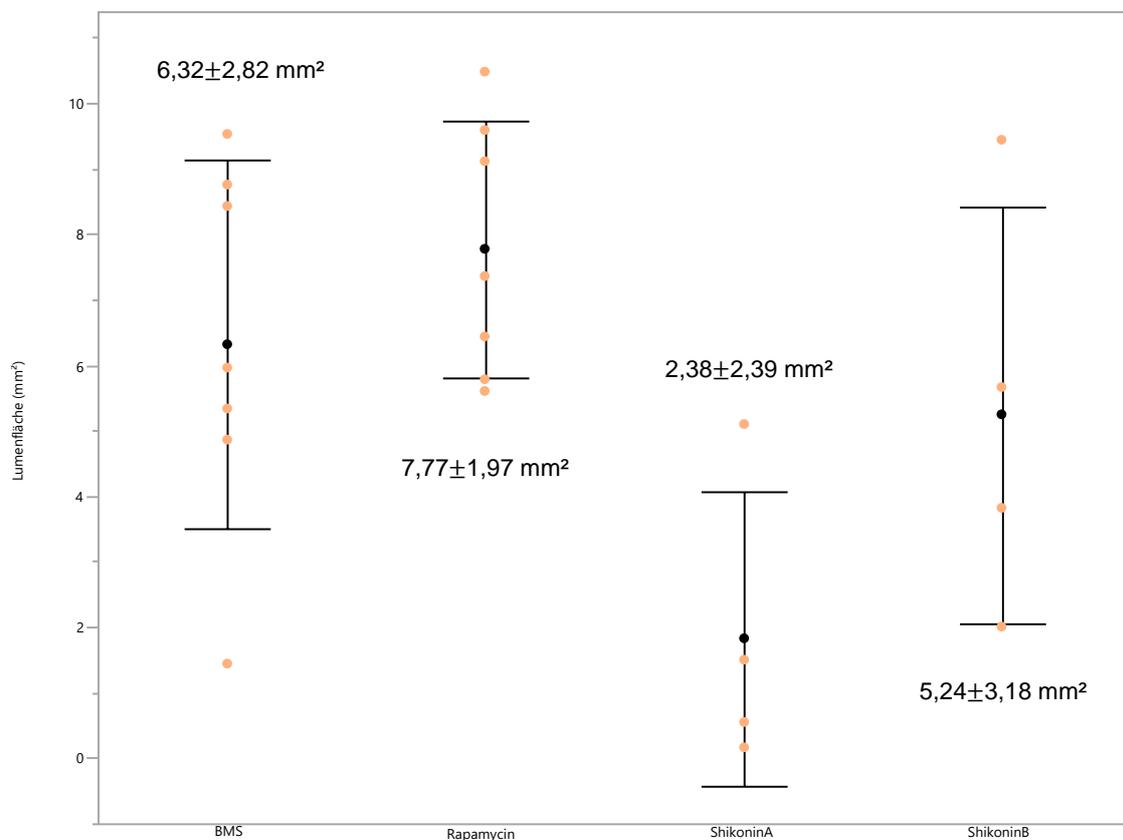


Abbildung 32: Lumenfläche der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.2.4 Intimafläche

Bezüglich der neugebildeten Intimafläche ergaben sich iliakal sehr ähnliche Ergebnisse wie koronar. Die Neointimabildung war in der hochdosierten Shikonin-Gruppe mit $5,71 \pm 2,34 \text{ mm}^2$ am ausgeprägtesten. In der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe ergab sich eine durchschnittliche Fläche von $4,22 \pm 3,58 \text{ mm}^2$. Damit war die Fläche der Neointima in beiden Shikonin-Gruppen signifikant größer als in der Kontrollgruppe mit $0,73 \pm 0,38 \text{ mm}^2$ ($p=0,0003$ bzw. $p=0,006$) und der Rapamycin-Gruppe mit $0,63 \pm 0,34 \text{ mm}^2$ ($p=0,0002$ bzw. $p=0,005$, siehe Abbildung 33).

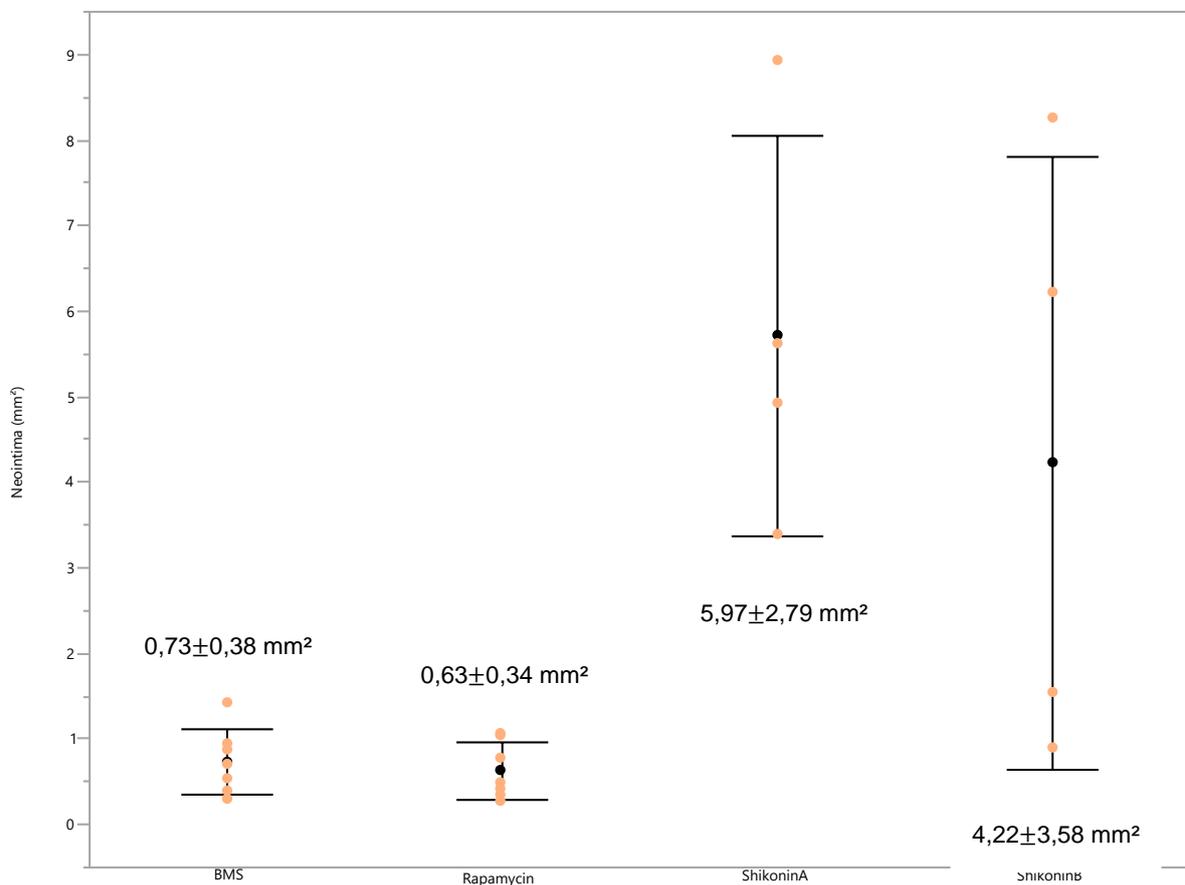


Abbildung 33: Intimafläche der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.2.5 Mediafläche

Die Mediafläche der Iliakalgefäße ergab für die hochdosierten Shikonin-Stents mit $2,03 \pm 0,81 \text{ mm}^2$ die höchsten Werte. Diese waren signifikant höher als bei den Rapamycin-Stents mit $1,03 \pm 0,31 \text{ mm}^2$ ($p=0,005$), den Kontrollstents mit $1,28 \pm 0,41 \text{ mm}^2$ ($p=0,026$) und auch signifikant höher als in der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mit $1,28 \pm 0,53 \text{ mm}^2$ ($p=0,046$). Siehe Abbildung 34.

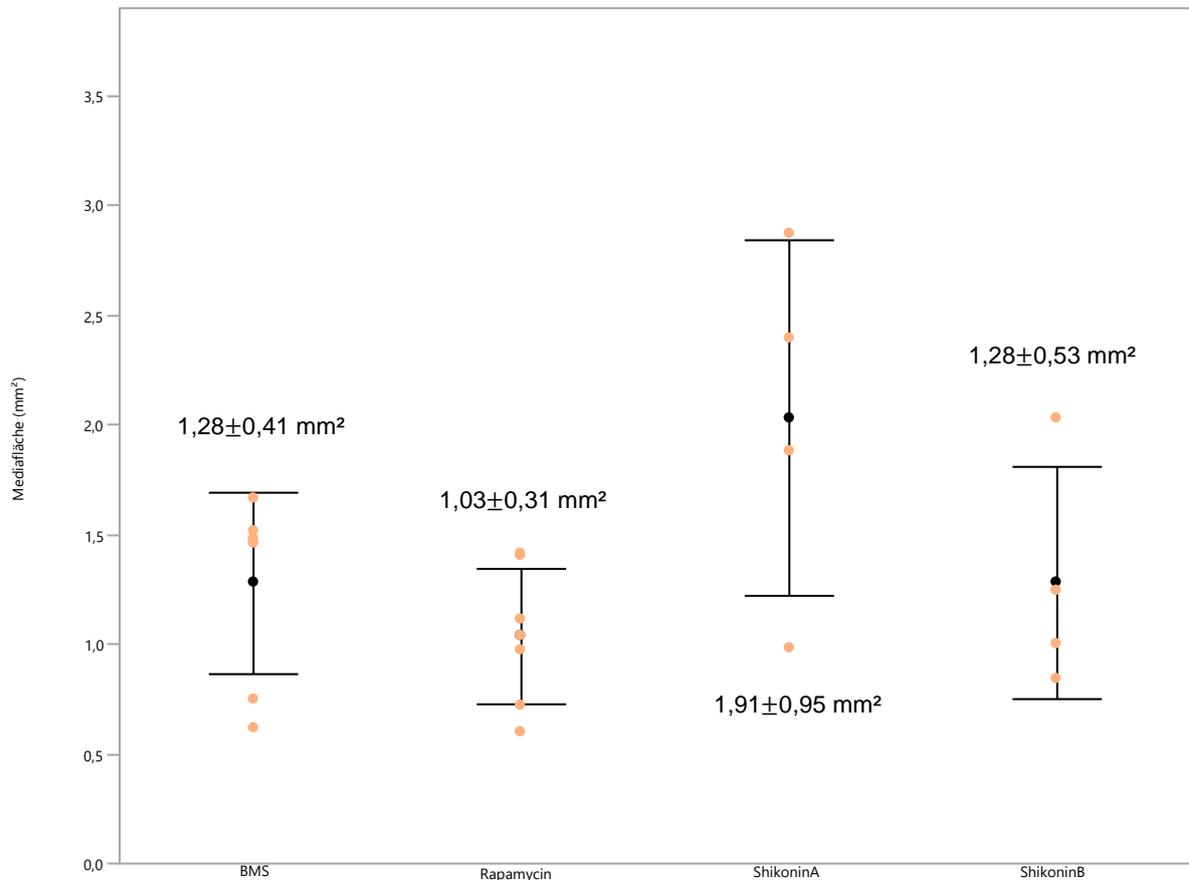


Abbildung 34: Morphometrische Messung der Mediafläche der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

Ergebnisse

3.3.2.6 Stenosegrad

Ähnlich wie bei den Koronargefäßen zeigt sich auch iliakal der Stenosegrad korrelierend zu den Ergebnissen der Intimafläche und des Restlumens in der hochdosierten Shikonin-Gruppe mit $80,27 \pm 16,23\%$ am größten. Damit war der Stenosegrad signifikant größer als sowohl in der Rapamycin-Gruppe mit $7,95 \pm 5,06\%$ ($p < 0,0001$), der Kontrollgruppe mit $12,72 \pm 9,75\%$ ($p < 0,0001$), als auch der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe mit $42,87 \pm 33,73\%$ ($p = 0,0050$). Diese wiederum zeigte einen signifikant größeren Stenosegrad als die Rapamycin- ($p = 0,0034$) und die Kontrollgruppe ($p = 0,0094$). Siehe hierzu auch Abbildung 35.

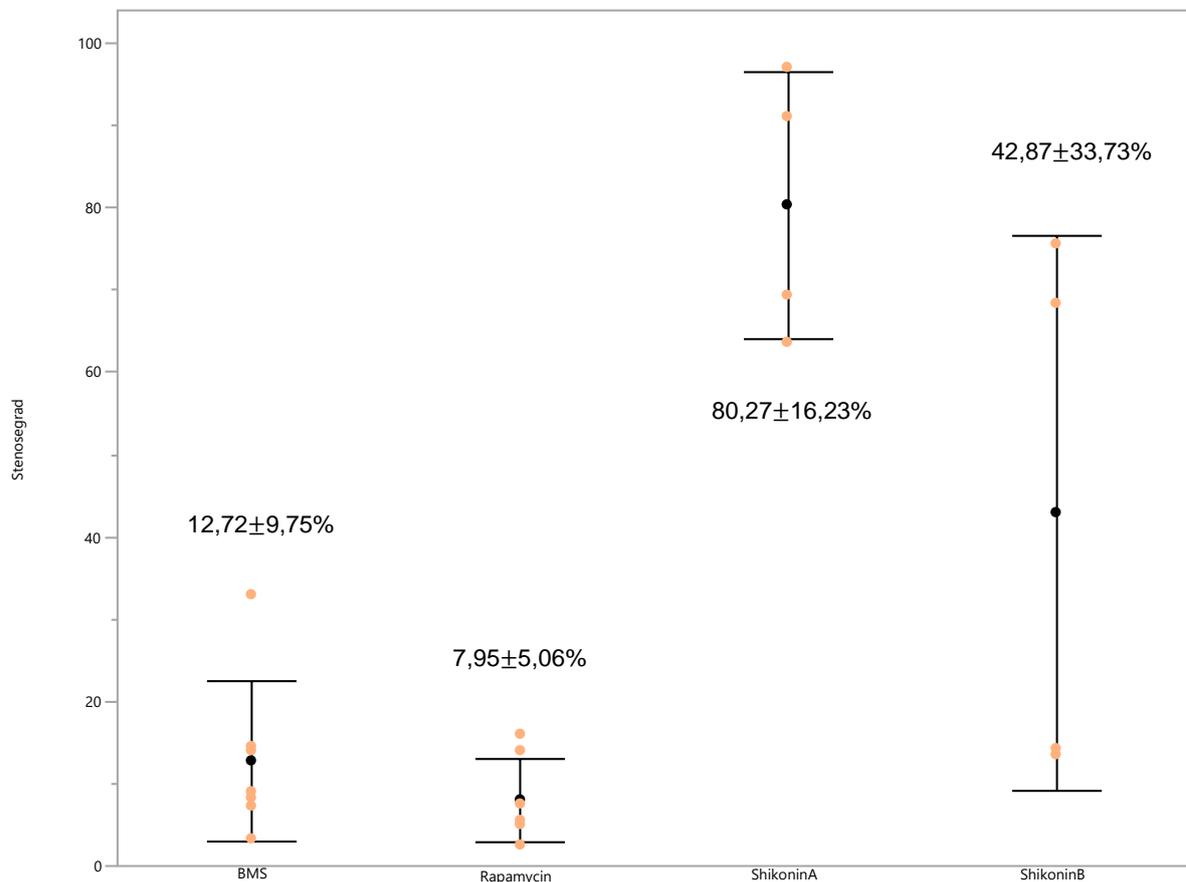


Abbildung 35: Berechneter Stenosegrad der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5 mg/ml), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg/ml)

In Abbildung 36 bis 39 sind exemplarisch Beispielbilder der verschiedenen Gruppen zu sehen. Während bei den beiden Shikoningruppen (Abb. 38 für die

Ergebnisse

hochdosierte und Abb. 39 für die niedrigdosierte Gruppe) eine deutliche Lumeneinengung durch die Neointima zu sehen ist, trat beim Kontrollstent (Abb. 36) und bei der Rapamycinbeschichtung (Abb. 37) nur eine sehr geringe Neointimabildung ohne relevante Lumeneinengung auf.

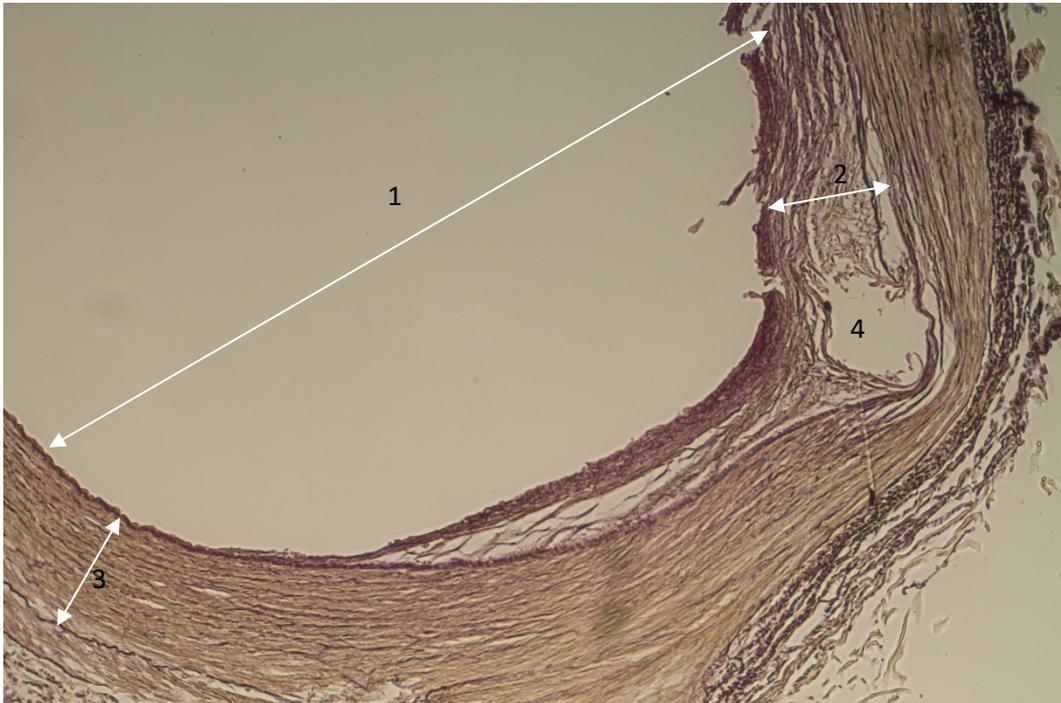


Abbildung 36: Linke Iliakalarterie Tier Nr. 9, BMS; Elastica-van-Gieson-Färbung, 6,25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine schwach ausgeprägte Neointimabildung lediglich im Bereich der Stentstreben ohne relevante Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

Ergebnisse



Abbildung 37: Linke Iliakalarterie Tier Nr. 19, Rapamycin; Elastica-van-Gieson-Färbung, 25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine schwach ausgeprägte Neointimabildung lediglich im Bereich der Stentstreben ohne relevante Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

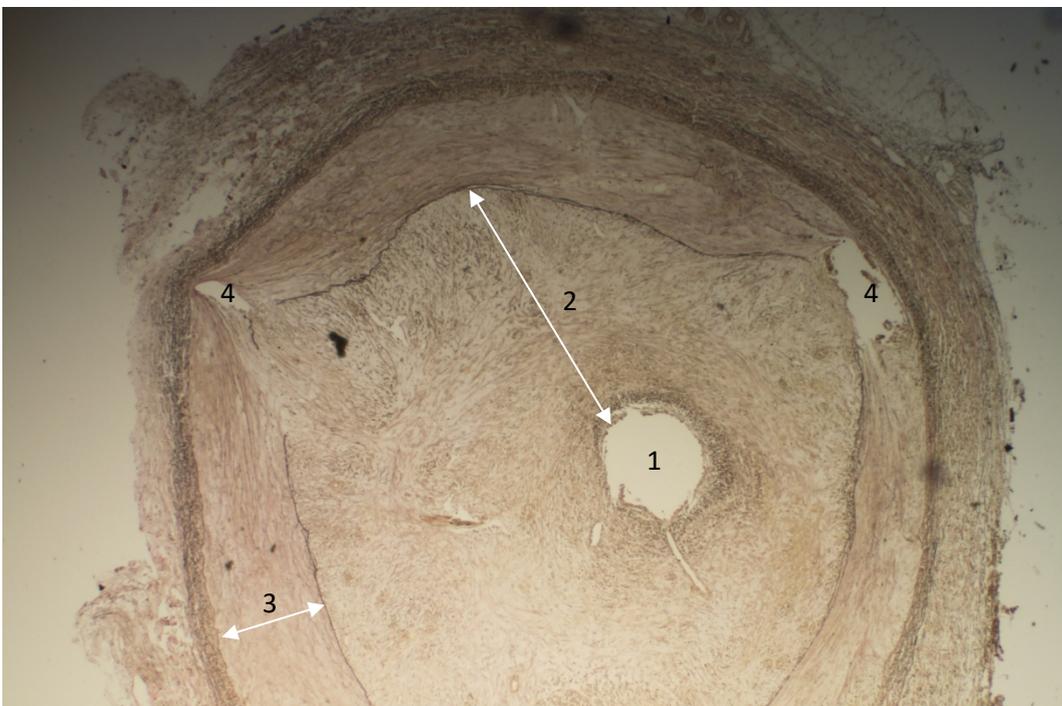


Abbildung 38: Linke Iliakalarterie Tier Nr. 7, Beschichtung mit 2 x 5 mg/ml Shikonin (ShikoninA); Elastica-van-Gieson-Färbung, 6,25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine ausgeprägte Neointimabildung mit subtotaler Stenose des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

Ergebnisse

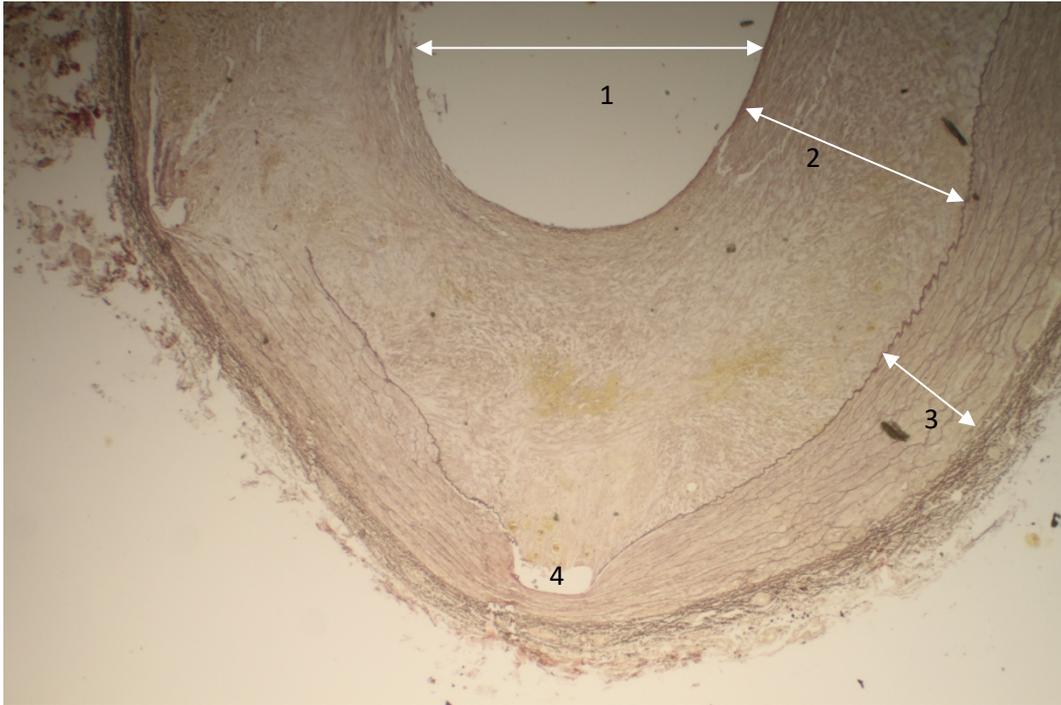


Abbildung 39: Linke Iliakalarterie Tier Nr. 13, Beschichtung mit 2 x 2,5 mg/ml Shikonin (ShikoninB); Elastica-van-Gieson-Färbung, 6,25-fache Vergrößerung. Es zeigt sich eine ausgeprägte Neointimabildung mit daraus resultierender Einengung des Gefäßlumens. 1 = Gefäßlumen, 2 = Neointima, 3 = Media, 4 = entfernte Stentstreben

3.3.3 Ergebnisse der histopathologischen Auswertung

3.3.3.1 Proliferationsindex der Intima

Wie schon bei den Koronargefäßen zeigte sich auch iliakal ein hoher Proliferationsindex in den Shikonin-Gruppen, welcher mit $92 \pm 4\%$ in der hochdosierten und $86 \pm 10\%$ in der niedrigdosierten Gruppe signifikant höher war als bei den Rapamycin-beschichteten Stents mit $60 \pm 25\%$ ($p=0,0255$ bzw. $p=0,0437$). Der Proliferationsindex in der Kontrollgruppe bewegte sich mit $72 \pm 19\%$ in der Mitte und zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen (Siehe Abbildung 40).

Ergebnisse

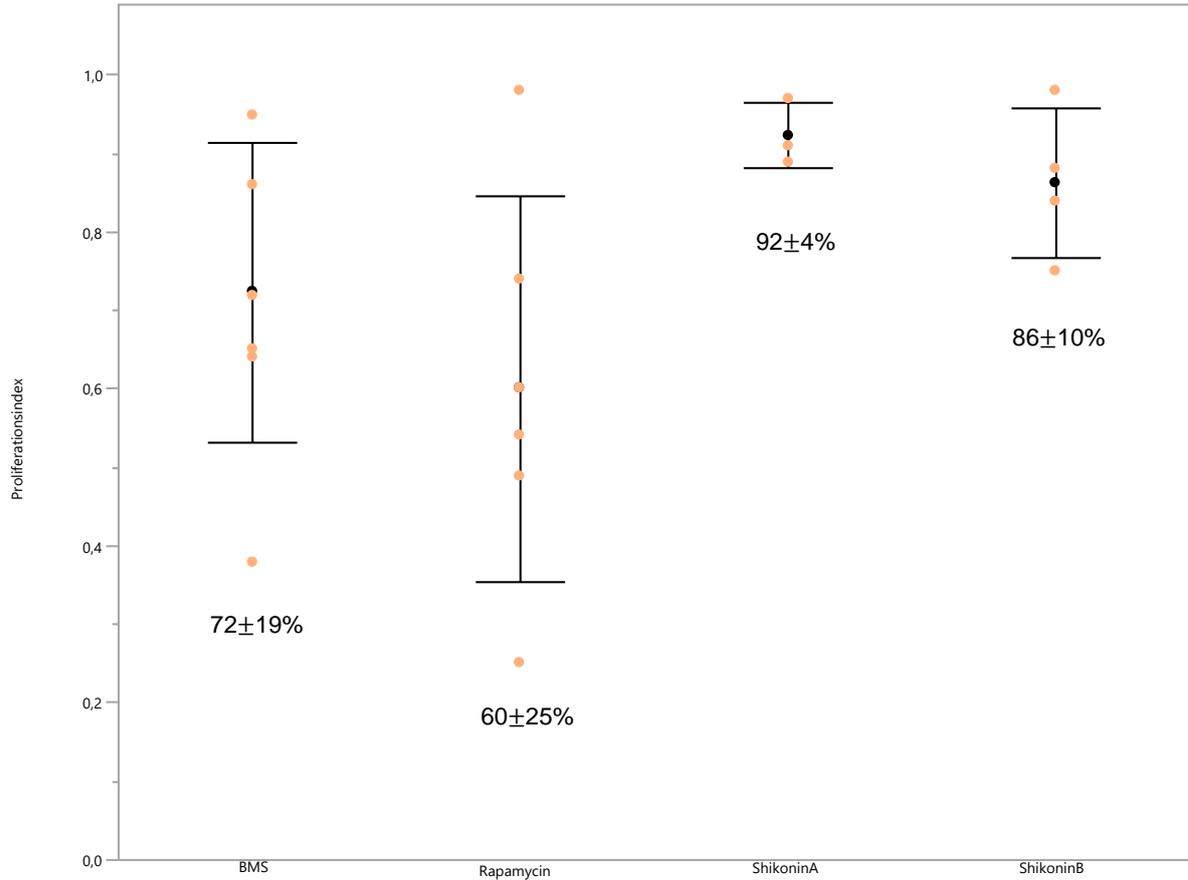


Abbildung 40: Proliferationsindex in der Intima der Iliakalgefäße mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung 4 Wochen nach Implantation der Stents. ShikoninA ist die hochdosierte Gruppe (2 x 5mg), ShikoninB die niedrigdosierte Gruppe (2 x 2,5 mg)

Auch iliakal ist der hohe Proliferationsindex in den Shikonin-Gruppen im Vergleich zu der Rapamycin- und der Kontrollgruppe gut im immunhistologischen Bild bei 50-facher Vergrößerung zu sehen. Siehe hierzu Abbildung 41 – 48.

Ergebnisse

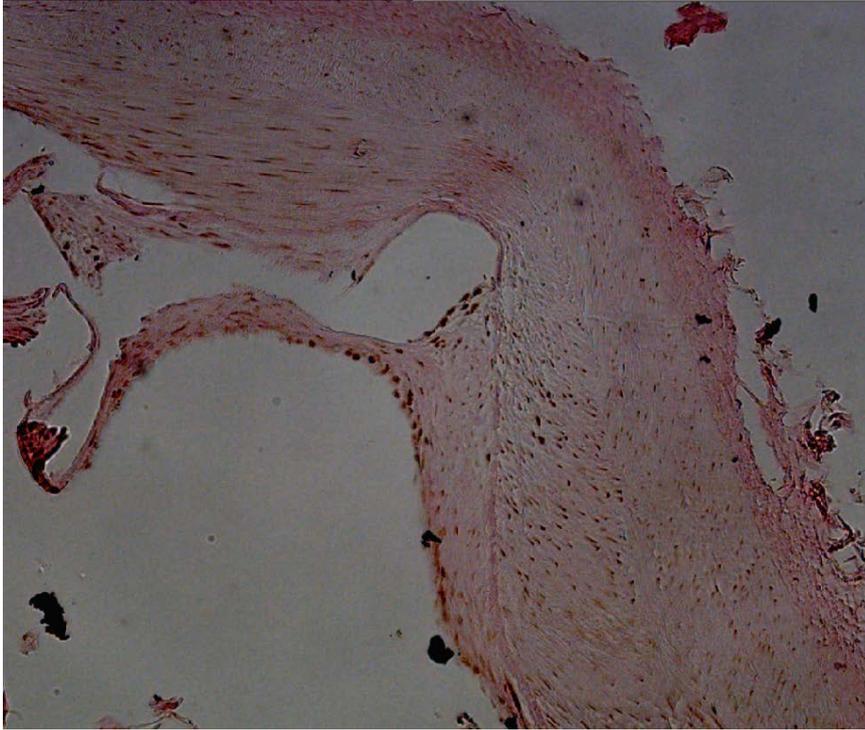


Abbildung 41: rechte Iliakalarterie Tier Nr. 6, BMS; Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen braun. Der Proliferationsindex beträgt hier 72%.

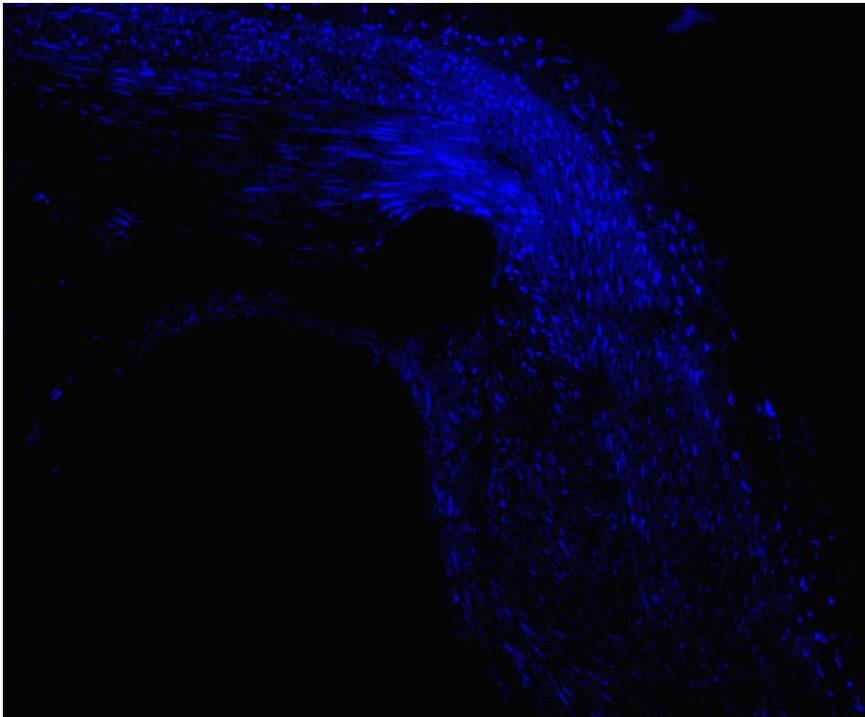


Abbildung 42: rechte Iliakalarterie Tier Nr. 6, BMS, Ausschnitt wie in Abbildung 41; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI). Die Zellkerne erscheinen hier blau.

Ergebnisse



Abbildung 43: rechte Iliakalarterie Tier Nr. 11, Rapamycin; Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen braun. Der Proliferationsindex beträgt hier 54%.

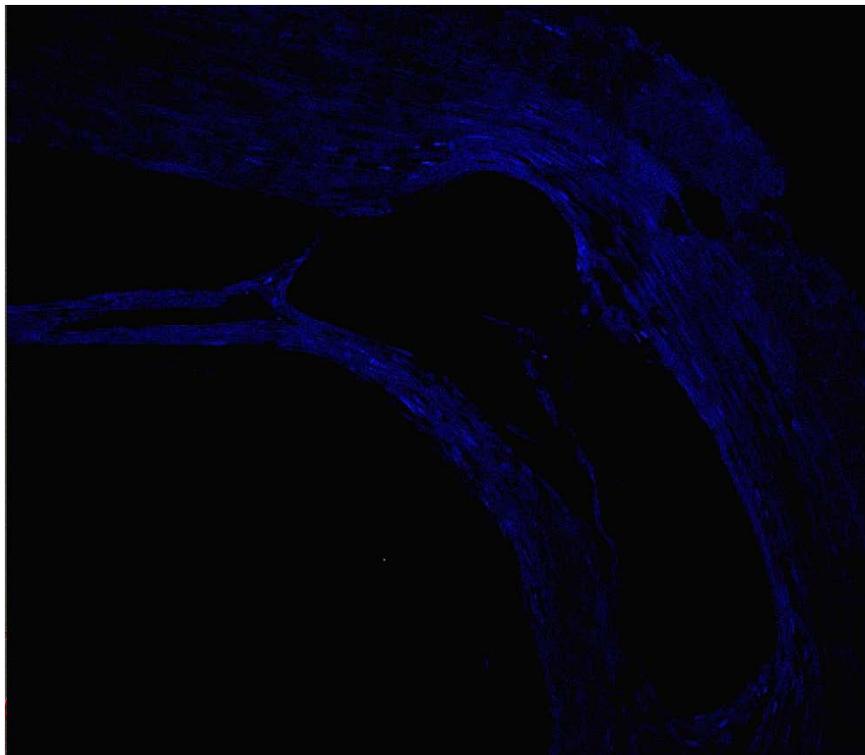


Abbildung 44: rechte Iliakalarterie Tier Nr.11, Rapamycin, Ausschnitt wie in Abbildung 43; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI). Die Zellkerne erscheinen hier blau.

Ergebnisse

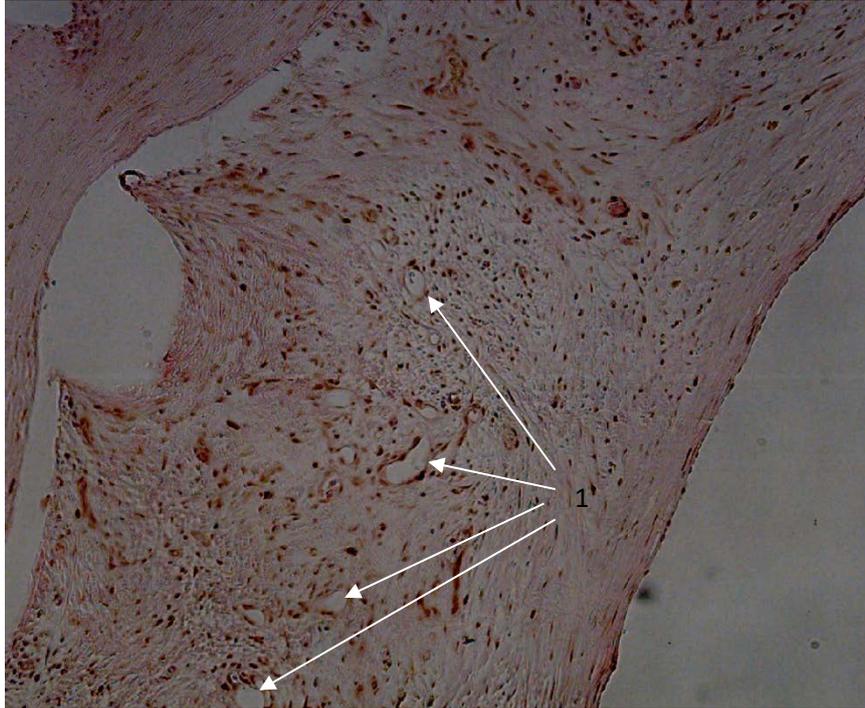


Abbildung 45: linke Iliakalarterie Tier Nr. 6, ShikoninA (2 x 5 mg/ml); Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen braun. Der Proliferationsindex beträgt hier 91%. Auffällig ist auch die Hypervaskularisation der Neointima (1)

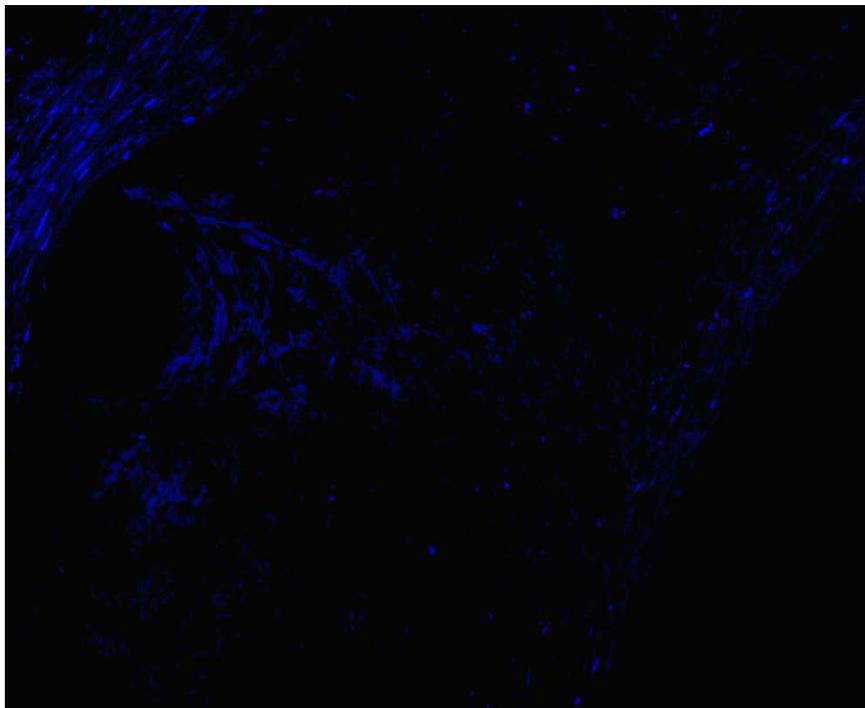


Abbildung 46: linke Iliakalarterie Tier Nr. 6, ShikoninA (2 x 5 mg/ml), Ausschnitt wie in Abbildung 45; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI). Die Zellkerne erscheinen hier blau.

Ergebnisse

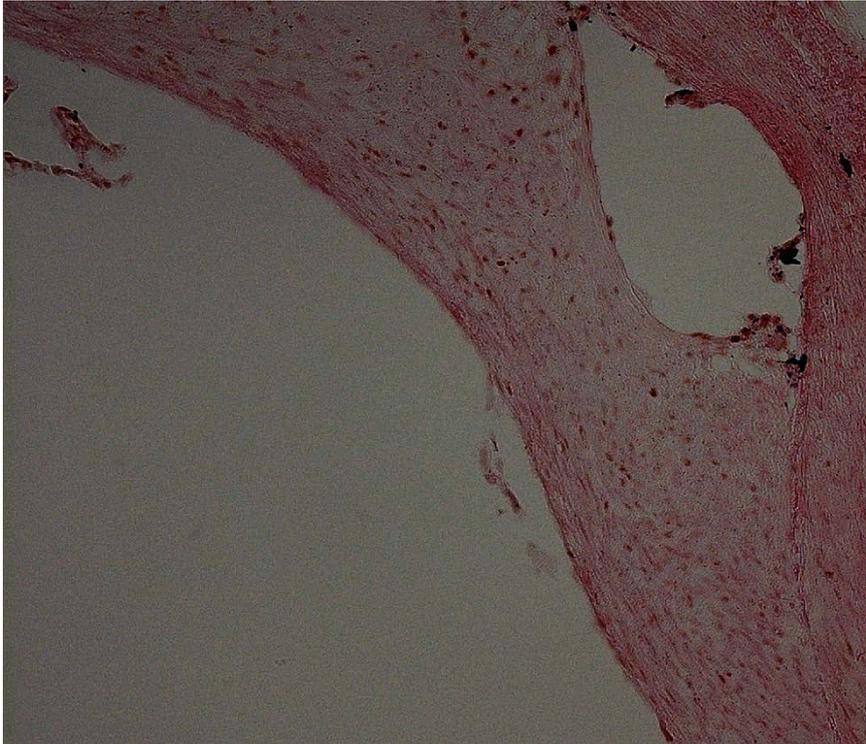


Abbildung 47: linke Iliakalarterie Tier Nr. 17, ShikoninB (2 x 2,5 mg/ml); Immunhistologische Anfärbung in Proliferation befindlicher Zellen (PCNA). Die Zellkerne erscheinen braun. Der Proliferationsindex beträgt hier 88%.

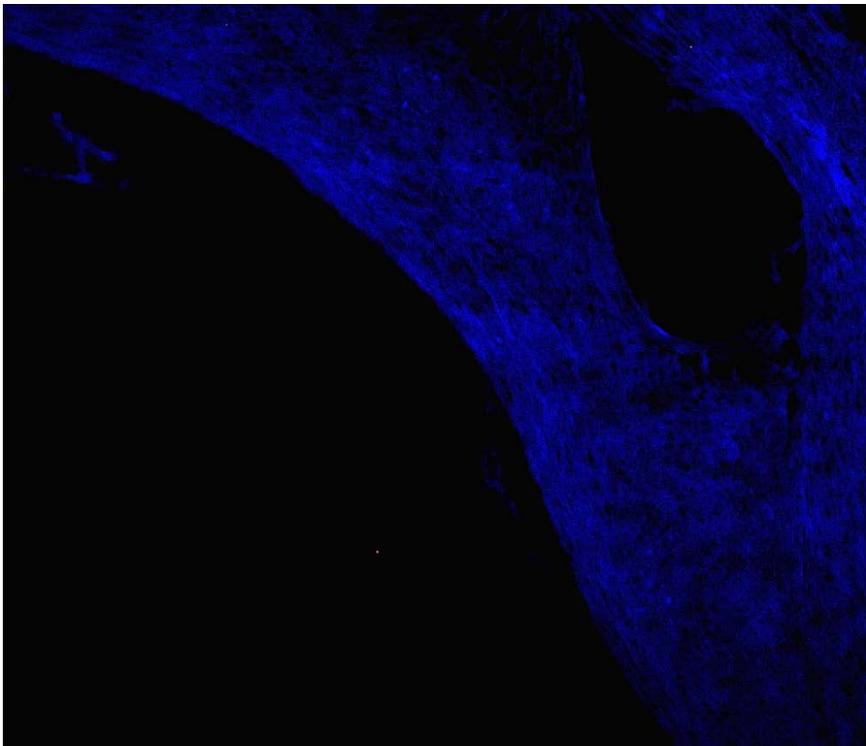


Abbildung 48: linke Iliakalarterie Tier Nr. 17, ShikoninB (2 x 2,5 mg/ml), Ausschnitt wie in Abbildung 47; Immunhistologische Anfärbung aller Zellen (DAPI). Die Zellkerne erscheinen hier blau.

Ergebnisse

3.3.3.2 Reendothelialisierung

Bezüglich der Reendothelialisierung in den unterschiedlichen Beschichtungsgruppen zeigt sich iliakal ein sehr ähnliches Bild wie auch koronar. Der größte Anteil vollständiger Reendothelialisierung ist in der BMS- und der hochdosierten Shikonin-Gruppe zu erkennen, während in der Rapamycin- und der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe größtenteils eine unvollständige Reendothelialisierung zu sehen ist.

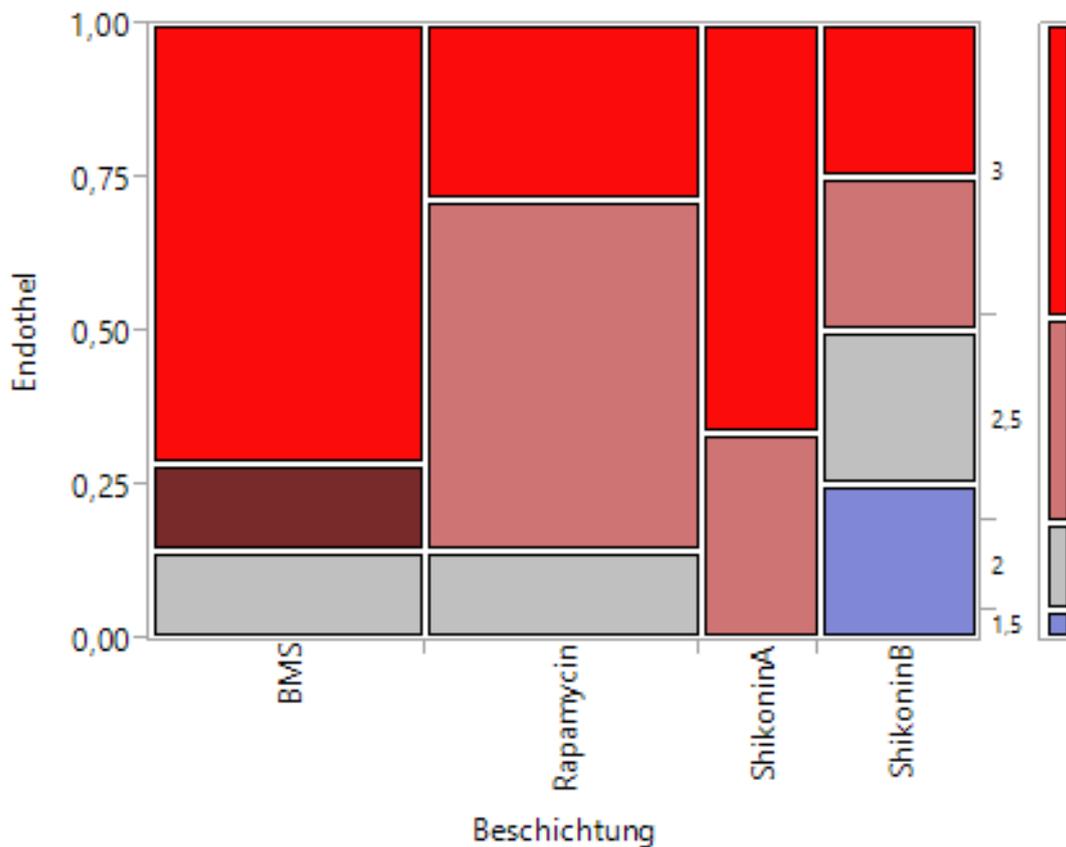


Abbildung 49: Mosaikdiagramm der Reendothelialisierung der Iliakalgefäße. 0 = 0-25% der Oberfläche, 1 = 25,1-50%, 2 = 50,1-75%, 3 = 75,1-100%. Bei grenzwertigen Ergebnissen wurden Zwischenwerte gebildet.

Ergebnisse

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ergibt sich 4 Wochen nach Stentimplantation für die shikoninbeschichteten Stents eine deutlich ausgeprägtere Restenose verglichen mit den unbeschichteten Kontrollstents und den rapamycinbeschichteten Stents sowohl in den Koronar- als auch den Iliakalgefäßen. Zwar zeigt sich tendenziell eine bessere Reendothelialisierung als bei der Rapamycinbeschichtung, welche vergleichbar mit derer bei unbeschichteten Stents ist. Dennoch ergibt sich für die direkten Zeichen einer Restenose wie Neointimafläche, Minimaler Restdurchmesser des Gefäßes, Restlumenfläche und Stenosegrad ein eindeutiger Nachteil der Shikoninbeschichtung gegenüber den Kontrollstents und den Rapamycin-Stents. Besonders ausgeprägt ist dieser in der höher dosierten Shikonin-Gruppe. Korrelierend dazu zeigt sich in den Shikonin-Gruppen auch ein deutlich höherer Proliferationsindex als Zeichen für einen generell erhöhten Zellumsatz nach Shikonin-Beschichtung. Zwischen Rapamycin und BMS zeigen sich nur geringe Unterschiede bezüglich der Restenose. Sowohl in den Koronar-, als auch in den Iliakalgefäßen zeigt sich die Restenose in der Rapamycin-Gruppe etwas geringer als in der Kontrollgruppe, wenn auch keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden konnten. Die schon angiographisch vermuteten Ergebnisse bestätigen sich somit in der histologischen Auswertung.

Diskussion

4 Diskussion

4.1 Hintergrund des vorliegenden Versuches

Zur Behandlung von arteriellen Gefäßstenosen haben sich, vor allem bei kleinen Gefäßen, in denen keine direkten chirurgischen Verfahren wie die Thrombendarteriektomie möglich sind, minimalinvasive Verfahren durchgesetzt. Nach Implantation der ersten Stents kam es jedoch gehäuft zu Restenosen. Ursächlich dafür scheint vor allem eine überschießende Reaktion ortsständiger Zellen wie glatter Muskelzellen und eine damit verbundene Intimahyperplasie und Thrombenbildung. Weiterhin wird durch die Freilegung thrombogenen Materials zusätzlich die Thrombenbildung angeregt, die hierdurch vermehrte Freisetzung von PDGF führt durch Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen wiederum zur Intimahyperplasie. [3] In einem nächsten Schritt wurden deshalb beschichtete Stents entwickelt (DES), welche bevorzugt mit immunsuppressiven oder zytotoxischen Medikamenten (Sirolimus, Paclitaxel) beschichtet wurden, um eben diese Entzündungsreaktion zu hemmen. Im Gegensatz zu einer systemischen immunsuppressiven Therapie kommen medikamentenbeschichtete Stents mit deutlich geringeren Dosen aus, sodass eine lokale Wirksamkeit ohne systemische Nebenwirkungen erreicht werden kann.

DES haben sich als effektive Methode zur Reduktion der Restenose im Vergleich zum unbeschichteten Stent sowohl im Bereich der Koronararterien, als auch im Bereich der Iliakal- und Oberschenkelarterien [53] etabliert. Dennoch besteht weiterhin die Problematik vor allem der späten Restenose (late loss). Die Hauptursache der späten Restenose ist meist eine späte Stentthrombose aufgrund einer verminderten Reendothelialisierung. In einer pathologischen Studie wurden die Koronargefäße von Patienten untersucht, die mehr als 30 Tage nach Stentimplantation verstorben sind. Dabei zeigte sich, dass in der Gruppe der mit Sirolimus oder Paclitaxel beschichteten Stents in 14 von 23 Fällen eine Stentthrombose zu finden war. Im Gegensatz dazu lag in der Kontrollgruppe mit BMS lediglich in 2 von 25 Fällen eine Stentthrombose vor.

Diskussion

Die Reendothelialisierung war in der DES-Gruppe mit ca. 56% deutlich geringer ausgeprägt als bei den unbeschichteten Stents mit rund 90%. In den DES mit Stentthrombose zeigte sich eine besonders geringe Reendothelialisierung. [54] Dies erfordert eine langfristige Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern wie ASS und Clopidogrel, was jedoch mit dem Risiko von Blutungen und Magen-Darm-Ulcera vergesellschaftet ist.

Aus diesen Gründen wird weiterhin intensiv an verbesserten Möglichkeiten der Restenoseprophylaxe geforscht. Wie eingangs bereits erläutert spielt vermutlich das schlechte Einheilen des Stents in das Gefäß und die dadurch verminderte Endothelialisierung eine entscheidende Rolle beim späten Lumenverlust.

Im vorliegenden Versuch sollte die Möglichkeit zur Prophylaxe der Restenose durch die Beschichtung eines Stents mit Shikonin unter Verwendung eines polymerfreien Beschichtungssystems untersucht werden.

4.2 Stentbeschichtungen zur Reduktion der Restenose

Aufgrund der antiproliferativen und antimigrativen Eigenschaften von Chemotherapeutika wie Paclitaxel durch die Hemmung von Mikrotubuli, in Verbindung mit der geringen Wasserlöslichkeit und damit schnellen Aufnahme ins Gewebe von Paclitaxel erschien dieses als sehr gut geeignet, um die neointimale Hyperplasie nach Stentimplantation zu hemmen. Nachdem im Jahr 2000 durch Drachman et al.[55] mit der Beschichtung von Stents mit Paclitaxel erste positive Ergebnisse im Tiermodell erzielt werden konnten, wurden 2003 in der TAXUS-Studie auch am Menschen vielversprechende Ergebnisse erzielt. [56] Im Rahmen dieser Studie wurde in der Rapamycin-Gruppe kein später Lumenverlust beobachtet, jedoch wurde bis zum primären Endpunkt der Studie mit Clopidogrel behandelt. In Langzeitbeobachtungen konnten sowohl für Paclitaxel, als auch für Sirolimus späte Stenosen mit akuter Symptomatik angiographisch nachgewiesen werden. [57] Alle Fälle traten nach vollständiger Beendigung der antikoagulativen Therapie oder unter Aspirin-Monotherapie auf. Wie auch 2007 durch Eisenstein et al. gezeigt werden konnte, ist die antikoagulative Therapie mit Clopidogrel

Diskussion

auch noch nach 12-24 Monaten wichtig, um die späte Restenose zu vermeiden. Im Gegensatz dazu war bei BMS später als 6 Monate nach Intervention kein Vorteil durch weitere Clopidogrel-Therapie mehr zu beobachten. [58] Aufgrund der späten Restenose wurde die 2. Generation der drug-eluting Stents, bestehend aus neuen, dünneren Stentsystemen, verträglicheren, biologisch abbaubaren Polymeren und anderen Medikamenten entwickelt. Diese zeigen im Vergleich zur ersten Generation eine signifikant verbesserte Sicherheit. [59] So konnte in einer Meta-Analyse mit über 50.000 Patienten aus 49 kontrollierten klinischen Studien eine mit den BMS vergleichbare Rate an späten Stentthrombosen gezeigt werden. Für die Untergruppe der mit Everolimus beschichteten Cobalt-Chrom-Stents ergab sich 2 Jahre nach Stentimplantation mit einer Odds Ratio von 0,35 (0,17-0,69) sogar ein signifikant niedrigeres Risiko einer späten Stentthrombose als nach Implantation von BMS. [60]

Aktuell verwendete Medikamente zur Beschichtung von DES sind hauptsächlich Immunsuppressiva wie Sirolimus, Everolimus und Zotarolimus, sowie Zytostatika wie Paclitaxel. In Bezug auf die Reendothelialisierung zeigten Jonet et al. einen Vorteil von Everolimus und Zotarolimus gegenüber den Substanzen Sirolimus und Paclitaxel, jedoch ergab sich die vollständigste Reendothelialisierung für BMS. So zeigte sich im Kaninchenmodell nach 14 Tagen eine signifikant bessere Reendothelialisierung bei den BMS verglichen mit Zotarolimus (ZES), Paclitaxel (PES) und Sirolimus freisetzenden Stents (SES). Die Endothelschicht bei Everolimus (EES) war zwar geringer, jedoch nicht signifikant. Nach 28 Tagen zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei hier die Reendothelialisierung in allen Gruppen bei > 70% lagen und keine statistische Signifikanz mehr gezeigt werden konnte. Die geringste Endothelfläche ergab sich in diesem Modell für SES und PES. [61] Einschränkend bei dieser Studie ist zu erwähnen, dass hier unterschiedliche Stentdesigns verwendet wurden. Eine entscheidende Rolle für die Reendothelialisierung spielt auch die Stentdicke. Diese war bei den Stents mit guter Endothelialisierung (EES 89 µm, ZES 96 µm) deutlich geringer als bei den Stentdesigns, die eine reduzierte Endothelialisierung erbrachten (PES (113 µm) and SES (153 µm)). Eine größere

Diskussion

Stentdicke führt zu einer vermehrten Beeinflussung des laminaren Blutflusses, durch die entstehenden Turbulenzen wird die Bildung einer Endothelschicht maßgeblich gestört. [62]

In einem Vergleich von DES und BMS in einer pathologischen Studie an humanen Gefäßen nach Stentimplantation konnte gezeigt werden, dass dauerhaft im Gefäß verbleibende Polymere der DES eine chronische Entzündungsreaktion auslösen und damit das thrombotische Risiko erhöhen können. [63]

Um die protrahierte Entzündungsreaktion durch verbleibende Polymere zu verhindern, wurden neben resorbierbaren Polymeren auch polymerfreie Stentsysteme entwickelt. Diese zeigen im 5-Jahres-outcome (ISAR-Test) keine signifikanten Unterschiede zu Paclitaxel-beschichteten Stentsystemen der ersten Generation. [64] Dasselbe Stentmodell wurde auch im vorliegenden Versuch verwendet.

4.3 Beschichtung peripherer Stents

In peripheren Gefäßen finden meist selbstexpandierbare Stents und Ballonangioplastien Anwendung. In einer ersten randomisierten, kontrollierten Studie konnten für die femoropopliteale Atherosklerose mit Sirolimus-beschichteten Stents keine Vorteile gegenüber BMS gefunden werden [65], wohingegen Paclitaxel-beschichtete Stents bezüglich Durchgängigkeit, klinischem Befinden und ereignisfreiem Überleben sowohl gegenüber BMS, als auch PTA signifikant bessere Ergebnisse erbrachten. [66]

Im infrapoplitealen Bereich konnten mit PES (paclitaxel eluting stents) zwar akzeptable klinische Ergebnisse erreicht werden, eine Verringerung der Restenoserate oder der Reinterventionsrate war jedoch nicht nachzuweisen. [67] Dagegen konnten für SES (Sirolimus eluting stents) sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Es konnte sowohl eine bessere langanhaltende Durchgängigkeit 3 Jahre nach Implantation im Vergleich zu BMS erreicht werden, als auch eine Reduktion der Restenose und damit einhergehend die Reduktion der Häufigkeit

Diskussion

von Reinterventionen [68]. In einer prospektiven, randomisierten Doppelblindstudie von Rastan et al. konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Hierbei wurde der im vorliegenden Versuch verwendete YUKON-Stent genutzt [69].

Auch im Vergleich zur PTA zeigen DES eine geringere Restenoserate und eine erhöhte Durchgängigkeit. So konnte in einer randomisierten klinischen Interventionsstudie an 200 Patienten nach einem Jahr Beobachtungsdauer durch einen SES mit 22,4% Restenose eine deutliche Reduktion gegenüber der konventionellen Ballonangioplastie mit einer Restenose von 41,9% erreicht werden. [70]

Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei allen genannten Studien an peripheren Gefäßen zwar signifikant geringere Restenoseraten und eine höhere Durchgängigkeit gezeigt wurden, eine Reduktion der Gesamtmortalität konnte jedoch nicht erreicht werden, ebenso konnte die Zahl der Extremitätenverluste nicht reduziert werden [69, 71].

Wie oben bereits erwähnt, führt das im Gefäß verbleibende Polymer zu einer chronischen Entzündungsreaktion, was einen prothrombotischen Prozess darstellt. Dies könnte maßgeblich zum Verlauf der späten Restenose beitragen. Ein neuerer Ansatz sind deshalb biokompatible oder biologisch abbaubare Polymere, oder wie im vorliegenden Versuch, polymerfreie Beschichtungen. Durch das Fehlen der Polymere könnte hierbei die chronische Entzündungsreaktion reduziert und damit das langfristige Outcome nach Stentimplantation verbessert werden.

Hierzu wurde im vorliegenden Versuch eine Beschichtungsapparatur der Firma Translumina verwendet. Die Hauptfunktion von Polymeren in Stentbeschichtungen ist die Retardierung der Medikamentenfreisetzung. Durch die hier verwendeten Stents mit mikroporöser Oberfläche ist ebenfalls eine Retardierung möglich, wodurch auf die Verwendung von Polymeren verzichtet werden kann.

Diskussion

Das Beschichtungsverfahren dauert lediglich 8 Minuten und kann direkt im Katheterlabor unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Hierdurch ist es möglich, in Zukunft individualisierte Beschichtungen direkt am Patienten orientiert durchzuführen, beispielsweise bei Patienten mit Risikofaktoren wie Diabetes eine höhere Dosierung der Medikamente zu verwenden. Weiterhin ist es möglich, auch mehrere Medikamente auf einen Stent aufzubringen und so zum Beispiel ein Zytostatikum zur Hemmung der Intimahyperplasie mit einem Medikament zur Anregung der Reendothelialisierung zu kombinieren. Sicherheit und Nutzen der polymerfreien Stents konnte schon wiederholt gezeigt werden. [72-74]

Aus experimenteller Sicht ist diese Stentplattform besonders gut geeignet um neue Substanzen wie beispielsweise Shikonin zur Stentbeschichtung zu testen, da diese unkompliziert aufgebracht werden können und die Dosierung individuell angepasst werden kann.

4.4 Verwendung von Shikonin

Durch die Implantation von Stents wird die Gefäßwand und ganz besonders das Endothel beschädigt. Wie eingangs beschrieben, kommt es durch das beschädigte Endothel zu einer Thrombozytenanlagerung und Thrombozytenaktivierung mit daraus resultierender Ausschüttung thrombogener und proinflammatorischer Zytokine. [75] Hierbei spielt P-Selektin eine entscheidende Rolle, da es das Bindeglied zwischen Endothelschädigung und Inflammation darstellt, indem es nach Aktivierung der Endothelzellen und der Thrombozyten durch den Gefäßschaden an die Zelloberfläche gebracht wird, und dadurch Leukozyten in das betroffene Gewebe einwandern. Um diesen Prozess aufzuhalten ist eine gute Reendothelialisierung der Gefäße nach Stentimplantation anzustreben. Die Reduktion von P-Selektin ist auch einer der Mechanismen, über den Clopidogrel seine Wirkung entfaltet. Neben der Thrombozytenaggregationshemmung führt Clopidogrel somit auch zu einer direkten Reduktion der Inflammation und der Neointimabildung. [76]

Diskussion

Es konnte auch an menschlichen Autopsien gezeigt werden, dass vermehrt freiliegende Stentstreben mit einem deutlich erhöhten Risiko einer späten Restenose korrelieren. [77] Dies ist jedoch auch abhängig von der Beschichtung, des verwendeten Polymers und des Stents. So konnte für Paclitaxel eine bessere Reendothelialisierung gezeigt werden als für Sirolimus, gleichzeitig zeigte Sirolimus jedoch eine geringere Restenose [78]. Für DES der 2. Generation mit einer Sirolimusbeschichtung konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu BMS eine geringere Reendothelialisierung stattfindet [63], was auch im vorliegenden Versuch bestätigt werden konnte. Zumindest in der hochdosierten Shikonin Gruppe war die Endothelschicht hingegen ähnlich gut ausgebildet wie in der Kontrollgruppe.

Die Verwendung von Shikonin im vorliegenden Versuch hat mehrere Gründe, da Shikonin in vorausgegangenen Versuchen an mehreren der oben genannten Ursachen der Restenose und postinterventioneller Gefäßverschlüsse vielversprechende Ergebnisse erbrachte.

Nach Expansion des Stents im Zielgefäß kommt es zu einer Beschädigung des Endothels. Hierbei werden Kollagenfasern freigelegt, welche zu einer Thrombozytenaktivierung führen. Durch Chang et. al konnte gezeigt werden, dass sowohl Shikonin, als auch verschiedene Derivate des Shikonins wie Acetylshikonin, eine deutliche Aggregationshemmung von Kaninchen-Thrombozyten bewirkten. [79] Dadurch könnten vor allem sehr frühe thrombotische Gefäßverschlüsse verhindert und eventuell auch die Dosis oder die Dauer medikamentöser Thrombozytenaggregationshemmung reduziert werden. Diese Überlegung spielte eine Rolle bei der Wahl des Shikonin als Stentbeschichtung, konnte aber in diesem Versuch nicht näher betrachtet werden.

Ein weiterer sehr wichtiger Faktor bei der Entstehung der Restenose ist die akut durch den Gefäßschaden und dauerhaft durch den einliegenden Stent begünstigte Entzündungsreaktion. Sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen spielt TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α) eine zentrale Rolle. [80] Schon seit langem werden beim Shikonin und seinen Derivaten

Diskussion

antiinflammatorische Effekte beobachtet, der genaue Mechanismus war jedoch lange Zeit nicht klar und ist auch heute noch nicht komplett verstanden. Es handelt sich am ehesten um ein multifaktorielles Geschehen. So konnte gezeigt werden, dass Shikonin durch die Hemmung des proinflammatorischen Leukotrien B₄ sowie der Hydroxyeicosatetraensäure zu einer Entzündungshemmung führt. [47] Auch konnte durch Wang, J.P et. al eine antiallergische Komponente des Shikonins gezeigt werden. Diese kommt am ehesten durch eine Mastzellstabilisation zustande [81]. Der wichtigste Faktor für den antiinflammatorischen Effekt von Shikonin scheint jedoch die Hemmung von TNF- α zu sein, welches an der Spitze der proinflammatorischen Zytokinkaskade steht und die Immunantwort initiiert. [82] Um diesen Entzündungsinitiator zu hemmen, wurde in der Vergangenheit schon vielfach versucht, den Effekt von TNF- α an verschiedenen Stellen zu blockieren, wie beispielsweise durch den Einsatz von Antikörpern gegen TNF- α [83] oder den TNF- α -Rezeptor [84], welche heute in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen Anwendung finden. Staniforth et. al konnten zeigen, dass es durch einen lokalen Reiz oder Gewebeschaden im Mausmodell zu einer 6-fach erhöhten Produktion von TNF- α kommt, was mit einer lokalen Entzündungsreaktion einhergeht. Durch die topische Behandlung mit Shikonin konnte die Produktion von TNF- α um bis zu 93% reduziert werden, wohingegen durch die Standardbehandlung mit topischen Kortikosteroiden wie Hydrocortison lediglich eine Reduktion von TNF- α um 47% erreicht werden konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass dieser Effekt von Shikonin durch eine direkte Inhibierung des TNF- α -Promotors entsteht. [85]

Eine weitere Eigenschaft des Shikonins ist seine antioxidative Aktivität. Oxidative Prozesse spielen im Rahmen der Neointimabildung eine wichtige Rolle. So konnte in Gefäßen, in denen durch einen mechanischen Stimulus eine Neointimabildung provoziert wurde, eine bis zu 11-fach höhere Menge an Untereinheiten der NADPH-Oxidase gefunden werden, welche im Rahmen oxidativer Prozesse erhöht ist. NADPH bildet in Verbindung mit Sauerstoff ein Hyperoxidanion, welches Ausgangspunkt einer Reihe weiterer reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid ist und damit durch oxidative

Diskussion

Schäden zur Neointimabildung führen kann. [86] Es konnte gezeigt werden, dass Shikonin eine ausgesprochen große Kapazität zum Abfangen von Sauerstoffradikalen besitzt. [87]

Wie oben bereits erwähnt spielt die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Restenose. Zhang et al konnten im Zellkulturversuch zeigen, dass durch Shikonin genau dieser Effekt signifikant reduziert werden kann. So wurde durch eine Lösung mit 1 µmol/l Shikonin in einer Zellkultur aus glatten Gefäßmuskelzellen durch die Hemmung verschiedener Regulatorproteine des Zellzyklus, wie beispielsweise Cyclin D und E, die DNA-Synthese um 33-98% reduziert. [88] Durch Shikonin konnte somit der Zellzyklus glatter Gefäßmuskelzellen deutlich gehemmt werden, der Anteil an G0/G1-Phasen stieg an, während G2- und S-Phasen reduziert wurden. Außerdem kam es zu einer deutlich gesteigerten Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen von 2,8-23,7%, verglichen mit 0,2-0,4% in der Kontrollgruppe.

4.5 Stentbeschichtung mit Sirolimus und Paclitaxel

Bei Sirolimus handelt es sich um ein Medikament, das ursprünglich als Makrolid-Antibiotikum entwickelt wurde. Seitdem die immunsuppressiven Eigenschaften von Sirolimus bekannt wurden, wird es vor allem zur immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantationen eingesetzt. Daneben spielt für die Wirksamkeit als Stentbeschichtung vor allem der ausgeprägte antiproliferative Effekt auf glatte Muskelzellen eine entscheidende Rolle. Durch die Hemmung der Aktivität von für den Zellzyklus wichtigen Kinasen wie zum Beispiel Retinoblastom-Protein wird der Zellzyklus im G1/S-Stadium blockiert und somit nicht das G2-Stadium der Proliferation erreicht. Da die Hemmung erst im G1-Stadium stattfindet, wird die Proliferation unabhängig vom Proliferationsfaktor gehemmt. [89]

Diskussion

Paclitaxel ist ein äußerst lipophiles Molekül und dadurch kaum in Wasser löslich. Durch die hohe Lipophilie kann es jedoch, auf einen Stent aufgebracht, nach Implantation des Stents sehr schnell und tief in die Gefäßwand diffundieren und dort akkumulieren. [90] Die geringe Wasserlöslichkeit führt dazu, dass nur minimale Mengen im Blutstrom gelöst werden, was einerseits zu einer sehr geringen systemischen Konzentration führt und damit auch systemische Nebenwirkungen zu vernachlässigen sind. Andererseits ist damit auch sichergestellt, dass die applizierte Dosis fast vollständig in die Gefäßwand aufgenommen wird.

Der Wirkmechanismus von Paclitaxel besteht in einer Hemmung der Mikrotubuli-Bildung durch direkte Bindung an Tubulin, wodurch die Polymerisation verhindert wird. Hierdurch wird der Aufbau des Spindelapparates in der Mitose gestört und damit die Proliferation effektiv gehemmt. Außerdem kommt es im Rahmen der Neointimabildung zusätzlich zu einer Hemmung der Migration glatter Muskelzellen, da auch hierfür funktionierende Mikrotubuli nötig sind. [91]

4.5.1 Antikoagulantien

Aufgrund des akuten Gefäßschadens durch die Stentimplantation in Verbindung mit dem Einbringen eines Fremdmaterials und dessen Verbleiben im Gefäß, entsteht ein ausgeprägter Prothrombotischer Reiz. Eine zweifache Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin und Clopidogrel ist daher momentan die Standardtherapie. [92] Es konnte gezeigt werden, dass bei vorzeitigem Beenden der Clopidogrel-Therapie innerhalb der ersten 30 Tage nach Stentimplantation ein 36,5-fach erhöhtes Risiko einer Stentthrombose besteht. Je später das Clopidogrel abgesetzt wird, desto geringer ist die Risikoerhöhung einer Stentthrombose, im Zeitraum zwischen 30 Tagen und 6 Monaten bestand nur noch ein 4,6-fach erhöhtes Risiko. [93]

Jedoch geht eine längere Dauer der Zweifachtherapie auch mit einem zunehmenden Risiko schwerer Blutungskomplikationen einher. So konnte gezeigt werden, dass bei einer langen Therapiedauer von durchschnittlich 16,8

Diskussion

Monaten ein 2,3-fach erhöhtes Risiko schwerer Blutungskomplikationen bestand, verglichen mit einer kurzen Therapiedauer von durchschnittlich 6,2 Monaten. [94]

Es gilt also, das richtige Mittelmaß zwischen ausreichend langer Thrombozytenaggregationshemmung zur Vermeidung einer Stentthrombose und dennoch möglichst kurzer Therapiedauer zur Vermeidung schwerer Blutungskomplikationen, zu finden. Aktuelle Empfehlungen liegen hierbei im Bereich von 6-12 Monaten (European Society of Cardiology [95], American Heart Association [96]). In einer aktuellen Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass bei kurzer zweifacher Thrombozytenaggregationshemmung (3-6 Monate) im Vergleich zu langer Therapiedauer (12-36 Monate) zwar ein signifikant höheres Risiko für Stentthrombosen bestand (odds ratio 1,71), durch ein erniedrigtes Risiko für klinisch relevante Blutungen (odds ratio 0,63) kam es jedoch zu einer etwas niedrigeren Gesamtmortalität (odds ratio 0,87; $p=0,073$). [97] Die Dauer der Therapie mit Clopidogrel sollte nach sorgfältiger Abwägung der individuellen Risiken für Blutungen und Stentthrombosen entschieden werden, während weiterhin eine lebenslange Therapie mit Aspirin empfohlen wird. [98]

4.6 Experimentelles Modell

4.6.1 Tiermodelle zur Erforschung der Restenose

Bevor ein neues Medikament oder eine neue Therapieform in klinischen Studien am Menschen getestet werden kann, muss sowohl die Wirksamkeit, als auch die Verträglichkeit vorher *in vitro* und im Tierversuch geprüft werden. In den letzten Jahrzehnten der tierexperimentellen Forschung zeigte sich, dass es kein alleiniges optimales Modell gibt, sondern je nach Fragestellung ein geeignetes Modell gesucht werden muss. [99]

Diskussion

4.6.2 Wahl des Schweinmodells

Im vorliegenden Versuch wurden ausschließlich bereits am Menschen eingesetzte Materialien und Medikamente verwendet. Deshalb lag das Hauptaugenmerk auf der Wirksamkeit. Hierfür eignet sich das Schweinmodell ganz besonders, da vor allem die Koronargefäße sehr große Ähnlichkeit mit denen vom Menschen haben und auch sehr ähnlich auf Gefäßschäden reagieren. [100] Auch die Größenverhältnisse ähneln denen beim Menschen, weshalb Stents und auch sonstige Interventionsmaterialien dieselben wie beim Menschen sind. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der durch die Angioplastie gesetzte Gefäßschaden streng mit der folgenden Restenose korreliert. Hierdurch kann auch in gesunden Koronarien ein Gefäßschaden simuliert werden, der ähnlich dem bei einem menschlichen, atherosklerotischen Gefäß ist. [101] In Anlehnung an andere Arbeiten wurde eine Überdehnung des Gefäßes um den Faktor 1,2 gewählt, um einen ausreichenden Schaden zu setzen, ohne jedoch das Gefäß zu stark zu schädigen, was zu ausgeprägten Dissektionen mit daraus resultierender Thrombosierung führen könnte. Dieses Risiko besteht ganz besonders bei einem Faktor $> 1,3$. Umgekehrt führt ein Faktor $< 1,1$ zu einer zu geringen Gefäßschädigung, was unabhängig von der getesteten Behandlungsmethode eine geringe Neointima-Bildung zur Folge hat, Unterschiede in der Wirksamkeit können so nur schwer festgestellt werden. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Schweinmodell und der Anwendung im Menschen besteht in der Heilungszeit des Gefäßes nach Stentimplantation. Bisherige Daten lassen eine sechsfache Heilungszeit beim Menschen, verglichen mit dem Schweinmodell, vermuten. Die genauen Gründe hierfür sind nicht endgültig geklärt, am ehesten spielt das junge Alter der verwendeten Schweine sowie das Verwenden gesunder Gefäße eine entscheidende Rolle. Aufgrund der schnelleren Heilung ist im Schweinmodell zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Stentbeschichtung ein Zeitraum von einem Monat ausreichend, längere Beobachtungszeiträume spielen vor allem für die Frage der Langzeitsicherheit eine Rolle. [102] Im vorliegenden Versuch wurde deshalb ein Beobachtungszeitraum von 28 Tagen gewählt. Nach diesem Zeitraum

Diskussion

kommt es teilweise schon wieder zur Reduktion einer gebildeten Neointima, was die Ergebnisse verfälschen würde.

4.7 Immunhistologische Veränderungen nach Stentimplantation

Neben dem Zusammenhang zwischen Gefäßverletzung und Restenose besteht auch ein direkter Zusammenhang zwischen Ausprägung der Entzündungsreaktion und einer Restenose durch vermehrte Bildung einer Neointima. So konnte durch Kornowski et al. sowohl eine signifikante Korrelation zwischen Gefäßverletzung und Inflammation, als auch eine signifikante Korrelation zwischen Inflammation und Neointima-Dicke gezeigt werden. [75] Aus diesem Grund sollte bei tierexperimentellen Arbeiten zur Effektivität von DES immer auch die Inflammationsreaktion berücksichtigt werden. Da bei der Bildung der Neointima außerdem die Proliferation glatter Muskelzellen eine wichtige Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Proliferationsindex erhoben. Hierbei wurden die in Teilung befindlichen Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzahl der in der Neointima vorgefundenen Zellen gesetzt.

In den Iliakalarterien zeigten sich mit $92\pm 4\%$ in der hochdosierten und $86\pm 10\%$ in der niedrigdosierten Shikonin-Gruppe signifikant höhere Proliferationsraten als in der Rapamycin-Gruppe mit $60\pm 25\%$ oder der Kontrollgruppe mit $72\pm 19\%$. Auch in den Koronararterien zeigten die Gefäße die höchsten Proliferationsraten in den Shikonin-Gruppen, wenn auch nicht signifikant. Entgegen der Erwartungen zeigten also die mit Shikonin behandelten Stents die höchsten Proliferationsraten, trotz der oben genannten antiinflammatorischen Eigenschaften von Shikonin. Zwischen den beiden Shikonin-Gruppen zeigt sich kein Unterschied bezüglich des Proliferationsindex.

Die Ergebnisse des Proliferationsindex korrelieren gut mit denen der Neointimafläche, was die Bedeutung der übermäßigen Proliferation für die Entstehung der Neointima zeigt. So war die Intimafläche als primärer Endpunkt dieses Versuchs sowohl koronar als auch in peripheren Gefäßen in den

Diskussion

Shikonin-Gruppen signifikant größer als in den Kontroll- und den Rapamycin-Gruppen.

4.8 Gefäßreaktion und Restenose

Sowohl in den Koronar-, als auch in den Iliakalarterien zeigte sich bei den Shikoninbeschichtungen eine deutlich ausgeprägtere Neointimabildung als in der Kontroll- und der Rapamycingruppe. Die Neointimafläche war koronar mit ca. 3,6 mm² bzw. 4,0 mm² in den beiden Shikoningruppen deutlich größer als in der Kontrollgruppe mit 1,2 mm² und der Rapamycingruppe mit ca. 0,8 mm². Iliakal ergaben sich ähnlich deutliche Ergebnisse mit einer ausgeprägten Neointimabildung in der Shikoningruppen (5,7 mm² bzw. 4,1 mm²), im Gegensatz zu einer deutlich geringer ausgeprägten Neointimabildung mit ca. 0,7 mm² in der Kontroll- und 0,6 mm² in der Rapamycingruppe. Um einen Fehler durch unterschiedliche Ausgangsgrößen der Gefäße zu vermeiden wurde außerdem der Stenosegrad aus Neointimafläche und Restlumenfläche berechnet, welcher korrelierende Ergebnisse erbrachte und bei den Shikoninbeschichtungen mit ca. 71% (hochdosiert) bzw. 57% (niedrigdosiert) in den Koronargefäßen und 43% (niedrigdosiert) bzw. 80% (hochdosiert) in den Iliakalgefäßen hochgradige Stenosen zeigte. Der Stenosegrad bei Rapamycinbeschichtung und in der Kontrollgruppe war deutlich geringer, die Rapamycinbeschichtung zeigte tendenziell bessere Ergebnisse als die unbeschichteten Stents, wobei hier bei geringer Fallzahl keine Signifikanz gezeigt werden konnte.

Eine mögliche Ursache für die beobachtete vermehrte Neointimabildung bei Verwendung shikoninbeschichteter Stents, in Verbindung mit einem erhöhten Proliferationsindex, ist der Effekt auf das Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)-System. TGF- β ist ein multifunktionelles Protein, welches bei Gewebeschäden freigesetzt wird und eine wichtige Rolle im Heilungsprozess spielt. So induziert es auch eine vermehrte Prokollagen- und Kollagensynthese und damit einen wichtigen Aspekt der Wundheilung. Nach einem Gefäßschaden führt dieser Prozess jedoch auch zu einer vermehrten

Diskussion

Intimabildung. [103] Weiterhin kommt es zu einer vermehrten Migration glatter Muskelzellen und einer chemotaktischen Wirkung auf Monozyten. [104] Die Wirkung von Shikonin auf die Bildung von TGF- β ist nicht eindeutig verstanden. Im Rahmen eines in-vitro-Modells zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass Shikonin über eine Induktion von TGF- β zu einer vermehrten Migration von intestinalen Epithelzellen und damit in Verbindung mit seinen antiinflammatorischen Eigenschaften eine Wundheilung begünstigt. [105] Übertragen auf den intravasalen Einsatz zur Restenoseprophylaxe könnte dieser Prozess jedoch über die oben genannten Mechanismen zur vermehrten Neointima-Bildung beitragen. Andererseits konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Shikonin in humanen Hautfibroblasten zu einer Reduktion der durch TGF- β induzierten Kollagensynthese führt. [106] Dies legt eine unterschiedliche Wirkung von Shikonin auf TGF- β abhängig von weiteren Faktoren wie Zelltyp und Entzündungsreaktion nahe.

Ein weiterer Aspekt, der für die vermehrte Neointimabildung ausschlaggebend sein könnte, ist die Wirkung von Shikonin auf die Neovaskularisierung. Vor allem bei der Größenprogredienz und der Destabilisierung bereits bestehender Plaques im Rahmen eines pathologischen Gefäßprozesses spielt die Neovaskularisierung eine bedeutende Rolle. Bei atherosklerotischen Koronararterien geht eine vermehrte Neovaskularisation der Intima mit einer deutlich erhöhten Stenose einher. Gleichzeitig werden vermehrt entzündliche Infiltrate gefunden. [107] Dass die Neovaskularisation nicht durch die vermehrte Entzündung und Stenose entsteht, sondern umgekehrt diese die Stenose verstärkt, legt ein Versuch von Stefanadis et al. nahe. Für die Neovaskularisation spielt der vascular endothelial growth factor (VEGF) eine entscheidende Rolle. Dieser wird hauptsächlich in Endothelzellen, aber auch in Entzündungszellen wie Makrophagen oder Granulozyten gebildet und induziert die Angiogenese. Durch die Beschichtung eines Stents mit Bevacizumab, einem spezifischen Antikörper gegen VEGF, konnte eine signifikante Reduktion der Neointimadicke mit $0,09 \pm 0,2$ mm in der Bevacizumab-Gruppe verglichen mit $0,12 \pm 0,2$ mm in der Kontrollgruppe erreicht werden. Messungen ergaben

Diskussion

dabei eine Reduktion von VEGF in der Gefäßwand. Es konnte also durch eine Reduktion von VEGF eine verminderte Stenose erreicht werden. Inflammation und Reendothelialisierung blieben davon unbeeinflusst. [108] Aufgrund der antiinflammatorischen Eigenschaften von Shikonin wird wie bei anderen antiinflammatorischen Substanzen eher eine antiangiogenetische Wirkung von Shikonin erwartet. Es konnte auch gezeigt werden, dass Shikonin in durch VEGF stimulierten Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen eine weitere VEGF-Produktion hemmt und damit eine weitere Aktivierung von Endothelzellen und eine damit einhergehende Angiogenese reduziert. [109] Auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus nicht bekannt ist, scheint die direkte Wirkung von Shikonin auf die Produktion von VEGF zumindest in den untersuchten stimulierten Endothelzellen eher hemmender Natur zu sein. Dennoch ergaben andere Versuche eine verstärkte Angiogenese und eine deutlich erhöhte VEGF-Konzentration in kutanem Granulationsgewebe unter der Anwesenheit von Shikonin. Der Mechanismus besteht am ehesten in einer durch Shikonin verstärkten Migration VEGF-positiver neutrophiler Granulozyten. Hierdurch kommt es indirekt durch die Granulozyten zu einer vermehrten VEGF-Produktion und -Freisetzung und damit auch zu einer gesteigerten Angiogenese. [110]

Hinzu kommt auch die Wirkung von Shikonin auf den basic fibroblast growth factor (bFGF). Dieser spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, so verstärkt er bei lokaler Applikation die Neopithelialisation und die Neovaskularisation, steigert die Bildung von Granulationsgewebe und führt damit zu einem schnelleren Wundverschluss. [111] Es konnte gezeigt werden, dass Shikonin über einen bisher unbekanntem Mechanismus zu einer erhöhten Konzentration von bFGF im lokal behandelten Gewebe führt und dies ein Teileffekt der wundheilungsfördernden Wirkung des Shikonin sein könnte. [112]

Die genannten Beobachtungen lassen sich auch sehr gut mit den Ergebnissen im vorliegenden Versuch vereinbaren. Zwar konnte eine gute Reendothelialisierung vor allem in der hochdosierten Shikonin-Gruppe beobachtet werden, was vermutlich auch einen positiven Effekt auf die späte

Diskussion

Restenose hätte. Jedoch kommt es zu einer ausgeprägten primären Restenose aufgrund einer überschießenden Entzündungsreaktion und einer ausgeprägten Bildung extrazellulärer Matrix, sowie der VEGF-vermittelten Neovaskularisation. Es zeigt sich in der vergrößerten Neointima und in der Media der Shikonin-Gruppen eine höhere Zelldichte mit einem erhöhten Proliferationsindex als Zeichen einer vermehrten zellulären Reaktion. Zwar wurden die Zellen nicht weiter differenziert, die histologisch deutlich vermehrten Zellen mit gelapptem Kern sprechen jedoch für einen hohen Anteil von Granulozyten. Außerdem zeigt sich ein deutlich unruhigeres Bild mit vielen Gefäßen in der Neointima (siehe hierzu Abbildung 45), während beispielsweise in der Kontrollgruppe kaum Gefäße in der Intima zu sehen sind. Zwar war nicht die Gesamtzelldichte, sondern der Proliferationsindex als ein Endpunkt des vorliegenden Versuches gedacht, jedoch fiel bei der Auswertung im Rahmen der Erhebung des Proliferationsindex die deutlich erhöhte Zelldichte bei den Shikonin-Präparaten auf, vor allem im Bereich der Stentstreben und damit dem Ort der höchsten Shikoninkonzentration. In den Koronargefäßen zeigten sich mit 250 ± 161 Zellen pro Bildausschnitt in der BMS-Gruppe und 210 ± 137 Zellen in der Rapamycin-Gruppe sehr ähnliche Werte. In der Shikonin-Gruppe, zusammengefasst aus beiden Dosisgruppen, welche untereinander keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, ergab sich mit 727 ± 433 Zellen pro Bildausschnitt eine signifikant höhere Zelldichte. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch in den Iliakalgefäßen, in denen die BMS-Gruppe und die Rapamycin-Gruppe mit 199 ± 111 bzw. 195 ± 100 Zellen vergleichbare, aber ebenfalls signifikant niedrigere Zelldichten als die Shikonin-Gruppe mit 601 ± 228 Zellen erbrachten.

4.9 Schlussfolgerungen

Im vorliegenden Versuch sollte die Wirksamkeit von Shikonin als Stentbeschichtung in Bezug auf die Restenoseprophylaxe getestet werden. Aufgrund der bisher vorhandenen Daten über Shikonin war eine positive Wirkung auf Parameter wie Inflammation, Reendothelialisierung und Restenose zu erwarten. Durch die vielfältigen Wirkmechanismen von Shikonin, wovon viele

Diskussion

noch nicht genau verstanden sind, war jedoch auch eine Einordnung der Relevanz verschiedener Wirkmechanismen sehr schwierig.

In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigte sich kein Nutzen von Shikonin als Beschichtungsoption von Stents zur Restenoseprophylaxe. Die Restenose in Form einer Neointima war deutlich ausgeprägter als bei den unbeschichteten Stents oder auch bei rapamycinbeschichteten Stents. Insgesamt zeigt sich mit der großen Zelldichte in Verbindung mit dem hohen Proliferationsindex also das Bild einer überschießenden zellulären Reaktion auf die lokale Therapie mit Shikonin, ähnlich derer bei der lokalen Behandlung von Wunden mit Shikonin. Durch die beschriebene Proliferationshemmung und Initiation der Apoptose glatter Muskelzellen durch Shikonin war eine verminderte Neointimabildung zu erwarten, da glatte Muskelzellen einen wichtigen Beitrag zur Neointimabildung leisten. Der vorliegende Versuch legt die Vermutung nahe, dass auch bei Hemmung glatter Muskelzellen eine überschießende Bildung von Neointima durch extrazelluläre Matrix entstehen kann. Aufgrund des schlechteren Abschneidens der höher dosierten Shikonin-Gruppe ist auch eine generelle Überdosierung des Shikonins nicht auszuschließen. In Bezug auf die Reendothelialisierung zeigte jedoch die niedrigdosierte Shikonin-Gruppe keinen Vorteil gegenüber der Beschichtung mit Rapamycin, sodass bei noch geringerer Dosierung ein Vorteil gegenüber Rapamycin bezüglich der späten Restenose nicht anzunehmen wäre.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Der Einsatz von Stents zur Therapie von Gefäßstenosen hat sich bereits etabliert. Die primäre Problematik der Restenose konnte durch ständige Weiterentwicklung der Stentmaterialien sowie durch die Einführung medikamentenbeschichteter Stents immer besser kontrolliert, jedoch nicht vollständig behoben werden. Nach Einführung der DES kam es bei deutlich reduzierter primärer Restenoserate vermehrt zur Ausbildung einer späten Restenose mit der Gefahr später Gefäßverschlüsse, besonders nach dem Beenden der zweifachen Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern. Diese späte Restenose ist vor allem der verzögerten Reendothelialisierung durch die antiproliferativen Eigenschaften der Stentbeschichtungen geschuldet. Ziel dieses Versuchs war die Vermeidung der späten Restenose durch Shikonin, einem wundheilungsfördernden Naphthochinin-Derivat.

14 weiblichen Mastschweinen wurden jeweils zwei koronare und zwei iliakale Stents implantiert, bei 5 weiteren Schweinen erfolgte lediglich die Implantation von zwei Koronarstents. Der Proliferationsreiz durch eine Gefäßschädigung wurde durch eine Überdehnung der Stents um den Faktor 1,2 gesetzt. Die Gruppeneinteilung erfolgte in zwei Shikoningruppen unterschiedlicher Dosierung (2 x 5 mg/ml bzw. 2 x 2,5 mg/ml), eine Rapamycingruppe (0,75%-Lösung) und eine Kontrollgruppe mit unbeschichteten Stents. 4 Wochen post interventionem erfolgte eine angiographische Kontrolluntersuchung sowie die anschließende Entnahme und histologische Auswertung der Gefäße.

Bereits in den angiographischen Kontrolluntersuchungen zeigten sich deutlich kleinere Restlumina in den Shikoningruppen verglichen mit der Kontroll- und der Rapamycingruppe. Die vermehrte Restenose bestätigte sich auch in der histologischen Untersuchung sowohl koronar, als auch iliakal. Zwar zeigte sich besonders in der hochdosierten Shikoningruppe eine gute Reendothelialisierung, jedoch war gleichzeitig eine ausgeprägte primäre Restenose zu beobachten, welche ebenfalls in der Hochdosisgruppe am deutlichsten ausfiel. Auffällig waren hierbei eine ausgeprägte Vaskularisierung

Zusammenfassung

der Neointima sowie in der immunhistologischen Auswertung eine stark erhöhte Zellzahl und eine erhöhte Proliferationsrate. Die Rapamycinbeschichtung erbrachte erwartungsgemäß die besten Ergebnisse.

Auch wenn die gute Reendothelialisierung nach Therapie mit shikoninbeschichteten Stents für eine gute Gefäßheilung mit dem Potential zur Verringerung einer späten Restenose spricht, war die Stentbeschichtung mit Shikonin aufgrund der ausgeprägten primären Restenose im vorliegenden Versuch der etablierten Beschichtung mit Sirolimus sowie den unbeschichteten Stents bezüglich der Restenoseprophylaxe deutlich unterlegen.

Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

1. Martin, G.M., *Atherosclerosis is the leading cause of death in the developed societies*. Am J Pathol, 1998. **153**(4): p. 1319-20.
2. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg, 1997: p. 437-452.
3. Casscells, W., *Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis*. Circulation, 1992. **86**(3): p. 723-9.
4. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
5. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.
6. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
7. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
8. Hansson, G.K. and J. Nilsson, *Introduction: atherosclerosis as inflammation: a controversial concept becomes accepted*. J Intern Med, 2008. **263**(5): p. 462-3.
9. Kannel, W.B., *The Framingham study*. Br Med J, 1976. **2**(6046): p. 1255.
10. Statistisches Bundesamt Deutschland, *Todesursachen in Deutschland*. 2014. **Fachserie 12**(Reihe 4).
11. Goldman, L., B. Hashimoto, E.F. Cook, and A. Loscalzo, *Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale*. Circulation, 1981. **64**(6): p. 1227-34.
12. Weitz, J.I., J. Byrne, G.P. Clagett, M.E. Farkouh, J.M. Porter, D.L. Sackett, D.E. Strandness, Jr., and L.M. Taylor, *Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: a critical review*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 3026-49.
13. Fontaine, R. and J.L. Fontaine, *[Medical and surgical therapeutic indications in peripheral arterial obliterations caused by arteriosclerosis]*. Cah Coll Med Hop Paris, 1967. **8**(13): p. 1119-28.
14. Rutherford, R.B., J.D. Baker, C. Ernst, K.W. Johnston, J.M. Porter, S. Ahn, and D.N. Jones, *Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version*. J Vasc Surg, 1997. **26**(3): p. 517-38.
15. Smith, J.K., R. Dykes, J.E. Douglas, G. Krishnaswamy, and S. Berk, *Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease*. JAMA, 1999. **281**(18): p. 1722-7.
16. Dotter, C.T. and M.P. Judkins, *Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application*. Circulation, 1964. **30**: p. 654-70.
17. *Coronary angioplasty versus coronary artery bypass surgery: the Randomized Intervention Treatment of Angina (RITA) trial*. Lancet, 1993. **341**(8845): p. 573-80.

Literaturverzeichnis

18. Rodriguez, A., F. Bouillon, N. Perez-Balino, C. Paviotti, M.I. Liprandi, and I.F. Palacios, *Argentine randomized trial of percutaneous transluminal coronary angioplasty versus coronary artery bypass surgery in multivessel disease (ERACI): in-hospital results and 1-year follow-up. ERACI Group.* J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(4): p. 1060-7.
19. King, S.B., 3rd, N.J. Lembo, W.S. Weintraub, A.S. Kosinski, H.X. Barnhart, M.H. Kutner, N.P. Alazraki, R.A. Guyton, and X.Q. Zhao, *A randomized trial comparing coronary angioplasty with coronary bypass surgery. Emory Angioplasty versus Surgery Trial (EAST).* N Engl J Med, 1994. **331**(16): p. 1044-50.
20. Hamm, C.W., J. Reimers, T. Ischinger, H.J. Rupprecht, J. Berger, and W. Bleifeld, *A randomized study of coronary angioplasty compared with bypass surgery in patients with symptomatic multivessel coronary disease. German Angioplasty Bypass Surgery Investigation (GABI).* N Engl J Med, 1994. **331**(16): p. 1037-43.
21. *First-year results of CABRI (Coronary Angioplasty versus Bypass Revascularisation Investigation). CABRI Trial Participants.* Lancet, 1995. **346**(8984): p. 1179-84.
22. *Comparison of coronary bypass surgery with angioplasty in patients with multivessel disease. The Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) Investigators.* N Engl J Med, 1996. **335**(4): p. 217-25.
23. Dotter, C.T., R.W. Buschmann, M.K. McKinney, and J. Rosch, *Transluminal expandable nitinol coil stent grafting: preliminary report.* Radiology, 1983. **147**(1): p. 259-60.
24. Schatz, R.A., J.C. Palmaz, F.O. Tio, F. Garcia, O. Garcia, and S.R. Reuter, *Balloon-expandable intracoronary stents in the adult dog.* Circulation, 1987. **76**(2): p. 450-7.
25. Serruys, P.W., P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand, P. Materne, and et al., *A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group.* N Engl J Med, 1994. **331**(8): p. 489-95.
26. Savage, M.P., D.L. Fischman, R. Rake, M.B. Leon, R.A. Schatz, I. Penn, M. Nobuyoshi, J. Moses, J. Hirshfeld, R. Heuser, D. Baim, M. Cleman, J. Brinker, S. Gebhardt, and S. Goldberg, *Efficacy of coronary stenting versus balloon angioplasty in small coronary arteries. Stent Restenosis Study (STRESS) Investigators.* J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(2): p. 307-11.
27. Suzuki, T., G. Kopia, S. Hayashi, L.R. Bailey, G. Llanos, R. Wilensky, B.D. Klugherz, G. Papandreou, P. Narayan, M.B. Leon, A.C. Yeung, F. Tio, P.S. Tsao, R. Falotico, and A.J. Carter, *Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model.* Circulation, 2001. **104**(10): p. 1188-93.
28. McFadden, E.P., E. Stabile, E. Regar, E. Cheneau, A.T. Ong, T. Kinnaird, W.O. Suddath, N.J. Weissman, R. Torguson, K.M. Kent, A.D. Pichard, L.F. Satler, R. Waksman, and P.W. Serruys, *Late thrombosis in*

Literaturverzeichnis

- drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy.* Lancet, 2004. **364**(9444): p. 1519-21.
29. Pfisterer, M., H.P. Brunner-La Rocca, P.T. Buser, P. Rickenbacher, P. Hunziker, C. Mueller, R. Jeger, F. Bader, S. Osswald, and C. Kaiser, *Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents.* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(12): p. 2584-91.
30. Dangas, G. and V. Fuster, *Management of restenosis after coronary intervention.* Am Heart J, 1996. **132**(2 Pt 1): p. 428-36.
31. Albiero, R., T. Nishida, M. Adamian, A. Amato, M. Vaghetti, N. Corvaja, C. Di Mario, and A. Colombo, *Edge restenosis after implantation of high activity (32)P radioactive beta-emitting stents.* Circulation, 2000. **101**(21): p. 2454-7.
32. Tepe, G., T. Dietrich, F. Grafen, U. Brehme, P. Muschick, L.M. Dinkelborg, A. Greschniok, C.D. Claussen, and S.H. Duda, *Reduction of intimal hyperplasia with Re-188-labeled stents in a rabbit model at 7 and 26 weeks: an experimental study.* Cardiovasc Intervent Radiol, 2005. **28**(5): p. 632-7.
33. Seabra Gomes, R., P. de Araujo Goncalves, R. Campante Teles, and M. de Sousa Almeida, *Late results (>10 years) of intracoronary beta brachytherapy for diffuse in-stent restenosis.* Rev Port Cardiol, 2014. **33**(10): p. 609-16.
34. Block, P.C., *Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty--anatomic and pathophysiological mechanisms. Strategies for prevention.* Circulation, 1990. **81**(3 Suppl): p. IV2-4.
35. Rosanio, S., M. Tocchi, C. Patterson, and M.S. Runge, *Prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions: the medical approach.* Thromb Haemost, 1999. **82 Suppl 1**: p. 164-70.
36. Mintz, G.S., J.J. Popma, A.D. Pichard, K.M. Kent, L.F. Satler, C. Wong, M.K. Hong, J.A. Kovach, and M.B. Leon, *Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study.* Circulation, 1996. **94**(1): p. 35-43.
37. Hofma, S.H., D.M. Whelan, H.M. van Beusekom, P.D. Verdouw, and W.J. van der Giessen, *Increasing arterial wall injury after long-term implantation of two types of stent in a porcine coronary model.* Eur Heart J, 1998. **19**(4): p. 601-9.
38. Edelman, E.R. and C. Rogers, *Pathobiologic responses to stenting.* Am J Cardiol, 1998. **81**(7A): p. 4E-6E.
39. Scott, N.A., G.D. Cipolla, C.E. Ross, B. Dunn, F.H. Martin, L. Simonet, and J.N. Wilcox, *Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries.* Circulation, 1996. **93**(12): p. 2178-87.
40. Shi, Y., J.E. O'Brien, A. Fard, J.D. Mannion, D. Wang, and A. Zalewski, *Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries.* Circulation, 1996. **94**(7): p. 1655-64.
41. Pinto Slottow, T.L. and R. Waksman, *Overview of the 2007 Food and Drug Administration Circulatory System Devices Panel meeting on the*

Literaturverzeichnis

- endeavor zotarolimus-eluting coronary stent*. *Circulation*, 2008. **117**(12): p. 1603-8.
42. Papageorgiou, V.P., *Wound healing properties of naphthaquinone pigments from *Alkanna tinctoria**. *Experientia*, 1978. **34**(11): p. 1499-501.
43. Hayashi, M., [*Pharmacological studies of Shikon and Tooki. (3) Effect of topical application of the ether extracts and Shiunko on inflammatory reactions*]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 1977. **73**(2): p. 205-14.
44. Tanaka, S., M. Tajima, M. Tsukada, and M. Tabata, *A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin*. *J Nat Prod*, 1986. **49**(3): p. 466-9.
45. Lin, Z.B., P. Wang, Y. Ruan, and Q.X. Guo, [*Anti-inflammatory effect of beta, beta-dimethylacrylshikonin (author's transl)*]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1980. **1**(1): p. 60-3.
46. Di Gennaro, A. and J.Z. Haeggstrom, *Targeting leukotriene B4 in inflammation*. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. **18**(1): p. 79-93.
47. Wang, W.J., J.Y. Bai, D.P. Liu, L.M. Xue, and X.Y. Zhu, [*The antiinflammatory activity of shikonin and its inhibitory effect on leukotriene B4 biosynthesis*]. *Yao Xue Xue Bao*, 1994. **29**(3): p. 161-5.
48. Lu, L., A. Qin, H. Huang, P. Zhou, C. Zhang, N. Liu, S. Li, G. Wen, W. Dong, X. Wang, Q.P. Dou, and J. Liu, *Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **658**(2-3): p. 242-7.
49. Kourounakis, A.P., A.N. Assimopoulou, V.P. Papageorgiou, A. Gavalas, and P.N. Kourounakis, *Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and on inflammation - a preliminary pharmacochemical investigation*. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2002. **335**(6): p. 262-6.
50. Chen, X., L. Yang, N. Zhang, J.A. Turpin, R.W. Buckheit, C. Osterling, J.J. Oppenheim, and O.M. Howard, *Shikonin, a component of chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(9): p. 2810-6.
51. Newman, P.J., *The biology of PECAM-1*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(1): p. 3-8.
52. Albelda, S.M., P.D. Oliver, L.H. Romer, and C.A. Buck, *EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(4): p. 1227-37.
53. Fusaro, M., S. Cassese, G. Ndrepepa, G. Tepe, L. King, I. Ott, M. Nerad, H. Schunkert, and A. Kastrati, *Drug-eluting stents for revascularization of infrapopliteal arteries: updated meta-analysis of randomized trials*. *JACC Cardiovasc Interv*, 2013. **6**(12): p. 1284-93.
54. Joner, M., A.V. Finn, A. Farb, E.K. Mont, F.D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H.K. Gold, and R. Virmani, *Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(1): p. 193-202.
55. Drachman, D.E., E.R. Edelman, P. Seifert, A.R. Groothuis, D.A. Bornstein, K.R. Kamath, M. Palasis, D. Yang, S.H. Nott, and C. Rogers, *Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in*

Literaturverzeichnis

- composition and arrest of growth over six months.* J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(7): p. 2325-32.
56. Grube, E., S. Silber, K.E. Hauptmann, R. Mueller, L. Buellesfeld, U. Gerckens, and M.E. Russell, *TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions.* Circulation, 2003. **107**(1): p. 38-42.
57. Ong, A.T., E.P. McFadden, E. Regar, P.P. de Jaegere, R.T. van Domburg, and P.W. Serruys, *Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents.* J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(12): p. 2088-92.
58. Eisenstein, E.L., K.J. Anstrom, D.F. Kong, L.K. Shaw, R.H. Tuttle, D.B. Mark, J.M. Kramer, R.A. Harrington, D.B. Matchar, D.E. Kandzari, E.D. Peterson, K.A. Schulman, and R.M. Califf, *Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation.* JAMA, 2007. **297**(2): p. 159-68.
59. Palmerini, T., G. Biondi-Zoccai, D. Della Riva, A. Mariani, P. Genereux, A. Branzi, and G.W. Stone, *Stent thrombosis with drug-eluting stents: is the paradigm shifting?* J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(21): p. 1915-21.
60. Palmerini, T., G. Biondi-Zoccai, D. Della Riva, C. Stettler, D. Sangiorgi, F. D'Ascenzo, T. Kimura, C. Briguori, M. Sabate, H.S. Kim, A. De Waha, E. Kedhi, P.C. Smits, C. Kaiser, G. Sardella, A. Marullo, A.J. Kirtane, M.B. Leon, and G.W. Stone, *Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis.* Lancet, 2012. **379**(9824): p. 1393-402.
61. Joner, M., G. Nakazawa, A.V. Finn, S.C. Quee, L. Coleman, E. Acampado, P.S. Wilson, K. Skorija, Q. Cheng, X. Xu, H.K. Gold, F.D. Kolodgie, and R. Virmani, *Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents.* J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(5): p. 333-42.
62. Simon, C., J.C. Palmaz, and E.A. Sprague, *Influence of topography on endothelialization of stents: clues for new designs.* J Long Term Eff Med Implants, 2000. **10**(1-2): p. 143-51.
63. Finn, A.V., G. Nakazawa, M. Joner, F.D. Kolodgie, E.K. Mont, H.K. Gold, and R. Virmani, *Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1500-10.
64. King, L., R.A. Byrne, J. Mehilli, A. Schomig, A. Kastrati, and J. Pache, *Five-year clinical outcomes of a polymer-free sirolimus-eluting stent versus a permanent polymer paclitaxel-eluting stent: final results of the intracoronary stenting and angiographic restenosis - test equivalence between two drug-eluting stents (ISAR-TEST) trial.* Catheter Cardiovasc Interv, 2013. **81**(1): p. E23-8.
65. Duda, S.H., M. Bosiers, J. Lammer, D. Scheinert, T. Zeller, V. Oliva, A. Tielbeek, J. Anderson, B. Wiesinger, G. Tepe, A. Lansky, M.R. Jaff, C. Mudde, H. Tieleman, and J.P. Beregi, *Drug-eluting and bare nitinol stents for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery: long-term results from the SIROCCO trial.* J Endovasc Ther, 2006. **13**(6): p. 701-10.

Literaturverzeichnis

66. Dake, M.D., G.M. Ansel, M.R. Jaff, T. Ohki, R.R. Saxon, H.B. Smouse, T. Zeller, G.S. Roubin, M.W. Burket, Y. Khatib, S.A. Snyder, A.O. Ragheb, J.K. White, L.S. Machan, and P.T.X.I. Zilver, *Paclitaxel-eluting stents show superiority to balloon angioplasty and bare metal stents in femoropopliteal disease: twelve-month Zilver PTX randomized study results*. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(5): p. 495-504.
67. Siablis, D., D. Karnabatidis, K. Katsanos, A. Diamantopoulos, N. Christeas, and G.C. Kagadis, *Infrapopliteal application of paclitaxel-eluting stents for critical limb ischemia: midterm angiographic and clinical results*. *J Vasc Interv Radiol*, 2007. **18**(11): p. 1351-61.
68. Siablis, D., D. Karnabatidis, K. Katsanos, A. Diamantopoulos, S. Spiliopoulos, G.C. Kagadis, and J. Tsolakis, *Infrapopliteal application of sirolimus-eluting versus bare metal stents for critical limb ischemia: analysis of long-term angiographic and clinical outcome*. *J Vasc Interv Radiol*, 2009. **20**(9): p. 1141-50.
69. Rastan, A., K. Brechtel, H. Krankenberg, R. Zahorsky, G. Tepe, E. Noory, U. Schwarzwald, R. Macharzina, T. Schwarz, K. Burgelin, S. Sixt, T. Tubler, F.J. Neumann, and T. Zeller, *Sirolimus-eluting stents for treatment of infrapopliteal arteries reduce clinical event rate compared to bare-metal stents: long-term results from a randomized trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(7): p. 587-91.
70. Scheinert, D., K. Katsanos, T. Zeller, R. Koppensteiner, P. Commeau, M. Bosiers, H. Krankenberg, I. Baumgartner, D. Siablis, J. Lammer, M. Van Ransbeeck, A.C. Qureshi, H.P. Stoll, and A. Investigators, *A prospective randomized multicenter comparison of balloon angioplasty and infrapopliteal stenting with the sirolimus-eluting stent in patients with ischemic peripheral arterial disease: 1-year results from the ACHILLES trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(22): p. 2290-5.
71. Canaud, L., B.A. Ozdemir, A.M. Belli, I.M. Loftus, M.M. Thompson, and R.J. Hinchliffe, *Infrainguinal angioplasty with drug-eluting stents and balloons*. *J Vasc Surg*, 2014. **59**(6): p. 1721-36.
72. Wessely, R., J. Hausleiter, C. Michaelis, B. Jaschke, M. Vogeser, S. Milz, B. Behnisch, T. Schratzenstaller, M. Renke-Gluszko, M. Stover, E. Wintermantel, A. Kastrati, and A. Schomig, *Inhibition of neointima formation by a novel drug-eluting stent system that allows for dose-adjustable, multiple, and on-site stent coating*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(4): p. 748-53.
73. Stiermaier, T., A. Heinz, D. Schloma, K. Kleinertz, W. Danschel, S. Erbs, A. Linke, E. Boudriot, B. Lauer, G. Schuler, H. Thiele, and S. Desch, *Five-year clinical follow-up of a randomized comparison of a polymer-free sirolimus-eluting stent versus a polymer-based paclitaxel-eluting stent in patients with diabetes mellitus (LIPSIA Yukon trial)*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2014. **83**(3): p. 418-24.
74. Ohlow, M.A., H. von Korn, O. Gunkel, A. Farah, J.T. Fuhrmann, and B. Lauer, *Incidence of adverse cardiac events 5 years after polymer-free sirolimus eluting stent implantation: Results from the prospective Bad Berka Yukon Choice registry*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2014. **84**(7): p. 1080-6.

Literaturverzeichnis

75. Kornowski, R., M.K. Hong, F.O. Tio, O. Bramwell, H. Wu, and M.B. Leon, *In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(1): p. 224-30.
76. Waksman, R., R. Pakala, P. Roy, R. Baffour, D. Hellinga, R. Seabron, R. Chan, M. Scheinowitz, F. Kolodgie, and R. Virmani, *Effect of clopidogrel on neointimal formation and inflammation in balloon-denuded and radiated hypercholesterolemic rabbit iliac arteries*. J Interv Cardiol, 2008. **21**(2): p. 122-8.
77. Finn, A.V., M. Joner, G. Nakazawa, F. Kolodgie, J. Newell, M.C. John, H.K. Gold, and R. Virmani, *Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization*. Circulation, 2007. **115**(18): p. 2435-41.
78. Kim, J.S., J.S. Kim, T.H. Kim, C. Fan, J.M. Lee, W. Kim, Y.G. Ko, D. Choi, M.K. Hong, and Y. Jang, *Comparison of neointimal coverage of sirolimus-eluting stents and paclitaxel-eluting stents using optical coherence tomography at 9 months after implantation*. Circ J, 2010. **74**(2): p. 320-6.
79. Chang, Y.S., S.C. Kuo, S.H. Weng, S.C. Jan, F.N. Ko, and C.M. Teng, *Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from Arnebia euchroma*. Planta Med, 1993. **59**(5): p. 401-4.
80. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 411-52.
81. Wang, J.P., S.L. Raung, L.C. Chang, and S.C. Kuo, *Inhibition of hind-paw edema and cutaneous vascular plasma extravasation in mice by acetylshikonin*. Eur J Pharmacol, 1995. **272**(1): p. 87-95.
82. Beutler, B.A., I.W. Milsark, and A. Cerami, *Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo*. J Immunol, 1985. **135**(6): p. 3972-7.
83. Rankin, E.C., E.H. Choy, D. Kassimos, G.H. Kingsley, A.M. Sopwith, D.A. Isenberg, and G.S. Panayi, *The therapeutic effects of an engineered human anti-tumour necrosis factor alpha antibody (CDP571) in rheumatoid arthritis*. Br J Rheumatol, 1995. **34**(4): p. 334-42.
84. Evans, R.C., L. Clarke, P. Heath, S. Stephens, A.I. Morris, and J.M. Rhodes, *Treatment of ulcerative colitis with an engineered human anti-TNFalpha antibody CDP571*. Aliment Pharmacol Ther, 1997. **11**(6): p. 1031-5.
85. Staniforth, V., S.Y. Wang, L.F. Shyur, and N.S. Yang, *Shikonins, phytochemicals from Lithospermum erythrorhizon, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5877-85.
86. Paravicini, T.M., L.M. Gulluyan, G.J. Dusting, and G.R. Drummond, *Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits*. Circ Res, 2002. **91**(1): p. 54-61.
87. Assimopoulou, A.N. and V.P. Papageorgiou, *Radical scavenging activity of Alkanna tinctoria root extracts and their main constituents, hydroxynaphthoquinones*. Phytother Res, 2005. **19**(2): p. 141-7.

Literaturverzeichnis

88. Zhang, Z.Q., X.C. Cao, L. Zhang, and W.L. Zhu, [Effect of shikonin, a phytocompound from *Lithospermum erythrorhizon*, on rat vascular smooth muscle cells proliferation and apoptosis in vitro]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2005. **85**(21): p. 1484-8.
89. Marx, S.O., T. Jayaraman, L.O. Go, and A.R. Marks, *Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1995. **76**(3): p. 412-7.
90. Creel, C.J., M.A. Lovich, and E.R. Edelman, *Arterial paclitaxel distribution and deposition*. *Circ Res*, 2000. **86**(8): p. 879-84.
91. Axel, D.I., W. Kunert, C. Goggelmann, M. Oberhoff, C. Herdeg, A. Kuttner, D.H. Wild, B.R. Brehm, R. Riessen, G. Koveker, and K.R. Karsch, *Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery*. *Circulation*, 1997. **96**(2): p. 636-45.
92. Authors/Task Force, m., S. Windecker, P. Kolh, F. Alfonso, J.P. Collet, J. Cremer, V. Falk, G. Filippatos, C. Hamm, S.J. Head, P. Juni, A.P. Kappetein, A. Kastrati, J. Knuuti, U. Landmesser, G. Laufer, F.J. Neumann, D.J. Richter, P. Schauerte, M. Sousa Uva, G.G. Stefanini, D.P. Taggart, L. Torracca, M. Valgimigli, W. Wijns, and A. Witkowski, *2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI)*. *Eur Heart J*, 2014. **35**(37): p. 2541-619.
93. van Werkum, J.W., A.A. Heestermans, A.C. Zomer, J.C. Kelder, M.J. Suttorp, B.J. Rensing, J.J. Koolen, B.R. Brueren, J.H. Dambrink, R.W. Hautvast, F.W. Verheugt, and J.M. ten Berg, *Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(16): p. 1399-409.
94. Cassese, S., R.A. Byrne, T. Tada, L.A. King, and A. Kastrati, *Clinical impact of extended dual antiplatelet therapy after percutaneous coronary interventions in the drug-eluting stent era: a meta-analysis of randomized trials*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(24): p. 3078-87.
95. Kolh, P., S. Windecker, F. Alfonso, J.P. Collet, J. Cremer, V. Falk, G. Filippatos, C. Hamm, S.J. Head, P. Juni, A.P. Kappetein, A. Kastrati, J. Knuuti, U. Landmesser, G. Laufer, F.J. Neumann, D.J. Richter, P. Schauerte, M. Sousa Uva, G.G. Stefanini, D.P. Taggart, L. Torracca, M. Valgimigli, W. Wijns, A. Witkowski, G. European Society of Cardiology Committee for Practice, J.L. Zamorano, S. Achenbach, H. Baumgartner, J.J. Bax, H. Bueno, V. Dean, C. Deaton, C. Erol, R. Fagard, R. Ferrari, D. Hasdai, A.W. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M.F. Piepoli, P. Ponikowski, P.A. Sirnes, J.L. Tamargo, M. Tendera, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, E.C.G. Committee, M. Sousa Uva, S. Achenbach, J. Pepper, A. Anyanwu, L. Badimon, J. Bauersachs, A. Baumbach, F. Beygui, N. Bonaros, M. De Carlo, C. Deaton, D. Dobrev, J. Dunning, E. Eeckhout, S. Gielen, D. Hasdai, P. Kirchhof, H. Luckraz, H. Mahrholdt, G. Montalescot, D.

Literaturverzeichnis

- Paparella, A.J. Rastan, M. Sanmartin, P. Sergeant, S. Silber, J. Tamargo, J. ten Berg, H. Thiele, R.J. van Geuns, H.O. Wagner, S. Wassmann, O. Wendler, J.L. Zamorano, C. Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of, S. the European Association for Cardio-Thoracic, and I. European Association of Percutaneous Cardiovascular, *2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI)*. Eur J Cardiothorac Surg, 2014. **46**(4): p. 517-92.
96. Levine, G.N., E.R. Bates, J.C. Blankenship, S.R. Bailey, J.A. Bittl, B. Cercek, C.E. Chambers, S.G. Ellis, R.A. Guyton, S.M. Hollenberg, U.N. Khot, R.A. Lange, L. Mauri, R. Mehran, I.D. Moussa, D. Mukherjee, B.K. Nallamothu, H.H. Ting, F. American College of Cardiology, G. American Heart Association Task Force on Practice, A. Society for Cardiovascular, and Interventions, *2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(24): p. e44-122.
97. Giustino, G., U. Baber, S. Sartori, R. Mehran, I. Mastoris, A.S. Kini, S.K. Sharma, S.J. Pocock, and G.D. Dangas, *Duration of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(13): p. 1298-310.
98. Patrono, C., F. Andreotti, H. Arnesen, L. Badimon, C. Baigent, J.P. Collet, R. De Caterina, D. Gulba, K. Huber, S. Husted, S.D. Kristensen, J. Morais, F.J. Neumann, L.H. Rasmussen, A. Siegbahn, P.G. Steg, R.F. Storey, F. Van de Werf, and F. Verheugt, *Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis*. Eur Heart J, 2011. **32**(23): p. 2922-32.
99. Narayanaswamy, M., K.C. Wright, and K. Kandarpa, *Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research*. J Vasc Interv Radiol, 2000. **11**(1): p. 5-17.
100. Schwartz, R.S., J.G. Murphy, W.D. Edwards, A.R. Camrud, R.E. Vliestra, and D.R. Holmes, *Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries*. Circulation, 1990. **82**(6): p. 2190-200.
101. Schwartz, R.S., K.C. Huber, J.G. Murphy, W.D. Edwards, A.R. Camrud, R.E. Vlietstra, and D.R. Holmes, *Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model*. J Am Coll Cardiol, 1992. **19**(2): p. 267-74.
102. Schwartz, R.S., N.A. Chronos, and R. Virmani, *Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(7): p. 1373-85.

Literaturverzeichnis

103. Nabel, E.G., L. Shum, V.J. Pompili, Z.Y. Yang, H. San, H.B. Shu, S. Liptay, L. Gold, D. Gordon, R. Derynck, and et al., *Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10759-63.
104. Ward, M.R., A. Agrotis, P. Kanellakis, J. Hall, G. Jennings, and A. Bobik, *Tranilast prevents activation of transforming growth factor-beta system, leukocyte accumulation, and neointimal growth in porcine coronary arteries after stenting*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(6): p. 940-8.
105. Andujar, I., J.L. Rios, R.M. Giner, and M.C. Recio, *Shikonin promotes intestinal wound healing in vitro via induction of TGF-beta release in IEC-18 cells*. Eur J Pharm Sci, 2013. **49**(4): p. 637-41.
106. Fan, C., Y. Dong, Y. Xie, Y. Su, X. Zhang, D. Leavesley, and Z. Upton, *Shikonin reduces TGF-beta1-induced collagen production and contraction in hypertrophic scar-derived human skin fibroblasts*. Int J Mol Med, 2015. **36**(4): p. 985-91.
107. Kumamoto, M., Y. Nakashima, and K. Sueishi, *Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance*. Hum Pathol, 1995. **26**(4): p. 450-6.
108. Stefanadis, C., K. Toutouzas, E. Stefanadi, A. Lazaris, E. Patsouris, and N. Kipshidze, *Inhibition of plaque neovascularization and intimal hyperplasia by specific targeting vascular endothelial growth factor with bevacizumab-eluting stent: an experimental study*. Atherosclerosis, 2007. **195**(2): p. 269-76.
109. Lee, H.J., H.J. Lee, V. Magesh, D. Nam, E.O. Lee, K.S. Ahn, M.H. Jung, K.S. Ahn, D.K. Kim, J.Y. Kim, and S.H. Kim, *Shikonin, acetylshikonin, and isobutyroylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice*. Yakugaku Zasshi, 2008. **128**(11): p. 1681-8.
110. Sakaguchi, I., M. Tsujimura, N. Ikeda, M. Minamino, Y. Kato, K. Watabe, I. Yano, and K. Kaneda, *Granulomatous tissue formation of shikon and shikonin by air pouch method*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(6): p. 650-5.
111. Miyoshi, M., T. Kawazoe, H.H. Igawa, Y. Tabata, Y. Ikada, and S. Suzuki, *Effects of bFGF incorporated into a gelatin sheet on wound healing*. J Biomater Sci Polym Ed, 2005. **16**(7): p. 893-907.
112. Mani, H., G.S. Sidhu, A.K. Singh, J. Gaddipati, K.K. Banaudha, K. Raj, and R.K. Maheshwari, *Enhancement of wound healing by shikonin analogue 93/637 in normal and impaired healing*. Skin Pharmacol Physiol, 2004. **17**(1): p. 49-56.

Erklärung zum Eigenanteil

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

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

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Jörg Schmehl und Dr. Benisch von der Firma Translumina.

Die Tierversuche wurden von mir zusammen mit Herrn Dr. med. Jörg Schmehl durchgeführt.

Die Einbettung der Präparate in Paraffin und Methacrylat erfolgte durch Dr. Rainer Kehlbach

Die histologische Aufarbeitung erfolgte selbstständig (nach Einarbeitung durch Jürgen von der Ruhr aus dem anatomischen Institut Tübingen.

Die gesamte Auswertung wurde von mir eigenständig durchgeführt. Bei der Einarbeitung war mir Rainer Kehlbach behilflich.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung durch Frau Annette Stauch vom Institut für Biometrie

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

Tübingen, den 14.06.2016

Markus Dobratz

Danksagung

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Nikolaou für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in der Abteilung für Radiologische Diagnostik durchzuführen zu können.

Meinem Doktorvater, Privatdozent Dr. Ketelsen, danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Schmehl für die gemeinsame Durchführung der Operationen und Angiographien, sowie für die Unterstützung bei der Auswertung dieser Arbeit bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Skutella, Anatomisches Institut, in dessen Einrichtung die Aufarbeitung der Präparate stattfinden konnte, sowie bei Jürgen von der Ruhr für seine tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. Scharpf vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen, der mir bei der Auswertung der Reendothelialisierung behilflich war.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. Kehlbach und Frau Dr. Elser, Zentrum für medizinische Forschung in Derendingen, für ihre immer freundliche und hilfreiche Unterstützung bei allen Fragen der Auswertung.

Bei Frau Anette Stauch vom Institut für Medizinische Biometrie bedanke ich mich herzlich für die ausführliche Beratung in Fragen der statistischen Auswertung.

Lebenslauf

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Markus Michael Dobratz
Geburtsdatum 18. Juli 1986 in Karlsruhe

Ausbildung

Schulbildung

1993-1997 Grundschule Langenalb
09/1997 bis 06/2006 Gymnasium Neuenbürg, **Abitur**

Studium

04/2007 bis 05/2013 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
11.03.2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.05.2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeit

08/2006 bis 04/2007 Wehrdienst: Fallschirmjäger Zweibrücken, KSK Calw
07-09/2007 Pflegepraktikum Krankenhaus Langensteinbach
2007/2008 Studentische Hilfskraft am Biologischen Institut Tübingen, Tutor im Seminar „Biologie für Mediziner“
12/2009 Wahlfach: Diagnostische Radiologie
03/2010 Famulatur Innere Medizin, städt. Klinikum Pforzheim
10/2010 Famulatur Gynäkologie, Universitäts-Frauenklinik Tübingen
03/2011 Famulatur Pädiatrie, Dr. med. Estler, Ammerbuch
04/2011 Famulatur Radiologische Ambulanz, Universitätsklinikum Tübingen
08/2011 Famulatur Pädiatrie, Universitätsklinikum Tübingen
02-05/2012 Praktisches Jahr Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen
06-09/2012 Praktisches Jahr Chirurgie, Universitätsklinikum Tübingen
10/2012 bis 01/2013 Praktisches Jahr Pädiatrie, Universitätsklinikum Tübingen
Seit 03/2014 Assistenzarzt, Universitäts-Kinderklinik Tübingen