

**„Stent Implantation in homozygoten
ApolipoproteinE-defizienten Ratten und die *in vitro* und *in vivo* Evaluation eines geflochtenen
Polyurethan-basierten Stents“**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe Mauricio Borinski
aus Siegen

Berichter: Privatdozent Dr. med. Felix Vogt
Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Die der Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden zwischen Mai 2007-September 2012 in der Medizinischen Klinik I, Klinik für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin des Universitätskrankenhauses der RWTH Aachen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen publiziert:

Fabian Schreiber, Philipp Schuster, **Mauricio Borinski**, Felix Vogt, Rüdiger Blindt, Thomas Gries Improving the mechanical properties of braided shape memory polymer stents by heat setting AUTEX Research Journal, Vol. 10, No3, September 2010 © AUTEX PAPER

Borinski, M., Flege, C., Schreiber, F., Krott, N., Gries, T.; Liehn, E.; Blindt, R., Marx, N., Vogt, F. Introduction of a high-throughput double-stent animal model for the evaluation of biodegradable vascular stents. J Biom Mat Res 2012;100B(8):2023-8.

Mauricio Borinski, Christian Flege, Nicole Krott, Annika Grahl, Nikolaus Marx, Felix Vogt Interleukin-8 and Interleukin-10 dependent elevation of in-stent restenosis in apolipoproteinE deficient rats *submitted August 2012*

Liste der verwendeten Abkürzungen	7
1. Einleitung	11
1.1 Koronare Herzkrankheit	11
1.2 Aufbau der Koronararterien.....	11
1.2.1 Das Endothel	12
1.3 Atherosklerose als inflammatorische Krankheit	12
1.4 Perkutane transluminale Koronarangioplastie	16
1.4.1 Stent Implantation.....	17
1.4.2 In-Stent Restenose.....	18
1.4.3 Drug-eluting Stents.....	19
1.4.4 Aktuelle DES Konzepte	20
1.4.4.1 Sirolimus (Rapamycin)	21
1.4.4.2 Paclitaxel	21
1.4.5 Limitationen momentan im klinischen Einsatz befindlicher Drug-eluting Stents.....	22
1.4.5.1 Drug-eluting Stents der zweiten Generation.....	22
1.4.6 Andere Drug-eluting Stent Strategien.....	23
1.4.7 Neue pharmakologische Ansätze	23
1.4.7.1 Duale pharmakologische Strategien.....	24
1.4.8 Neue Drug-eluting Stent Konzepte	24
1.4.9 Neue Stent Materialien	26
1.4.9.1 Polymere als Stent-Werkstoffe	27
1.4.9.2 Formgedächtnispolymere als alternative Stent-Werkstoffe	27
1.5 Biofunktionalisierung.....	28
1.5.1 Endotheliale Progenitorzellen und vaskuläre Regeneration	31
1.6 Alternatives Stentdesign und Stentherstellung	34
1.7 In vivo Untersuchungen von Stents.....	36
1.7.1 Übersicht über Großtiermodelle zur Erforschung von Mechanismen nach arterieller Gefäßverletzung	37
1.7.1.1 Porcines koronares In-Stent Restenose Modell	37
1.7.1.2 Schafmodell der In-Stent Restenose	38
1.7.1.3 Kaninchenmodell der In-Stent Restenose	38
1.8.1. Übersicht über Mausmodelle der Neointima Formation und der In-Stent Restenose	39

1.8.1.1 Draht-Verletzung („Wire injury“)	39
1.8.1.2 Ballon-Angioplastie	40
1.8.1.3 Stent Implantation in der Arteria carotis communis ohne Ballon	40
1.8.1.4 Stent Implantation in der abdominalen Aorta eines Spendertiers und Interposition in die Arteria carotis communis eines Empfängertiers	41
1.8.1.5 Stent Implantation in der abdominalen Aorta von Mäusen	42
1.8.1.6 Rattenmodell der Neointima Formation und der In-Stent Restenose	43
1.8.1.6.1 Stent Implantation der abdominalen Aorta über eine Mikroinzision in der Aorta	43
1.8.2 Neues Tiermodell zur Erforschung der Mechanismen der Atherosklerose und Restenose Entstehung	44
1.9 Ziel der Arbeit	45
2. Material und Methoden	47
2.1 In vitro	47
2.1.1 Zellkultur	47
2.1.1.1 Präparation der aus dem peripheren Blut stammenden Endothelialen Progenitor Zellen	47
2.1.1.2 Humane Nabelschnurvenen Endothelzellen	47
2.1.1.3 Humane glatte Gefäßmuskelzellen	48
2.1.1.4 Glatte Gefäßmuskelzellen aus thorakaler Rattenaorta	48
2.1.2 <i>In vitro</i> Biokompatibilitätstests	48
2.1.3 Kolorimetrischer Proliferationsassay	49
2.1.4 Zell-Proliferationsassay (5-bromodeoxyuridine-incorporation assay)	49
2.1.5 Statischer Zell-Adhäsions Assay	50
2.1.5.1 Adhäsion an Zellkulturplatten	50
2.1.5.2 Adhäsion an Komponenten der ECM	50
2.1.5.3 Adhäsion an Polyurethan Netze	51
2.1.6 Migrationsassay/Chemotaxis Assay (modifizierte Boyden-Kammer)	51
2.1.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	52
2.1.8 Evaluation der mechanischen Eigenschaften des Polyurethan Stents nach Ballondilatation	52
2.1.9 Statistische Analyse	53

2.2 In vivo	53
2.2.1 Tierstämme und Tierversorgung	53
2.2.2 Ratten-Modell der In-Stent Restenose	54
2.2.2.1 ApoE ^{-/-} Ratten als Modell der In-Stent Restenose	55
2.2.2.2 Blutparameter Analysen	56
2.2.2.3 Interleukin-6, -8 und -10 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	56
2.2.3 Histomorphometrie und immunohistochemische Analyse	56
2.2.3.1 Gewebe-Präparation	56
2.2.3.2 Hämalaun & Eosin Färbung (Polyurethan Stent)	56
2.2.3.3 Giemsa Färbung (Bare-metal Stents)	57
2.2.3.4 Elastica von Gieson Färbung (Polyurethan Stent)	57
2.2.3.5 Histomorphometrische Evaluation	58
2.2.3.6 Histopathologische Analysen:	59
2.3 Materialien	59
2.3.1 Geräte	59
2.3.2 Verbrauchsmaterialien	63
2.3.3 Chemikalien	64
2.3.4 Verwendete Zelllinien	66
2.3.5 Verwendete Zell-Medien	66
2.3.6 Zellzählung	67
3. Ergebnisse	68
3.1 Mechanische Tests des Polyurethan Stents	68
3.1.1 Dilatationsverhalten des Polyurethan Stents	68
3.1.2 Spontaner Recoil des Polyurethan Stents	68
3.2 In vitro Biokompatibilitätstests	69
3.2.1 Proliferationsassays/ Vitalitätsassay	70
3.2.1.1 Proliferationsassays BrdU der rVSMC	72
3.2.2 Migrationsassays	73
3.2.3 Adhäsion an Polyurethan Geflechte	76
3.3 In vivo	79
3.3.1 Sprague Dawley Ratten und BMS	79
3.3.2 ApoE ^{-/-} Ratten und BMS	84
3.3.2.1 Perioperative Mortalität	84

3.3.2.2 Histomorphometrische Analysen ApoE ^{-/-} vs WT	86
3.3.2.3 Histopathologische Analysen.....	88
3.3.2.4 Blutparameter und Interleukine	91
3.4 In vivo Evaluation des Polyurethan Stents	93
3.4.1 Sprague Dawley Ratten und Polyurethan Stent	93
4. Diskussion	97
4.1 Entwicklung der Fragestellung	97
4.2 In vitro.....	97
4.2.1 Biokompatibilität	98
4.2.2 Parakrine & autokrine Mechanismen adulter Stammzellen	99
4.2.3 Adhäsion an PU Geflechte	100
4.2.4 Mechanische Tests.....	101
4.2.4.1 Limitationen geflochtener Strukturen	102
4.2.4.2 Oberflächencharakteristika	104
4.2.4.2.1 Oberflächenenergie	104
4.2.4.2.2 Oberflächenbeschaffenheit.....	105
4.3 In vivo Untersuchungen von Stents.....	106
4.3.1 Stentimplantation der abdominalen Aorta über eine Mikroinzision in der Aorta.....	106
4.3.2 Schlußfolgerungen	108
4.4 Limitationen	109
5. Zusammenfassung	110
5. Summary	111
6. Literaturverzeichnis	112
Anhang	136
Ehrenerklärung	136
Danksagung	137
Veröffentlichungen/Poster/Vorträge	138

Liste der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ASS	Acetylsalicylsäure
Ac-LDL	acetyliertes low density lipoprotein
ASC	Adulte Stammzellen
BM-MNC	aus dem Knochenmark-stammende Mononukleäre Zellen
BMS	Bare Metal Stent (Metallstent)
BSA	bovines Serum Albumin
ND	normale Ernährung
CD	cluster of differentiation
Col	Collagen
cRGD	integrin-bindendens zyklisches Arg-Gly-Asp Peptid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DES	Drug-eluting stent (Medikament-freisetzender Stent)
Dil-Ac-LDL	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labelled Ac-low-density-lipoprotein
EZ	Endothelzelle
ECM	extrazelluläre Matrix
EEL	Lamina elastica externa
EKM	Endothelzellkonditioniertes Medium
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPC	Endotheliale Progenitor Zellen
EPC KM	Endotheliale Progenitor Zell konditioniertes Medium
FITC	Fluorescein isothiocyanate

Liste der verwendeten Abkürzungen

Fn	Fibronektin
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
HE	Hämalaun-Eosin
hEGF	humaner endothelialer Wachstumsfaktor
HDL	high density lipoprotein
HUVEC	humane umbilikale Venenendothelzellen
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule-1, inter zelluläres Zell Adhesionsmolekül-1
IGF	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor
IH	intimale Hyperplasie
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IEL	Lamina elastica interna
ISR	In-Stent restenose
KDR	kinase insert domain Rezeptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density Lipoprotein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Faktor
MACE	major adverse cardiac events
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MNC	Mononukleäre Zelle
MSC	mesenchymale Stammzelle

Liste der verwendeten Abkürzungen

NI	Neointima
OCT	optische Kohärenztomographie
oxLDL	oxidiertes low density Lipoprotein
PBMC	peripheral blood mononuclear cell, mononukleäre Zellen
PCI	percutane transluminale koronare Intervention
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PMC	peripheral mononuclear cells
POBA	Plain old balloon angioplastie, Ballon-Angioplastie
PPAR- γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
PU	Polyurethan
ROS	Reactive Oxygen Species, freie Radikale
SDF	Stromal derived factor
SMA	Shape memory alloy (Formgedächtnislegierung)
SMA	Smooth muscle actin
SMC	Smooth muscle cell = humane glatte Gefäßmuskeltzelle
SMP	shape memory polymer (Form-Gedächtnis Polymer)
SMPC	Smooth muscle progenitor cell, Vorläuferzellen von glatten Gefäßmuskelnzellen
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM	Vascular cell adhesion molecule, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor-receptor-2 vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorsrezeptor-2
Vn	Vitronektin
VLA-4	very late antigen-4
VLDL	very low density Lipoprotein
VSMC	Vascular smooth muscle cell, vaskuläre Gefäßmuskelzelle
vWF	von Willebrandt Faktor
WT	Wildtyp, Sprague Dawley Ratten
XTT	Sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist als Krankheit definiert, bei der atherosklerotische Läsionen der Koronargefäße zu verminderter Blutversorgung im Myokard führen. Diese verminderte Blutversorgung führt zu einer Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) innerhalb des Myokards. Die wichtigsten klinischen Manifestationen sind Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkt und plötzlicher Herztod. Die KHK ist die Haupttodesursache in den westlichen Industrieländern. Allein in Deutschland starben im Jahr 2002 knapp 210.000 Menschen aufgrund von Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, was ungefähr 25% der Gesamtmortalität ausmacht.

1.2 Aufbau der Koronararterien

Koronare Arterien können histologisch in drei Schichten unterteilt werden (Abb. 1). Die innerste Schicht wird als Tunica intima bezeichnet. Sie sorgt für den optimalen Gas- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gefäßwand. Die innerste Schicht ist mit einer Endothelschicht ausgekleidet, flachen Zellen, die sich auf einer Basalmembran befinden. Die Lamina elastica interna (IEL) trennt die Intima von der Media, einem Segment, das in erster Linie aus zirkulär angeordneten glatten Gefäßmuskelzellen, elastischen Fasern, Kollagen Typ I, II & III, Proteoglykanen sowie Fibronectin besteht.

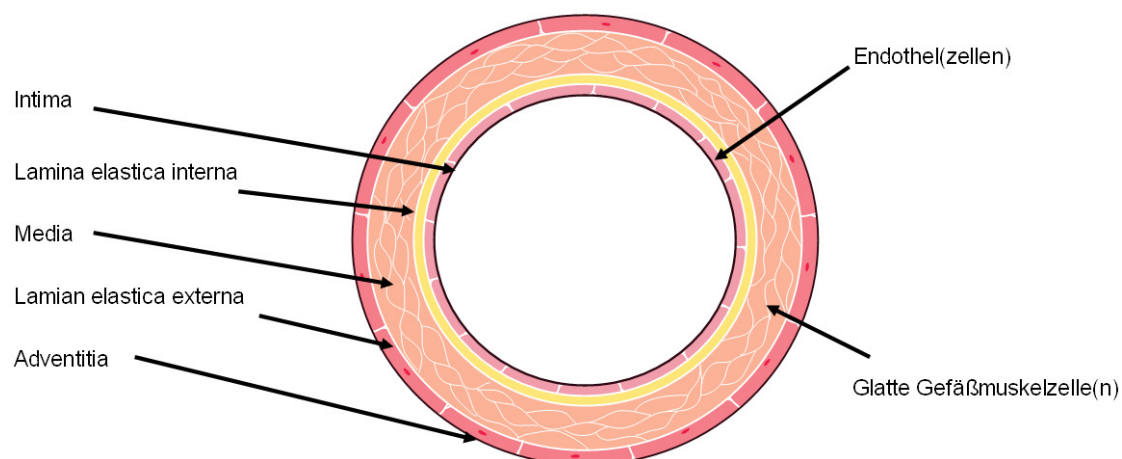


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gefäßwand (Abbildung erweitert und abgeändert nach ¹³⁶)

1. Einleitung

Die Media reguliert die Vasodilatation durch Muskelkontraktion. Pulsschlag und Blutdruck erzeugen eine Spannung, die durch Muskelbewegungen angepasst werden kann. Die Lamina elastica externa (EEL) trennt die Media von der äußeren Schicht, der Adventitia, die hauptsächlich aus Bindegewebe, kleinen Gefäßen und Nerven besteht, welche die Arterie versorgen und in ihrer Umgebung fixieren.

1.2.1 Das Endothel

Das Endothel bildet die innerste Zellschicht der Blutgefäße. Endothelzellen sind keine inerten Zellen, sondern in hohem Maße metabolisch aktiv und spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Funktionen, im Besonderen bei der Regulation des Gefäßtonus, beim Blutzellverkehr, dem hämostatischen Gleichgewicht, der Zell-Proliferation, der Permeabilität, sowie der adaptiven Immunität ⁶⁻⁸. Das Endothel ist in viele, wenn nicht gar alle Krankheitszustände involviert. Entweder als erste pathophysiologische Determinante oder als endotheliale Denudation, einer Endothelzellschädigung, die durch perkutane transluminale (koronare) Intervention (PCI) hervorgerufen wird ⁸.

Ein gesundes Endothel ermöglicht die Gefäßintegrität durch dynamische Mechanismen, welche thrombogene Komplikationen verhindern und die längerfristige Durchlässigkeit gewährleisten ^{30, 241}, was in mehreren Studien mit einer *in vitro* Endothelialisierung durch Endothelzellen auf Implantaten vor der Implantation gezeigt werden konnte ^{137, 200, 226, 227}. Wegen der kosten- und arbeitsintensiven sowie zeitaufwändigen *in vitro* Endothelialisierung ist eine verbesserte *in situ* Endothelialisierung durch modifizierte kardiovaskuläre Implantate mit optimierter Migration und Proliferation der residenten Endothelzellen wünschenswert.

1.3 Atherosklerose als inflammatorische Krankheit

Hauptursache von Kardio- und Zerebralenereignissen ist die Atherosklerose, die häufigste Erkrankung der großen und mittelgroßen

1. Einleitung

muskulären und elastischen Arterien. Die WHO definiert die Artherosklerose als eine „variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Akkumulation von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalzium Ablagerungen, verbunden hieraus resultierenden Veränderungen der Arterienmedia“¹⁷⁸.

Heutzutage wird die Atherosklerose als chronische inflammatorische Krankheit der Gefäßwand bezeichnet^{119, 128, 182} bei der das Endothel eine Hauptrolle spielt³³. Die American Heart Association teilt atherosklerotische Läsionen in 6 Kategorien ein, wobei die Stadien 1-3 als Vorstufen der Stadien 4-6 gelten, die wiederum als fortgeschrittene Läsionen definiert werden. Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose sind Hyperlipidämie (erhöhte Plasma-Low Density Lipoprotein (LDL) Konzentrationen), Hypertension, Nikotinabusus und die Generation von Sauerstoffradikalen (ROS), sowie Diabetes mellitus. Zusätzliche Risikofaktoren wie Adipositas, Hyperurikämie, Stress und familiäre Vorbelastung scheinen ebenfalls von Bedeutung für die Entwicklung der Endothelschädigung zu sein, die ihrerseits zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Nach der „Response to injury“-Theorie ändern sich die endothelialen Funktionen aufgrund der Schädigungen bei denen unterschiedliche kardiovaskuläre Risikofaktoren eine signifikante Rolle spielen^{182, 183}.

Zur endothelialen Dysfunktion führt ein Endothel, das nicht mehr in der Lage ist die vaskuläre Homeostase aufrecht zu erhalten²¹⁸. Dieser Zustand ist u.a. bedingt durch eine reduzierte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) (durch verminderte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)), die von proinflammatorischen Molekülen wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) hervorgerufen wird²⁷⁴. Dies führt zu einer erhöhten Produktion von Vasokonstriktoren, einer gestörten Regulation der Inflammation, zur Thrombose und zum Zellwachstums innerhalb der Gefäßwand^{245, 258}. Diese endotheliale Dysfunktion ist durch die Anlagerung von Thrombozyten, einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), und unterschiedlicher Selektine gekennzeichnet, und bewirkt eine erhöhte Ansammlung von Leukozyten, Monozyten und Lipiden im subendothelialen Raum¹⁸².

1. Einleitung

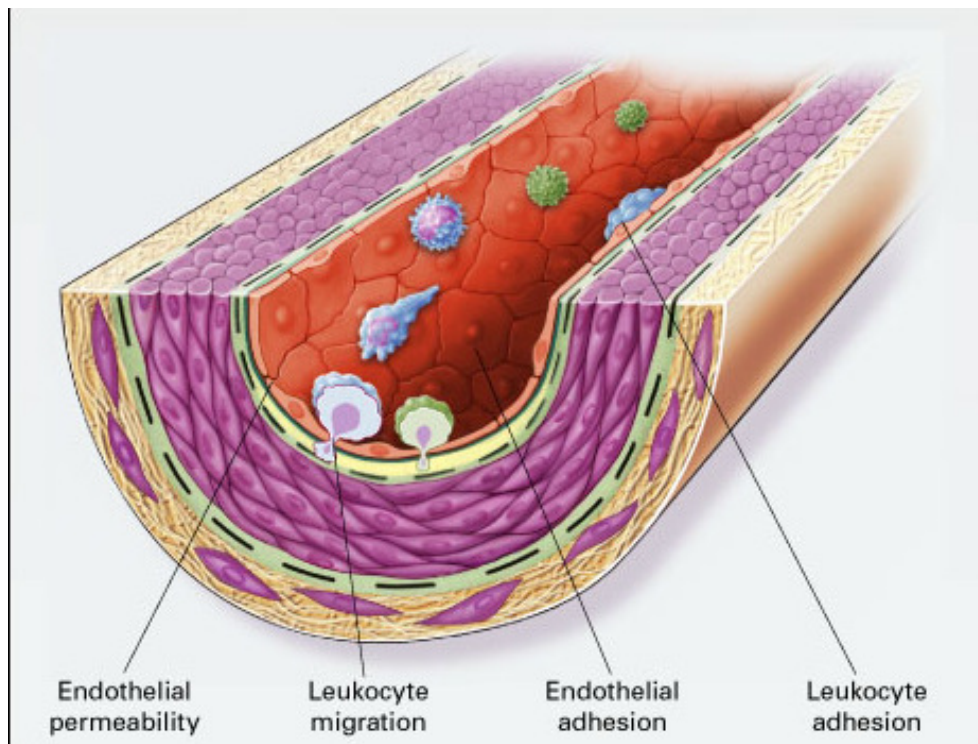


Abb. 2: Schematische Sicht auf die Gefäßwand und der initialen endothelialen Dysfunktion ¹⁸²

Das Austreten von Monozyten aus dem Blutfluss in die subendotheliale Fläche (ein Prozess, der als transendotheliale Migration bezeichnet wird) führt zur Entwicklung von primären Läsionen, sogenannten Fettstreifen ¹⁵¹. Der initiale Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose ist die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion an Stellen turbulenten Blutflusses, welche eine erhöhte Permeabilität für LDL bewirkt und die Akkumulation von LDL in der subendothelialen Fläche erhöht. Das LDL innerhalb der Gefäßwand wird durch freie Radikale zu oxidiertem LDL (oxLDL) umgewandelt, was zu ersten inflammatorischen Reaktionen innerhalb der Gefäßwand führt, die u.a. auf einer Heraufregulation von Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren beruht ²⁷¹⁻²⁷³ (Abb.3).

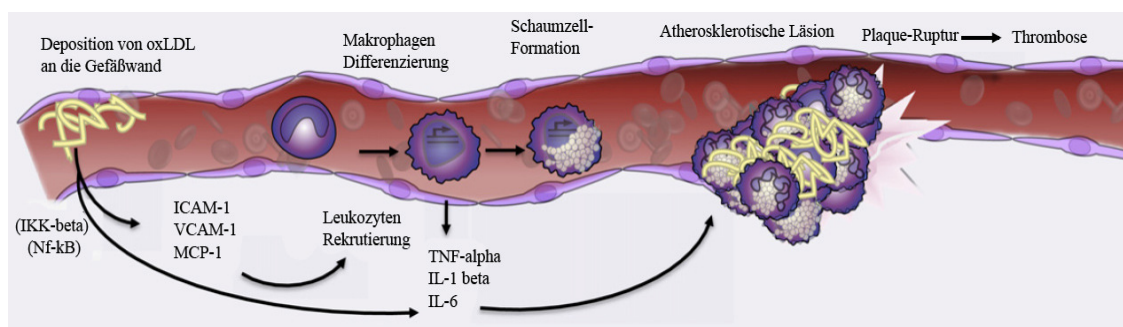


Abb. 3: NF- κ B vermittelt proinflammatorische Signale im Endothel und an Leukozyten, welche die Atherogenese vorantreiben (Abb. aus ¹⁸).

1. Einleitung

Zusätzlich blockiert das oxLDL die Produktion von NO, einem Mediator mit unterschiedlichen antiatherogenen Eigenschaften, u. a. der Steuerung der Vasodilatation und der damit verbundenen Blutdrucksenkung. Andere Faktoren, mit Einfluss auf die ersten inflammatorischen Reaktionen sind: erhöhter Scheerstress (in Gebieten turbulenten Flusses (z.B. der Carotisbifurkation)) und erhöhte Werte von Homocystein und Geschlechtshormonen ^{119, 182}.

Selektine vermitteln die primäre Interaktion zwischen mononukleären Zellen und dem Endothel, während Intergrine und deren Liganden die feste Adhäsion vermitteln. Chemokine aktivieren Integrine und rekrutieren mononukleäre Zellen an Orten der Inflammation und sind dadurch in die Prozesse der Monozyten-Adhäsion und -Migration involviert. Unter Einfluss von ROS und Enzymen (z.B. der sekretorischen Phospholipase A2) wird LDL in oxLDL umgewandelt. Dieses wird von membrangebundenen Scavenger Rezeptoren auf Makrophagen erkannt und von letzteren aufgenommen ¹¹¹, wodurch sie sich zu Schaumzellen („Foam Cells“) umwandeln. Die Expression von Scavenger Rezeptoren ist von Zytokinen wie TNF- α , Interferon (IFN)- γ und Macrophage Colony-Stimulating Faktor (M-CSF) abhängig, die in hohen Konzentrationen von aktivierten Makrophagen sezerniert werden ²²⁹. Zusätzlich setzen Makrophagen nach oxLDL-Aufnahme Chemokine, Wachstumsfaktoren und Hydrolasen wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) frei. Aktivierte Makrophagen exprimieren Major histocompatibility complex (MHC) -II und können diese Antigene den T-Lymphozyten „präsentieren“ und diese dadurch aktivieren. Durch die Aktivierung von T-Lymphozyten und der darauf folgenden Freisetzung von Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α wird der inflammatorische Prozess innerhalb des Plaque verstärkt ⁷⁶.

Der nächste Schritt in der Entwicklung des atherosklerotischen Plaques ist die Bildung einer fibrösen Kappe, welche aus einer Akkumulation von extrazellulären Lipiden (Hauptbestandteil: oxLDL), glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix besteht. Die fibröse Kappe bildet ein Schutzschild gegen den Blutfluss und ihre Effektivität ist sowohl von ihrer Zusammensetzung als auch von der Stabilität der extrazellulären Komponenten, hauptsächlich das durch die glatten Gefäßmuskelzellen sezernierte Kollagen, abhängig. Die Degradation der fibrösen Kappe erfolgt durch die freigesetzten MMP, Kollagenasen und Elastasen. Aktivierte T-Zellen stimulieren die Produktion

1. Einleitung

dieser Enzyme durch Makrophagen und vermindern dadurch die Plaquestabilität ⁵⁹.

Erste Entwicklungen einer atherosklerotischen Läsion beginnen schon in früher Kindheit. Die klinische Korrelation der atherosklerotischen Plaque-Entwicklung zeigt sich an den Herzkranzgefäßen durch eine belastungsabhängige Angina Pectoris. Eine weitere Erhöhung der Belastung kann zur Plaque Ruptur führen, welche sich als akutes Koronar Syndrom (ACS), akuter Herzinfarkt (MI) oder plötzlicher Herztod manifestiert. Die Wahrscheinlichkeit der Plaque Ruptur korreliert weniger mit der Behinderung des Blutflusses als vielmehr mit der Vulnerabilität des Plaques.

Eine Plaque Ruptur findet sich häufig in der Schulterregion der fibrösen Kappe, dem Übergang zwischen der modifizierten arteriellen und der gesunden Gefäßwand. Dabei kommt thrombogenes Material in den Blutfluss, und aktiviert die Coagulationskaskade. Das führt zu einem Gefäßverschluss und den oben genannten klinischen Manifestationen.

Die wichtigsten Mechanismen für die Plaque Destabilisierung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen sezernierte MMPs degradieren Extrazellulärmatrixkomponenten, die zur Mazeration der fibrösen Kappe führen.
2. Zunahme von Makrophagen und Lymphozyten innerhalb des Plaques erhöhen die Konzentration inflammatorischer Moleküle innerhalb der Gefäßwand.
3. Die Neovaskularisation innerhalb des Plaques beginnt in der Tunica media und wird durch inflammatorische Mediatoren unterstützt. Durch vermehrtes Einströmen von inflammatorischen Zellen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Blutpenetration in den Plaque.

1.4 Perkutane transluminale Koronarangioplastie

Die Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) stellt die am häufigsten durchgeführte Krankenhaus-basierte Intervention weltweit dar. Über 1.000.000 Interventionen werden in den Vereinigten Staaten von Amerika

1. Einleitung

jährlich durchgeführt ¹⁴ und neueste Schätzungen gehen von weltweit ca. 5 Millionen Drug-eluting Stents (DES) Implantationen pro Jahr aus ²⁰⁶. 1977 wurde diese Intervention durch Andreas Grüntzig und Kollegen eingeführt ⁷⁴.

Dabei wird ein Plastikkatheter über einen femoralen oder brachialen Zugang über die abdominale Aorta und den Aortenbogen bis zu den verschlossenen, bzw. verengten Koronararterien vorgeschoben. Mittels Röntgenstrahlung und unter Verwendung von röntgendichten Materialien kann der Katheter beim Vorschieben bis zur Gefäßverengung verfolgt werden. Ein vormontierter Ballon an der Spitze des Katheters weitet die Gefäßverengung mittels Druck. Dieser Prozess wird als Angioplastie („Plain old balloon angioplasty“ (POBA)) bezeichnet.

Bei der Weitung kann es zur Überdehnung der Gefäßwand und einem negativen Remodelling kommen, die die Resultate der Intervention verschlechtern. Um dieses negative Remodelling zu verhindern wird in 90% der Interventionen ein metallisches Gerüst (Stent) an Stellen, an denen das Gefäß geweitet wurde, implantiert. Im Jahre 2004 wurden ca. 250.000 Koronare Interventionen durchgeführt ²⁴⁰. 2008 wurden bereits ca. 300.000 Koronare Intervention gemeldet ²³⁷. In den USA war die KHK im Jahre 2007 für 1 von 6 Toten, d.h. 17% aller Todesfälle, verantwortlich. Über 400.000 Tote wurden in den USA 2007 der KHK zugeschrieben und Schätzungen gehen von jährlich 785.000 neuen koronaren Anfällen und 470.000 erneuten Anfällen aus. Statistisch gesehen gibt es in den USA alle 25 Sekunden eine Herzattacke und in jeder Minute stirbt ein US-Amerikaner daran ¹⁸⁰. Obwohl neue Therapieoptionen und die Reduktion von Risikofaktoren die Häufigkeit von Herztodesfällen während der letzten Dekade deutlich verringert haben, bleibt die Anzahl der Toten nach wie vor hoch.

1.4.1 Stent Implantation

Die Verwendung von perkutan eingeführten prothetischen Implantaten zur Aufrechterhaltung der luminalen Integrität wurde bereits 1964 - schon lange vor der Einführung der PTCA - von Dotter und Judkins vorgeschlagen ⁴⁹. Im Jahre 1985 führten Palmaz und Kollegen ¹⁶² erstmals die Verwendung von Ballon-montierten Stents in periphere Gefäße ein. Bei der ersten Generation vaskulärer Stents handelte es sich um kleine metallische Gerüste, die das Schrumpfen und das negative Remodelling nach Angioplastie verhinderten. Im

1. Einleitung

Vergleich zur allein durchgeführten POBA ohne prothetisches Implantat zeigte sich, dass die Stentimplantation in Verbindung mit einer dualen anti-Plättchen Therapie (DAPT) das Outcome verbesserten und das Langzeit-negative Remodelling verhinderten^{21, 139, 171, 201, 202, 230}. Obwohl die Stentimplantation das negative Remodelling, bzw. den Recoil (elastische Rückstellkräfte¹⁹⁰) verhindert, bewirkt die Implantation via Ballon einen Verlust der Endothelzellschicht und ein Überdehnen der Arterie, wodurch ein inflammatorischer Reiz hervorgerufen wird, der zur Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie zur Sekretion von Extrazellulären-Matrix (ECM) Komponenten führt. Diese Prozesse stellen die Hauptursachen des Wiederverengens und der Neointima Formation nach intravaskulärer Intervention dar. Der Verlust von Lumen innerhalb eines Gefäßsegments, das durch einen Stent gestützt wird, wird als In-Stent Restenose (ISR) bezeichnet (Abb. 4).

1.4.2 In-Stent Restenose

ISR ist die wichtigste langfristige Limitation nach Stentimplantation, die bei 15-60% der Patienten auftritt⁵³. In idealen koronaren Läsionen wird von 15-20% ISR Raten berichtet, allerdings betragen die ISR Raten bei Patienten mit komplexen Läsionen (z.B. kleinen Gefäßen oder Bifurkationsläsionen, die ungefähr 15% der zu behandelnden Läsionen ausmachen) 30-60%^{53, 83}. Aufgrund des durch das metallische Gerüst hervorgerufenen inflammatorischen Reizes und der endothelialen Denudation, wechseln die glatten Gefäßmuskelzellen der Media von einem bewegungslosen in einen migratorischen, proliferierenden und sekretorischen Phänotypen. Darüber hinaus dringen Monozyten bzw. Makrophagen in die Gefäßwand sezernieren Zytokine, Chemokine und Komponenten der ECM und werden in den Blutfluss abgegeben.

1. Einleitung

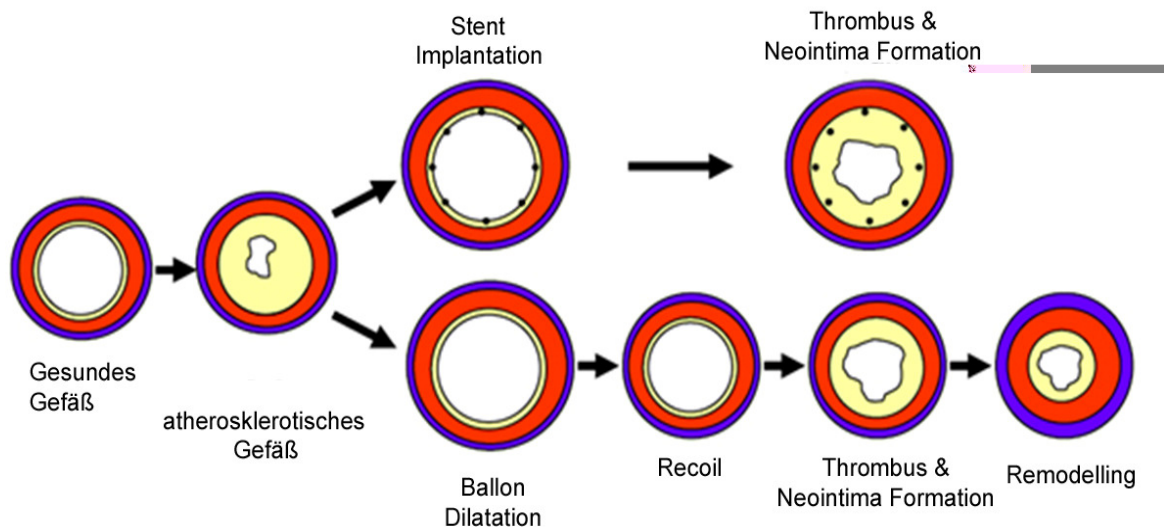


Abb. 4: Schematische Darstellung der Phasen der Restenose und ISR nach POBA, bzw. Stentimplantation (Abb. aus ²¹¹)

Die Einführung von DES konnte die ISR Raten im Vergleich zu den ISR Raten bei BMS signifikant reduzieren.

1.4.3 Drug-eluting Stents

Die Einführung der ersten Generation von DES hat die Inzidenz der ISR nach PCI, welche für mehr als eine Dekade die Achilles Ferse der interventionellen Kardiologie darstellte, deutlich verringert. Mehrere klinische Studien haben die Überlegenheit der DES in Bezug auf das Auftreten von „major adverse cardiac events“ (MACE, also Herzinfarkte, Tod) nach PCI im Vergleich zu BMS gezeigt ^{93, 142, 192, 212-214}. Basierend auf diesen Daten konnte eine ISR Rate von 8-15% in Abhängigkeit der Komplexität der Läsionen ermittelt werden ⁸³. Die verbleibende ISR kann durch die Limitationen der verwendeten Medikamente erklärt werden, die nicht zellspezifisch wirken und somit auch andere Zelltypen, wie Endothelzellen inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein funktionelles, intaktes Endothel Voraussetzung für die Verhinderung des neointimalen Wachstums nach PCI ¹⁰⁸ ist. Da die bisher verwendeten Medikamente nicht zellspezifisch sind, kommt es zu verlangsamten und unvollständigen Reendothelialisierungen ^{124, 127, 235}, die für die Entwicklung von späten und sehr späten Stent Thrombosen nach Absetzen der DAPT verantwortlich sein könnten. Hayashi et al. zeigten, dass sowohl Paclitaxel® als auch Sirolimus® zur Autophagie von Endothelzellen führen und

1. Einleitung

dadurch die Reendothelialisierung beeinflussen⁷⁸. Kurz nach der durch PCI verursachten Endothelverletzung beginnt die komplexe Kommunikation zwischen der subendothelialen Matrix, aktivierten Plättchen, zirkulierenden inflammatorischen und Progenitorzellen (Endothelialen Progenitorzellen (EPC)), und den Vorläuferzellen von glatten Gefäßmuskelzellen (SMPC))^{39, 191, 255}. Eine schnelle Reendothelialisierung in der existierenden Läsion ist essentiell um die Thrombose an der Gefäßwand zu verhindern, weshalb die direkte Anlockung (ein „Homing“) von endothelialen Vorläuferzellen durch Biofunktionalisierung vaskulärer Implantate als viel versprechender Ansatz gilt.

1.4.4 Aktuelle DES Konzepte

Momentan verwendete DES besitzen ein metallisches Rückgrat aus rostfreiem Stahl oder Cobalt-Chrom, das mit dem eines BMS vergleichbar ist. Zusätzlich dazu besitzen sie eine oder mehrere Polymerschichten in denen ein antiproliferativ wirkendes Medikament inkorporiert wird. Stents können ein offenes oder geschlossenes Stent-Zellen Design und unterschiedliche Zellgrößen haben, was jedoch einen Einfluss auf die Gleichmäßigkeit der Medikamentfreisetzung hat^{94, 95}. Dennoch stellen DES die erste erfolgreiche Applikation eines kontrollierten Medikamentenfreisetzungsystems in der interventionellen Kardiologie zur Behandlung der KHK dar²⁶¹. Dabei wird die kontrollierte Medikamentfreisetzung durch Diffusion aus der Polymerbeschichtung oder durch Degradation der Polymerbeschichtung, den osmotischem Druck oder Ionen-Austausch ermöglicht². Unterschiedliche Methoden der Medikamentfreisetzung von einer Stentplattform wurden vorgeschlagen, z.B. die Verwendung nicht polymerer Medikamentbeschichtungen¹¹⁶, die kovalente Medikamentanlagerung durch Linkermoleküle, Medikamenteinflössende Polymer-Medikament-Infusions Hülzen¹⁴⁸ und nicht absorbierbare oder bioabsorbierbare Polymerträger.

Die Nutzung von Polymeren ermöglicht eine kontrollierte Freisetzungskinetik des Medikaments in die Gefäßwand, mit dem Hauptziel die Inhibition der Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen zu gewährleisten^{131, 132, 134}. Die zurzeit am häufigsten verwendeten Medikamente bei DES sind Rapamycin (Sirolimus) (Sirolimus-freisetzender Koronarstent, Cypher® stent, Cordis, Johnson & Johnson, USA), Paclitaxel (Taxus™, Boston Scientific, USA), Everolimus (Xience V, Guidant, Abbott, USA) Zotarolimus

1. Einleitung

(Resolute Stent, Medtronic Cardiovascular, USA ²⁴⁷) und Biolimus A9 (Biomatrix, Biosensors Int.). Diese Medikamente inhibieren die SMC Proliferation durch unterschiedliche Mechanismen.

1.4.4.1 Sirolimus (Rapamycin)

Rapamycin ist ein Immunsuppressivum, das durch das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird und aus einer Erdprobe von der Osterinsel Rapa Nui isoliert wurde ^{17, 199, 243}. Das Medikament wird mit einer Konzentration von 140 µg/cm² in eine nicht degradierbare Polymerschicht aus Polyethylen co-Vinylacetat und Poly-butylmethacrylat ¹⁴¹ inkorporiert. 80% des Medikaments werden innerhalb der ersten 30 Tage freigesetzt. Rapamycin verhindert die SMC Proliferation durch ein Blocken des Zellzyklus im Übergang der G1 zur S Phase, was zu einer verminderten Neointimabildung führt. Gleichzeitig beeinflusst es aber auch andere Zelltypen (Endothelzellen und EPC) und verhindert somit eine rasche Reendothelialisierung ⁷⁸. Zudem scheint Rapamycin die Apoptose von EPC zu induzieren ¹²⁴. Aufgrund dieser Limitation wurden unterschiedliche Analoga (Everolimus, Biolimus) entwickelt, doch auch diese Analoga scheinen die gleichen negativen Eigenschaften wie Sirolimus zu besitzen.

1.4.4.2 Paclitaxel

Paclitaxel wurde 1971 aus der pazifischen Eibe isoliert ²⁵². Es induziert ein Anhalten im Zellzyklus und verhindert dadurch die Bildung einer Neointima ⁸¹. Es ist extrem lipophil, was zu einer schnellen zellulären Aufnahme des Medikaments führt. Paclitaxel beeinflusst die Zusammensetzung der Mikrotubuli in stabile, aber desorganisierte und dysfunktionale Polymere. Dadurch kann sich keine mitotische Spindel bilden, die zur Zellteilung (hauptsächlich in der G2/M Phase des Zellzyklus), dem intrazellulären Transport und der Aufrechterhaltung der zellulären Struktur vonnöten ist. ¹⁸⁴. Auch Paclitaxel wirkt nicht zellspezifisch.

1.4.5 Limitationen momentan im klinischen Einsatz befindlicher Drug-eluting Stents

Hauptnachteile der zurzeit verwendeten Stents sind die Eigenschaften des Metalls und ihr lebenslanger Verbleib im Gefäß. Die bereits implantierten Stents behindern dadurch eventuell notwendige Interventionen („Target Vessel Revascularisation“ (TVR)); man benötigt eine langwierige und kostenintensive DAPT um vor Stent Thrombosen (ST) zu schützen. Da DES die Reendothelialisierung beeinflussen, sind die Langzeiteffekte der DES auf die ISR bisher nicht abzusehen, denn eine ISR kann auch nach der vollständigen Medikamentenfreisetzung vom Stent aufgrund der unvollständigen Reendothelialisierung und des anhaltenden inflammatorischen Reizes entstehen. Studien belegten, dass bei Patienten mit komplexen Läsionen (kleinen Gefäßen, Bifurkation- und Multigefäßläsionen als auch bei Patienten mit DM) nach wie vor hohe ISR Raten (>20%) auftreten ⁷³. In einer Studie von Nakazawa et al. konnte gezeigt werden, dass DES die Atherosklerose in Halsschlagadern im Vergleich zu BMS beschleunigten ⁵⁸. Zusätzlich zeigt das Metallgerüst der aktuellen Stentgeneration Artefakte bei den an Bedeutung zunehmenden nicht invasiven Methoden, wie der optischen Kohärenz Tomographie (OCT).

Wegen dieser Nachteile und der zu erwartenden Zunahme von PCI sind alternative Stent Konzepte dringend erforderlich. Dabei erscheint der Umstieg auf Polymere als Werkstoffe für die Stentherstellung und eine Biofunktionalisierung der kardiovaskulären Implantate als besonders viel versprechend.

1.4.5.1 Drug-eluting Stents der zweiten Generation

Aufgrund der Limitationen der DES der ersten Generation wurden verbesserte Stents mit neuem Design und neuen Beschichtungen und neuen Medikamenten entwickelt (z.B. der Everolimus-freisetzende Xience V Stent, Abbott Vascular Devices, USA, der Zotarolimus-freisetzende Resolute, Medtronic CardioVascular, USA oder ein Tacrolimus freisetzender Stent ⁷²). Diese Stents der zweiten Generation demonstrierten eine Überlegenheit gegenüber den DES der ersten Generation ²⁴⁷.

1.4.6 Andere Drug-eluting Stent Strategien

Hauptproblem der momentanen Strategien ist der Einsatz von Medikamenten, die unspezifisch wirken, somit auch die Proliferation von Endothelzellen inhibieren und zu unvollständiger Implantatreendothelialisierung führen, welche das Vorkommen von Stentthrombosen begünstigt ²³⁵.

Andere pharmakologische Ansätze wurden bisher in zahlreichen Studien überprüft und bestanden, u. a. aus der Applikation von Hormonen, wie Estradiol ^{1, 186}, der Applikation des Reduktaseinhibitors Cerivastatin ¹⁰⁰, dem antimigratorischen Medikament Batimastat ¹¹⁸, als auch Antioxidantien wie Probucol und Carvedilol ^{106, 257}. In humanen Studien konnten die vielversprechenden Ergebnisse aus präklinischen Modellen jedoch häufig nicht bestätigt werden.

1.4.7 Neue pharmakologische Ansätze

Die Integrität des Endothels ist wichtig, da das Endothel als Barriere zwischen Blut und subendothelialen Matrixproteinen fungiert. Es verhindert die Infiltration von inflammatorischen Zellen und die Thrombusformation; es reguliert den Gefäßdruck und kontrolliert die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen ^{64, 65}. Deswegen ist es wichtig die Mechanismen der endothelialen Regeneration nach Denudation genauer zu erforschen, um zukünftigen therapeutischen Strategien - nicht nur nach Angioplastie oder Stent Implantation - den Weg zu ebnen. Adulte Stammzellen erscheinen als therapeutische Zellquellen zur Beschleunigung der Reendothelialisierung und deren Rekrutierung an Orte der Neovaskularisation ähnelt den Prozessen einer inflammatorischen Reaktion. Sobald diese Zellen an die verletzte Gefäßwand rekrutiert wurden, interagieren diese mit dem denudierten Endothelmonolayer, sowie dies Leukozyten mit reifen Endothelzellen tun ²⁶⁵. Neben der Regulation des EPC Homings durch Chemokine, stellen die Adhäsionsmoleküle der Selektin und Integrin Familien eine wesentliche Komponente als Schlüsselregulatoren des EPC Homings in der „Roll-Phase“ und der festen Arretierung an Endothelzellen und an Komponenten der ECM sowohl *in vivo* als

1. Einleitung

auch *in vitro* dar. Selbst Vorläuferzellen von glatten Gefäßmuskelzellen scheinen an der Sekretion von Chemokinen beteiligt zu sein und haben einen Einfluss auf die Adhäsion von EPC^{87, 270}. Wenn EPC an Orte vaskulärer Läsionen rekrutiert werden und fest adhären, tragen diese zur Wiederherstellung des Endothels bei. Dies kann durch Differenzierung zu reifen Endothelzellen als auch durch parakrine Effekte geschehen und beeinflusst die Migration und Proliferation der umliegenden Endothelzellen^{47, 231} detailliert gereviewed in⁶⁸. Chemokine (Interleukin-1, -6 und -8, Macrophage Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)), Zytokine (Macrophage migratory inhibitory factor (MIF), Selektine (P-Selectin und E-Selectin), Adhäsionsmoleküle (Integrine, Angio associated migratory cell Protein (AAMP)) und deren Rezeptoren (ICAM, VCAM, P-Selectin Glykoprotein Ligand -1 (PSGL-1)), Transkriptionsfaktoren (z.B. NF-κB Transkriptionsfaktorenfamilie) stellen, aufgrund ihrer Rolle bei der Leukozyten, bzw. EPC-Aktivierung und Rekrutierung, interessante Medikamentenziele bei der Behandlung von inflammatorischen und Immunkrankheiten dar. Eine weitere vielversprechende Möglichkeit stellt die Applikation von small interfering RNA (siRNA) von einer Stentplattform mit Polymerbeschichtung zur lokalen Genetherapie innerhalb der arteriellen Gefäßwand dar¹⁸⁷.

1.4.7.1 Duale pharmakologische Strategien

Eine duale Strategie, die eine frühe Elution proendothelialer und antiproliferativer Substanzen aus der Beschichtung und einer späteren Elution von antiinflammatorischen Substanzen aus dem Kern eines Stents vorsieht, scheint vielversprechend^{112, 155}. Zusätzlich dazu scheinen Strategien, die luminal die Reendothelialisierung durch EPC/Endothelzellen fördern und abluminal die Proliferation der SMC inhibieren vielversprechend²⁵⁷.

1.4.8 Neue Drug-eluting Stent Konzepte

Neue Ansätze für zukünftige DES beinhalten die Verwendung neuer Materialien (z.B. Formgedächtnis-Legierungen (z. B. Nitinol²⁰⁸), nicht degradierbare und biodegradierbare Polymere oder biodegradierbare Metalle (reines Eisen, Magnesiumlegierungen¹²⁹)), neuer Verarbeitungstechniken (3D-Flechten, Selektives Laser Schmelzen („Selective Laser Melting“ SLM)) und einer Biofunktionalisierung der Implantate. Hauptaugenmerk für neue

1. Einleitung

Stentkonzepte ist die Fähigkeit des Stents *in situ* abgeworfen/implantiert zu werden (die Zustellbarkeit „Deliverability“). Zusätzlich dazu müssen die Stents eine ausreichende Haltbarkeit, Sicherheit (Schutz vor Stentthrombosen) und Effektivität (Reduktion der ISR) aufweisen ²⁵⁷. Allerdings sind diese Faktoren häufig voneinander abhängig (Abb. 5). Zusätzlich muss die stützende Struktur und das Design (Material, Geometrie, Strebendicke), die Bio- und Blutkompatibilität, die chemische Zusammensetzung, das Korrosionsverhalten und die pharmakologische Strategie bei zukünftigen Ansätzen berücksichtigt werden.



Abb. 5: Die Hauptkomponenten aktueller DES Plattformen (Abb. adaptiert nach ²⁵⁷).

Aus der klinischen Sichtweise sollte ein idealer Stent folgende Eigenschaften aufweisen:

- Implantierbarkeit an jeder Stelle innerhalb des koronaren arteriellen Systems
- geringer Diameter, hohe Flexibilität und gute „Trackability“
- präzise Platzierung und gute Sichtbarkeit (Röntgendicht)
- vorhersehbares und exaktes Expansionsverhalten mit geringer Verkürzung
- ausreichende Radialfestigkeit
- verhindern von Plaqueüberhängen durch viele Stentstreben und kleinen Flächen zwischen den Streben

1. Einleitung

- Erlauben eines Zugangs zu Seitenästen durch einige Flächen zwischen den Streben mit ausreichender Größe (gerade bei Bifurkationsstenosen)
- Reduktion der akuten thrombotischen und inflammatorischen Prozesse innerhalb der Gefäßwand, z.B. durch einige dünne Stentstreben
- Ermöglichen der Wundheilung und Verhinderung von erhöhtem neointimalem Wachstum
- Thromboresistenz und hohe hydrodynamische Kompatibilität
- Zugriff auf das Gefäß bei eventuell zusätzlich anfallenden Interventionen (Target-Läsion Revaskularisation (TLR) und Bypass-OP)
- Verschwinden nach ungefähr 6 Monaten

All diese Anforderungen, die ein zukünftiger Stent haben sollte, erscheinen bisher als inkompatibel ¹⁷⁵.

1.4.9 Neue Stent Materialien

Ein optimaler Stent sollte das Gefäß solange stützen wie es eine Stützfunktion benötigt, sollte einen antiproliferativen Effekt auf SMC ausüben, die Implantatreendothelialisierung beschleunigen und eine minimale Entzündung hervorrufen. Zurzeit werden die meisten klinisch verwendeten Stents aus rostfreiem Stahl hergestellt und besitzen dadurch nur eine limitierte Flexibilität im Vergleich zur umgebenden Gefäßwand, und stellen somit eine signifikante Diskrepanz dar ²⁶². Selbst wenn die strukturelle Anpassung eines Metallstents an das Gefäß angepasst wird, kann eine lokale Steifigkeit der Stentstreben zu signifikant erhöhtem lokalem Stress auf die Gefäßwand führen ²³. Zusätzlich können die miniaturisierten Stentstreben dann nur eine beschränkte Menge an pharmakologischen Substanzen in ihre dünne Beschichtung aufnehmen ⁵².

Die Praktikabilität und Biokompatibilität von Stents auf Polymerbasis zeigte kontroverse Ergebnisse. Vor allem haben frühe Studien gezeigt, dass es aufgrund von Polymerbeschichtungen zu einer erhöhten inflammatorischen Antwort des Gefäßes kommen kann ^{55, 238}. Des Weiteren wurde eine erhöhte Thrombogenität von Polymerstents in mehreren Studien beobachtet ^{122, 211, 238}. Allerdings zeigten Polymere auch vielversprechende Resultate ^{122, 246, 264} wie, z.B. der Igaki-Tamai PLLA Polymer Stent, der der erste bioabsorbierbare Polymer Stent war, der 1999 in Menschen implantiert wurde ²²⁰. Da es häufig zu

1. Einleitung

einer erneuten Behandlung der Läsion kommen kann ("Target lesion Revascularization" TVR), wäre ein biodegradierbarer Stent ideal. Ein komplett degradierbarer Stent, der das Gefäß stützt, solange es einer Stützfunktion bedarf und dann verschwindet sobald der Recoil und die Umgestaltungsprozesse („Remodelling“) abgeschlossen sind, hat mehrere theoretische Vorteile ²⁰³. Mehrere Versuche wurden bereits mit degradierbaren Materialien wie z.B. PDLLA ^{220,25}, oder einer Kombination von PLLA und Poly(4-hydroxybutyrate) ⁷⁰, Magnesium ¹⁵⁷ oder korrodierbarem Eisen ^{167, 168} durchgeführt und zeigten unterschiedliche Ergebnisse in Tier ²⁶⁴ und human Studien.

1.4.9.1 Polymere als Stent-Werkstoffe

Polymere werden zurzeit als Biomaterialien in Implantaten, Operationsinstrumenten, Wundabdeckungen und Medikament-liefernden Systemen („Drug delivery Systems“) eingesetzt ^{117, 189}. In Abhängigkeit von seiner jeweiligen Verwendung muss das verwendete Polymer unterschiedliche Funktionen erfüllen, z.B. müssen Polymerstents eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen, um so der Lumenverengungen zu verhindern. Das Design ist ebenso wichtig, wie die Materialauswahl und die *in vivo* Performance ²⁶⁷⁻²⁶⁹.

Hauptvorteile von Polymer-basierten Stents sind die erhöhte Kapazität zur Inkorporation von pharmakologischen Substanzen, die Biokompatibilität und in manchen Fällen die Biodegradabilität ^{37, 52, 160}. Zudem könnten Polymer-basierte Stents potentielle Vorteile wie eine verbesserte Anpassung an die Gefäßwand („Compliance matching“), günstige Herstellung als auch die Verwendung von Stereolithographie für maßgeschneiderte Implantate ³⁸ bieten. Bei Polymeren lassen sich die Oberflächen auf molekularer Ebene modifizieren ¹⁶⁰ und bei manchen Polymeren kann ein Form-Gedächtnis-Effekt zur minimal invasiven Implantation ausgenutzt werden ^{52, 248}.

1.4.9.2 Formgedächtnispolymere als alternative Stent-Werkstoffe

Formgedächtnispolymere (FGP) wurden 1984 in Frankreich entwickelt und kurze Zeit später in Japan, Korea, China und in anderen Ländern Europas

1. Einleitung

auf den Markt gebracht und bieten sich in besonderer Weise an, da sie ihre Form aktiv und in vorbestimmter Weise ändern können und diese Änderungen durch unterschiedliche Stimuli, wie Licht, Wärme, ein elektrisches oder magnetisches Feld oder durch Kontakt mit Wasser induziert werden. Der Formgedächtniseffekt basiert auf der segmentierten molekularen Struktur, einem Block-Copolymer, das ein hartes und ein weiches Segment besitzt. Das harte Segment bildet eine Netzfunktion innerhalb des Polymers aus und ist für die permanente Form verantwortlich. Das weiche Segment dagegen ist für die temporäre Form und für den Formgedächtniseffekt hauptverantwortlich. Dabei beeinflussen zwei charakteristische Temperaturen den Formgedächtniseffekt: Die Glasübergangstemperatur (T_g) des weichen Segments und die Schmelztemperatur (T_s) des harten Segments. Bisher sind die meisten FGP thermoplastische und duroplastische Polymersysteme auf Polyurethan-Basis. Die Glasübergangstemperatur (T_g) reicht von -70°C bis $+100^\circ\text{C}$ und bietet somit eine große Bandbreite an potentiellen Anwendungen. Der Formgedächtniseffekt der Polymere ist um ein Vielfaches höher als der von Formgedächtnislegierungen²⁰⁹. Diese FGP weisen mit $\sim 1.13 - 1.25 \text{ g cm}^{-3}$ eine wesentlich geringere Dichte als die bereits im klinischen Einsatz befindliche Formgedächtnis-Legierung Nitinol auf ($6.4 - 6.5 \text{ g cm}^{-3}$). Ein weiterer Vorteil der Polymersysteme ist ihre Blut- und Gewebekompatibilität. Erste Untersuchungen mit gefalteten tubulären FGP Stents wurden bereits durchgeführt²⁴⁸. Ein thermaler Formgedächtniseffekt im Bereich der Körpertemperatur, sowie die Möglichkeit (z. B. antiproliferative/proendotheliale^{26, 15}) Medikamente in die Polymermasse zu inkorporieren, machen diese Polymergruppe für medizinische Applikationen interessant⁹.

1.5 Biofunktionalisierung

Seit Jahren wird an der Verbesserung der Oberflächeneigenschaften von Implantaten mit Blutkontakt geforscht. Die Hämkompatibilität kann durch passive (Gold, Heparin, Carbon, Silikoncarbid, Phosphorylcholine) und aktive Beschichtungen (anti-thrombotisch, anti-inflammatorisch, anti-proliferativ) verbessert werden¹⁶⁵. Weitere Möglichkeiten bieten eine mikro- und nano-

1. Einleitung

Strukturierung, Zelleitlinienstrukturen, Beschichtungen mit inkorporierten Substanzen, die die Oberflächen-induzierte Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden verringern, sowie die Verarbeitung neuartiger inerter biokompatibler Polymere. Mehrere pharmakologisch aktive Substanzen (Polysaccharide, Heparin, Hyaluronsäure; antiinflammatorische Substanzen wie Salicylsäure; NO, das die Thrombogenität verringert) wurden bereits an synthetische Polymere gekoppelt. Trotz zahlreicher Oberflächenmodifikationen und –Verbesserungen stellt das native Endothel die beste Oberfläche im Blutkontakt dar ²⁴². Zahlreiche Untersuchungen über das „Säen“ („Cell Seeding“) von Endothelzellen auf synthetischen Materialien (Grafts ^{45, 138} oder ganzen, künstlich hergestellten Gefäßen ¹⁵³) wurden in den letzten Jahren durchgeführt.

Zur Besiedlung von Implantaten benötigt man autologe Endothelzellen, die man durch eine Biopsie erhalten kann, die *in vitro* vervielfältigt werden und auf den vaskulären Graft gesetzt werden müssen. Diese Prozesse sind jedoch zeitintensiv und kostspielig, Kontaminations- und Infektionsanfällig, eine Alterierung des Endothelzell-Phänotyps und der Funktion kann auftreten und eine zweite Operation erforderlich machen. Alternativ könnten die Zellen von Spendern genutzt werden, was wiederum den permanenten Gebrauch von immunsuppressiv wirkenden Medikamenten notwendig macht, um einer Abstoßung vorzubeugen ²⁴².

Bei der Biofunktionalisierung geht es unter anderem darum autologe, adulte Stammzellen aus dem Knochenmark zu mobilisieren, die Zellen an den Stent, bzw. das Implantat zu locken, die Adhäsion an den Stent zu ermöglichen/ zu verbessern und die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen zu beeinflussen, bzw. in die gewünscht Richtung zu lenken ⁴⁰.

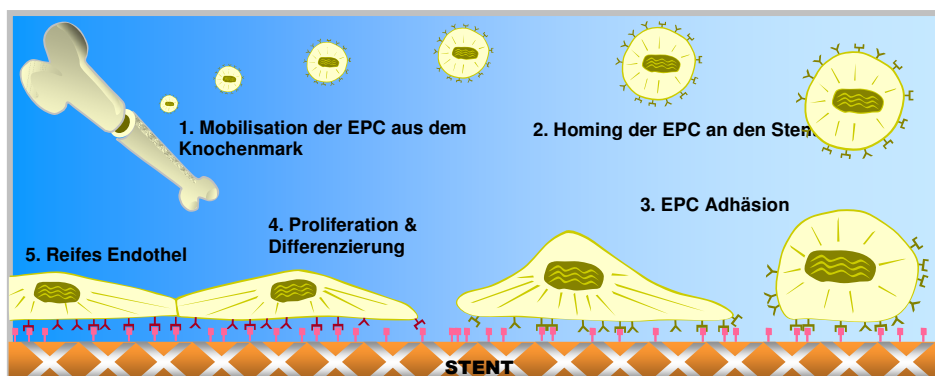


Abb. 6: Schematische Darstellung der *in situ* Stent-Endothelialisierung

1. Einleitung

Dabei gibt es unterschiedliche Strategien, die das „Fishing for EPC“ verbessern sollen: die Nutzung von Antikörpern, Peptiden, magnetischen Molekülen, Oligosacchariden oder Aptameren ²⁴². So wurde z.B. ein Stent entwickelt, der mit einem gegen CD34 gerichteten Antikörper beschichtet ist ^{20, 36}. Dieser Antikörper soll die Anlockung von CD34⁺ Zellen (hämatopoetischen Stammzellen) ermöglichen, die als adulte Stammzellen die Fähigkeit besitzen sich in reifes Endothel zu differenzieren und damit die Wiederherstellung des Endothels beschleunigen könnten (schematische Darstellung in Abb. 6 & 7).

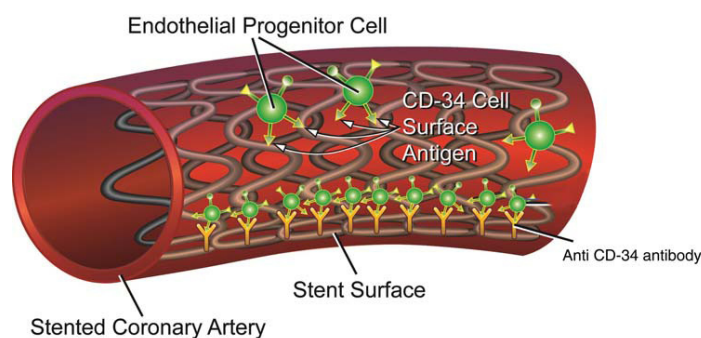


Abb. 7: Schematisches Diagramm des „EPC-Kaperung“ („EPC-Capturing“) Prinzips (Abb. aus ⁶⁰).

Ein weiteres vielversprechendes Zielmolekül zum Kapern von EPC aus dem Blut an ein Implantat scheint der VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) darzustellen. Unter geringem Scherstress konnte *in vitro* demonstriert werden, dass es möglich ist, mit einem absorbierten und Protein-G orientierten, monoklonalen anti VEGFR-2 Antikörper möglich war VEGFR-2 positive Endothelzellen (HUVEC) aus dem Fluss heraus an eine Oberfläche zu kapern ^{130, 242}. Da EPC durch die Expression von VEGFR-2 charakterisiert werden, konnten diese durch einen auf einer Oberfläche immobilisierten VEGFR-2 Antikörper ebenfalls angelockt werden ²⁴². In einer weiteren Studie wurden EPC durch einen mit vaskulärem endotheliale Cadherin beschichteten Stent rekrutiert, wodurch eine reduzierte Neointima Formation als auch eine beschleunigte Implantatre endothelialisierung im Kanninchen Tiermodell erzielt wurde ¹²⁰. Diese Strategie besitzt den Vorteil, dass VE-Cadherin auf 99.1% der untersuchten EPC vorkommt, wohingegen nur 58,6% der EPC CD34 positiv waren ¹²⁰.

1. Einleitung

Außerdem wurden unterschiedliche Peptid-Sequenzen der ECM Komponenten Fn¹⁶⁹ (REDV⁸⁸, PHSRN¹⁵⁴, GRGDSP und RGD), Laminin (IKLLI, IKVAV²²³, LRE, PDSGR, RGD, und YIGSR) und Kollagen-I (DGEA²⁵⁶), die das Zellverhalten beeinflussen können, isoliert und auf Materialien aufgebracht um die biologischen Eigenschaften zu verbessern. So wurde ein Stent entwickelt, der mit einem zyklischen Arginin-Glycin-Asparagin (cRGD) Peptid beschichtet war und dadurch einen Teil der Peptidesequenz der ECM Komponenten Fn und Vn nachahmt. Dieser Stent zeigte eine verminderte Restenose Rate und eine beschleunigte Implantatreendothelialisierung im Vergleich zu unbeschichteten Stents. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die beschleunigte Reendothelialisierung zu verminderter Neointimaformation im Vergleich zu Kontrollstents nach 28 und 84 Tagen im porcinen Modell führte. Diese Effekte wurden durch die vermehrte Rekrutierung von EPC an den Stent erklärt²⁶.

1.5.1 Endotheliale Progenitorzellen und vaskuläre Regeneration

„One cautionary note is that, to paraphrase an old joke, if you ask five “EPC” researchers what kind of cells they study, you’ll get six answers.”²¹⁰

Die erste detaillierte Beschreibung der Isolation von vermeintlichen EPC wurde von Asahara und Kollegen im Jahr 1997 publiziert¹⁶. Die Autoren berichteten darin von der Isolation CD34⁺ Zellen aus peripherem humanem Blut mittels magnetischer Mikrobeads. Die Zellen wurden auf Fn-beschichteten Flaschen kultiviert und wuchsen zu einem endothelialen Phänotyp heran. Durch weitere Untersuchungen wurden mehrere Marker entdeckt, die die funktionelle endotheliale Progenitorzelle charakterisieren: CD133⁺ (adulte Stammzell Marker), CD34⁺, CD45⁻ (Leukozyten-Marker) und VEGFR-2 (auch als „kinase insert domain receptor“ (KDR) oder „Flk-1“ bezeichnet)^{85, 232, 233, 101, 61}. Diese Zellen können aus dem Knochenmark, der fötalen Leber, peripherem oder Nabelschnurblut isoliert werden und formen, sobald sie auf Fn-beschichteten

1. Einleitung

Zellkulturflaschen kultiviert werden, Monolayer mit einem typischen Kopfsteinpflaster ähnlichen endothelialen Erscheinungsbild (Abb. 8) ¹⁴³. Sie haben die Fähigkeit kapillare Strukturen in Matrigel zu bilden, und sie besitzen die Fähigkeit endothelspezifisches Lektin (z. B. *Ulex europaeus* agglutinin-1) zu binden als auch acetyliertes low-density lipoprotein (acLDL) zu inkorporieren ^{144,104,176}.

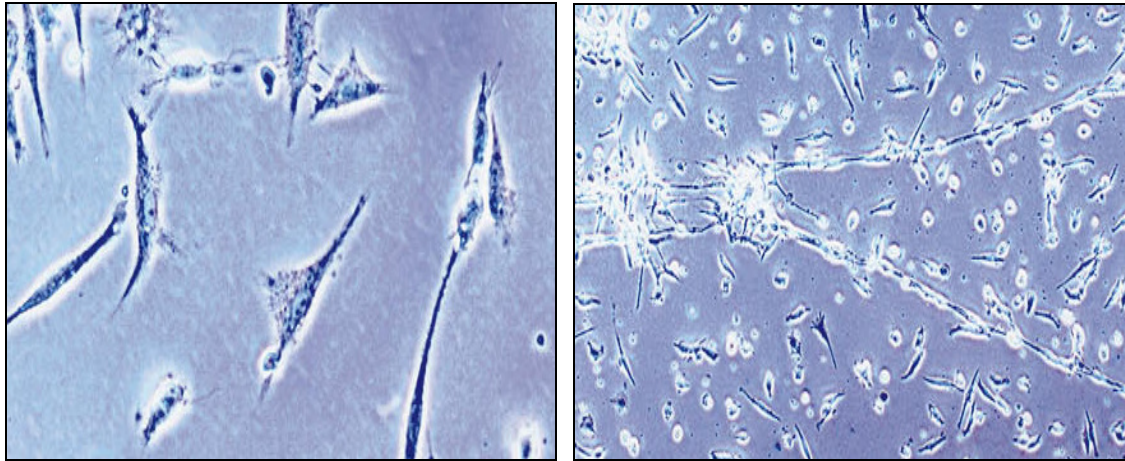


Abb. 8: Spindelförmige Zellen nach 7 Tagen Zellkultur in MV-2 Medium (links). Netzwerk formation von EPC nach 7 Tagen Kultur auf Fibronectin-beschichteten Flaschen. (Abb. aus ¹⁶)

Die Anzahl von CD133⁺ Zellen in nicht-mobilisiertem peripheren Blut ist gering und liegt bei ~0.002% der gesamten peripheren Mononukleären Zellen ((PBMC) ~3000-5000 Zellen/ml Blut ¹⁶³), weswegen eine beschleunigte *in situ* Reendothelialisierung durch eine erhöhte Mobilisation von zirkulierenden EPC aus dem Knochenmark erstrebenswert ist ⁵. Durch Applikation unterschiedlicher Substanzen (HMG-CoA Reduktase Inhibitoren (Statinen), Estradiol, Peroxisome proliferator activated Rezeptor gamma (PPAR-γ) -Antagonisten, CXCR4-Antagonisten (AMD3100), VEGF, Erythropoietin, Angiopoietin-1, Granulocyte Colony-Stimulating Faktor (G-CSF); Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Faktor (GM-CSF), Stromal-derived Factor-1 (SDF-1), Hepatozyten Growth Factor (HGF), Leukaemia Inhibitory Factor und Interleukin-8 (IL-8)) lässt sich die Anzahl von zirkulierenden EPC ^{77, 98, 140, 221, 260} bis auf ein 10faches steigern. Allerdings zeigte die Langzeitbehandlung mit Statinen (10-40 mg/Tag für > 8 Wochen) in Patienten mit KHK eine dosisabhängige Reduktion der EPC Level in *in vitro* Untersuchungen ⁸⁶.

Die Wirkung der Signalfaktoren hängt von deren lokalen Konzentrationen, deren Interaktionen mit anderen Molekülen (Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen usw.), Zelltypen und deren

1. Einleitung

Aktivierungsstatus ab. Zum Beispiel können VEGF und Interleukin-1 β (IL-1 β)^{205, 224} die Endothelialisierung aufgrund ihrer Rollen bei der Endothelzellen Proliferation und Migration verbessern, als auch zu unerwünschter intimalen Hyperplasie beitragen, wenn sie von ePTFE Grafts freigesetzt werden^{173, 249}. Neueste Studien erklären die positiven Effekte (z.B. die beschleunigte Reendothelialisierung), die den EPCs zugeschrieben werden, eher durch parakrine Effekte, als durch direkte Zelldifferenzierung in reife Endothelzellen¹⁷².

Momentan ist ungeklärt, ab wann und ob sich EPC in reife Endothelzellen *in vivo* umwandeln können, doch der Startpunkt scheint die Migration der Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die Zirkulation zu sein. Eine weitere Möglichkeit könnte der Verlust des Stammzellmarkers CD133 und des hematopoietischen Stammzellmarkers CD34, sowie die parallele oder darauf folgende Expression von endothelialen Markern wie, z.B. von Willbrandt Faktor (vWF), eNOS und E-Selektin sein^{16, 104}. Diese Eigenschaften gelten als endothelzellspezifisch und scheinen die Maturation der zirkulierenden EPC hin zu adhärenen reifen Endothelzellen zu bestätigen. Allerdings existiert zurzeit keine genaue Definition der EPC. So wird diese Bezeichnung häufig in der Literatur verwendet um monozytäre Zellen, die aus dem Blut isoliert wurden und endotheliale Eigenschaften aufweisen, proangiogene Faktoren sezernieren und nicht in Endothelzellen differenzieren, verwendet. Andere wiederum meinen mit EPCs Zellen, die aus dem Blut stammen und in reife Endothelzellen differenzieren oder es bereits waren. Wieder andere bezeichnen EPCs als Zellen, die aus dem Knochenmark stammen und eine Vielzahl von spezifischen Markern exprimieren. Andere meinen Zellen aus dem Embryo. Viele Forschergruppen haben ihre Zellen mit dem Namen EPC bezeichnet, selbst wenn diese Zellpopulationen wenige Gemeinsamkeiten mit den durch Asahara beschriebenen Zellen aufwiesen. Demnach muss man bei EPC Studien stets im Hinterkopf behalten, dass es sich um eine Vielzahl von Zelltypen handeln kann²¹⁰. Einheitliche Isolations- und Zellkulturbedingungen könnten dabei Abhilfe schaffen.

1. Einleitung

1.6 Alternatives Stentdesign und Stentherstellung

Die mechanische Stabilität geflochtener Netze erscheint hinreichend für den Einsatz als vaskuläre Implantate. Um Netze mittels einer Flechtmaschine herzustellen, muss das Ausgangsmaterial (Polymer, Metall) in eine Filament-Struktur überführt werden, was durch Schmelzspinnen erfolgt. Mit dieser Technik sind Polyurethan-Monofilamente mit Durchmessern von 10µm bis 2mm herstellbar. In der Flechtmaschine lassen sich anschließend unterschiedliche Parameter [Stentlänge, Stentdurchmesser, Flechtwinkel, Anzahl der Monofilamente (8x/16x/24x)] variieren und an die speziellen Anforderungen, z.B. die eines Koronarstents, angepasst⁸⁴ (Abb. 9).

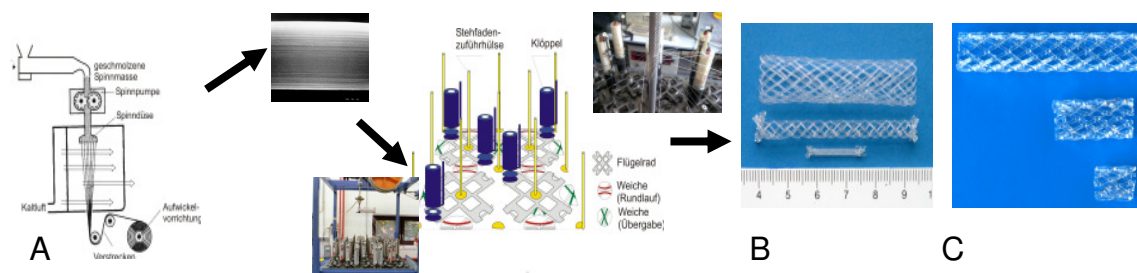


Abb. 9: **A:** Herstellung von PU-Monofilamenten und vaskulären Implantaten aus Monofilamenten mittels 3D-Flechttechniken **rechts:** verschiedene Stent Prototypen **B:** vor und **C:** nach Wärmebehandlung (Abb. von Fabian Schreiber, Prof. Thomas Gries, Institut für Textiltechnik ITA, RWTH Aachen)

PU Stents der ersten Generation zeigten eine deutliche Reaktion auf eine Inkubation bei 37°C (Abb. 10). Die Verkürzung der Monofilamente führte zu einer Verengung des Lumen. Darüber hinaus zeigten die PU Stents eine geringe Radialfestigkeit (Abb. 8). Um die Radialfestigkeit der PU Stents zu erhöhen wurde eine Wärmebehandlung bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (110°C und 125°C), bei der die Kreuzungspunkte der Monofilamente miteinander verschmolzen.

1. Einleitung



Abb. 10: PU Stent erster Generation: PU Stent (12 Monofilamente, 200µm Monofilamentdurchmesser, 45°C Flechtwinkel, 2fache Verstreckung) nach 1stündiger Inkubation bei 37°C.

Die Wärmebehandlung der PU Stent führte zu einer erhöhten Radialfestigkeit (Abb. 11, Abb. 12) ¹⁹⁴, allerdings ging diese auf Kosten der Flexibilität. Zusätzlich ging der Formgedächtniseffekt des Polymers verloren, der in Abb. 10 zu sehen ist.



Abb. 11: PU Stent zweiter Generation: PU Stent (12 Monofilamente, 100µm Monofilamentdurchmesser) nach Wärmebehandlung bei 125°C (Maßstabsbalken = 3mm).

1. Einleitung

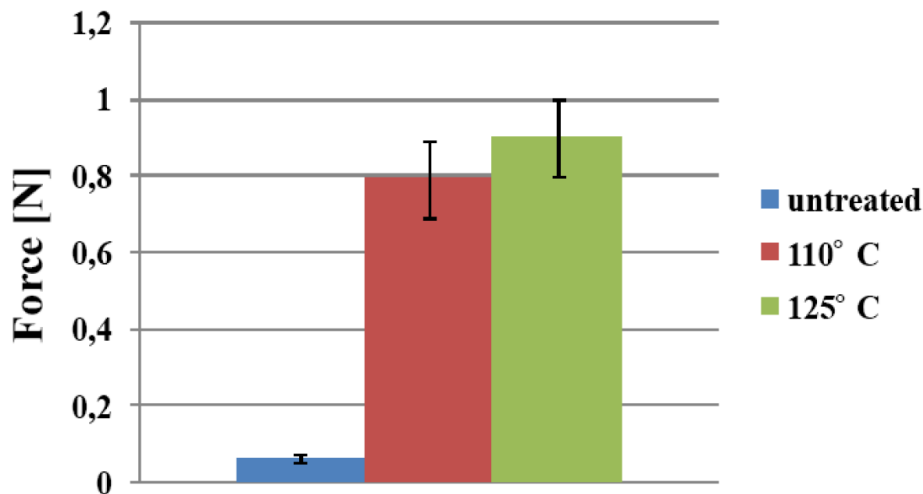


Abb. 12: Vergleich von drei unterschiedlich behandelten Polyurethan - Stents. Gezeigt ist die Kraft, die für eine radiale Kompression von 1mm benötigt wurde (Abb. aus ¹⁹⁴).

1.7 In vivo Untersuchungen von Stents

Aus der großen klinischen Bedeutung der ISR als langfristiges Problem für die Behandlung der KHK resultieren intensive wissenschaftliche Bemühungen hinsichtlich medizintechnischer Fortschritte. *In vitro* und *in vivo* Evaluationen haben zahlreiche Erkenntnisse über die Entstehung der Restenose geliefert und klinischen Studien gingen erfolgreiche Tierversuche voraus. Dabei zeigte sich jedoch oftmals, dass Interventionen, die im Tierversuch erfolgreich waren, nicht auf den Menschen übertragbar waren. Nichtsdestoweniger ist der Tierversuch, wegen der komplexen, multifaktoriellen Entstehung der ISR eine unverzichtbare Annäherung an menschliche Verhältnisse. Dabei kann man auf eine Reihe von Großtiermodellen der ISR zurückgreifen, von denen das porcine Koronare ISR Modell und das Kaninchen Arteria iliaca ISR Modell die am häufigsten eingesetzten Tiermodelle sind ^{197, 198, 215, 236, 238, 250}. Vor allem sind die Prozesse nach Gefäßverletzung (Ballondilatation oder Stentimplantation) bei Schweinen und Menschen ähnlich ¹⁹⁸. Großtiermodelle (Hunde, Primaten) stellen aufgrund ihrer stark eingeschränkten Verfügbarkeit, der Kosten und der Gefäßgröße (koronar als auch peripher) interessante Möglichkeiten dar ¹⁶⁶, weisen jedoch tierartspezifische Limitationen auf: So sind z. B. Hunde resistent gegen eine Neointimaformation nach PCI oder Stent Implantation ¹⁹⁵. Obwohl nicht humane

1. Einleitung

Primaten mehrere Vorteile hinsichtlich ihrer phylogenetischen Verwandtschaft, Ernährung, metabolischer Analogien der Disposition zur Entwicklung metabolischer und kardiovaskulärer Krankheiten sowie akuter Thrombosen nach vaskulären Interventionen bieten, haben ethische Bedenken, hohe Kosten und die potentielle Möglichkeit viraler Zoonosen^{19, 166, 185} die Vorteile dieser Modelle in Frage gestellt.

1.7.1 Übersicht über Großtiermodelle zur Erforschung von Mechanismen nach arterieller Gefäßverletzung

1.7.1.1 Porcines koronares In-Stent Restenose Modell

Da das Gefäßsystem von Schweinen, hinsichtlich ihrer Gefäßmorphologie, die Gefäßgröße, die relative kollaterale arterielle Versorgung, die Anwesenheit eines gut entwickelten Vasa vasorum, die generelle Physiologie und das Coagulationssystems^{71, 126, 166}, dem von Menschen ähnelt, stellt das porcine koronare ISR-Modell ein wichtiges Modell zur Evaluation neuer therapeutischer Ansätze dar. In diesem Modell lassen sich kommerziell erhältliche Stents in die linke und rechte Koronararterie implantieren. Zusätzlich dazu kann man neue Führungsdrähte und Katheter austesten. Obwohl dieses material- und personalintensive Großtiermodell nicht einfach durchzuführen ist, wird es häufig verwendet. Die Tiere erhalten eine duale anti-Plättchen Therapie, die mit der beim Menschen vergleichbar ist (75mg Clopidogrel und 100mg ASS pro Tag, die 3 Tage vor Intervention begonnen und bis zur Tötung aufrechterhalten wird.)^{25, 246}. Das Stent zu Arterie-Verhältnis während der Implantation reicht von 1.1 bis 1.2. Eine Hauptlimitation des Modells ist die Tatsache, dass Schweine keine atherosklerotischen Läsionen wie Menschen bilden und die Stents damit in gesunde Gefäße implantiert werden. Zudem entwickeln Schweine eine abgeschwächte Inflammation nach Implantation von BMS, Polymer-beschichteten und Polymer-freien DES^{42, 149, 150} in Koronaren oder peripheren Applikationen⁵⁰. Zusätzlich dazu zeigen Schweine eine eosinophile Reaktion auf die endovaskulären Implantate, die bei anderen Tiermodellen wie Ratten, Mäusen, Kaninchen, Hunden, Schafen oder Primaten nicht beobachtet werden konnte^{13, 48}.

1. Einleitung

1.7.1.2 Schafmodell der In-Stent Restenose

Schafe stellen aufgrund ihres menschenähnlichen fibrinolytischen Systems, dem Coagulationssystem und der koronaren Anatomie ein weiteres interessantes Tiermodell zur Erforschung der Mechanismen der ISR dar¹⁰³. Die Antwort auf die vaskuläre Verletzung ist bei Schafen mit der bei Schweinen vergleichbar¹³. Das Schafmodell bietet ausreichend große Bifurkationen des Koronargefäßsystems, sodass dieses Modell die Evaluation von Bifurkationsstents ermöglicht.

1.7.1.3 Kaninchenmodell der In-Stent Restenose

Kaninchen sind eine der am meisten untersuchten Tierart, die spontane und ernährungsinduzierte Atherosklerose ausbilden¹⁵². Eine Angioplastie (mit oder ohne Stent Implantation) kann sowohl in der Aorta, den Halsschlagadern und der Arteria iliaca durchgeführt werden. Die Dimensionen der iliofemorale Arterien sind mit denen der menschlichen Koronarien vergleichbar und eignen sich zur Evaluation von kommerziell erhältlichen Implantaten¹⁶⁶. Nach Einführen eines 3.0mm x 20mm Angioplastieballons werden die Arterien 3mal verletzt. Dieses Trauma führt zu einer endothelialen Denudation und subsequenter Neointima Formation. Zusätzlich können, je nach Fragestellung, 3.0mm x 15mm große Stents in die femoral Arterien implantiert werden⁴⁶. Die Tiere erhalten eine fettreiche Ernährung, die 2 Wochen vor der Intervention beginnt. 1 Tag vor der Intervention erhalten die Tiere eine duale anti Plättchentherapie, die aus 12.5 mg ASS und 12.5 mg Clopidogrel pro Tag besteht und oral appliziert wird¹²¹. Es konnte gezeigt werden, dass die Raten und Phasen der vaskulären Heilung nach Stentimplantation im normocholesterolämischen Kaninchen Arteria iliaca Modell, denen der standardisierten Schweine Koronar ISR Modells ähneln^{166, 196, 244}. Zusätzlich belegten DES Studien vergleichbare Werte für Kaninchen und Schweinen, was evtl. durch die Flusssdynamiken in den Arterien mit Stent erklärt werden kann^{19, 166}.

Großtiermodelle sind nicht nur wegen erheblicher Unterbringungskapazitäten sondern auch wegen der Notwendigkeit besonderer radiologischer und operativer Techniken außerordentlich material- und personalintensiv. Darüber hinaus sind sie genetisch weniger präzise, da es

1. Einleitung

keine transgenen Modelle gibt. Insofern weisen Kleintiermodelle wesentliche Vorteile auf. Zur Untersuchung der Prozesse der Restenose und der ISR hat man in den letzten Jahren unterschiedliche Kleintiermodelle (in erster Linie bei Mäusen) entwickelt^{10, 32, 54, 115, 123, 125, 158, 188}. Knockout Mausmodelle (z.B. ApoE^{-/-} Mäuse oder LDLr^{-/-} Mäuse) bieten die einzigartige Möglichkeit molekulare Mechanismen der vaskulären Läsionsformation nach Gefäßverletzung zu studieren und mit daraus resultierenden Erkenntnisse neuen, katheterbasierten Interventionen in humanen Mikrogefäßen in der peripheren und zerebralen Zirkulation den Weg ebnen¹³³.

Weiterhin bedient sich die Forschung sowohl der Großtiermodelle als auch eine Reihe von (transgenen, Knockout-) Kleintiermodellen, wobei z. Zt. der Vorhersagewert der Großtiermodelle, trotz fehlender genetischer Genauigkeit, im Allgemeinen höher angesetzt wird¹⁰².

1.8.1. Übersicht über Mausmodelle der Neointima Formation und der In-Stent Restenose

1.8.1.1 Draht-Verletzung („Wire injury“)

Eines der ältesten Modelle einer arteriellen Verletzung und der Neointima Formation ist das Draht-Verletzungsmodell, das Volkhard Lindner 1993 etablierte¹²³. Bei diesem Modell wird die linke Halsschlagader (Arteria carotis communis) durch eine mittige Inzision auf der ventralen Seite des Tieres freigelegt. Die Bifurkation wird lokalisiert und zwei Ligaturen werden um die Arteria carotis externa gelegt, von denen die distale Ligatur die Arterie komplett verschließt. Zwischen den beiden Ligaturen wird eine Inzision gemacht, durch die man einen Führungsdraht (mit einem Durchmesser von 0.014 Zoll) in das Gefäß einführt, um das Endothel zu denudieren. Unter Rotation wird der Draht in die Arteria carotis communis in Richtung des Aortenbogens vorgeschoben. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt um eine vollständige Endotheldenudation hervorzurufen. Anschließend wird der Draht aus dem Gefäß entfernt und die proximale Ligatur der Arteria carotis externa verschlossen¹²³. Als Ergebniss zeigt sich ein Plättchen Monolayer auf dem durch die Verletzung denudierten Endothel. Bei diesem Modell werden oftmals auch die subendothelialen Schichten der glatten Gefäßmuskelzellen verletzt.

1. Einleitung

Der Replikationsindex der medialen SMCs lag nach 2 Tagen bei 1.6%, nach 5 Tagen bei 9.8%. Der Replikationsindex der intimalen SMC lag nach 8 Tagen nach der Denudation bei 66%. Nach 2 Wochen entsprach die intimale Zellzahl der Medialen. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die endotheliale Regeneration nach 3 Wochen abgeschlossen ist ¹²³.

1.8.1.2 Ballon-Angioplastie

Matter et al. führten eine Ballon-Angioplastie in Carotiden von Wildtyp und ApoE^{-/-} Mäusen durch. Dabei wurden die Tiere unterschiedlichen Gruppen mit unterschiedlicher Ernährung zugeordnet. Eine Gruppe erhielt eine normale Ernährung, eine weitere eine fettreiche Ernährung mit 1,25% Cholesterin ¹³³. Die Operation wurde wie zuvor beschriebene Operation nach Lindner et al. ¹²³ durchgeführt, allerdings wurde anstatt eines Führungsdrahtes ein miniaturisierter Ballonkatheter (Schwager Medica, Winterthur, Schweiz) zur Endotheldenudation in der Arteria carotis communis verwendet. Zusätzlich dazu wurde der Ballondurchmesser dem individuellen Mausgewicht angepasst. Die Ergebnisse zeigten, dass der mediale Zelltod in allen Versuchsgruppen nach einer Stunde und einem Tag in allen Versuchsgruppen identisch war. Eine erhöhte intimale Inflammation (% Anteil an CD45-positiven Zellen) und Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM konnten bei den fettreich ernährten ApoE^{-/-} Mäusen nach 7 Tagen beobachtet werden. Zusätzlich dazu zeigte sich bei den ApoE^{-/-} Mäusen nach 7 und 28 Tagen eine erhöhte Proliferationsrate innerhalb der Gefäßwand. Nach 28 Tagen konnte eine erhöhte Neointima Formation bei ApoE^{-/-} Mäusen auf fettreicher Ernährung im Vergleich zu Wildtyp und ApoE^{-/-} Mäusen auf normaler Ernährung festgestellt werden ¹³³.

1.8.1.3 Stent Implantation in der Arteria carotis communis ohne Ballon

Mitarbeiter am Institut für Molekulare Herzkreislaufforschung der RWTH Aachen haben ein Mausmodell etabliert, bei dem ein Nitinolstent in die linke Arteria carotis communis implantiert wird. Dazu legten sie, wie bei dem Gefäßverletzungsmodell von Lindner et. ¹²³, die linke Carotis Bifurkation frei. Ein kleiner von einem dünnen Schlauch bedeckter, geflochtener Nitinolstent, wird daraufhin über eine Inzision in der Arteria carotis externa in Richtung des Aortenbogens vorgeschoben und in der Arteria carotis communis durch

1. Einleitung

Zurückziehen des Schlauches implantiert. Nach Entfernen der Schlauchs spannt sich der Nitinolstent von selbst auf und benötigt daher keinen Ballon (Abb. 13). Anschließend verschließt man die Arteria carotis externa mit nicht degradierbarem 4/0 Nahtmaterial ^{207, 208}.

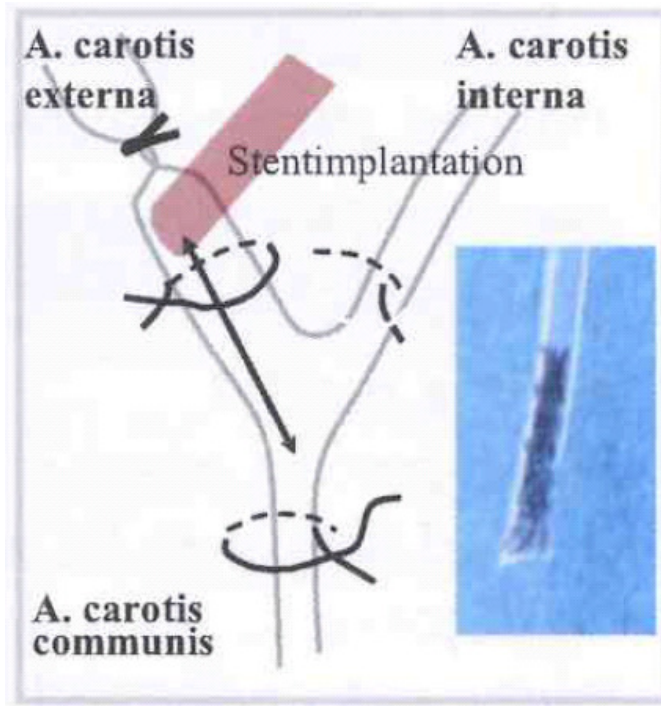


Abb. 13: Schematische Ansicht der Nitinol-Stentimplantation (Abb. aus ²⁰⁷).

1.8.1.4 Stent Implantation in der abdominalen Aorta eines Spendertiers und Interposition in die Arteria carotis communis eines Empfängertiers

Ali et al. stellten 2007 ein weiteres Tiermodell der ISR vor in dem ein Aortensegment eines Spendertiers (C57Bl/6 Wildtyp oder ApoE^{-/-} Maus) entweder einer Balloangioplastie unterzogen oder ein miniaturisierter Stent (1.25 x 2.5 mm) implantiert wurde. Das Aortensegment wird zwischen die zuvor geteilte Arteria carotis communis eines genetisch identischen Empfängers interpositioniert und nach 1,7,14 und 28 Tagen wieder entnommen. Unverletzte und Ballon-verletzte Gefäße von Kontrolltieren entwickelten eine minimale neointimale Hyperplasie, wohingegen ApoE^{-/-} Mäuse eine nach 4 Wochen um 30% erhöhte Neointima Formation nach Stentimplantation zeigten ¹⁰, obwohl der Verletzungsgrad und die Inflammation, die durch die Stentimplantation hervorgerufen wurde, in beiden Gruppen ähnlich waren. Dieses Modell

1. Einleitung

ermöglicht die Untersuchung molekularer Signalwege nach Stentimplantation und neuer therapeutischer Zielmoleküle zur Verhinderung der ISR (Abb. 14).

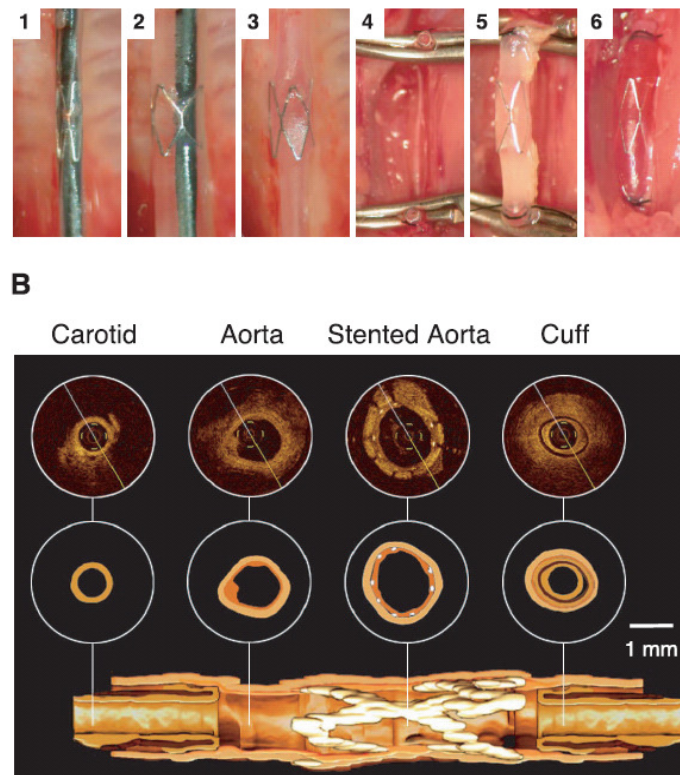


Abb. 14: A: Angioplastie und Stent Implantation in der Mauseaorta (Abb. aus ¹⁰)

1.8.1.5 Stent Implantation in der abdominalen Aorta von Mäusen

Rodriguez-Menocal et al. (2010) implantierten miniaturisierte BMS in die abdominale Aorta von ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 15) ¹⁷⁹. Mittels Ultraschall Biomikroskopie wurde die Durchgängigkeit der BMS zu überpüft. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Gefäße entnommen und für histopathologische Analysen weiterverarbeitet. Eine Thrombusformation konnte histologisch bereits nach einem Tag detektiert werden; eine Leukozyten Adhäsion und -Infiltration konnte nach sieben Tagen beobachtet werden und nahm danach weiter zu. Diese Studie zeigte, dass die Neointima Formation, die Neointimadicke und luminale Stenose simultan bis 28 Tage nach Intervention zunehmen. Obwohl diese Studie ein vielversprechender Ansatz zur Untersuchung der Mechanismen der ISR darstellt und für zukünftige Untersuchungen zahlreiche genetisch manipulierte Mäusestämme zur Verfügung stehen, weisen die Autoren auf den Hauptnachteil: die hohe Ausfallquote von knapp ~35% ¹⁷⁹ hin. Dieses Tiermodell erfordert sehr gute

1. Einleitung

mikrochirurgische Fähigkeiten und die Miniaturisierung des zu testenden Stents.

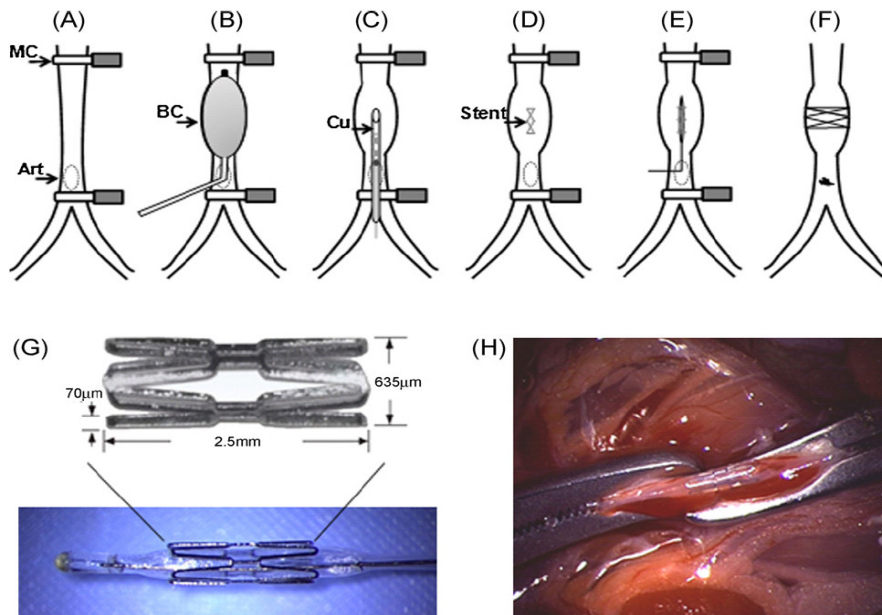


Abb. 15: Stent Implantation in der murinen abdominalen Aorta. (A) Nach dem die abdominale Aorta freigelegt wurde, wurden zwei Mikrovaskularklemmen distal der renalen Arterien und proximal der Bifurkation positioniert. Eine kleine Inzision wurde durchgeführt. (B) Ein Ballonkatheter wurde in die Aorta eingeführt (nach einer Applikation von 3-5 Tropfen Lidocaine) und im Gefäß auf 2 bar dilatiert. (C & D) Ein mikrovaskulärer Stent wurde auf einem Plastikschauch aufgebracht und in der Mauseorta abgeworfen. (E & F) Ein Angioplastie Ballon wurde in den Stent gebracht um den Stent zu dilatieren. Anschließend wurde der Katheter entfernt und die Inzision verschlossen (G) Mikrovaskulärer Stent (BMS). (H) Photographie des implantierten BMS in der murinen Aorta. Art: Arteriotomie, MC Mikrovaskuläre Klemme, Cu: Schlauch (Cuff) BC: Ballonkatheter (Abb. aus ¹⁷⁹).

1.8.1.6 Rattenmodell der Neointima Formation und der In-Stent Restenose

1.8.1.6.1 Stent Implantation der abdominalen Aorta über eine Mikroinzision in der Aorta

Das Tiermodell nach Langeveld et al. stellt ein einfaches und verlässliches Tiermodell zur Evaluation neuer Stents dar ^{44, 114, 115}. Die ermittelten Werte für ISR, die Neointima Fläche und Neointima Dicke, erreichten nach 28 Tagen ihr Maximum ^{114, 115}. Die ISR nach 7, bzw. 28 Tagen unterscheidet sich nur wenig, wenn auch statistisch signifikant.

Tierstudien der ISR sind zur Extrapolation der humanen Pathophysiologie erforderlich, bevor neue Stentmaterialien, Stentdesigns oder DES Konzepte in klinischen Studien verwendet werden können. Um die ISR zu reduzieren haben zahlreiche Forscher die Effekte neuartiger Polymere, Metalle und Medikamente zur Inhibition der neointimalen Hyperplasie untersucht. Da

1. Einleitung

die mannigfaltigen ISR Mechanismen nicht *in vitro* nachgebildet werden können, bieten Tiermodelle der ISR die einzige Untersuchungsmöglichkeit. Dabei sollte ein Tiermodell die pathophysiologischen Prozesse der Neoatheroskleroseentwicklung zeigen und interventionelle Prozeduren sowie bildgebende Verfahren ermöglichen, mithin den gesamten Ablauf des klinischen Einsatzes simulieren ²². Ratten als Tiermodell der Kardiologie und Atheroskleroseforschung sind zwar für die Aufklärung der ISR hilfreich, sind aber insofern in ihrer Aussagefähigkeit begrenzt, als Ratten keine *de novo* atherosklerotischen Läsionen bilden ^{113-115, 266}.

1.8.2 Neues Tiermodell zur Erforschung der Mechanismen der Atherosklerose und Restenose Entstehung

Ein ideales Tiermodell zur Erforschung der Mechanismen der ISR sollte eine ausreichende Gefäßgröße vorweisen und einen atherogenen Phänotyp entwickeln. Bis vor kurzem war die genetische Manipulation, die zur Herstellung atherogener Phänotypen benötigt wurde, auf Mäuse beschränkt. ApoE^{-/-} oder LDL Rezeptor^{-/-} Mausstämmen repräsentierten dabei die häufigsten Kleintiermodelle der Atheroskleroseforschung. Apolipoprotein E (ApoE), ein Glykoprotein, ist für den normalen Lipidmetabolismus essentiell; es verhindert die Akkumulation Cholesterin-reicher Partikel im Plasma und dient als Ligand für Rezeptoren, die in die Beseitigung von Chylomikronen und Very low-density Lipoproteinresten aus der Zirkulation involviert sind. ApoE's Hauptfunktion besteht dabei in seinen Cholesterin-transportierenden Eigenschaften, die den Cholesterin-Efflux aus Lipid-beladenen peripheren Zellen, sowie die Entfernung von Cholesterin Lipoproteinen aus dem Plasma fördern ⁹⁰. Zusätzlich dazu konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass ApoE die Migration und Proliferation von SMC inhibiert ^{89, 90, 216, 217}, sowie die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen als auch die Akkumulation von Monozyten in atherosklerotischen Läsionen in ApoE^{-/-} Mäusen beeinflusst ¹⁴⁵. ApoE^{-/-} Mäuse stellen ein etabliertes Modell der akzelerierten Atheroskleroseentwicklung dar ²² und gehörten zu den ersten entwickelten Knockout-Mausmodellen, die in den frühen 90er Jahren durch homologe Rekombination von embryonalen Stammzellen kreiert wurden ^{170, 275}. Wenn ApoE^{-/-} Mäuse eine fettreiche,

1. Einleitung

cholesterinreiche Ernährung erhalten, sind die Plasma Cholesterinwerte erhöht und die Tiere entwickeln vergrößerte atherosklerotische Läsionen aller Phasen (Monozyten Adhäsion, Schaumzellformation (Fettstreifen) und Läsionen mit fibröser Kappe), die in dem gesamten arteriellen Gefäßbaum zu detektieren sind¹⁴⁷. Allerdings sind diese Läsionen Makrophagen-reich und weisen einen verringerten Anteil an SMC auf^{11, 28, 145, 147}. Dieser, im Vergleich zu menschlichen Läsionen, relative Mangel an SMC in der Neointima und die extrem hohen Plasma-Lipidprofile der murinen Modelle²⁶⁶ werfen die Frage auf in wie weit diese Tiermodelle die humane Pathophysiologie abbilden, in der die Entwicklung der Neointima größtenteils durch die Proliferation und Migration als auch der Sezernierung von ECM Komponenten durch SMC beeinflusst wird¹¹. Zusätzlich dazu ist die durchführbare mechanische arterielle Gefäßverletzung nicht mit der klinischen zu vergleichen, da

- (i) die Gefäßgröße unzureichend ist,
- (ii) die Implantationsmethode sich von den konventionellen interventionellen Techniken unterscheidet und
- (iii) eine Miniaturisierung der (neuen) Stents nötig ist.

Die Einführung von Zinc-finger Nukleasen erlaubt einen zielgerichteten Eingriff in embryonale Stammzellen^{62, 97}. Diese Methode ermöglicht die Herstellung einer Reihe neuer (kardiovaskulärer) Forschungstiermodelle (ApoE^{-/-}, LDL^{-/-} oder Leptin Knock Ratten, Quelle: <http://www.sageresearchmodels.com/research-models>)^{24, 97, 62, 63, 99, 234}. Eines der ersten erarbeiteten Tiermodelle stellt die homozygote ApoE^{-/-} Ratte dar, welche die Vorteile der atherogenen Mausmodelle auf eine größere Tiergröße überträgt. Bisher ist allerdings nichts über die "bench-to-bedside" Relevanz dieses Tiermodells für die ISR Forschung publiziert.

1.9 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der histomorphometrischen und histopathologischen Parameter nach transabdominaler, arterieller Stent Implantation in ApoE^{-/-} Ratten. Da Ratten

Modelle der ISR nur geringe ISR Raten aufweisen, würde eine erhöhte Antwort auf die Stentimplantation ein einfaches und verlässliches Werkzeug zur Evaluation neuer Stentstrategien darstellen.

Zusätzlich dazu sollte evaluiert werden, wie sich ein mittels Flechten hergestellter Form-Gedächtnis-Polymerstent aus Polyurethan (PU, Carbothane, hergestellt von Dipl.-Ing. Fabian Schreiber, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dipl.-Wirt. Ing. Thomas Gries, Institut für Textiltechnik, RWTH Aachen) als alternatives Stentkonzept verhält. Dazu erfolgten *in vitro* Biokompatibilitätstests mit unterschiedlichen vaskulären Zelltypen, die an den Prozessen der ISR beteiligt sind, und die *in vivo* Evaluation nach PU Stent Implantation.

2. Material und Methoden

2.1 *In vitro*

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Präparation der aus dem peripheren Blut stammenden Endothelialen Progenitor Zellen

Periphere, aus dem Blut stammende Mononukleäre Zellen (PBMC) wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern der Blutbank der Universitätsklinik der RWTH Aachen isoliert. Nach der Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll 1.077 g/ml, Biochrom, Berlin, Deutschland) wurden $1-2 \times 10^6$ PBMC auf Fibronektin-beschichteten (Harbor Bioproducts, Norwood, USA) 75 cm² Zellkulturflaschen (BD Falcon, Beckton & Dickinson, Bedford, USA) in 10 mL Endothelial Basal Medium (EBM MV2, Promocell, Heidelberg) mit 5% FCS, 0.5 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF), 5ng/mL human endothelial growth factor (hEGF), 1 µg/ml Ascorbinsäure, 10ng/ml human basal fibroblast growth factor, 20 µg/ml insulin like growth factor-1 (IGF-1) und Antibiotika bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 7 Tagen in Kultur wurden diese Zellen in Kontrollversuchen (FACS, Immunhistochemie) als Dil-Ac-LDL aufnehmende und Lektin bindende Zellen charakterisiert, womit sie dem EPC Phänotypen entsprachen.

2.1.1.2 Humane Nabelschnurvenen Endothelzellen

Humane umbilikale Nabelschnurvenen Endothelzellen (HUVEC) wurden aus Nabelschnüren isoliert und in Endotheliale Growth Medium (PromoCell, Heidelberg) mit FCS (5%), EGF (5 ng/ml), VEGF (0.5ng/ml), bFGF (10ng/ml), IGF-1 (20 µg/ml), Ascorbinsäure (1 µg/ml) und Antibiotika auf Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen auf neue Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen passagiert. HUVEC der Passagen 3-7 wurden auf Collagen beschichtete Thermanox Coverslips (Nunc, ThermoScientific, Germany) passagiert und unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Um

2. Material und Methoden

konditioniertes HUVEC Medium zu erhalten wurde der konfluente HUVEC Monolayer mit einer Pipette ($v = 1000\mu\text{l}$) verletzt und die Zellen anschließend für 24h in Serum-freien Medium kultiviert.

2.1.1.3 Humane glatte Gefäßmuskelzellen

Humane Koronararterien wurden durch Endatherektomie während einer Koronaren Bypass OP (CABG) mit schriftlicher Genehmigung gewonnen. Aus diesen Arterien wurden die humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HuSMC) nach der Explantationsmethode von Ross und Kariya¹⁸¹ isoliert. Alle Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEN/Nut.Mix F-12 mit Glutamax, Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), Penizillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) (beide von Sigma-Aldrich) und 10% FCS (Gibco-BRL) bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Bei Konfluenz wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst und 1:2 gesplittet. Zellen wurden durch ihr charakteristisches Hill-and Valley-Pattern als vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen identifiziert. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 3-6 benutzt.

2.1.1.4 Glatte Gefäßmuskelzellen aus thorakaler Rattenaorta

Rattenaorten wurden nach Tötung der ApoE^{-/-} und Wildtyp Tiere gewonnen. Aus diesen Arterien wurden die glatten Gefäßmuskelzellen (rVSMC) nach der Explantationsmethode von Ross und Kariya¹⁸¹ isoliert. Alle Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEN/Nut.Mix F-12 mit Glutamax, Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), Penizillin (100 Einheiten/ml), Streptomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) (beide von Sigma-Aldrich) und 10% FCS (Gibco-BRL) bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Bei Konfluenz wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst und 1:2 gesplittet. Zellen wurden durch ihr charakteristisches Hill-and Valley-Pattern als vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen identifiziert. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 5-7 benutzt.

2.1.2 *In vitro* Biokompatibilitätstests

Um die Biokompatibilität der Carbothane®-PU Monofilamente zu evaluieren, wurden die Monofilamente mit 7 Tage alten EPC kultiviert. Um die

2. Material und Methoden

Vitalität der adhärenenten Zellen zu demonstrieren wurden die Zellen mit Calcein (0,3µl/ml) für 30 Min. bei 37°C. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,5% Ethidiumbromid in PBS für 2 Min. bei 37°C inkubiert um so die toten Zellen anzufärben. Nach dreifachem Waschen mit PBS wurde die Vitalität der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, DMI-3000, Wetzlar) beobachtet. Vitale Zellen konnten durch den FITC Filter (grüne Fluoreszenz) detektiert werden. Tote Zellen, welche das Ethidiumbromid internalisieren, konnten durch den TRITC Filter (rote Fluoreszenz) auf dem Mikroskop detektiert werden.

2.1.3 Kolorimetrischer Proliferationsassay

Der XTT-Test (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) wurde wie von Alley et al.¹² beschreiben durchgeführt. Sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic Säurehydrat (XTT) wird von metabolisch aktiven Zellen in eine Formazanfärbung umgewandelt. 2×10^4 HuSMC / 4×10^4 EPC und 2×10^4 HUVEC wurden auf 96-well Zellkulturplatten ausgesät und für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit mit PU Netzen wurden 50 µl der XTT Lösung zu jedem Well gegeben und (finale Konzentration = 0,3 mg/ml) für 4h inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Microplate Reader (Molecular Device, Softmax, Biberach, Deutschland) gemessen. Bei 720 nm wurde die Referenz gemessen. Die Resultate wurden als optische Dichte (OD) nach Subtraktion des zellfreien Mediums zusammengefasst. Jede Bedingung wurde 3fach ermittelt.

2.1.4 Zell-Proliferationsassay (5-bromodeoxyuridine-incorporation assay)

Zur Analyse der Proliferation der unterschiedlichen rVSMC der jeweiligen Genotypen (WT und ApoE^{-/-}) wurde ein 5-bromodeoxyuridine (BrdU) Zell Proliferation Test (Chemicon) durchgeführt. 5000 rVSMC/ml der jeweiligen Genotypen wurden auf 96-well Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h in DMEM (5% CO₂ und 37°C) inkubiert. 5-bromodeoxyuridine (BrdU) wurde für 2 h hinzugefügt. Nach der Inkubationszeit wurde die optische Dichte jedes Wells

2. Material und Methoden

bei 370 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge lag bei 492 nm (Molecular Device, Softmax, Wokingham, United Kingdom). Die Ergebnisse wurden nach Subtraktion des Leerwertes (Zell-freies DMEM) gegen die Proliferation der WT rVSMC normiert. Jede Probe wurde 3-fach ermittelt.

2.1.5 Statischer Zell-Adhäsions Assay

7 Tage lang auf Fibronectin-beschichteten Flaschen kultivierte EPC wurden nach Waschen mit PBS mit Accutase (PAA, Deutschland) für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und dadurch abgelöst. Nach der Zentrifugation und Resuspension in komplettem Endothelial Basal Medium (PromoCell, Heidelberg) mit FKS (5%), EGF (5 ng/ml), VEGF (0.5 ng/ml), bFF (10 ng/ml), IGF-1 (20 µg/ml), Ascorbinsäure (1 µg/ml) und Antibiotika wurden identische EPC Zell Zahlen (2×10^5 /100µl Medium) auf Fibronectin-beschichteten 96-well Platten ausgesät und für 30 Min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und es folgte der Proliferationsassay (XTT, Roche, Penzberg, Germany) wie oben beschrieben. Bei jeder Bedingung wurde 3fach ermittelt.

2.1.5.1 Adhäsion an Zellkulturplatten

EPC wurden mit Accutase (PAA, Deutschland) für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, gelöst, zentrifugiert und resuspendiert. 100 µl einer 4×10^5 /ml EPC Lösung in MV-2 basal Medium wurden pro Well einer 96-well Zellkulturplatte (Falcon, BD, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und für 0, 2, 5, 15, 30, und 60 Min. inkubiert. Nach Entfernen der nichtadhärenten Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden die adhärenen Zellen EPCs für 4 h mit dem XTT-Zellproliferationstest inkubiert. Die Resultate wurden als optische Dichte minus den Wert des Zellfreien-Mediums angegeben. Bei jeder Bedingung wurde 3fach ermittelt.

2.1.5.2 Adhäsion an Komponenten der ECM

EPCs wurden mittels Accutase (PAA, Deutschland) für 5 Min bei 37°C und 5% CO₂ gelöst, zentrifugiert und resuspendiert. 100µl einer 4×10^5 /ml EPC-Lösung wurden auf pro Well einer 96-well Zellkulturplatte (Flacon, BD, Heidelberg, Deuchtschland), die mit unterschiedlichen Komponenten der ECM

2. Material und Methoden

beschichtet waren (Vitronectin (Vn) ($c = 0.5 \mu\text{g/ml}$ Sigma, Taufkirchen, Deutschland), Kollagen G ($c = 0.08 \mu\text{g/ml}$ Biochrom, Berlin, Deutschland) Fibronektin (Fn) ($c = 10 \mu\text{g/ml}$ TebuBio, Offenbach, Deutschland), und für 0, 2, 5, 15, 30, und 60 min inkubiert. Nach Entfernen der nicht adhärenen Zellen durch 3maliges Waschen mit PBS, wurden die adhärenen EPCs mit XTT für 4h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Resultate sind als optische Dichte minus den Wert des Zellfreien-Mediums angegeben. Bei jeder Bedingung wurde 3fach ermittelt.

2.1.5.3 Adhäsion an Polyurethan Netze

7 Tage alte EPCs wurden mittels Accutase (PAA, Deutschland) für 5 Min bei 37°C und 5% CO_2 gelöst, zentrifugiert und resuspendiert. $100 \mu\text{l}$ einer $4 \times 10^5/\text{ml}$ EPC-Lösung wurden pro Well einer 96-well Zellkulturplatte (Falcon, BD, Heidelberg, Deutschland) in der ein Polyurethannetz den Boden des Wells bedeckte inkubiert. Die Polyurethannetze wurden zuvor für eine Stunde mit unterschiedlichen Komponenten der ECM inkubiert {Vn ($c = 0.5 \mu\text{g/ml}$ Sigma, Taufkirchen, Deutschland)}, Kollagen G {(col) ($c = 0.08 \mu\text{g/ml}$ Biochrom, Berlin, Deutschland)} Fn {($c = 10 \mu\text{g/ml}$ TebuBio, Offenbach, Deutschland)} oder waren unbehandelt. Die Inkubation der Zellen auf den Netzen dauerte 30 min bei 37°C und 5% CO_2 . Nach Transferieren der Polyurethannetze in ein neues Well wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt. Die adhärenen EPCs wurden mit XTT für 4h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Resultate sind als optische Dichte bei 490 nm minus den Wert des Zellfreien-Mediums angegeben. Bei jeder Bedingung wurde 3fach ermittelt.

2.1.6 Migrationsassay/Chemotaxis Assay (modifizierte Boyden-Kammer)

Die Zellmigration von HUVEC/EPC/HuSMC in Anwesenheit des PU wurde durch eine modifizierte Boyden-Kammer (Neuroprobe, Gaithersburg, USA) quantifiziert. $800 \mu\text{l}$ einer 2×10^5 HUVEC/ml / 2×10^5 EPC/ml oder 4×10^4 HuSMC/ml Zellsuspension wurden auf die obere der 2 Kammern gegeben, die durch eine Membran mit der Porengröße von $8 \mu\text{m}$ voneinander getrennt

2. Material und Methoden

waren. Für die *in vitro* Experimente mit den Zellen wurden die Polyurethannetze in die untere Kammer gegeben. Die Membranen wurden nach 4h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ mit Methanol fixiert und mit Hemacolor (Merck, Deutschland) gefärbt. Zellen auf der unteren Seite der Membran wurden mit der DISKUS Software (Dr. Hilgers, Königswinter, Deutschland) gezählt. Jeder Bedingung wurde 3fach ermittelt und die Anzahl der migrierten Zellen wurde in 5 zufällig gewählten Gesichtsfeldern unter 100facher Vergrößerung gezählt. Die Chemotaxis wurde berechnet aus:

(Anzahl der migrierten Zellen auf den Membranen mit den PU-Proben/Anzahl der migrierten Zellen bei den Kontrollen) * 100 %

2.1.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Verifizierung der Adhäsion von EPC an PU Monofilamente wurden die Proben in PBS mit 0.25% Glutaraldehyd / 2% Paraformaldehyd fixiert. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Reihe von Alkohol dehydriert, getrocknet und auf einer REM Halterung montiert. Nach Sprühbeschichtung mit Gold/Palladium wurden die Proben im Elektronenmikroskop (ESEM XL30 FEG, FEI, Eindhoven, Niederlande) untersucht.

2.1.8 Evaluation der mechanischen Eigenschaften des Polyurethan Stents nach Ballondilatation

Um die mechanischen Eigenschaften des PU Stents nach Ballondilatation zu evaluieren wurden 3.0 x 8 mm große PU Stents auf Angioplastie-Ballons (3.0 x 12 mm Diameter, Abbott Vascular, Ragendingen, Germany) montiert und unter einem Binokular fixiert (MZ-9, Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Stentdurchmesserzunahme wurde mit einem handelsüblichen Metallstent verglichen (3.5 x 13 mm, Cypher, Cordis, USA). Während der Dilatation des Ballons mittels Inflator (Medflator II, Medex Supply, Monsey NY, USA) wurde bei 6, 8, 10, 12, 14, 16, oder 18 atm eine Aufnahme gemacht (DISKUS Analyse Software, Dr. Hilgers, Königswinter, Deutschland) und anschließend ausgewertet.

2. Material und Methoden

Um den spontanen PU Stent Recoil ohne externe Einwirkung zu ermitteln, wurden 3.0 * 8 mm PU Stents auf entweder 3.0 mm oder 3.5 mm Angioplastie Ballons montiert. Zudem wurden 3.5 x 8 mm PU Stents auf 4.0 mm Angioplastie Ballons montiert. Die Ballons wurden bis auf 18 bar für 30 Sek. dilatiert und anschließend entfernt. 1 Minute nach Dilatation wurde der Recoil evaluiert (DISKUS Analyse Software, Dr. Hilgers, Königswinter, Deutschland).

2.1.9 Statistische Analyse

Die morphometrischen Daten, die Ergebnisse der Proliferations, Adhäsions und Migrationstests sind als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way ANOVA gefolgt von einem Bonferroni post hoc Test für multiple Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen. Unterschiede in den 7/28 Tage Gruppen wurden mit einem t Test verglichen. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Für die statistische Analyse wurde Prism Software 4.0 (Graphpad Software Inc, La Jolla, USA) verwendet.

2.2 *In vivo*

2.2.1 Tierstämme und Tierversorgung

Die tierexperimentellen Protokolle wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ 87-51.04.2010.A065). Bei den Versuchstieren handelte es sich um Sprague-Dawley-Ratten, die in einem vollklimatisierten Tierstall bei einer Luftfeuchtigkeit von $60\% \pm 5\%$ und einer Raumtemperatur von $21^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ gehalten wurden. Die Unterbringung erfolgte in Gruppen bis zu vier Tieren in Makrolonkäfigen auf Weichholzgranulat, welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Der Tag-/Nacht-Rhythmus wurde im zwölf-Stunden-Abstand mit künstlichem Licht gewährleistet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. 3 Tage vor der Intervention und bis zur Euthanasie erhielten die Tiere eine duale Antiplättchen Therapie welche aus Clopidogrel (Iscover 0,3 mg/Tag) und ASS (0,4mg/Tag) bestand. Eine zusätzliche Gruppe erhielt eine fettreiche Ernährung (mit 20% Fett & 1,25% Cholesterin, SNIFF Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

2. Material und Methoden

Zufällig ausgewählten Tieren wurde entweder ein BMS oder ein PU Stent in die abdominale Aorta implantiert.

2.2.2 Ratten-Modell der In-Stent Restenose

Die Operation wurde nach Langeveld ¹¹⁵ et al. durchgeführt (siehe Abb. 16). 12-14 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten (WT, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 520 ± 42 g wurden in den Experimenten eingesetzt. Die Tiere wurden mittels Ketanest (100 mg/kg) und Xylazin (20 mg/kg) i.p. anästhesiert und erhielten während der Operation 1,5 - 2% Isoflurane in O₂ und N₂ durch eine Anästhesie-Einheit (SF3 Flowmeter, UNO BV Roestvaststaal, Niederlande, Fluß = 1l/Minute O₂), um die Narkose aufrechtzuerhalten. Zur zusätzlichen Anticoagulation erhielten die Tiere 100 IU/kg Heparin i.p. (Heparin-Natrium-25.000, Ratiopharm, Ulm, Deutschland). Die Operation wurde unter einem Dissektionsmikroskop (Leica MZ9, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt.

Die Aorta wurde durch eine mittige Inzision der ventralen Seite freipräpariert. Die Aorta wurde mittels einer kleinen Inzision geöffnet, das Gefäß mit einer Heparin-Lösung (250 IU/ml) gespült, und ein 2,5 mm x 8 mm Stent (BMS, Mini Vision Abbott, Deutschland) oder ein PU Stent 2 mm x 8 mm (geschützt durch einen Funnel Introducer (Abbott Vascular, Wetzlar, Deutschland) eingeführt. Der Katheter wurde in Richtung des Aortenbogens geschoben, der Funnel Introducer wurde aus dem Gefäß entfernt und der Ballon wurde mit einem Medflator (Medex Supply, Monsey NY, USA) für 30 Sek. und 12 Bar Druck inflatiert. Das Overstretch Verhältnis ("overstretch-ratio", das Verhältnis zwischen Gefäß mit implantiertem Stent und dem nativen Gefäßdiameter) in allen Gefäßen mit implantiertem Stent lag bei 1,2 : 1. Nach der Implantation des Stents wurde der Katheter aus dem Gefäß entfernt und die Aorta mit nicht degradierbarem 9-0 Nahtmaterial (Dafilon, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) und Gefäßchirurgischen Knoten verschlossen. Das Peritoneum und die Hautinzision wurden mit nicht degradierbarem 4-0 Nahtmaterial verschlossen (Silkam, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland). Eine postoperative Schmerzlinderung im Versuchsansatz des ISR Modells erfolgte alle 8-12h für 72 h mit Buprenorphin (Temgesic, 0,05-0,1 mg/kg).

2. Material und Methoden

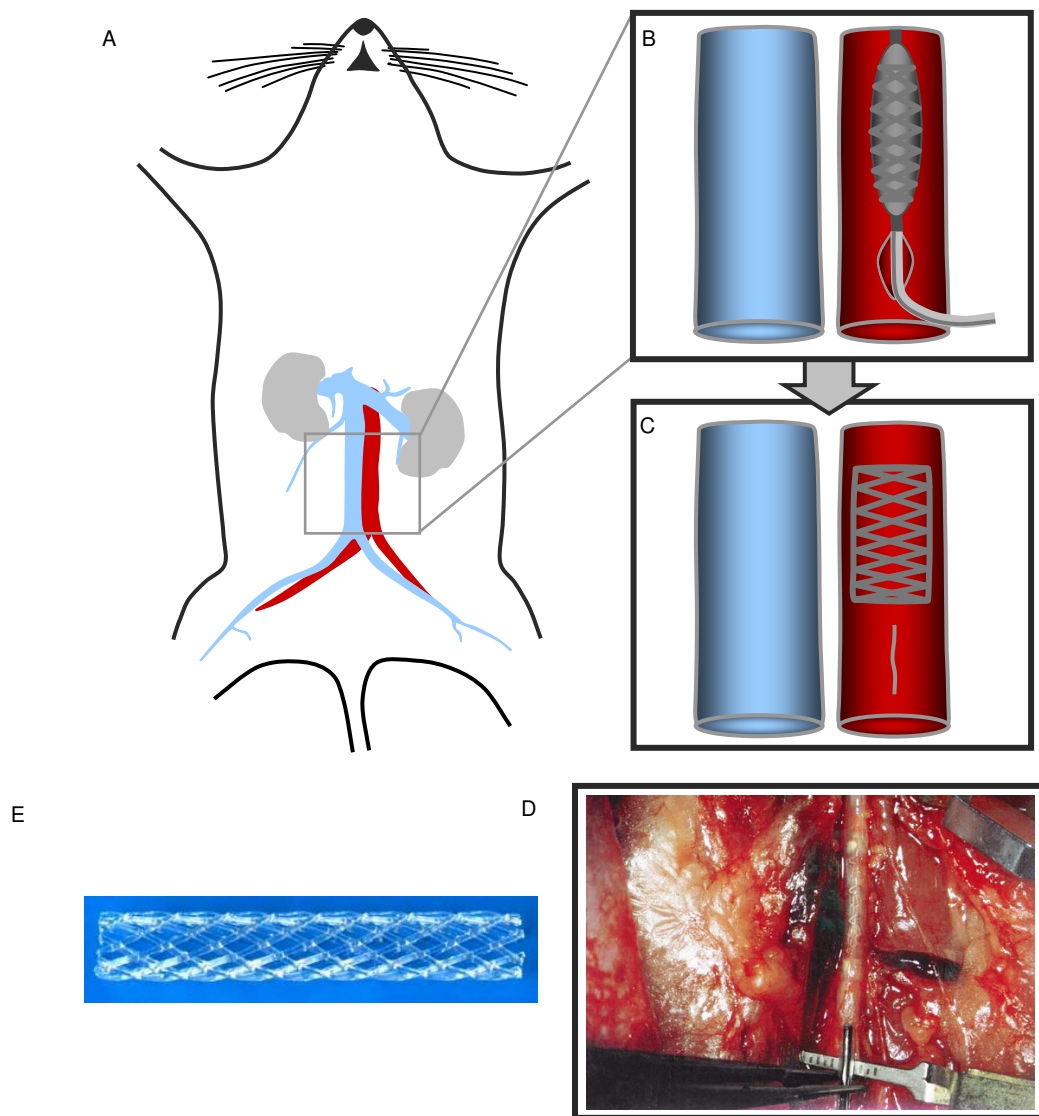


Abb. 16: Schematische Ansicht des ISR Modells (adaptiert nach ¹¹⁵) A: Übersicht: Das Abdomen wird durch eine midsagittale Inzision geöffnet, die abdominale Aorta vom umgebenden Gewebe freipräpariert und durch Gefäßklemmen abgeklemmt. B: Über eine Inzision wird ein Katheter eingeführt und ein Stent (BMS oder PU) implantiert. C: der expandierte Stent in der abdominalen Aorta. Das Gefäß wird mit Gefäßchirurgischen Knoten verschlossen. D: ISR Modell mit einem BeStent™ 2,5 x 9 mm (Abbildung aus ¹¹⁵) E: mittels 3D-Flechten hergestellter und wärmefixierter Polyurethan Stent (2,5*8mm)

2.2.2.1 ApoE^{-/-} Ratten als Modell der In-Stent Restenose

WT Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und homozygote SD-ApoE^{tm1sage} knockout Ratten (ApoE^{-/-}, Produktnummer: TGRA3710HM9, Compore Zr® Zinc-finger target site: 5' CAGGCCCTGAACCGAttctggGATTACCTGCGCTGGG, NCBI GeneID: 25728; NCBI GeneID: NC_005100.2 GenBank, von Sigma Aldrich Genetic Engineering Labs, Jeff S. Xue, Aaron M. McCoy, Edward J. Weinstein, Sigma Aldrich, Saint

2. Material und Methoden

Louis, MO, USA) erhielten einen BMS (Multilink Minivision 2.5 x 8 mm, Abbott Vascular, St. Clara, CA) in die abdominale Aorta. Die Intervention erfolgte wie oben für den WT beschrieben.

2.2.2.2 Blutparameter Analysen

Zur Analyse der Blutparameter bei ApoE^{-/-} und WT Ratten wurden nach Einleiten der Narkose und vor der Intervention ca. 1 – 1.5 ml Blut retro-orbital entnommen und in EDTA, bzw. Serumröhrchen gesammelt. Das Blutplasma wurde bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Die Plasmaparameter Cholesterin und Glukose wurden bei den ApoE^{-/-} und WT Kontrollen durch das Laboratorium des Instituts für Versuchstierkunde innerhalb des Universitätsklinikums der RWTH Aachen evaluiert.

2.2.2.3 Interleukin-6, -8 und -10 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Ermittlung der Serum Interleukin-6, -8 und -10 Konzentrationen wurden ELISA Kits (Produktnummer: R6000B (IL-6); RCN100 (CXCL1/CINC-1); R R1000 (IL-10, alle Kits von Quantikine® ELISA R&D Systems, Abingdon, UK) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angabe der Hersteller. Die Resultate sind in pg/ml ± SEM angegeben.

2.2.3 Histomorphometrie und immunohistochemische Analyse

2.2.3.1 Gewebe-Präparation

Zu den vorherbestimmten Zeitpunkten (7 & 28 Tage nach der Stent Implantation) wurden die abdominalen Rattenaorten fixiert. Operativ entfernte Aortensegmente wurden mit 50ml NaCl perfundiert und im Anschluss daran mit 50ml einer 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

2.2.3.2 Hämalan & Eosin Färbung (Polyurethan Stent)

Zur Paraffineinbettung wurden die Gefäß-Präparate in 4% Paraformaldehyd-Lösung über 24 h fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (Einbettungsautomat Tissue Trek® VIP, Miles Scientific, USA). Für

2. Material und Methoden

die Färbung wurden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend in PBS-Puffer (Biochrom, Berlin, Deutschland) überführt.

Die Schnitte wurden 3 mal für 10 Minuten in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100% 100% 96% 70% Ethanol) für jeweils 5 Minuten inkubiert und anschließend 5 Minuten in Aqua dest gewaschen und für 5 Minuten in frisch filtriertem Hämalaun inkubiert. Danach erfolgte eine zweifache Spülung mit Leitungswasser und eine 10 minütige Inkubation in warmem Leitungswasser. Es folgte eine 5 minütige Inkubation in 0,1% wässriger Eosinlösung. Anschließend erfolgten ein Waschschrift in Aqua dest und in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96% für 10 Sekunden, 100% für 2 Minuten).

2.2.3.3 Giemsa Färbung (Bare-metal Stents)

Die Gefäßpräparate mit implantiertem BMS wurden in 4% PFA-Lösung für 24 h fixiert und anschließend in Technovit 9100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Anschließend erfolgte die Sektionierung in 50µm Sektionen des proximalen, mittleren und distalen Stentbereichs, die anschließend mit Giemsa gefärbt wurden. Die 50µm Schliffe wurden für 15-20 Minuten in 30% H₂O₂ inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Eine frisch angesetzte und filtrierte Giemsa Lösung (1:5 40 ml Giemsa Lösung (Merck 9024, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) + 160 ml H₂O) wurde für 45 Minuten auf die Schliffe gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Schliffe mit Leitungswasser gewaschen und bis zur mikroskopischen Untersuchung lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.3.4 Elastica von Gieson Färbung (Polyurethan Stent)

Die Paraffin-Schnitte wurden für 5-10 Minuten in Xylol inkubiert, anschließend erfolgte eine jeweils 5 Minuten Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%), dann für 1-2 Minuten in 80% Alkohol. Die Schnitte wurden für 20 Minuten bei 60°C in Resorcin-Fuchsin inkubiert, anschließend mit Aqua dest. gespült und daraufhin in 80% Alkohol differenziert bis keine Farbschlieren im Aqua dest. erkennbar waren. Die Kernfärbung erfolgte für 10 Min. mit Weigerts Eisenhämatoxylin (Weigert Lösung A + Weigert Lösung B im

2. Material und Methoden

Verhältnis 1:1). Die Schnitte wurden erneut gespült, dann kurz in 0,5-1% HCl-Alkohol (70%) differenziert und sofort mindestens 2x mit Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden im dritten Wasser 10 Minuten inkubiert, mit Aqua dest abgespült, dann für 3-5 Minuten in Pikrofuchsin inkubiert und erneut in Aqua dest gespült. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und eine anschließende kurze Inkubation in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit Vitroclud eingedeckelt.

Das Ergebnis der Färbung ist eine braun-schwarze Färbung der Kerne, eine orange-rote Färbung der Kollagen Fasern, eine schwarz-rötliche Färbung der elastischen Fasern und Membranen und eine gelbe Färbung der Muskulatur.

Frau Nicole Krott hat die Paraffin-Schnitte des Polyurethan-Stents angefertigt als auch die Färbungen der Gewebeproben durchgeführt.

2.2.3.5 Histomorphometrische Evaluation

Die Lumenfläche, die neointimale Dicke, die Fläche der Lamina elastica interna (IEL) und Lamina elastica externa (EEL) wurden ermittelt (DISKUS Software, Dr. Hilgers, Königswinter, Deutschland). Dabei berechnet sich die neointimale Fläche aus der Fläche der IEL – der Fläche der Lumens. Zusätzlich können die lumeninale Fläche, die Plaque Fläche, die Mediale Fläche und das Intima : Media Verhältnis und die Gesamtgefäßfläche berechnet werden.

Die mediale Fläche ergab sich aus der Subtraktion der Fläche der EEL – die Fläche der IEL. Die Größe des Gefäßes wurde durch Messen des Umfangs der EEL ermittelt. Der Prozentsatz der ISR wird definiert als:

$$(1 - [\text{Lumen Fläche} / \text{Fläche der Lamina elastica interna}]) \times 100^{26, 246}$$

Die statistische Analyse der jeweiligen Gruppen ermittelte sich aus den Durchschnittswerten der Sektionen pro Stent.

2. Material und Methoden

2.2.3.6 Histopathologische Analysen:

Die inflammatorische Antwort auf die Stentimplantation wurde durch das Zählen der inflammatorischen Zellen (CIC, Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophilen charakterisiert durch deren typische Morphology) evaluiert ¹¹⁰. In jeder Probe wurden 5 zufällig gewählte Gesichtsfelder (Vergrößerung = 200x) rund um die Stentstreben ausgewählt und die Anzahl der CIC gezählt. Zusätzlich wurde der Gesamtgefäßdurchmesser mit charakteristischer Tunica Media (bestehend aus mehreren Schichten zirkulär angeordneter SMC und kontinuierlichen elastischen Fasern) bestimmt und in Relation zu der Fraktion ohne charakteristische Media (Bereiche ohne zirkulär angeordnete SMCs und mit unterbrochenen elastischen Fasern).

2.3 Materialien

2.3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Megafuge 1.0	Hereaus Instruments, Hanau
Tecan Infinite Pro 200 Platerreader	Tecan Group Ltd., Männedorf
Zentrifuge 5417 R Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubationsschrank	Heraeus Instruments, Hanau
HERA-Safe Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Boyden Kammern	Biocat GmbH, Heidelberg
Inverses Fluoreszenzmikroskop	
Leica DMI-3000	Leica, Wetzlar
Leica MZ-6 Stereomikroskop	Leica, Wetzlar
Großes Schwenkarmstativ	Leica, Wetzlar
Gas exhaust unit	UNO Roestvaststaal, Zevenaar
Gesichtsmaske Ratte	UNO Roestvaststaal, Zevenaar
Flowmeter SF3	UNO Roestvaststaal, Zevenaar
Heizkissen	Beuer, Ulm

2. Material und Methoden

Ultraschallgerät Elmasonic S10H
Einsatzkorb für Elmasonic S10H

Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe

3 Chip-Kamera JVC KY-F 75
DISKUS Analyse Software

JVC, Friedberg
Tech. Büro Hilger, Königswinter

OP-Werkzeuge

alle Fine Science Tools,
Heidelberg

1 x Dumont#5/45
1 x Vannas Tübingen angewinkelt
1 x Tungsten Carbide straight
2 x Dumont#7 Fine Tips
1 x Suture Tying Forceps
1 x Nadelhalter ohne Schloß
1 x Halsey Nadelhalter
2 x Weitlaner-Locklite
1 x magnetisches Fixator Retraktionssystem
Kit für Tiere ab 200g (inkl. Retraktoren)
2 x Dietrich Bulldog Klammern, gewinkelt
2 x Bulldog Type Serrefines, gebogen
1 x Vessel Cannulation Forceps

2. Material und Methoden

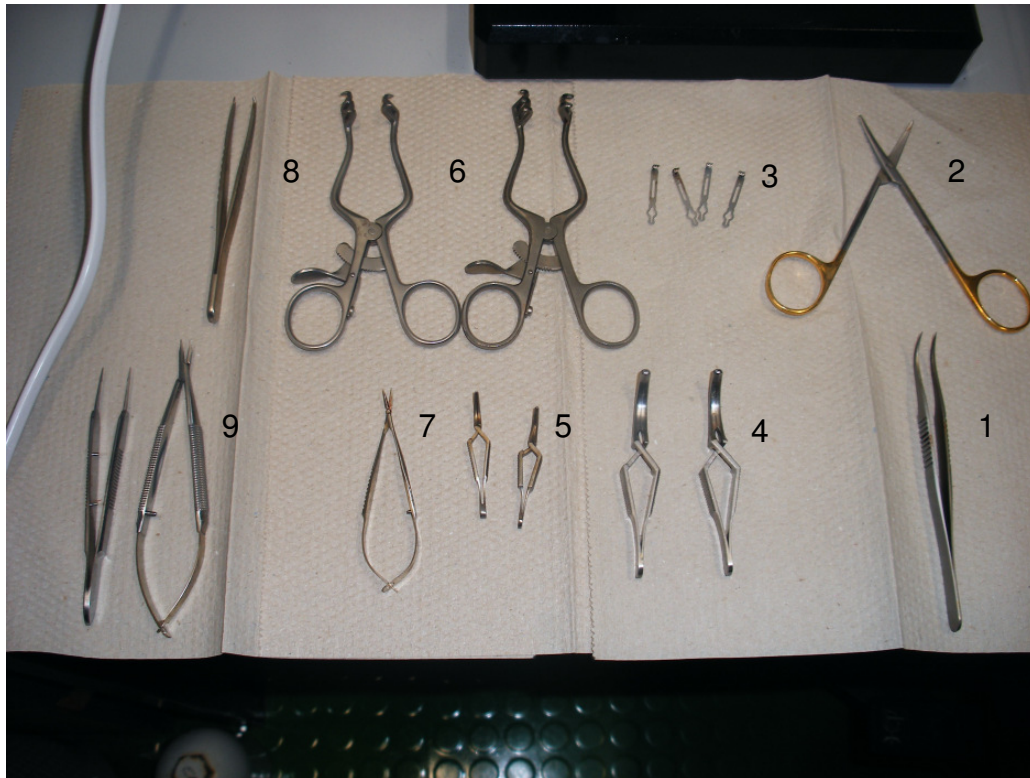


Abb. 17: Übersicht OP-Platz und -Equipment. OP Besteck Anordnung linke Seite: (1) Pinzette, (2) Schere, (3) Retraktoren, (4) Dietrich Bulldog Gefäßklemmen, (5) Bulldog Type Serrefines, gebogen, (6) Weitlaner-Locklite, (7) Vannas Tübingen, (8) Vessel Cannulation Forceps, (9) Nadelhalter ohne Schloß und Pinzette (Suture Tying Forceps) zum Zunähen des Gefäßes

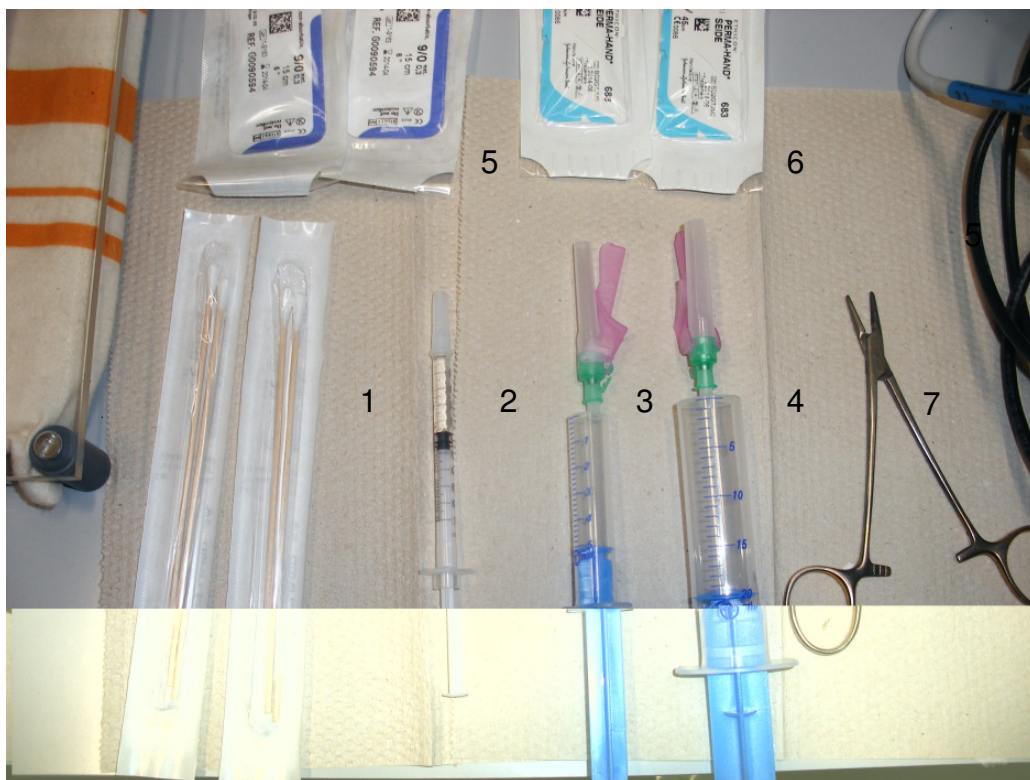


Abb. 18: OP Besteck rechte Seite: (1) sterile Wattestäbchen, (2) 0,5 ml 2% Lidokainspritze, (3) 5 ml 25IU Heparin/ml in NaCl, (4) NaCl zum Spülen, (5) 9/0 Nahtmaterial (1x als Ersatz), (6) 4/0 Nahtmaterail (1x Peritoneum, 1x Haut), (7) Nadelhalter

2. Material und Methoden

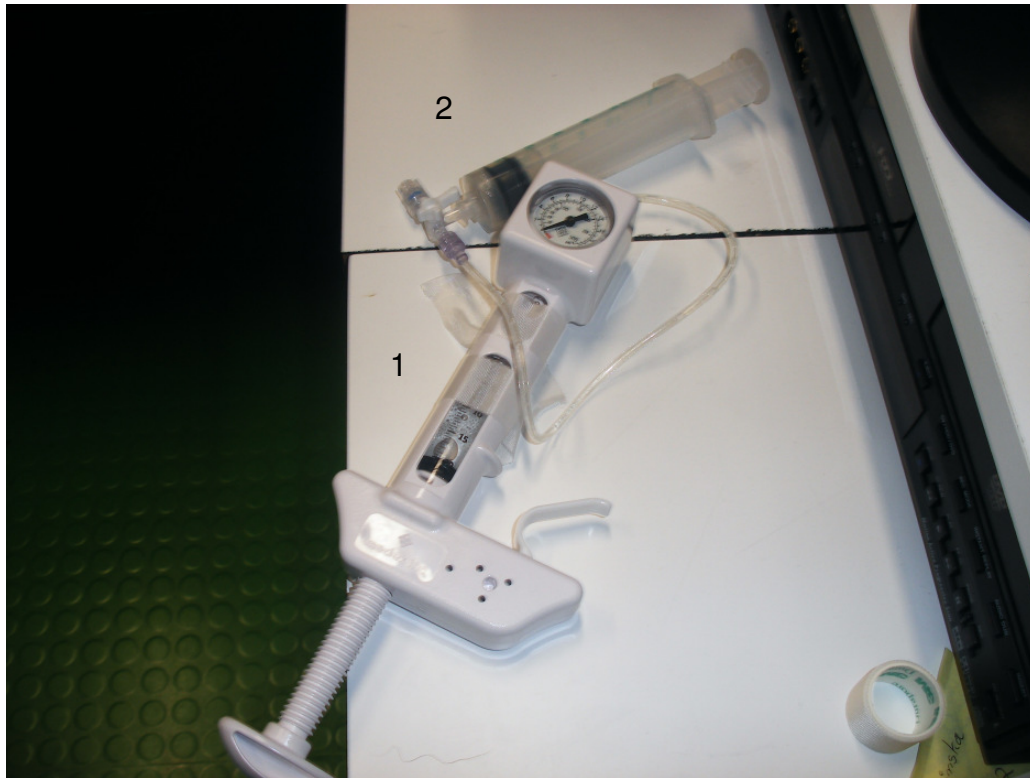


Abb. 19: (1) Medflator + (2) Spritze zum Entlüften des Ballons, rechts neben dem OP Platz



Abb. 20: Übersicht OP-Platz: (1) Binokular, (2) OP Tisch mit Heizdecke, (3) Anästhesieanlage, (4) Kaltlichtquelle, (5) sterile Tupfer

2. Material und Methoden

Tiere:

Sprague-Dawley Wildtyp Ratten
Homozygous ApoE Knockout Ratte
Sprague Dawley Male 9-12 Weeks Old
(TGRS3710HM9-1EA)

Charles River, Sulzfeld

Sigma Aldrich Genetic
Engineering, St. Louis

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialie

6-well Zellkulturschale
24-well Zellkulturschale
96-well Zellkulturschale
75er Zellkulturflasche
Cellstar Tubes 50ml
Probengefäß Micro f. Serum
Probengefäß Micro . EDTA
Kapillaren 30mm 0.8 außen
50ml Perfusorspritze
20ml Spritze Luer
5 ml Spritze Luer
Tuberkulinspritze mit Kanüle
Tuberkulinspritze ohne Kanüle
Thermanox Coverslips 25mm
Mullkompresse 5x5cm, steril
Kanüle Gr. 20 27G
Kanüle Gr. 18 safety 25G
Safety-Multifly Set
Wattestäbchen 15cm, Wattekopf klein steril
Funnel Introducer
OTW PTA Ballon 3*8mm
OTW PTA Ballon 3,5*8mm
OTW PTA Ballon 3,5*12mm
OTW PTA Ballon 4*12mm

Hersteller

Becton Dickinson, München
Becton Dickinson, München
Becton Dickinson, München
Becton Dickinson, München
Greiner bio-one, Essen
Sarstedt, Nürnberg
Sarstedt, Nürnberg
Hilgenberg, Malsfeld
Becton Dickinson, Heidelberg
Becton Dickinson, Heidelberg
Becton Dickinson, Heidelberg
Braun, Melsungen
Braun, Melsungen
Nunc, Rochester
Fuhrmann, Much
Sarstedt, Nürnberg
Sarstedt, Nürnberg
Sarstedt, Nürnberg
Applimed SA, Châtel St-Denis
Abbott Vascular, Ragendingen
Abbott Vascular, Ragendingen
Abbott Vascular, Ragendingen
Abbott Vascular, Ragendingen
Abbott Vascular, Ragendingen

2. Material und Methoden

Porenfilter 8µm
Polyurethan, Carbothane®
RX Multilink Minivision 2,5*8mm
Medflator II
Nahtmaterial 4-0 Silkam DS19
Nahtmaterial 9/0 Dafilon DLM6S
Kontrollfutter (S0382-P040)
Atherogenes Futter (S0382-P042)

Whatman GmbH, Dassel
Lubrizol, Belgien
Abbott Vascular, Ragendingen
Medex Supply, USA
BBD Aesculap GmbH, Tuttlingen
BBD Aesculap GmbH, Tuttlingen
SNIFF Spezialdiäten, Soest
SNIFF Spezialdiäten, Soest

2.3.3 Chemikalien

Substanz

Accutase
Amphotericin (100mg/ml)
Augencreme Bepanthen
Biocoll Separating Solution
Calcein AM
Collagen G
Dextran
Di-ac-LDL
DMEM
EDTA
Elca Med Enthaarungscreme 100ml
Endothelial Cell Basal Medium MV2
Endopan 3 Basal Medium Endothelzellen
Fibronektin
FKS
Gelatine
Gentamicin (50mg/ml)
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung
Glutaraldehyd
HCL
Hemacolor Schnelfärbung Lsg.1-3
HEPES Transportpuffer
Heparin-Natrium-25.000

Hersteller

PAA, Deutschland
Sigma, München
Bayer, Leverkusen
Biochrom, Berlin
Gibco, Darmstadt
Biochrom, Berlin
Sigma, München
Invitrogen, Eggenstein
Invitrogen, Eggenstein
Merck, Darmstadt
Azid Bons GmbH, Herrenberg
PromoCell, Heidelberg
Pan Biotech, Aidenbach
Tebu-Bio, Offenbach
Biowest, Renningen
Sigma, München
Gibco, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Sigma, München
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Ratiopharm, Ulm

2. Material und Methoden

Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Ketanest	CEVA Sante Animale, Brüssel
K-Plast-System	MDS GmbH, Busseck
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9% 500ml	KMF, Lohmar
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Lösung 3,13%	Eifelfango, Bad Neuenahr- Ahrweiler
Paraformaldehyd 4% in PBS	Roth, Karlsruhe
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
PDGF-BB	Provitro, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Eggenstein
RPMI 1640	Invitrogen, Eggenstein
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg
Temgesic	Essex Pharma GmbH, München
Tris	Roth, Darmstadt
Trypsin / EDTA	Invitrogen, Eggenstein
Tween 20	Fluka, Schweiz
UEA-Lektin	Sigma, München
Vitronektin	Sigma, München
Xylazin	Medistar, Ascheberg
Zell Proliferationskit (XTT)	Roche, Mannheim

Lösungen:

Weigerts Eisenhämatoxylin	Merck, Darmstadt
Lösung A: 10g Hämatoxylin 1000ml 96% EtOH	
Lösung B: 40ml 29% Eisen-III-Chlorid-Lsg 950ml aqua dest 7,5ml 37% HCl	
Gebrauchslösungen A + B zu gleichen Teilen (in kleinen Mengen frisch ansetzen 50ml + 50ml)	

		5 ng/ml EGF 0,5 ng/ml VEGF 10 ng/ml bFGF 20 µg/ml IGF-1 1 µg/ml Ascorbinsäure 100 U/ml Penizilin 100 U/ml Streptomycin
EPC	Endotheliales Basal Medium MV2	500 ml MV2 Medium 5% FCS 0,5 ng/ml VEGF 5 ng/ml heGF 1 µg/ml Ascorbinsäure 10 ng/ml hBfGF 20 µg/ml IGF-1 100 U/ml Penizilin 100 U/ml Streptomycin
HuSMC	Dulbecco modified Eagle's medium (DMEN/Nut.Mix F12 mit Glutamax)	500 ml DMEN Medium 10% FCS 100 U/ml Penizilin 100 U/ml Streptomycin

2.3.6 Zellzählung

Zur Ermittlung der Zellzahlen wurde eine Neubauer-Zahlkammer (0,05 x 0,05 x 0,1 mm) verwendet. Die Anzahl der Zellen wurde in 4 x 16 Quadraten der Zellkammer unter einem inversen Durchlichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Medium lässt sich durch die Formel $[n/4 \times 10^4 = \text{Zellzahl/mL}]$ berechnen, wobei n der Anzahl, der gezählten Zellen entspricht.

3. Ergebnisse

3.1 Mechanische Tests des Polyurethan Stents

3.1.1 Dilatationsverhalten des Polyurethan Stents

Die mechanischen Tests zeigten, dass sich die PU Stents während der Ballondilatation so verhalten wie handelsübliche Metallstents (Abb. 21). Mit zunehmendem Druck weiten sich die Stents, sodass ein den Anforderungen entsprechender Durchmesser erreicht werden kann. Während der Untersuchungen trat keine Strebenfraktur, bzw. Riss in den PU Monofilamenten auf. Damit sind die mechanischen Voraussetzungen für eine Verwendung als Stent erfüllt.

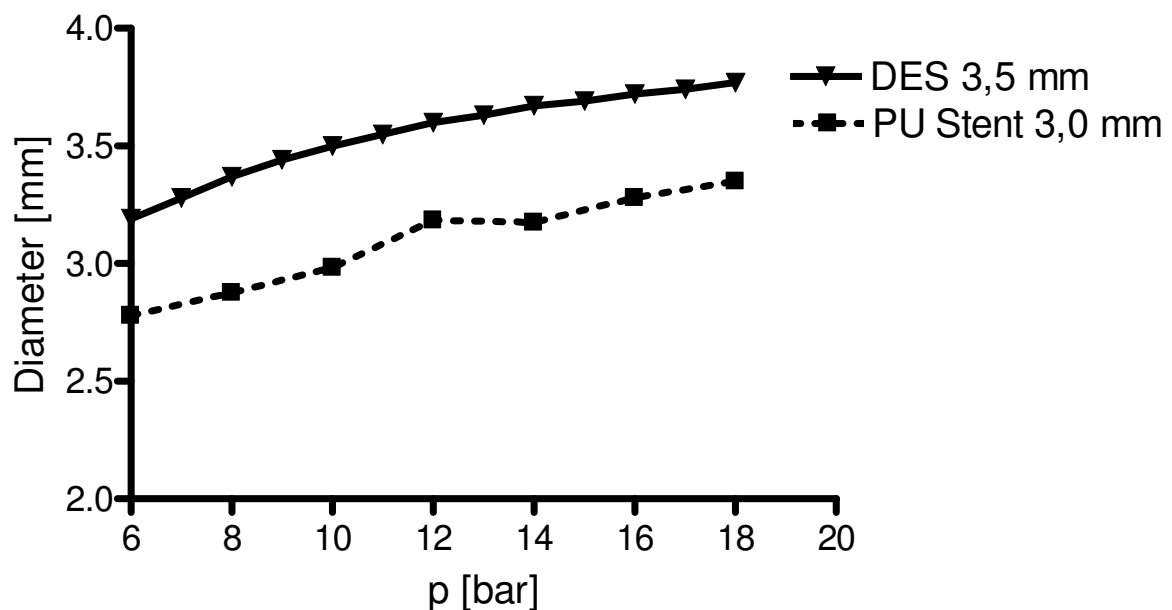


Abb. 21 : PU Stent und Metallstent (DES) Dilatationsverhalten. Der Stent Diameter nimmt mit dem Druck zu und das Dilatationsverhalten des PU Stents ist bei Drucken ab 6 bar mit dem eines handelsüblichen Metallstents vergleichbar.

3.1.2 Spontaner Recoil des Polyurethan Stents

Nach Entfernen des Ballons zeigten die PU – im Gegensatz zu Metallstents – einen spontanen Recoil, d.h. sie konnten ihren ursprünglich mittels Ballon erreichten Durchmesser nicht aufrechterhalten. Alle getesteten PU

3. Ergebnisse

Stents wiesen einen spontanen Recoil auf, und zwar $11.5 \pm 3.5\%$ bei einem 3.0×8 mm PU Stent auf einem 3.0×12 mm Angioplastieballon; $8.4 \pm 3.5\%$ bei einem 3.0×8 mm PU Stent auf einem 3.5×12 mm Angioplastieballon; und $7.2 \pm 0.7\%$ bei einem 3.5×8 mm PU Stent auf einem 4.0×12 mm Angioplastieballon (Abb. 22).

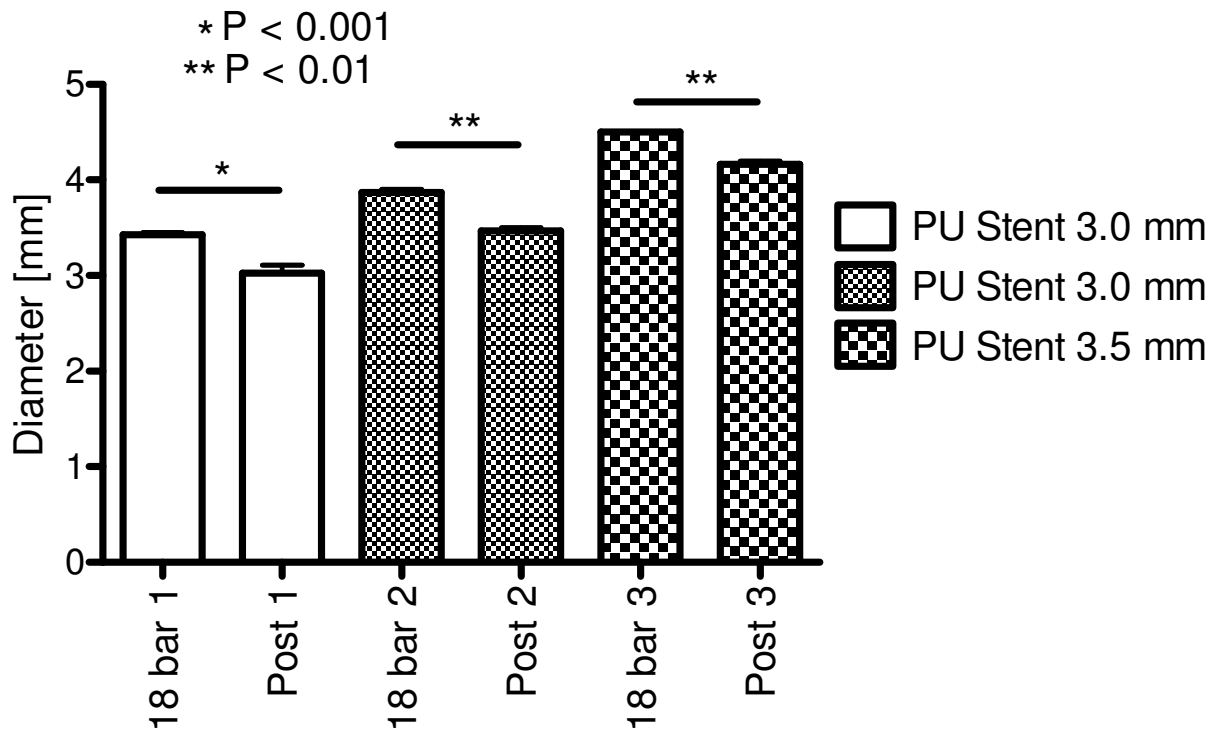


Abb. 22: Durchmesser der PU Stents während und 1 Minute nach Ballondilatation.

3.2 In vitro Biokompatibilitätstests

Als erstes wurde überprüft, ob die aus dem peripheren Blut isolierten Zellen nach 7 Tagen in Adhärenz-Zellkultur auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten, die für EPC ihre charakteristischen Colony Forming Units (CFU) aufwiesen (siehe Abb. 23), sowie die spezifischen Eigenschaften der Diac-LDL Aufnahme (siehe Abb. 24 links) und die Bindung von UEA-Lektin zeigten (siehe Abb. 24 Mitte).

3. Ergebnisse

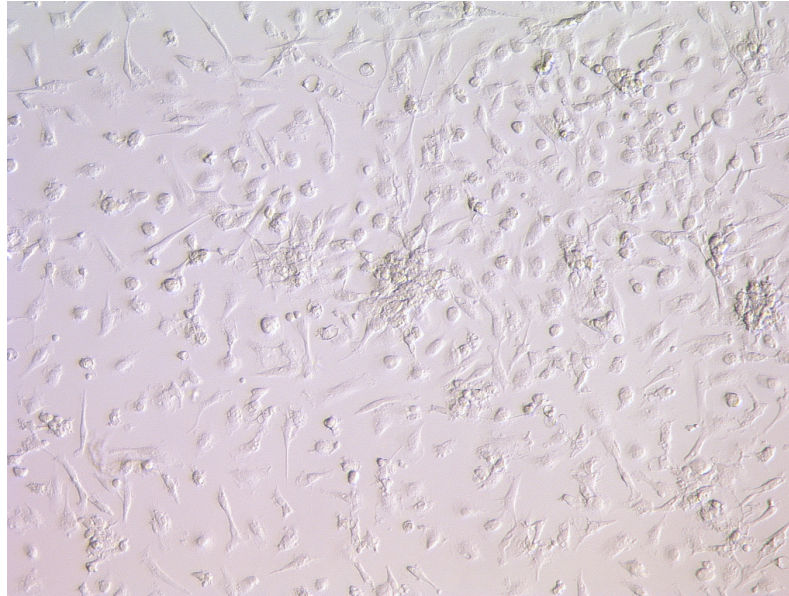


Abb. 23: Aufnahme von 7 Tage alten EPC (Vergrößerung = 100x). Charakteristische Kolonieformende Einheiten („Colony forming units“) der EPC.

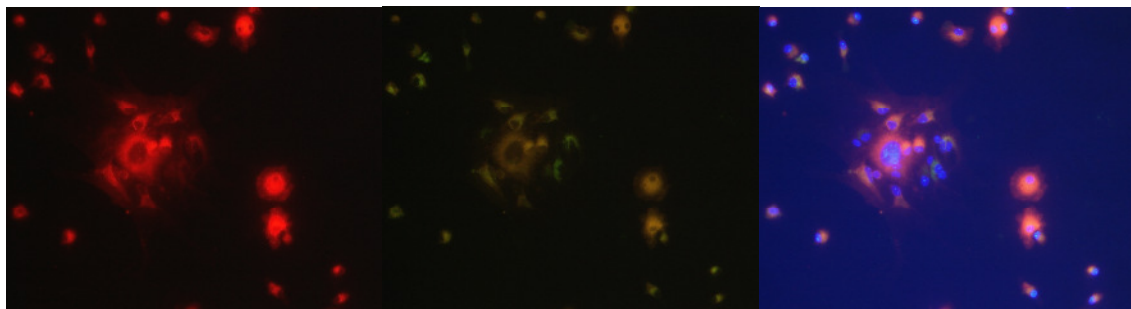


Abb. 24 links: Di-acLDL Aufnahme von 7 Tage alten EPC, **mitte:** UEA-Lektin Bindung von 7 Tagen alten EPC **rechts:** zusammengelegte Fluoreszenzmikroskopiebilde (Zellkerne = DAPI) Vergrößerung = 200x). Der Status der EPC wurde nach 7 Tagen in Kultur durch die Di-ac-LDL Aufnahme und die Bindung von UEA-Lektin bestätigt. (rot = Di-ac-LDL, grün = UEA-lektin, blau = DAPI)

Nach Bestätigung des EPC Phänotyps wurden die Zellen für die nachfolgenden Biokompatibilitätstests (Proliferations-/Vitalitätstest, Migrations- und Adhäsionsassays) verwendet.

3.2.1 Proliferationsassays/ Vitalitätsassay

Der Einfluss von PU auf die Vitalität, bzw. Proliferation von HUVEC und HuSMC wurde durch Vitalitätstests ermittelt. HUVEC zeigten bei der Inkubation mit PU eine im Vergleich zu Kontrollen signifikant verringerte Vitalität ($p < 0.001$), doch im Vergleich zu anderen bereits im klinischen Einsatz befindlichen Materialien (DES, bzw., Vicryl) keinen signifikanten Vitalitätsunterschied ($p > 0.05$) (Abb. 25).

3. Ergebnisse

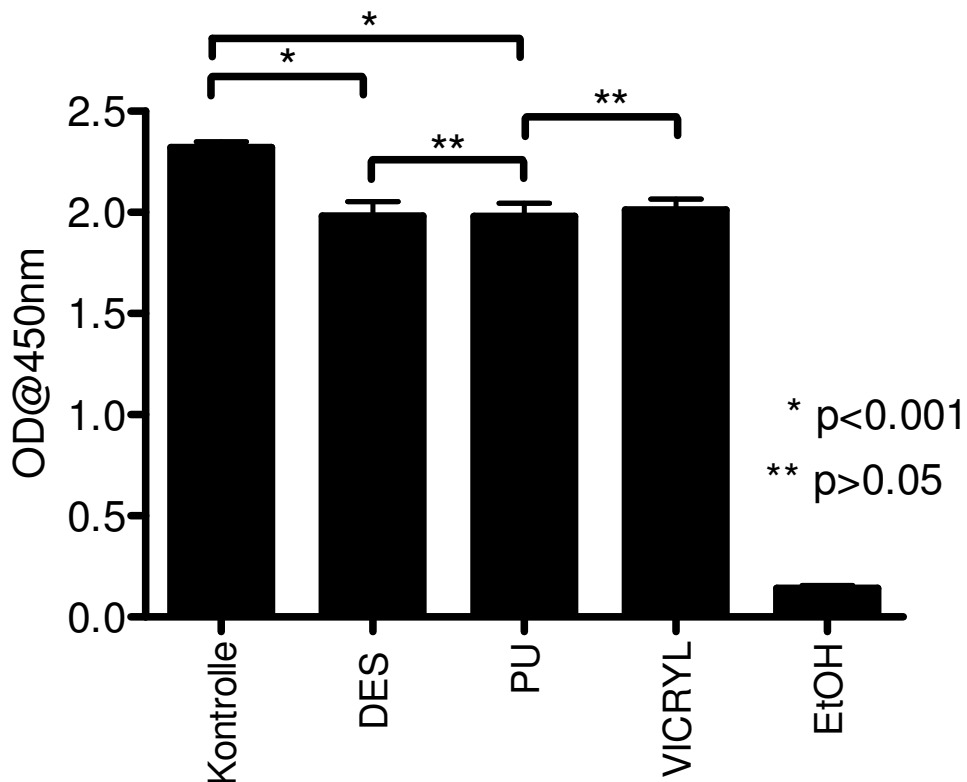


Abb. 25: In vitro Biokompatibilitätstest: Im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte HUVEC) konnte ein signifikanter Unterschied der Proliferation von HUVEC in Anwesenheit von DES, Vicryl und PU festgestellt werden ($p<0.001$). Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den verwendeten Materialien ($p>0.05$).

HuSMC hingegen zeigten eine im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte Vitalität ($p<0.01$). Im Vergleich zur Vitalität bei Anwesenheit von DES war die Vitalität von HuSMC in Anwesenheit von PU signifikant erhöht ($p<0.05$). Im Vergleich zu Vicryl zeigte sich kein Unterschied ($p>0.05$, Abb. 26).

3. Ergebnisse

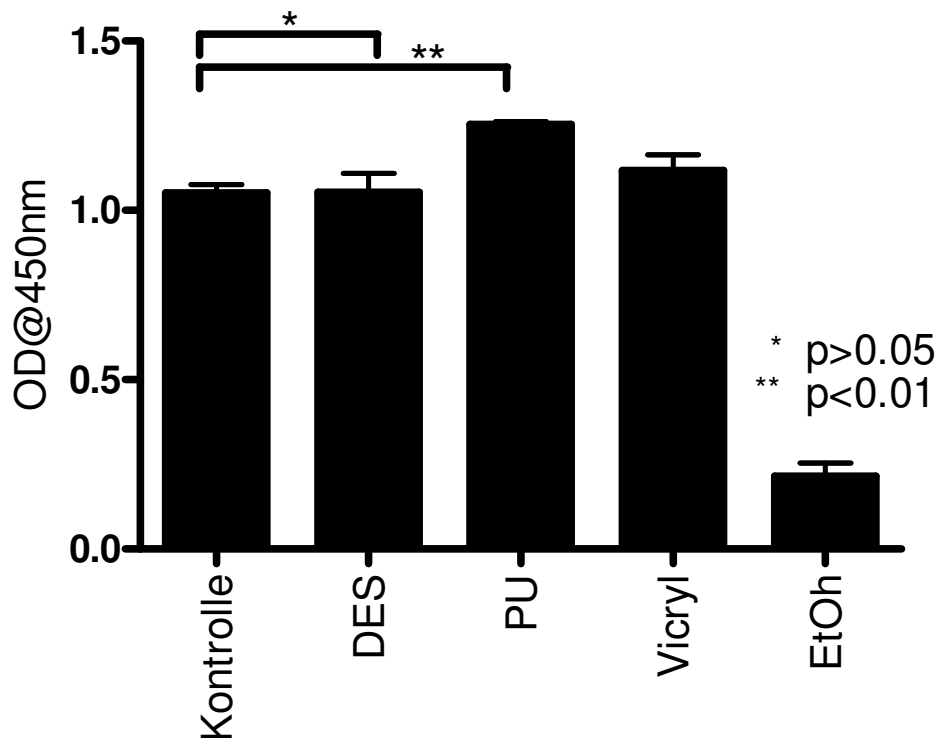


Abb. 26: In vitro Biokompatibilitätstest: Im Vergleich zur Kontrolle (HuSMC) konnte ein signifikanter Unterschied der Proliferation von HuSMC in Anwesenheit von PU festgestellt werden ($p < 0.01$). Im Vergleich zu den mit DES und Vicryl zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$).

Die durch die Anwesenheit von Ethanol (EtOH) ermittelten Werte entsprechen der Negativkontrolle ($p < 0.001$ vs. Kontrollen).

3.2.1.1 Proliferationsassays BrdU der rVSMC

Die Proliferation der unterschiedlichen rVSMC wurde durch einen BrdU-Proliferationstest ermittelt. Dabei zeigten die aus den ApoE^{-/-} Ratten isolierten rVSMC eine im Vergleich zu den WT rVSMC signifikant erhöhte Proliferation (138.4 ± 4.7 vs. $100.0 \pm 4.3\%$; $p < 0.0001$; Abb. 27).

3. Ergebnisse

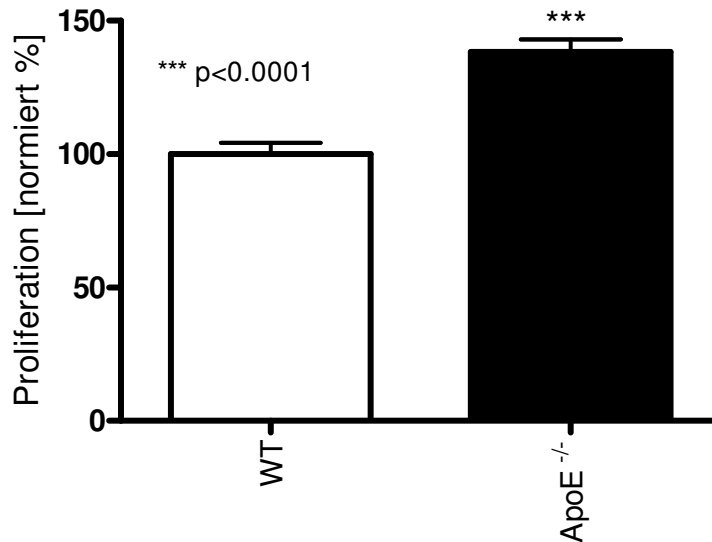


Abb. 27: *In vitro* BrdU-Proliferationstest der unterschiedlichen rVSMC: Im Vergleich zu WT-rVSMC zeigten die ApoE^{-/-} rVSMC eine signifikant erhöhte Proliferation ($p < 0.0001$).

3.2.2 Migrationsassays

Zur Ermittlung des Einflusses von PU auf die Migration von Endothelzellen wurden Migrationsassays in modifizierten Boydenkammern durchgeführt. Die Migration wurde in unstimulierten HUVEC (Kontrolle und Kontrolle + PU) und in durch Endothelzell-konditioniertem (EKM) und Endothelprogenitorzell-konditioniertem (EPC KM) Medium stimulierten HUVEC ermittelt. In allen PU Ansätzen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Migration ($p > 0.05$) gegenüber den jeweiligen Kontrollen. Die durch konditionierte Medien (EKM und EPC KM) stimulierten HUVEC zeigten eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Migration ($p < 0.05$) (Abb. 28).

3. Ergebnisse

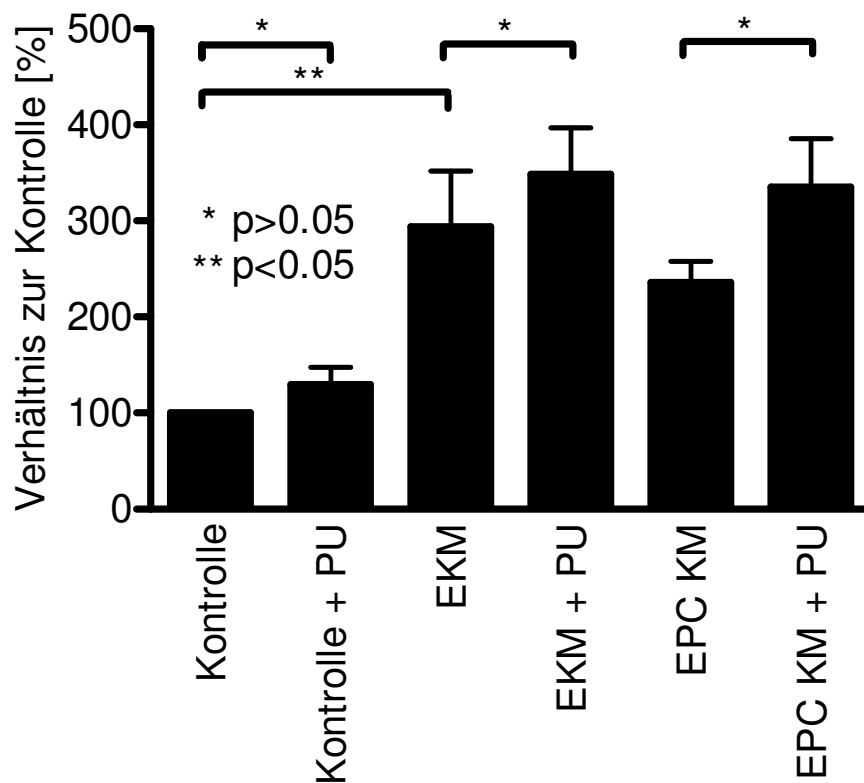


Abb. 28: Migrationsassay: PU zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Migration von unstimulierten und EKM-, bzw. EPC KM-stimulierten HUVEC.

Die Migration wurde in unstimulierten EPC (Kontrolle und Kontrolle + PU) und in durch EKM und EPC KM Medium stimulierten EPC ermittelt. Im unstimulierten Ansatz zeigte sich ein nicht signifikanter Einfluss des PU auf die Migration von EPC ($p > 0.05$). Bei den EKM und EPC KM stimulierten EPC reduzierte die Anwesenheit von PU die Migration ($p < 0.01$ EKM vs. EKM + PU, bzw. $p < 0.05$ EPC KM vs. EPC KM + PU) (Abb. 29).

3. Ergebnisse

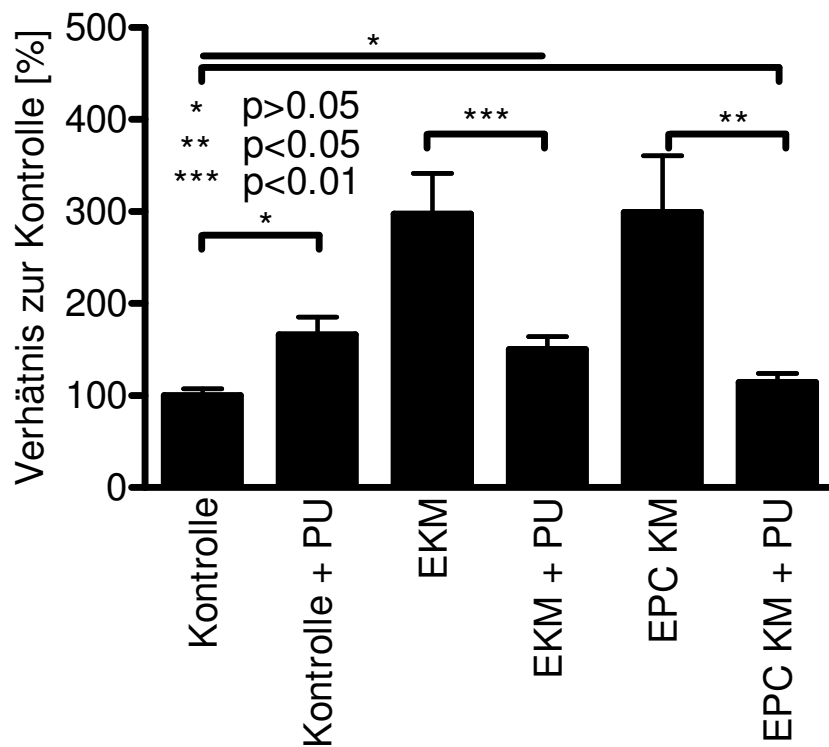


Abb. 29: Migrationsassay: PU zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Migration von unstimulierten EPC ($p > 0.05$) allerdings zeigten EKM-, bzw, EPC KM-stimulierten EPC eine signifikante Migration wenn PU anwesend war ($p < 0.01$, bzw. $p < 0.05$).

Zur Ermittlung des Einflusses von PU auf die Migration von HuSMC wurden Migrationsassays in modifizierten Boydenkammern durchgeführt. Die Migration wurde in unstimulierten HuSMC (Kontrolle und Kontrolle + PU) und in durch EKM und EPC KM stimulierten HuSMC ermittelt. In allen PU Ansätzen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Migration ($p > 0.05$). Die durch konditionierte Medien stimulierten HuSMC zeigten eine im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen signifikant erhöhte Migration ($p < 0.001$) (Abb. 30).

3. Ergebnisse

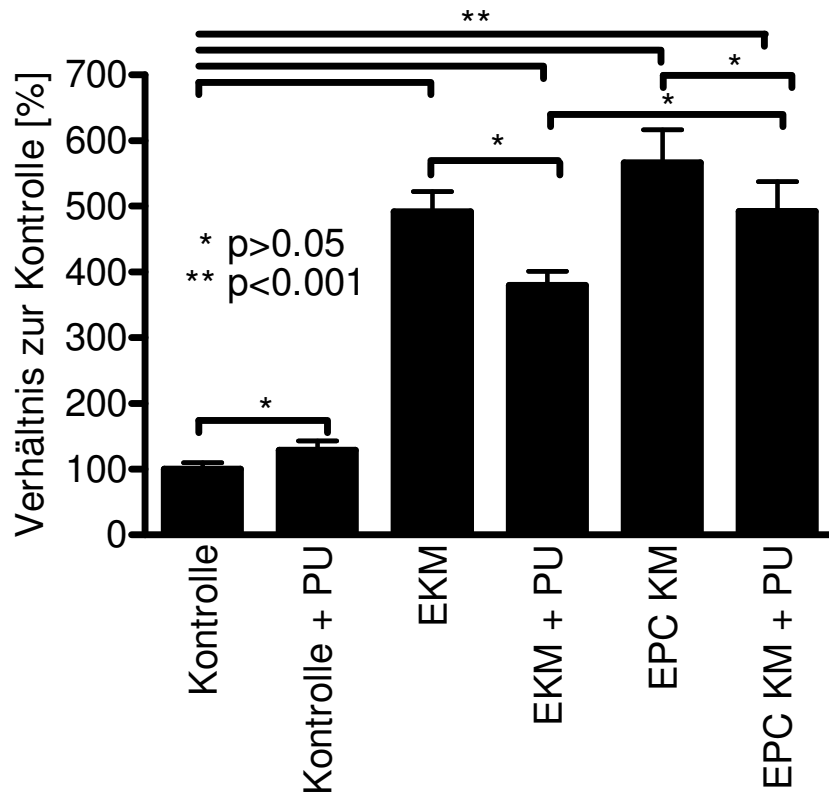


Abb. 30: Migrationsassay: PU zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Migration von unstimulierten und EKM-, bzw, EPC KM-stimulierten HuSMC.

3.2.3 Adhäsion an Polyurethan Geflechte

Zur Ermittlung der Adhäsion von EPC an PU wurden Calcein-fluoreszenzmarkierte 7 Tage alte EPC mit dem PU für 30 min. inkubiert. Die Abbildungen zeigen vitale Zellen in PU konditioniertem Medium (Abb. 31 links) und auf PU Monofilamenten (Diameter 200 μm).

3. Ergebnisse

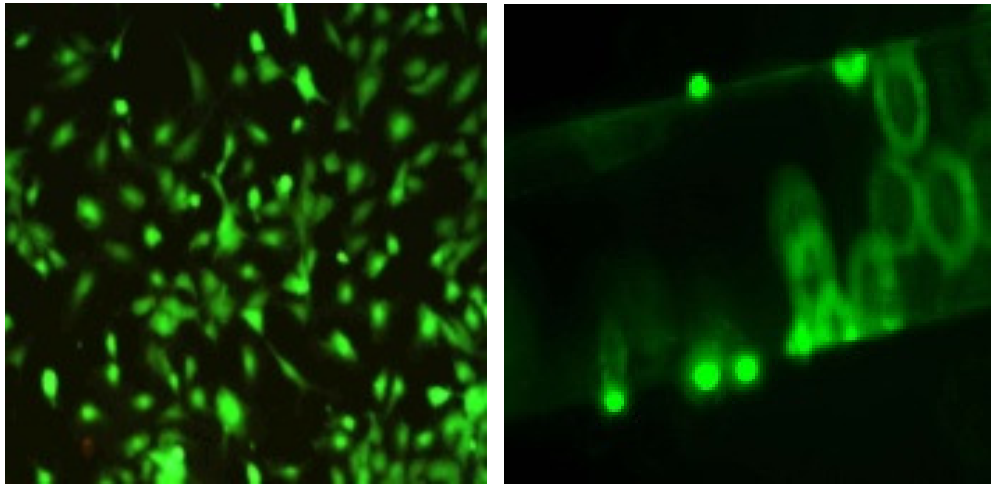


Abb. 31: links: Calcein-fluoreszenz gefärbte EPC in PU-konditioniertem Medium zeigen eine deutliche Vitalität. rechts: Calcein-fluoreszenz gefärbte EPC an einem PU Monofilament. (Vergrößerung links: 200x, rechts 200x)

Zusätzlich wurden die PU Netze mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Dort zeigte sich, dass EPC die Fähigkeit besitzen an PU zu adhären, wo sie eine spindelartige Form annehmen (siehe Abb. 32). Zusätzlich konnte die Oberflächenbeschaffenheit der Monofilamente genauer betrachtet werden. Dabei zeigte sich, dass die durch das Schmelzspinnen hergestellten PU Monofilamente eine glatte Oberfläche aufwiesen.

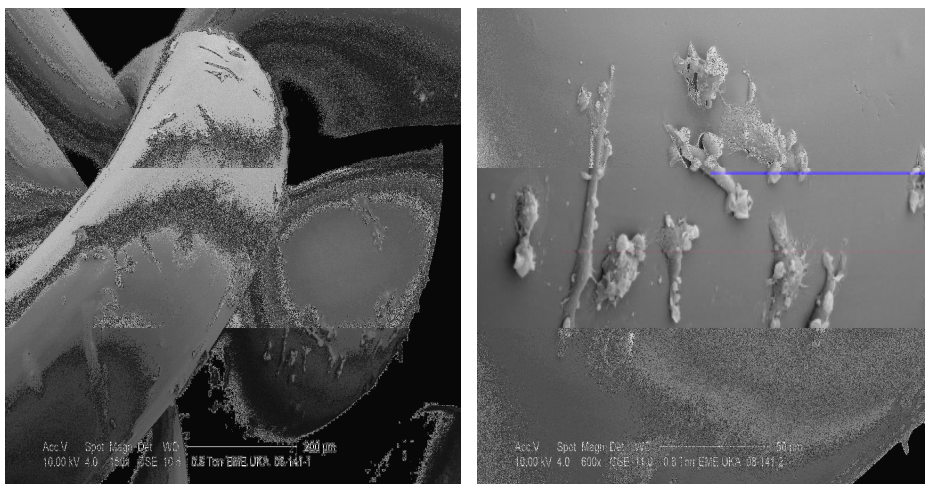


Abb. 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von adhären EPC auf PU Netzen (Vergrößerung links: 150x, rechts 600x)

Im nächsten Schritt wurde die Kinetik der Adhäsion von EPC an unterschiedliche Komponenten der ECM, Plastik und PU fluorometrisch

3. Ergebnisse

quantifiziert. Dabei zeigte sich eine zeitabhängige Adhäsion bei Vitronectin (Vn), Fibronectin (Fn) und den Zellkulturplatten (Abb. 33), die bei Kol nicht beobachtet werden konnte.

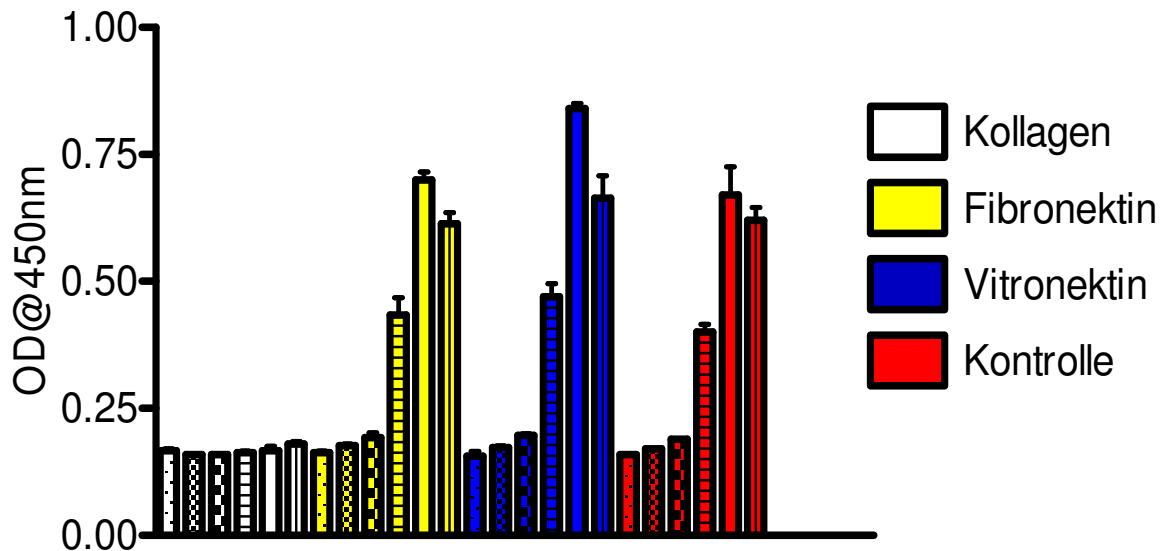


Abb. 33: Zeitabhängige Adhäsion von 7 Tage alten EPC an Komponenten der ECM (Kollagen, Fibronectin, Vitronectin) und Zellkulturplatten (Kontrolle) (0, 2, 5, 15, 30, und 60 Minuten). Maximale Adhäsion nach 30, bzw. 60 Minuten ($p < 0.001$ nach 30, 60 Minuten vs. 0, 2, 5, 15 Minuten)

Da EPC die höchste Adhäsivität nach 30 - 60 Minuten zeigten, wurden 30 minütige Adhäsionsassays mit Fn- und Vn-beschichteten und unbeschichteten PU-Netzen durchgeführt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied der Adhäsion von EPC an die beschichteten und unbeschichteten PU-Netze ($p > 0.05$) (siehe Abb. 34) ermittelt werden.

3. Ergebnisse

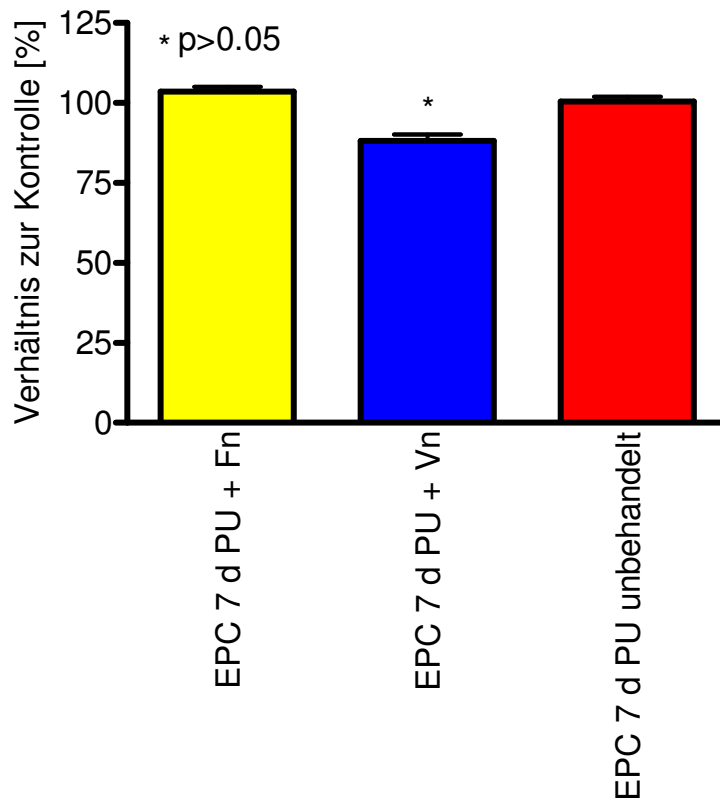


Abb. 34: Adhäsion von 7 Tagen alten EPC an Fn/Vn-beschichtete oder unbeschichtete PU-Netze ($p > 0.05$ vs. unbeschichtetem PU-Netz)

3.3 *In vivo*

3.3.1 Sprague Dawley Ratten und BMS

Die Stent-Implantation in die abdominale Aorta von Sprague-Dawley Ratten war sowohl mit handelsüblichen BMS als auch mit den mittels 3D-Flechten hergestellten PU Stents durchführbar. Allerdings musste das Abwurfssystem für die PU Stents modifiziert werden. 11 Tiere erhielten einen BMS (5 Tiere für 7 Tage und 6 Tiere für 28 Tage und die Kontrollernährung (ND). 12 Tiere erhielten einen BMS und die fettreiche Ernährung (WD). Die ermittelten Restenose-Raten lagen nach 7 Tagen bei $7,2\% \pm 2,5$ und nach 28 Tagen bei $17,6\% \pm 5,8$ ($p < 0.0001$ vs. 7 Tage; Abb. 35). Die ermittelten Werte bei den Tieren, die eine fettreiche Ernährung erhielten, lagen nach 7 Tagen bei $9,45\% \pm 4,16$ und nach 28 Tagen bei $12,25\% \pm 3,68$.

3. Ergebnisse

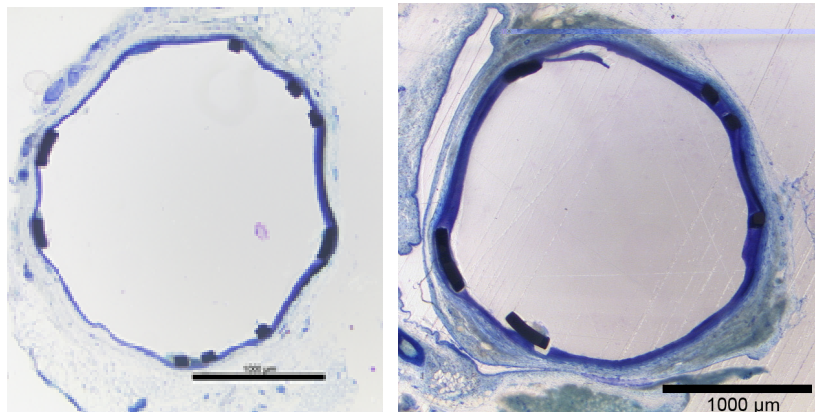
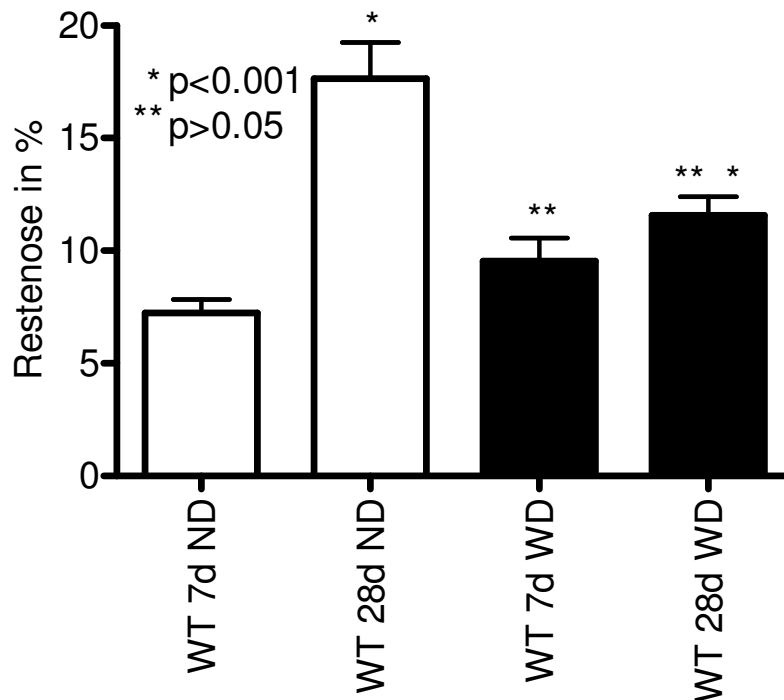


Abb. 35: oben: In-Stent Restenose nach abdominalem Stenting. Die höchste ISR Rate konnte bei Sprague-Dawley Ratten mit Kontrollernährung 28 Tage nach Stent-Implantation beobachtet werden ($p<0.0001$ vs. BMS 7d). Eine fettreiche Ernährung führte zu keiner signifikanten Erhöhung der ISR Rate weder 7 noch 28 Tage nach BMS Implantation (BMS 7d vs. BMS 7d WD $p>0.05$; BMS 7d vs. BMS 28d WD $p<0.001$; BMS 7d WD vs. BMS 28d WD $p>0.05$). **unten:** Giemsa Färbung der BMS in abdominalen Aorta. Links: 7 Tage nach Implantation, Rechts: 28 Tage nach Implantation (Vergrößerung 25x).

Neointima Fläche:

Im nächsten Schritt wurde die entstandene neointimale Fläche ermittelt. Nach 7 Tagen lag die neointimale Fläche bei ND bei $0,27 \pm 0,10 \text{ mm}^2$, nach 28 Tagen bei $0,68 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ ($p<0.001$). In der WD Gruppe betrug die neointimale

3. Ergebnisse

Fläche nach 7 Tagen $0,41 \pm 0,25 \text{ mm}^2$, nach 28 Tagen $0,47 \pm 0,19 \text{ mm}^2$ ($p > 0,05$). Zwischen den Gruppen mit fettreicher Ernährung (7 und 28d) und den Kontrollgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 36).

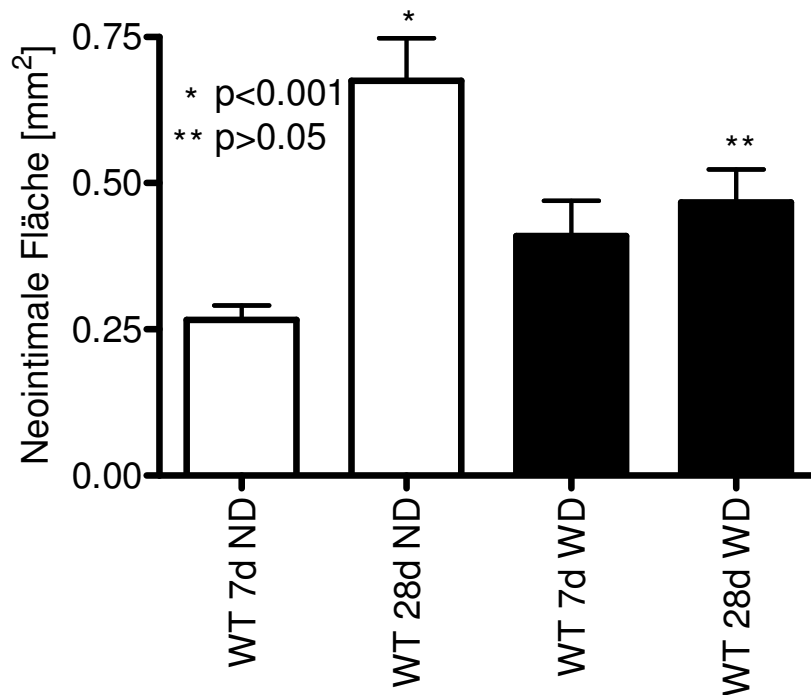


Abb. 36: Neointima Fläche [mm^2] nach 7 und 28 Tagen.

Mediafläche:

Die Mediafläche in den jeweiligen Versuchsgruppen wurde ermittelt, wiesen aber keinen signifikanten Unterschied auf. Nach 7 Tagen lag die Mediafläche bei ND bei $0,34 \pm 0,04 \text{ mm}^2$, nach 28 Tagen bei $0,42 \pm 0,16 \text{ mm}^2$ ($p > 0,05$). In der WD Gruppe lag die neointimale Fläche nach 7 Tagen bei $0,35 \pm 0,10 \text{ mm}^2$, nach 28 Tagen bei $0,33 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ ($p > 0,05$). Zwischen den Gruppen mit fettreicher Ernährung (7 und 28d) und den Kontrollgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 37).

3. Ergebnisse

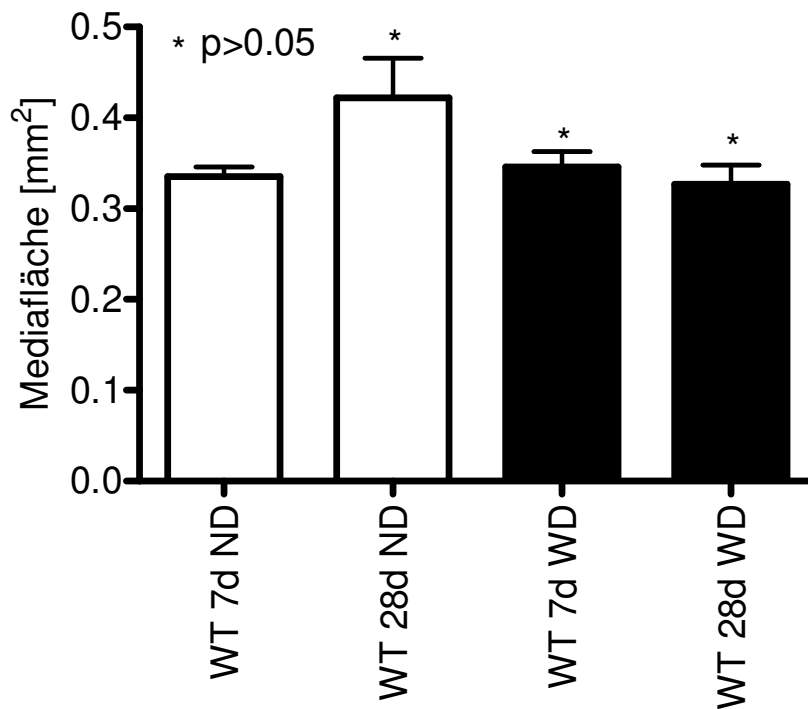


Abb. 37: Mediafläche [mm²] nach 7 und 28 Tagen.

Neointima/Media Verhältnis:

Das Neointima/Media Verhältnis in den jeweiligen Versuchsgruppen wurde aus den Neointima Flächen und Media Flächen der jeweiligen Schnitte ermittelt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden 28 Tage ($1,68 \pm 0,20$) und 7 Tage Gruppen ($0,79 \pm 0,09$), sowohl bei fettreicher als auch normaler Ernährung. Zwischen den beiden 28 Tage Versuchsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied ($p>0.05$) (Abb. 38).

3. Ergebnisse

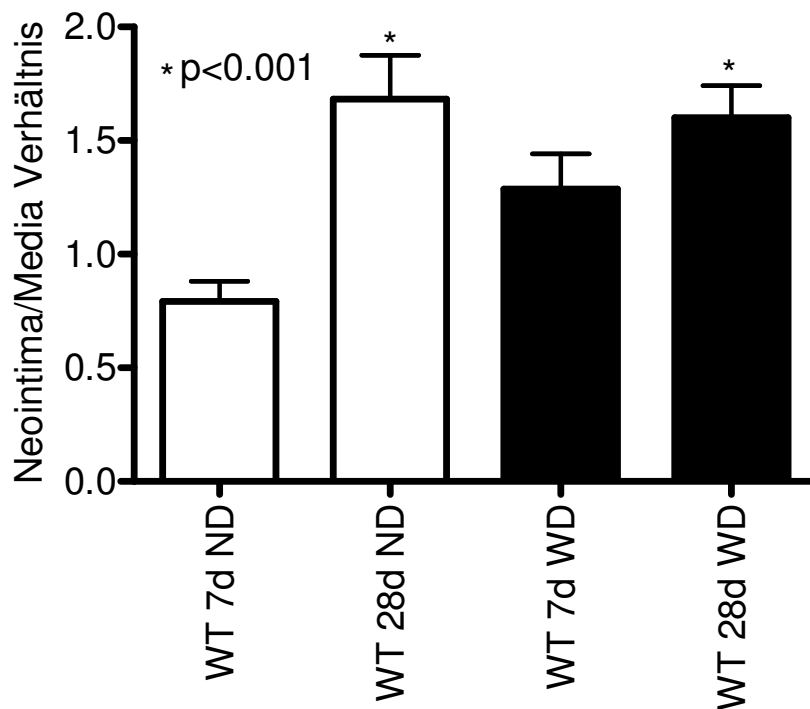


Abb. 38: Neointima/Media-Verhältnis nach 7 und 28 Tagen

Neointima Dicke:

Die Neointima Dicke in den jeweiligen Versuchsgruppen wurde ermittelt und wies einen signifikanten Unterschied zwischen 7 Tagen und 28 Tagen nach Intervention auf (Abb. 39). Nach 7 Tagen war die Neointima in WT Ratten bei ND $53,3 \mu\text{m} \pm 15,9 \mu\text{m}$ dick; nach 28 Tagen war die Neointima $113,7 \mu\text{m} \pm 30,7 \mu\text{m}$ dick ($p < 0.001$ vs. BMS 7d ND); bei den Tieren mit fettreicher Ernährung war die Neointima nach 7 Tagen $59,4 \mu\text{m} \pm 26,5 \mu\text{m}$ ($p > 0.05$ vs. BMS 7d ND) und nach 28 Tagen $86,5 \mu\text{m} \pm 23,2 \mu\text{m}$ dick ($p < 0.001$ vs BMS 7d ND & BMS 7d WD).

3. Ergebnisse

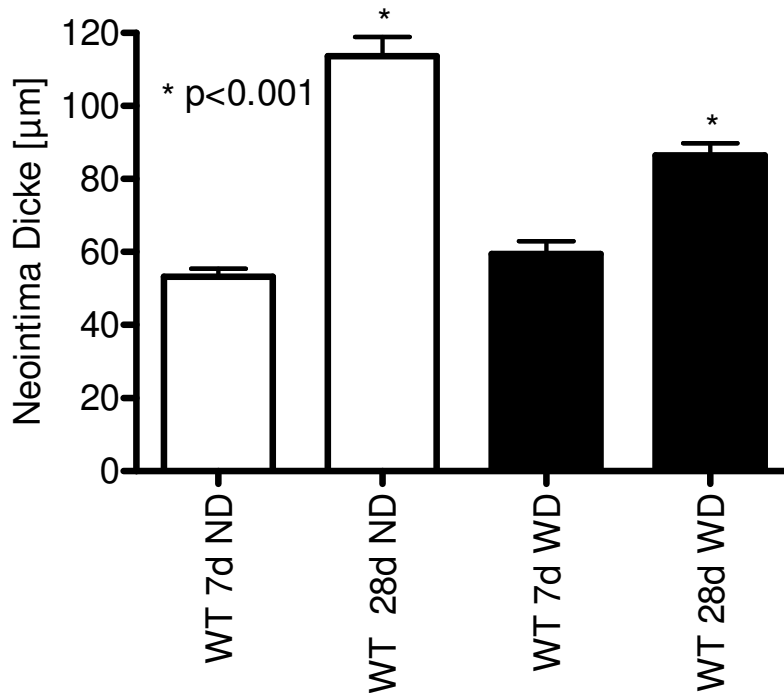


Abb. 39: Neointima Dicke [µm] nach 7 und 28 Tagen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen

3.3.2 ApoE^{-/-} Ratten und BMS

3.3.2.1 Perioperative Mortalität

Insgesamt wurden 25 ApoE^{-/-} Ratten der Stentimplantation unterzogen. Drei ApoE^{-/-} Ratten wurden direkt nach der Operation euthanasiert, da es nicht gelang das Gefäß zu verschließen; bei 22 ApoE^{-/-} Ratten gelang die Intervention (Überlebensrate: 88%). Acht ApoE^{-/-} Ratten zeigten Symptome einer Stentthrombose (ST), wurden innerhalb von 24 h euthanasiert und die ST wurde bestätigt (ST Rate: 32%). Sechs ApoE^{-/-} Ratten wurden nach 7 Tagen euthanasiert; innerhalb der 28 Tage Gruppe, verstarben 3 von 8 Ratten (37.5%) zu unerwarteten Zeitpunkten (zwischen 9 und 17 Tagen nach Intervention) durch interne Blutungen oder durch die Bildung eines abdominalen aortalen Aneurysmen (Abb. 40).

3. Ergebnisse

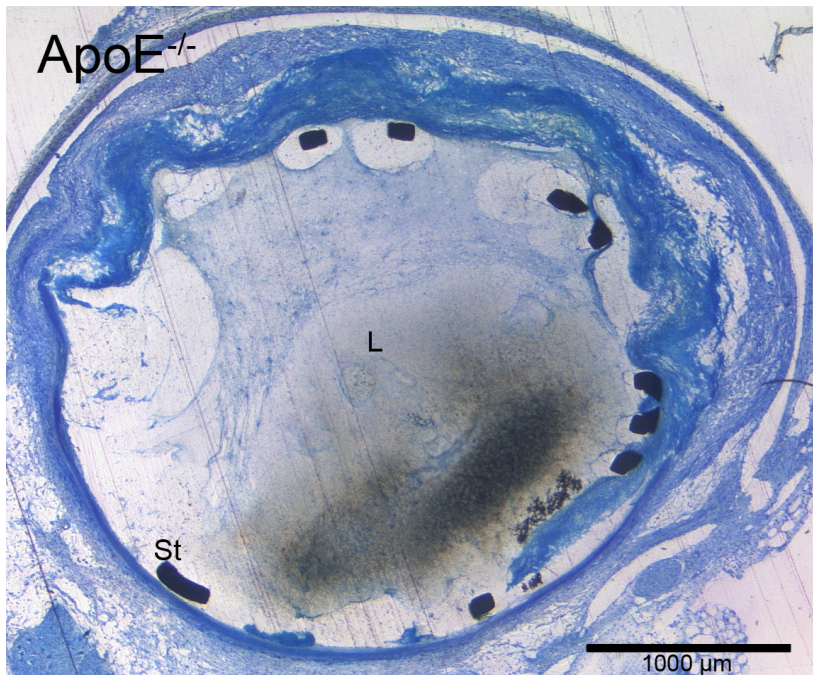


Abb. 40: Giemsa Färbung der BMS in abdominalen Aorta 12 Tage nach Stentimplantation (Stentstrebe, L = Lumen).

In einer weiteren Versuchsgruppe wurden 16 WT Ratten operiert. Zwei Ratten wurden direkt nach der Operation euthanasiert, da es nicht gelang das Gefäß zu verschließen. Bei 14 Tieren war die Intervention erfolgreich (Überlebensrate: 87.5%). Zwei WT Ratten zeigten Symptome einer ST (ST Rate: 14.3%). Alle 12 SPDW Ratten, die keine Symptome der ST zeigten und die die Operation überlebten, überlebten ohne Einschränkungen bis zu den geplanten Tötungszeitpunkten. Bei den Kontrolltieren konnten keine internen Blutungen oder AAA Formation festgestellt werden (Abb. 41).

3. Ergebnisse

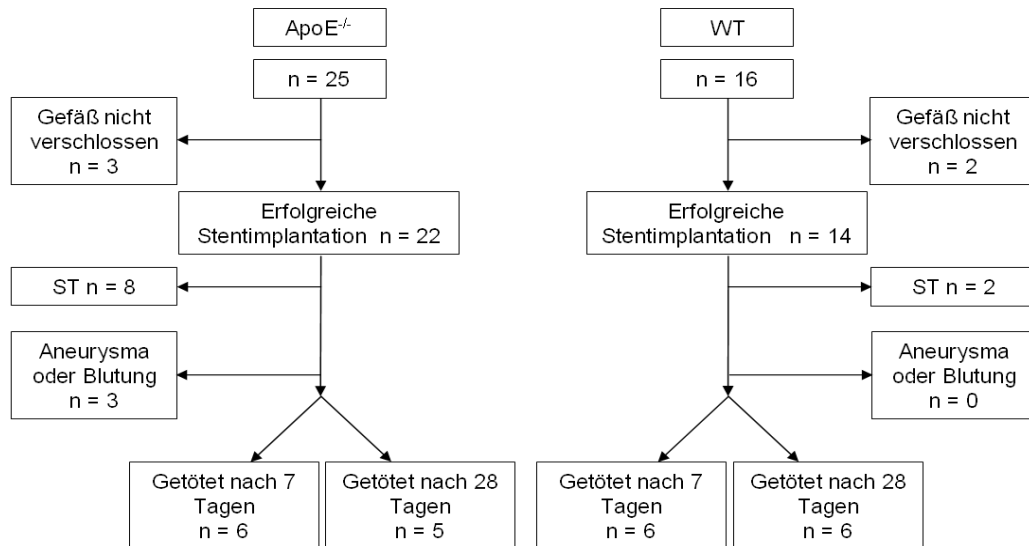


Abb. 41: Die perioperative Mortalität durch missglückten Gefäßverschluss war in beiden Versuchsgruppen gleich; sowohl die Rate der letalen ST und der letalen vaskulären Verletzungen (abdominales aortales Aneurysma und/oder innere Blutungen) waren in ApoE^{-/-} Ratten erhöht.

3.3.2.2 Histomorphometrische Analysen ApoE^{-/-} vs WT

Die Gefäßgröße (Gefäßfläche) betrug nach 7 Tagen $5.3 \pm 0.31 \text{ mm}^2$ vs. $3.9 \pm 0.14 \text{ mm}^2$ ($p < 0.05$) für ApoE^{-/-} vs. WT Ratten. Die ISR lag bei $11.1 \pm 1.4 \%$ vs. $2.1 \pm 0.5 \%$ ($p < 0.05$). Die Neointimale Fläche war $0.59 \pm 0.1 \text{ mm}^2$ vs. $0.07 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ ($p < 0.01$) und Neointimale Dicke war $87.0 \pm 14.6 \mu\text{m}$ vs. $54.6 \pm 8.2 \mu\text{m}$ ($p > 0.05$) in ApoE^{-/-} vs. WT Ratten.

Die Gefäßgröße betrug nach 28 Tagen $5.9 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ vs. $4.4 \pm 0.2 \text{ mm}^2$ ($p < 0.01$) für ApoE^{-/-} vs. WT Ratten. Die ISR betrug $26.4 \pm 3.9 \%$ vs. $13.1 \pm 1.9 \%$ ($p < 0.001$), und die Neointimale Fläche war $1.5 \pm 0.38 \text{ mm}^2$ vs. $0.54 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ ($p < 0.01$) groß. Die Neointimale Dicke lag bei $216.7 \pm 56.8 \mu\text{m}$ vs. $117.6 \pm 16.3 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$) in ApoE^{-/-} vs. WT Ratten (Abb. 42 und 43).

ApoE^{-/-} Ratten zeigten Überreste einer Thrombose und gelegentliche Stentmalapposition aufgrund des positiven Remodellings, dass bei den Tieren beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu waren alle Kontrollgefäße histologisch analysierbar, keine Stent Malapposition konnte detektiert werden. Die Injury Scores in allen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

3. Ergebnisse

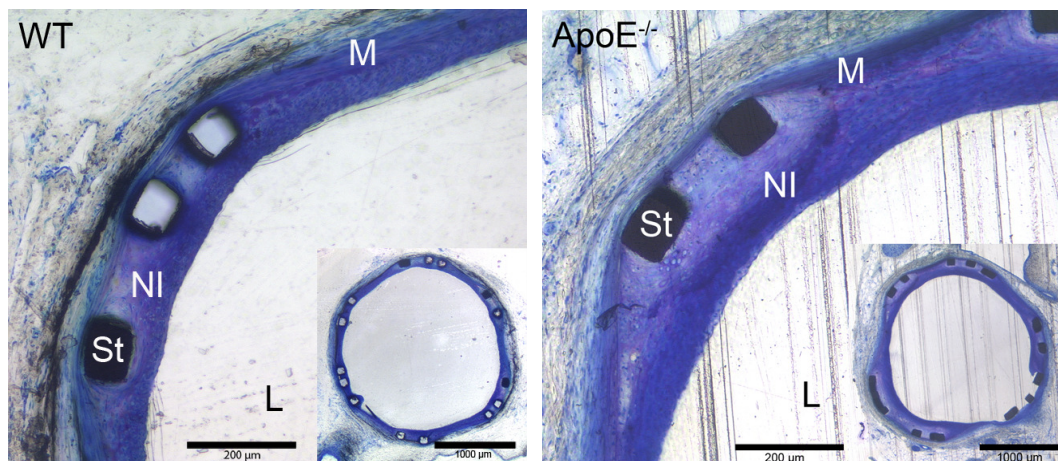
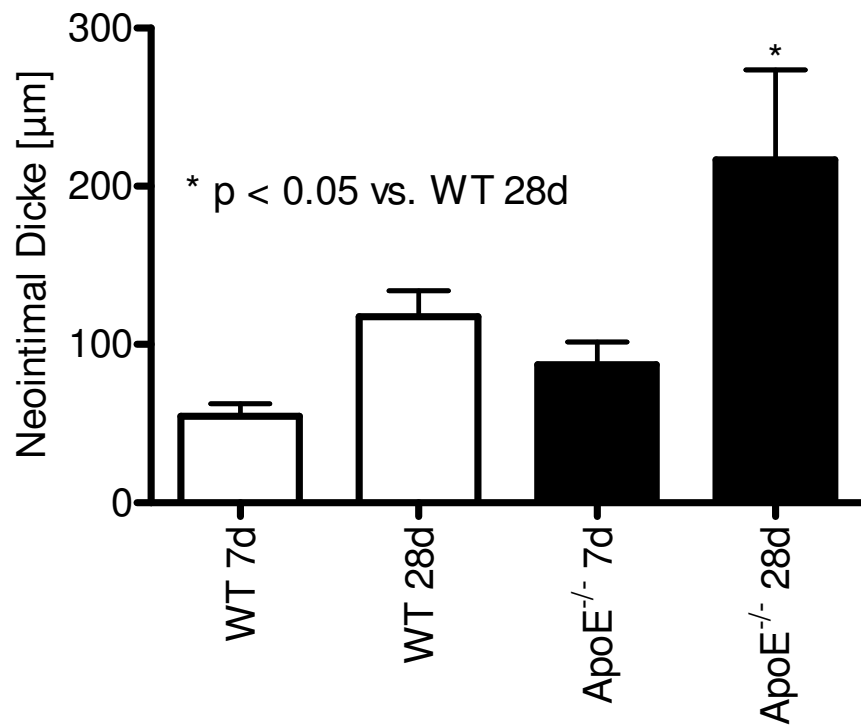


Abb. 42: oben: Die Neointimale Dicke nach abdominalen Stenting in WT und ApoE^{-/-} Ratten. **unten:** Repräsentative Abbildungen der Giemsa-gefärbten abdominalen Aorta 28 Tage nach Stentimplantation in WT (links) und ApoE^{-/-} Ratten (rechts).

3. Ergebnisse

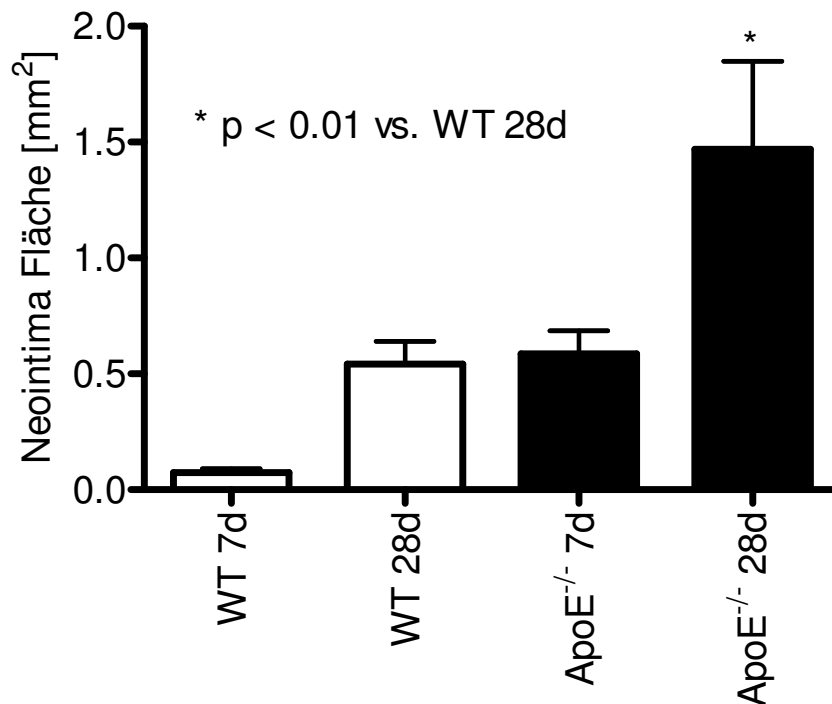


Abb. 43: Die Neointimale Fläche (NI) in WT Ratten war nach 28 Tage nach Intervention signifikant erhöht.

3.3.2.3 Histopathologische Analysen

Durch die Evaluation der Dichte der chronisch inflammatorischen Zellen (CIC) zeigte sich eine erhöhte Inflammation 7 Tage nach Stentimplantation in ApoE^{-/-} vs. WT rats (108 ± 26 vs. 29.3 ± 5 CIC/Gesichtsfeld (HPF); $p < 0.05$). Auch nach 28 Tagen war die Inflammation in ApoE^{-/-} Ratten signifikant erhöht (ApoE^{-/-} vs. WT rats 456.2 ± 181.4 vs. 108.0 ± 25.9 CIC/HPF; $p < 0.05$ (Abb. 44).

3. Ergebnisse

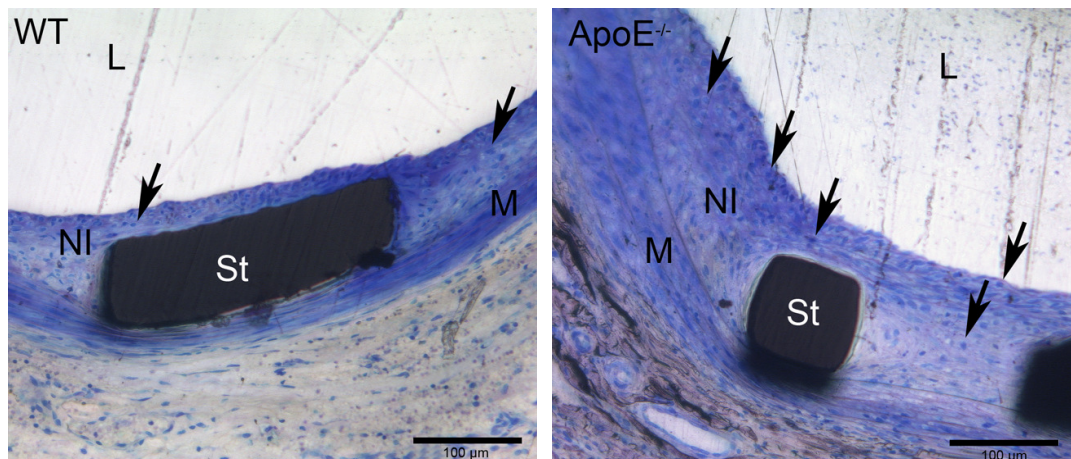
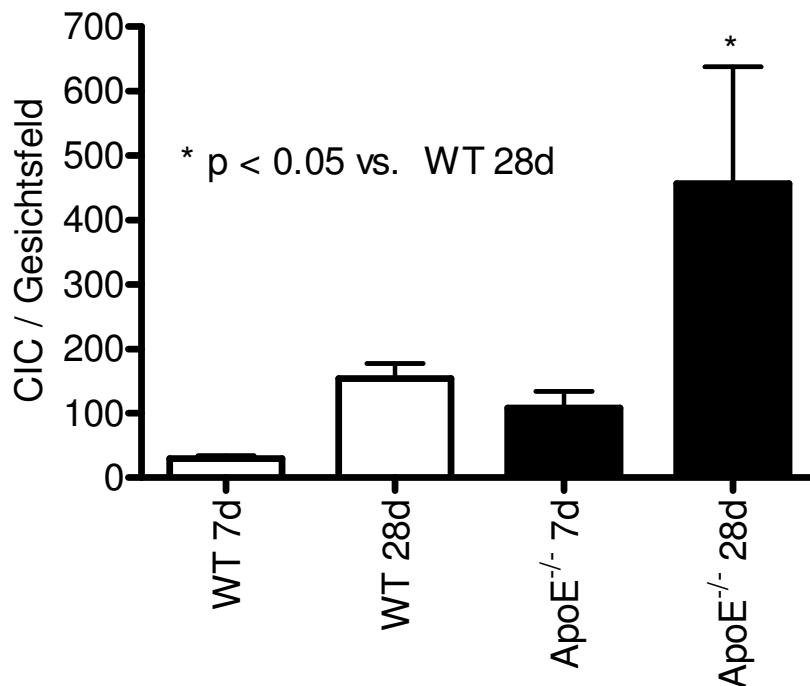


Abb. 44: oben: Die CIC Dichte in ApoE^{-/-} 28 Tage nach Intervention war signifikant erhöht. **unten:** Repräsentative Abbildungen von Giemsa-gefärbten abdominalen Aorten 28 Tage nach Stentimplantation in WT (links) und ApoE^{-/-} (rechts); NI = neointima, St = Stentstrebe, M = Media, L = Lumen; (Maßstabsbalken = 100μm).

Der Anteil des Gesamtgefäßdurchmessers, der 7 Tage nach der Intervention keine charakteristische, zirkulär angeordnete Media aufwies, war bei den ApoE^{-/-} Tieren im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht (33.2 ± 4.7 vs. 8.5 ± 1.8 % ($p < 0.001$)). Auch nach 28 Tagen war der Anteil, der keine charakteristische Media aufwies signifikant erhöht (50.1 ± 4.5 vs. 10.0 ± 2.0 % ($p < 0.001$)) in ApoE^{-/-} vs. WT Ratten (Abb. 45).

3. Ergebnisse

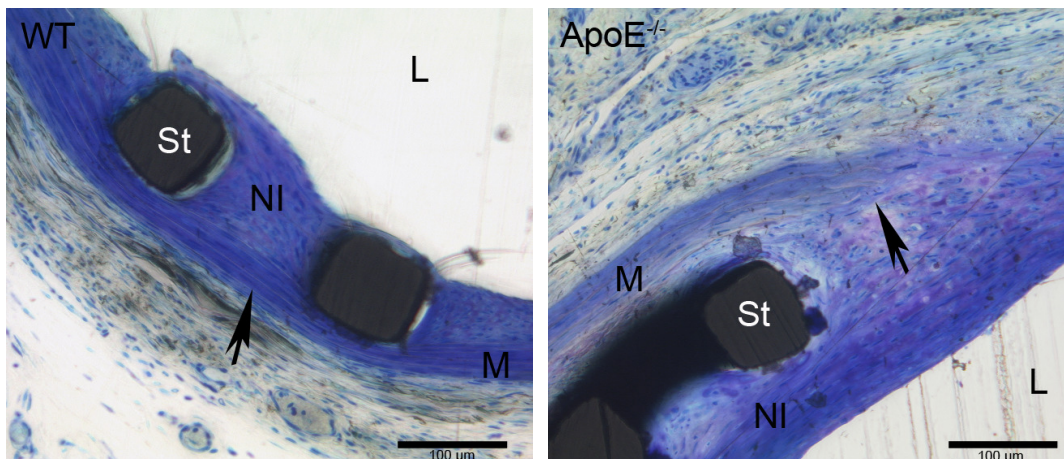
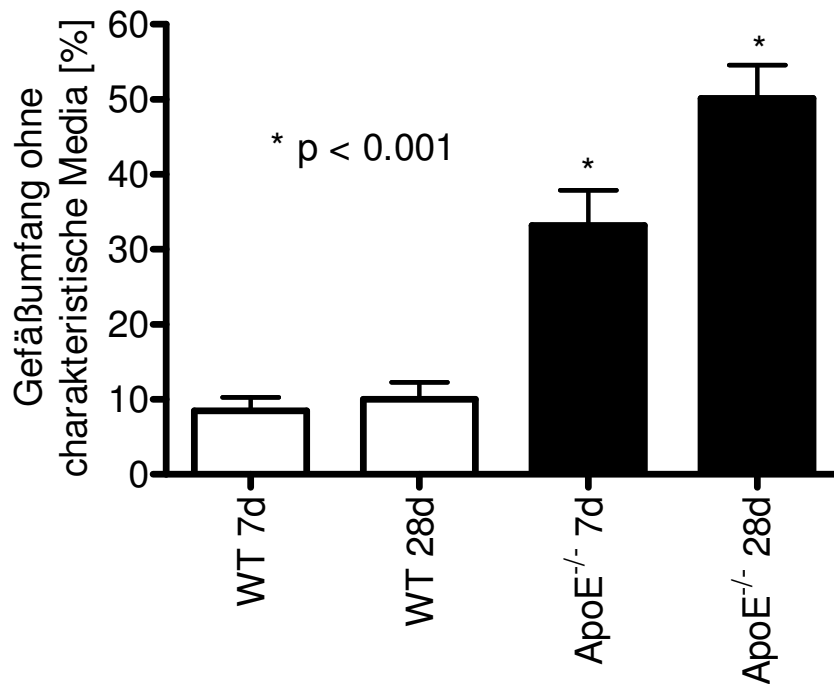


Abb. 45: oben: In ApoE^{-/-} Ratten zeigten sich vergrößerte Areale, die keine definierte und charakteristische konzentrische SMC Verteilung aufwiesen (beide ApoE^{-/-} Versuchsgruppen $p < 0.001$ vs. SPDW). **unten:** Repräsentative Abbildungen Giemsa-gefärbten abdominalen Aorten 28 Tage nach Stentimplantation in WT (links) und ApoE^{-/-} (rechts) (Maßstabsbalken = 100 μm).

3. Ergebnisse

Die histomorphometrischen und histopathologischen Werte der jeweiligen Versuchgruppen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Histomorphometrische und histopathologische Daten

7 Tage	ApoE^{-/-}	WT	p-Wert
In-stent Restenose (%)	11.1 ± 1.4	2.1 ± 0.5	<0.05
Neointimale Fläche (mm²)	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.0	n.s.
Chronisch inflammatorische Zellen	108 ± 26	29 ± 5	<0.05
Verletzungsgrad	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.2	n.s.
28 Tage	ApoE^{-/-}	WT	p-Wert
In-stent Restenose (%)	26.4 ± 3.9	13.1 ± 1.9	<0,001
Neointimale Fläche (mm²)	1.5 ± 0.4	0.5 ± 0.1	<0.01
Chronisch inflammatorische Zellen	456 ± 181	153 ± 23	<0.05
Verletzungsgrad	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.2	n.s.

3.3.2.4 Blutparameter und Interleukine

ApoE^{-/-} and WT Ratten wiesen keine Unterschiede in den Standard Blutwerten auf. Die Plasma Analysen zeigten, dass die Plasmacholesterinkonzentrationen in den ApoE^{-/-} Ratten signifikant erhöht waren (8.6 ± 1.7 mmol/l vs. 2.0 ± 0.5; p<0.001; Abb. 46), während sich die Glucose und Triglyceridkonzentrationen nicht unterschieden. Die Konzentrationen von IL-8 war bei ApoE^{-/-} Ratten erhöht (1026.0 ± 352.1 pg/ml vs. 342.0 ± 39.7 pg/ml; p<0.05; Abb. 47). Im Gegensatz dazu war die IL-10 Konzentration in ApoE^{-/-} reduziert (26.2 ± 8.2 pg/ml vs. 90.7 ± 6.5 pg/ml; p<0.001; Abb. 46). Die Blutserumkonzentration von IL-6 zeigte keinen Unterschied zwischen ApoE^{-/-} und WT Ratten (199.0 ± 2.0 pg/ml vs. 187.2 ± 2.8 pg/ml (p>0.05)) (Tab. 2).

3. Ergebnisse

Tabelle 2: Blutparameter- und Serumparameter von ApoE^{-/-} und WT Ratten.

	Einheit	ApoE ^{-/-}	WT	p-Wert
Leukozyten	10 ³ /μl	9.6 ± 1.9	13.8 ± 12.2	n.s.
Erythrozyten	10 ⁶ /μl	7.9 ± 0.4	7.0 ± 1.5	n.s.
Thrombozyten	10 ³ /μl	731.9 ± 340.4	648.7 ± 348.9	n.s.
Hämoglobin	g/dL	13.8 ± 0.8	13.9 ± 2.0	n.s.
Hematokrit	%	40.5 ± 2.2	39.0 ± 6.9	n.s.
MCV	fL	51.0 ± 2.6	51.5 ± 7.2	n.s.
MCH	pg	17.2 ± 0.8	20.9 ± 7.4	n.s.
MCHC	g/dL	33.8 ± 0.8	36.7 ± 6.3	n.s.
Cholesterin	mmol/l	8.6 ± 1.7	2.0 ± 0.6	p<0.001
Glukose	mmol/l	9.9 ± 2.5	11.9 ± 3.5	n.s.
Triglyzeride	mmol/l	1.4 ± 0.7	1.6 ± 0.8	n.s.
IL-6	pg/ml	199.0 ± 2.0	187.2 ± 2.8	n.s.
Initiales Gewicht	g	443.1 ± 40.3	522.3 ± 46.0	p<0.001

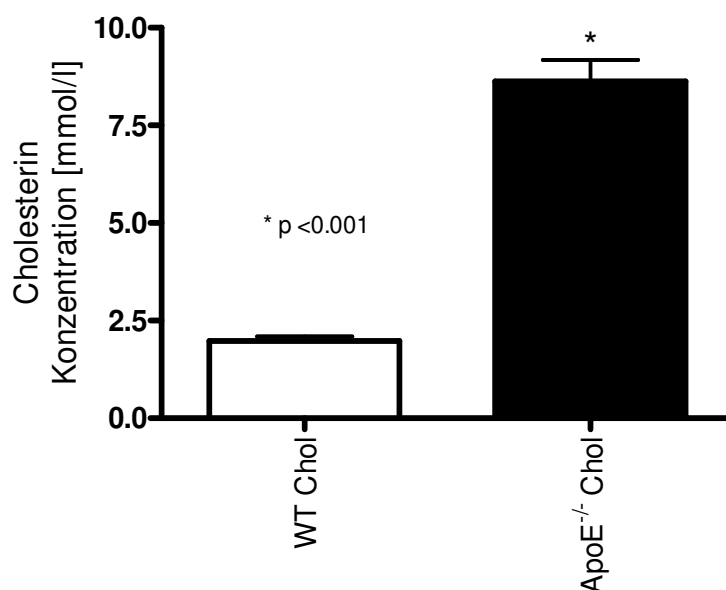


Abb. 46: Cholesterin Konzentration im Blutserum von WT und ApoE^{-/-} Ratten.

3. Ergebnisse

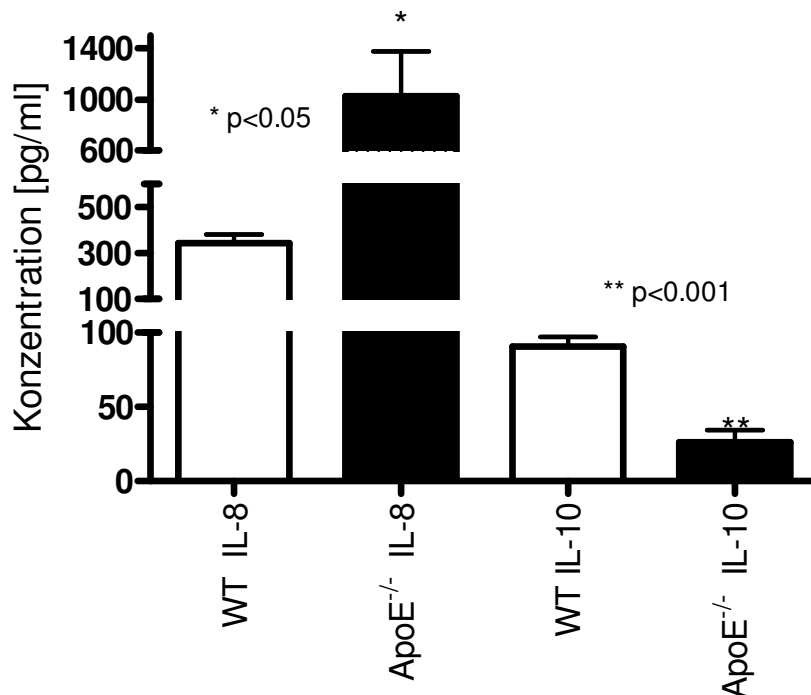


Abb. 47: Interleukin-8 und Interleukin-10 Konzentrationen im Blutserum von WT und ApoE^{-/-} Ratten.

3.4 In vivo Evaluation des Polyurethan Stents

3.4.1 Sprague Dawley Ratten und Polyurethan Stent

Zur Implantation der PU Stents war ein modifiziertes Abwurfssystem vonnöten. Ein Funnel Introducer, der den ungekrimpten PU Stent bedeckte, wurde durch die Gefäßinzision in die abdominale Aorta eingeführt und in Richtung des Aortenbogens vorgeschoben. Zum Abwurf des PU Stents wurde der Funnel Introducer zurückgezogen. Die Dilatation erfolgte anschließend mit einem Angioplastieballon (OTW 2,5*8mm, 12 atm, Abbott Vascular, Ragendingen, Deutschland). Danach wurde der Ballon entfernt und das Gefäß wie oben beschrieben verschlossen. 5 Ratten erhielten einen PU Stent in die abdominale Aorta. Die Tiere erholten sich nach der PU Stent Implantation zeitnah und konnten sich ohne Einschränkungen bewegen. Innerhalb der nächsten Stunden verringerte sich die Bewegungsfähigkeit und es kam ausnahmslos zu einer unzureichenden Blutversorgung im Rumpf der Tiere, die nach maximal 48 Stunden zum Tod der Tiere führte. In den histologischen

3. Ergebnisse

Untersuchungen war eine deutliche Verengung des Lumens aufgrund einer Thrombusbildung innerhalb des Stents zu erkennen (Abb. 48, 49, 50).

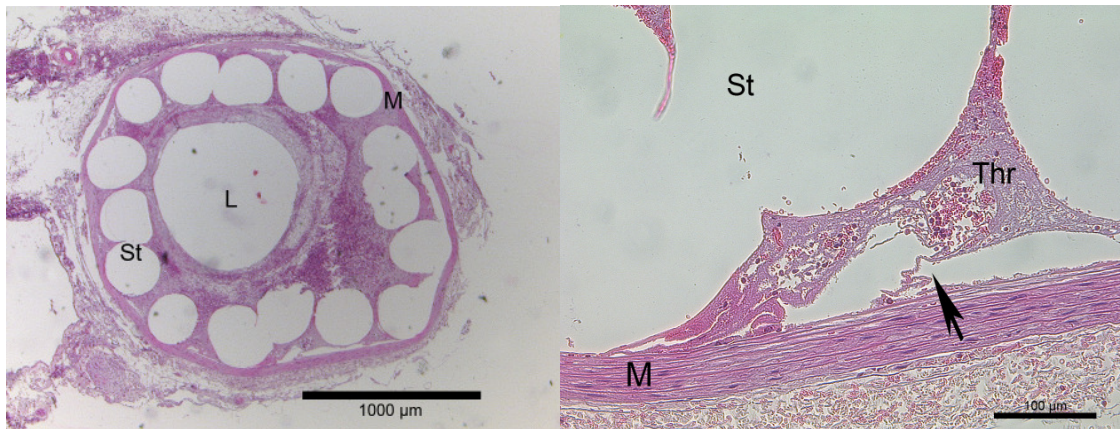


Abb. 48: Hämalalaun & Eosin (HE) Färbung, **links:** distales Ende des geflochtenen PU-Stents (16xMonofilamente mit 200µm Filament-Durchmesser) 24 h post Implantation. Die Abbildung zeigt die Kreuzungspunkte der Monofilamente. **rechts:** mittlerer Teil des PU Stents mit Kreuzungspunkten der Monofilamente (L = Lumen, Thr = Thrombus, M = Tunica media, St = PU Stentstrebenartefakt)

Aufgrund der Tatsache, dass der PU Stent nicht in der Lage war seine Funktion als Gefäßstütze auszuüben und eine vaskuläre Integrität zu gewährleisten, konnten die oben genannten Punkte ISR, Neointimafläche, Verletzungsgrad, Media Fläche, Neointima Dicke sowie das Neointima/Media Verhältnis zu den vorgesehenen Zeitpunkten (7, bzw. 28 Tage post OP) nicht ermittelt werden.

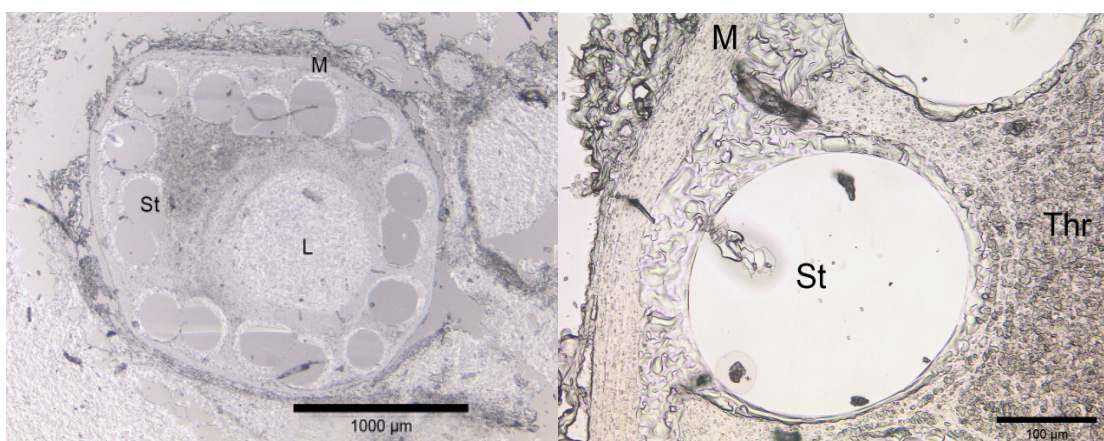


Abb. 49: Repräsentative, ungefärbte Abbildungen des PU Stents innerhalb der abdominalen Aorta. (M = Tunica media, L = Lumen, Thr = Thrombus, St = PU Stentstrebenartefakt)

3. Ergebnisse

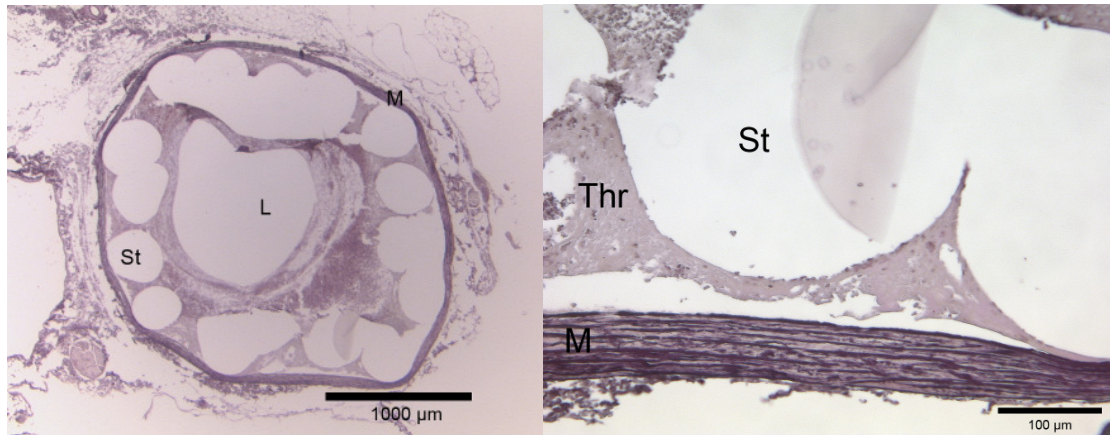


Abb. 50: Repräsentative Elastica van Gieson-Färbung des PU Stents innerhalb der abdominalen Aorta. Die elastischen Fasern sind deutlich zu erkennen und intakt (St = PU Stentstrebenartefakt, M = Tunica media, L = Lumen, Thr = Thrombus)

Da die untersuchten PU Stents ihre Funktion als vaskuläres Implantat nicht ausüben konnten, wurde der Ansatz modifiziert. Dabei wurde zunächst wie oben beschrieben ein PU Stent in die abdominale Aorta von WT Ratten implantiert. Im direkten Anschluß an die PU Stentimplantation wurde zusätzlich ein BMS (2 x 8mm, Multilink Minivision, Abbott Vascular, Ragendingen, Deutschland) zur Vermeidung des Recoils des PU Stents/Gefäßes erfolgreich implantiert (Abb. 51). Diese Prozedur gelang wiederholt (n=4); ein Überleben der Tiere bis zum vordefinierten Zeitpunkt der Tötung (Tag 7) war hiermit, im Unterschied zur alleinigen PU Stent Implantation, gewährleistet. Dieses etablierte Tiermodell, das eine Kombination eines Klein-¹¹⁵ und eines Großtiermodells darstellt²⁶⁴ ermöglicht die schnelle präklinische Evaluation neuer Stentkandidatmaterialien in Blutkontakt und ist vor allem für Polymerdegradationsstudien interessant (Borinski M. et al., Introduction of a high-throughput double-stent animal model for the evaluation of biodegradable vascular stents *Journal of Biomaterials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012).

3. Ergebnisse

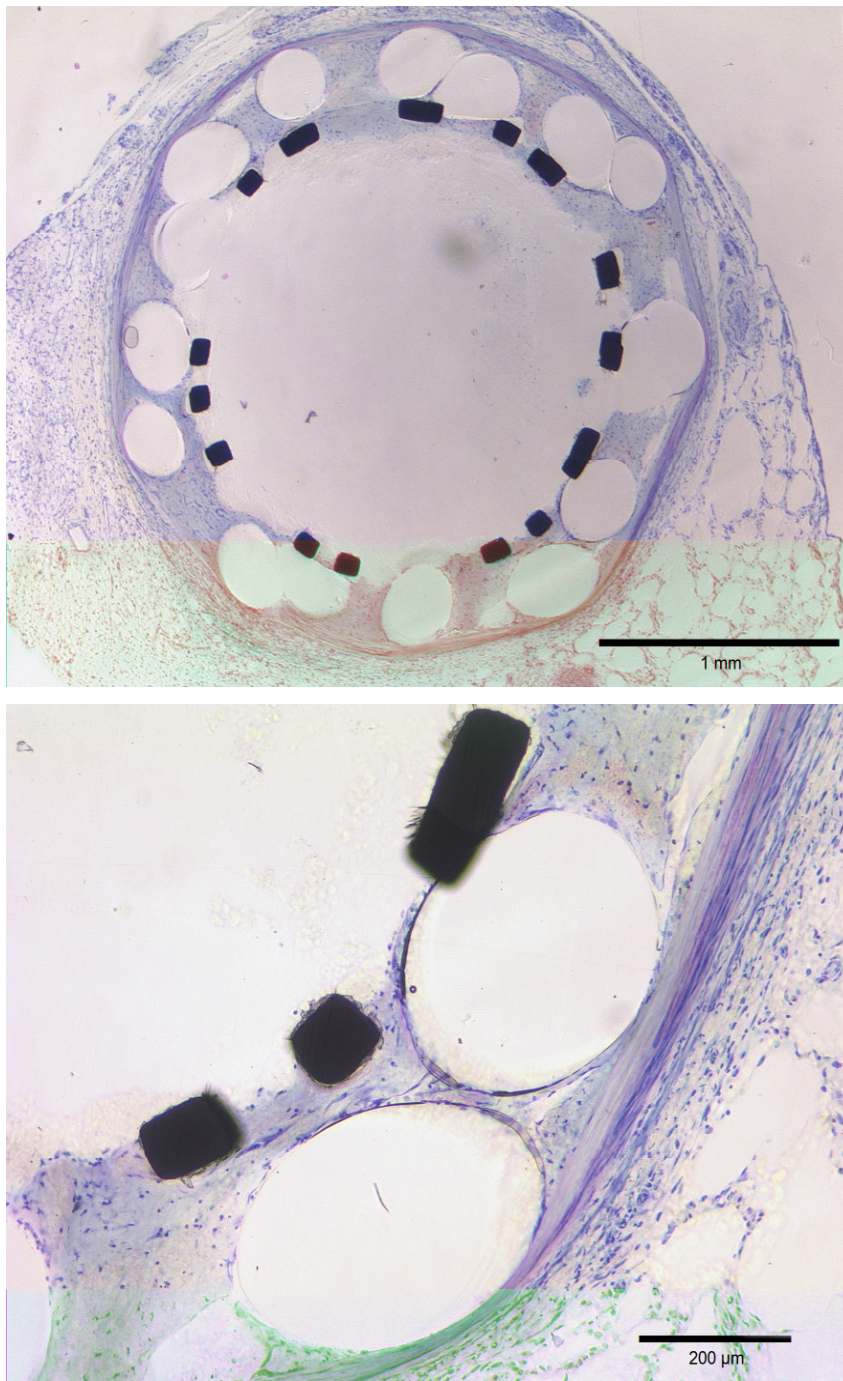


Abb. 51: oben: Abbildung des Doppel-Stent ISR Modells nach Implantation in die abdominale Aorta (nach 7 Tagen), in dem der geflochtene PU Stent (hergestellt aus 16x Monofilamenten mit einem Durchmesser von 200µm) durch einen darunterliegenden BMS (2.0 x 8mm) gestützt wird. **unten:** BMS Streben stützen den PU Stent und können somit die vaskuläre Integrität gewährleisten. Das Kandidatmaterial steht in direktem Gewebe- und Blutkontakt.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung der Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Erkenntnisse über die ApoE-Defizienz bei Ratten zu erlangen. Die genetische Manipulation von Ratten ist erst seit kurzer Zeit möglich und bisher gibt es keine Informationen, in wie weit dieses neue Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung genutzt werden kann. Die bisher existierenden Ratten-Modelle der ISR besitzen nur geringe ISR Raten. Zudem werden die Stents in gesunde und nicht erkrankte Gefäße implantiert. Eine Erhöhung der ISR und weiterer histomorphometrischer und histopathologischer Parameter nach Stentimplantation bei ApoE^{-/-} Ratten würde die Validität dieses Kleintiermodells erhöhen, so dass die Effektivität und Sicherheit neuer kardiovaskulärer therapeutischer Ansätze schnell und einfach evaluiert werden könnte.

Zusätzlich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Biokompatibilität und die *in vivo* Verträglichkeit eines mittels Flechttechniken angefertigten Polymerstent auf Polyurethanbasis evaluiert. Da Polymere unterschiedliche Vorteile gegenüber Metallen besitzen, haben mehrere Wissenschaftler die Verwendung von Polymeren anstatt von Metallen als Werkstoffe für vaskuläre Implantate vorgeschlagen^{52, 117, 160, 220, 246, 248}. Im Rahmen dieser Studie wurde das thermoplastische Formgedächtnispolymer Carbothane® (Firma Lubrizol, Belgien) zu Monofilamenten verarbeitet und anschließend in eine 3-dimensionale Struktur überführt, die als vaskulärer Stent dienen sollte. Nach der *in vitro* Evaluation der Biokompatibilität des Polymers auf die Migration und Proliferation unterschiedlicher vaskulärer Zellen und ersten mechanischen Tests, erfolgte die PU Stent Evaluation *in vivo*.

4.2 *In vitro*

Nach Herstellung der PU Stents wurde der Einfluß des Materials auf einige an der Entstehung der Restenose beteiligten Zelltypen (HUVEC, EPC und HuSMC) untersucht. Dabei zeigte das verwendete PU weder bei Endothelzellen, noch bei Gefäßmuskelzellen, einen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation im Vergleich zu anderen, bereits im klinischen Einsatz

4. Diskussion

befindlichen Materialien (DES oder Vicryl). Zwar bedingt jedes getestete Material eine Verschlechterung der Zellproliferation, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, doch konnte kein signifikanter Proliferationsunterschied von HUVEC, EPC und HuSMC zwischen den eingesetzten Implantat-Materialien festgestellt werden.

4.2.1 Biokompatibilität

Die Biokompatibilität eines Materials ist Voraussetzung für den späteren Einsatz *in vivo*. Dabei gilt, dass die Bezeichnung „Biokompatibilität“ nicht nur bedeutet, dass das Material keine Zytotoxizität aufweist, sondern auch eine Funktionalität besitzt, die die Zell-Material Interaktion je nach organspezifischer oder lokaler Anwendung ermöglicht. Biokompatibilität und Biofunktionalität korrespondieren dabei mit den biologischen, biophysikalischen und biochemischen Interaktionen zwischen dem Material und dem Gewebe. Zusätzlich dazu sollten die Materialien keine immunologischen Reaktionen (keine Allergien) oder mutagene oder onkogene Effekte hervorrufen¹⁷⁷.

Im nächsten Schritt der vorliegenden Studie erfolgte die Evaluation des Einflusses des Carbothane®-PU auf die Zellmigration. Die Migration von Zellen stellt einen wesentlichen Prozess in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und der Neointimalen Hyperplasie dar. In den drei Versuchsgruppen (EPC, HUVEC und HuSMC) zeigte sich, dass das verwendete Polyurethan keinen signifikanten Unterschied in der Migrationskapazität der verwendeten Zellen zwischen Kontrollen und PU-Proben gab.

In weiteren Ansätzen wurden stimulierte Zellen untersucht. Die Stimulation von EPC, HUVEC und HuSMC durch Endothelzell-konditioniertes Medium, bzw. durch EPC-konditioniertes Medium führte zu signifikant erhöhten Migrationskapazitäten. Eine zusätzliche Inkubation der stimulierten Ansätze mit PU zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Migrationsfähigkeit. Eine Tendenz zu verringerter Migration konnte bei den Versuchansätzen mit HUVEC festgestellt werden. Theoretisch stellt eine erhöhte Migration von Endothelzellen durch ein Material einen interessanten Ansatz zur Beschleunigung der Reendothelialisierung dar, allerdings unterschied sich der ermittelte Wert statistisch nicht signifikant von den jeweiligen Kontrollen.

4. Diskussion

Bei EPC und HuSMC hingegen zeigte sich eine andere Tendenz: Die Inkubation der Zellen mit den konditionierten Medien und dem PU zeigte eine, wenn auch nicht signifikante, Steigerung der Migrationskapazität. Eine Steigerung der Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, als auch von EPC, kann zu erhöhter Neointima Bildung und erhöhter Restenose, also schlechterem Outcome führen. Da sich die Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden, erscheint das PU als geeignetes Material zur Verwendung als vaskuläres Implantat. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass konditionierte Medien einen signifikanten Einfluss auf das Verhalten anderer Zelltypen ausüben können.

4.2.2 Parakrine & autokrine Mechanismen adulter Stammzellen

Die Hypothese der parakrinen Effekte adulter Stammzellen auf andere Zelltypen (Endothelzellen, SMC) konnte in den in dieser Studie durchgeführten Migrationsassays beobachtet werden. So konnte eine 2-3-fach erhöhte Migration bei den durch EPC-KM stimulierten Zellen (HUVEC, EPC und HuSMC) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden. Des Weiteren zeigte die Stimulation der unterschiedlichen Zelltypen durch EKM einen ebenfalls signifikanten Unterschied. Da das EKM durch die Verletzung des Endothels gewonnen wurde, scheinen verletzte Endothelzellen in der Lage zu sein unterschiedliche Chemokine und Wachstumsfaktoren an die Umgebung zu sezernieren und dadurch das Verhalten anderer Zelltypen über parakrine Mechanismen zu beeinflussen. Das EPC-KM wurde aus dem Zellkulturüberstand der EPC gewonnen und beeinflusste ebenfalls die Migration von Zellen.

Es gibt zunehmend Beweise, die die Hypothese unterstützen, dass parakrine Faktoren, welche von adulten (Stamm-) Zellen freigesetzt werden, eine wesentliche Rolle in reparativen Prozessen, z.B. nach Stammzell-Mobilisation oder -Injektion in verletztes Myokard spielen. Weitere Analysen demonstrierten die Expression und Freisetzung von Wachstumsfaktoren (VEGF-2, VEGF-B, SDF-1 und IGF-1) in EPC und reifen Endothelzellen in den Zellkulturüberstand²³¹. Studien an mesenchymalen Stammzellen, zeigten, dass sie eine große Bandbreite an Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren produzieren und sezernieren, welche eine wichtige, potentielle Rolle bei der

4. Diskussion

Regeneration nach Myokardinfarkt spielen³¹. So sind die Gewebskonzentrationen von Proteinen wie VEGF, bFGF, HGF, und IGF-I in verletzten, mit MSC und multipotenten humanen Knochenmarksstammzellen behandelten myokardialen Arealen signifikant erhöht^{107, 146, 263}. Des Weiteren wird die Theorie der Gewebereparatur durch parakrine Effekte unterstützt, da von adulten genetisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen konditioniertes Medium einen positiven Effekt auf ischämisches Myokard ausübt^{66, 67}. So führte die Injektion von Knochenmark-MSC in aktuell infarzierte Herzen zu erhöhter kapillarer Dichte, verringerter Infarktgröße und verbesserten kardialen Funktionen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen²¹⁹. Die parakrinen Faktoren könnten auf benachbarte Zellen wirken und führten zu myokardialer Protektion und Neovaskularisation. Allerdings sind die exakten Mechanismen dabei noch ungeklärt. Die Hypothese der parakrinen/autokrinen Mechanismen von adulten Stammzellen erweitert somit die traditionelle Ansicht der Stammzellen. Somit könnte die Freisetzung von Faktoren in der Mikroumgebung und die Modulation der Stammzellbiologie die Gewebereparatur beeinflussen. Deswegen erscheint das Anlocken von EPC an ein Implantat als vielversprechend Strategie zur Förderung der Geweberegeneration.

4.2.3 Adhäsion an PU Geflechte

Die qualitative Untersuchung der Vitalität von EPC auf PU Monofilamenten mittels Calcein-Färbung zeigte, dass EPC in der Lage sind an das PU zu adhären. Des Weiteren zeigte diese Untersuchung, dass EPC auf den PU Monofilamenten vital sind. Zusätzlich zu den Calcein-Etidiumbromid-Untersuchungen wurden rasterelektronische Aufnahmen von EPC auf dem PU angefertigt, die eindeutig belegten, dass EPC die Fähigkeit besitzen an das PU zu adhären und sich dort auszubreiten.

Die darauf folgenden Adhäsionsversuche an mit Komponenten der ECM-beschichtete PU Netze wurden für 30 Minuten durchgeführt, allerdings zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten PU Kontrollen keine erhöhte Adhäsion nach Beschichtung der PU Netze mit Fn und Vn. Demnach scheint die Beschichtung des PUs nicht durch einfache Beschichtungsmethoden, wie die Beschichtung von Zellkulturoberflächen mit Fn oder Vn, durchführbar zu sein.

4. Diskussion

Dennoch konnte die effektive Adhäsion vitaler EPC an den PU Stent demonstriert werden und diese lies sich mit der Adhäsion von EPC an ECM Komponenten vergleichen. In einer Studie von Ranjan et al. konnte die Adhäsion von *in vitro* expandierten EPC an ePTFE Oberflächen durch eine Kombination von 3 ECM Komponenten (Fn, Kollagen I und Kollagen IV, was in dieser Publikation als „OptiMat“ bezeichnet wurde) im Vergleich zu einzelnen Komponenten und unbeschichteten ePTFE Oberflächen (vaskuläre Prothesen mit kleinem Diameter) erhöht werden ¹⁷⁴.

Im nächsten Ansatz wurde die Adhäsion von EPC an Komponenten der ECM untersucht. Dabei zeigte sich eine maximale Zelladhäsion an die Komponenten Fn und Vn als an Plastik nach 30-60 min. Die EPC Adhäsion an Kollagen blieb über den beobachteten Zeitraum (1 h) gering. Fn kann unter anderem über das Integrin $\alpha_5\beta_1$ und Vn Integrin $\alpha_v\beta_3$ gebunden werden ⁹¹. EPC exprimieren die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$, welche maßgeblich an der Adhäsion von EPC an Komponenten der ECM beteiligt sind ^{164, 251}. Das zyklische Arg-Gly-Asp Peptid (cRGD-Peptid) ahmt die Bindungsdomäne der Integrine nach und ermöglicht so eine vermehrte Rekrutierung der EPC an die Stentstreben ²⁶.

4.2.4 Mechanische Tests

Stents wurden entwickelt um den akuten Gefäßverschluss nach PTCA zu vermeiden. Demnach muss die radiale Festigkeit dieser Implantate dem elastischen Recoil von Arterien nach erfolgter Dilatation und Gefäßspasmen standhalten können. Bei Untersuchungen mit Epinephrin stimulierten Kaninchenarterien wurde ein transmuraler Druck von 200-275 mmHg erreicht. Der durchschnittliche Blutdruck beim Menschen liegt etwa bei 100 mmHg. Demnach muss ein Stent mindestens dem Differenzdruck von 175 mmHg (0,23 bar) standhalten können ³. Der Palmas Schatz Stent (PS153 Serie, ein Metallstent) kollabiert bei einem Druck von 0,66 bar; der NIR Stent, auch ein Metallstent, hält einem Druck von bis zu 1,06 bar stand ¹⁹³. Agrawal et al. ³ zeigten, dass ein Polylaktid Stent bis zum Kollaps einem Druck von mehr als 300 mmHg (0,4 bar) standhalten kann. Bei einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass ein PDLLA-Stent bei einem Druck von 0,4 bar noch keine

4. Diskussion

signifikante Verringerung des Durchmessers aufwies ²⁵ und somit eine ausreichende Stabilität besaß, um auch maximalen Druckverhältnissen in menschlichen Koronargefäßen standzuhalten ²¹¹. Bei dem hier untersuchten PU Stent zeigten die mechanischen Tests einen deutlichen Recoil des PU Stent nach Ballondilatation auch ohne ein von außen Druck-ausübendes Gefäß. Das Dilatationsverhalten und der spontane PU Stent Recoil waren zwar angemessen, doch gleichzeitig demonstrierten die mechanischen Tests eine verringerte Radialfestigkeit im Vergleich zu BMS, bzw. DES. Die Kompressionstests zeigten eine erhöhte Durchmesserverringering als DES. Die radialen Kräfte, die in normalen Blutgefäßen wirken würden bei dem untersuchten PU Stent zu einer Durchmesserverringering von 0.2 bis 0.3mm führen ³.

4.2.4.1 Limitationen geflochtener Strukturen

Mehrere Studien schlagen das Flechten als Herstellungstechnik für vaskuläre Implantate vor ^{4, 82, 105}. Zudem befassten sich mehrere Studien mit der Analyse geflochtener Strukturen, die aus degradierbaren ⁸² oder nicht degradierbaren ¹⁰⁵ Polymeren hergestellt wurden. Allerdings zeigten sich unterschiedliche Limitationen. Ein Hauptnachteil einer geflochtenen Struktur für die vaskuläre Applikation ist die Tatsache, das die Monofilamente sich kreuzen und somit die Wanddicke (bei einem Stent die Strebendicke, der Strebendurchmesser) doppelt so hoch ist wie der eigentliche Durchmesser der Filamente, wodurch sich das Lumen verringert. Ein weiterer Nachteil von geflochtenen Polymerstrukturen ist die geringe Radialfestigkeit, die durch die geringe Kontaktfläche zwischen den Filamenten und der Verlängerung, bzw. Verkürzung bei Kompression oder Expansion entsteht. Eine Möglichkeit diese Limitationen zu umgehen ist die Verwendung von abgeflachten Monofilamenten ¹³⁵, wodurch sich die Kontaktfläche zwischen den Monofilamenten erhöht, die Gesamtrradialfestigkeit zunimmt und das Lumen vergrößert wird.

Die Wärmebehandlung der PU Stent führte zu einer erhöhten Radialfestigkeit, allerdings ging diese auf Kosten der Flexibilität. Zusätzlich ging der Formgedächtniseffekt des Polymers verloren.

4. Diskussion

Die PU Stents ließen sich mit einem handelsüblichen Ballon aufdehnen, wobei der Enddurchmesser durch den applizierten Druck bestimmt werden konnte. Aufgrund der bei dem hier verwendeten PU Stent miteinander verschmolzenen Kreuzungspunkte, welche durch die Wärmebehandlung zwar dazu führen, dass die Radialfestigkeit des Stents zunahm, kommt es bei der Ballondilatation zusätzlich zur gewünschten Durchmesserergrößerung zu einer Verkürzung der Längsachse des Stents. Diese longitudinale Verkürzung kann durch die miteinander verschmolzenen Monofilamente erklärt werden. Dieses Verhalten würde während der Expansion innerhalb einer Läsion Scherkräfte auf die Gefäßwand ausüben und zu vermehrtem vaskulärem Trauma führen, was wiederum negative Auswirkungen auf die Heilung und die Restenose hätte.

Der PU Stent konnte unter Verwendung des adaptierten Abwurfsystems erfolgreich in der abdominalen Aorta von Ratten implantiert werden. Da die Tiere nach erfolgreicher Operation jedoch ausnahmslos innerhalb von 2 Tagen verstarben, erscheint der PU Stent, aufgrund von mangelnder Flexibilität und mangelnder „Trackability“ in dieser Form nicht für eine vaskuläre Applikation geeignet zu sein. Hauptunterschied bei den verwendeten Stents war die Tatsache, dass der zu evaluierende PU Stent, aufgrund seiner Herstellungsschritte (Flechten & Wärmefixierung) über keinen „Delivery state“ verfügte, da er sich aufgrund der vorher durchgeführten Wärmebehandlung nicht falten („crimpen“) liess. Eine der essentiellen Charakteristiken eines Stents ist seine Fähigkeit auf einen Ballonkatheter gefaltet zu werden und dadurch einen verringerten Durchmesser (von ca. 1-2 mm ¹⁵⁶) aufzuweisen, mit dem es möglich ist, bis zur Stenose zu gelangen. Vorort wird der Ballon dilatiert und der Stent durch den applizierten Druck auf den gewünschten Durchmesser gebracht.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit untersuchten PU Stent konnte ein geflochtener Stent aus der Formgedächtnis-Legierung Nitinol gekrimpt in die Arteria carotis von Mäusen implantiert werden. Dieser faltete sich nach Entfernen der Schutzhülle selbst auf ²⁰⁸. Im Gegensatz zu dem PU Stent, wies der durch Flechten hergestellte Nitinolstent einen Formgedächtniseffekt auf und besaß keine miteinander verschmolzenen Monofilamente ²⁰⁸ sodaß ein „Delivery state“ vorhanden war.

4. Diskussion

4.2.4.2 Oberflächencharakteristika

Ein Stentmaterial kann aufgrund seiner Oberflächencharakteristika (Oberflächenenergie, Oberflächenbeschaffenheit, Oberflächenpotential und der Stabilität der Oberflächenoxidschicht) die Thrombogenität und die Bildung der Neointimalen Hyperplasie beeinflussen^{129, 159}. Die Kombination dieser Charakteristika kann in den meisten Fällen das Outcome des Stents vorhersagen.

4.2.4.2.1 Oberflächenenergie

Die Oberflächenenergie und die Oberflächenchemie eines Materials bestimmen dessen Benetzung sowie dessen Thrombogenität^{51, 129}. In aller Regel sind Metalle elektropositiv, während Blutelemente hingegen eher elektronegativer geladen sind²²⁵, was zu einer erhöhten Thrombogenität führen kann⁴³. So hat, z.B. Polyethylenterephthalat (PET, auch bekannt als Dacron® (Du Pont, USA)) im Gegensatz zu Polytetrafluorethylen (PTFE) eine hohe Oberflächenenergie und zeigt eine signifikant erhöhte Thrombogenität⁷⁵.

Diese Erkenntnisse führten dazu, dass Metalle, die in der Regel eine hohe Oberflächenenergie aufweisen, mit einem Polymer beschichtet werden, das eine geringe Oberflächenenergie besitzt. So verringert eine Beschichtung aus Polyurethan auf Tantalum oder rostfreiem Stahl die Oberflächenenergie und damit die Thrombogenität^{41, 56}. In einer Studie von Hietala et al. 2004⁸² konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Beschichtung geflochtener PLA Stents mit Heparin zu einer verminderten Plättchenaktivierung im Vergleich zu unbeschichteten PLA Stents führte. Allerdings beeinflussen diese Thromboresistenten, hydrophoben Polymeroberflächen nicht nur die Adhäsion von Blutplättchen sondern auch die von Endothelzellen²³⁹. Die Beschichtung mit Komponenten der ECM, z.B. Fn, kann die Adhäsion an Polymeroberflächen verbessern^{29, 239}. In der vorliegenden Studie konnte die Adhäsion von EPC an die hergestellten PU Netze durch eine Vorbehandlung mit den ECM Komponenten Fn und Vn nicht erhöht werden. Des Weiteren zeigte sich in den *in vivo* Experimenten, dass das verwendete PU (Carbothane®) thrombogen war.

4. Diskussion

4.2.4.2.2 Oberflächenbeschaffenheit

Die Thrombogenität eines Materials ist ebenfalls von seiner Oberflächenbeschaffenheit abhängig ¹²⁹. So ist die Thrombogenität bei rauen Oberflächen erhöht ^{43, 69, 79} und macht ein abschließendes Schleifen von Stents notwendig. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass geschliffene Koronarstents eine verringerte Thrombogenität und Neointimale Hyperplasie aufweisen ¹²⁹. Zusätzlich kann die Beschichtungstechnik einen Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit ausüben; so wird die Thrombogenität durch Galvanisierung von Oberflächen im Vergleich zu Ionenimplantations-behandelten Stents erhöht ⁸⁰. Gefurchte Oberflächen mit einer Größe von 22 µm können aber die Migrationskapazität von Endothelzellen auch erhöhen und zu einer beschleunigten Reendothelialisierung führen ¹⁶¹. Des Weiteren kann eine Veränderung von Polyurethan-Oberflächen durch Gold Nanopartikel (Größe 5 nm; in einer Gold-Konzentration von 43,5 ppm) zur erhöhten Migration von Endothelzellen führen. Dabei scheint die Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinasen (FAK), die zytoskeletonischen Veränderungen und die Heraufregulation der eNOS Expression über den Pi3K/Akt Signaltransduktionsweg reguliert zu werden und makroskopisch zu vermehrter Zellmigration zu führen ⁹². In einer weiteren Studie von Taneja et al. konnte demonstriert werden, dass eine Oberfläche mit 13 µm Furchentiefe zu einer signifikant erhöhten Anzahl an elongierten SMC im Vergleich zu elektropolierten Oberflächen auf 316L rostfreiem Stahl führt. Dabei gilt, dass elongierte, kontraktile SMC – im Gegensatz zu „synthetischen“ SMCs - reduzierte Migrations- und Proliferationsraten aufweisen, und erhöhte Level an kontraktilen Proteinen wie α-Aktin, Calponin und Myosin heavy Chain exprimieren ^{27, 204, 222, 228}. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine glatte Oberfläche der PU Monofilamente auf der EPC adhärieren können, doch die Histologien zeigen eindeutig, dass es sich bei dem eingesetzten PU um thrombogenes Material handelt, das für den Einsatz als vaskuläres Implantat, solange es unbehandelt ist, ungeeignet ist.

4.3 In vivo Untersuchungen von Stents

4.3.1 Stentimplantation der abdominalen Aorta über eine Mikroinzision in der Aorta

Tierstudien der ISR sind zur Extrapolation der humanen Pathophysiologie nötig, bevor neue Stentmaterialien, Designs oder DES Konzepte in klinischen Studien verwendet werden können. Da die mannigfaltigen ISR Mechanismen nicht *in vitro* nachgebildet werden können, stellen Tiermodelle der ISR die einzige Möglichkeit dar diese zu erforschen. Dabei sollte ein Tiermodell die pathophysiologischen Prozesse der Neoatherosklerose Entwicklung nachahmen und interventionelle Prozeduren sowie bildgebende Verfahren ermöglichen, die Standardprozeduren des klinischen Einsatzes darstellen ²². Bisherige Hauptlimitation von Ratten als Tiermodelle der Kardiologie und Atheroskleroseforschung war die Tatsache, dass Ratten keine *de novo* atherosklerotischen Läsionen bilden, allerdings für die Erforschung der ISR hilfreich sind ^{113-115, 266}.

Das in dieser Dissertation verwendete Tiermodell stellt ein einfaches und verlässliches Tiermodell zur Evaluation neuer Stents dar ^{44, 114, 115}. Die in dieser Studie ermittelten Werte für ISR, Neointima Fläche, Neointima Dicke, Mediafläche und Verletzungsgrad entsprachen denen der Vorbildveröffentlichung von Langeveld et al. ^{114, 115}. Zwar unterscheiden sich die ISR Raten in den beiden Versuchsgruppen (7 bzw. 28 Tage) signifikant, sind aber dennoch gering. Da erhöhte Cholesterinwerte zu einem Risikofaktor der Atherosklerose zählen, wurde eine weitere Versuchsgruppe mit einer fettreichen Ernährung gefüttert. Die in dieser Studie ermittelten Werte dieser Versuchsgruppe zeigten keine Erhöhung der ISR, Neointima Fläche oder Neointima Dicke. Demnach spielt die Ernährung einen untergeordneten Einfluss auf die Entstehung der ISR in Sprague-Dawley Ratten.

Die Resultate in der Gruppe der ApoE^{-/-} Ratten deuten an, dass ApoE^{-/-} Ratten als wertvolles Werkzeug zur Evaluation neuer kardiovaskulärer Strategien dienen können. Zudem bestätigen sie die Rolle von ApoE auf das Verhalten von SMCs ^{89, 90, 216, 217}. ApoE verhindert die Akkumulation Cholesterin-reicher Partikel und ist in die Beseitigung von Chylomikronen und VLDL-Resten aus der Zirkulation involviert. Das Fehlen von ApoE erhöht die

4. Diskussion

LDL Retention durch Proteoglykane innerhalb der Gefäßwand, was ein Schlüsselement in der Entwicklung der frühen Atherosklerose darstellt ²⁵⁹. Zusätzlich dazu führt die Beladung mit Lipiden zu einer Unterbrechung des Src-FAK-tensin Signaltransduktionsweges in SMCs, was wiederum zu einer signifikanten Reduktion der Fähigkeit die ECM Komponenten Kollagen und Fn korrekt zusammenzubauen führt ^{11, 57}. Diese anormale Polymerization der ECM Komponenten könnte für die Entstehung vulnerabler atherosklerotischer Plaques verantwortlich sein, und könnte ebenfalls für die in den ApoE^{-/-} Tieren beobachteten abdominalen aortalen Aneurysmen und die internen Blutungen verantwortlich gewesen sein.

Die Rolle von Chemokinen bei der Aufrechterhaltung einer vasculären Inflammation kann als gesichert angesehen werden ^{253-255, 271}. Die erhöhte IL-8 Konzentration des proinflammatorischen Chemokins IL-8 und die gleichzeitige Herunterregulation des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Blutplasma von ApoE^{-/-} Ratten könnten für die beobachtete verstärkte Antwort nach vaskulärer Stentimplantation mitverantwortlich sein.

Außerdem konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass ApoE^{-/-} Ratten eine höhere Prädisposition zur Entwicklung von Stentthrombosen besitzen, was letztendlich zu erhöhter Mortalität führte. Zusätzlich zu der Hypercholesterolemie bedingten Fehlzusammensetzung der ECM Komponenten scheint der Verlust der charakteristisch konzentrisch angeordneten Media im Großteil des Gefäßes bei ApoE^{-/-} Ratten die Aneurysmaformation und internen Blutungen zu begünstigen.

Zur Reduktion der Mortalität nach Stentimplantation könnte ein anderes Tiermodell herangezogen werden. Ein vor kurzem etabliertes Tiermodell nutzt den Zugang zur abdominalen Aorta über einen trans-carotidealen Zugang. Dazu wird die Carotisbifurkation freipräpariert und ein Führungsdraht durch den Aortenbogen bis zur abdominalen Aorta vorgeschoben. Anschließend erfolgt die Implantation von DES oder BMS. In diesem Modell zeigte sich jedoch, dass im Gegensatz zu dem in dieser Studie verwendeten Tiermodell, beim Vergleich zwischen Paclitaxel-freisetzenden Stents (PES) und BMS kein signifikanter Unterschied der Neointimalen Hyperplasie nach 4 Wochen zu beobachten war. Dennoch wurde ein signifikanter Unterschied bei der Reendothelialisierung zwischen PES und BMS beobachtet ¹¹³. Ein weiteres Tiermodell stellt die

4. Diskussion

Stentimplantation in die Arteria carotis dar. In diesem Modell lässt sich ein 2,25 x 8 mm großer Stent implantieren⁹⁶. Zusätzlich kann ein trans-iliacaler Ansatz verfolgt werden¹⁵⁸, der eine verringerte Mortalität zeigte. Als zusätzliche Option bietet sich die Verwendung von heterozygoten ApoE (ApoE^{-/+}) Ratten an, die die Intervention wohlmöglich besser tolerieren könnten. Bisher ist nichts über diese Tiere bekannt.

Da Gefäße mit metallischem Implantat nur wenige histologische Untersuchungen erlauben, sollten weitere Analysen der Gefäßwandreaktionen nach arterieller Verletzung in ApoE^{-/-} Ratten nach POBA anstatt arterieller Stentimplantation erfolgen. Dieses Tiermodell stellt eines der ältesten Tiermodelle der arteriellen Gefäßverletzung dar. Dabei wird die endotheliale Denudation mittels Embolektomieballonkatheter in den Halsschlagadern von Ratten erzielt. In diesem Modell konnte demonstriert werden, dass das Endothel sich von den Enden des denudierten Segments aus regeneriert. Zudem konnte gezeigt werden, dass das mittlere Drittel der denudierten arteriellen Fläche 12 Wochen nach Intervention kein vollständiges Endothel aufweist³⁵. In einer weiteren Studie wurde demonstriert, dass die mediale SMC Proliferation ihr Maximum nach 48 Stunden und die intimale SMC Proliferation (46%) ihr Maximum nach 96 Stunden (73%) erreichte³⁴. Dieses Tiermodell ermöglicht die Einbettung der Proben in Paraffin und eröffnet damit zahlreiche spezifische Analysemethoden, die bei Metallstents nicht durchführbar sind. Somit liessen sich z. B. die mediale, (neo)intimale SMC Proliferationskinetik oder die Reendothelialisationskinetik analysieren. Zudem ermöglicht dieses Modell die Untersuchung der Interaktionen zwischen den zellulären und azellulären Elementen der Gefäßwand und des Blutes¹⁸², der Inflammation, der Plättchenaktivierung¹⁵² und der Endothelialen Dysfunktion¹⁰⁹.

4.3.2 Schlußfolgerungen

Im Rahmen der Dissertation konnte gezeigt werden, dass ApoE^{-/-} Ratten erhöhte Plasma Cholesterinwerte aufweisen, die nach arterieller Verletzung zu der Entwicklung erhöhter ISR Raten, erhöhter Neointima Fläche, Neointima

Dicke und Inflammation führen. Aufgrund der beobachteten histomorphometrischen und histopathologischen Abänderungen erhöht dieses Tiermodell die Validität von Ratten als Tiermodell zur Erforschung der Mechanismen der ISR. Allerdings ist die beobachtete Anfälligkeit der ApoE^{-/-} Ratten für die Entwicklung von Stentthrombosen, internen Blutungen und Aneurysmen nach Stentimplantation unerwünscht hoch. Alternative interventionelle Ansätze bzw. ein heterozygoter ApolipoproteinE defizienter Rattenstamm bieten sich als potentielle Lösung an.

Dennoch erscheinen ApoE^{-/-} Ratten als interessanter Tierstamm zur Evaluation von Langzeiteffekten von Hypercholesterolämie, sowohl auf die Entwicklung der ISR als auch der (Neo-)Atherosklerose. Zur genauen Charakterisierung der Entwicklung von vaskulären Läsionen in Apo^{-/-} Ratten sind weitere Studien notwendig. Zudem bleibt bisher offen, ob ApoE^{-/-} Ratten, analog zu den bereits genauer charakterisierten ApoE^{-/-} Mäusen in der Lage sind atherosklerotische Läsionen aller Phasen im gesamten Bereich des arteriellen Systems zu bilden und ob die atherosklerotischen Läsionen eine der humane Pathophysiologie vergleichbare Plaquekomposition aufweisen.

4.4 Limitationen

Die Stentimplantation in die abdominale Aorta von Ratten spiegelt die menschliche Situation nur bedingt wider. Menschliche Koronararterien weisen einen muskulären Phänotypen auf, wohingegen die Aorta als elastisches Gefäß angesehen wird. Zusätzlich ist die Entwicklung einer ISR beim Menschen durch erkranktes vaskuläres Gewebe gekennzeichnet, wohingegen die Arterien bei Ratten gesunde Gefäße darstellen. Aufgrund dieser Tatsache kann die ISR Entwicklung bei Ratten die beim Menschen nicht vollständig widerspiegeln. Vielversprechend erscheint allerdings der im Rahmen dieser Arbeit erstmals evaluierte Einfluss der ApolipoproteinE-Defizienz bei Ratten, die aufgrund der erhöhten Plasma Cholesterin- und Chemokine-Werte Alterationen in der Gefäßwand bilden. Dennoch ist die Transformation der hier ermittelten Ergebnisse auf klinisch relevante Bedingungen nur eingeschränkt möglich.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse über Reaktionen nach intra-vaskulärer Stent Implantation in neuentwickelten ApolipoproteinE-defizienten Ratten zu erlangen. Obwohl zahlreiche Tiermodelle zur Evaluation neuer Stentstrategien existieren, weist jedes Modell seine spezifischen Limitationen auf. Genetisch manipulierte ApolipoproteinE-defiziente Ratten könnten als verlässliches Modell zur einfachen Evaluation neuer DES Strategien dienen, da sie:

(1) erhöhte histomorphometrische und histopathologische Parameter nach Gefäßverletzung aufweisen und somit die Effizienz neuer Strategien eindeutig demonstrieren bzw. widerlegen können

(2) und über eine ausreichende Gefäßgröße verfügen, sodass Stents evaluiert werden können, die von den Dimensionen her denen im klinischen Alltag ähneln.

Aufgrund der hohen Restenoserate nach Stent Implantation und der Langlebigkeit von Metallimplantaten wurden synthetische Polymere als alternative Materialien zur Herstellung von Stents und Systemen als alternative Biomaterialien vorgeschlagen. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* Biokompatibilitätstests (Evaluation der Zellproliferation, Zellmigration, Zelladhäsion an Polyurethan (PU, Carbothane®, Lubrizol, Belgium)) und *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das verwendete Material zwar eine zufriedenstellende Biokompatibilität aufwies, allerdings aufgrund der Verarbeitungstechnik, dem Flechten aus einzelnen PU Monofilamenten, keine ausreichende Stabilität und Flexibilität für eine vaskuläre Applikation als Stent bot. Zusätzlich dazu zeigte das PU eine erhöhte Thrombogenität. Andere Verarbeitungsmethoden und weitere Beschichtungsverfahren könnten dazu beitragen diese Limitationen zu überwinden.

5. Summary

Aim of this study was to evaluate the vascular responses of novel developed ApolipoproteinE-deficient rats. Although lots of animal models of ISR exist, each model displays individual drawbacks. Genetic modified ApolipoproteinE-deficient rats may serve as a powerful tool for evaluation of novel DES strategies due to:

- (1) increased histomorphometric and histopathologic responses after vascular injury which clearly allow prove or disprove of novel DES strategies
- (2) sufficient vessel size to evaluate human sized vascular stents/devices

Due to high ISR rates after stent implantation and the durable nature of current metallic stents, polymers were suggested as alternative biomaterials. In this work *in vitro* biocompatibility assays (evaluation of cell migration, proliferation and cell adhesion) of polyurethane (Carbothane®, Lubrizol, Belgium) were performed. Results displayed sufficient biocompatibility of the polymer, but *in vivo* results clearly demonstrated that braiding of polyurethane out of single monofilaments does not result in sufficient stability and flexibility of the obtained vascular device. Other processing methods may overcome these limitations and may take advantage of the good polymer biocompatibility.

6. Literaturverzeichnis

Reference List

1. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, Mattos LA, Sousa AG, Moses J, Kipshidize N and others. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1118-1121.
2. Acharya G, Park K. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:387-401.
3. Agrawal CM, Haas KF, Leopold DA, Clark HG. Evaluation of poly(L-lactic acid) as a material for intravascular polymeric stents. *Biomaterials* 1992;13:176-182.
4. Ahlhelm F, Kaufmann R, Ahlhelm D, Ong MF, Roth C, Reith W. Carotid artery stenting using a novel self-expanding braided nickel-titanium stent: feasibility and safety porcine trial. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2009;32:1019-1027.
5. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005;45:321-325.
6. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;100:158-173.
7. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007;100:174-190.
8. Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 2008;60:139-143.
9. Ajili SH, Ebrahimi NG, Soleimani M. Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants. *Acta Biomater* 2009;5:1519-1530.
10. Ali ZA, Alp NJ, Lupton H, Arnold N, Bannister T, Hu Y, Mussa S, Wheatcroft M, Greaves DR, Gunn J and others. Increased in-stent stenosis in ApoE knockout mice: insights from a novel mouse model of balloon angioplasty and stenting. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:833-840.
11. Allahverdian S, Francis GA. Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 2010;20:96-102.
12. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48:589-601.

6. Literaturverzeichnis

13. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Flidner T, Erhardt W, Schomig A. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 2000;101:1453-1458.
14. American Heart Association. Heart and Stroke statistical update. In: 2002.
15. Aoki J, Serruys PW, van BH, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, Regar E, de Feyter PJ, Davis HR and others. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1574-1579.
16. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967.
17. Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* 1978;31:539-545.
18. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011;13:11-22.
19. Bayes-Genis A, Kantor B, Keelan PC, Altman JD, Lubbe DF, Kang JH, Schwartz RS. Restenosis and Hyperplasia: Animal Models. *Curr Interv Cardiol Rep* 2000;2:303-308.
20. Beijik MA, Klomp M, Verouden NJ, van GN, Koch KT, Henriques JP, Baan J, Vis MM, Scheunhage E, Piek JJ and others. GenousTM endothelial progenitor cell capturing stent vs. the Taxus Liberte stent in patients with de novo coronary lesions with a high-risk of coronary restenosis: a randomized, single-centre, pilot study. *Eur Heart J* 2009.
21. Bennett MR, O'Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacol Ther* 2001;91:149-166.
22. Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr Opin Lipidol* 2010;21:434-440.
23. Berry JL, Manoach E, Mekkaoui C, Rolland PH, Moore JE, Jr., Rachev A. Hemodynamics and wall mechanics of a compliance matching stent: in vitro and in vivo analysis. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:97-105.
24. Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S. Stimulation of homologous recombination

6. Literaturverzeichnis

- through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 2001;21:289-297.
25. Blindt R, Hoffmeister KM, Bienert H, Pfannschmitt, Bartsch G, Thissen H, Klee D, vom DJ. Development of a new biodegradable intravascular polymer stent with simultaneous incorporation of bioactive substances. *Int J Artif Organs* 1999;22:843-853.
 26. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, Seitz B, Kapurniotu A, Kwok C, Dewor M and others. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1786-1795.
 27. Blindt R, Vogt F, Lamby D, Zeiffer U, Krott N, Hilger-Eversheim K, Hanrath P, vom DJ, Bosserhoff AK. Characterization of differential gene expression in quiescent and invasive human arterial smooth muscle cells. *J Vasc Res* 2002;39:340-352.
 28. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996;272:685-688.
 29. Budd JS, Bell PR, James RF. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Br J Surg* 1989;76:1259-1261.
 30. Bunting S, Moncada S, Vane JR. Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet* 1977;2:1075-1076.
 31. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-1084.
 32. Chamberlain J, Wheatcroft M, Arnold N, Lupton H, Crossman DC, Gunn J, Francis S. A novel mouse model of in situ stenting. *Cardiovasc Res* 2009.
 33. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Poher JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS and others. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-3561.
 34. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49:327-333.
 35. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983;49:208-215.
 36. Co M, Tay E, Lee CH, Poh KK, Low A, Lim J, Lim IH, Lim YT, Tan HC. Use of endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate- to long-term clinical follow-up. *Am Heart J* 2008;155:128-132.

6. Literaturverzeichnis

37. Colombo A, Karvouni E. Biodegradable stents : "fulfilling the mission and stepping away". *Circulation* 2000;102:371-373.
38. Cooke MN, Fisher JP, Dean D, Rimnac C, Mikos AG. Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;64:65-69.
39. Daniel JM, Sedding DG. Circulating smooth muscle progenitor cells in arterial remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:273-279.
40. de MA, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules* 2008;9:2969-2979.
41. De S, I, Wilczek KL, Verbeken EV, Vandorpe J, Lan PN, Schacht E, De GH, Piessens J. Biocompatibility of polymer-coated oversized metallic stents implanted in normal porcine coronary arteries. *Atherosclerosis* 1995;114:105-114.
42. De S, I, Wilczek KL, Verbeken EV, Vandorpe J, Lan PN, Schacht E, De GH, Piessens J. Biocompatibility of polymer-coated oversized metallic stents implanted in normal porcine coronary arteries. *Atherosclerosis* 1995;114:105-114.
43. DePalma VA, Baier RE, Ford JW, Glott VL, Furuse A. Investigation of three-surface properties of several metals and their relation to blood compatibility. *J Biomed Mater Res* 1972;6:37-75.
44. Deuse T, Ikeno F, Robbins RC, Schrepfer S. Imaging in-stent restenosis: an inexpensive, reliable, and rapid preclinical model. *J Vis Exp* 2009.
45. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 1999;126:847-855.
46. Deux JF, Meddahi-Pelle A, Le Blanche AF, Feldman LJ, Colliet-Jouault S, Bree F, Boudghene F, Michel JB, Letourneur D. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1604-1609.
47. Di SS, Yang Z, Wyler von BM, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS ONE* 2009;4:e5643.
48. Dolmatch BL, Dong YH, Trerotola SO, Hunter DW, Brennecke LH, LaBounty R. Tissue response to covered Wallstents. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:471-478.

6. Literaturverzeichnis

49. Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application. 1964. *Radiology* 1989;172:904-920.
50. Dube H, Clifford AG, Barry CM, Schwarten DE, Schwartz LB. Comparison of the vascular responses to balloon-expandable stenting in the coronary and peripheral circulations: long-term results in an animal model using the TriMaxx stent. *J Vasc Surg* 2007;45:821-827.
51. E Ruckenstein, Sathyamurthy V, Gourisankar. A surface energetic criterion of blood compatibility of foreign surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 1984;101:436-451.
52. Eberhart RC, Su SH, Nguyen KT, Zilberman M, Tang L, Nelson KD, Frenkel P. Bioresorbable polymeric stents: current status and future promise. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14:299-312.
53. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* 2003;361:247-249.
54. Finn AV, Gold HK, Tang A, Weber DK, Wight TN, Clermont A, Virmani R, Kolodgie FD. A novel rat model of carotid artery stenting for the understanding of restenosis in metabolic diseases. *J Vasc Res* 2002;39:414-425.
55. Fischell TA. Polymer coatings for stents. Can we judge a stent by its cover? *Circulation* 1996;94:1494-1495.
56. Fontaine AB, Koelling K, Clay J, Spigos DG, Dos PS, Christoforidis G, Hinkle G, Hill T, Cearlock J, Pozderac R. Decreased platelet adherence of polymer-coated tantalum stents. *J Vasc Interv Radiol* 1994;5:567-572.
57. Frontini MJ, O'Neil C, Sawyez C, Chan BM, Huff MW, Pickering JG. Lipid incorporation inhibits Src-dependent assembly of fibronectin and type I collagen by vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2009;104:832-841.
58. G.Nakazawa ELAVFEKMAPBFDKRV. Drug-eluting stents accelerate atherosclerosis at the sites of stented coronary arteries. *Eur Heart J* 2008:777.
59. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503.
60. Garg S, Duckers HJ, Serruys PW. Endothelial progenitor cell capture stents: will this technology find its niche in contemporary practice? *Eur Heart J* 2010;31:1032-1035.

6. Literaturverzeichnis

61. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N and others. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106-3112.
62. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X and others. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009;325:433.
63. Geurts AM, Cost GJ, Remy S, Cui X, Tesson L, Usal C, Menoret S, Jacob HJ, Anegon I, Buelow R. Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleases. *Methods Mol Biol* 2010;597:211-225.
64. Gimbrone MA, Jr., Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997;99:1809-1813.
65. Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2000;902:230-239.
66. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS and others. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11:367-368.
67. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS and others. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006;20:661-669.
68. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103:1204-1219.
69. Goldberg L, Bosco P, Shors E, Klein S, Nelson R, White R. Effect of surface porosity on early thrombogenicity using vascular grafts with two surfaces in sequence. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1981;27:517-521.
70. Grabow N, Bunger CM, Schultze C, Schmohl K, Martin DP, Williams SF, Sternberg K, Schmitz KP. A biodegradable slotted tube stent based on poly(L-lactide) and poly(4-hydroxybutyrate) for rapid balloon-expansion. *Ann Biomed Eng* 2007;35:2031-2038.
71. Gross DR. Thromboembolic phenomena and the use of the pig as an appropriate animal model for research on cardiovascular devices. *Int J Artif Organs* 1997;20:195-203.
72. Grube E, Buellesfeld L. Rapamycin analogs for stent-based local drug delivery. Everolimus- and tacrolimus-eluting stents. *Herz* 2004;29:162-166.

6. Literaturverzeichnis

73. Grube E, Dawkins K, Guagliumi G, Banning A, Zmudka K, Colombo A, Thuesen L, Hauptman K, Marco J, Wijns W and others. TAXUS VI final 5-year results: a multicentre, randomised trial comparing polymer-based moderate-release paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent for treatment of long, complex coronary artery lesions. *EuroIntervention* 2009;4:572-577.
74. Grüntzig AR SÅS. Nonoperative dilatation of coronaryartery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. In: *New England Journal of Medicine*; 1979. p 61-68.
75. Hamlin GW, Rajah SM, Crow MJ, Kester RC. Evaluation of the thrombogenic potential of three types of arterial graft studied in an artificial circulation. *Br J Surg* 1978;65:272-276.
76. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989;9:567-578.
77. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S and others. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354-3360.
78. Hayashi S, Yamamoto A, You F, Yamashita K, Ikegame Y, Tawada M, Yoshimori T, Shimizu S, Nakashima S. The stent-eluting drugs sirolimus and paclitaxel suppress healing of the endothelium by induction of autophagy. *Am J Pathol* 2009;175:2226-2234.
79. Hecker JF, Scandrett LA. Roughness and thrombogenicity of the outer surfaces of intravascular catheters. *J Biomed Mater Res* 1985;19:381-395.
80. Hehrlein C, Zimmermann M, Metz J, Ensinger W, Kubler W. Influence of surface texture and charge on the biocompatibility of endovascular stents. *Coron Artery Dis* 1995;6:581-586.
81. Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Blattner A, Axel DI, Schroder S, Heinle H, Karsch KR. Local paclitaxel delivery for the prevention of restenosis: biological effects and efficacy in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1969-1976.
82. Hietala EM, Maasilta P, Juuti H, Nuutinen JP, Harjula AL, Salminen US, Lassila R. Platelet deposition on stainless steel, spiral, and braided polylactide stents. A comparative study. *Thromb Haemost* 2004;92:1394-1401.
83. Hill RA, Dundar Y, Bakhai A, Dickson R, Walley T. Drug-eluting stents: an early systematic review to inform policy. *Eur Heart J* 2004;25:902-919.
84. Houis S, Gries T, Weber C, Kelm M, Blindt R. Shape-memory polymers for vascular stent applications. In: 2009.

6. Literaturverzeichnis

85. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:201-206.
86. Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, Hanrath P, Weber C. Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis* 2007;192:413-420.
87. Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, Weber C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res* 2007;100:590-597.
88. Hubbell JA, Massia SP, Desai NP, Drumheller PD. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Biotechnology (N Y)* 1991;9:568-572.
89. Hui DY. Apolipoprotein E-induced cell signaling in the vessel wall. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5:335-341.
90. Hui DY, Basford JE. Distinct signaling mechanisms for apoE inhibition of cell migration and proliferation. *Neurobiol Aging* 2005;26:317-323.
91. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006;119:3901-3903.
92. Hung HS, Wu CC, Chien S, Hsu SH. The behavior of endothelial cells on polyurethane nanocomposites and the associated signaling pathways. *Biomaterials* 2009;30:1502-1511.
93. Hunter WL. Drug-eluting stents: beyond the hyperbole. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:347-349.
94. Hwang CW, Wu D, Edelman ER. Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery. *Circulation* 2001;104:600-605.
95. Hwang CW, Wu D, Edelman ER. Impact of transport and drug properties on the local pharmacology of drug-eluting stents. *Int J Cardiovasc Intervent* 2003;5:7-12.
96. Iaconetti C, Polimeni A, Sorrentino S, Sabatino J, Pironti G, Esposito G, Curcio A, Indolfi C. Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury. *Basic Res Cardiol* 2012;107:296.
97. Isalan M. Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nat Methods* 2011;9:32-34.
98. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, Nakamura T, Sasaki H. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial

6. Literaturverzeichnis

- progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:276-280.
99. Jacob HJ, Lazar J, Dwinell MR, Moreno C, Geurts AM. Gene targeting in the rat: advances and opportunities. *Trends Genet* 2010;26:510-518.
100. Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, Kastrati A, Schomig A, Wessely R. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res* 2005;68:483-492.
101. Jevon M, Dorling A, Hornick PI. Progenitor cells and vascular disease. *Cell Prolif* 2008;41 Suppl 1:146-164.
102. Johnson GJ, Griggs TR, Badimon L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1999;81:835-843.
103. Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung* 1994;44:793-797.
104. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A and others. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001;7:1035-1040.
105. Kim JH, Kang TJ, Yu WR. Mechanical modeling of self-expandable stent fabricated using braiding technology. *J Biomech* 2008.
106. Kim W, Jeong MH, Cha KS, Hyun DW, Hur SH, Kim KB, Hong YJ, Park HW, Kim JH, Ahn YK and others. Effect of anti-oxidant (carvedilol and probucol) loaded stents in a porcine coronary restenosis model. *Circ J* 2005;69:101-106.
107. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-685.
108. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys P. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:733-739.

6. Literaturverzeichnis

109. Kleinedler JJ, Orchard EA, Foley JD, Rogers LK, Hebert VY, Dugas TR. A dietary approach to increase in-stent stenosis and face validity of a rat model for arterial angioplasty and stenting. *Atherosclerosis* 2011.
110. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-230.
111. Krieger M. Molecular flypaper and atherosclerosis: structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends Biochem Sci* 1992;17:141-146.
112. Kukreja N, Onuma Y, Daemen J, Serruys PW. The future of drug-eluting stents. *Pharmacol Res* 2008;57:171-180.
113. Kwon JS, Park RK, Shim TJ, Jeong MH, Cho MC, Ahn Y, Kim DW. Comparison of bare metal stent and paclitaxel-eluting stent using a novel rat aorta stent model. *J Vet Sci* 2011;12:143-149.
114. Langeveld B, Roks AJ. Commentary: rat restenosis models: means for thorough restenosis research. *J Endovasc Ther* 2005;12:343-345.
115. Langeveld B, Roks AJ, Tio RA, van Boven AJ, van der Want JJ, Henning RH, van Beusekom HM, van der Giessen WJ, Zijlstra F, van Gilst WH. Rat abdominal aorta stenting: a new and reliable small animal model for in-stent restenosis. *J Vasc Res* 2004;41:377-386.
116. Lansky AJ, Costa RA, Mintz GS, Tsuchiya Y, Midei M, Cox DA, O'Shaughnessy C, Applegate RA, Cannon LA, Mooney M and others. Non-polymer-based paclitaxel-coated coronary stents for the treatment of patients with de novo coronary lesions: angiographic follow-up of the DELIVER clinical trial. *Circulation* 2004;109:1948-1954.
117. Lendlein A, Behl M, Hiebl B, Wischke C. Shape-memory polymers as a technology platform for biomedical applications. *Expert Rev Med Devices* 2010;7:357-379.
118. Lewis AL, Willis SL, Small SA, Hunt SR, O'byrne V, Stratford PW. Drug loading and elution from a phosphorylcholine polymer-coated coronary stent does not affect long-term stability of the coating in vivo. *Biomed Mater Eng* 2004;14:355-370.
119. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000;247:349-358.
120. Lim WH, Seo WW, Choe W, Kang CK, Park J, Cho HJ, Kyeong S, Hur J, Yang HM, Cho HJ and others. Stent Coated With Antibody Against Vascular Endothelial-Cadherin Captures Endothelial

6. Literaturverzeichnis

- Progenitor Cells, Accelerates Re-Endothelialization, and Reduces Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011.
121. Lin Q, Ding X, Qiu F, Song X, Fu G, Ji J. In situ endothelialization of intravascular stents coated with an anti-CD34 antibody functionalized heparin-collagen multilayer. *Biomaterials* 2010;31:4017-4025.
122. Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ, Topol EJ. Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:808-816.
123. Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res* 1993;73:792-796.
124. Liu HT, Li F, Wang WY, Li XJ, Liu YM, Wang RA, Guo WY, Wang HC. Rapamycin inhibits re-endothelialization after percutaneous coronary intervention by impeding the proliferation and migration of endothelial cells and inducing apoptosis of endothelial progenitor cells. *Tex Heart Inst J* 2010;37:194-201.
125. Lowe HC, Chesterman CN, Khachigian LM. Rat aortic stenting: toward a simple model of in-stent restenosis. *Am J Cardiol* 2001;88:720-721.
126. Lowe HC, Schwartz RS, Mac Neill BD, Jang IK, Hayase M, Rogers C, Oesterle SN. The porcine coronary model of in-stent restenosis: current status in the era of drug-eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:515-523.
127. Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, Virmani R. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2007;115:1051-1058.
128. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
129. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials* 2007;28:1689-1710.
130. Markway BD, McCarty OJ, Marzec UM, Courtman DW, Hanson SR, Hinds MT. Capture of flowing endothelial cells using surface-immobilized anti-kinase insert domain receptor antibody. *Tissue Eng Part C Methods* 2008;14:97-105.
131. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:412-417.
132. Marx SO, Marks AR. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 2001;104:852-855.

6. Literaturverzeichnis

133. Matter CM, Ma L, von LT, Meier P, Lohmann C, Zhang D, Kilic U, Hofmann E, Ha SW, Hersberger M and others. Increased balloon-induced inflammation, proliferation, and neointima formation in apolipoprotein E (ApoE) knockout mice. *Stroke* 2006;37:2625-2632.
134. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A, Greutert H, Kurz DJ, Wnendt S, Kuttler B, Joch H, Grunenfelder J, Zund G and others. Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:286-292.
135. McIntee BE. The wallstent endoprosthesis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1999;9:373-381.
136. Medical Art Gallery Servier UK www.servier.co.uk/medical-art-gallery/slideKit.asp?kit19. Medical Art Gallery Servier UK. In: 2012.
137. Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Froschl A, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg* 2001;71:S327-S331.
138. Meinhart JG, Schense JC, Schima H, Gorlitzer M, Hubbell JA, Deutsch M, Zilla P. Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. *Tissue Eng* 2005;11:887-895.
139. Moer R, Myreng Y, Molstad P, Albertsson P, Gunnes P, Lindvall B, Wiseth R, Ytre-Arne K, Kjekshus J, Golf S. Stenting in small coronary arteries (SISCA) trial. A randomized comparison between balloon angioplasty and the heparin-coated beStent. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1598-1603.
140. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:36-45.
141. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban HE, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G and others. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002;346:1773-1780.
142. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS and others. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003;349:1315-1323.
143. Murohara T. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:303-307.

6. Literaturverzeichnis

144. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000;105:1527-1536.
145. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL, Wang M, Sanson M, Abramowicz S, Welch C and others. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest* 2011;121:4138-4149.
146. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M and others. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128-1135.
147. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14:133-140.
148. Nakayama Y, Nishi S, Ueda-Ishibashi H, Matsuda T. Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:52-61.
149. Nakazawa G, Finn AV, John MC, Kolodgie FD, Virmani R. The significance of preclinical evaluation of sirolimus-, paclitaxel-, and zotarolimus-eluting stents. *Am J Cardiol* 2007;100:36M-44M.
150. Nakazawa G, Finn AV, Ladich E, Ribichini F, Coleman L, Kolodgie FD, Virmani R. Drug-eluting stent safety: findings from preclinical studies. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:1379-1391.
151. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-2690.
152. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol* 2000;11:5-17.
153. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999;284:489-493.
154. Ochsenhirt SE, Kokkoli E, McCarthy JB, Tirrell M. Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. *Biomaterials* 2006;27:3863-3874.

6. Literaturverzeichnis

155. Onuma Y, Ormiston J, Serruys PW. Bioresorbable Scaffold Technologies. *Circ J* 2011.
156. Onuma Y, Serruys PW. Bioresorbable scaffold: the advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization? *Circulation* 2011;123:779-797.
157. Ormiston JA, Serruys PW. Bioabsorbable coronary stents. *Circ Cardiovasc Interv* 2009;2:255-260.
158. Oyamada S, Ma X, Wu T, Robich MP, Wu H, Wang X, Buchholz B, McCarthy S, Bianchi CF, Sellke FW and others. Trans-iliac rat aorta stenting: a novel high throughput preclinical stent model for restenosis and thrombosis. *J Surg Res* 2011;166:e91-e95.
159. Palmaz JC. New advances in endovascular technology. *Tex Heart Inst J* 1997;24:156-159.
160. Palmaz JC. Intravascular stents in the last and the next 10 years. *J Endovasc Ther* 2004;11 Suppl 2:II200-II206.
161. Palmaz JC, Benson A, Sprague EA. Influence of surface topography on endothelialization of intravascular metallic material. *J Vasc Interv Radiol* 1999;10:439-444.
162. Palmaz JC, Sibbitt RR, Reuter SR, Tio FO, Rice WJ. Expandable intraluminal graft: a preliminary study. Work in progress. *Radiology* 1985;156:73-77.
163. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA and others. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-958.
164. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R and others. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000;95:3289-3296.
165. Pendyala L, Jabara R, Robinson K, Chronos N. Passive and active polymer coatings for intracoronary stents: novel devices to promote arterial healing. *J Interv Cardiol* 2009;22:37-48.
166. Perkins LE. Preclinical models of restenosis and their application in the evaluation of drug-eluting stent systems. *Vet Pathol* 2010;47:58-76.
167. Peuster M, Hesse C, Schloo T, Fink C, Beerbaum P, von SC. Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. *Biomaterials* 2006;27:4955-4962.

6. Literaturverzeichnis

168. Peuster M, Wohlsein P, Brugmann M, Ehlerding M, Seidler K, Fink C, Brauer H, Fischer A, Hausdorf G. A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 2001;86:563-569.
169. Pierschbacher M, Hayman EG, Ruoslahti E. Synthetic peptide with cell attachment activity of fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:1224-1227.
170. Plump AS, Smith JD, Hayek T, alto-Setala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71:343-353.
171. Poon M, Badimon JJ, Fuster V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* 2002;359:619-622.
172. Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpaa N, Rajantie I, Yla-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:6620-6625.
173. Randone B, Cavallaro G, Polistena A, Cucina A, Coluccia P, Graziano P, Cavallaro A. Dual role of VEGF in pretreated experimental ePTFE arterial grafts. *J Surg Res* 2005;127:70-79.
174. Ranjan AK, Kumar U, Hardikar AA, Poddar P, Nair PD, Hardikar AA. Human blood vessel-derived endothelial progenitors for endothelialization of small diameter vascular prosthesis. *PLoS ONE* 2009;4:e7718.
175. Regar E, Sianos G, Serruys PW. Stent development and local drug delivery. *Br Med Bull* 2001;59:227-248.
176. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-346.
177. Rickert D, Lendlein A, Peters I, Moses MA, Franke RP. Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;263:215-222.
178. Riede UN, Schäfer HE. Lehrbuch der allgemeinen und speziellen Pathologie. In: Thieme Verlag; 1995. p 437.
179. Rodriguez-Menocal L, Wei Y, Pham SM, St-Pierre M, Li S, Webster K, Goldschmidt-Clermont P, Vazquez-Padron RI. A novel mouse model of in-stent restenosis. *Atherosclerosis* 2010;209:359-366.

6. Literaturverzeichnis

180. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de SG, Ford ES and others. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:e18-e209.
181. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971;50:172-186.
182. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:S419-S420.
183. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977;86:675-684.
184. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 1995;332:1004-1014.
185. Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2006;15:318-330.
186. Ryu SK, Mahmud E, Tsimikas S. Estrogen-eluting stents. *J Cardiovasc Transl Res* 2009;2:240-244.
187. San JA, Bala M, Hlawaty H, Portes P, Vranckx R, Feldman LJ, Letourneur D. Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering RNA. *Biomacromolecules* 2009;10:3074-3080.
188. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K and others. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2097-2104.
189. Schakenraad JM, Oosterbaan JA, Nieuwenhuis P, Molenaar I, Olijslager J, Potman W, Eenink MJ, Feijen J. Biodegradable hollow fibres for the controlled release of drugs. *Biomaterials* 1988;9:116-120.
190. Scheller B, Leveson B, Joner M, Zahn R, Klauss V, Naber C, Schächinger V, Elsässer AA, KAdDGfKD. freisetzende Koronarstents und mit Medikamenten beschichtete Ballonkatheter
Positionspapier der DGK 2011
. In: *Kardiologie* 2011
DOI 10.1007/s12181-011-0375-6
© Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. Published by Springer-Verlag ; 2011.
191. Schober A, Zerneck A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2007;97:730-737.

6. Literaturverzeichnis

192. Schofer J, Schluter M, Gershlick AH, Wijns W, Garcia E, Schampaert E, Breithardt G. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS). *Lancet* 2003;362:1093-1099.
193. Schrader SC, Beyar R. Evaluation of the compressive mechanical properties of endoluminal metal stents. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1998;44:179-187.
194. Schreiber F. Improving the mechanical properties of braided shape memory polymer stents by heat setting. *Autex Research Journal* 2010;Vol. 10:73-76.
195. Schwartz RS. Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more. *Lab Invest* 1994;71:789-791.
196. Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN and others. Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation* 2002;106:1867-1873.
197. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-274.
198. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 1990;82:2190-2200.
199. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28:727-732.
200. Seifalian AM, Tiwari A, Rashid ST, Salacinski H, Hamilton G. Impregnation of the the polymeric graft with adhesives molecules, typically oligopeptides or glycoprotein improves retention. *Artif Organs* 2002;26:209-210.
201. Serruys PW, de JP, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P and others. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994;331:489-495.
202. Serruys PW, Kay IP, Disco C, Deshpande NV, de Feyter PJ. Periprocedural quantitative coronary angiography after Palmaz-Schatz stent implantation predicts the restenosis rate at six months: results of a meta-analysis of the BELgian NETHERlands Stent study (BENESTENT) I, BENESTENT II Pilot, BENESTENT

6. Literaturverzeichnis

- II and MUSIC trials. Multicenter Ultrasound Stent In Coronaries. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1067-1074.
203. Serruys PW, Ormiston JA, Onuma Y, Regar E, Gonzalo N, Garcia-Garcia HM, Nieman K, Bruining N, Dorange C, Miquel-Hebert K and others. A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system (ABSORB): 2-year outcomes and results from multiple imaging methods. *Lancet* 2009;373:897-910.
204. Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:333-338.
205. Shiba Y, Takahashi M, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2009;81:169-177.
206. Simsek C, Serruys PW. Developments in coronary artery stenting: primum non nocere. *Panminerva Med* 2011;53:19-30.
207. Simsekyilmaz S, Liehn EA, Weinandy S, Schreiber F, Jockenhoevel S, Gries T, Möller M, Klee D, Zernecke A. Wirkmechanismen von biofunktionalen pro-EPC Mini-Stents in der Maus. In: 2010. p 49.
208. Soehnlein O, Wantha S, Simsekyilmaz S, Doring Y, Megens RT, Mause SF, Drechsler M, Smeets R, Weinandy S, Schreiber F and others. Neutrophil-derived cathelicidin protects from neointimal hyperplasia. *Sci Transl Med* 2011;3:103ra98.
209. Sokolowski W, Metcalfe A, Hayashi S, Yahia L, Raymond J. Medical applications of shape memory polymers. *Biomed Mater* 2007;2:S23-S27.
210. Springer ML, Wang X. Blunting half of the double-edged sword: potential use of interleukin-10 to protect bone marrow-derived cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2011;109:1196-1198.
211. Stein A. Langzeituntersuchung zur In-Stent Restenose eines neuen biodegradierbaren, wirkstoffbeladenen, intravaskulären Polylaktidstents nach Implantation in porcine Koronararterien. In: 2006.
212. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, O'Shaughnessy CD, DeMaio S, Hall P, Popma JJ and others. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;294:1215-1223.
213. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J and others. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004;350:221-231.

6. Literaturverzeichnis

214. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J and others. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation* 2004;109:1942-1947.
215. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB and others. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-1193.
216. Swertfeger DK, Bu G, Hui DY. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E inhibition of smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 2002;277:4141-4146.
217. Swertfeger DK, Hui DY. Apolipoprotein E receptor binding versus heparan sulfate proteoglycan binding in its regulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 2001;276:25043-25048.
218. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11:61-74.
219. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H886-H893.
220. Tamai H, Igaki K, Kyo E, Kosuga K, Kawashima A, Matsui S, Komori H, Tsuji T, Motohara S, Uehata H. Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation* 2000;102:399-404.
221. Tan Y, Shao H, Eton D, Yang Z, onso-Diaz L, Zhang H, Schulick A, Livingstone AS, Yu H. Stromal cell-derived factor-1 enhances pro-angiogenic effect of granulocyte-colony stimulating factor. *Cardiovasc Res* 2007;73:823-832.
222. Taneja V, Vertegel A, Langan EM, III, Laberge M. Influence of topography of an endovascular stent material on smooth muscle cell response. *Ann Vasc Surg* 2011;25:675-685.
223. Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1989;264:16174-16182.
224. Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda S, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K and others. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* 2006;98:1194-1202.

6. Literaturverzeichnis

225. Tesfamariam B. Drug release kinetics from stent device-based delivery systems. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:118-125.
226. Thebaud NB, Pierron D, Bareille R, Le VC, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:339-345.
227. Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:271-276.
228. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990;10:966-990.
229. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-252.
230. Topol EJ, Mark DB, Lincoff AM, Cohen E, Burton J, Kleiman N, Talley D, Sapp S, Booth J, Cabot CF and others. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: results from a multicentre randomised trial. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. *Lancet* 1999;354:2019-2024.
231. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:733-742.
232. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:318-322.
233. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-353.
234. Vaira S, Yang C, McCoy A, Keys K, Xue S, Weinstein EJ, Novack DV, Cui X. Creation and Preliminary Characterization of a Leptin Knockout Rat. *Endocrinology* 2012.
235. van Beusekom HM, Saia F, Zindler JD, Lemos PA, Swager-Ten Hoor SL, van Leeuwen MA, de Feijter PJ, Serruys PW, van der Giessen WJ. Drug-eluting stents show delayed healing: paclitaxel more pronounced than sirolimus. *Eur Heart J* 2007;28:974-979.
236. van Beusekom HM, Whelan DM, Hofma SH, Krabbendam SC, van H, V, Verdouw PD, van der Giessen WJ. Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1109-1117.

6. Literaturverzeichnis

237. van Buuren F, Horstkotte D. 23. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland. In: 2009. p -
Der Kardiologe doi:10.1007/s12181-009-0224-z Key:
citeulike:5814847.
238. van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR, Jr., Ellis SG, Topol EJ. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;94:1690-1697.
239. van Wachem PB, Vreriks CM, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. The influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers. *J Biomed Mater Res* 1987;21:701-718.
240. van BF, Horstkotte D. [21st report about the statistics of the heart catheterization laboratory in the German Federal Republic. Results of the joint inquiry of the Commission for Clinical Cardiology and of the Working Groups for Interventional Cardiology and Angiology of the German Society for Cardiology and Circulatory Research in the year 2004]. *Clin Res Cardiol* 2006;95:383-387.
241. Vane JR, Botting RM. Endothelium--thromboresistance. *Wien Klin Wochenschr* 1991;103:403-404.
242. vci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization - A review of current strategies. *Biotechnol Adv* 2010;28:119-129.
243. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28:721-726.
244. Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart* 2003;89:133-138.
245. Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-642.
246. Vogt F, Stein A, Rettemeier G, Krott N, Hoffmann R, vom DJ, Bosserhoff AK, Michaeli W, Hanrath P, Weber C and others. Long-term assessment of a novel biodegradable paclitaxel-eluting coronary polylactide stent. *Eur Heart J* 2004;25:1330-1340.
247. von BC, Basalus MW, Tandjung K, van Houwelingen KG, Stoel MG, Louwerenburg JH, Linssen GC, Said SA, Kleijne MA, Sen H and others. A randomized controlled trial in second-generation zotarolimus-eluting Resolute stents versus everolimus-eluting

6. Literaturverzeichnis

- Xience V stents in real-world patients: the TWENTE trial. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1350-1361.
248. Wache HM, Tartakowska DJ, Hentrich A, Wagner MH. Development of a polymer stent with shape memory effect as a drug delivery system. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:109-112.
249. Walpoth BH, Zammaretti P, Cikirikcioglu M, Khabiri E, Djebaili MK, Pache JC, Tille JC, Aggoun Y, Morel D, Kalangos A and others. Enhanced intimal thickening of expanded polytetrafluoroethylene grafts coated with fibrin or fibrin-releasing vascular endothelial growth factor in the pig carotid artery interposition model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:1163-1170.
250. Walter DH, Cejna M, az-Sandoval L, Willis S, Kirkwood L, Stratford PW, Tietz AB, Kirchmair R, Silver M, Curry C and others. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation* 2004;110:36-45.
251. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-3024.
252. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-2327.
253. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005;96:612-616.
254. Weber C. Chemokines in atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1896.
255. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1997-2008.
256. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials* 2007;28:3004-3011.
257. Wessely R. New drug-eluting stent concepts. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:194-203.
258. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-1160.

6. Literaturverzeichnis

259. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:471-474.
260. Wojakowski W, Ratajczak MZ, Tendera M. Interleukin-8: more on the mechanisms of progenitor cells mobilization in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2006;27:1013-1015.
261. Wykrzykowska JJ, Onuma Y, Serruys PW. Advances in stent drug delivery: the future is in bioabsorbable stents. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:113-126.
262. Yakacki CM, Shandas R, Lanning C, Rech B, Eckstein A, Gall K. Unconstrained recovery characterization of shape-memory polymer networks for cardiovascular applications. *Biomaterials* 2007;28:2255-2263.
263. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH and others. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005;115:326-338.
264. Zamiri P, Kuang Y, Sharma U, Ng TF, Busold RH, Rago AP, Core LA, Palasis M. The biocompatibility of rapidly degrading polymeric stents in porcine carotid arteries. *Biomaterials* 2010;31:7847-7855.
265. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2008;78:413-421.
266. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:497841.
267. Zdrahala RJ. Small caliber vascular grafts. Part I: state of the art. *J Biomater Appl* 1996;10:309-329.
268. Zdrahala RJ. Small caliber vascular grafts. Part II: Polyurethanes revisited. *J Biomater Appl* 1996;11:37-61.
269. Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 1999;14:67-90.
270. Zernecke A, Schober A, Bot I, von HP, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 2005;96:784-791.
271. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in Atherosclerosis. An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008.

- 272. Zernecke A, Weber C. Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol* 2005;100:93-101.
- 273. Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2010;86:192-201.
- 274. Zhang J, Patel JM, Li YD, Block ER. Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997;96:71-87.
- 275. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258:468-471.

Anhang

Ehrenerklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Frau Nicole Krott hat die Paraffin-Schnitte der Polyurethan-Stents als auch die Färbungen der Gewebeproben durchgeführt. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den durchgeführten und in der vorliegenden Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der RWTH Aachen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Mauricio Borinski

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Rüdiger Blindt und PD Dr. med. F. Vogt für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, Dr. med. Dr. rer. medic. Dipl.-Biotech. Christian Flege, MTA Aline Müller, MTA Petra Fischer, Dipl.-Biol. Andreas Nellen, Dr. rer. nat. Mirko Moreno, Dipl.-Biol. Daniel Heinrichs, Thadek Stupinski, Dr. med. vet. Nina Gronloh, Michael Schmitz, Frau Kranz-Vanberg, dem Team des Instituts für Tierversuchskunde des Universitätsklinikums Aachen (Prof. Dr. med. vet. R. Tolba) Dipl.-Ing. Fabian Schreiber, Dipl.-Ing. Philipp Schuster, Dr. Dipl.-Ing. Stephanie Houis, Dr. rer. nat. Sebastian Olschewski, Dr. med. vet. Eva Sicking, Nicole Aranda Gallego und Sebastian Nauendorf, und dem ganzen Herzkatheterlaborteam der Medizinischen Klinik I, Dr. med. Kathrin Schmitz, cand. med. Annika Grahl, Manfred Bovi (†) (Institut für Pathologie, Elektronenmikroskopie), Univ.-Prof. Dr. med. N. Marx, sowie meinen ehemaligen Arbeitskollegen aus Münster, Dr. rer. nat. Insa Buers, Dr. rer. nat. Anneke Rübel, Dr. rer. nat. Yvonne Nitschke, Prof. Dr. rer. nat. H. Robenek, Dr. rer. nat. Rainer Windler, Stefanie Becher und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Malte Kelm.

Vor allem möchte ich mich aber bei Dr. Peter Jacob, Dr. med. vet. Mamdouh Afify, Dr. rer. nat. A. Teubner, Martin Meynberg und Frau Niicole Krott bedanken. Ohne ihre kritischen Anmerkungen wäre diese Doktorarbeit niemals entstanden.

Veröffentlichungen/Poster/Vorträge:

Transversal and lateral exciton energy transfer in grana thylakoids of spinach

Kirchhoff H, **Borinski M**, Lenhert S, Chi L, Büchel C.

Biochemistry. 2004 Nov 16;43(45):14508-16 PAPER

Structural and functional self-organization of Photosystem II in grana thylakoids

Kirchhoff H, Haase W, Haferkamp S, Schott T, **Borinski M**, Kubitschek U,

Rögner M Biochim Biophys Acta. 2007 Sep; 1767(9):1180-8 PAPER

MS412 Development and evaluation of a novel poly-L-lactic acid/caprolactone copolymer coronary stent manufactured by selective laser melting

Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, June 2010, Page 193 F.

Vogt, C. Flege, S. Hoeges, **M. Borinski**, V.A. Schulte, R. Hoffmann, N. Marx, R.

Poprawe, K. Wissenbach, R. Blindt Abstract

MS339 Development and characterization of a shape-memory polymer based coronary stent with endothelial progenitor cell-adhesive capacity

Atherosclerosis Supplements, Volume 11, Issue 2, June 2010, Page 178 F.

Vogt, **M. Borinski**, F. Schreiber, C. Flege, N. Krott, T. Gries, C. Weber, R.

Hoffmann, N. Marx, R. Blindt Abstract

DGAF Blaubeuren 2010 Development and characterization of a shape-memory polymer-based coronary stent with endothelial progenitor cell-adhesive capacity

F. Vogt, **M. Borinski**, F. Schreiber, C. Flege, N. Krott, T. Gries, C. Weber, R.

Hoffmann, N. Marx, R. Blindt Perfusion Jahrgang 23 2010 Heft 1 Seite 30

Abstract/Vortrag

Development and evaluation of a novel Poly-L-Lactic acid/caprolactone copolymer coronary stent manufactured by selective laser melting

F. Vogt, C. Flege, S. Hoeges, **M. Borinski**, V.A. Schulte, R. Hoffmann, N. Marx,

R. Poprawe, K. Wissenbach, R. Blindt Perfusion Jahrgang 23 2010 Heft 1 Seite

40 Abstract

DGK Mannheim 2010 Development and characterization of a shape-memory polymer-based coronary stent with endothelial progenitor cell-adhesive capacity **M. Borinski**, F. Schreiber, C. Flege, N. Krott, T. Gries, C. Weber, R. Hoffmann, N. Marx, R. Blindt, F. Vogt (Aachen) V1705 Freier Vortrag: Koronarpathophysiologie 10.April 2010

Autex Journal 2010 Improving the mechanical properties of braided shape memory polymer stents by heat setting Fabian Schreiber, Philipp Schuster, **Mauricio Borinski**, Felix Vogt, Rüdiger Blindt, Thomas Gries AUTEX Research Journal, Vol. 10, No3, September 2010 © AUTEX PAPER

DGAF Blaubeuren 2011 Development and in vivo evaluation of a novel shape-memory polymer-based coronary stent **M. Borinski**, F. Schreiber, C. Flege, N. Krott, T. Gries, C. Weber, R. Hoffmann, N. Marx, R. Blindt, F. Vogt Perfusion Jahrgang 24 2011 Heft 1 Seite 34 Poster

Manufacturing and in vivo characterization of different novel fully degradable copolymeric coronary stents via selective laser melting C. Flege, J. Jauer, **M. Borinski**, R. Poprawe, K. Wissenbach, N. Marx, R. Blindt, F. Vogt Perfusion Jahrgang 24 2011 Heft 1 Seite 34 Poster

Development and In Vivo Evaluation of a Novel Polyurethane-based Coronary Stent **Mauricio Borinski**, Fabian Schreiber, Christian Flege, Thomas Gries, Christian Weber, Nikolaus Marx, Rüdiger Blindt, Felix Vogt 24th Conference on Biomaterials Dublin 2011 Poster

Borinski, M., Flege, C., Schreiber, F., Krott, N., Gries, T.; Liehn, E.; Blindt, R., Marx, N., Vogt, F. Introduction of a high-throughput double-stent animal model for the evaluation of biodegradable vascular stents. Journal of Biomedical Materials Research Part B 2012 Nov;100(8):2023-8. Epub 2012 Sep 21 PAPER

DGAF Blaubeuren 2011 **M. Borinski**, C. Flege, N. Krott, A. Grahl, N. Marx, F. Vogt (Aachen) Angio-associated Migratory Cell Protein reguliert die endotheliale

THP-1-Adhäsion und wird von vaskulären Progenitorzellen exprimiert. Perfusion
Jahrgang 25 2012 Heft 1 Seite 34 Vortrag

PI-77 Angio-associated migratory cell protein contributes to progenitor cell adhesion and migration and to neoatherosclerosis development in the rat in-stent restenosis model **Mauricio Borinski**, Christian Flege, Nicole Krott, Annika Grahl, Nikolaus Marx, Felix Vogt, 17th International Vascular Biology Meeting (IVBM), Wiesbaden, 02-05. Juni 2012 Poster

ApolipoproteinE-deficient rats generated via zinc-finger nucleases develop elevated vascular inflammation and in-stent restenosis, Felix Vogt, Christian Flege, Annika Grahl, Nikolaus Marx, **Mauricio Borinski**, Poster P2424, 27.08.2012, European Society of Cardiology, ESC 2012 Munich Poster

Interleukin 6-, 8- And 10-dependent Elevation of In-stent Stenosis in Apolipoprotein E Deficient Rats, Felix Vogt, Christian Flege, Nikolaus Marx, **Mauricio Borinski**, Session Title: Hot topics in Catheter-based Coronary Interventions: Experimental and New Technology, Nov 6 2012, AHA 2012 Los Angeles Poster

Development and characterization of a coronary polylactic acid stent prototype generated by selective laser melting, Christian Flege, Felix Vogt, Simon Höges, Lucas Jauer **Mauricio Borinski**, Vera A. Schulte, Rainer Hoffmann Reinhart Poprawe, et al. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, *accepted September 2012*

M. Borinski, C. Flege, N. Krott, N. Marx, F. Vogt (Aachen) Athero-metabolic and inflammatory alterations promote in-stent restenosis in apolipoproteinE deficient rats, P768 (9); 79. Jahrestagung der DGK Mannheim 2013

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Mauricio Armando Borinski
Geburtsdatum: 31.07.1978 in Siegen
Kontakt: Annastr. 42, 52062 Aachen
Mobil: 0177 / 352 88 06
E-Mail: mauricio.borinski@gmail.com

Schule und Ausbildung

02/2013 – 05/2013	Weiterbildung für Projektmanagement, CBM Projektmanagement GmbH, Berlin. Zertifiziert nach GPM/IPMA Level D
05/2007 – 12/2012	Promotion zum Dr. rer. nat. an der Medizinischen Klinik I des Uniklinikum (Univ.-Prof. Dr. med. N. Marx) der RWTH Aachen, AG PD. Dr. med. F. Vogt (ehemals AG Prof. Dr. med. R. Blindt) mit „magna cum laude“
05/2006 – 05/2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter Leibniz-Institut für Atheroskleroseforschung (LIFA) der WWU Münster, AG Prof. Dr. H. Robeneck
10/1999 – 10/2004	Studium der Biologie Hauptfach: Pflanzenphysiologie; Nebenfächer: Zoologie und Biophysik: Abschluss: 1.9
10/1998 – 10/1999	Studium der Chemie. Universität Dortmund
1984 – 1997	Grundschule und Max-Planck-Gymnasium Dortmund: Abschluss; Abitur: 2.6

Arbeitserfahrung und Praktika

Seit 05/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotionsarbeit zum Dr. rer. nat. in der AG PD Vogt; Medizinische Klinik I; UK Aachen, in Kooperation mit dem Institut für Textiltechnik (ITA), RWTH Aachen. (<u>Thema</u> : Stent Implantation in homozygoten ApolipoproteinE-defizienten Ratten und die in vitro und in vivo Evaluation eines geflochtenen Polyurethan-basierten Stents)
05/2006 – 05/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Leibniz-Institut für Atheroskleroseforschung (LIFA) der Westfälischen-Wilhelms-Universität (WWU), Münster
11/2005 – 04/2006	Praktikant in der AG Prof. Dr. R. Hallmann am Institut für Pathobiochemie der WWU, Münster
01/2005 – 10/2005	Selbstständige Tätigkeit in der Gastronomie
04/2004 – 10/2004	Diplomarbeit im Institut für Pflanzenphysiologie der WWU, AG Prof. Dr. Weis (<u>Thema</u> : Transversaler und lateraler Exitonen Energietransfer in Grana Thylakoiden des Spinats)
04/2003 – 10/2003	Studentische Hilfskraft am Institut für Ökologie der Pflanzen, Prof. Dr. von Willert, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
10/1997 – 10/1998	Wehrersatzdienst bei der Johanniter Unfallhilfe Dortmund