

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des Deutschen Herzzentrums
München des Freistaates Bayern
Klinik an der Technischen Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Heribert Schunkert)

**Evaluierung der Optischen Kohärenztomographie zur Detektion
von Neoatherosklerose im translationalen Ansatz**

Kristina Euler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Michael Joner
2. Prof. Dr. Heribert Schunkert

Die Dissertation wurde am 23.01.2019 bei der Technischen Universität
München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.06.2019 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
2	<u>HINTERGRUND</u>	8
2.1	ATHEROSKLEROSE	8
2.1.1	DEFINITION	8
2.1.2	PATHOGENESE	8
2.1.3	THERAPIE	11
2.1.3.1	Perkutane Koronarintervention (PCI)	12
2.1.3.2	Ballonangioplastie	12
2.1.3.3	Stentimplantation	13
2.2	NEOATHEROSKLEROSE	14
2.2.1	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	15
2.3	VERGLEICH ZWISCHEN ATHEROSKLEROSE UND NEOATHEROSKLEROSE	17
2.4	DIAGNOSTIK DER ATHEROSKLEROSE UND NEOATHEROSKLEROSE	18
2.4.1	OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE	18
2.4.1.1	Technischer Hintergrund der Optischen Kohärenztomographie	20
2.4.1.2	Grauwertbestimmung	20
3	<u>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</u>	22
3.1	NOTWENDIGKEIT EINES NEUEN TIERMODELLS FÜR NEOATHEROSKLEROSE	23
3.2	WAHL POTENTIELLER SURROGATPARAMETER MITTELS OCT	25
4	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	27
4.1	TIERMODELL	27
4.1.1	VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	27
4.1.2	GRUPPENEINTEILUNG UND CHOLESTERINFÜTTERUNG	27
4.1.3	STENTIMPLANTATION	28
4.1.4	DENUDATION	30
4.1.5	VERSUCHSENDE	30
4.1.5.1	Euthanasie	30
4.1.5.2	Gefäßentnahme und Fixierung	31
4.1.6	HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER PROBEN	31
4.1.6.1	Dehydrierung und Methylmetacrylat – Einbettung	32
4.1.6.2	Anfertigung histologischer Schnitte	33
4.1.6.3	Färbungen	34
4.1.6.3.1	Movat Pentachrom Färbung für MMA- Schnitte	34
4.1.6.3.2	Hämatoxylin- Eosin- Färbung	36
4.1.6.3.3	Immunhistochemische Färbung	37
4.1.7	HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG	40
4.1.7.1	Morphometrie	40
4.1.7.2	Neoatherosklerose Score	41
4.1.7.3	Histologische Charakterisierung der Regions of Interest	43
4.1.8	KORRELATION UND OCT AUSWERTUNG	45
4.1.8.1	Korrelation	45
4.1.8.2	OCT Auswertung	46
4.1.9	MESSUNG VON ATTENUATION INDEX UND PEAK INTENSITY	47
4.2	HUMANE AUTOPSIE PROBEN	49
4.3	KLINISCHE OCT DATEN	50
4.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	50

5	ERGEBNISSE	52
5.1	NEOATHEROSKLEROTISCHE TIERMODELLE IM VERGLEICH	52
5.1.1	MORPHOMETRIE	52
5.1.1.1	Korrelation zwischen OCT und Histologie	53
5.1.2	NEOATHEROSKLEROSE SCORE SYSTEM	54
5.1.3	BLUTWERTE: CHOLESTERIN IM PLASMA	62
5.1.4	BEURTEILUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN PRÄPARATE	65
5.1.4.1	Präparate aus Tierversuchen	65
5.1.4.2	Humane Präparate	67
5.2	DETEKTION DER NEOATHEROSKLEROSE	68
5.2.1	NEOATHEROSKLEROSE GEGEN GESUNDE NEOINTIMA	68
5.3	DIREKTER VERGLEICH DER MITTELWERTE FÜR INDEXA UND INDEXB	70
5.3.1	INDEXA (PEAK INTENSITY)	70
5.3.2	INDEXB (ATTENUATION INDEX)	72
5.4	OCT MESSUNGEN DER KLINISCHEN PATIENTENFÄLLE	75
5.5	LIMITATIONEN	78
5.5.1	NEOVASKULARISATION	78
5.5.2	LIMITATION IM INDEXA (PEAK INTENSITY)	79
5.5.3	LIMITATION IM INDEXB (ATTENUATION INDEX)	83
6	DISKUSSION	86
7	ZUSAMMENFASSUNG	94
8	SUMMARY	96
9	ANHANG	97
9.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
9.2	TABELLENVERZEICHNIS	98
9.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
9.4	LITERATURVERZEICHNIS	100
9.5	IMPLANTATIONSMATRIX DES TIERVERSUCHS	106
9.6	PROTOKOLLE ZUR HERSTELLUNG VON FÄRBE LÖSUNGEN	106
9.6.1	LÖSUNGEN FÜR DIE MOVAT PENTACHROM- FÄRBUNG	106
9.6.1.1	Working Hematoxylin- Lösung	106
9.6.1.2	Natriumthiosulfat	107
9.6.1.3	1% Alzianblau	107
9.6.1.4	Woodstain Scarlet Working Solution	108
9.6.1.5	0,5% Essigsäure	108
9.6.1.6	5% Phosphorwolframsäure	108
9.6.1.7	alkoholische Safran- Lösung	108
9.6.2	LÖSUNGEN FÜR DIE HÄMATOXYLIN- EOSIN- FÄRBUNG	109
9.6.2.1	Eosin Y/Phloxine B Working Solution	109
9.6.2.2	Ammoniumwasser	109
9.7	PROTOKOLL ZUR HERSTELLUNG VON MMA- LÖSUNGEN	110
9.8	PROTOKOLL ZUR HERSTELLUNG VON HAUPT'S ADHÄSIONS REAGENZ	110
10	LEBENS LAUF	111
11	DANKSAGUNG	113

1 Einleitung

Mit der ersten koronaren Angioplastie an einem wachen Menschen in Zürich läutete der deutsche Radiologe Andreas Grüntzig am 16. September 1977 eine neue Ära der Kardiologie ein – die Ära der intravaskulären Intervention. (Gruntzig, 1978) Durch diese Intervention war es nun möglich, mit Hilfe eines entfaltbaren Ballons am Ende eines Drahtes, Engstellen in Gefäßen wieder zu eröffnen.

Eine unerwünschte Reaktion des Gefäßes auf dieses neue Verfahren ist ein erneuter und akuter Lumenverlust des Gefäßes durch dessen elastische Rückstellkräfte, oft nur Minuten nach der Ballondilatation.

Im Frühling 1986 berichteten Ulrich Sigwart (Lausanne) und Jacques Puel (Toulouse) von der ersten Implantation eines Metallgerüsts, welches durch Dilatation eines im Lumen liegenden Ballons fest im Gefäß verankert werden und so den unerwünschten elastischen Rückstellkräften entgegenwirken konnte. Es handelte sich um den ersten Bare Metal Stent (BMS). (Rousseau et al., 1987; Sigwart, Puel, Mirkovitch, Joffre, & Kappenberger, 1987)

Der Reiz, der im Gefäß durch dieses Metallgerüst gesetzt wurde, führte allerdings häufig zu Restenosen, erneuten Wiederverengungen. Ursache für diese Restenosen ist die neointimale Hyperplasie, das überschießende Wachstum der innersten Gefäßwandschicht als Reaktion der Einheilung auf den Fremdkörper, was weiter zu einem erneuten Verschluss oder Teilverschluss des betroffenen Herzkranzgefäßes führt. Die Entwicklung der Drug- Eluting- Stents (DES) - Medikamente freisetzende Stents -, die dieser Proliferation der Neointima entgegenwirken sollten, stellte um die Jahrtausendwende schließlich einen wichtigen Schritt in der Therapie der koronaren Herzkrankheit dar und schien zu aller Erst die Lösung des Problems zu sein. (Morice et al., 2002; Serruys, 2002) Doch bereits im Jahr 2006, in welchem mehr DES implantiert wurden als je zuvor, zeigte sich, dass man die Nebeneffekte der DES unterschätzt hatte. Allein in Amerika wurde in diesem Jahr von über 200.000 erneuten Verschlüssen nach DES- Implantation berichtet. (Lloyd-Jones et al., 2010) Allerdings finden sich markante Unterschiede zwischen den pathologischen Prozessen von BMS und DES. Während die Restenose, wie eben beschrieben, im Mittelpunkt der Komplikationen nach BMS- Implantation stand, handelte es sich bei den

Veränderungen der Gefäßwand nach DES- Implantation um das Gegenteil: Es erfolgt eine stark verzögerte Einheilung, auch als „delayed healing“ bezeichnet. Die Problematik basiert auf der verzögerten Ausbildung eines gesunden und funktionsfähigen Endothels durch die vom Stent freigesetzten Medikamente. (Otsuka et al., 2012) So zeigen sich schwerwiegende Veränderungen der Neointima, wie das Auftreten von Schaumzellen, Kalk und sogar Nekrosen, deutlich früher nach DES-Implantation als nach BMS-Implantation. (Nakazawa et al., 2011) Als Schaumzellen werden solche Fresszellen (Makrophagen) bezeichnet, welche große Mengen an Cholesterin und Lipiden in sich aufnehmen und sich schließlich in der Neointima festsetzen. Sie zählen ebenso wie die Ausbildung von Nekrosen zu den pathologischen Charakteristika der Atherosklerose. Nekrosen und nekrotische Kerne resultieren aus der Apoptose, dem „geplanten“ Zelltod, welcher durch vasoaktive Substanzen indiziert wird. Diese Substanzen werden von Zelltypen, unter anderen Makrophagen, sezerniert, die im Zuge der Atherosklerose in die Intima einwandern. (Libby, 2012) Über die genaue Pathogenese dieser nach Implantation eines DES auftretenden Erkrankung, welche heute als Neoatherosklerose bezeichnet wird, ist derzeit wenig bekannt. Um die Pathogenese der Neoatherosklerose genauer zu verstehen, spielen Tiermodelle eine entscheidende Rolle. Allerdings gab es bis dato kein etabliertes Modell der Neoatherosklerose, weswegen die Etablierung eines solchen unabdingbar ist. Die über Jahrzehnte andauernde Pathogenese der atherosklerotischen Grunderkrankung stellt hierbei eine große Hürde dar. Während die Veränderungen im menschlichen Körper über einen langen Zeitraum schleichend voranschreiten, muss der Kaninchenkörper die Pathogenese wesentlich schneller, innerhalb weniger Wochen bzw. Monate, ertragen.

Um ein geeignetes Tiermodell zu finden und zu etablieren, müssen daher verschiedene Modifikationen eines Tiermodells der Neoatherosklerose histopathologisch evaluiert und mit fundierten Erkenntnissen der Humanpathologie verglichen werden, um eine solide Validierung dieses Tiermodells zu erreichen.

Bis heute existiert keine valide klinische Nachweismethode der neointimalen Gefäßveränderungen. Mit der intrakoronaren Angiographie ist zwar seit langem

ein Diagnostikum für Gefäßverengungen per se verfügbar, jedoch handelt es sich hierbei lediglich um ein quantitatives und nicht um ein qualitatives Verfahren. Das heißt, man kann nicht zwischen neointimaler Hyperplasie ohne weitreichenden pathologischen Wert und Neoatherosklerose unterscheiden. Es handelt sich also lediglich um eine Luminographie, bei der keine Aussage über die Beschaffenheit der Neointima getroffen werden kann.

Mit der Optischen Kohärenztomographie (OCT), einem Verfahren bekannt aus der Augenheilkunde zur Untersuchung des Augenhintergrundes, ist es prinzipiell möglich, verschiedene Qualitäten im Gewebe zu detektieren. Allerdings ist unbekannt, wie die Untersuchungsergebnisse interpretiert werden können.

Wenn es möglich ist, das OCT für den klinischen Gebrauch als intrakoronares, bildgebendes Untersuchungsinstrument zu validieren, so kann frühzeitig eine Therapiestrategie erarbeitet werden, um der zunehmenden pathologischen Veränderung des Gefäßes entgegenzuwirken und so einem erneuten Verschluss der Herzkranzgefäße zuvorzukommen. Diese Validierung ist Ziel dieser Arbeit.

2 Hintergrund

Die Atherosklerose im humanen Koronargefäß stand in den letzten Jahren im Mittelpunkt der Forschung. Sie stellt momentan die führende Todesursache weltweit dar. Besonders deutlich ist die Zunahme in Industrieländern, vor allem aufgrund der steigenden Inzidenz von Adipositas und Diabetes mellitus. 2008 verstarben 17,3 Millionen Menschen weltweit an kardiovaskulären Ereignissen (30% aller Todesfälle). Davon erlagen 7,3 Millionen Menschen einer koronaren Herzerkrankung und 6,2 Millionen einem Schlaganfall. Laut einer Studie der World Health Organization wird diese Zahl bis 2030 auf bis zu 23,3 Millionen Todesfälle pro Jahr steigen. (World Health Organization, 2013)

2.1 Atherosklerose

2.1.1 Definition

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert die Atherosklerose als „variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und dessen Bestandteilen, Bindegewebe und Kalzium- bzw- Kalkablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“. (Bühling, Lepenies, & Witt, 2008)

2.1.2 Pathogenese

Jahrzehntelang war man davon überzeugt, die Atherosklerose wäre nichts anderes als eine Cholesterinspeicherkrankheit, charakterisiert durch vermehrte Einlagerung von Cholesterin und thrombotischem Material in arteriellen Gefäßwänden. Im 21. Jahrhundert wandelte sich diese Überzeugung. Nun steht die Proliferation der glatten Muskelzellen und deren Bildung von Proteoglykanen im Mittelpunkt der Forschung. (Ross & Glomset, 1976a, 1976b) Aktuell geht man allerdings davon aus, dass zu Beginn der atherosklerotischen Pathogenese vor

allem Entzündungsprozesse stehen. Diese Hypothese wird durch die zunehmenden Erkenntnisse über die Funktion der Zytokine als Informationsträger in solchen Prozessen gestützt. Dabei können Risikofaktoren wie Rauchen, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck als Trigger dienen, sind aber für den Anstoß einer Entzündungsreaktion nicht obligat. (Libby, 2012)

Vor allem in Bereichen gestörter Strömungseigenschaften, wie an Bifurkationen und Gefäßkrümmungen, kommt es zu starken Veränderungen und in weiterer Folge zur Bildung von atherosklerotischen Läsionen, unter anderem zu Plaques. Die Atherosklerose entsteht durch Akkumulation von Lipiden in der extrazellulären Matrix, vorwiegend Proteoglykanen, in der Tunica intima. Man geht davon aus, dass Schädigung und Funktionsverlust des Endothels mitursächlich für die Atherosklerose sind. Das intakte Endothel bildet im gesunden Gefäß eine Schutzbarriere, die Lipoproteinen den Eintritt ins Gewebe verwehrt und Verbindungen mit Adhäsionsmolekülen unterbindet. Im Zuge der endothelialen Fehlfunktion zu Beginn der Atherosklerose kommt es allerdings zu erhöhter Permeabilität. Folglich können Lipoproteine, vor allem LDL, in die Intima übertreten, wo diese getrennt von Plasma-Antioxidantien durch Oxidationsprozesse verändert werden. Diese veränderten Lipoproteine modifizieren nun Endothelzellen und glatte Muskelzellen zur vermehrten Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren. (Libby, Ridker, & Maseri, 2002)

Des Weiteren führt eine chronische Hypercholesterinämie zur erhöhten Adhäsionsneigung von Leukozyten am luminalen Endothel, welche nun das vorgeschädigte Endothel passieren können. Schließlich akkumulieren die eingewanderten Leukozyten und bilden verstärkt Rezeptoren für modifizierte Lipoproteine aus (sogenannte Müllschlucker- Rezeptoren). Die so entstandenen Makrophagen phagozytieren Lipide und wandeln sich in Schaumzellen um, welche sich durch ein lipidreiches, schaumiges Zytoplasma auszeichnen und die Intima nicht mehr verlassen können. Diese Vorgänge sind kennzeichnend für die Bildung eines Fettstreifens, auch als „fatty streak“ bezeichnet. Diese potentielle Vorstufe der Plaques werden als Xanthome bezeichnet und sind per se noch nicht gefährlich. Man findet sie manchmal bereits in den Gefäßen Neugeborener, möglicherweise als Ausdruck eines maternalen Risikoprofils. Viele dieser

Xanthome verändern sich nicht weiter. Einige jedoch, vor allem solche an den oben genannten Prädilektionsstellen, zeichnen sich im weiteren Verlauf durch Einlagerung von azellulärem lipidreichen Material in der Intima aus und werden schließlich als atherosklerotische Läsionen bezeichnet. Diese Läsionen treten typischerweise bereits in einem Alter von 20- 30 Jahren auf. Makrophagen, die in den Lipidkern eingewandert sind, setzen Zytokine, wie IL-1 und TNF-alpha frei, die glatte Muskelzellen zur Proliferation und zur Bildung von extrazellulärer Matrix anregen. So wandern glatte Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima ein und umlagern den Kern. Gehen die Makrophagen schließlich zu Grunde, bedeutet dies den Beginn eines nekrotischen Kerns. Dieser zeichnet sich durch eine fehlende Gewebematrix und die Anwesenheit von Hyaluron und Zelltrümmer von Makrophagen und glatten Muskelzellen aus. Man bezeichnet die so entstandenen Strukturen als Fibroatherome. Warum manche atherosklerotische Läsionen einen nekrotischen Kern entwickeln und manche nicht, ist nach wie vor unklar und scheint auch nicht vom Geschlecht des Patienten abzuhängen. Man weiß allerdings, dass in einem Alter von 30 Jahren Männer eher zu atherosklerotischen Läsionen neigen als Frauen. In weiterer Folge kommt es zur Veränderung des Gewebes über dem nekrotischen Kern, also auf der Lumen- zugewandten Seite. Während es sich anfänglich um Intimagewebe handelt, kommt es in einer kontinuierlichen Umwandlung zu kollagenreichem, fibrösem Gewebe und somit zur Bildung einer sogenannten fibrösen Kappe.

Initial kommt es laut dem Model von Glagov durch Remodeling der Gefäßwand nicht zu einer Lumeneinengung sondern zu einer Gefäßerweiterung im Sinne eines Kompensationsmechanismus des Gefäßes auf die atherosklerotischen Veränderungen. Erst ab einer Plaquegröße von 40% oder mehr ist dieser Mechanismus erschöpft und es kommt zur Lumeneinengung. Diese Hypothese erklärt auch, weshalb Frühformen der Atherosklerose in der Herzkatheteruntersuchung oft nicht sichtbar sind. (Hess, 2000)

Die entstandenen Läsionen können nun stabiler Natur sein und somit subklinisch und asymptomatisch für den Patienten verlaufen. Manche führen zu Obstruktionen und somit zum Krankheitsbild der stabilen Angina Pectoris. Plaques können allerdings auch rupturieren und zu einem akuten thrombotischen Verschluss und somit zum Herzinfarkt führen. Ob eine Plaque rupturiert oder nicht, hängt vor allem

von der Dicke seiner fibrösen Kappe ab. So wurde 2014 durch Falk et al. im Zuge einer Autopsiestudie gezeigt, dass die Kappe bei rupturierenden Plaques im Mittel lediglich eine Dicke von 23µm aufweist, 95% aller untersuchten Plaquerupturen gehen aus einer Dicke unter 65µm hervor. Eine Ruptur findet außerdem häufiger in der Randzone der Kappe statt, als im zentralen Segment über dem Kern. (Bentzon, Otsuka, Virmani, & Falk, 2014)

Kommt es zu einer Plaqueruptur, so resultiert diese in einem Teil- oder Kompletverschluss des betroffenen Herzkranzgefäßes. Daraus ergibt sich eine verminderte Durchblutung des Gefäßes und somit eine Unterversorgung des angeschlossenen Myokards. Dieser Vorgang äußert sich schließlich in der Blutuntersuchung durch den Anstieg von Substanzen, die im Zuge des Myokarduntergangs von den Myozyten ausgeschüttet werden. Unter anderem handelt es sich um Troponin, Creatinkinase, Myoglobin und der Laktatdehydrogenase. Im Elektrokardiogramm kann sich der so entstandene Herzinfarkt auch durch eine Hebung der ST- Strecke äussern, weswegen man von einem ST- Strecken- Hebungsinfarkt (STEMI) spricht.

2.1.3 Therapie

Der durch die atherosklerotisch bedingte Verengung der Herzkranzgefäße herbeigeführten Unterversorgung des Herzmuskels kann heute durch eine Vielzahl von Therapien begegnet werden. So unterscheidet man zwischen einem medikamentösen, chirurgischen und interventionellen Vorgehen.

Bei der medikamentösen bzw. konservativen Therapie steht vor allem die Prävention, also die Kontrolle der Risikofaktoren, im Mittelpunkt. Hierzu zählt die adäquate Einstellung des Blutdrucks, die Anpassung etwaiger Dyslipidämien und die kontrollierte medikamentöse Therapie eines allfällig vorhandenen Diabetes Mellitus. Zur konservativen Therapie gehört auch die Anpassung des Lebensstils, vor allem die Gewichtsreduktion bei adipösen Patienten.

Wird die Atherosklerose als koronare Herzkrankheit schließlich symptomatisch, ist eine Revaskularisation durch ein interventionelles oder chirurgisches Vorgehen indiziert. Welches Verfahren schließlich angewendet wird, hängt von verschiedenen Faktoren, wie der Lokalisation und dem Ausmaß der atherosklerotischen Läsion sowie von der gemessenen Herzfunktion und den

Begleiterkrankungen ab. So sollte zum Beispiel bei einer Erkrankung aller dreier Herzkranzgefäße oder des koronaren Hauptstammes, die Indikation zur Bypassoperation gestellt werden. (Windecker et al., 2015)

Doch immer häufiger kann inzwischen auf eine interventionelle Therapie zurückgegriffen werden. Hierbei unterscheidet man zwischen der Ballonangioplastie und der Stent- Implantation.

2.1.3.1 Perkutane Koronarintervention (PCI)

Beim interventionellen Ansatz zur Therapie der koronaren Herzkrankheit wird eine arterielle Schleuse, vorzugsweise in der Arteria radialis oder in der Arteria femoralis, platziert. Schließlich können bei Durchleuchtung mit einem Bildwandler unter anderem koronare Verengungen und die Pumpfunktion des Herzens beurteilt werden. Dies geschieht unter Einspritzung von Kontrastmittel über einen so genannten Pigtail- Katheter. Schließlich werden die Engstellen mit Hilfe eines Führungsdrahtes, welcher zum Schutz der Gefäße mit einem sehr weichen stumpfen Drahtende ausgestattet ist, aufgesucht. Über diesen nun positionierten Draht können in Folge weitere Maßnahmen stattfinden, wie die Ballonangioplastie oder die Implantation eines Stents. (Dietz & Rauch, 2003)

2.1.3.2 Ballonangioplastie

Der in der Ballonangioplastie verwendete Katheter enthält an seiner Spitze einen Ballon, welcher durch das Katheterlumen mit dem anderen Ende des Drahtes verbunden ist und dort vom Behandler durch Einspritzen von Flüssigkeit entfaltet werden kann. Dazu wird er zuerst über den Führungsdraht zur Läsion herangeführt, um schließlich durch vorsichtige Dilatation den Verschluss zu eröffnen. Als Konsequenz erfolgt durch dieses Vorgehen eine Fragmentierung des Thrombus. (Erdmann, 2011)

In vielen Fällen reicht eine alleinige Ballonangioplastie aufgrund der elastischen Rückstellkräfte der Gefäße zur Reperfusion allerdings nicht aus. In diesen Fällen ist die Implantation eines Stents indiziert.

2.1.3.3 Stentimplantation

Ein wichtiges therapeutisches Mittel der Atherosklerose-induzierten Gefäßverengung bzw. des Koronarverschlusses ist die koronare Stentsetzung. (Serruys et al., 1994)

Um einen Stent zu implantieren, wird über den Führungsdraht der Stent- Katheter eingeführt, an dessen Spitze sich das winzige Metallgerüst in noch nicht expandierter Form befindet. Der Katheter wird bis zur Läsion vorgeschoben und der Stent kann mittels Ballondilatation eröffnet werden. Diese künstliche Gefäßstütze wirkt den elastischen Rückstellkräften entgegen.

Nach der Zulassung des ersten Metall-Stents durch die FDA (US-amerikanische Zulassungsbehörde) im Jahr 1994, wurde dieser erfolgreich und millionenfach implantiert. Die Implantation dieser unbeschichteten Metallstents (bare metal stents, BMS) wurde aufgrund der für die damalige Zeit guten klinischen Ergebnisse zum Standard bei der Behandlung von stenosierten koronaren Herzerkrankungen. Trotz der initialen Erfolgsrate der BMS zur Revaskularisation von verengten Koronargefäßen zeigten sich frühe Komplikationen durch vorzeitigen Wiederverschluss des Gefäßes aufgrund von Hyperplasien der Neointima (In-Stent-Restenose). (Fischman et al., 1994) Die Hyperplasie und somit der erneute Gefäßverschluss ist auf die unspezifische Immunreaktion gegen den implantierte Fremdkörper (Stent) zurückzuführen.

Mit der Einführung Medikamenten-beschichteter Stents (drug eluting stents, DES) konnte der langfristige klinische Erfolg durch eine Reduzierung der In-Stent Restenose erheblich verbessert werden. Fortgeführte klinische Studien warnen jedoch vor Gebrauch dieser Implantate mit frühzeitigem Absetzen der gerinnungshemmenden Medikamente. (Camenzind, Steg, & Wijns, 2007; Pfisterer et al., 2006; Stone et al., 2007) Bei Verwendung von zugelassenen DES in komplexen Läsionen wurde angioskopisch und im Falle von Autopsien eindrucksvoll gezeigt, dass diese Stentimplantate über Jahre hinweg im Gefäß freiliegen und durch die verzögerte Einheilung zu einer späten Stent-Thrombose führen können. (Finn, Nakazawa et al., 2007; Joner et al., 2008) Neben dem Grad der Gefäßerkrankung wird auch die Beschichtung des Stents für die unzureichende Einheilung der Implantate verantwortlich gemacht. Die Beschichtung besteht aus bis zu drei Komponenten. Zunächst wird auf das

Metallgerüst des Stents eine Polymerschicht aufgebracht, welche als Trägersubstanz für das als zweite Schicht folgende Medikament dient. Auf diese Medikamenten-Polymer-Mischung folgt in seltenen Fällen eine zweite Beschichtung mit Polymer ohne Medikament als Schutzschicht gegenüber mechanischer Beanspruchung und frühzeitigem Freisetzen des Medikaments während der Intervention. Die Medikamente, wie z.B. Sirolimus und seine Derivate, werden auch in der Tumorthherapie angewendet und besitzen eine starke anti-proliferative Wirkung, die das Wachstum, die Vermehrung und das Einsprossen von glatten Gefäßmuskelzellen verhindert. Des Weiteren besitzen die verwendeten Substanzen eine deutliche antiinflammatorische Wirkung, die einer unspezifischen immunologischen Reaktion des Körpers auf den Fremdkörperreiz entgegenwirkt. Die Histologie aus Tierstudien zeigte, dass in der frühen Phase nach Stentimplantation das Medikament zu einer verzögerten Einheilung, gemessen anhand des Grades der Re-Endothelialisierung des Implantates und dem Bestehen von Fibrinablagerungen führt. (Awata et al., 2007; Nakazawa, Finn, & Virmani, 2007)

2.2 Neoatherosklerose

Unter Neoatherosklerose versteht man die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßablagerungen im Bereich des vormals mittels Stentimplantation behandelten Gefäßabschnittes. Hierbei treten die atherosklerotischen Veränderungen regelmäßig im Bereich der Neointima auf und stehen somit nicht in Verbindung mit der ursprünglichen atherosklerotischen Plaque im Bereich der Media, die zur Stentimplantation geführt hat. (Yahagi et al., 2016) Bereits die Präsenz von Schaumzellen in der Neointima definiert das Auftreten von Neoatherosklerose. Weitere Charakteristika, wie Kalzifizierung, die Bildung von Fibroatheromen oder thrombotischen Rupturen, sind fakultativ. (Nakazawa et al., 2011)

Diese In-Stent neoatherosklerotischen Veränderungen repräsentieren einen progressiven und instabilen Zustand der Erkrankung, welcher eine neue

Gefäßverengung bzw. einen weiteren Gefäßverschluss zur Folge haben kann. (Foley et al., 1995)

Autopsiestudien an einer Population aus Patienten, gestorben an kardiovaskulären und nicht kardiovaskulären Ereignissen zeigten, dass sich nach DES- Implantation weitaus mehr In- Stent Neoatherosklerose zeigt, als nach BMS- Implantation.

Nakazawa et al. verglichen in einer weiteren Autopsiestudie DES mit BMS. Es zeigte sich, dass die Inzidenz von Neoatherosklerose in DES (31%) weitaus höher lag als in BMS (16%). Instabile Läsionen, welche durch ihre Zusammensetzung und Beschaffenheit (siehe Absatz 2.1.2.) ein hohes Rupturrisiko aufweisen, zeigten sich beim DES (1.5 ± 0.4 Jahre) weitaus früher als bei BMS (6.1 ± 1.5 Jahre). Es stellte sich ebenso heraus, dass instabile neoatherosklerotische Veränderungen bereits nach 9 Monaten sichtbar waren, während es nach BMS Implantation frühestens nach 2,5 Jahren zur Ausbildung von instabilen neoatherosklerotischen Veränderungen kam. (Nakazawa et al., 2011) Zudem wurde festgestellt, dass nach DES- Implantation Neoatherosklerose früher auftrat als nach BMS- Implantation.

Neoatherosklerose kann einen erneuten Verschluss des Gefäßes nach Stent-Setzung im Implantat hervorrufen und ist somit eine äußerst ernst zu nehmende Komplikation der Stent- Therapie.

Das frühzeitige Auftreten von Neoatherosklerose, insbesondere nach DES Implantation in Zusammenhang mit der ungeheuer großen Anzahl von weltweit implantierten DES, machen diese Manifestation der Atherosklerose zu einem Krankheitsbild mit potentiell weitreichenden klinischen und sozialen Folgen.

2.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der Neoatherosklerose ist derzeit noch weitgehend unbekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es zwischen der Manifestation von Atherosklerose in nativen Gefäßabschnitten und der Neoatheroskleroseentstehung im Stentbereich deutliche Überlappungen gibt. Die Risikofaktoren der Neoatheroskleroseentstehung sind vermutlich weitgehend überlappend mit denen der Atherosklerose im nativen Koronargefäß. Hierbei spielt vermutlich der erhöhte Cholesterinspiegel im Blut, die Hypercholesterinämie, die größte Rolle. Als wichtiger pathogenetischer Faktor ist

sicherlich die langfristig verzögerte Gefäßheilung zu nennen, welche durch die Dysfunktion des Gefäßendothels nach DES Implantation zu massiv gesteigerter Ablagerung von Fettbestandteilen in die mit Stent versorgte Gefäßwand sorgt. In Folge dessen kommt es zu gesteigerter Entzündungsreaktion mit Monozyteneinwanderung und schließlich zur Ausbildung von Schaumzellen im Bereich der Neointima.

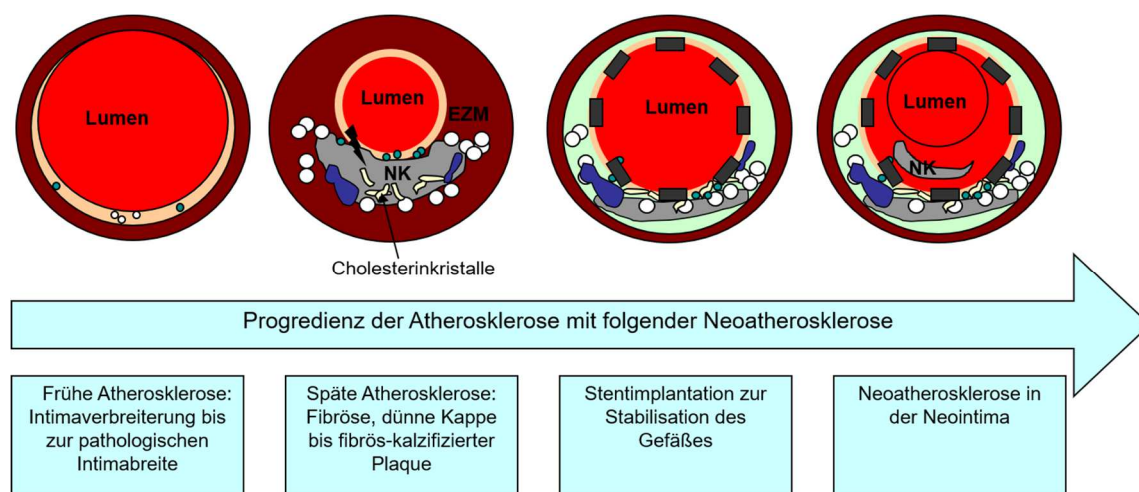


Abbildung 2-1: Histopathologie der Atherosklerose und Neoatherosklerose (EZM= Extrazellulärmatrix; NK= Nekrotischer Kern) (Malle, 2013)

In Abbildung 2-1 wird schematisch der Prozess von der Pathogenese der Atherosklerose bis hin zur Entstehung der Neoatherosklerose dargestellt. Es wird die bereits in Absatz 2.1.2 beschriebene Pathogenese der Atherosklerose gezeigt, beginnend mit einer leichten Intimaverdickung bis hin zur schwereren, pathologischen Intimaproliferation. Dieses Gewebe präsentiert sich reich an Proteoglykanen und glatten Muskelzellen. Es kann aufgelockert erscheinen, jedoch zeigt sich noch keine Gewebsdestruktion. Des Weiteren bilden sich mit fortschreitender später Atherosklerose im geschädigten Gewebe auch Fibrosen, nekrotische Kerne, Schaumzellen und fibrös- kalzifizierte Plaques.

Schließlich, im 3. Bild von links dargestellt, wird das Gefäß durch Implantation eines Stents eröffnet und stabilisiert.

Zu Beginn der Pathogenese der Neoatherosklerose steht schließlich die Bildung von Schaumzellenclustern. Diese befinden sich meist nahe der Stentstreben bzw.

nahe des Lumens. Gehen diese Zellcluster in den programmierten Zelltod, die Apoptose, über kommt es zur Bildung von nekrotischen Kernen. Diese sind häufig in fortgeschrittenen neoatherosklerotischen Läsionen zu finden, allerdings ist deren Vorkommen nicht obligat für die Diagnose der Neoatherosklerose. Das fortschreitende Einwandern von Makrophagen kann schließlich zum Ausdünnen der fibrösen Kappe führen und somit zur Plaqueruptur. Ebenso können das Vorhandensein von Einblutungen in den entstandenen Plaques, sowie Fibrinablagerungen um Stentstreben, als fakultativ für die Pathogenese der Neoatherosklerose angesehen werden. (Yahagi et al., 2016) Im Zuge dieser Prozesse kann es schließlich zur erneuten Stenose des Gefäßabschnittes kommen.

In den Gefäßwänden sind bei fortgeschrittener Neoatherosklerose Cholesterinlücken zu erkennen. Dabei handelt es sich um Ansammlungen von Cholesterinkristallen, welche als Korrelat der Überladung mit LDL anzusehen sind.

2.3 Vergleich zwischen Atherosklerose und Neoatherosklerose

Vergleicht man nun die Pathogenese der Atherosklerose und der Neoatherosklerose, so finden sich neben den vielen Ähnlichkeiten auch markante Unterschiede.

Im Kontrast zu der sich über Jahrzehnte bildenden Atherosklerose findet die der Neoatherosklerose in nur wenigen Monaten bzw. Jahren statt,

Bei beiden Erkrankungen steht die Einlagerung von Schaumzellen in der Intima im Mittelpunkt der Pathogenese.

Dabei sind die für die Atherosklerose typischen einzeln eingestreuten Schaumzellen, auch bekannt als „fatty streaks“, für die Neoatherosklerose eher untypisch. Die Schaumzellen neigen hier zu einer Kumulation als Schaumzellcluster, intimale Xanthome, nahe der Oberfläche (Lumen) oder in Bereichen um bzw. nahe der Stentstreben. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist die Progression dieser Formationen. Während sich atherosklerotische fatty streaks zurückbilden können, werden die neoatherosklerotischen Schaumzellcluster durch den programmierten Zelltod zu nekrotischen Kernen umgewandelt. Die sich aus den fatty streaks bei Progression der Atherosklerose

entwickelnden Lipidkerne können sich auch zu nekrotischen Kernen weiterentwickeln. Diese liegen allerdings im Vergleich zu den in der Neoatherosklerose oberflächlich liegenden nekrotischen Kernen in der Tiefe der Intima und neigen somit seltener zur Ruptur.

Einblutungen in Plaques, am ehesten durch Einwanderung des Blutes aus dem Lumen, als Zeichen einer beginnenden oder drohenden Ruptur, finden sich sowohl bei der Atherosklerose, als auch bei der Neoatherosklerose.

Des Weiteren sind Kalzifikationen in beiden Entitäten zu finden.

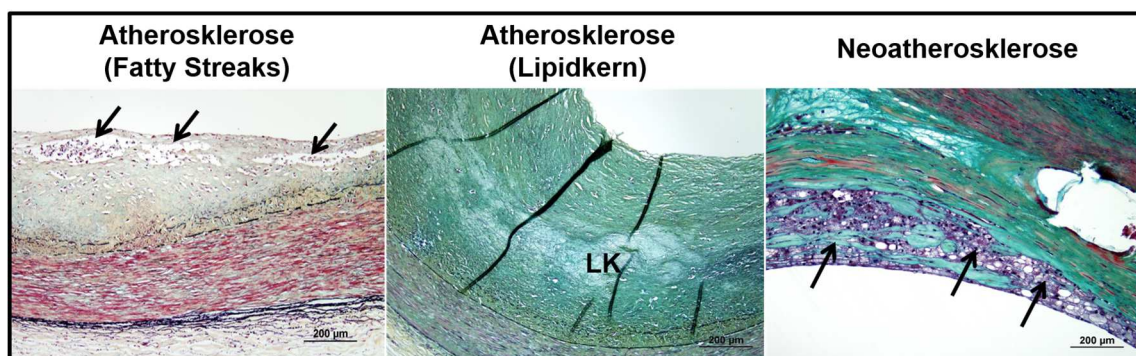


Abbildung 2-2: Vergleich der Atherosklerose mit der Neoatherosklerose (Pfeile: Schaumzellen; LK: Lipidkern)

2.4 Diagnostik der Atherosklerose und Neoatherosklerose

Bis dato stehen hauptsächlich quantitative Methoden wie die Koronarangiographie im Mittelpunkt der Untersuchung von Herzkranzgefäßen im klinischen Setting. Die weitere Differenzierung von Atherosklerose und Neoatherosklerose und das Bestreben kardiovaskuläre Erkrankungen nach Möglichkeit frühzeitig zu erkennen und zu behandeln verlangt die Etablierung neuer qualitativer Diagnostika.

2.4.1 Optische Kohärenztomographie

Im Bereich der kardiovaskulären Bildgebung ist die Optische Kohärenztomographie (OCT) ein innovatives und junges Verfahren, basierend auf Infrarotlicht, mit dessen Hilfe die Arterienwand mit einer Auflösung von 10-

40µm dargestellt werden kann. Des Weiteren können Aussagen über Morphologie und Gewebsbeschaffenheit getroffen werden. Daher eignet sich dieses Verfahren im Besonderen auch für die Diagnostik der Neoatherosklerose. Das hohe Auflösungsvermögen ermöglicht eine Differenzierung von Intima, Media und Adventitia, welches so detailliert bei z.B. dem IVUS (=intravaskulärer Ultraschall) mit einer Auflösung von 150-200µm nie möglich war. (Ponzalo, Serruys, Macaca, & Regar, 2010)

Es hat sich herausgestellt, dass die OCT- Bildgebung ein wichtiges Werkzeug zur Beurteilung und Charakterisierung von Gewebe darstellt. So konnte bereits in einer Studie von Malle et al. gezeigt werden, dass mit Hilfe der OCT zwischen reifer und unreifer Neointima nach Stentimplantation unterschieden werden kann. (Malle et al., 2013) In der im Jahr 2012 erschienenen Kritik von Prati et al. wird über wichtige Einblicke und Beschränkungen der OCT- basierenden Bildgebung für Patienten nach DES- Implantation berichtet. (Prati et al., 2012) Die OCT ist ein nützliches Werkzeug zur Darstellung und Diagnose von Fehlpositionierungen von Stents, welche mit einem erhöhten Risiko für Thrombosen im Stent einhergehen. Ebenso können Dissektionen und andere Interventions-bezogene Komplikationen detektiert werden. Jedoch ist eine der größten Limitationen zum momentanen Zeitpunkt die sichere Differenzierung von gesunder und erkrankter Neointima nach Stentimplantation.

Kang et al. berichten über eine hohe potenzielle Aussagekraft des OCT's in der klinischen Anwendung zur Detektion der Neoatherosklerose im humanen Koronargefäß. Es zeigt sich, dass klare Unterschiede zwischen stabiler und instabiler Angina Pectoris zu finden sind. Jedoch fanden die Untersuchung im Vergleich zum intravaskulären Ultraschall (IVUS) unter Ausschluss histologischer Methoden statt, so dass hier nicht von einer Validierung des Verfahrens gesprochen werden kann, da der IVUS selbst nie eine Validierung erfahren hatte. So betonen sie in ihrer Arbeit die Notwendigkeit eines histologischen Tiermodells. (Kang et al., 2011)

Unter Benutzung der OCT- basierenden Gewebecharakterisierung zur Detektion von Neoatherosklerose erwartet man einen wesentlichen Einfluss auf die klinische Anwendung dieser Technologie.

Betrachtet man nun die weltweite jährliche Implantationsrate von DES (ungefähr 3 Millionen/ Jahr), so zeigt sich hier nicht nur eine große klinische Relevanz, sondern auch ein hoher wirtschaftlicher Einfluss.

2.4.1.1 Technischer Hintergrund der Optischen Kohärenztomographie

Die OCT bildet die intraluminale Silhouette zweidimensional ab und gibt Informationen über die Beschaffenheit der Gefäßwand und möglicher Veränderungen, wie Atherosklerose. Dieses bildgebende Verfahren basiert auf Licht und kann so in vivo intrakoronar angewendet werden. Die niedrig kohärenten, nahezu infraroten Lichtwellen, werden vom Katheter kreisrund ausgesandt, an der Gefäßwand reflektiert, um schließlich von einem Detektor am Katheter wieder aufgenommen zu werden. Aus diesen Daten ergibt sich eine Reihe zweidimensionaler Bilder, welche schließlich, unter anderem mittels Grauwertbestimmung, ausgewertet werden können. (Ponzalo et al., 2010)

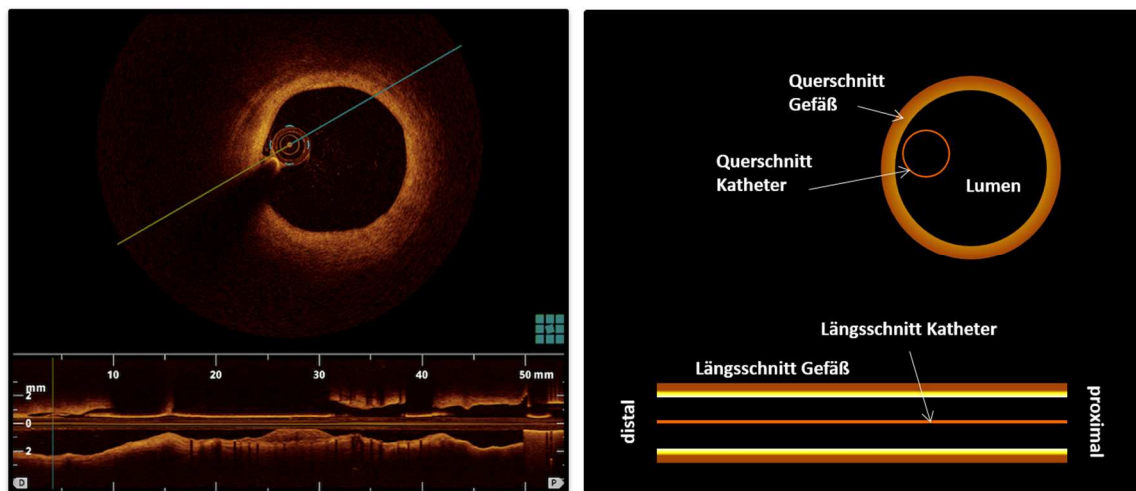


Abbildung 2-3: Bildsequenz im OCT (li.: Aufnahme aus humanem Koronargefäß; re.: Modelldarstellung)

2.4.1.2 Grauwertbestimmung

Die verschiedenen Komponenten, die während der Entstehung und Progredienz der Atherosklerose und Neoatherosklerose in der Gefäßwand zu finden sind, unterscheiden sich maßgeblich durch ihre unterschiedlichen optischen Eigenschaften. Diese ermöglichen eine Differenzierung im OCT. Der vom Katheter

ausgesandte Lichtstrahl wird vom Gewebe reflektiert, gestreut und absorbiert. Die individuelle Absorption hängt von den zellulären und nicht- zellulären Bestandteilen des Gewebes und von der Dichte der durch den Lichtstrahl durchdrungenen Grenzflächen ab. So absorbiert eine atherosklerotische oder auch neoatherosklerotische Läsion (Abbildung 2-4: Vergleich gesunden und kranken Gewebes in Histologie (oben, human) und OCT (unten)) an der Grenzfläche zwischen Lumen und Gefäßwand beispielsweise mehr Licht als gesunde Neointima und führt damit zu einer relativen Abschwächung des Signals hinter dieser Grenzfläche (im Bereich des nekrotischen Kerns). Auf diese Art und Weise lässt sich krankes von gesundem Gewebe differenzieren.

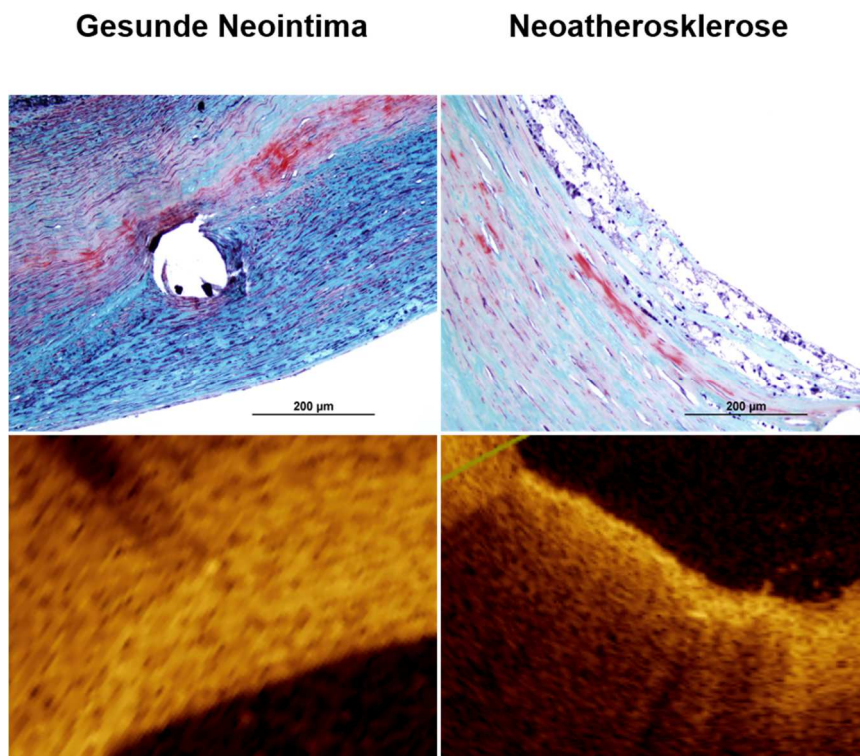


Abbildung 2-4: Vergleich gesunden und kranken Gewebes in Histologie (oben, human) und OCT (unten)

3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel des Forschungsprojektes war die Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der Neoatherosklerose und deren morphologische Charakterisierung mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie als bildgebendes Verfahren. Dazu waren folgende Meilensteine vorgesehen:

1. Etablierung eines Neoatherosklerose- Tiermodells
2. Etablierung von Surrogatparametern mit Hilfe der OCT, welche mittels histologischer Untersuchungen im Tiermodell und humanen Autopsiepräparaten validiert werden sollten
3. Anwendung der validierten Surrogatparameter im klinischen Versuch

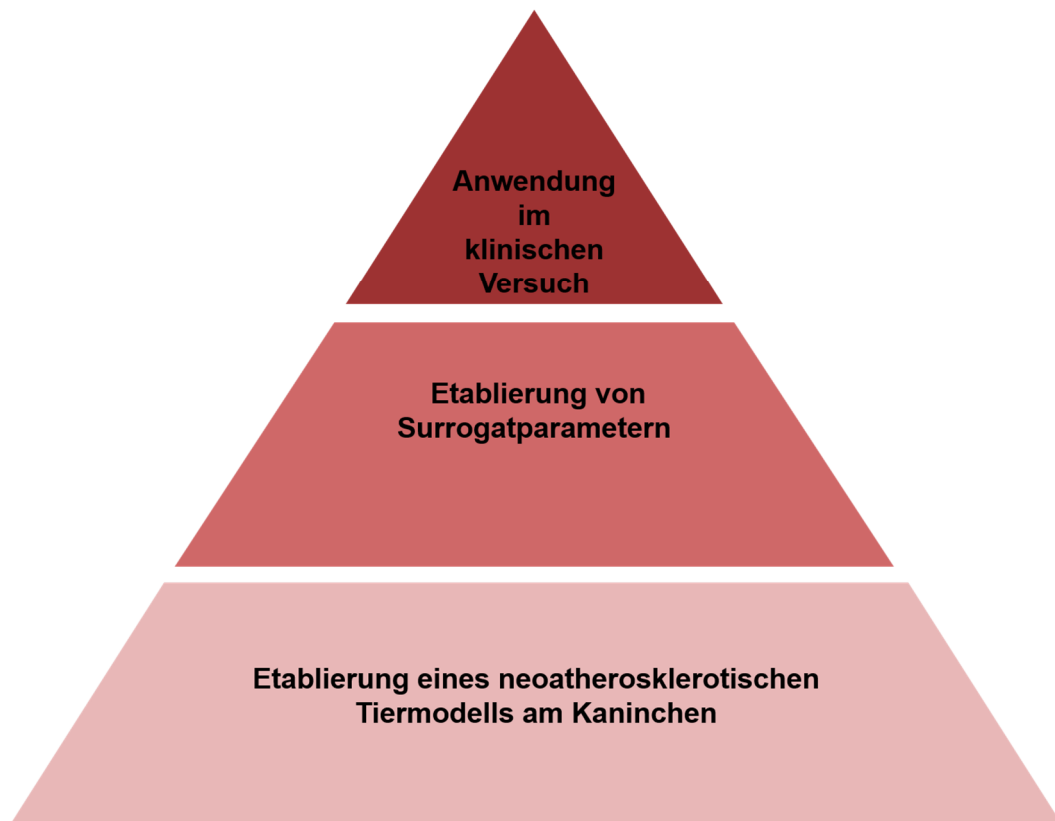


Abbildung 3-1: Meilensteine

Erster und wichtigster Schritt dieser Arbeit war die Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der Pathogenese der Neoatherosklerose. In diesem Tiermodell sollten nun Surrogatparameter im OCT festgelegt werden, mit Hilfe derer eine qualitative Beurteilung des Gewebes, also eine Unterscheidung zwischen

gesundem und erkranktem Gewebe, ermöglicht werden sollte. Dazu musste ein Abgleich zwischen den gesammelten OCT- Daten und dem Goldstandard der Histologie erfolgen. In einem weiteren Schritt wurde nach diesem Verfahren eine Korrelation zwischen humanen Autopsiepräparaten und bildmorphologischer OCT Daten beurteilt. Nach dieser Etablierung erfolgte nun die Validierung der Surrogatparameter anhand der ersten Messung klinischer Daten aus Patientenfällen. Es handelte sich hierbei um Daten aus Follow-Up-Untersuchungen des Deutschen Herzzentrums München. Anhand dieser Messungen sollten die vorher festgelegten Parameter in ihrer Anwendung erprobt und überprüft werden.

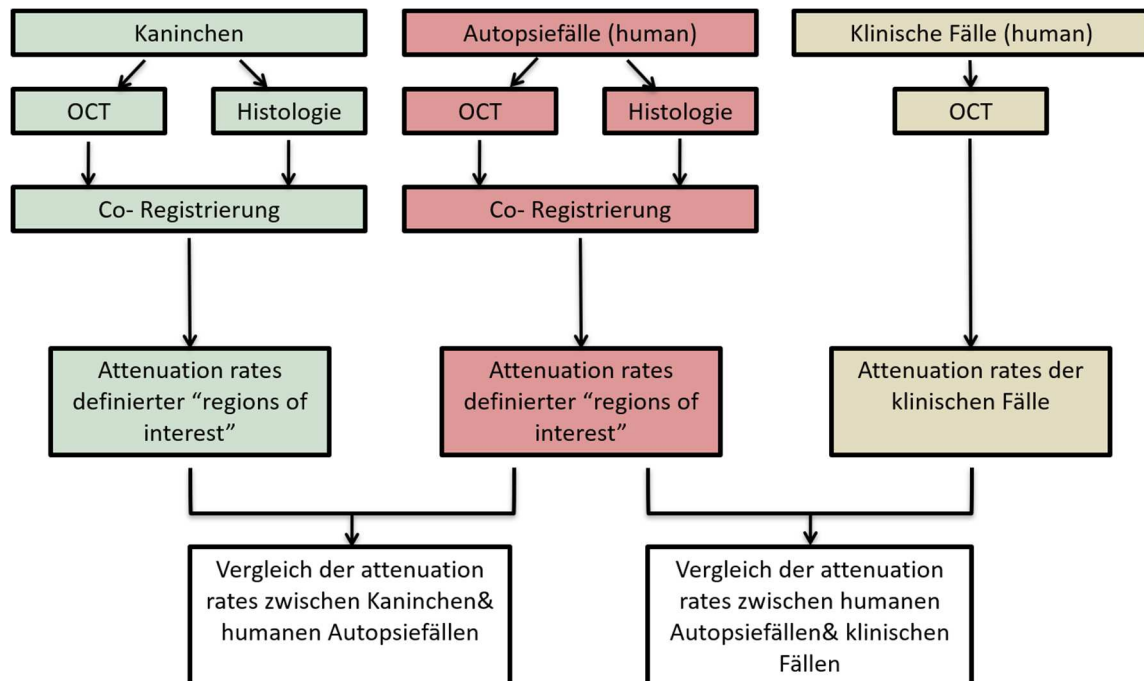


Abbildung 3-2: Forschungsplan

3.1 Notwendigkeit eines neuen Tiermodells für Neoatherosklerose

Die enge Beziehung sowie die Unterschiede zwischen Atherosklerose und Neoatherosklerose wurden in dieser Arbeit bereits erläutert. Maßgeblich für ein Tiermodell zur Erforschung der Neoatherosklerose war nicht, wie bei der

Atherosklerose, die initiale Erkrankung des Gefäßes, die schließlich die Implantation eines Stents notwendig machte. Im Mittelpunkt stand vielmehr die Veränderung und die Reaktion des Gewebes nach Implantation. Dies führte zu einer wesentlich komplexeren Fütterungs- und Implantationsmatrix. In Abbildung 3-2 ist vereinfacht zu sehen wo die wesentlichen Unterschiede lagen. Während ein Tiermodell zur Abbildung der Atherosklerose auf einer Anfütterung mit Cholesterinhaltiger Nahrung basiert, war bei einem Modell der Neoatherosklerose eine initiale Anfütterung mit Cholesterinhaltigem Futter, gefolgt von einer Stentimplantation und einer abschließenden zweiten Anfütterungsphase mit ebenso Cholesterinhaltigem Futter notwendig. Dies bedeutete eine wesentlich höhere Belastung für die Versuchstiere.

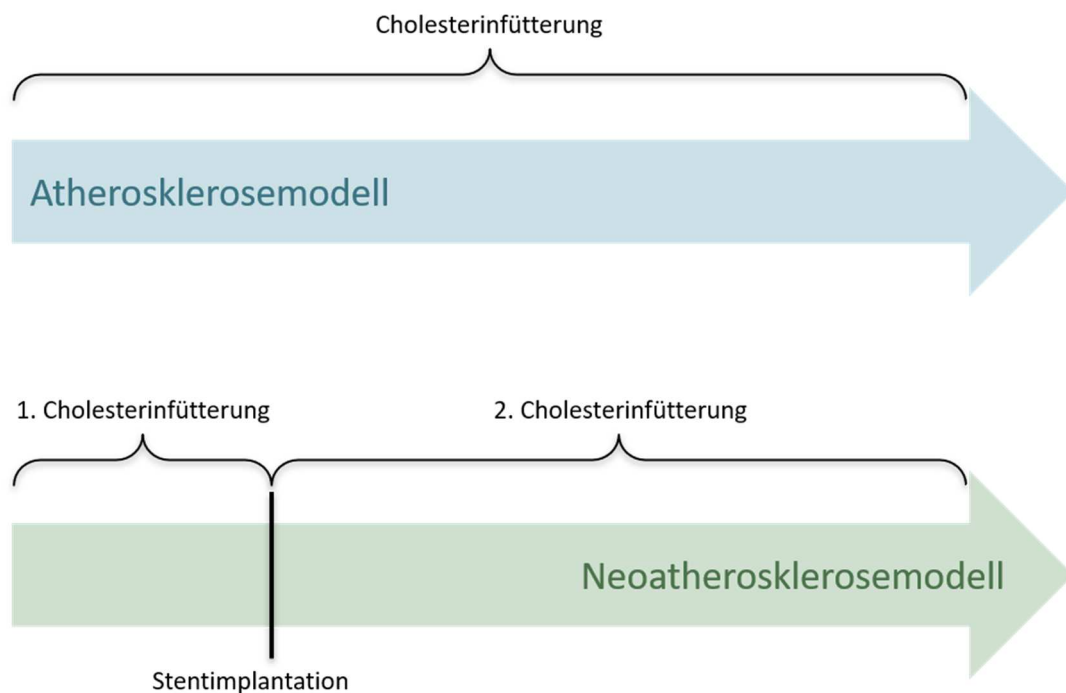


Abbildung 3-3: Vergleich eines atherosklerotischen mit einem neoatherosklerotischen Tiermodell

Schwere Gefäßveränderungen können quantitativ, aber nicht qualitativ mit Hilfe der konventionellen Herzkatheteruntersuchung dargestellt werden. Dementsprechend war die Neoatherosklerose mit herkömmlichen angiographischen Verfahren nicht abbildbar. Um nun die Pathogenese der Neoatherosklerose besser beschreiben zu können, musste ein Weg gefunden werden, mit dem diese in vivo beobachtet und charakterisiert werden konnte. Diese

Methodik war mit dem OCT prinzipiell verfügbar, jedoch wurden noch keine bekannten Surrogatparameter festgelegt, mit Hilfe derer eine qualitative Beurteilung stattfinden konnte. Es war also notwendig, solche Parameter zu finden, durch die im OCT Aussagen über die Beschaffenheit des Gewebes und somit den Fortschritt der Erkrankung zu treffen waren. Es galt Grenzwerte zu finden, durch die festlegbar war, um Gewebe als krank oder gesund zu klassifizieren. Diese konnten durch einen Abgleich der OCT- Bilder mit den entsprechenden histologisch aufgearbeiteten Abschnitten des Gefäßes gewonnen werden. Erst dann konnte im Tiermodell die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung in vivo beobachtet und beurteilt werden. Mit Hilfe der durch das Tiermodell erhaltenen Erkenntnisse konnten schließlich Aussagen über neoatherosklerotische Vorgänge im humanen Koronargefäß getätigt werden.

3.2 Wahl potentieller Surrogatparameter mittels OCT

Die Signalverarbeitung eines auf Infrarotlicht basierenden diagnostischen Mediums ist prinzipiell durch zwei wesentliche Faktoren gekennzeichnet: Die Wellenlänge des Lichtstrahls beim Auftreffen auf die Gewebeschicht sowie die Abschwächung des Lichtstrahls bei seinem Weg durch das Gewebe. In Analogie dazu wurden folgende Faktoren als potentielle Surrogatparameter zur Detektion von Neoatherosklerose bestimmt: Der sogenannte **Index A** sowie der **Index B**, die sich aus einer mathematischen Funktion ergeben, welche die maximale Intensität des Lichtstrahls (peak intensity, Index A) und die Abschwächung des Lichtstrahls (attenuation, Index B) widerspiegeln. Index A und B wurden für jeden beliebigen Gefäßabschnitt ermittelt und konnten somit verwendet werden, um die maximale Intensität und Abschwächung des OCT Lichtes in einem neoatherosklerotischen Gefäßabschnitt mit denen eines gesunden Gefäßabschnittes zu vergleichen.

In Abbildung 4-6 wird der Messungs- und Berechnungsprozess von Index A und Index B dargestellt. Dabei zeigt die unter „B“ dargestellte Funktion die eben beschriebene Intensität des Lichtstrahls, aufgetragen gegen die Distanz. Der abzulesende maximale Intensitätswert wurde als Index A bezeichnet. Die daraus resultierende exponentielle Funktion ergab schließlich den Index B.

So konnten den verschiedenen Gewebebeschaffenheiten bestimmte Werte zugeordnet werden und die Validierung des OCT's mit Hilfe der Histologie erfolgen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Tiermodell

4.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Kaninchen wurden in speziellen Tierhaltungsräumen unter konventionellen Hygienebedingungen gehalten. Der klimatisierte Haltungsbereich hatte eine Raumtemperatur von 18 +/- 2°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-50%. Die Hell/Dunkelphase entsprach 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit mit zwischengeschalteten Dämmerlichtphasen. Die männlichen Tiere (3,5 kg Gewicht) saßen einzeln in Käfigen mit einer Abmessung von 4000 cm² Grundfläche pro Tier. Die Einzelhaltung beugte Bissverletzungen bei Rangordnungskämpfen vor, da die Tiere vor Einstallung bereits geschlechtsreif waren und auch einzeln vom Anbieter verschickt wurden. Es bestand Geruchs-, Sicht- und Hörkontakt. Die Fütterung erfolgte mit Kaninchenfutter in pelletierter Form ad libitum. Eine Nippeltränke (800ml Wasserflasche mit angebrachtem Nippel) mit ungesäuertem Leitungswasser diente als Tränkevorrichtung. Wasserflaschen wurden jeden zweiten Tag gewechselt und gereinigt. Wasser und Futter wurde täglich neu aufgefüllt. Als Beschäftigungsmaterial diente Heu und Nageholz.

4.1.2 Gruppeneinteilung und Cholesterinfütterung

Die insgesamt 15 Kaninchen wurden in 3 Gruppen zu je 5 Kaninchen eingeteilt. Die verschiedenen Gruppen unterschieden sich bezüglich ihrer Cholesterin- Diät, dem Zeitpunkt der Stentimplantation und dem Zeitpunkt der 2. Denudation (Abbildung 4-1).

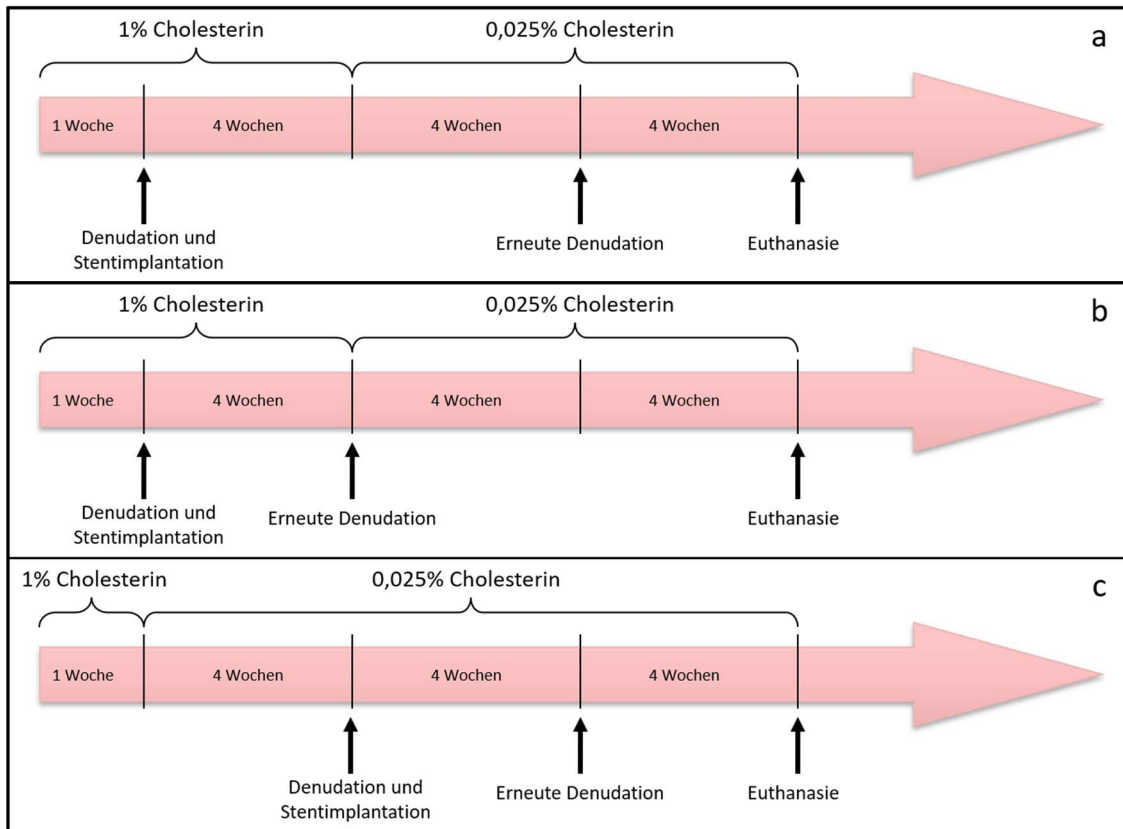


Abbildung 4-1: Tierversuchsgruppen. Die Gruppe 1(a) weist eine sehr späte Denudation auf im Vergleich zur Gruppe 2(b). Die Gruppe 3(c) unterscheidet sich im Wesentlichen durch die bedeutend kürzere 1%-Cholesterin Diät von den anderen beiden Gruppen.

4.1.3 Stentimplantation

Alle Schritte wurden unter Narkose durchgeführt und bedurften daher keiner gesonderten Vorbereitung. Um den Stress der Tiere zu minimieren, wurden sie zur Gewöhnung an die neuen Haltungsbedingungen und an das Pflegepersonal und die versuchsdurchführenden Personen 14 Tage vor Versuchsbeginn eingestallt.

Präoperativ erhielten die Kaninchen zur Schmerzprävention Buprenorphin 0,025 mg/kg KGW s.c. Die Narkoseeinleitung erfolgte über einen Ohrvenenkatheter (22G Braunüle) mit einem Bolus von 1% Propofol. Die Gabe erfolgte nach Wirkung; bei Erlangen der Intubationsfähigkeit wurden die Tiere intubiert und beatmet. Mittels Propofolanästhesie wurde die Narkose weitergeführt. Die chirurgische Toleranz und Analgesie wurde durch zusätzliche kontrollierte Gabe von Fentanyl (0,01 mg/kg KGW) erreicht.

Intraoperativ erhielten die Tiere eine Flüssigkeitssubstitution durch Infusion mit Ringer-Lösung i.v.. Nach Überprüfung der völligen Schmerzfreiheit mittels Zwischenzehenreflex wurde eine ca. 2 cm lange Inzision im Bereich des Halses lateral der Trachea durchgeführt. Die oberflächlichen Halsmuskeln und Faszien wurden stumpf präpariert, um die tiefe Halsmuskulatur zu exponieren. Anschließend wurde die Faszie der tiefen Halsmuskulatur linksseitig der Trachea getrennt und die Arteria carotis communis freipräpariert. Diese wurde vom umgebenden Nervus vagus getrennt und schließlich am proximal und distal präparierten Ende angeschlungen. Die Arteria carotis wurde nun mittels einer Mikrodissektionsschere inzidiert und eine 5 French Schleuse eingebracht. Nach Fixierung der Schleuse wurde die Antikoagulation durch Gabe von Heparin (150 IE/kg) und 40 mg Acetylsalicylsäure (Aspisol) i.v. erreicht. Anschließend wurde ein Swan-Ganz-Katheter (Einschwemmkatheter) eingeführt und in die Aorta vorgeschoben. Über den gleichen Katheter wurde ein initiales Angiogramm erstellt. Nach Entfernen des Swan-Ganz-Katheters wurde ein Gefäßdraht über die Iliakalarterie (Arteria iliaca externa) bis in die Femoralarterie positioniert. Die A. iliaca externa wurde daraufhin mit einem Ballonkatheter (3,0x10mm) denudiert indem der Ballonkatheter zunächst im distalen Anteil platziert wurde und dann im inflatierten Zustand (1 bar unter dem Nominaldruck) nach proximal (kranial) bis in die A. iliaca communis zurückgezogen wurde. Daraufhin wurde der Ballonkatheter im deflatierten Zustand wieder an die distale Ausgangsposition zurückverlagert und die Prozedur unter Nominaldruck wiederholt. Nach der zweimaligen Denudation des ersten Gefäßes wurde die zweite Iliakalarterie auf die selbe Weise behandelt. Nach der Prozedur wurde eine geeignete Lokalisation für die Stentplatzierung bestimmt und der Stent (3,0mm Durchmesser) in die Gefäßwand mit leichter Gefäßwandüberdehnung unter Nominaldruckapplikation expandiert. Beide Iliakalgefäße wurden mit einem Stent behandelt. Abschließend wurde ein finales Angiogramm zum Ausschluss einer Gefäßdissektion oder eines Aneurysmas angefertigt. Nach dem Entfernen der Gefäßschleuse wurde die Arteria carotis permanent ligiert, die Haut vernäht und die Narkoseausleitung durchgeführt.

Die Narkosedauer während Narkoseeinleitung, Stentimplantation und Narkoseausleitung betrug insgesamt 2 Stunden. Die Kaninchen standen bis zu 2 Stunden postoperativ unter Beobachtung und wurden nach Wiedererlangen der Stellreflexe in ihre Käfige zurückgebracht. Für den Tag der Operation war eine

zweimalige postoperative Analgesie mit Buprenorphin (0,025 mg/kg KGW s.c.) im Abstand von 8 Stunden vorgesehen.

Postoperativ und bis zur Euthanasie wurde den Tieren täglich, nach vorsichtiger Fixation des Kopfes am Unterkieferwinkel, 40 mg Acetylsalicylsäure in den Mundwinkel verabreicht.

4.1.4 Denudation

Im zweiten Schritt des Versuchs erfolgte je nach Gruppeneinteilung nach einigen Wochen eine erneute Denudation des Gefäßabschnittes, in welchem zuvor der Stent implantiert wurde. Die Narkoseeinleitung erfolgte wie bereits beschrieben. Durch eine kleine Inzision im lateralen Halsbereich wurde nun die andere A. Carotis freigelegt und, entsprechend dem bereits beschriebenen Vorgehen, mit einer Schleuse versehen. Nun wurde erneut ein Gefäßdraht in der Femoralarterie positioniert. Es erfolgte eine weitere Denudation beider Gefäße entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen. Abschließend wurde ein finales Angiogramm erstellt, um etwaige Dissektionen oder Aneurysmata am Gefäß auszuschließen. Die Gefäßschleuse wurde entfernt, nun auch die zweite A. Carotis permanent ligiert, die Haut vernäht und die Narkose ausgeleitet. Die Ligatur beider Karotiden wurde von den Tieren in der Regel aufgrund ihrer ausgeprägten Kollateralisierung sehr gut vertragen und stellte kein Problem in der Sauerstoffversorgung des Gehirns dar.

Die erneute Denudation war notwendig, um das bereits gebildete Endothel zu verletzen und so, wie bereits beschrieben, die Bildung der Neoatherosklerose zu unterstützen.

4.1.5 Versuchsende

4.1.5.1 Euthanasie

Hierfür wurden die Tiere mit oben beschriebener Prämedikation und Narkosetechnik narkotisiert. Danach erfolgte die Euthanasie der Tiere mit 300mg/Kg KGW Pentobarbital i.v.. Der Zugang erfolgte nun mittels eines ca. 7cm langen Schnitts entlang der Linea Alba. Unter oben beschriebener Methode zur

Kathetersetzung wurde nun über die Bauchorta eine finale Angiographie durchgeführt. Ebenso wurden die OCT- Pullbacks in beiden Gefäßen an dieser Stelle mittels OCT- Katheter (St. Jude) erstellt. Nach Euthanasie des Tieres wurden die Gefäße *in situ* mit 500ml heparinierter Ringerlösung gespült. Die Spülung ermöglichte eine optimale Qualität der Bildgebung, da bei der Erstellung eines OCT-Pullbacks sowohl im Zuge dieses Vorgehens als auch bei der klinischen Anwendung ein so genannter „Flush“, also das Spülen mit einer entsprechenden Flüssigkeit, notwendig war. Während hierzu in diesem Tierversuch Ringerlösung oder NaCl- Lösung zu Hilfe genommen wurde, wird der Flush in der klinischen Anwendung mit Kontrastmedium durchgeführt. Dementsprechend erfolgte auch die Anpassung der Einstellungen bzw. die Kalibrierung der OCT Konsole auf die unterschiedlichen Flüssigkeiten. Im Tiermodell wurden die Gefäße post mortem mit dem OCT abgebildet, nachdem die Zirkulation des Tieres zum Erliegen gekommen war. Aus diesem Grund empfahl es sich, das komplette Blutvolumen gegen Ringerlösung auszutauschen.

4.1.5.2 Gefäßentnahme und Fixierung

Die Gefäße wurden zur histologischen Untersuchung vor Explantation zusätzlich mit 10%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Explantation erfolgte ca. 0,5 cm proximal und distal der gestenteten Gefäßabschnitte. Anschließend wurden die entnommenen Segmente vorsichtig vom umgebenden Gewebe befreit, mit 4%igem Formalin gespült und bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung in 4% Formalin fixiert.

4.1.6 Histologische Aufarbeitung der Proben

Sowohl die Einbettung als auch die Färbungen beruhten auf Protokollen der AG Joner (Deutsches Herzzentrum München), in der diese Doktorarbeit verfasst wurde. Zum Teil wurden diese Protokolle und die Rezepturen der einzelnen Mixturen bereits in einer vorigen Doktorarbeit beschrieben. (Malle, 2013)

4.1.6.1 Dehydrierung und Methylmetacrylat – Einbettung

Nach Fixierung der gestenteten Gefäße für 24 Stunden in 4% gepufferter Formalinlösung wurden die Stentpräparate über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und dann für die Einbettung in Methylmetacrylat vorbereitet.

Vorbereitung - Dehydrierung der Gefäße

4% Formaldehyd (gepuffert)	1 Tag
100% Ethanol	1 Tag
Aceton	1 Tag
Aceton+ 100% Methanol (im Verhältnis 1:1)	1 Tag
100% Methanol	3 Tage

MMA- Einbettung

MMA+ 100% Methanol (im Verhältnis 1:1)	3 Tage
1. MMA- Wechsel	3 Tage
2. MMA- Wechsel*	3 Tage

* beim 2. Wechsel des MMA musste unbedingt darauf geachtet werden, frisch angesetztes MMA zu verwenden. Beim 1. Wechsel konnte MMA verwendet werden, welches bereits in einem vorigen Einbettverfahren zur Verwendung kam.

Tabelle 4-1: MMA- Einbettung nach Milz& Putz (1994)

Es war darauf zu achten, ausschließlich Glasgefäße zur Einbettung in Methylmetacrylat zu verwenden, da dieses dazu neigt, Plastik zu zersetzen. Nach dem 2. MMA- Wechsel wurden die Proben mittels eines Dessikators (PELCO Vakuum Dessikator; Ted Pella Inc., Redding, Californien, USA) für 10min in Vakuum inkubiert, um schließlich in einen Wärmeschrank bei ca. 37°C verbracht zu werden, in dem die Proben in 3-4 Tagen aushärteten.

4.1.6.2 Anfertigung histologischer Schnitte

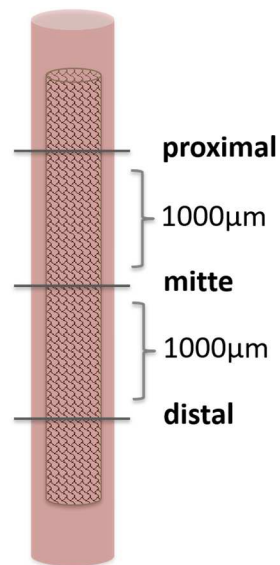


Abbildung 4-2: Schnittebenen im Gefäß

Nach Aushärtung des Methylmetacrylats wurden die Glasformen vorsichtig mit einem Hammer zerschlagen und das MMA wurde von sämtlichen Glasresten gesäubert. Die Proben wurden nun mit Hilfe einer Bandsäge in Blöcke zu 1x3 cm gesägt und auf einer Rundhalterung mittels Cyalonit® Kleber (Typ 201, Bürklin, Oberhaching, Deutschland) aufgeklebt.

Die Anfertigung der pro Schnittebene 5µm dicken Schnittpräparate (3µm Dicke für Schnitte der Immunhistochemie) erfolgte unter Verwendung eines Groß- und Hartschnittmikrotoms (SM2500, Leica Microsystems GmbH) in Verbindung mit einem speziellen Hartmetallmesser (Leica Microsystems GmbH). Der Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen betrug ca. 1000µm. Das Absägen der Zwischenbereiche erfolgte mittels einer Innenlochsäge (Sägemikrotom SP1600, Leica Microsystems GmbH, Nussloch). Pro Stent wurde aus 3 Schnittebenen (Abbildung 4-2: Schnittebenen im Gefäß) je 1 Schnitt pro Färbung angefertigt. Die Schnitte wurden vorsichtig mit 70% Ethanol geglättet, um schließlich mit Haupt's Adhäsions Reagenz (selbst hergestellt) auf dem Objektträger fixiert zu werden. Zur Trocknung ruhten die Schnitte 2-3 Stunden bei 45°C und eine weitere Nacht bei Raumtemperatur, bevor sie gefärbt werden konnten.

4.1.6.3 Färbungen

Die angefertigten Schnitte wurden entplastiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden sie zur Morphometrie nach Movat-Pentachrom und zur Beurteilung der Einheilungsparameter nach Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

4.1.6.3.1 Movat Pentachrom Färbung für MMA- Schnitte

Für die Beurteilung der Morphometrie eignete sich die Movat Pentachrom Färbung am besten. Sie zeichnet sich durch eine farbenprächtige, sehr fein differenzierte Färbung der verschiedenen Komponenten des Gewebes aus. So stellen sich elastische Fasern in einem dunklen Purpur dar. Proteoglykane, wie sie in unreifer Intima zu finden sind, können an der türkis-grünen Farbe identifiziert werden, während Zellkerne blauschwarz, Kollagen in orange bis gelb und die Muskelzellen des Gewebes rot bis dunkelrot erscheinen.

Im Zuge des Färbeprozesses musste zuerst entplastiniert und rehydriert werden. Schließlich folgten etliche Färbeschritte, um die Proben zuletzt wieder zu dehydrieren.

Entplastination und Rehydration

Xylol	Bei Raumtemperatur über Nacht
2- Methoxyethylacetat	30min.
100% Ethanol	2x 10min.
96% Ethanol	2x 10min.
70% Ethanol+ 1% HCl	10x dippen
Waschen in warmen Leitungswasser (37°C)	3min.

Färbung

Alcian Blau*	30min.
Waschen in heißem Leitungswasser (70°C)	3x
Working Hematoxylin- Lösung*	20min.
Waschen in warmen Leitungswasser (37°C)	3x
2% FeCl ₃	30sek.
Waschen in warmen Leitungswasser (37°C)	3x
5% Natriumthiosulfat*	1 min.
Waschen unter laufendem Leitungswasser	1,5min.
Spülen mit Aqua dest.	1x
Woodstain Scarlet Working Solution*	20min
Spülen mit Aqua dest.	5x dippen
0,5% Essigsäure*	10x dippen
5% Phosphorwolframsäure*	5x dippen
Spülen mit Aqua dest.	2x dippen
0,5% Essigsäure*	8sek.
Schnitte abtropfen lassen	
96% Ethanol	1 min.
100% Ethanol	2x 1 min.
Alkoholische Safran- Lösung*	25min.

Dehydration

100% Ethanol	2x je 15x dippen
Xylol	2x je 15x dippen

* Lösungen wurden selbst hergestellt. Die Zusammensetzungen der einzelnen Mixturen sind im Anhang zu finden.

Tabelle 4-2: Movat Pentachrom- Färbung für MMA

4.1.6.3.2 Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbung, kurz HE- Färbung, eignete sich besonders gut zur Darstellung der Einheilungs- und Inflammationsparameter, war aber auch in der Beurteilung von Kalzifikationen der Movat- Pentachrom- Färbung vorzuziehen.

Zellkerne stellen sich dunkelblau dar, während die sie umgebenden Zellbestandteile in verschiedenen Rosa- und Rottönen dargestellt werden. Kalk stellt sich dunkelviolet bis blau dar (Abbildung 4-3: Kalzifikationen in einem nekrotischen Kern (dunkelviolet; siehe Pfeile)).

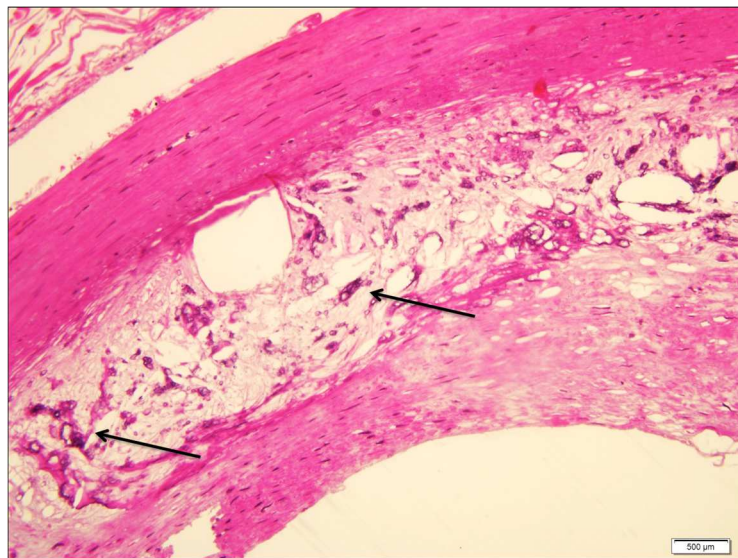


Abbildung 4-3: Kalzifikationen in einem nekrotischen Kern (dunkelviolet; siehe Pfeile)

Entplastinieren und Rehydrieren

Xylol	Bei Raumtemperatur über Nacht
2- Methoxyethylacetat	30min.
100% Ethanol	2x 10min.
96% Ethanol	2x 10min.
70% Ethanol+ 1% HCl	10x dippen
Waschen in warmen Leitungswasser (37°C)	3min.

Färbung	
Mayers Hämatoxylin	36min.
Waschen in heißem Leitungswasser (70°C)	3x
Ammoniumwasser*	15x dippen
Waschen in warmen Leitungswasser (37°C)	4x
Eosin Y/ PhloxineB Working Solution*	3min.

Dehydration	
96% Ethanol	2x je 15x dippen
100% Ethanol	2x je 15x dippen
Xylol	2x je 15x dippen

* Lösungen wurden selbst hergestellt. Die Zusammensetzungen der einzelnen Mixturen sind im Anhang zu finden.

Tabelle 4-3: HE- Färbung für MMA

4.1.6.3.3 Immunhistochemische Färbung

Zur besseren Darstellung der Schaumzellen im erkrankten Gewebe, eignet sich die Immunhistochemie. Basierend auf dem Prinzip der Antigen- Antikörper-Bindung wurde hierbei ein Farbstoff an einen Antikörper gebunden, der spezifisch Makrophagen bindet. Nach dem Auswaschen des überflüssigen Antikörper-Farbstoff-Gemisches und der Gegenfärbung mit Hämatoxylin, präsentierte sich der histologische Schnitt schließlich mit eindeutig von den anderen Zellen zu differenzierenden Makrophagen.

Da sich bei den Makrophagen und ihren Oberflächenproteinen markante Unterschiede zwischen Kaninchen und Mensch ergaben, mussten zwei verschiedene Methoden bzw. Antikörper herangezogen werden. Zur Färbung in humanem Gewebe ist in den folgenden Tabellen daher das CD68- Protokoll angegeben, sowie das RAM11- Protokoll für Kaninchengewebe.

Entplastinieren und Rehydrieren

Xylol	über Nacht
Xylol	2x 30min. bei 45°C
Xylol	4x 5min.
2-Methoxyethylacetat	2x 20min.
Aceton	2x 5min.
100% Ethanol	2x 5min.
90% Ethanol	5min.
70% Ethanol	5min.
Waschen in Aqua dest.	3x 10min.

Färbung

EDTA unter Bedampfung	10min.
Waschen in Aqua dest.	3x 5min.
3% Wasserstoffperoxid	3x 5min.
Waschen in Aqua dest.	3x 5min.
Waschen mit PBS-T (1%)	5min.
Waschen mit frischem PBS-T (1%)	30min.
DAKO- Protein Blocker	10min.
Primärantikörper CD68 (1:400)	Über Nacht bei 2-8°C
Waschen mit PBS-T (1%)	3x 5min.
LSAB- Sekundärantikörper	30min.
Waschen mit PBS-T (1%)	3x 5min.
LSAB Streptavidin HRP	30min.
Waschen mit PBS-T (1%)	2x 5min.
Waschen mit PBS	5min.
Nova Red	4min.
Waschen mit Aqua dest.	3x 2min.
Hämatoxylin	6min.
Waschen mit Aqua dest.	2x 2min.
Waschen mit PBS	2min.
Waschen mit Aqua dest.	3x 2min.

Lufttrocknen

Tabelle 4-4: CD68- immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Makrophagen in humanem Gewebe

Entplastinieren und Rehydrieren

Xylol	über Nacht
Xylol	2x 30min. bei 45°C
Xylol	4x 5min.
2-Methoxyethylacetat	2x 20min.
Aceton	2x 5min.
100% Ethanol	2x 5min.
90% Ethanol	5min.
70% Ethanol	5min.
Waschen in Aqua dest.	3x 10min.

Färbung

Citrat Puffer pH 6,0 unter Bedampfung	20min.
Waschen in Aqua dest.	3x 5min.
3% Wasserstoffperoxid	20min.
Waschen in Aqua dest.	3x 5min.
Waschen mit PBS-T (1%)	5min.
Waschen mit frischem PBS-T (1%)	30min.
DAKO Protein- Blocker	10min.
Primärer Antikörper RAM11 (1:200)	Über Nacht bei 2-8°C
Waschen mit PBS-T (1%)	3x 5min.
Sekundärantikörper Pferd Anti-Maus (1:200)	30min.
Waschen mit PBS-T (1%)	3x 5min.
LSAB Streptavidin HRP	30min.
Waschen mit PBS-T (1%)	2x 5min.
Waschen mit PBS	5min.
Nova Red	4min.
Waschen mit Aqua dest.	3x 5min.
Hämatoxylin	8min.
Waschen mit Aqua dest.	2x 1min.

PBS	2x dippen
Waschen mit Aqua dest.	3x 2min.
Lufttrocknen	

Tabelle 4-5: RAM11- immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Makrophagen im Kaninchengewebe

4.1.7 Histopathologische Auswertung

Die histopathologische Auswertung der Gewebsquerschnitte in diesem Projekt war äußerst vielseitig.

Für die Etablierung des neoatherosklerotischen Kaninchenmodells wurde die Morphometrie (4.1.7.1) und die Beurteilung der Neoatherosklerose und Inflammation (4.1.7.2) im ganzen Querschnitt herangezogen, um die einzelnen Gruppen mit einander zu vergleichen. Für die Validierung des OCTs war hingegen die Beurteilung der einzelnen „Regions of Interest“ hinsichtlich ihrer Gewebscharakterisierung (4.1.7.3) maßgeblich.

4.1.7.1 Morphometrie

Für die morphometrische Auswertung wurden die Movat-Pentachrom-Schnitte mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit integrierter Kamera unter 2- und 20-facher Vergrößerung fotografiert und mittels digitaler Morphometrie (IP Lab, Becton, Dickinson and Company) ausgemessen. Gemessen wurden die Flächen der Lamina elastica externa (EEL), der Lamina elastica interna (IEL) und des Lumens, sowie die Dicke der Neointima über den Struts. Die Fläche der Media errechnete sich aus der Fläche der EEL abzüglich der Fläche der IEL. Die Fläche der Neointima errechnete sich aus der Fläche der IEL abzüglich der Fläche des Lumens. Die prozentuale Stenose errechnete sich aus der Fläche der Neointima dividiert durch die Fläche der IEL mal 100%.

Für die Messung der mittleren Neointimadicke über den einzelnen Stentstreben wurde der Abstand zwischen der Lumen-Grenze und der luminal gerichteten Seite des Stent Struts bestimmt. Die mittlere Gesamt-Neointimadicke ergab sich aus dem Mittelwert der Neointimadicke über den Streben.

4.1.7.2 Neoatherosklerose Score

Bei der Beurteilung der Neoatherosklerose konnte auf kein etabliertes Scoring-System zurückgegriffen werden. Es war notwendig, einen neuen Score zu etablieren. Da sich die Neoatherosklerose im Wesentlichen durch das Vorkommen von Schaumzellen in der Neointima definiert (Nakazawa et al., 2011), sollte sich auch der Score an diesen Zellen orientieren.

Der Neoatherosklerose Score bestand aus mehreren Komponenten. Zusammen betrachtet sollte mit ihm die deskriptive Beurteilung der Progression der Neoatherosklerose möglich sein.

Zur Beurteilung der Neoatherosklerose wurden die Schnitte anhand der Movat-Pentachrom-Färbung unter 2-facher bis 40-facher Vergrößerung hinsichtlich mehrerer Parameter untersucht und der Grad der Neoatherosklerose bestimmt.

Neoatherosklerose Zirkumferenz Score

Keine Neoatherosklerose	Score 0	Keine Schaumzellen in der Zirkumferenz der Neointima
Minimale Neoatherosklerose	Score 1	<25% Schaumzellen in der Zirkumferenz der Neointima
Milde Neoatherosklerose	Score 2	25-50% Schaumzellen in der Zirkumferenz der Neointima
Moderate Neoatherosklerose	Score 3	50-75% Schaumzellen in der Zirkumferenz der Neointima
Massive Neoatherosklerose	Score 4	>75% Schaumzellen in der Zirkumferenz der Neointima

Neoatherosklerose Tiefe Score

Keine Neoatherosklerose	Score 0	Keine Schaumzellen in der Tiefe der Neointima
Minimale Neoatherosklerose	Score 1	<25% Schaumzellen in der Tiefe der Neointima

Milde Neoatherosklerose	Score 2	25-50% Schaumzellen in der Tiefe der Neointima
Moderate Neoatherosklerose	Score 3	50-75% Schaumzellen in der Tiefe der Neointima
Massive Neoatherosklerose	Score 4	>75% Schaumzellen in der Tiefe der Neointima

Tabelle 4-6: Neoatherosklerose Score, bestehend aus zwei Beurteilungen: Die Evaluation der Neoatherosklerose bezogen auf die Zirkumferenz im Gefäß und die der Neoatherosklerose bezogen auf die in die Tiefe (von luminal) reichenden Veränderungen.

Inflammation um Stent Struts

Da es sich bei der Neoatherosklerose, wie auch bei der Atherosklerose, um einen inflammatorischen Prozess handelt, musste auch die Inflammation in die Beurteilung des Gewebes mit einbezogen werden. Hier wurde vor allem das Einwandern von Entzündungszellen in Bereichen nahe der Stent Struts beurteilt.

Inflammation

Keine Inflammation	Score 0	Keine Entzündungszellen um Struts
Milde Inflammation	Score 1	Vereinzelte Entzündungszellen
Moderate Inflammation	Score 2	> 40% Struts von je mindestens 5 Inflammationzellen umgeben
Massive Inflammation	Score 3	> 80% Struts von je mindestens 5 Inflammationzellen umgeben

Tabelle 4-7: Score zur Beurteilung der Inflammation in der Neointima

Weitere histopathologische Faktoren

Neben den augenscheinlichen Merkmalen wie Schaumzellen und Inflammation, geht die Neoatherosklerose auch mit einigen anderen histopathologischen Veränderungen der Neointima einher. Dazu zählen vor allem die Mikrokalzifizierung als Zeichen des Zelluntergangs; das Auftreten von Gewebsschichten verschiedener Qualitäten (gesund, neoatherosklerotisch,

unreif) und Cholesterinkristalle als Indiz für die enge Beziehung zur Atherosklerose. Das Auftreten eines oder mehrerer dieser Merkmale wurde für jeden histologischen Querschnitt berücksichtigt und in die Beurteilung aufgenommen.

Ebenso wurde das Auftreten von Neovaskularisation und Einblutungen in die Neointima berücksichtigt. Diese beiden Faktoren sind als Zeichen der Inflammation im Zuge der Neoatherosklerose zu werten.

Mikrokalzifikation	Score 0	Merkmal nicht ausgeprägt
	Score 1	Merkmal ausgeprägt
Cholesterinkristalle	Score 0	Merkmal nicht ausgeprägt
	Score 1	Merkmal ausgeprägt
Gewebeschichtung	Score 0	Merkmal nicht ausgeprägt
	Score 1	Merkmal ausgeprägt
Einblutung	Score 0	Merkmal nicht ausgeprägt
	Score 1	Merkmal ausgeprägt
Neovaskularisation	Score 0	Merkmal nicht ausgeprägt
	Score 1	Merkmal ausgeprägt

Tabelle 4-8: Histopathologische Begleiterscheinungen der Neoatherosklerose

4.1.7.3 Histologische Charakterisierung der Regions of Interest

Als Regions of Interest werden im wissenschaftlichen Sprachgebrauch Areale bezeichnet, welche aufgrund ihrer Ausprägung oder Lokalisation als Messbereiche herangezogen werden.

Da schließlich jeder einzelnen Messung im OCT (siehe unten) eine passende histologische Beschreibung zugeordnet werden soll, mussten zuerst Gruppen solcher Charaktere definiert werden.

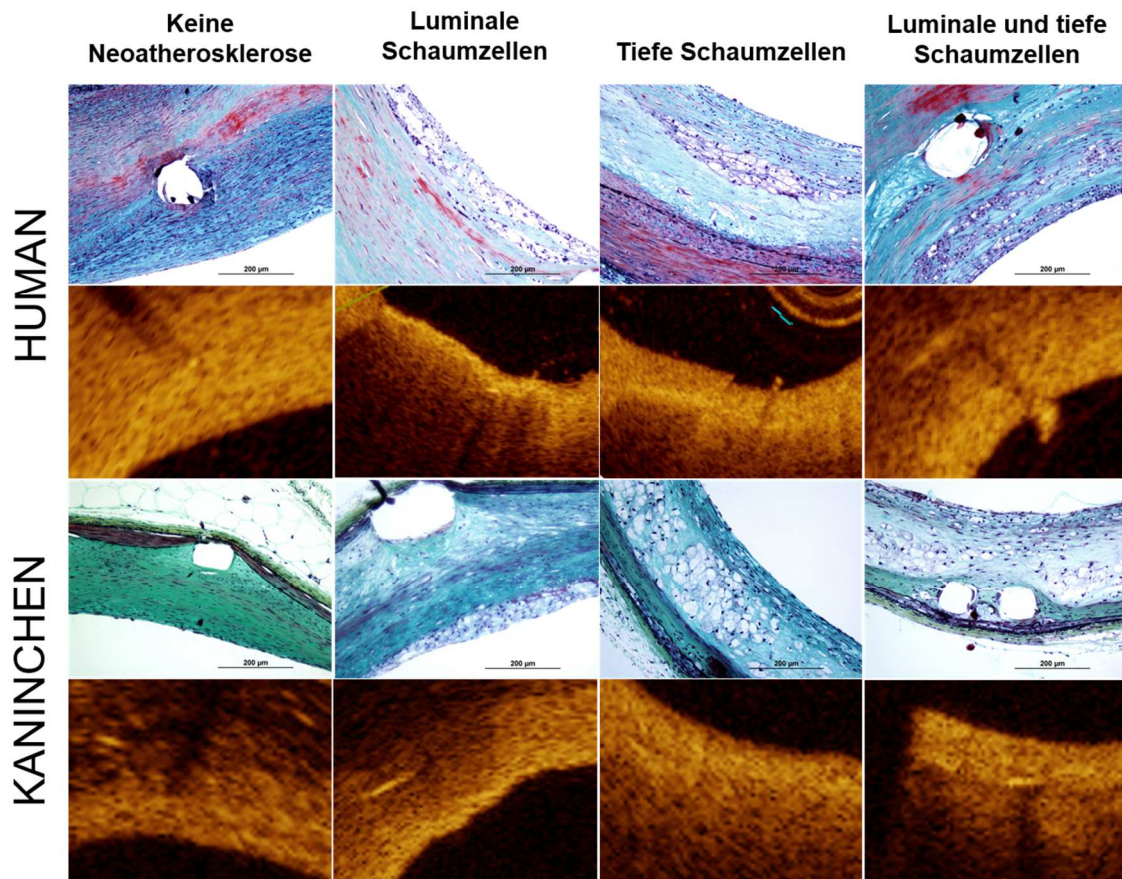


Abbildung 4-4: Gruppeneinteilung der „Regions of Interest“ - Histologie und passende OCT-Areale im Vergleich in Mensch und Kaninchen.

Definiert wurden 4 verschiedene Gruppen (Abbildung 4-4: Gruppeneinteilung der „Regions of Interest“ - Histologie und passende OCT- Areale im Vergleich in Mensch und Kaninchen.), die bei Betrachtung der Histologie deutliche Unterschiede aufwiesen. „Keine Neoatherosklerose“ bedeutet, dass in der beurteilten „Region of Interest“ keine Schaumzellen oder andere Zeichen der Neoatherosklerose (z.B. Kalzifikationen) zu erkennen waren, egal ob sich die Neointima reif oder unreif darstellte. Schließlich wurden 3 verschiedene Gruppen für das Auftreten von Schaumzellen festgelegt:

Die Gruppe der „luminalen Schaumzellen“, welche nur in Bereichen nahe des Lumens auftraten. Dort ließen sie sich häufig gut als Band schaumiger und bläschenartiger Zellen vom Rest des Gewebes abgrenzen. Die Zellen lagen keinem oder einem nicht intakten Endothel nach luminal an.

Die Gruppe der „tiefen Schaumzellen“. Die Schaumzellen lagen in tieferen Gewebsschichten und wurden zum Lumen hin von mindestens drei über einander

liegenden Reihen intakter Zellen, wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Proteoglykanen überlagert.

Die Gruppe der „luminalen und tiefen Schaumzellen“, eine Kombination aus den ersten beiden mit Schaumzellen assoziierten Gruppen. Hier fanden sich sowohl Lumen - nah als auch in der Tiefe der Neointima Ansammlungen von Schaumzellen, die von glatten Muskelzellen umgeben sein konnten.

4.1.8 Korrelation und OCT Auswertung

4.1.8.1 Korrelation

Die Korrelation der OCT- Bilder mit den histologischen Schnitten stellte einen der wichtigsten Schritte dar, denn die Ebenen mussten exakt zusammenpassen.

Die Korrelation wurde mit Hilfe der histologischen Schnitte am Mikroskop und dem Rückzug an der OCT Station durchgeführt. Am OCT Rückzug wurde mit der Suche nach dem zur Histologie passenden Querschnitt begonnen, wenn zumindest $\frac{3}{4}$ der Struts in der Zirkumferenz des Gefäßes abgebildet waren und die Zirkumferenz des Stents komplett nachgezeichnet werden konnte. Ein Strut wurde hierbei als heller Bereich sehr hoher Intensität mit typischen dorsalen Schatten definiert. Schließlich wurde jeder Querschnitt mit der Histologie derselben Sektion (proximal, medial, distal) verglichen. Die Suche orientierte sich nach Abgleich der Distanz im Pullback zum proximalen und distalen Ende des Stents bzw. zur erwarteten Distanz in der Histologie. Außerdem wurden Landmarken, wie Seitenäste und knapp an der untersuchten Arterie liegende andere Gefäße herangezogen. Wenn schließlich ein Frame gefunden wurde, welcher sowohl in der Anzahl und Anordnung der Struts als auch in der Dicke der Neointima mit dem histologischen Querschnitt zusammenpasste (Abbildung 4-5), konnte dieser als überlagerbarer Querschnitt akzeptiert werden.

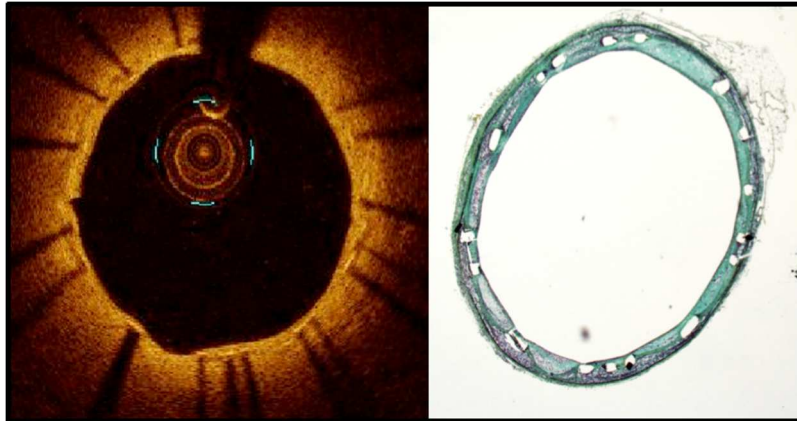


Abbildung 4-5: Beispiel für die korrekte Co-Registrierung von OCT und Histologie

Für die spätere Auswertung war es allerdings wichtig, nicht nur ganze Querschnitte miteinander zu korrelieren, sondern auch wesentlich detaillierter, einzelne „Regions of Interest“. Hierbei handelt es sich um Bereiche in der Gefäßwand, die eine 1:1- Korrelation zwischen Histologie und OCT aufweisen. Bei der Definition ausgewählter „Regions of Interest“ wurde auf die passende Intimadicke und die Stentkonfiguration auch der umliegenden Stents geachtet. Diese Regionen konnten entweder zwischen einem Strut und dem Lumen oder der Strebenfläche, der imaginären Verbindungslinie zwischen zwei Struts, die aufgrund der nicht sichtbaren Lamina elastica interna näherungsweise im OCT herangezogen wurde, und dem Lumen definiert werden. Zu jeder dieser „Regions of Interest“ erfolgte schließlich je eine Messung für den Attenuation Index und die Peak Intensity (4.1.9).

4.1.8.2 OCT Auswertung

Die Parameter der morphometrischen Auswertung der OCT Frames entsprachen weitgehend denen der histologischen Morphometrie. Die zuerst korrelierten Frames wurden schließlich mit Hilfe der LightLab Software (LightLab Imaging, Westford, MA, USA) vermessen.

Gemessen wurde die Fläche des Lumens und, in Annäherung an die Lamina elastica interna, die des Stents, da die IEL im OCT nicht sichtbar war. Ebenso wurde die Distanz von jedem Strut zum Lumen vermessen. Anhand dieser Messungen konnten schließlich die mittlere prozentuelle Stenose (1-

{Lumenfläche/Stentfläche}*100) und die mittlere Fläche der Neointima (Stentfläche-Lumenfläche) berechnet werden.

Zusätzlich wurde mittels einer automatischen Messung der LightLab Software, nach Festlegung der Fläche des Lumens und der des Stents, die mittlere Dicke der Neointima berechnet.

4.1.9 Messung von Attenuation Index und Peak Intensity

Die Analyse des Attenuation Index und der Peak Intensity stellte den Kernpunkt der Detektion von Neoatherosklerose im Koronargefäß mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie dar.

Die Erfassung der Grauwerte erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Um die Grauwerte eines Frames messen zu können, musste dieser allerdings zuerst in ein schwarz-weißes 8-bit Bild umgewandelt werden. Die Kalibrierung des „hellsten“ und des „dunkelsten“ Punktes war nötig, um eine für jedes Bild identische Messspanne zu erhalten. Als Maß des hellsten Bereichs diente hierfür der Katheter, der dunkelste Bereich wurde über das Lumen definiert. Ebenso musste die Distanzmessung über den Durchmesser des Katheters kalibriert werden (Katheter St.Jude Dragon Fly C7; d= 0,9mm).

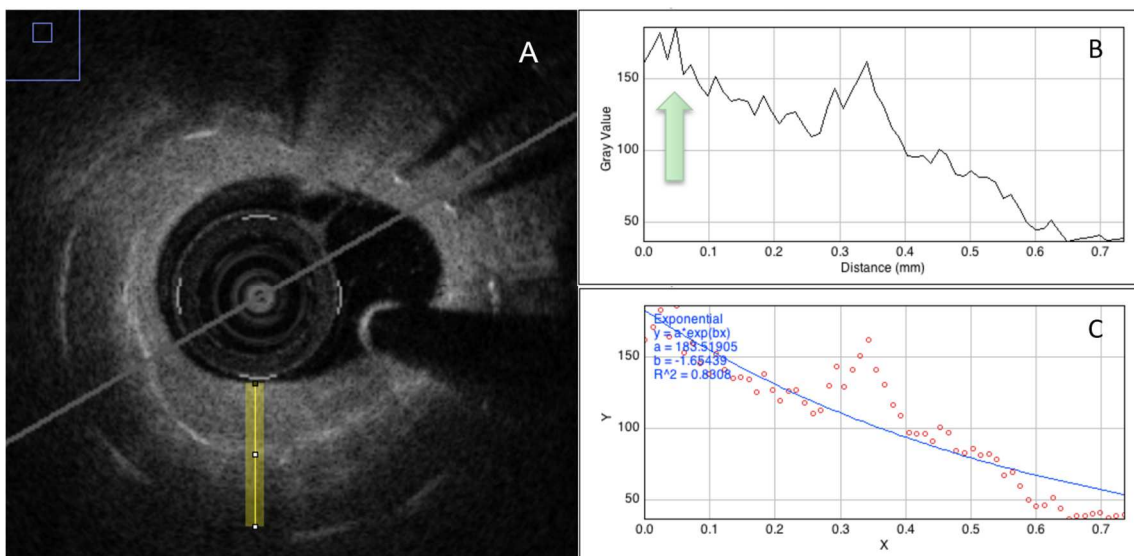


Abbildung 4-6: Messung des Attenuation Index und der Peak Intensity mittels ImageJ. (A: Die Region of Interest ist als gelber Balken zu erkennen; B: Die Peak Intensity ist in diesem Diagramm durch den roten Pfeil markiert; C: Der Attenuation Index ergibt sich aus der exponentiellen Darstellung der Funktion der Grauwerte.)

Schließlich wurden die Regions of Interest einzeln vermessen (Abbildung 4-6). Von luminal bis zum Strut bzw. der Strut area wurde hierzu ein Messbalken aufgezogen. Die Breite des Balkens definierte sich immer über die Kalibrierung des Katheterdurchmessers. Durch diese Kalibrierung ergab sich die Anzahl der Pixel am Bild, die dem Katheterdurchmesser (0,9mm) entsprachen. Um eine einheitliche Größe der Region of Interest wählen zu können, wurde daher immer ein Zehntel des Katheterdurchmessers gewählt, also 0,09mm.

Bsp.: Entsprechen 110 Pixel nach der Kalibrierung dem Durchmesser von 0,9mm, so ergeben sich für die Breite des Balkens 11 Pixel.

Mit Hilfe eines Plot- Profils können nun die Intensitäten der Grauwerte von luminal ausgehend grafisch dargestellt werden (Abbildung 4-6). Bei einem Plot- Profil handelt es sich um die grafische Darstellung der einzelnen Pixelwerte über die Länge der Region of Interest. Aus dieser Kurve lässt sich die Peak Intensity ablesen, der Bereich der Kurve mit der höchsten Intensität. Da die Peak Intensity einem abzulesenden Wert einer berechneten Funktion (x) entspricht, kann für den IndexA keine Einheit angegeben werden. Werden alle Punkte dieser Kurve, daher alle Punkte dieser Messung, schließlich exponentiell aufgetragen, so ergibt dies den Attenuation Index als Steigung dieser Funktion (Abbildung 4-6). Der Attenuation Index wird ebenso, wie die Peak Intensity, ohne Einheit beschrieben.

Die erhaltenen Daten können in der Auswertung schließlich mit dem jeweiligen Gewebetyp in der Region of Interest der histologischen Querschnitte abgeglichen werden.

So sollte sich für beide Charakteristika ein Messbereich ergeben, der das Vorkommen von neoatherosklerotischen Veränderungen in der Neointima detektiert.

4.2 Humane Autopsie Proben

Die humanen Proben stammten aus dem Archiv des pathologischen Instituts CVPath Institute Inc. in Gaithersburg, Maryland, USA. Es handelte sich hierbei um Präparate, die bei CVPath im Zuge der pathologischen Befundung Verstorbener hergestellt wurden und nach Abschluss der Untersuchung zu Forschungszwecken genutzt wurden.

Die Herzen, aus denen die Präparate gewonnen wurden, stammten von Chief Medical Examiner Offices aus Kliniken in Maryland und wurden von CVPath konsiliarisch begutachtet. Die Herzen wurden katalogisiert und durchliefen schließlich eine Reihe von Untersuchungen, darunter Angiographie, Röntgen und OCT, bis sie schließlich von einem auf das Herz spezialisierten Pathologen makroskopisch untersucht, präpariert und zur histologischen Verarbeitung freigegeben wurden. Wie auch die „gestenteten“ Kaninchengefäße wurden die fein präparierten humanen Herzkranzarterien in MMA eingebettet und mittels derselben Verfahren zur weiteren Untersuchung und Forschung geschnitten und gefärbt. Nach der folgenden mikroskopischen Untersuchung des Gewebes wurden die Präparate schließlich für Forschungsprojekte wie dieses, freigegeben. Dementsprechend konnten diese histopathologischen Präparate auch für diese Arbeit herangezogen werden. Es erfolgte auch in diesem Versuchsschritt die Untersuchung der Gefäße mittels OCT, sowie die Korrelation der so erhaltenen Bilder mit der Histologie, nach denselben Prinzipien der Korrelation wie im Kaninchenmodell.

Die so erhaltenen Cut- off- Werte konnten schließlich mit denen aus dem Tiermodell verglichen werden, wodurch eine Validierung derselben möglich war. Hierbei war im Besonderen die unterschiedliche Gewebzusammensetzung von Kaninchen und Menschen zu beachten.

Ausserdem konnten diese Werte zur Untersuchung der in Absatz 4.3 beschriebenen klinischen Fälle herangezogen werden.

4.3 Klinische OCT Daten

Schließlich sollten die an den humanen Autopsieproben ermittelten Cut- off Werte anhand 6 verschiedener Patientenfälle (OCT Pullbacks) aus Follow- Up- Untersuchungen des Deutschen Herzzentrums in München erprobt werden.

Die Fälle wurden hierzu aus dem Restenose- Register des DHZ ausgewählt, wobei folgende Auswahlkriterien berücksichtigt wurden: Bildqualität, Fehlen von Artefakten sowie Vorhandensein verdächtiger Neoatherosklerose- Läsionen. Da bei diesem Schritt in vivo OCT- Rückzüge aus Untersuchungen lebender Patienten herangezogen wurden, konnte keine Auswahl von Messbereichen anhand der histologischen Querschnitte getroffen werden. Die hierfür notwendige Explantation des Koronargefäßes ließ sich mit dem Leben nicht vereinbaren und stand dementsprechend nicht zu Verfügung. Daher war ein striktes Vorgehen zur Definierung von randomisierten Messbereichen notwendig. Es wurden in konstantem Abstand für die distalen, medialen und proximalen Abschnitte je 3 Frames bei 12Uhr, 3Uhr, 6Uhr und 9Uhr vermessen. Die Abstände zwischen den Frames ergaben sich strikt nach Division der Gesamtanzahl der Frames, in denen Stentstreben auszumachen waren, durch 9 (je 3 Frames auf 3 Abschnitten), um eventuelle Selektionsfehler zu vermeiden.

Die Messungen von IndexA und IndexB wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden statistisch analysiert und grafisch dargestellt.

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und Auswertung erfolgte mit der Software JMP[®] (Version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Diagramme zum besseren Verständnis der Daten wurden mit Microsoft Excel (Version 14.1.0, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) erstellt.

Die Ergebnisse der Morphometrie wurden in Mittelwerten und Standardabweichung angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen

wurden zur Analyse der IndexA- und IndexB- Messungen ermittelt. Zur Messung der Korrelation von OCT und Histologie, wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse nach Pearson, der Korrelationskoeffizient r^2 ermittelt.

Der Vergleich der Gruppen im Tiermodell anhand der beiden Schaumzellen-Scores und des Inflammations- Scores erfolgte statistisch mit Hilfe der Wilcoxon Methode, bei der nichtparametrische Vergleiche der Paare erstellt wurden. Die Analyse der nominal verteilten Scores (Mikrokalzifikation, Cholesterinkristalle, Gewebeschichtung, Neovaskularisation, Einblutung) erfolgte mit der Kontingenzanalyse nach Fisher. Die Auswertung der humanen Daten hinsichtlich der Neoatherosklerose- Scores erfolgte durch eine simple Analyse der Verteilung zur deskriptiven Darstellung der Ergebnisse.

Des Weiteren wurden die Mittelwerte von IndexA und IndexB mittels der Methode der kleinsten Quadrate und Tukeys HSD (Honestly Significant Difference) auf deren Signifikanz getestet. Um schließlich eine Aussage über die Qualität des OCTs bei der Detektion von Neoatherosklerose allgemein und der Unterscheidung einzelner Ausprägungsgrade innerhalb der Neoatherosklerose machen zu können wurden mit Hilfe der Receiver- Operating- Characteristic (ROC) die Sensitivität und Spezifität bzw. deren Cut-Off- Werte ermittelt.

Zur Beurteilung der Limitation durch Neovaskularisation im gesunden Gewebe erfolgte unter deren Berücksichtigung ein Vergleich der Subgruppen. So wurden die vier verschiedenen Gruppen der Ausprägungsgrade als Subgruppen mit, bzw. ohne Neovaskularisation verglichen. Dieser Vergleich fand ebenso mit der Methode der kleinsten Quadrate und Tukeys HSD- Test statt.

5 Ergebnisse

Auf den folgenden Seiten finden sich die Ergebnisse der Studie, beginnend mit dem Vergleich der drei verschiedenen Tiermodelle, gefolgt von den Ergebnissen der Detektion der Neoatherosklerose mittels IndexA und IndexB. Von den zu Anfang 15 in die Studie eingeschlossenen Tieren verstarben 2 frühzeitig im Tierversuch und wurden somit aus den Analysen ausgeschlossen.

5.1 Neoatherosklerotische Tiermodelle im Vergleich

5.1.1 Morphometrie

Im Folgenden finden sich sowohl die Analysen zur Morphometrie in Histologie und OCT aus Mensch und Kaninchen als auch die Regressionsanalyse nach Pearson zur Kontrolle der Korrelation zwischen OCT und Histologie.

Histologie	Lumen Fläche (mm ²)		EEL Fläche (mm ²)		IEL Fläche (mm ²)		Neointima Dicke (mm)		Neointima Fläche (mm ²)		Media Fläche (mm ²)		Stenose (%)	
	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.
Gruppe 1	5,22	1,36	7,43	1,31	7,02	1,32	0,13	0,08	1,80	0,54	0,41	0,17	25,76	8,39
Gruppe 2	4,96	0,94	6,78	0,96	6,46	0,86	0,14	0,08	1,50	0,41	0,32	0,13	24,69	7,70
Gruppe 3	5,40	0,72	6,63	0,41	6,37	0,43	0,07	0,06	0,97	0,33	0,26	0,06	15,69	6,58

OCT	Lumen Fläche (mm ²)		Lumen Diameter (mm)		Stent Fläche (mm ²)		Stent Diameter (mm)		Dicke der Neointima (mm)		Neointima Fläche (mm ²)		Stenose Fläche (mm ²)		Stenose (%)	
	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.	Mittelwert	Std. abw.
Gruppe 1	5,11	0,85	2,56	0,25	6,12	0,57	2,78	0,12	0,11	0,07	1,00	0,45	0,17	0,08	17,11	8,06
Gruppe 2	5,02	0,76	2,52	0,20	5,84	0,50	2,72	0,12	0,11	0,05	0,83	0,40	0,15	0,08	14,90	7,69
Gruppe 3	5,41	0,93	2,61	0,24	5,94	0,56	2,75	0,13	0,07	0,06	0,53	0,47	0,09	0,09	9,49	9,21

Tabelle 5-1: Morphometrie der Präparate aus Kaninchen in OCT und Histologie

Histologie	Lumen Fläche (mm ²)		EEL Fläche (mm ²)		IEL Fläche (mm ²)		Neointima Dicke (mm)		Neointima Fläche (mm ²)		Media Fläche (mm ²)		Stenose (%)	
	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.
	5,60	2,69	15,86	6,65	13,55	5,96	0,38	0,55	7,94	4,43	2,32	0,78	58,64	14,80

OCT	Lumen Fläche (mm ²)		Lumen Diameter (mm)		Stent Fläche (mm ²)		Stent Diameter (mm)		Dicke der Neointima (mm)		Neointima Fläche (mm ²)		Stenose Fläche (mm ²)		Stenose (%)	
	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.	Mittel-wert	Std. abw.
	5,60	2,93	2,54	0,78	8,26	2,76	3,19	0,55	0,33	0,16	2,66	0,89	0,37	0,20	36,79	20,22

Tabelle 5-2: Morphometrie der humanen Präparate in OCT und Histologie

Die morphologische Auswertung der humanen Präparate zeigt im Vergleich zu den präklinischen Präparaten eine ausgeprägte prozentuelle Stenose, sowohl in der Histologie als auch in der OCT. Zu beachten ist aber der in beiden Versuchsgruppen vorzufindende Unterschied der prozentualen Stenose zwischen der Histologie und der OCT. Dies ist am ehesten auf die Schrumpfung der Präparate während des Einbettungs-, Schneide- und Färbeprozesses zurückzuführen.

Im Vergleich der drei Kaninchengruppen zeigt sich das stärkste neointimale Wachstum in Gruppe 2 (Histologie) bzw. Gruppe 1 (OCT).

5.1.1.1 Korrelation zwischen OCT und Histologie

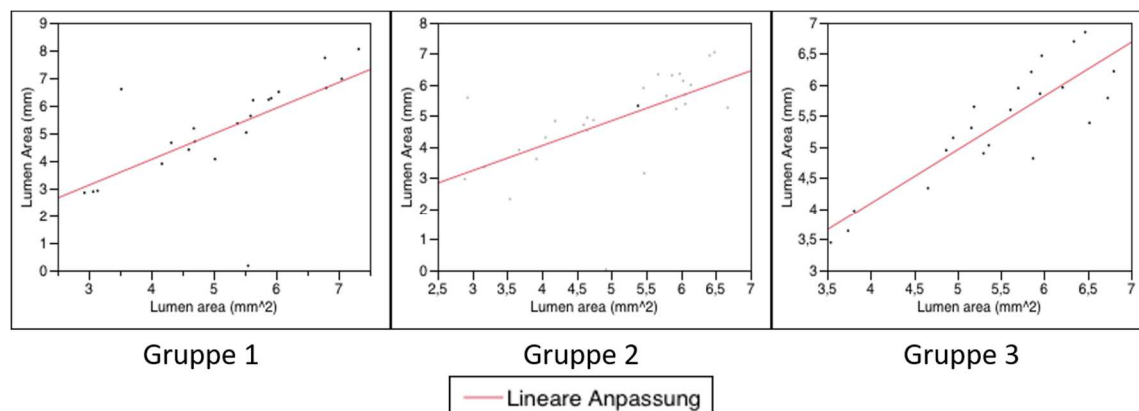


Abbildung 5-1: Regressionsanalyse der 3 Gruppen im Tiermodell. Details siehe Tabelle 5-3

Die Regressionsanalyse nach Pearson zeigt, dass Gruppe 3 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,7562 die beste Korrelation zwischen OCT und Histologie innerhalb der 3 definierten Gruppen aufweist. Gruppe 3 weist entsprechend der Morphometrie in Tabelle 5-1 allerdings auch die geringste neointimale Dicke und wie unter 5.1.2 weiter ausgeführt auch die wenigsten Anzeichen einer Neoatherosklerose auf.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Korrelationskoeffizient r^2	0,4156	0,3531	0,7562

Tabelle 5-3: Korrelationskoeffizient der 3 Gruppen im Tiermodell

5.1.2 Neoatherosklerose Score System

Die Beurteilung der in Absatz 4.1.2 aufgeführten drei Tiermodelle, mit Hilfe der beschriebenen Scores ergibt im Wesentlichen ein einheitliches Bild. Gruppe 1 zeigt nahezu lückenlos die höchsten Ergebnisse in den verschiedenen Scores.

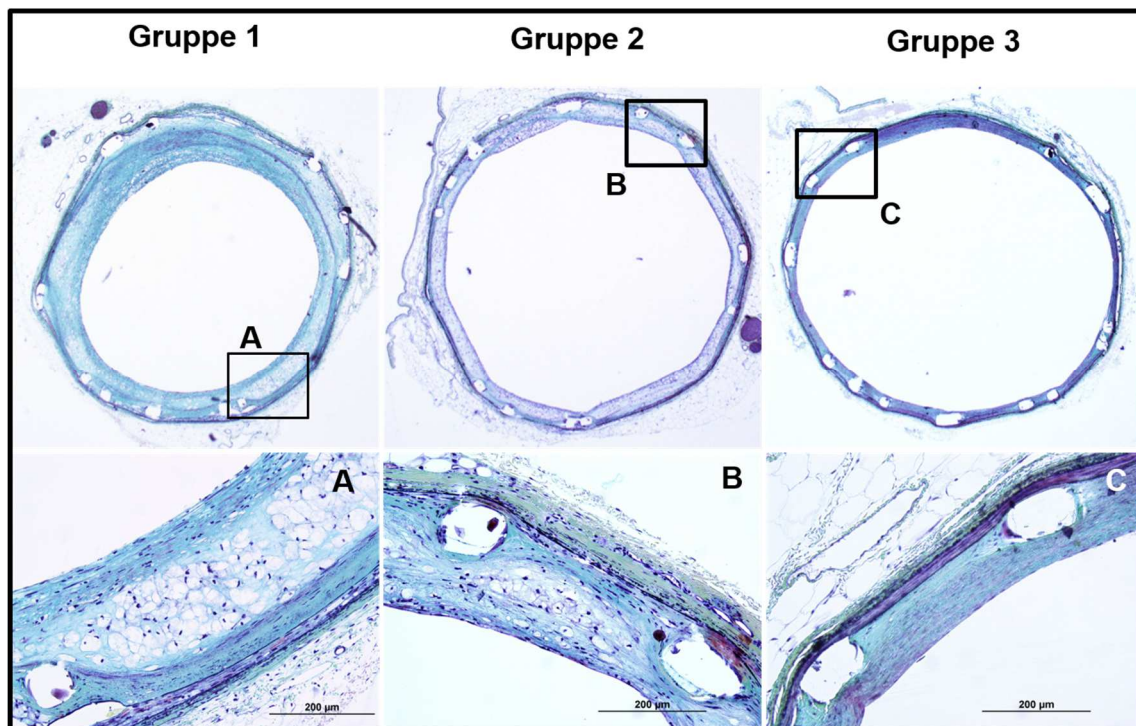


Abbildung 5-2: Repräsentative histologische Gefäßquerschnitte der drei Tiermodelle im Vergleich

In Abbildung 5-2 sind drei Gefäßquerschnitte, repräsentativ für die drei Versuchsgruppen, mit je einer Vergrößerungsaufnahme zu sehen. Schon anhand dieser Bilder lassen sich die nachfolgenden Ergebnisse zusammenfassen. Gruppe 1 weist die meisten Schaumzellen in der Neointima auf, während Gruppe 2 die Neoatherosklerose schwächer abbildet und Gruppe 3 überwiegend eine gesunde Neointima ausgebildet hat, nahezu frei von Neoatherosklerose. In Abbildungen 5-3 bis 5-5 werden zur Darstellung der nicht parametrischen Daten Box Plots zur Hilfe genommen.

Beurteilung der Neoatherosklerose in der Zirkumferenz

Es findet sich bei der zirkumferentiellen Beurteilung der Schaumzellen ein signifikantes Ergebnis ($p= 0,002$). Gruppe 1 weist in der Zirkumferenz die meiste Neoatherosklerose auf.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Median	2,83	1,33	0
25%	0,75	0,25	0
75%	3,92	3,50	0
p- Wert			0,002

Tabelle 5-4: Ergebnisse des Scores „Schaumzellen in der Zirkumferenz des Gefäßes“

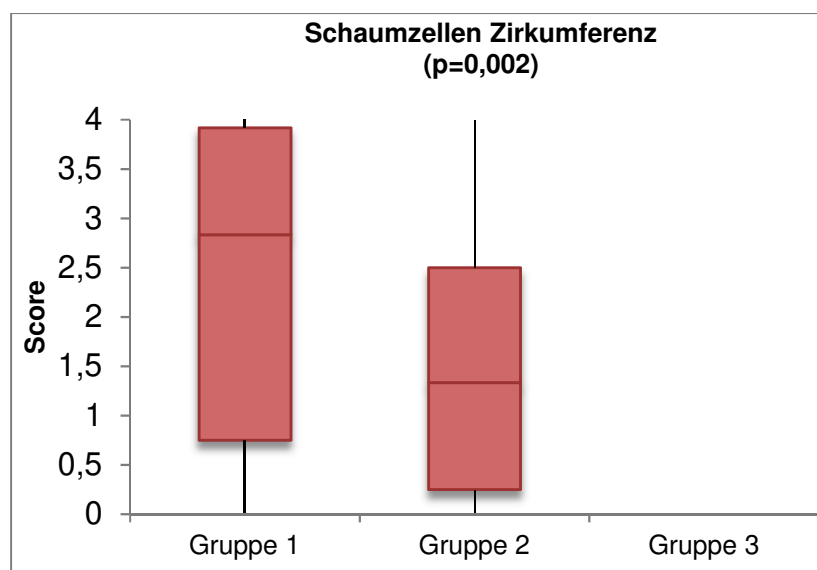


Abbildung 5-3: Boxplot Grafik zur Tabelle 5-4

Beurteilung der Neoatherosklerose in der Tiefe

Tabelle 5-5 und Abbildung 5-4 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Beurteilung von Schaumzellen in der Tiefe der Neointima (vom Lumen bis zur Lamina elastica interna). Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p= 0,0012$) zwischen den einzelnen Gruppen. Die meiste Neoatherosklerose kann auch hier in der Gruppe 1 ausgemacht werden.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Median	2,66	0,83	0
25%	1,25	0,25	0
75%	3,58	1,66	0
p- Wert			0,001

Tabelle 5-5: Ergebnisse des Scores „Schaumzellen in der Tiefe des Gefäßes“

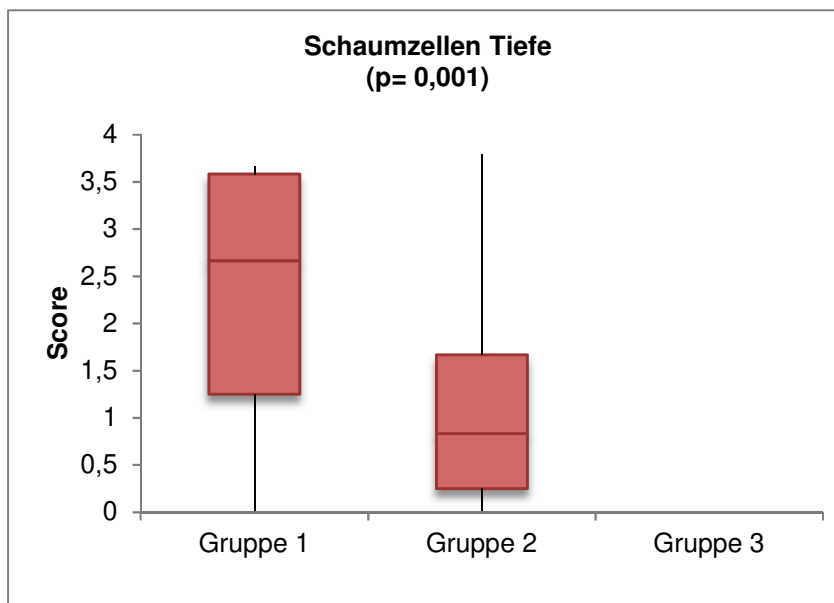


Abbildung 5-4: Boxplot Grafik zur Tabelle 5-5

Beurteilung der Inflammation um die Stent Struts

Wie schon bei der Beurteilung der Schaumzellen, zeichnet sich auch in der Evaluation der Inflammation um die Stent Struts die Gruppe 1 mit dem höchsten Score aus. Die Ergebnisse sind auch hier signifikant ($p= 0,001$).

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Median	1,66	0,5	0
25%	0,75	0	0
75%	1,66	1,08	0,33
p- Wert	0,001		

Tabelle 5-6: Ergebnisse des Scores zur Beurteilung der Inflammation

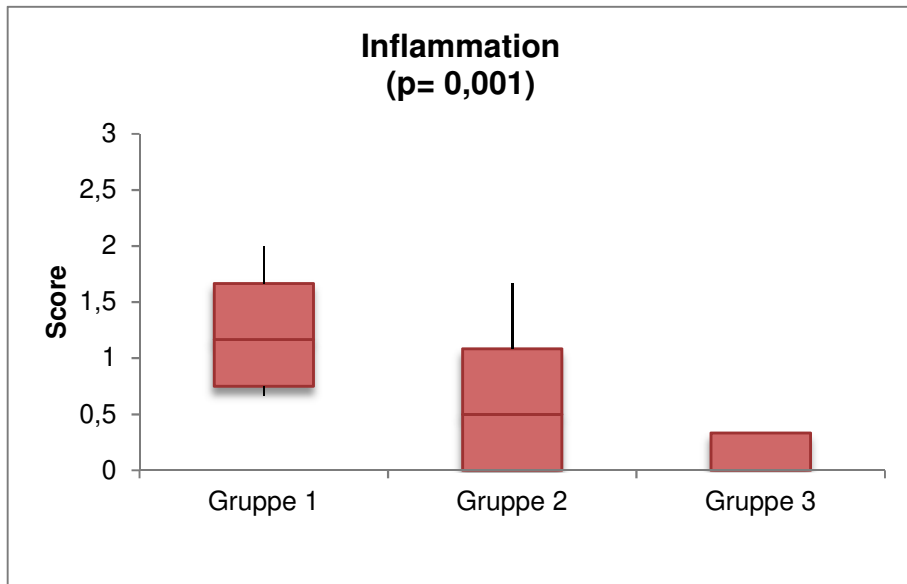


Abbildung 5-5: Boxplot Grafik zur Tabelle 5-6

Beurteilung der neoatherosklerotischen Begleiterscheinungen

Die vielfältigen neoatherosklerotischen Begleiterscheinungen, die bei der Auswertung gefunden werden konnten, werden in Abbildung 5-6 abgebildet.

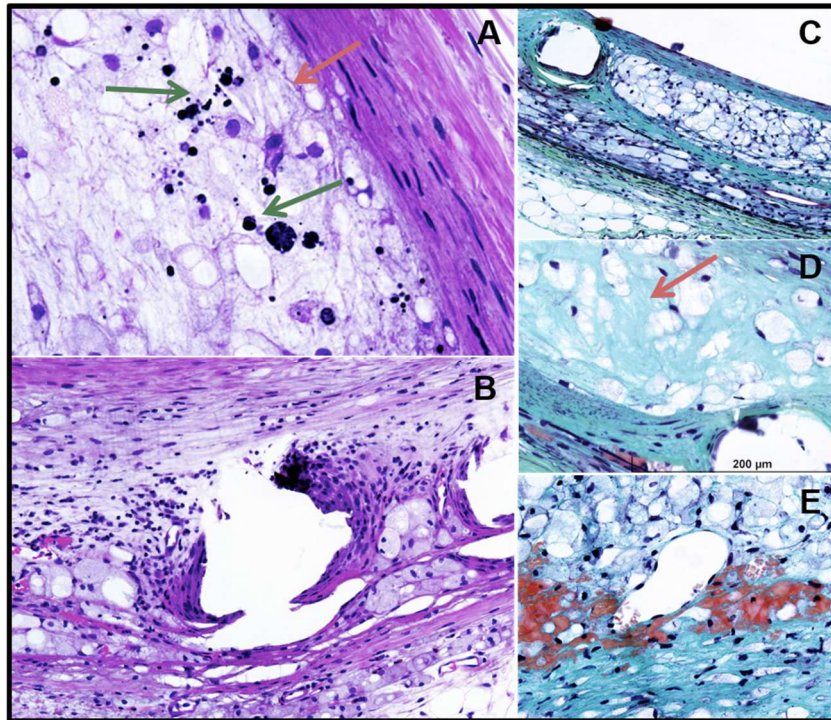


Abbildung 5-6: Verschiedene Auffälligkeiten in der Histologie, typisch für die Neoatherosklerose. Links: HE- Färbung mit Mikrokalzifikationen (A – grüne Pfeile) und Inflammation um den Stent- Strut (B). Rechts: Movat Pentachrom- Färbung mit neoatherosklerotischer Schichtung (C), Cholesterinkristallen (A,D - durch rote Pfeile gekennzeichnet) und Neovaskularisation mit Einblutungen (E).

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass in der Beurteilung dieser pathologischen Veränderungen die Gruppe 1 hinsichtlich des Auftretens von Cholesterinkristallen und Gewebeschichtung dominant ist, jedoch können Mikrokalzifikationen, Einblutungen und Neovaskularisation vermehrt in Gruppe 2 gefunden werden. Gruppe 3 weist lediglich einige wenige Mikrokalzifikationen auf.

	Gruppe 1 (n= 24)			Gruppe 2 (n= 30)			Gruppe 3 (n= 24)		
	0	1	1 (%)	0	1	1 (%)	0	1	1 (%)
Mikrokalzifikation	20	4	16,67%	24	6	20%	19	5	19,23%
Cholesterinkristalle	16	8	33,33%	26	4	13,33%	24	0	15,38%
Gewebeschichtung	5	19	79,17%	19	11	36,67%	24	0	0%
Einblutung	21	3	12,50%	24	6	66,67%	24	0	0%
Neovaskularisation	17	7	29,17%	18	12	40%	24	0	0%

0= nicht vorhanden; 1= vorhanden

Tabelle 5-7: Beurteilung der Begleiterscheinungen der Neoatherosklerose (0= Merkmal vorhanden; 1= Merkmal nicht vorhanden)

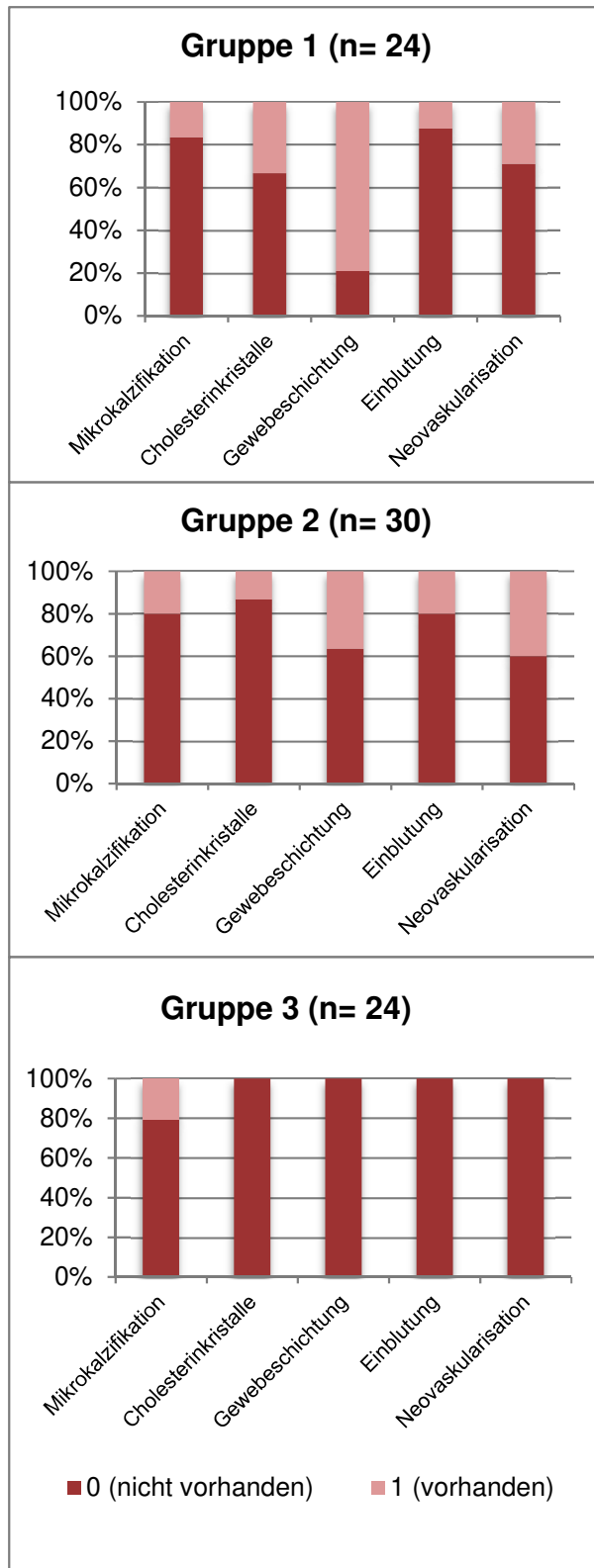


Abbildung 5-7: Darstellung der prozentuellen Verteilung verschiedener Begleiterscheinungen in den drei Tierversuchsgruppen

Beurteilung der humanen histologischen Gefäßquerschnitten

Unter Berücksichtigung derselben Scores, wie bereits im Tiermodell angewendet, wurden auch die humanen histologischen Querschnitte beurteilt und sollen im Folgenden dargestellt werden.

Zu beachten ist hier das vermehrte Auftreten von Neovaskularisation.

Charakter	Median	0,25%	0,75%
<i>Schaumzellen Zirkumferenz</i>	2	1,5	2
<i>Schaumzellen Tief</i>	2	1	3
<i>Inflammation</i>	1	0	1,5

Charakter	0	1	1 (%)
<i>Mikrokalzifikation</i>	13	4	23,53%
<i>Cholesterinkristalle</i>	11	6	35,29%
<i>Gewebeschichtung</i>	14	3	17,65%
<i>Einblutungen</i>	14	3	17,65%
<i>Neovaskularisation</i>	8	9	52,94%

Tabelle 5-8: Ergebnisse der Auswertung der humanen histologischen Gefäßquerschnitte

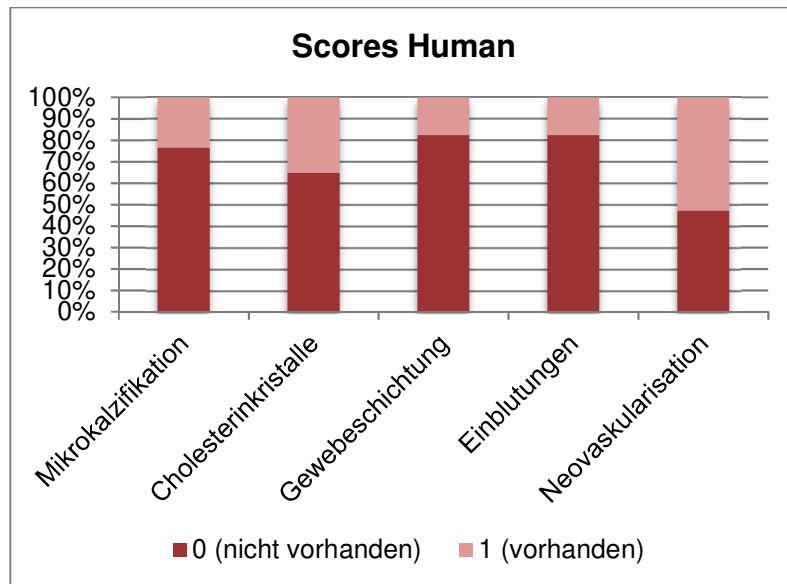


Abbildung 5-8: Grafik zur Tabelle 5-8

5.1.3 Blutwerte: Cholesterin im Plasma

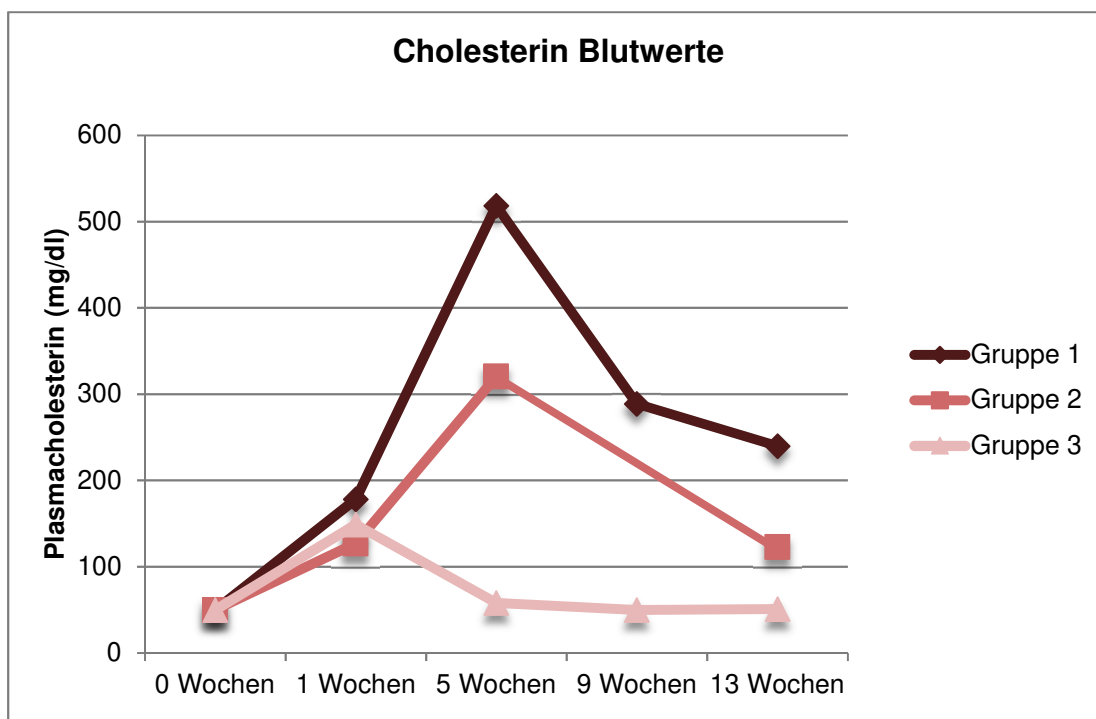


Abbildung 5-9: Cholesterin Plasma Werte der drei Tierversuchsgruppen

In Abbildung 5-9 sind die Cholesterinwerte im Plasma der drei Tierversuchsgruppen dargestellt. Es zeigt sich, dass in Gruppe 1 der höchste Wert erreicht wurde (518,4 mg/dl nach 5 Wochen). Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen aus der Beurteilung der Scores und letztlich auch der Morphometrie.

Zur genauen Veranschaulichung sind in Abbildung 5-10 die Cholesterin Plasma Werte für die drei verschiedenen Tierversuchsgruppen als Area Under Curve (AUC)- Diagramme aufgeführt. Es zeigt sich für die Gruppe 1 eine AUC von 5453,7 mg/dL. Kolodgie et al. beschreiben, dass zur Sicherstellung eines atherosklerotischen Tiermodells das Gesamtcholesterin über die Gesamtdauer des Versuchs bei >5000 mg/dl liegen muss. Unter Berücksichtigung dieses Grenzwertes ist zu erwähnen, dass lediglich die Gruppe 1 den benötigten Wert in Cholesterinwochen (entsprechen der Area Under Curve) erreicht. Gruppe 2 und Gruppe 3 liegen weit unter diesem Zielwert. (Kolodgie et al., 1996)

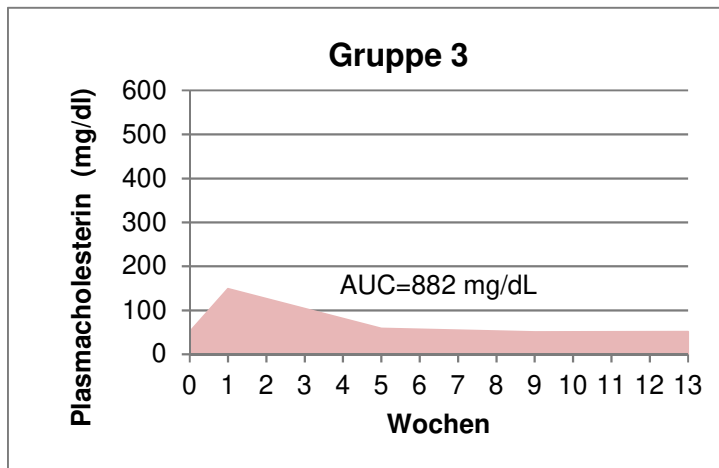
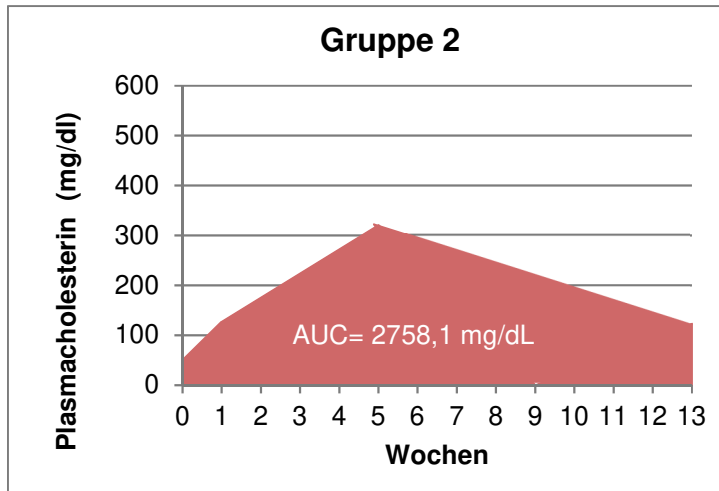
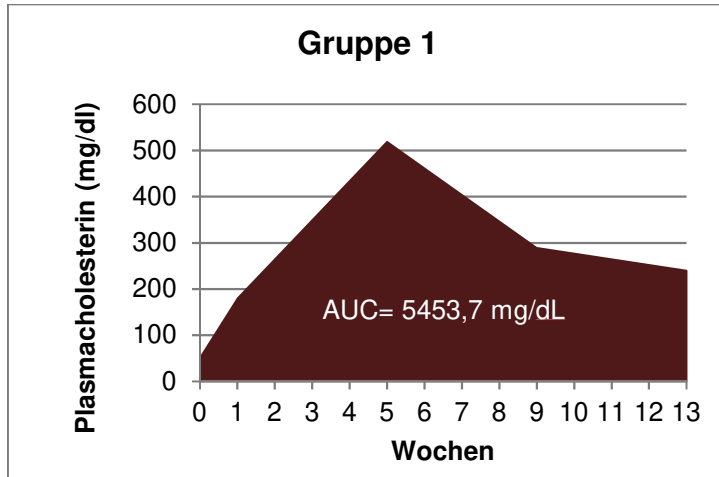


Abbildung 5-10: Cholesterin Plasma Werte der drei Tierversuchsgruppen als Area Under Curve (AUC)

5.1.4 Beurteilung der immunhistochemischen Präparate

Im Folgenden werden stellvertretend je zwei RAM11-, zwei CD68- Präparate und je eine Kontrolle aufgeführt. Diese Färbung soll aufgrund ihrer hohen Spezifität zum jeweiligen Antigen beweisend darstellen, dass die in dieser Arbeit als neoatherosklerotische Areale bezeichneten Gewebe auch tatsächlich dieser Beschaffenheit zugehörig sind.

5.1.4.1 Präparate aus Tierversuchen

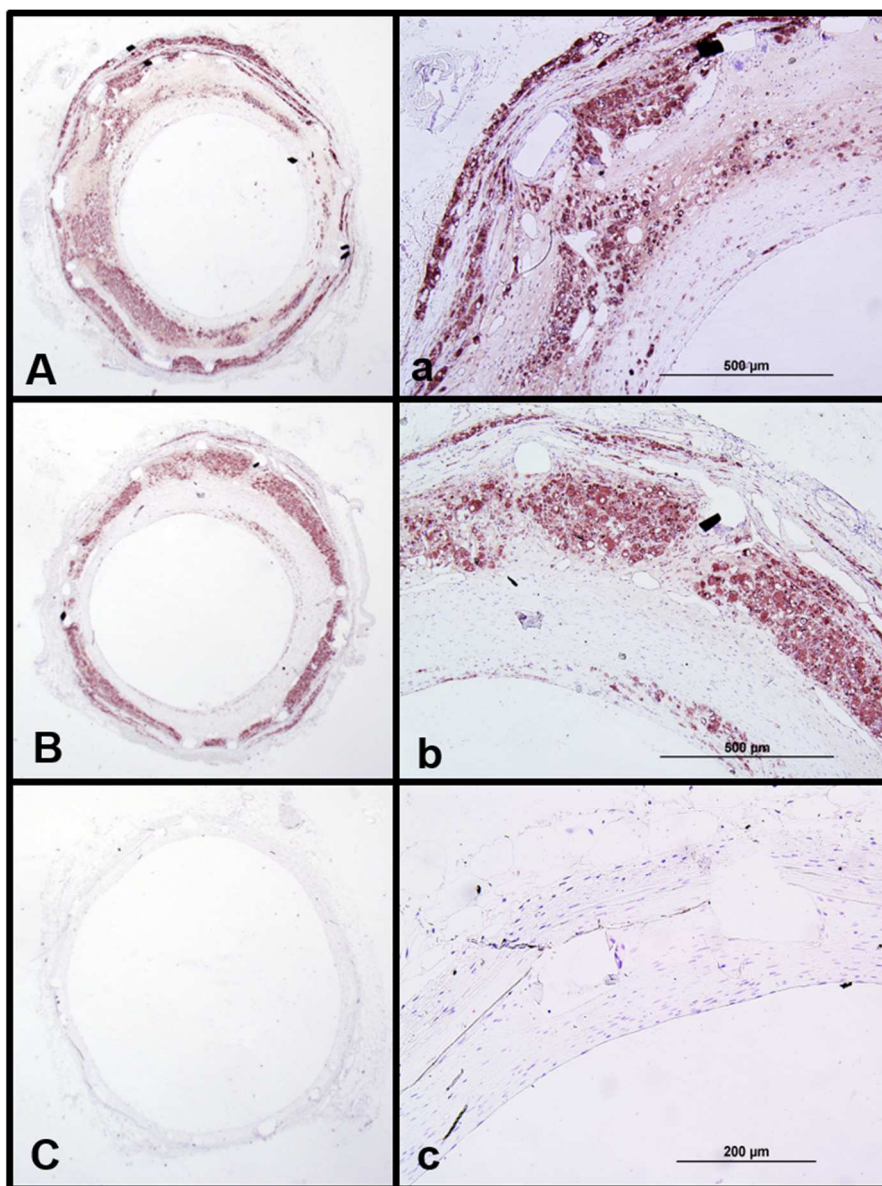


Abbildung 5-11: Immunhistochemische Kaninchenpräparate in RAM11 Färbung (A,B,C in 2000- facher Vergrößerung; a,b,c in 20000- facher Vergrößerung. A und B (bzw. a und b) zeigen RAM11- Präparate, C (bzw. c) die Kontrolle

Wie in Abbildung 5-11 zu sehen lassen sich die rotbraunen Makrophagen bzw. Schaumzellen in der RAM11- Färbung stark von den restlichen Zellen (blassgelb/weißlich) abgrenzen. Sowohl in A bzw. a, als auch in B bzw. b zeigt sich nicht nur Atherosklerose (A und B: gesamte Zirkumferenz) sondern auch Neoatherosklerose (A: gesamte Zirkumferenz, B: von 9 Uhr bis 3 Uhr). Während sich die Atherosklerose hinter den Struts befindet und nach deren Implantation teilweise sternförmig verdrängt wird, liegen die Areale der Neoatherosklerose vor den Struts, also Lumen- näher. Beide sind allerdings bezüglich Intensität und Farbe der Makrophagen von einander nicht zu unterscheiden. Dies zeigt erneut den engen Zusammenhang dieser beiden Erkrankungen.

Zur Kontrolle dient Bild C bzw. c. Hier wurde die exakt selbe Färbemethode angewendet mit der Ausnahme des RAM11- Schrittes. Die Probe durchlief demnach denselben Färbeprozess exklusive des Auftragens des Antikörpers.

5.1.4.2 Humane Präparate

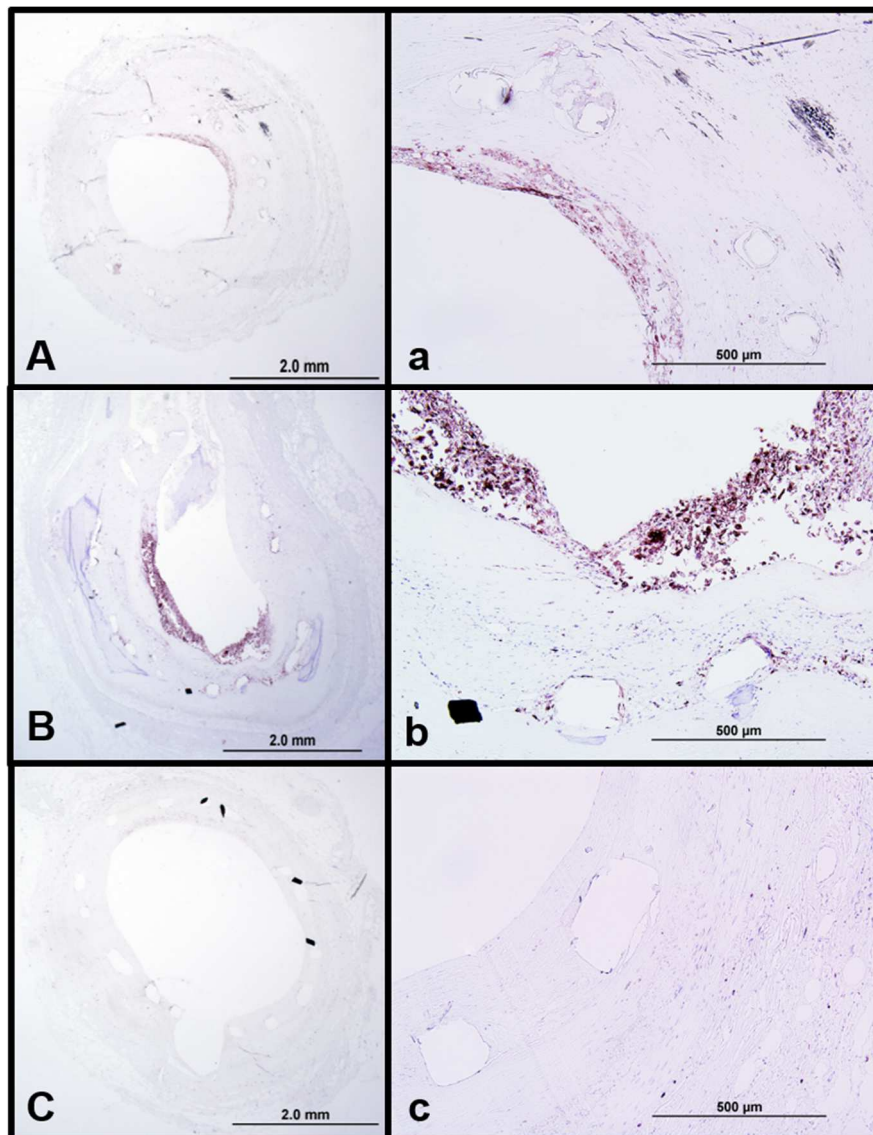


Abbildung 5-12: Immunhistochemische humane Präparate in CD68 Färbung (A,B,C in 2000- facher Vergrößerung; a,b,c in 10000- facher Vergrößerung. A und B (bzw. a und b) zeigen CV68- Präparate, C (bzw. c) die Kontrolle

Wie bereits im Vergleich der Tierversuchsgruppen beschrieben, grenzen sich auch bei der CD68- Färbung die Makrophagen mit ihrem charakteristischen Erscheinungsbild stark vom restlichen Gewebe ab. Abbildung 5-12 zeigt drei humane Präparate. A bzw. a und B bzw. b zeigen auch hier die Antikörpermarkierten Makrophagen in rotbraun, während C bzw. c die Kontrolle darstellt, bei der auch im Zuge der CD 68 Färbereihe auf die Zugabe des Antikörpers verzichtet wurde.

A bzw. a und B bzw. b zeigen im Gegensatz zu den Präparaten aus dem Tierversuch keine Atherosklerose, sondern lediglich Neoatherosklerose. Neben dieser ist eine beträchtliche Restenose in Form von unreifer Neointima zu erwähnen. Die Neoatherosklerose befindet sich in Bild A zwischen 12 Uhr und 3 Uhr, in Bild B ist sie zwischen 4 Uhr und 9 Uhr zu finden. Sie befindet sich ganz typisch luminal und zeichnet sich hier durch einen Randsaum aus Schaumzellen aus.

5.2 Detektion der Neoatherosklerose

Um festzustellen ob mit Hilfe von Attenuation Index und/ oder Peak Intensity Neoatherosklerose von gesundem Gewebe differenziert werden kann folgen hier zweierlei Analysen. Zum einen zeigt Absatz 5.2.1 den direkten Vergleich zwischen gesundem Gewebe und Neoatherosklerose allgemein, daher ohne Rücksichtnahme auf verschiedenen Ausprägungen und Charaktere innerhalb der Neoatherosklerose.

5.2.1 Neoatherosklerose gegen gesunde Neointima

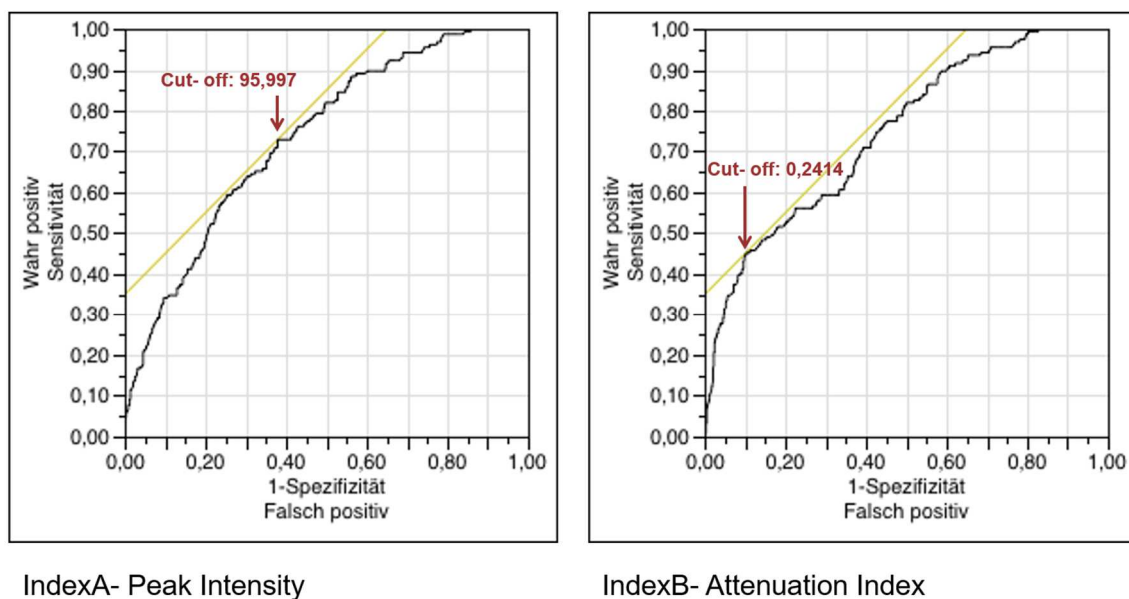


Abbildung 5-13: ROC- Kurve der Kaninchen- Präparate für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index)

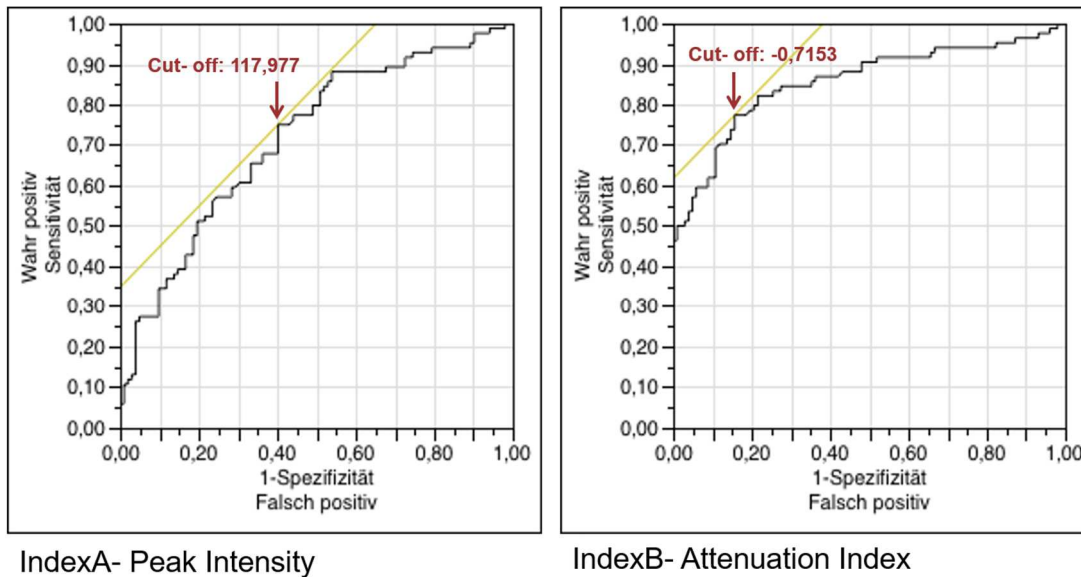


Abbildung 5-14: ROC- Kurve der humanen Präparate für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index)

	Charakter		Spezifität	Sensitivität	Positiv Prädiktiver Wert	Negativ Prädiktiver Wert
Kaninchen	IndexA	95,9970	62,11%	72,90%	24,20%	83,72%
	IndexB	0,2414	89,83%	45,16%	12,03%	43,60%
Human	IndexA	117,977	59,80%	73,68%	63,06%	70,93%
	IndexB	-0,7153	75,79%	84,34%	78,89%	81,81%

Tabelle 5-9: Spezifität und Sensitivität sowie positiv- und negativ- prädiktive Werte für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index) in Kaninchen und Mensch

Die Analyse mit Hilfe der Grenzwertoptimierungsmethode in humanem Gewebe zeigt für den Attenuation Index (IndexB) sowohl eine höhere Sensitivität mit 84,34% als auch eine wesentlich höhere Spezifität mit 75,79% als für die Peak Intensity (IndexA) mit lediglich 59,8% für die Spezifität und 73,86% für die Sensitivität. In derselben Analyse mit Daten aus Kaninchengewebe zeigt sich zwar für den Attenuation Index eine höhere Spezifität mit 89,83% (gegen die Spezifität der Peak Intensity mit 62,11%), allerdings weist sie mit 45,16% eine niedrigere Sensitivität als die Peak Intensity mit 72,90% auf.

Auch die Cut-off- Werte unterscheiden sich zwischen humanen und tierischen Präparaten wesentlich. So kann im Kaninchen mittels Peak Intensity ab 95,9970

mit einer Sensitivität von 72,90% Neoatherosklerose detektiert werden. Im Menschen ist dies allerdings erst ab 117,977 mit einer Sensitivität von 73,68% möglich.

Ein Attenuation Index von -0,7153 detektiert mit einer Sensitivität von 84,34% Neoatherosklerose im humanen Gefäß, im Kaninchen ergibt sich diese Grenze bei bereits 0,2414 und einer Sensitivität von lediglich 45,16%.

Zur Berechnung dieser Werte wurden die Messwerte in zwei Gruppen „gesund“ und „erkrankt“ mit Hilfe der Grenzwertoptimierungsmethode aufgetragen.

5.3 Direkter Vergleich der Mittelwerte für IndexA und IndexB

5.3.1 IndexA (Peak Intensity)

Tabelle 5-10 zeigt die Ergebnisse der Daten aus den humanen Autopsie-Präparaten und den Kaninchen- Präparaten für den IndexA. Im Vergleich zwischen humanen und tierischen Daten zeigt sich, dass die Mittelwerte der Gruppen „luminale Schaumzellen“ und „luminale und tiefe Schaumzellen“ nah an einander liegen. Hingegen unterscheiden sich die Mittelwerte der anderen Gruppen stark.

Ausprägungsgrad	Human (n= 184)		Kaninchen (n= 725)	
	IndexA - Mittelwert	Std.abw.	IndexA - Mittelwert	Std.abw.
1: Keine Neoatherosklerose	112,893 (n= 102)	29,2493	82,995 (n= 568)	32,1628
2: Luminale Schaumzellen	137,555 (n= 40)	26,5170	137,180 (n= 26)	23,7524
3: Tiefe Schaumzellen	142,898 (n= 38)	36,4249	101,913 (n= 110)	27,1902
4: Lum.& tiefe Schaumzellen	125,992 (n= 4)	5,6571	121,392 (n= 21)	24,1152

Tabelle 5-10: Mittelwerte und Standardabweichung der Ergebnisse aus tierischem und humanem Gewebe für IndexA

In der Abbildung 5-15 ist ersichtlich, dass sich vor allem die Gruppe „tiefe Schaumzellen“ (Säule 3) zwischen menschlichen und tierischen Ergebnissen stark unterscheidet (siehe Diskussion). Am besten bildet das Tiermodell bezüglich des IndexA die luminalen Schaumzellen ab, denn in diesem Ausbildungsgrad sind die IndexA- Werte für Kaninchen und humanes Gewebe nahezu identisch.

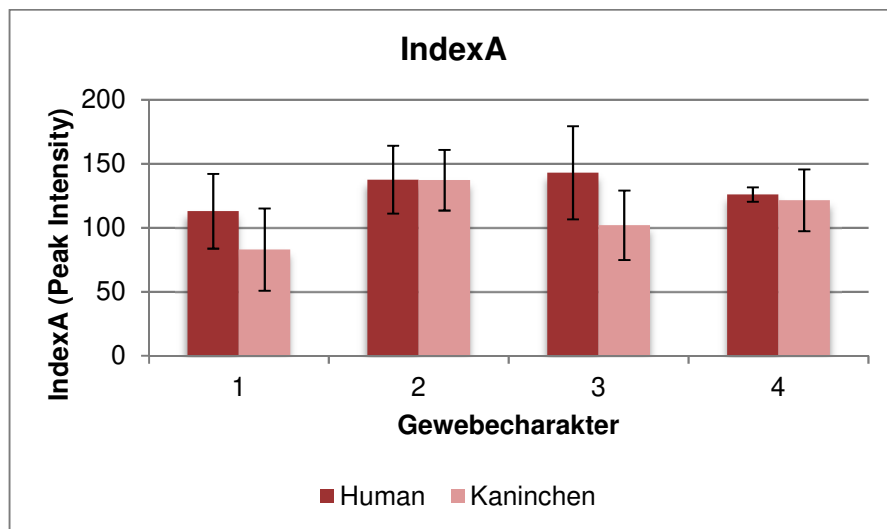


Abbildung 5-15: Grafische Darstellung der in Tabelle 5-10 aufgeführten Ergebnisse für den IndexA (Peak Intensity). Legende siehe Tabelle 5-10

In Tabelle 5-11 und 5-12 werden die Ergebnisse der OCT Messungen von Kaninchen und humanen Autopsie- Präparaten bezüglich ihrer Signifikanz dargestellt. Ein „+“ bedeutet, dass signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerte der verglichenen Gruppen gefunden werden konnten. Ein „-“ bedeutet demnach, dass keine signifikanten Unterschiede der verglichenen Gruppen existieren.

Entsprechend Tukeys HSD- Test ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe „Keine Neoatherosklerose“ und „luminale Schaumzellen“ bzw. „tiefe Schaumzellen“ sowohl in den Autopsie- Präparaten als auch in den Kaninchen- Präparaten. Des Weiteren unterscheiden sich die Ergebnisse der Messungen aller Gruppen im Tiermodell signifikant von einander - mit Ausnahme der Gruppen „luminale Schaumzellen“ und „luminale und tiefe Schaumzellen“.

Kaninchen	Keine Neoathero - sklerose	Luminale Schaumzellen	Tiefe Schaumzellen	Lum.& tiefe Schaumzellen
Keine Neoatherosklerose	-	+	+	+
Luminale Schaumzellen	+	-	+	-
Tiefe Schaumzellen	+	+	-	+
Lum.& tiefe Schaumzellen	+	-	+	-

Tabelle 5-11: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade im Tiermodell.

Human	Keine Neoathero - sklerose	Luminale Schaumzellen	Tiefe Schaumzellen	Lum.& tiefe Schaumzellen
Keine Neoatherosklerose	-	+	+	-
Luminale Schaumzellen	+	-	-	-
Tiefe Schaumzellen	+	-	-	-
Lum.& tiefe Schaumzellen	-	-	-	-

Tabelle 5-12: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade der humanen Daten.

5.3.2 IndexB (Attenuation Index)

In Tabelle 5-13 finden sich die Mittelwerte und Standardabweichungen für den IndexB aller präklinischen Daten. Es zeigen sich markante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der humanen Autopsie- Präparate und denen der Kaninchen- Präparate in allen Gruppen. Besonders groß ist die Abweichung zwischen Kaninchen und humanem Gewebe in der Gruppe der „tiefen Schaumzellen“. Während die humanen Messungen hier einen mittleren Attenuation Index von -0.8596 ergeben, findet sich bei denselben Messungen im Tiermodell ein Wert von 4,277.

Ausprägungsgrad	Human (n= 184)		Kaninchen (n= 725)	
	IndexB - Mittelwert	Std.abw.	IndexB - Mittelwert	Std.abw.
1: Keine Neoatherosklerose	1.5268 (n= 102)	0.30023	12.697 (n= 568)	0.64010
2: Luminale Schaumzellen	-1.8350 (n= 40)	0.47943	-0.992 (n= 26)	2.99184
3: Tiefe Schaumzellen	-0.8596 (n= 38)	0.49189	4.277 (n= 110)	1.45455
4: Lum.& tiefe Schaumzellen	-1.6610 (n= 4)	1.51611	0.750 (n= 21)	3.32901

Tabelle 5-13: Mittelwerte und Standardabweichung der Ergebnisse aus tierischem und humanem Gewebe für IndexB (Attenuation Index)

Aus Abbildung 5-16 lässt sich im Wesentlichen schließen, dass trotz schlechter Korrelation zwischen humane Daten und solchen aus dem Tierversuch, ein Attenuation Index im gesunden Gewebe positive Werte annimmt, während derselbe in neoatherosklerotischem Gewebe mit luminalen Schaumzellen in der Regel negative Ergebnisse erzielt. Die starken Unterschiede zwischen humanen Autopsiepräparaten und Kaninchengewebe werden im Kapitel „Diskussion“ genauer ausgeführt.

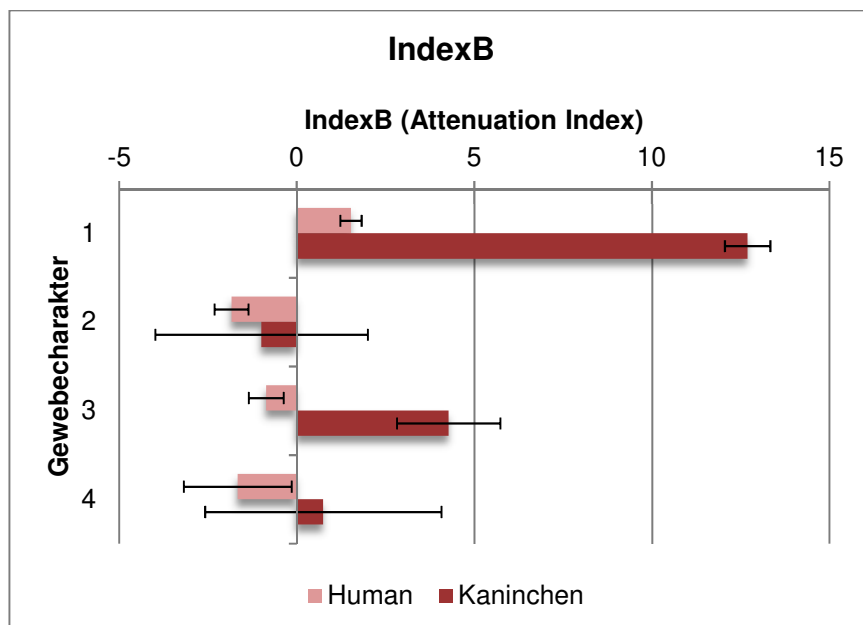


Abbildung 5-16: Grafische Darstellung der in Tabelle 5-13 aufgeführten Ergebnisse für den IndexB (Attenuation Index). Legende siehe Tabelle 5-13

In Tabelle 5-14 und Tabelle 5-15 werden die signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Gruppen dargestellt. Auch hier bedeutet ein „+“, dass ein solcher signifikanter Unterschied vorliegt. Ein „-“ hingegen spricht gegen dieses Vorliegen. Es zeigt sich, wie auch in der Analyse des IndexA, ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse der Gruppe „Keine Neoatherosklerose“ und der Gruppe der „luminalen Schaumzellen“ bzw. „tiefe Schaumzellen“ sowohl bei humanen als auch bei den präklinischen Daten. Im Tierversuch unterscheidet sich zusätzlich auch die Gruppe der „luminalen und tiefen Schaumzellen“ vom gesunden Gewebe (Gruppe: „Keine Neoatherosklerose“).

Kaninchen	Keine Neoathero - sklerose	Luminale Schaumzellen	Tiefe Schaumzellen	Lum.& tiefe Schaumzellen
Keine Neoatherosklerose	-	+	+	+
Luminale Schaumzellen	+	-	-	-
Tiefe Schaumzellen	+	-	-	-
Lum.& tiefe Schaumzellen	+	-	-	-

Tabelle 5-14: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade der Neoatherosklerose im Tiermodell.

Human	Keine Neoathero - sklerose	Luminale Schaumzellen	Tiefe Schaumzellen	Lum.& tiefe Schaumzellen
Keine Neoatherosklerose	-	+	+	-
Luminale Schaumzellen	+	-	-	-
Tiefe Schaumzellen	+	-	-	-
Lum.& tiefe Schaumzellen	-	-	-	-

Tabelle 5-15: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade der humanen Daten.

5.4 OCT Messungen der klinischen Patientenfälle

Da sich, wie in den Ergebnissen bereits angeführt, der Index B als geeigneter Wert für die Differenzierung von Neoatherosklerose und gesundem Gewebe dargestellt hat, beschränkt sich die Auswertung der OCT Messungen für die

klinischen Patientenfälle aus dem Deutschen Herzzentrum München auf eben diesen.

Die Absolutergebnisse der insgesamt 203 Messungen aus den 6 Patientenfällen zeigen 66 Einzelmessungen von Neoatherosklerose. 137 der Messungen zeigen demnach keine Neoatherosklerose.

In Abbildung 5-17 werden die Basischarakteristika der in der Studie eingeschlossenen Patienten dargestellt. Es zeigt sich bei allen Patienten ein ausgeprägtes kardiovaskuläres Risikoprofil. Die linke Koronararterie (LAD) ist hier häufiger von Restenose betroffen als die rechte Koronararterie (RCA) oder die Arteria Circumflexa (LCx). Alle Patienten sind männlichen Geschlechts und weisen verschiedenste Vorerkrankungen auf. Beim Großteil der eingeschlossenen Patienten wurde die Indikation zur Herzkatheteruntersuchung mit OCT bei Belastungsdyspnoe gestellt. Ein Patient war beschwerdefrei, es zeigte sich aber ein auffälliger Befund im Zuge der Ergometrie.

Alter (Mittelwert)	55- 72 (62)
Geschlecht	m
Gewicht in kg (Mittelwert)	65.2- 83 (64.2)
Größe in cm (Mittelwert)	168- 178 (172.7)
BMI in kg/m ²	21.5- 28.7 (25.7)
Vorerkrankungen	Hypothyresoe (n=1) Hepatitis A (n=1) Hepatitis B (n=1) HIV (n=1) Lues (n=1) Medikamenteninteraktion mit Pravastatin/ Prasugrel bei HAART (n=1) Blasentumor (n=1) Depression (n=2) Niereninsuffizienz Stadium III (n=1) LWS- und HWS- Syndrom (n=1) Nephrolithiasis (n=1) Plexuslähmung (n=1) Benigne Prostatahyperplasie (n=1) ACE- Hemmerunverträglichkeit
Cardiovaskuläre Risikofaktoren	Diabetes Mellitus Typ II (n=5) Arterielle Hypertonie (n=6) Hypercholesterinämie (n=6) Ex- Nikotinabusus (n=3) Familiäre Prädisposition (n=2)
Indikation	Thorakale Beschwerden(n=1) Belastungsdyspnoe NYHA II (n=4)

	Pathologische Ergometrie (n=1)
	Instabile Angina Pectoris (n=1)
	Stabile Angina Pectoris (n=1)
Lokalisation Arterie	LAD (n=4)
	RCA (n=1)
	LCx (n=1)

Abbildung 5-17: Basischarakteristika der Teilnehmer (n=6)

Kategorie	Häufigkeiten
Keine Neoatherosklerose	137
Neoatherosklerose	66
Summe	203

Tabelle 5-16: Absolutergebnis der Neoatherosklerose Messungen der klinischen Patientenfälle im OCT (in %)

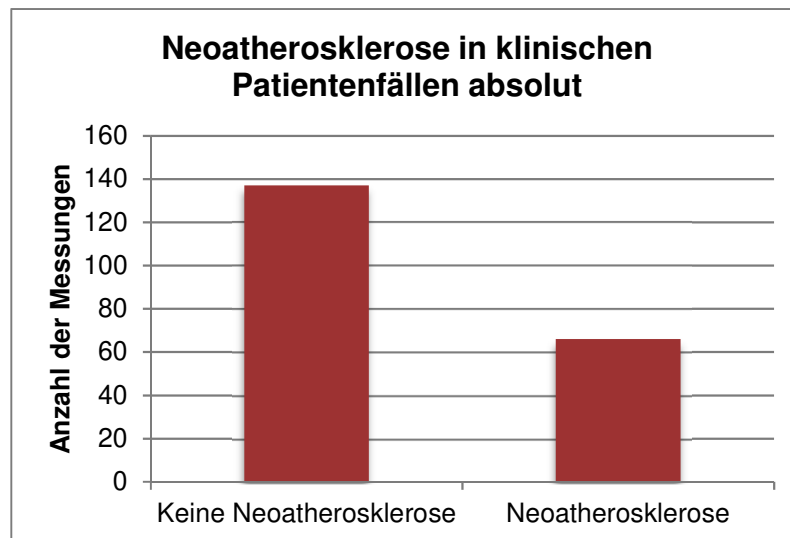


Abbildung 5-18: Absolutergebnis der Neoatherosklerose Messungen der klinischen Patientenfälle im OCT

In den Auswertungen der einzelnen klinischen Fälle, siehe Abbildung 5-19 und Tabelle 5-17, zeigt sich, dass, laut den in dieser Arbeit gesetzten Parametern, in Fall 2 die meiste Neoatherosklerose (41,67%) im Gefäß auftritt. Hingegen zeigt sich in Fall 4 (12,9%) und Fall 5 (14,29%) eine weniger stark ausgeprägte Erkrankung.

	Keine Neoatherosklerose	Neoatherosklerose
Fall 1	61.29	38.71
Fall 2	58.33	41.67
Fall 3	64.71	35.29
Fall 4	87.1	12.9
Fall 5	85.71	14.29
Fall 6	67.49	32.51

Tabelle 5-17: Einzelergebnisse der OCT Messungen der klinischen Patientenfälle (in %)

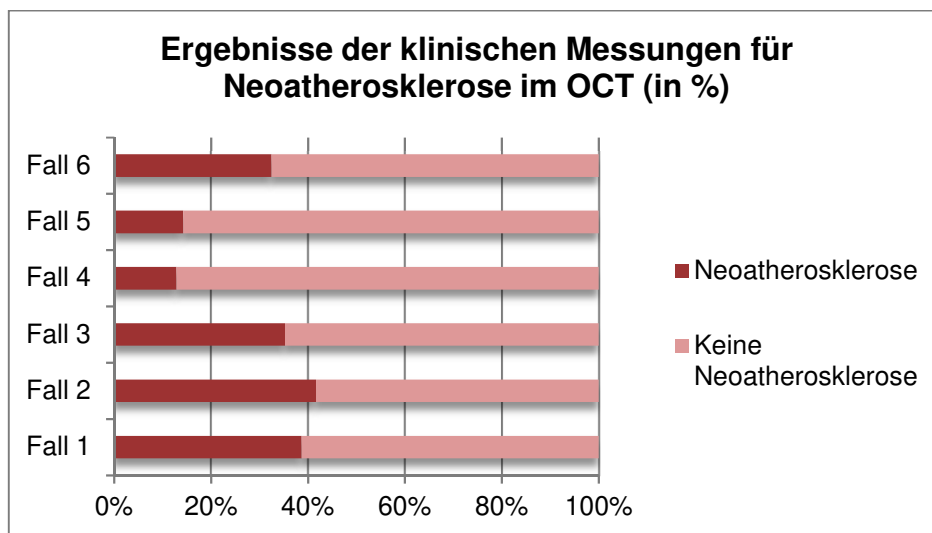


Abbildung 5-19: Einzelergebnisse der OCT Messungen der klinischen Patientenfälle

5.5 Limitationen

5.5.1 Neovaskularisation

Im Laufe der Messungen und Analysen stellte sich heraus, dass Neovaskularisation eine ganz wesentliche Limitation für die optische Kohärenztomographie als bildgebendes Verfahren zur Detektion von Neoatherosklerose darstellt. Wie in Abbildung 5-20, zwei Querschnitte humaner Koronararterien mit ihren korrelierten Bildern aus dem OCT, veranschaulicht, ist

schon mit bloßem Auge die Limitation zu erkennen. Während die Lumen-nahen Bereiche der Neointima sowohl bei der Neoatherosklerose als auch bei der Neovaskularisation sehr hell erscheinen, so nimmt die Lichtintensität zu den Stent Struts hin zunehmend ab. Der Grund für diesen Intensitätsverlust ist allerdings in den beiden Entitäten nicht derselbe. Der das Licht abschwächende Faktor in der Neoatherosklerose sind die Schaumzellen (obere Bilderreihe; SZ), während im Fall der Neovaskularisation in einer an sich gesunden und unreifen Neointima die einsproßenden Gefäße (untere Bilderreihe; NV) für den Intensitätsverlust verantwortlich sind.

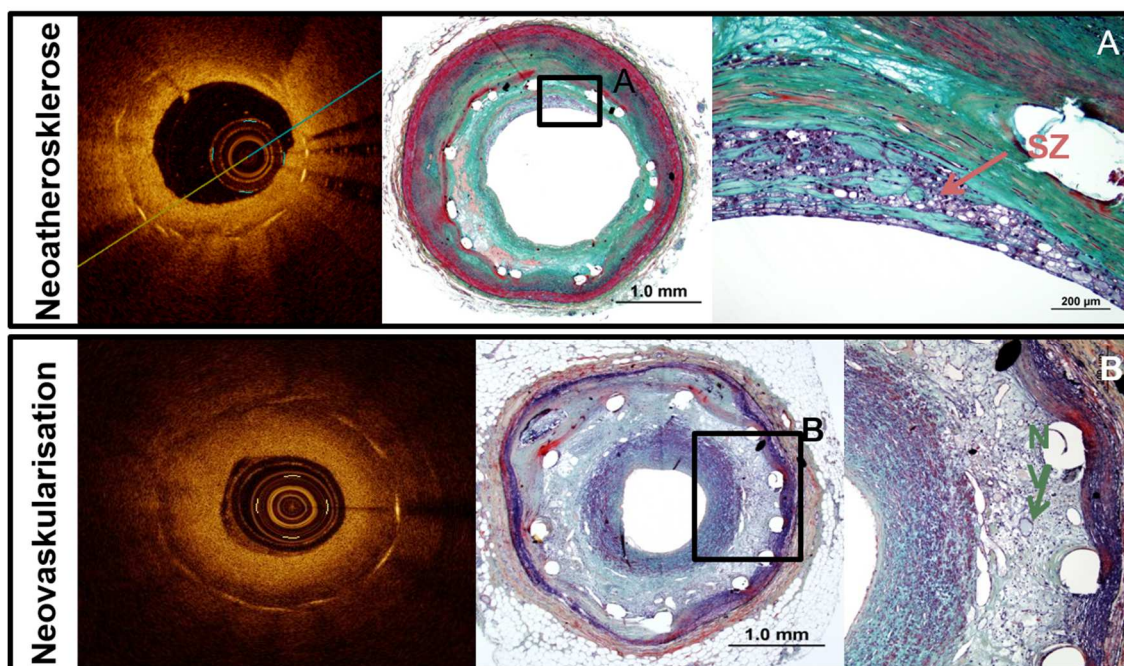


Abbildung 5-20: Vergleich von Neoatherosklerose und Neovaskularisation in zwei Querschnitten humaner Herzkranzgefäße (SZ= Schaumzellen; NV= Neovaskularisation)

5.5.2 Limitation im IndexA (Peak Intensity)

In Tabelle 5-18 sind Mittelwerte und Standardabweichungen für die Peak Intensity unter Berücksichtigung der erstellten Subgruppen dargestellt, um die Limitation der Neovaskularisation aufzuzeigen. Es zeigt sich in der Gruppe der „Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose“ eine Peak Intensity, die sowohl im Tiermodell als auch in den humanen Autopsiepräparaten den Werten der Gruppe

der „luminalen Schaumzellen“ sehr nahe kommt, obwohl in diesem an sich gesunden Gewebe keine Schaumzellen zu finden sind.

Ausprägungsgrad	Human (n= 168)		Kaninchen (n= 699)	
	IndexA - Mittelwert	Std.abw.	IndexA - Mittelwert	Std.abw.
1: Keine Neoatherosklerose	109,83 (n= 91)	29,26	80,72 (n= 537)	31,14
2: Luminale Schaumzellen	136,94 (n= 33)	27,99	127,92 (n= 11)	22,92
3: Tiefe Schaumzellen	146,44 (n= 29)	33,08	100,23 (n= 104)	26,24
4: Lum.& tiefe Schaumzellen	125,99 (n= 4)	5,66	112,87 (n= 16)	18,76
5: Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose	138,22 (n= 11)	11,97	122,36 (n= 31)	23,17

Tabelle 5-18: Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Ausprägungsgrade für den IndexA (Peak Intensity) in humanen Autopsiepräparaten und Tierversuchsgruppen

In Abbildung 5-21 sind die Ergebnisse aus Tabelle 5-18 grafisch abgebildet. Auch hier zeigt sich die Ähnlichkeit der Ergebnisse der „Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose“ (Säule 5) und der „luminalen Schaumzellen“ (Säule 2). Im Gegensatz dazu lässt sich ein, wenn auch nicht signifikanter, Unterschied der beiden Gruppen ohne Neoatherosklerose erkennen (Vergleiche Säule 1 „Keine Neoatherosklerose“ und Säule 5 „Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose“).

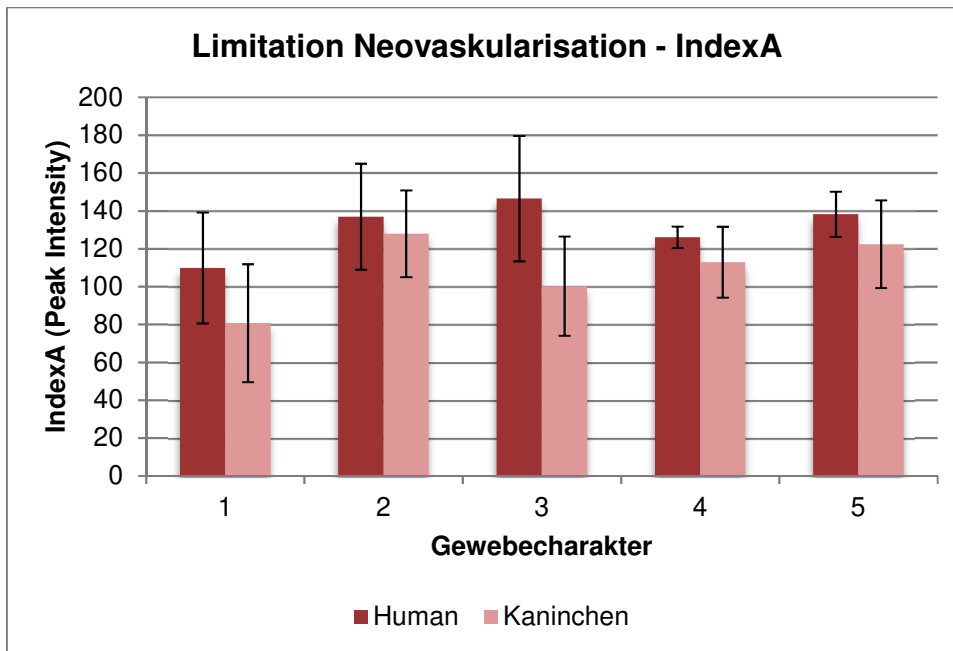


Abbildung 5-21: Grafische Darstellung der Limitation der Neovaskularisation anhand der Peak Intensity (Legende siehe Tabelle 5-18)

In Tabelle 5-19 und Tabelle 5-20 werden die signifikanten Unterschiede der Ergebnisse dargestellt. Wie bereits beschrieben steht ein „+“ stellvertretend für einen signifikanten Unterschied, während ein „-“ dagegenspricht.

Die Ergebnisse aus den Messungen zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten von Neovaskularisation in gesunder Neointima und Neoatherosklerose gefunden werden konnte.

Zwischen den Ausprägungsgraden der Neoatherosklerose und dem gesunden Gewebe („Keine Neoatherosklerose“) findet sich, wie erwartet, ein signifikanter Unterschied.

Kaninchen	Keine Neoatherosklerose	Neoatherosklerose	Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose
Keine Neoatherosklerose	-	+	+
Neoatherosklerose	+	-	-
Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose	+	-	-

Tabelle 5-19: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus dem Tierversuch unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexA

Im Gegensatz zu den Messungen aus den Tierversuchen konnte bei der Auswertung der humanen Daten kein signifikanter Unterschied zwischen Neovaskularisation und Neoatherosklerose gefunden werden.

Human	Keine Neoatherosklerose	Neoatherosklerose	Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose
Keine Neoatherosklerose	-	+	-
Neoatherosklerose	+	-	-
Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose	-	-	-

Tabelle 5-20: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus den humanen Autopsiepräparaten unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexA

5.5.3 Limitation im IndexB (Attenuation Index)

Wie bereits für den IndexA beschrieben, so spiegelt sich die Limitation der Neovaskularisation im gesunden Gewebe auch im IndexB wieder.

Tabelle 5-21 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Daten für den IndexB. Auch hier entsprechen die Werte für den IndexB in Bereichen der Neovaskularisation in gesunder Neointima nicht denen des restlichen gesunden Gewebes sondern eher denen der Neoatherosklerose. Verallgemeinert lässt sich sagen, dass Neoatherosklerose in der Regel mit einem negativen Attenuation Index einhergeht und gesunde Neointima mit einem Positiven. Der Attenuation Index für die Gruppe „Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose“ ist mit -1,1452 (humane Daten) bzw. -0,367 (Daten aus dem Tierversuch) jedoch eindeutig negativ.

Ausprägungsgrad	Human (n= 168)		Kaninchen (n= 699)	
	IndexB - Mittelwert	Std.abw.	IndexB - Mittelwert	Std.abw.
1:Keine Neoatherosklerose	1.8498 (n= 91)	0.3110	13.451 (n= 527)	0.6486
2: Luminale Schaumzellen	-1.8059 (n= 33)	0.5164	-0.551 (n= 11)	4.5323
3: Tiefe Schaumzellen	-1.0551 (n= 29)	0.5509	-1.769 (n= 104)	6.7225
4: Lum.& tiefe Schaumzellen	-1.6610 (n= 4)	1.4834	1.539 (n= 16)	3.7580
5: Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose	-1.1452 (n= 11)	0.8945	-0.367 (n= 31)	2.6998

Tabelle 5-21: Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Ausprägungsgrade für den IndexB (Attenuation Index) in humanen Autopsiepräparaten und Tierversuchsgruppen

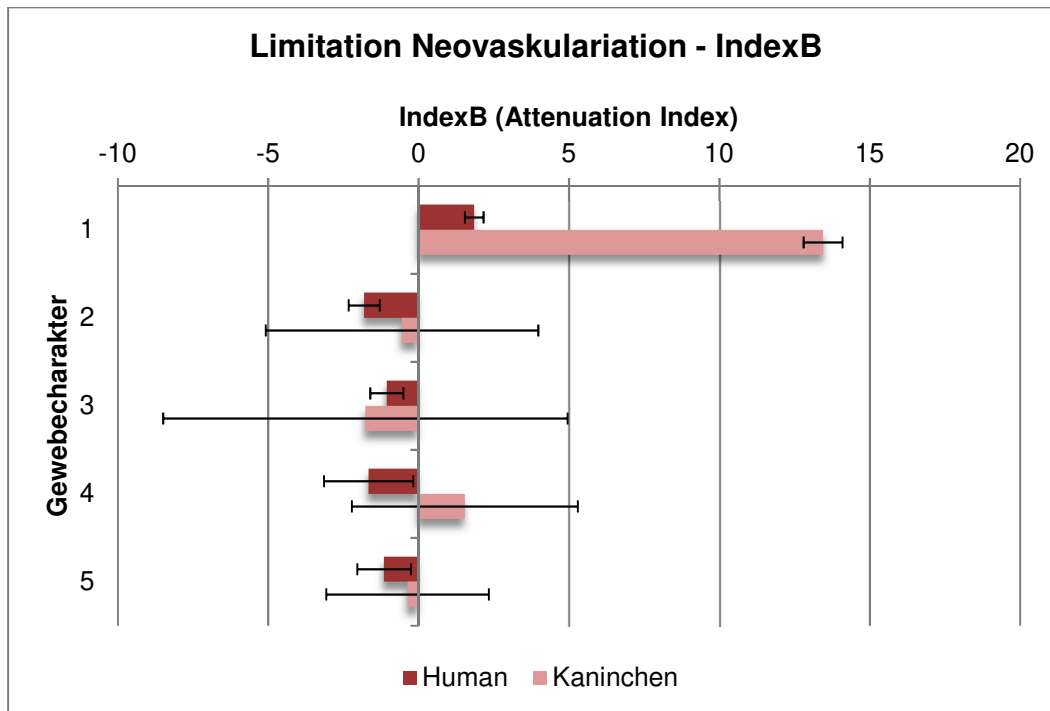


Abbildung 5-22: Grafische Darstellung der Limitation der Neovaskularisation anhand des Attenuation Index (1: Keine Neoatherosklerose; 2: Luminale Schaumzellen; 3: Tiefe Schaumzellen; 4: Luminale und tiefe Schaumzellen; 5: Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose)

Die signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aller Messungen (siehe Tabelle 5-22 und Tabelle 5-23) für den IndexB gleichen denen des IndexA. So lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen „Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose“ und „luminale Schaumzellen“ ausmachen.

Auch hier finden sich im Tiermodell signifikante Unterschiede zwischen „Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose“ und „Keine Neoatherosklerose“.

Kaninchen	Keine Neoatherosklerose	Schaumzellen (allgemein)	Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose
Keine Neoatherosklerose	-	+	+
Schaumzellen (allgemein)	+	-	-
Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose	+	-	-

Tabelle 5-22: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus dem Tierversuch unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexB

Human	Keine Neoatherosklerose	Schaumzellen (allgemein)	Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose
Keine Neoatherosklerose	-	+	-
Schaumzellen (allgemein)	+	-	-
Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose	-	-	-

Tabelle 5-23: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus den humanen Autopsiepräparaten unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexB

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der Neoatherosklerose. Dies sollte unter Einbeziehung präklinischer und klinischer Daten, sowie der Histopathologie und der optischen Kohärenztomographie erfolgen. Zusammenfassend konnten folgende Feststellungen getätigt und Ergebnisse erzielt werden:

- Die Darstellung und Beobachtung der Neoatherosklerose ist im Tiermodell möglich.
- Mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie können wegweisende Aussagen über die qualitative und quantitative Ausbildung der Neointima gemacht werden.
- Neovaskularisation stellt eine wesentliche Limitation der Detektion der Neoatherosklerose mittels OCT dar.

Bislang ist bekannt, dass es sich bei der Neoatherosklerose um eine Veränderung der Neointima nach Stentimplantation handelt, die sowohl in BMS als auch in DES zu finden ist. Hierbei kann sie jedoch deutlich häufiger und auch früher in DES gefunden werden (DES: 64% vs. BMS 31%; früheste Veränderungen in DES nach 70 Tagen, in BMS nach 900 Tagen). (Nakazawa et al., 2011) So handelt es sich vor allem in DES bei der Ausbildung von Neoatherosklerose um einen Prozess innerhalb weniger Monate, die Pathogenese der verwandten Atherosklerose nimmt im Vergleich mehrere Jahrzehnte in Anspruch. (Yahagi et al., 2016)

Derzeit geht man von zwei möglichen Erklärungen für diese rasche Ausbildung in DES aus: Zum einen steht die Implantation eines Fremdkörpers in das Gefäß und die damit verbundene chronische Entzündungsreaktion im Mittelpunkt. (Inoue et al., 2004) Diese Reaktion dürfte am ehesten auf die Polymerummantelung des Stents zurückzuführen sein. (Nakazawa, Ladich, Finn, & Virmani, 2008) Zum anderen steht die verzögerte Endothelialisierung durch die medikamentöse Beschichtung des Stents im Mittelpunkt. Dieser Zustand führt zum vermehrten Einwandern von Lipidzellen und inflammatorischen Zellen und unterhält so den Entzündungsprozess. (Finn, Joner et al., 2007) Zudem müssen

die durch die Implantation des Metallgerüsts entstehenden Scherkräfte und Turbulenzen berücksichtigt werden, durch welche die Hämodynamik gestört wird. Auch dieser Mechanismus kann zum Einwandern von Monozyten in die Intima führen und somit eine Neoatherosklerose mitbegründen. (Otsuka et al., 2012)

Die rasche Restenose in BMS zeichnet sich hingegen durch Gewebe reich an glatten Muskelzellen sowie Fibrin aus. Diese frühe neointimale Hyperplasie ähnelt der Gefäßreaktion nach einer Ballonangioplastie. Es zeigen sich in der Regel allerdings keine atherosklerotischen Veränderungen. (Kimura et al., 2002)

Atherosklerotische Veränderungen werden in BMS erst sehr spät, meist nach über 5 Jahren gefunden. (Ramcharitar et al., 2007; Takano et al., 2009)

Ähnlich der Atherosklerose werden Rauchen, Alter >65 Jahre, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und chronische Nierenerkrankungen als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Neoatherosklerose angesehen. (Yonetsu et al., 2012)

All dies zeigt, dass in den letzten Jahren viel Wissen über die Neoatherosklerose generiert werden konnte. Dennoch bleiben die wesentlichen Fragen ungeklärt, nämlich die nach der Entstehung der Erkrankung. Es existieren mehrere Theorien, wesentliche Einflussfaktoren scheinen bereits bekannt zu sein, doch die Antwort bleibt letztlich aus. So wurde in dieser Arbeit nach einem Tiermodell gesucht, um anhand eines solchen, in Zukunft die Entstehung der Neoatherosklerose näher untersuchen zu können.

Um hierfür ein geeignetes Tiermodell zu etablieren, wurden drei verschiedene Tiermodelle, die sich in Dauer der hochdosierten Cholesterinzufuhr und dem Zeitpunkt der Denudation unterscheiden, mit einander verglichen.

Es zeigt sich sowohl in der rein visuellen Begutachtung der histologischen Schnitte als auch in der statistischen Auswertung, dass die Gruppe 1 Neoatherosklerose am besten abbildet. Zu berücksichtigen ist allerdings die große Variabilität der Kaninchen im Ansprechen auf die Cholesterin-Diät. Die gleiche Cholesterin-Diät kann in zwei Kaninchen zu zwei verschiedenen Ergebnissen führen. (Kolodgie et al., 1996)

Im Zuge der Analysen der Morphometrie wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt, um, repräsentativ für die Messungen von Histologie und OCT, deren Anpassung zu testen. Hierbei zeigt sich die stärkste Korrelation in

den Messungen der Gruppe 3. Diese Gruppe ist zugleich die der schwächsten Ausprägung der Neoatherosklerose. Eine dünne und gesunde Neointima macht die Korrelation zwischen OCT und Histologie sehr einfach, während es schwieriger wird, die passenden Querschnitte einander zuzuordnen, je dicker und kranker die Neointima wird. Wie in dieser Arbeit mehrfach gezeigt, führt die Anwesenheit von Schaumzellen zu einem Intensitätsverlust des Lichts und somit des OCT- Signals. Dies macht es in der Neoatherosklerose oft schwer, Stent Struts hinter der Neointima zu erkennen. Diese Beobachtung macht die Korrelation manchmal unmöglich und ist mit Sicherheit auch eine Limitation für das Tiermodell.

Schließlich werden noch die jeweiligen Cholesterin- Plasma- Werte zu den Tierversuchsgruppen in den Ergebnissen aufgeführt. Zu sehen ist, dass die Beurteilung der Neoatherosklerose im Score- System sehr gut mit den Blutwerten korrelieren. Kolodgie et al. postulierten 1996, dass für das Auftreten von atherosklerotischen Läsionen mindestens 5000 Cholesterinwochen (Cholesterin-Plasma- Werte multipliziert mit der Gesamtdauer des Versuchs) notwendig sind. Dies kann auch auf neoatherosklerotische Läsionen umgelegt werden. Lediglich Gruppe 1 erreichte diese 5000 Cholesterinwochen.

Ein ebenso wesentlicher Teil dieser Arbeit war die Testung der Optischen Kohärenztomographie zur Detektion der Neoatherosklerose im translationalen Ansatz.

Neben der OCT stehen heute eine Reihe anderer Verfahren zur invasiven Bildgebung der Koronargefäße zur Verfügung, unter anderem der intravaskuläre Ultraschall (IVUS) und die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS). Während mit der OCT eine höhere Auflösung (OCT: 10 μ m; IVUS: 150 μ m) als mit dem IVUS erreicht werden kann, weist dieser allerdings einer höhere Gewebspenetration auf (OCT: 1.0-2.5mm; IVUS: 10.0mm). Durch die hohe Auflösung der OCT ist die Detektion von kleinen, also frühen, neointimalen Veränderungen möglich. (Suzuki et al., 2008) Mit dem IVUS ist eine Detektion der Neoatherosklerose entsprechend der geringeren Auflösung erst in späteren Stadien möglich, in denen aufgrund der im Vergleich geringen Gewebspenetration andererseits die Beurteilung mittels OCT oft nicht möglich ist.

Auch die NIRS nimmt immer mehr an Bedeutung zu und wird im Zuge von sogenannten Hybrid- Bildgebungen zur Darstellung von Gefäßwänden genutzt. Dies bedeutet, dass dieses Verfahren in Ergänzung zu OCT oder IVUS angewendet wird. Mit der Nahinfrarotspektroskopie können durch Anwendung von Infrarotlicht im Bereich von 780- 2500nm verschiedene Arten von Gewebe unterschieden werden. (Waxman, Ishibashi, & Caplan, 2007) Mit dem NIRS-IVUS, einem Kombinationsverfahren aus Nahinfrarotspektroskopie und intravaskulärem Ultraschall, wird zur Beurteilung der nativen Atherosklerose ein Chemogramm erzeugt, in dem lipidreiche Regionen dargestellt werden können. (Gardner et al., 2008; Waxman et al., 2009) Neben der außerdem weiterhin bestehenden Limitation des IVUS, nur späte Läsionen erkennen zu können, kann der NIRS- IVUS Läsionen unterhalb eines Stents nicht von solchen oberhalb unterscheiden. Dementsprechend kann nicht zwischen Neoatherosklerose und einem alten atherosklerotischen Plaque unterschieden werden. (Madder et al., 2016) Zudem erfolgte bislang keine Validierung hinsichtlich der Detektion der Neoatherosklerose für diese Methode.

Es ist heute möglich mit Hilfe der Optischen Kohärenztomographie eine Vielzahl von Veränderungen der Gefäßwände sichtbar zu machen. So stellt sich eine frühe Restenose in BMS (nach 3- 8 Monaten) als homogenes Band hoher Signalintensität dar. (Yamamoto et al., 2011) In DES wird dieses homogene Band seltener beobachtet, häufiger spricht man hier von einer geschichteten Neointima (Gonzalo et al., 2009), wie sie im Zuge dieser Arbeit auch des Häufigeren beobachtet und mit der Neoatherosklerose in Zusammenhang gebracht werden konnte.

In Autopsiestudien wurde ein Zusammenhang zwischen ungenügender Einheilung des Stents in die Gefäßwand und Stent- Thrombosen gezeigt. (Finn, Joner et al., 2007; Joner et al., 2006) Durch die hohe Auflösung der OCT kann diese mangelnde Einheilung detektiert werden. Schließlich ist es auch möglich Fehlplatzierungen, eine Malapposition von Stents, darzustellen, welche ebenso zunehmend mit dem Auftreten von späten Stent- Thrombosen in Verbindung gebracht werden. (Daemen et al., 2007; Guagliumi et al., 2012; Kang et al., 2013) Wie bereits durch Malle et al. gezeigt wurde, existiert mit der OCT eine Methode, durch die Gewebe auch qualitativ beurteilt werden kann. Insbesondere konnte in der Studie aus 2013 gezeigt werden, dass die Unterscheidung zwischen „reifer“

und „unreifer“ Neointima mit der OCT möglich ist. Die Messungen erfolgten hier, wie auch in dieser Arbeit, nach der Methode der Grauwertbestimmungen. (Malle et al., 2013)

Ziel dieser Arbeit war, neben der Etablierung des neuen Tiermodells, auch die Anwendbarkeit der OCT in diesem zur Unterscheidung zwischen Neoatherosklerose und gesunder Neointima zu prüfen.

Innerhalb der Optischen Kohärenz Tomographie wurden IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index) als potenzielle Surrogatparameter der Neoatherosklerose getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass mit Hilfe dieser beiden Parameter Neoatherosklerose detektiert werden kann, jedoch eine Differenzierung der Ausprägungsgrade innerhalb der Neoatherosklerose nicht möglich ist.

Dies lässt sich aus Tukeys HSD- Test auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ausprägungsgraden erkennen. So kann unter anderem mittels beider Indexe Neointima mit luminalen Schaumzellen nicht von solcher mit luminalen und tiefen Schaumzellen unterschieden werden. Dies kann am frühen Intensitätsverlust des Lichtsignals liegen: Sind luminale Schaumzellen vorhanden, so wird das Signal zum Stent Strut hin immer schwächer und so können tiefe Schaumzellen gar nicht mehr wahrgenommen werden. Dieser Umstand resultiert schließlich in nicht- signifikanten Unterschieden dieser beiden Ausprägungsgrade.

Des Weiteren konnten im Zuge der finalen Analysen Unterschiede zwischen humanen Ergebnissen und solchen aus den Tierversuchen beobachtet werden. Sowohl im IndexA als auch im IndexB weichen die Ergebnisse zwischen den beiden Gruppen zum Teil deutlich voneinander ab. Die Erklärung für diese Beobachtung könnte in den verschiedenen Speicherformen des Cholesterins liegen. In der Publikation von Guyton und Klemp et al. wurde 1994 die Verteilung von Cholesterin in frühen atherosklerotischen Läsionen der humanen Aorta, sogenannten „fatty streaks“, beschrieben. (Guyton & Klemp, 1994) Diese frühe Form der Atherosklerose mit einer hohen Präsenz an Schaumzellen gleicht histopathologisch sehr stark der Neoatherosklerose und soll an dieser Stelle zum Vergleich herangezogen werden. So sind in diesen Läsionen nur 39% des Gesamtcholesterins in freier Form zu finden, während 61% verestert vorliegen. (Rosenfeld et al., 1988) Dies steht im klaren Gegensatz zur Cholesterinverteilung

in Kaninchen-Läsionen, in denen Cholesterin zum überwiegenden Teil in freier, unveresterter Form vorliegt. (Kolodgie et al., 1996) Diese Unterschiede können schließlich auch in unterschiedlichen Intensitätsveränderungen des OCT- Lasers resultieren, wenn dieser durch das Gefäßgewebe strahlt, und so zu verschiedenen Ergebnissen von IndexA und IndexB in Mensch und Kaninchen führen.

Ein großer Unterschied kann in der Analyse des IndexB für die Gruppe „Keine Neoatherosklerose“ gefunden werden. Dieser Unterschied beruht vermutlich nicht nur auf der Cholesterinverteilung sondern auch auf den teils sehr kleinen Messbereichen, den definierten Regions of Interest. Im Zuge der Messungen werden diese im OCT- Bild, wie in der Methodik beschrieben, durch das Markieren eines bestimmten Bereiches mit Hilfe eines Balkens, der wie eine Linie vom Lumen bis zur Stentebene gezogen werden kann, definiert. Ist die Neointima allerdings sehr dünn, ergibt sich eine sehr kleine Region of Interest. Da die Software ImageJ eine bestimmte Anzahl an Punkten pro Fläche misst, werden somit bei einer kleinen Region auch nur sehr wenige Punkte gemessen. Dies erklärt potentielle falsch hohe Ergebnisse. In den humanen Autopsiefällen gab es keine derart kleinen Regions of Interest, da die Neointima, gesund oder erkrankt, stets dicker war als im Tiermodell.

Eine wesentliche Limitation der Optischen Kohärenztomographie stellt die Neovaskularisation dar. Wie in den Ergebnissen bereits veranschaulicht wurde, ist diese ohne den Goldstandard der Histopathologie, welche im Patienten in der Klinik nicht zu Verfügung steht, mit der OCT nicht von der Neoatherosklerose zu unterscheiden. Neovaskularisation kann als Reaktion auf die Stentimplantation auch innerhalb einer gesunden Neointima gebildet werden und hat dort keinerlei klinische Relevanz. Durch die Eröffnung des Stents mit Hilfe eines Ballons, wird das behandelte Gefäß einem großen Druck ausgesetzt. Das Einsprießen der kleinen Blutgefäße in die Neointima kann als Zeichen dieser Belastung während der Implantation gedeutet werden. Dennoch kann sich im Verlauf nach der Implantation eine gesunde Neointima entwickeln.

Das Auftreten der Gefäße wird mit Hilfe der OCT allerdings sehr ähnlich dargestellt wie das Vorhandensein von Schaumzellen. Falsch positive Ergebnisse sind das Resultat.

Schließlich muss noch erwähnt werden, dass die Fallzahl der humanen Autopsiepräparate zu gering ist, um von einer Validierung dieser Methode sprechen zu können.

Neben der hier beschriebenen Neovaskularisation sind noch weitere derzeit bekannte Limitationen zu nennen. In einer histopathologischen Studie über die Differentialdiagnosen in der Interpretation der optischen Kohärenztomographie, zeigten Lutter et al. 2016 eine Vielzahl an Limitationen auf. So zeigte sich eine homogene Zusammensetzung der Neointima in der OCT bei der Kontrolle mit den korrelierten histologischen Präparaten häufig als Anreicherung glatter Muskelzellen, Proteoglykanen und Kollagen, jedoch wurden auch organisierte Thromben gefunden, welche in der OCT ebenso homogen wirkten. Wurde in der OCT eine Schichtung der Neointima gefunden, so wurde in der Histopathologie neben Neovaskularisation und Kalzifikation auch das Auftreten von Gewebe, reich an Proteoglykanen und glatten Muskelzellen gefunden. Desgleichen konnten abgeheilte neointimale Rupturen und Erosionen nachgewiesen werden. Eine starke oberflächliche Auslöschung kann ebenso das Vorhandensein von luminal eingewanderten Makrophagen bedeuten, wie das eines nekrotischen Kerns. Auch auf der Stentstrebenebene konnten solche Unterschiede beobachtet werden. So kann ein stark abgedunkelter Bereich um den Strebenbereich sowohl als Neovaskularisation, aber auch als hypersensitive Vaskulitis oder massive Akkumulation von Inflammationszellen gedeutet werden. (Lutter et al., 2016) Es zeigten sich dementsprechend Limitationen mit weitreichenden Konsequenzen. Ein Beispiel: Während im Rahmen eines oberflächlichen hohen Intensitätsverlustes eine Ansammlung luminaler Schaumzellen eher als Korrelat einer frühen Neoatherosklerose zu werten sind, wäre der differentialdiagnostisch mögliche nekrotische Kern ein Zeichen der weit fortgeschrittenen Erkrankung mit einem potentiellen Rupturrisiko. Ebenso kann eine geschichtete Zusammensetzung der Intima Zeichen einer geheilten Ruptur darstellen, jedoch ist auch das Vorhandensein von Neovaskularisation oder Kalzifikation möglich. Unter Berücksichtigung, dass Letztere für die Neoatherosklerose keinen pathologischen Wert darstellen, eine geheilte Ruptur aber einen sehr fortgeschrittenen Krankheitsverlauf bedeutet, ist auch hier eine Einschränkung dieses Verfahrens gegeben.

Zuletzt soll schließlich auf den Ausblick in die Zukunft eingegangen werden. Zu aller erst ist zu sagen, dass das hier entwickelte Tiermodell weiter getestet und angepasst werden muss. Die beschriebene Gruppe 1 mag gute Resultate zeigen, diese spiegeln allerdings nach wie vor nicht die Neoatherosklerose in ihrer Ausprägung im humanen Gefäß wieder. Dementsprechend wird eine Studie benötigt, um die molekularbiologischen Unterschiede der intravasalen Lipidspeicherung zwischen Mensch und Kaninchen offenzulegen, denn nur so kann die menschliche Neoatherosklerose auch im Kaninchenmodell endgültig verstanden werden.

Auch der Vermessungsprozess in der Grauwertanalyse der Optischen Kohärenztomographie bedarf weiterer Arbeit und einheitlicher Regelungen. Die Messungen selbst sind langwierig und unterliegen in vielerlei Hinsicht dem Urteil des Durchführenden. Die falsch hohen Werte bei geringer neointimaler Dicke können nur durch zusätzliche Gütekriterien, wie einer Mindestanzahl an in die Berechnung einzuschließenden Pixel, vermieden werden. Nur durch eine Vereinfachung und einer Vereinheitlichung kann die Grauwertanalyse im klinischen Alltag einsetzbar werden.

Mit der Entwicklung der Mikro- Optischen Kohärenztomographie (μ OCT), zeigen sich derzeit neue Einblicke in eine Weiterentwicklung der Technik mit einer Auflösung von $1\mu\text{m}$. (Kashiwagi et al., 2014) Während mit der regulären OCT eine Gewebsbeschaffenheit annähernd interpretiert werden kann, so ist mit der μ OCT die Darstellung einzelner Makrophagen und deren eingelagerten Cholesterinkristallen möglich. Dieses vielversprechende Verfahren befindet sich derzeit ebenso in der präklinischen Testphase, wie der Nahinfrarotfluoreszenz-IVUS (NIRF-IVUS). Hierbei handelt es um ein kombiniertes Verfahren aus intravaskulärem Ultraschall und einer Fluoreszenzmessung im Nahinfrarotbereich (650- 900nm). Hierbei werden fluoreszierende Stoffe wie Indocyaningrün, intrakoronar verabreicht und binden schließlich an die lipidgeladenen Makrophagen der neo- bzw. atherosklerotischen Gefäßwand. Durch kombinierte Fluoreszenz- und Ultraschallkatheter kann somit eine Bildgebung auf molekularer Ebene erfolgen. (Abran et al., 2015)

7 Zusammenfassung

Die Neoatherosklerose ist eine neuartige Erkrankung der Herzkranzgefäße nach Stentimplantation. Die mit dieser Krankheit einhergehenden Veränderungen der Neointima sind jedoch auch ein Zeichen der Progression der zugrundeliegenden Atherosklerose. Das Ziel dieser Studie war die Etablierung eines neuen Tiermodells (Kaninchen), um die Neoatherosklerose in Zukunft genauer untersuchen zu können. Zum anderen sollte die optische Kohärenztomographie (OCT) als bildgebende diagnostische Untersuchungsmethode getestet werden. Zu diesem Zweck wurden 15 Kaninchen aus 3 verschiedenen Tiermodellen und 6 humane Autopsiefälle hinsichtlich des Auftretens und der Ausprägung von Neoatherosklerose untersucht. Die 3 präklinischen Tiermodelle unterschieden sich durch deren Cholesterin-Diät und den Zeitpunkt der Denudation. OCT Bilder und histologische Schnitte wurden co-registriert und hinsichtlich des Ausprägungsgrades der Neoatherosklerose in Gruppen eingeteilt und untersucht, um diesen spezifische Werte für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index) zuzuordnen.

Die Ausprägung der Neoatherosklerose war signifikant stärker in derjenigen Tierversuchsgruppe, welche einer langen hochprozentigen Cholesterindiät und einer späten Denudation unterzogen wurde.

Der Cut-Off-Wert der Peak Intensity zur Detektion der Neoatherosklerose in den humanen Autopsiefällen lag bei 117,98 (Spezifität: 59,80%; Sensitivität: 75%) und bei 95,99 im Tiermodell (Spezifität: 62,11%; Sensitivität: 72,90%). Ein Attenuation Index von -0,7345 (Spezifität: 84,31%; Sensitivität: 77,38%) in humanem Gewebe und 0,2414 in Kaninchengewebe (Spezifität: 89,83%; Sensitivität: 45,16%) sprach für Neoatherosklerose.

Desweiteren konnte in der Neovaskularisation in Gewebe ohne Neoatherosklerose eine wesentliche Limitation für das OCT gefunden werden.

Demnach ist es möglich, neoatherosklerotische Läsionen im Kaninchenmodell durch hohe Cholesterinzufuhr und Schädigung des Endothels durch wiederholte Denudation nach Stent Implantation nachzubilden.

Eine Detektion von Neoatherosklerose mit Hilfe des OCT's ist möglich, jedoch wird diese durch das Vorhandensein von Neovaskularisation limitiert. Eine

Unterscheidung zwischen verschiedenen Ausbildungsgraden innerhalb der Neoatherosklerose ist nicht möglich.

8 Summary

Neoatherosclerosis has been recognized as important disease entity, representing an additional manifestation of atherosclerotic disease found in nascent neointimal tissue in the aftermath of stent implantation. This study aimed to establish a novel animal model of neoatherosclerosis and to investigate the feasibility in detecting neoatherosclerosis using optical coherence tomography (OCT).

Stented arteries of 15 rabbits in 3 different study groups and 6 autopsy cases with neoatherosclerosis were evaluated. The 3 different preclinical study groups differed in the sequence of vascular interventions and duration of cholesterol diet. OCT frames and histological cross sections were co-registered and neoatherosclerotic changes assessed using computational modelling of peak intensity and attenuation index of OCT light.

The presence of neoatherosclerosis was significantly increased in rabbits with long-term high dose - cholesterol diet and repeat denudation of the endothelial layer.

The cut-off in peak intensity for detecting neoatherosclerosis in human autopsy cases was 117.98 (Specificity: 59.80%; Sensitivity: 75%) and 95.99 in rabbits (Specificity: 62.11%; Sensitivity: 72.90%). The attenuation index was -0.7345 (Specificity: 84.31%; Sensitivity: 77.38%) in humans and 0.2414 in rabbits (Specificity: 89.83%; Sensitivity: 45.16%).

Furthermore neovascularisation in tissue without neoatherosclerosis remains an important limitation of detecting neoatherosclerosis with optical coherence tomography.

In conclusion neoatherosclerotic lesions can be established in a preclinical rabbit model of hypercholesterolemic feeding and repeat arterial denudation.

While the detection of neoatherosclerotic change was feasible using OCT imaging, limitations remain in the differentiation of advanced stages of neoatherosclerosis.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Histopathologie der Atherosklerose und Neoatherosklerose (EZM= Extrazellulärmatrix; NK= Nekrotischer Kern)	16
Abbildung 2-2: Vergleich der Atherosklerose mit der Neoatherosklerose (Pfeile: Schaumzellen; LK: Lipidkern).....	18
Abbildung 2-3: Bildsequenz im OCT (li.: Aufnahme aus humanem Koronargefäß; re.: Modelldarstellung)	20
Abbildung 2-4: Vergleich gesunden und kranken Gewebes in Histologie (oben, human) und OCT (unten).....	21
Abbildung 3-1: Meilensteine	22
Abbildung 3-2: Forschungsplan.....	23
Abbildung 3-3: Vergleich eines atherosklerotischen mit einem neoatherosklerotischen Tiermodell	24
Abbildung 4-1: Tierversuchsgruppen. Die Gruppe 1(a) weist eine sehr späte Denudation auf im Vergleich zur Gruppe 2(b). Die Gruppe 3(c) unterscheidet sich im Wesentlichen durch die bedeutend kürzere 1%-Cholesterin Diät von den anderen beiden Gruppen.....	28
Abbildung 4-2: Schnittebenen im Gefäß	33
Abbildung 4-3: Kalzifikationen in einem nekrotischen Kern (dunkelviolet; siehe Pfeile).36	
Abbildung 4-4: Gruppeneinteilung der „Regions of Interest“ - Histologie und passende OCT- Areale im Vergleich in Mensch und Kaninchen.	44
Abbildung 4-5: Beispiel für die korrekte Co-Registrierung von OCT und Histologie.....	46
Abbildung 4-6: Messung des Attenuation Index und der Peak Intensity mittels ImageJ. (A: Die Region of Interest ist als gelber Balken zu erkennen; B: Die Peak Intensity ist in diesem Diagramm durch den roten Pfeil markiert; C: Der Attenuation Index ergibt sich aus der exponentiellen Darstellung der Funktion der Grauwerte.)	47
Abbildung 5-1: Regressionsanalyse der 3 Gruppen im Tiermodell. Details siehe Tabelle 5-3	53
Abbildung 5-2: Repräsentative histologische Gefäßquerschnitte der drei Tiermodelle im Vergleich	54
Abbildung 5-3: Boxplot Grafik zur Tabelle 5-4.....	55
Abbildung 5-4: Boxplot Grafik zur Tabelle 5-5.....	56
Abbildung 5-5: Boxplot Grafik zur Tabelle 5-6.....	57
Abbildung 5-6: Verschiedene Auffälligkeiten in der Histologie, typisch für die Neoatherosklerose. Links: HE- Färbung mit Mikrokalzifikationen (A – grüne Pfeile) und Inflammation um den Stent- Strut (B). Rechts: Movat Pentachrom- Färbung mit neoatherosklerotischer Schichtung (C), Cholesterinkristallen (A,D - durch rote Pfeile gekennzeichnet) und Neovaskularisation mit Einblutungen (E).....	58
Abbildung 5-7: Darstellung der prozentuellen Verteilung verschiedener Begleiterscheinungen in den drei Tierversuchsgruppen	60
Abbildung 5-8: Grafik zur Tabelle 5-8	62
Abbildung 5-9: Cholesterin Plasma Werte der drei Tierversuchsgruppen.....	62
Abbildung 5-10: Cholesterin Plasma Werte der drei Tierversuchsgruppen als Area Under Curve (AUC)	64
Abbildung 5-11: Immunhistochemische Kaninchenpräparate in RAM11 Färbung (A,B,C in 2000- facher Vergrößerung; a,b,c in 20000- facher Vergrößerung. A und B (bzw. a und b) zeigen RAM11- Präparate, C (bzw. c) die Kontrolle	65
Abbildung 5-12: Immunhistochemische humane Präparate in CD68 Färbung (A,B,C in 2000- facher Vergrößerung; a,b,c in 10000- facher Vergrößerung. A und B (bzw. a und b) zeigen CV68- Präparate, C (bzw. c) die Kontrolle	67
Abbildung 5-13: ROC- Kurve der Kaninchen- Präparate für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index)	68

Abbildung 5-14: ROC- Kurve der humanen Präparate für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index)	69
Abbildung 5-15: Grafische Darstellung der in Tabelle 5-10 aufgeführten Ergebnisse für den IndexA (Peak Intensity). Legende siehe Tabelle 5-10	71
Abbildung 5-16: Grafische Darstellung der in Tabelle 5-13 aufgeführten Ergebnisse für den IndexB (Attenuation Index). Legende siehe Tabelle 5-13	73
Abbildung 5-17: Basischarakteristika der Teilnehmer (n=6).....	77
Abbildung 5-18: Absolutergebnis der Neoatherosklerose Messungen der klinischen Patientenfälle im OCT	77
Abbildung 5-19: Einzelergebnisse der OCT Messungen der klinischen Patientenfälle	78
Abbildung 5-20: Vergleich von Neoatherosklerose und Neovaskularisation in zwei Querschnitten humaner Herzkranzgefäße (SZ= Schaumzellen; NV= Neovaskularisation)	79
Abbildung 5-21: Grafische Darstellung der Limitation der Neovaskularisation anhand der Peak Intensity (Legende siehe Tabelle 5-18).....	81
Abbildung 5-22: Grafische Darstellung der Limitation der Neovaskularisation anhand des Attenuation Index (1: Keine Neoatherosklerose; 2: Luminale Schaumzellen; 3: Tiefe Schaumzellen; 4: Luminale und tiefe Schaumzellen; 5: Neovaskularisation ohne Neoatherosklerose).....	84

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: MMA- Einbettung nach Milz& Putz (1994)	32
Tabelle 4-2: Movat Pentachrom- Färbung für MMA.....	35
Tabelle 4-3: HE- Färbung für MMA	37
Tabelle 4-4: CD68- immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Makrophagen in humanem Gewebe.....	39
Tabelle 4-5: RAM11- immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Makrophagen im Kaninchengewebe.....	40
Tabelle 4-6: Neoatherosklerose Score, bestehend aus zwei Beurteilungen: Die Evaluation der Neoatherosklerose bezogen auf die Zirkumferenz im Gefäß und die der Neoatherosklerose bezogen auf die in die Tiefe (von luminal) reichenden Veränderungen.....	42
Tabelle 4-7: Score zur Beurteilung der Inflammation in der Neointima	42
Tabelle 4-8: Histopathologische Begleiterscheinungen der Neoatherosklerose.....	43
Tabelle 5-1: Morphometrie der Präparate aus Kaninchen in OCT und Histologie	52
Tabelle 5-2: Morphometrie der humanen Präparate in OCT und Histologie.....	53
Tabelle 5-3: Korrelationskoeffizient der 3 Gruppen im Tiermodell.....	54
Tabelle 5-4: Ergebnisse des Scores „Schaumzellen in der Zirkumferenz des Gefäßes“ ..	55
Tabelle 5-5: Ergebnisse des Scores „Schaumzellen in der Tiefe des Gefäßes“	56
Tabelle 5-6: Ergebnisse des Scores zur Beurteilung der Inflammation.....	57
Tabelle 5-7: Beurteilung der Begleiterscheinungen der Neoatherosklerose (0= Merkmal vorhanden; 1= Merkmal nicht vorhanden).....	59
Tabelle 5-8: Ergebnisse der Auswertung der humanen histologischen Gefäßquerschnitte	61
Tabelle 5-9: Spezifität und Sensitivität sowie positiv- und negativ- prädiktive Werte für IndexA (Peak Intensity) und IndexB (Attenuation Index) in Kaninchen und Mensch	69
Tabelle 5-10: Mittelwerte und Standardabweichung der Ergebnisse aus tierischem und humanem Gewebe für IndexA.....	70
Tabelle 5-11: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade im Tiermodell.....	72
Tabelle 5-12: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade der humanen Daten.....	72
Tabelle 5-13: Mittelwerte und Standardabweichung der Ergebnisse aus tierischem und humanem Gewebe für IndexB (Attenuation Index).....	73

Tabelle 5-14: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade der Neoatherosklerose im Tiermodell.	75
Tabelle 5-15: Darstellung der signifikanten Unterschiede der einzelnen Ausprägungsgrade der humanen Daten.....	75
Tabelle 5-16: Absolutergebnis der Neoatherosklerose Messungen der klinischen Patientenfälle im OCT (in %)	77
Tabelle 5-17: Einzelergebnisse der OCT Messungen der klinischen Patientenfälle (in %).....	78
Tabelle 5-18: Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Ausprägungsgrade für den IndexA (Peak Intensity) in humanen Autopsiepräparaten und Tierversuchsgruppen.....	80
Tabelle 5-19: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus dem Tierversuch unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexA.....	82
Tabelle 5-20: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus den humanen Autopsiepräparaten unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexA	82
Tabelle 5-21: Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Ausprägungsgrade für den IndexB (Attenuation Index) in humanen Autopsiepräparaten und Tierversuchsgruppen.....	83
Tabelle 5-22: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus dem Tierversuch unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexB.....	85
Tabelle 5-23: Darstellung der signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus den humanen Autopsiepräparaten unter Berücksichtigung der Limitation Neovaskularisation im IndexB	85

9.3 Abkürzungsverzeichnis

A.. <i>Arteria</i>
AG. <i>Arbeitsgruppe</i>
Aqua dest.. <i>Aqua destillata</i>
BMS. <i>Bare Metal Stent</i>
CD68. <i>Cluster of Differentiation 68</i>
CHO. <i>Cholesterin</i>
DES. <i>Drug Eluting Stent</i>
EEL. <i>Lamina elastica externa</i>
EZM. <i>Extrazellulärmatrix</i>
FDA. <i>Food and Drug Administration</i>
FeCl ₃ . <i>Eisen-(III)-Chlorid</i>
HCl. <i>Salzsäure</i>
HE. <i>Hämatoxylin Eosin</i>
HSD. <i>Honestly Significant Difference</i>
IEL. <i>Lamina elastica interna</i>
IL-1. <i>Interleukin-1</i>
IVUS. <i>Intravaskulärer Ultraschall</i>
KGW. <i>Körpergewicht</i>
LM. <i>Lichtmikroskop</i>

MMA. *Methylmethacrylat*
μOCT. *Mikro- Optische Kohärenztomographie*

NK. *Nekrotischer Kern*
NIRF. *Nahinfrarotfluoreszenz*
NIRS. *Nahinfrarotspektroskopie*
NV. *Neovaskularisation*

OCT. *Optische Kohärenztomographie*

PCI. *Perkutane Koronarintervention*

RAM11. *Rabbit Makrophage Marker*

SZ. *Schaumzellen*

TNF. *Tumornekrosefaktor*

9.4 Literaturverzeichnis

- Abran, M., Stahli, B. E., Merlet, N., Mihalache-Avram, T., Mecteau, M., Rheume, E., . . . Lesage, F. (2015). Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomedical Optics Express*, *6*(10), 3989–3999. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.003989>
- Awata, M., Kotani, J.-i., Uematsu, M., Morozumi, T., Watanabe, T., Onishi, T., . . . Nagata, S. (2007). Serial angioscopic evidence of incomplete neointimal coverage after sirolimus-eluting stent implantation: Comparison with bare-metal stents. *Circulation*, *116*(8), 910–916. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609057>
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. [Renu], & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*, *114*(12), 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
- Bühling, K., Lepenies, J., & Witt, K. (2008). *Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie: Grundlagen der Pathologie des Kreislaufs* (2nd ed.). München: Urban und Fischer in Elsevier.
- Camenzind, E., Steg, P. G., & Wijns, W. (2007). Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: A cause for concern. *Circulation*, *115*(11), 1440-55; discussion 1455. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.666800>
- Daemen, J., Wenaweser, P., Tsuchida, K., Abrecht, L., Vaina, S., Morger, C., . . . Serruys, P. W. [Patrick W.] (2007). Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: Data from a large two-institutional cohort study. *Lancet (London, England)*, *369*(9562), 667–678. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60314-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60314-6)
- Dietz, R., & Rauch, B. (2003). Leitlinien zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz - und Kreislaufforschung (DGK). *Zeitschrift für Kardiologie*. (92), 501–521.

- Erdmann, E. (Ed.). (2011). *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße ; mit 185 Tabellen ; [Therapie evidenz-basiert (8., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl.)*. Heidelberg: Springer Medizin.
- Finn, A. V., Joner, M., Nakazawa, G., Kolodgie, F., Newell, J., John, M. C., . . . Virmani, R. [Renu] (2007). Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: Strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*, *115*(18), 2435–2441.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.693739>
- Finn, A. V., Nakazawa, G., Joner, M., Kolodgie, F. D. [Frank D.], Mont, E. K., Gold, H. K., & Virmani, R. [Renu] (2007). Vascular responses to drug eluting stents: Importance of delayed healing. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(7), 1500–1510.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.144220>
- Fischman, D. L., Leon, M. B., Baim, D. S., Schatz, R. A., Savage, M. P., Penn, I., . . . Nobuyoshi, M. (1994). A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England Journal of Medicine*, *331*(8), 496–501.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199408253310802>
- Foley, D. P., Melkert, R., Umans, V. A., Jaegere, P. P. de [P. P.], Strikwerda, S., Feyter, P. J. de, & Serruys, P. W. (1995). Differences in restenosis propensity of devices for transluminal coronary intervention. A quantitative angiographic comparison of balloon angioplasty, directional atherectomy, stent implantation and excimer laser angioplasty. Carport, MERCATOR, MARCATOR, PARK, and BENESTENT Trial Groups. *European Heart Journal*, *16*(10), 1331–1346.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a060740>
- Gardner, C. M., Tan, H., Hull, E. L., Lisauskas, J. B., Sum, S. T., Meese, T. M., . . . Muller, J. E. (2008). Detection of lipid core coronary plaques in autopsy specimens with a novel catheter-based near-infrared spectroscopy system. *JACC. Cardiovascular Imaging*, *1*(5), 638–648.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2008.06.001>
- Gonzalo, N., Serruys, P. W. [Patrick W.], Okamura, T., van Beusekom, H. M., Garcia-Garcia, H. M., van Soest, G., . . . Regar, E. (2009). Optical coherence tomography patterns of stent restenosis. *American Heart Journal*, *158*(2), 284–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2009.06.004>
- Gruntzig, A. (1978). Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet (London, England)*, *1*(8058), 263. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90500-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90500-7)
- Guagliumi, G., Sirbu, V., Musumeci, G., Gerber, R., Biondi-Zoccai, G., Ikejima, H., . . . Stone, G. W. (2012). Examination of the in vivo mechanisms of late drug-eluting stent thrombosis: Findings from optical coherence tomography and intravascular ultrasound imaging. *JACC. Cardiovascular Interventions*, *5*(1), 12–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jcin.2011.09.018>
- Guyton, J. R., & Klemp, K. F. (1994). Development of the atherosclerotic core region. Chemical and ultrastructural analysis of microdissected

- atherosclerotic lesions from human aorta. *Arteriosclerosis and Thrombosis : a Journal of Vascular Biology*, 14(8), 1305–1314.
- Hess, O. M. (2000). *Herzkatheter: Einsatz in Diagnostik und Therapie*.
- Inoue, K., Abe, K., Ando, K., Shirai, S., Nishiyama, K., Nakanishi, M., . . . Miyamoto, T. A. (2004). Pathological analyses of long-term intracoronary Palmaz-Schatz stenting; Is its efficacy permanent? *Cardiovascular Pathology : the Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 13(2), 109–115. [https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(03\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(03)00132-7)
- Joner, M., Finn, A. V., Farb, A., Mont, E. K., Kolodgie, F. D. [Frank D.], Ladich, E., . . . Virmani, R. [Renu] (2006). Pathology of drug-eluting stents in humans: Delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(1), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.03.042>
- Joner, M., Nakazawa, G., Finn, A. V., Quee, S. C., Coleman, L., Acampado, E., . . . Virmani, R. [Renu] (2008). Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(5), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.04.030>
- Kang, S.-J., Lee, C. W., Song, H., Ahn, J.-M., Kim, W.-J., Lee, J.-Y., . . . Park, S.-J. [Seung-Jung] (2013). Oct analysis in patients with very late stent thrombosis. *JACC. Cardiovascular Imaging*, 6(6), 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2013.02.006>
- Kang, S.-J., Mintz, G. S., Akasaka, T., Park, D.-W., Lee, J.-Y., Kim, W.-J., . . . Park, S.-J. [Seung-Jung] (2011). Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation*, 123(25), 2954–2963. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.988436>
- Kashiwagi, M., Liu, L., Chu, K. K., Sun, C.-H., Tanaka, A., Gardecki, J. A., & Tearney, G. J. (2014). Feasibility of the assessment of cholesterol crystals in human macrophages using micro optical coherence tomography. *PloS One*, 9(7), e102669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102669>
- Kimura, T., Abe, K., Shizuta, S., Odashiro, K., Yoshida, Y., Sakai, K., . . . Nobuyoshi, M. [Masakiyo] (2002). Long-term clinical and angiographic follow-up after coronary stent placement in native coronary arteries. *Circulation*, 105(25), 2986–2991. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000019743.11941.3b>
- Kolodgie, F. D., Katocs, A. S., Largis, E. E., Wrenn, S. M., Cornhill, J. F., Herderick, E. E., . . . Virmani, R. (1996). Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16(12), 1454–1464.
- Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2045–2051. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705>
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135–1143. <https://doi.org/10.1161/hc0902.104353>

- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., Simone, G. de, . . . Wylie-Rosett, J. (2010). Heart disease and stroke statistics--2010 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, *121*(7), e46-e215. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192667>
- Lutter, C., Mori, H., Yahagi, K., Ladich, E., Joner, M., Kutys, R., . . . Finn, A. V. (2016). Histopathological Differential Diagnosis of Optical Coherence Tomographic Image Interpretation After Stenting. *JACC. Cardiovascular Interventions*, *9*(24), 2511–2523. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2016.09.016>
- Madder, R. D., Khan, M., Husaini, M., Chi, M., Dionne, S., VanOosterhout, S., . . . Jacoby, M. (2016). Combined Near-Infrared Spectroscopy and Intravascular Ultrasound Imaging of Pre-Existing Coronary Artery Stents: Can Near-Infrared Spectroscopy Reliably Detect Neointimal Hyperplasia? *Circulation. Cardiovascular Imaging*, *9*(1). <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.115.003576>
- Malle, C. (2013). *Beurteilung der Stenteinheilung mittels Optischer Kohärenztomographie im atherosklerotischen Kaninchenmodell und die Übertragbarkeit auf den Menschen*. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss., 2013. München: Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität. Retrieved from <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-156592>
- Malle, C., Tada, T., Steigerwald, K., Ughi, G. J., Schuster, T., Nakano, M., . . . Joner, M. (2013). Tissue characterization after drug-eluting stent implantation using optical coherence tomography. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *33*(6), 1376–1383. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301227>
- Morice, M.-C., Serruys, P. W. [Patrick W.], Sousa, J. E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., . . . Falotico, R. (2002). A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *The New England Journal of Medicine*, *346*(23), 1773–1780. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012843>
- Nakazawa, G., Finn, A. V., & Virmani, R. [Renu] (2007). Vascular pathology of drug-eluting stents. *Herz*, *32*(4), 274–280. <https://doi.org/10.1007/s00059-007-2997-9>
- Nakazawa, G., Ladich, E., Finn, A. V., & Virmani, R. [Renu] (2008). Pathophysiology of vascular healing and stent mediated arterial injury. *EuroIntervention : Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, *4 Suppl C*, C7-10.
- Nakazawa, G., Otsuka, F., Nakano, M., Vorpahl, M., Yazdani, S. K., Ladich, E., . . . Virmani, R. [Renu] (2011). The pathology of neointimal hyperplasia in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology*, *57*(11), 1314–1322. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.01.011>
- Otsuka, F., Finn, A. V., Yazdani, S. K., Nakano, M., Kolodgie, F. D. [Frank D.], & Virmani, R. [Renu] (2012). The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. *Nature Reviews. Cardiology*, *9*(8), 439–453. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.64>

- Pfisterer, M., Brunner-La Rocca, H. P., Buser, P. T., Rickenbacher, P., Hunziker, P., Mueller, C., . . . Kaiser, C. (2006). Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: An observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *Journal of the American College of Cardiology*, *48*(12), 2584–2591. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.10.026>
- Ponzalo, N., Serruys, P. W., Macaca, C., & Regar, E. (2010). Optical coherence tomography in the study of coronary stenosis. *Coronary stenosis - imaging, structure and physiology*, 219–232.
- Prati, F., Guagliumi, G., Mintz, G. S., Costa, M., Regar, E., Akasaka, T., . . . Di Mario, C. (2012). Expert review document part 2: Methodology, terminology and clinical applications of optical coherence tomography for the assessment of interventional procedures. *European Heart Journal*, *33*(20), 2513–2520. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs095>
- Ramcharitar, S., Garcia-Garcia, H. M., Nakazawa, G., Kukreja, N., Ligthart, J., Virmani, R. [Renu], & Serruys, P. W. [Patrick W.] (2007). Ultrasonic and pathological evidence of a neo-intimal plaque rupture in patients with bare metal stents. *EuroIntervention : Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, *3*(2), 290–291.
- Rosenfeld, M. E., Chait, A., Bierman, E. L., King, W., Goodwin, P., Walden, C. E., & Ross, R. (1988). Lipid composition of aorta of Watanabe heritable hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. Plasma lipid composition determines aortic lipid composition of hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, *8*(4), 338–347.
- Ross, R., & Glomset, J. A. (1976a). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *The New England Journal of Medicine*, *295*(7), 369–377. <https://doi.org/10.1056/NEJM197608122950707>
- Ross, R., & Glomset, J. A. (1976b). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *The New England Journal of Medicine*, *295*(8), 420–425. <https://doi.org/10.1056/NEJM197608192950805>
- Rousseau, H., Puel, J., Joffre, F., Sigwart, U., Duboucher, C., Imbert, C., . . . Wallsten, H. (1987). Self-expanding endovascular prosthesis: An experimental study. *Radiology*, *164*(3), 709–714. <https://doi.org/10.1148/radiology.164.3.3303120>
- Serruys, P. W. (2002). Arts I -- the rapamycin eluting stent; ARTS II -- the rosy prophecy. *European Heart Journal*, *23*(10), 757–759. <https://doi.org/10.1053/euhj.2001.3020>
- Serruys, P. W., Jaegere, P. de, Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., . . . Materne, P. (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *The New England Journal of Medicine*, *331*(8), 489–495. <https://doi.org/10.1056/NEJM199408253310801>
- Sigwart, U., Puel, J., Mirkovitch, V., Joffre, F., & Kappenberger, L. (1987). Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *The New England Journal of Medicine*, *316*(12), 701–706. <https://doi.org/10.1056/NEJM198703193161201>
- Stone, G. W., Moses, J. W., Ellis, S. G., Schofer, J., Dawkins, K. D., Morice, M.-C., . . . Leon, M. B. [Martin] (2007). Safety and efficacy of

- sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *The New England Journal of Medicine*, 356(10), 998–1008. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067193>
- Suzuki, Y., Ikeno, F., Koizumi, T., Tio, F., Yeung, A. C., Yock, P. G., . . . Fearon, W. F. (2008). In vivo comparison between optical coherence tomography and intravascular ultrasound for detecting small degrees of in-stent neointima after stent implantation. *JACC. Cardiovascular Interventions*, 1(2), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2007.12.007>
- Takano, M., Yamamoto, M., Inami, S., Murakami, D., Ohba, T., Seino, Y., & Mizuno, K. (2009). Appearance of lipid-laden intima and neovascularization after implantation of bare-metal stents extended late-phase observation by intracoronary optical coherence tomography. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.032>
- Waxman, S., Dixon, S. R., L'Allier, P., Moses, J. W., Petersen, J. L., Cutlip, D., . . . Krucoff, M. W. (2009). In vivo validation of a catheter-based near-infrared spectroscopy system for detection of lipid core coronary plaques: Initial results of the SPECTACL study. *JACC. Cardiovascular Imaging*, 2(7), 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2009.05.001>
- Waxman, S., Ishibashi, F., & Caplan, J. D. (2007). Rationale and use of near-infrared spectroscopy for detection of lipid-rich and vulnerable plaques. *Journal of Nuclear Cardiology : Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, 14(5), 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.nuclcard.2007.08.001>
- Windecker, S., Kolh, P., Alfonso, F., Collet, J.-P., Cremer, J., Falk, V., . . . Witkowski, A. (2015). 2014 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization. *EuroIntervention : Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, 10(9), 1024–1094. https://doi.org/10.4244/EIJY14M09_01
- World Health Organization (2013). Fact Sheet °317 - Cardiovascular diseases (CVDs).
- Yahagi, K., Kolodgie, F. D. [Frank D.], Otsuka, F., Finn, A. V., Davis, H. R., Joner, M., & Virmani, R. [Renu] (2016). Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nature Reviews. Cardiology*, 13(2), 79–98. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.164>
- Yamamoto, M., Takano, M., Murakami, D., Inami, T., Kobayashi, N., Shirakabe, A., . . . Mizuno, K. (2011). Impact of small thrombus formation in restenotic bare-metal stent lesions associated with acute coronary syndrome: Identification by optical coherence tomography. *International Journal of Cardiology*, 149(2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.12.027>
- Yonetsu, T., Kato, K., Kim, S.-J., Xing, L., Jia, H., McNulty, I., . . . Jang, I.-K. (2012). Predictors for neoatherosclerosis: A retrospective observational study from the optical coherence tomography registry. *Circulation. Cardiovascular Imaging*, 5(5), 660–666. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.112.976167>

9.5 Implantationsmatrix des Tierversuchs

<i>Tiernummer</i>	<i>Studientyp</i>	<i>Zeitpunkt</i>	<i>Start 1% CHO</i>	<i>Denudation + Stent Implantation</i>	<i>Wechsel zu .025% CHO</i>	<i>2. Denudation</i>	<i>Datum der Explantation</i>
1	328	LM	91 Tage	10.10.2013	17.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
2	329	LM	91 Tage	10.10.2013	17.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
3	330	LM	91 Tage	10.10.2013	17.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
4	331	LM	91 Tage	10.10.2013	17.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
5	332	LM	91 Tage	10.10.2013	17.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
6	333	LM	91 Tage	10.10.2013	18.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
7	334	LM	91 Tage	10.10.2013	18.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
8	335	LM	91 Tage	10.10.2013	18.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
9	336	LM	91 Tage	10.10.2013	18.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
10	337	LM	91 Tage	10.10.2013	18.10.2013	14.11.2013	09.01.2014
11	338	LM	91 Tage	10.10.2013	15.11.2013	17.10.2013	10.01.2014
12	339	LM	91 Tage	10.10.2013	15.11.2013	17.10.2013	10.01.2014
13	340	LM	91 Tage	10.10.2013	15.11.2013	17.10.2013	10.01.2014
14	341	LM	91 Tage	10.10.2013	15.11.2013	17.10.2013	10.01.2014
15	342	LM	91 Tage	10.10.2013	15.11.2013	17.10.2013	10.01.2014

9.6 Protokolle zur Herstellung von Färbelösungen

9.6.1 Lösungen für die Movat Pentachrom- Färbung

9.6.1.1 Working Hematoxylin- Lösung

- 30 ml 10 % alkoholisches Hämatoxylin
- 30 ml 96 % Ethanol
- 30 ml 10 % Eisen-III-Chlorid

- 30 ml Verhoeff`s Jod-Lösung
- 10 % alkoholisches Hämatoxylin
 - 10 g Hämatoxylin
 - 100 ml 100 % Ethanol
- Verhoeff`s Jod-Lösung
 - 2 g Jodkristalle
 - 4 g Kaliumjodid
 - 100 ml deionisiertes Wasser
- 10 % bzw. 2 % Eisen-III-Chlorid
 - 10 g bzw. 2 g Eisen-III-Chlorid
 - 100 ml deionisiertes Wasser

9.6.1.2 Natriumthiosulfat

- 5 g Natriumthiosulfat
- 100 ml deionisiertes Wasser

9.6.1.3 1% Alzianblau

- 1 g Alzianblau
- 100 ml 1 % Essigsäure

9.6.1.4 Woodstain Scarlet Working Solution

- 80 ml der Lösung „A“
 - 20 ml der Lösung „B“ o Lösung „A“
 - 0,1 g Crocein Scarlet
 - 99,5 ml deionisiertes Wasser
 - 0,5 ml Eisessig
- Lösung „B“
 - 0,1 g Acid Fuchsin
 - 99,5 ml deionisiertes Wasser
 - 0,5 ml Eisessig

9.6.1.5 0,5% Essigsäure

- 0,5 ml Eisessig
- 99,5 ml deionisiertes Wasser

9.6.1.6 5% Phosphorwolframsäure

- 5 g Phosphorwolframsäure
- 100 ml deionisiertes Wasser

9.6.1.7 alkoholische Safran- Lösung

- 6 g Safran du Gatinais

- 100 ml 100 % Ethanol

gut vermischen, Lösung über Nacht stehen lassen und am nächsten Tag dekantieren

9.6.2 Lösungen für die Hämatoxylin- Eosin- Färbung

9.6.2.1 Eosin Y/Phloxine B Working Solution

- 100 ml 1 % Eosin Y Stammlösung

- 10 ml 1 % Phloxin B Stammlösung

- 780 ml 95 % EtOH

- 4 ml Eisessig

- 1 % Eosin Y Stammlösung

- 1 g Eosin Y, wasserlöslich

- 100 ml deionisiertes Wasser

- 1 % Phloxin B Stammlösung

- 1 g Phloxin B

- 100 ml deionisiertes Wasser

9.6.2.2 Ammoniumwasser

4-5 Tropfen konzentriertes Ammoniumhydroxid in 1000ml Leitungswasser lösen

9.7 Protokoll zur Herstellung von MMA- Lösungen

Herstellung des MMA-Polymerisationsgemisches:

- 200 ml Methylmethacrylat
- 7 g getrocknetes Benzoylperoxid Pulver
- 50 ml Nonylphenyl-polyethylenglykol Acetat

9.8 Protokoll zur Herstellung von Haupt's Adhäsions Reagenz

- 1 g Gelatine in 100 ml Aqua dest bei 30 °C lösen
- 2 g Phenol
- 15 ml Glycerol

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	27.12.1988
Geburtsort	Wien
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig

Ausbildung

1995 – 1999	Volksschule Baden bei Wien (Österreich)
1999 – 2007	BG/ BRG Biondegasse Baden bei Wien (Österreich)
Juli 2007 – August 2007	Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Österreichischen Roten Kreuz
2007 – 2009	Studium der Geologie an der Universität Wien
Okt. 2009 – Dez. 2015	Studium der Medizin an der LMU München
Nov. 2014 – Okt. 2015	Praktisches Jahr (1. Tertial: Anästhesiologische Klinik Großhadern; 2. Tertial: Viszeral-, Unfall- und Gefäßchirurgie Helios Klinik Pasing; 3. Tertial: Kardiologie Inselspital Bern)
22. Dezember 2015	Approbation als Ärztin

Berufliche Erfahrung

2006 – 2015	Ehrenamtliche Mitarbeiterin des Österreichischen Roten Kreuzes
Frühjahr 2009	Medizinisches Praktikum im AKH Wien
August/ September 2010	Pflegepraktikum im Landeskrankenhaus Thermenregion Mödling
März/ April 2011	Pflegepraktikum im Landeskrankenhaus Thermenregion Baden
Februar/ März 2012	Famulatur im Krankenhaus Hietzing Wien (Kardiologie)
September/ Oktober 2012	Famulatur im Krankenhaus Hietzing Wien (Kardiologie)
Februar/ März 2013	Famulatur im Deutschen Herzzentrum München
August/ September 2013	Famulatur im Deutschen Herzzentrum München

März - Mai 2014	Forschungsaufenthalt in Gaithersburg, MD, USA bei CVPPath Institute Inc.
April 2016 – November 2017	Assistenzärztin am Unfallkrankenhaus Berlin in der Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und Schmerzmedizin unter Prof. Dr. med. Walter Schaffartzik
Februar 2018 – heute	Assistenzärztin am Kantonspital Aarau in der Klinik für Anästhesie unter Prof. Dr. med. Christoph Kindler

11 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Michael Joner bedanken, der mir nicht nur diese Doktorarbeit, sondern im Zuge der zugrundeliegenden Forschung in den Vereinigten Staaten auch eine ganz besondere Zeit ermöglichte, in der er mir das für die Wissenschaft notwendige Handwerkszeug beibrachte. Danke!

Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. vet. Kristin Steigerwald bedanken. Sie ging mit mir die ersten Schritte in der Forschung und half mir, auf diesem Gebiet Laufen zu lernen. Mit ihrer herzlichen Art wurde sie schnell mehr als nur eine Betreuerin und auch nach der Auflösung der deutschen Arbeitsgruppe, stand sie stets mit Rat und Tat an meiner Seite.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Adnan Kastrati und Dr. med. Robert Byrne PhD für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Vor Allem aber möchte ich meinen Eltern danken. Sie haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Ihr Glaube an mich und an die Fertigstellung dieser Arbeit war und ist stets unerschütterlich, auch wenn ich diesen Glauben zeitweise verloren hatte.

Last but definitely not least I want to thank Dr. Renu Virmani and all the people from CV Path. I had an awesome time with you. I learned and laughed a lot and I am thankful for every single day I spent with you. Thank you!