

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen
Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ-Prof. Dr. A. Schömig)

Intravaskuläre Zellimplantation mittels Dispatch-Katheter nach PTCA in porcine Femoral- und Koronargefäße

Peter Stefan Springer

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann, Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg (schriftliche Beurteilung)
2. Univ.-Prof. A. Kastrati
3. Priv.-Doz. I. Ott (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 31.05.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	5
2. Grundlagen	7
2.1. Entstehung der Restenose	7
2.1.1. Early recoil und Remodelling der Gefäßwand	7
2.1.2. Thrombusbildung und -organisation	8
2.1.3. Neointima-Hyperplasie	8
2.2. Bisherige therapeutische Ansätze	10
2.2.1. Alternative Verfahren	10
2.2.2. Stentimplantation	10
2.2.3. Medikamentöse Therapieansätze	11
2.2.4. Ansätze der lokalen Applikation	11
2.2.5. Applikation ionisierender Strahlung	13
3. Fragestellung	14
4. Material und Methodik	15
4.1. Herstellung der Zellsuspension	15
4.1.1. Zellkultur	15
4.1.2. DiI-Färbung	16
4.2. Tiervorbereitung	17
4.2.1. Tierart	17
4.2.2. Medikation und Anästhesie	17
4.3. Zellapplikation in die Koronargefäße	18
4.3.1. Operative Zugänge	18
4.3.2. Gefäßwandverletzung durch Dilatation	19
4.3.3. Applikation der Zellsuspension	20
4.4. Zellapplikation in die Femoralgefäße	22
4.4.1. Operativer Zugang	22
4.4.2. Gefäßwandverletzung durch Dilatation	23
4.4.3. Zellapplikation	23
4.5. Herstellung der Gefrierschnitte	24
4.6. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	25
4.7. Methoden der statistischen Auswertung	25

5. Ergebnisse	26
5.1. Gesamtübersicht des Cell-seeding	26
5.2. Einfluss des Zelltyps auf das Cell-seeding	27
5.3. Einfluss der Stehzeit des Schweins auf das Cell-seeding	28
5.4. Einfluss der Art der Vorverletzung auf das Cell-seeding	29
5.5. Einfluss der Zellkonzentrationen auf das Cell-seeding	30
5.6. Vergleich des Cell-seeding in die Koronargefäße zu den Femoralgefäßen	34
6. Diskussion	36
6.1. Einfluss verschiedener Faktoren auf das Ergebnis des Cell-seeding	36
6.2. Eignung der ECV304-Zelllinie für das endotheliale Cell-seeding-Modell	37
6.3. Lokale Zellapplikation mit dem Dispatch®-Katheter	38
6.4. Übertragbarkeit des Cell-seeding vom Schweinmodell auf den Menschen	38
6.5. Therapeutischer Einsatz des Cell-seedings	39
7. Zusammenfassung	41
8. Literaturverzeichnis	42
9. Danksagung	50

Verwendete Abkürzungen:

bFGF	basic fibroblast growth factor
ECV	vein endothelial-like cell line
LAD	left anterior descending artery
LCX	left circumflex artery
MW	Mittelwert
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
pEC	porcine endothel cells
pSMC	porcine smooth muscle cells
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
SEM	standard error of the mean
TGF- β	tissue growth factor beta

1. Einleitung

Die koronare Herzkrankheit stellt in den westlichen Industrieländern immer noch die häufigste Todesursache dar. Neben der chirurgischen und medikamentösen Therapie dieser Erkrankung, gewinnt die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) seit ihrer Einführung 1977 als Behandlungsalternative immer mehr an Bedeutung. Die Entwicklung neuer Kathedertechniken und Materialien, wie auch die zunehmende Erfahrung der Untersucher führt zu einer ständigen Indikationserweiterung. So werden zur Zeit weltweit etwa eine Million Interventionen pro Jahr durchgeführt, wobei sich die Anzahl innerhalb fünf bis sechs Jahren nahezu verdoppelt hat⁴⁸.

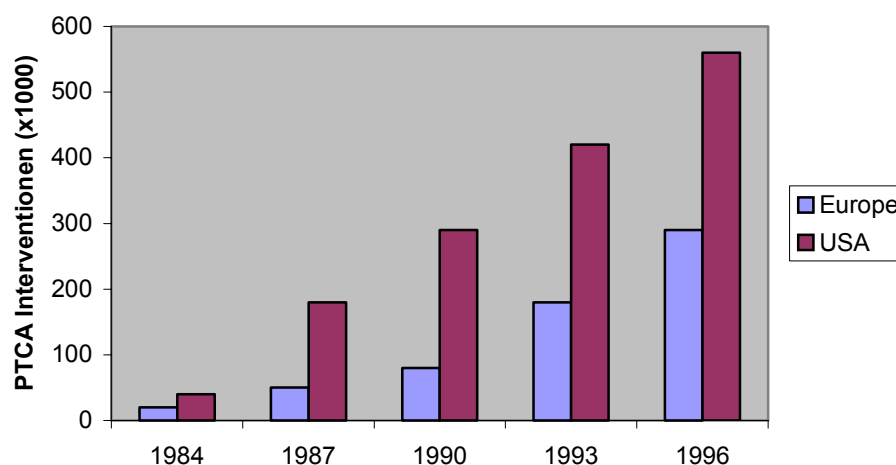


Abb. 1.1: steigende Anzahl der PTCAs in Europa und USA in den letzten Jahren⁴⁸

Trotz einer primären Erfolgsrate von ca. 90%, wird der Langzeiterfolg besonders durch Restenosen verringert, d.h. durch einen beträchtlichen Verlust des initialen Lumengewinns durch die PTCA. Je nach Typ der Stenose und Art des gewählten Interventionsverfahrens tritt diese Komplikation bei ca. 30-50% der Patienten innerhalb der ersten drei bis sechs Monate auf²⁷. Inzwischen handelt es sich bei etwa einem Viertel der jährlich durchgeführten PTCAs um Re-Interventionen nach aufgetretener Restenose, was wiederum bis zu drei Milliarden Dollar pro Jahr zusätzlich an Kosten verursacht⁴⁸.

Allein eine Reduktion der Restenoserate von 33% auf 25% würde in den USA Kosten von jährlich 750 Millionen Dollar einsparen².

Das erklärt, dass derzeit vielerlei Versuche unternommen werden, um die Inzidenz der Restenose nach PTCA zu senken, wenn auch mit mäßigem Erfolg. Die alternativen Ansätze zur konventionellen PTCA, bei denen Plaquematerial entfernt werden sollte (z.B. Laserangioplastie, Atherektomie) ergaben keine deutliche Senkung der Restenoserate. Auch nach Einführung von implantierbaren endovaskulären Prothesen, den so genannten Stents, wurde die Restenose in einigen Studien nur um etwa 10% gesenkt^{10;41}. Versuche, die Restenose mittels systemischer Pharmakotherapie zu vermindern, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Einer der Gründe ist, dass die lokale Konzentration des systemisch verabreichten Medikaments am Wirkort zu niedrig ist²³. So entstand das Konzept der lokalen Therapie, bei dem direkt am Wirkort Substanzen, z.B. durch gentechnisch modifizierte Zellen, synthetisiert werden, die zu einer Verminderung der Restenose führen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der intravaskulären Implantation von verschiedenen Zellarten im Anschluss an die endotheliale Verletzung im Rahmen einer PTCA mittels eines speziellen Applikationssystems, dem DISPATCH®-Katheter, getestet. Diese Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf einen späteren therapeutischen Einsatz von Endothelzellen zur Reduzierung der neointimalen Proliferation und der daraus resultierenden Restenose, durch frühe Reendothelialisierung und lokale Überexpression von speziellen Inhibitoren durch genetische Modifikation der applizierten Zellen.

2. Grundlagen

2.1. Entstehung der Restenose

Die Entstehung der Restenose resultiert aus einer Kombination verschiedener Prozesse, die im Rahmen der Gefäßverletzung sowohl der Intima als auch der Media während der PTCA auftreten ⁴⁸. Die Antwort des Gefäßes auf die Verletzung ist ein komplexer Vorgang, der ähnlich wie bei anderen Wundheilungsprozessen in drei überlappenden Phasen abläuft: „Early recoil“ und „Remodelling“, Thrombusbildung und Thrombusorganisation, und die Hyperplasie der Neointima.

2.1.1. Early recoil und Remodelling der Gefäßwand

Die Antwort der Gefäßwand auf die PTCA zeigt sich akut durch eine frühe elastische Retraktion („early recoil“) und chronisch durch einen Umbau („remodelling“).

Die elastische Retraktion ist eine Folge der mechanischen Überdehnung des Gefäßes und entwickelt sich innerhalb Minuten bis Stunden ¹². Einerseits beruht sie auf der Tendenz der elastischen Strukturen der Media und der Adventitia, nach einer Überdehnung durch Dilatation wieder in Richtung der Ausgangsgröße zurückzukehren ¹⁸, andererseits kommt es auch zu einer Vasokonstriktion, die aus der Endothelverletzung und Plättchenaktivierung resultiert ⁹. So entwickeln Patienten, die angiographisch innerhalb der ersten 24 Stunden nach der PTCA einen Lumenverlust von 10% oder mehr aufwiesen („early recoil“), innerhalb von 6 Monaten zu 74% eine Restenose. Bei den Patienten ohne nachweisbare frühe Retraktion lag die Restenoserate hingegen nach 6 Monaten bei 10% ³⁹.

Der Umbau des Gefäßes, das „remodelling“ wird am besten durch eine reaktive Schrumpfung der Adventitia beschrieben, wodurch letztendlich der Gesamtdurchmesser des Gefäßes und somit auch der des Lumens abnimmt⁴⁰.

2.1.2. Thrombusbildung und -organisation

Bei der Überdehnung mit dem Ballonkatheter wird das Endothel eingerissen und somit subendotheliale, hoch thrombogene Substanzen, wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor und Fibronectin freigesetzt³. Diese werden von Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten erkannt und vermitteln deren Aktivierung und Adhäsion an die Gefäßwand. Es kommt zur Anlagerung weiterer Thrombozyten und schließlich zur Bildung eines Thromben. Für die Restenose ist dies bedeutsam, weil zum einen die darauf folgende Organisation des Thromben direkt zu einer Verengung des Lumens führt. Zum anderen kommt es durch die Aktivierung der Thrombozyten zur Freisetzung einer Reihe von Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Faktor (PDGF), Tissue Growth Factor Beta (TGF-β), Basic Fibroblast Growth Faktor (bFGF) und Interleukin-1²⁶, welche durch Stimulation der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen für die Neointima-Bildung verantwortlich sein sollen⁴.

2.1.3. Neointima-Hyperplasie

Die aktivierten Thrombozyten produzieren, wie in 2.1.2 beschrieben, eine Reihe von Mediatoren, welche die Bildung der Neointima durch eine Aktivierung und Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media mit anschließender Migration in die Intima bewirken¹¹. Die eingewanderten glatten Muskelzellen replizieren sich weiter und bilden extrazelluläre Matrix, welche im Laufe von 4 bis 6 Monaten durch Kollagen und Elastin ersetzt wird und somit letztendlich zu einer Verengung des arteriellen Lumens führt³⁴.

Der Anteil der einzelnen Komponenten der Restenosierung ist mit dem intravasalen Ultraschall messbar, wobei zwischen der Neointimabildung und dem späten Gefäßremodelling unterschieden werden kann. Die Restenose bei mit der Ballon-PTCA behandelten Patienten ist mit 73% zum größten Anteil auf das Gefäßremodelling zurückzuführen und zu 27% auf die Neointima-Hyperplasie, während bei Stentimplantation

praktisch kein Remodelling nachweisbar ist, sondern die Restenose fast ausschließlich aus der Neointima-Hyperplasie resultiert ³⁰.

Nachfolgend ist die vermutliche Pathophysiologie der Restenose noch einmal in einem Übersichtsdiagramm zusammengefasst (Abb. 2.2):

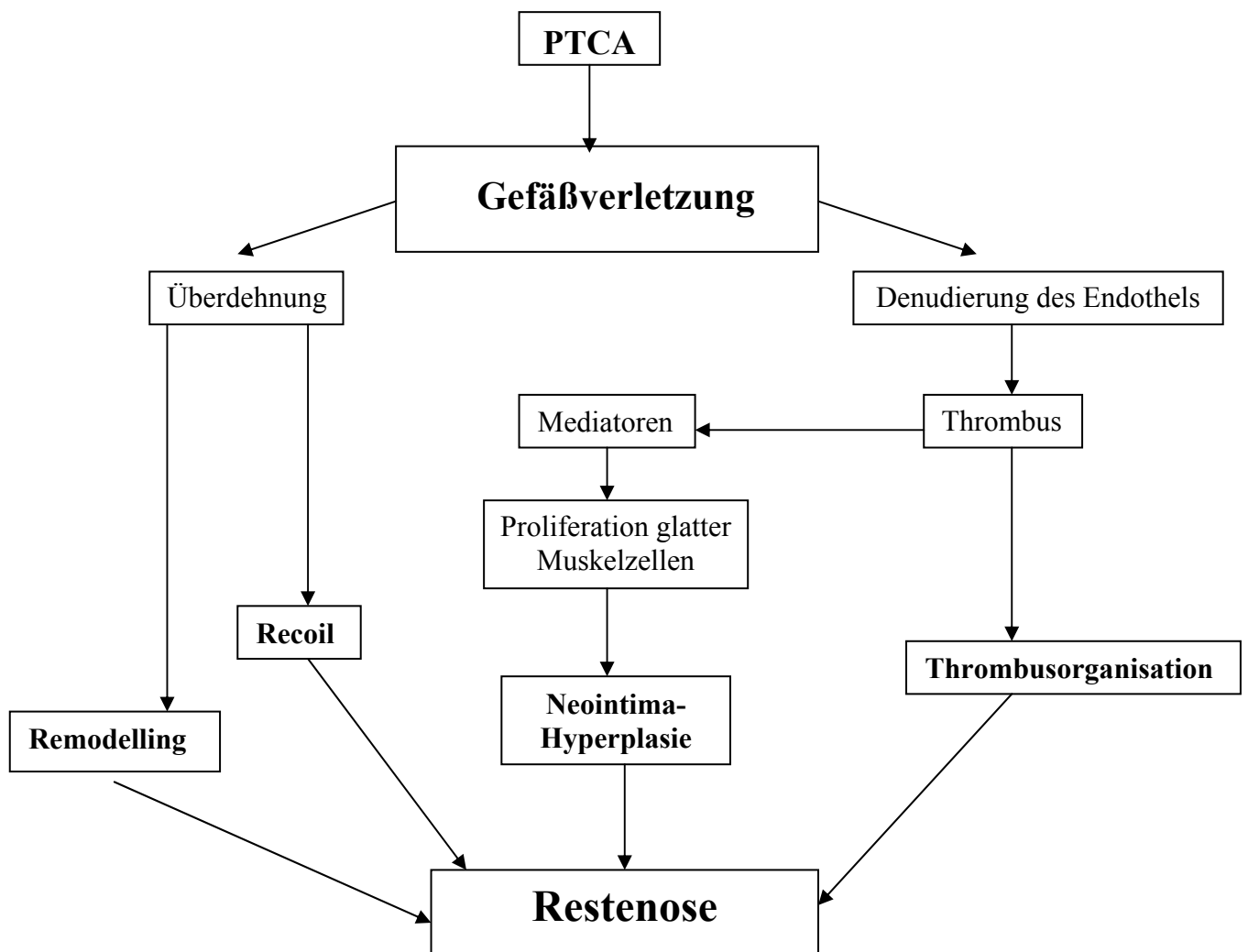


Abb. 2.2: Pathophysiologische Mechanismen der Restenose nach angioplastischen Revaskularisationsverfahren nach TOPOL et al.⁴⁸

2.2. Bisherige therapeutische Ansätze

2.2.1. Alternative Verfahren

Die Entwicklung alternativer Verfahren (Laserangioplastie, Rotablator, directionale Atherektomie) zur PTCA beruht auf der Idee, durch Abtragung des atherosklerotischen Plaques eine Verbesserung des Langzeitergebnisses zu erreichen. So wurde beispielsweise in der CAVEAT-Studie bei etwa 1000 Patienten die gerichtete Atherektomie nach Simpson mit einer Ballondilatation verglichen⁴⁷. Die Restenoserate nach Atherektomie war mit 49% zwar um etwa 10% niedriger als bei der Ballondilatation, was jedoch durch mehr Komplikationen bei der technisch schwierigen Methode relativiert wurde. In einer Folgeuntersuchung stellte sich außerdem heraus, dass die Atherektomiegruppe in der Langzeitbeobachtung über ein Jahr mehr Infarkt- und Todesfälle aufwies⁸.

2.2.2. Stentimplantation

Ein vielversprechender Ansatz zur Restenosereduktion ist die Implantation von endovaskulären Gefäßprothesen, den sogenannten Stents. In zwei internationalen Studien (STRESS, BENESTENT) wurde die Restenoserate nach Stentimplantation im Vergleich zur alleinigen Ballondilatation untersucht^{10;41}. In beiden Studien konnte eine um 10% geringere Restenoserate festgestellt werden, was vermutlich auf einen größeren initialen Lumengewinn und einer Hemmung des elastic recoils bzw. des Remodellings durch den Stent zurückzuführen ist⁴². Jedoch liegt beim Einsatz von Stents auch eine erhöhte Inzidenz von Blutungskomplikationen vor, was auf die wegen des gesteigerten Thromboserisikos notwendige Antikoagulationstherapie zurückzuführen ist^{10;41}.

2.2.3. Medikamentöse Therapieansätze

Bei den Ansätzen zur Restenoseverhütung stand zu Beginn der interventionellen Behandlung der Versuch der systemischen Nachbehandlung z.B. mit Kalziumantagonisten und Thrombozytenaggregationshemmer im Vordergrund. Der Ansatz der Verhinderung von überschießenden Kontraktionen des gedehnten Gefäßabschnitts und Thrombenanlagerungen an der komprimierten Plaque konnte die Restenoserate nicht signifikant senken²². Trotz einer Reihe von im Tierversuch wirksamen Substanzen wie z.B. antiproliferative Medikamente, ACE-Hemmer und Antioxidantien ließ sich die Restenoserate in klinischen Studien durch medikamentöse Therapien bislang nicht wesentlich beeinflussen²². Als Grund für die Ineffektivität wird unter anderem angenommen, dass die am gewünschten Wirkort, nämlich der dilatierten Stelle, zu erreichende Wirkstoffkonzentration teilweise um den Faktor 10 bis 40 zu niedrig ist, um die Mechanismen der Restenose wesentlich zu beeinflussen^{22;23}. Bei den meisten der untersuchten Wirkstoffe verbietet sich jedoch eine Erhöhung der systemischen Dosierung, weil damit auch die Inzidenz ernster Nebenwirkungen steigen würde²¹. Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich das Konzept der lokalen Applikation von Pharmaka, um eine hohe Konzentration am Ort der Dilatation und damit eine Hemmung der Restenose zu erreichen.

2.2.4. Ansätze der lokalen Applikation

Antithrombotische Substanzen

Im Rahmen der PTCA kann es zur Anlagerung eines Thrombus an der Dilatationsstelle kommen, was zu einem Akutverschluss führen kann, und möglicherweise die Entstehung der Neointima vorantreibt (s. Kap.2.1.2). Aus dieser Überlegung heraus wurde in einigen Studien der Einfluss von antithrombotischen Substanzen wie Heparin, Hirudin und Urokinase getestet. Für Heparin ist neben der antithrombotischen auch eine antiproliferative Wirkung auf glatte

Muskelzellen bekannt¹⁹. Im Kaninchenmodell wurde durch die lokale Applikation von niedermolekularem Heparin ein deutlicher antiproliferativer und somit restenosehemmender Effekt nachgewiesen³⁵. Im Schweinemodell konnte außerdem eine deutliche Hemmung der initialen Thrombusformation durch lokal appliziertes rekombinantes Hirudin nachgewiesen werden²⁹. Eine weitere Möglichkeit die Thrombusbildung zu reduzieren ist der lokale Einsatz von Fibrinolytika. In zwei Studien wurde dabei der Wirkstoff Urokinase lokal mittels verschiedener Kathetersysteme komplikationslos appliziert, wenn auch nur bei kleinen Patientenkollektiven ohne Kontrollgruppe^{31;32}. Insgesamt lässt sich zwar durch lokale Applikation von antithrombotischen und fibrinolytischen Substanzen die Bildung einer akuten Thrombose positiv beeinflussen, der langfristige Nutzen zur Restenoseduktion ist jedoch bisher noch ungeklärt.

Antiproliferative Substanzen

Der Versuch, die neointimale Proliferation durch systemische Gabe z.B. von Zytostatika zu erreichen, geht mit schweren Nebenwirkungen auf den Organismus einher. So wurde im Hinblick auf eine geringere systemische Belastung die lokale Applikation durch einen mit Methotrexat beschichteten Stent versucht⁶, bisweilen aber mit eher enttäuschendem Ergebnis. Dagegen zeigte der Versuch der Implantation von Dexamethason-Polymeren in die Adventitia, wodurch der Wirkstoff protrahiert freigesetzt wird, einen hemmenden Einfluss auf die Neointimaproliferation⁴⁹. Ob ein derartiges System therapeutisch in Koronargefäßen eingesetzt werden kann, scheint jedoch fraglich.

Eine inzwischen etablierte Möglichkeit zur Restenosehemmung ist der Einsatz des Makrolidantibiotikums Rapamycin, das einen proliferationshemmenden Effekt auf glatte Muskelzellen hat³⁷. Bei einem Patientenkollektiv, dem rapamycin-beschichtete Stents implantiert wurden, konnte in einem postinterventionellen Zeitraum von 12 Monaten eine potente, langanhaltende Hemmung der Neointimaproliferation nachgewiesen werden⁴³.

Gentransfer

Eine Alternative zur Applikation konventioneller Pharmaka ist der Transfer genetischen Materials in die Zellen der Gefäßwand. So wurde in zwei Studien Gefäßwandzellen durch

Transfektion mit dem Gen für die Thymidinkinase aus dem Herpes-Simplex-Virus für die zytotoxische Wirkung von Ganciclovir, einem Nucleosid-Analogen, sensibilisiert^{15;36}, welches nach erfolgter Transfektion systemisch verabreicht wurde. Ein Nachteil solcher Methoden ist, dass am Zielort eine hohe Zahl an transfizierten Zellen notwendig ist, was wiederum den Einsatz von viralen Vektoren, wie Adenoviren zur Folge hat. Dabei besteht jedoch wieder die Gefahr einer systemischen viralen Belastung des Organismus oder einer durch die Viren hervorgerufene lokale Inflammation, die für die Restenoseprävention kontraproduktiv wäre.

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Plasmid-DNA³⁸ oder die Kombination von Plasmiden mit Liposomen^{5;33}. Der Vorteil von weniger systemischen Risiken muss dabei aber wiederum mit einer geringeren Transfektionsrate erkauft werden.

2.2.5. Applikation ionisierender Strahlung

Eine weitere Überlegung, eine Proliferationshemmung zu erreichen, ist die lokale Anwendung radioaktiver Strahlung. Im Kaninchenmodell wurden Edelstahlstents implantiert, die vorher durch Protonenbeschuss im Zyklotron aktiviert wurden, und somit als Betastrahler am Einsatzort wirken konnten²⁰. Dadurch wurde eine signifikante Hemmung der Neointimabildung erreicht. Inzwischen gibt es auch schon therapeutische Erfahrung beim Menschen. Die Patienten wurden nach PTCA über einen mit Iridium beladenen Draht im Angioplastiebereich bestrahlt, wodurch eine signifikante Minderung der Restenoserate erreicht werden konnte⁴⁶. Jedoch stellt sich bei solchen Methoden die Frage nach langfristigen Komplikationen, wie beispielsweise der malignen Transformation.

3. Fragestellung

Entsprechend dem gegenwärtigen Kenntnisstand zur Pathogenese der Neointima-Hyperplasie wird von der Hypothese ausgegangen, dass eine Hemmung der vaskulären Entzündungsreaktion nach koronarer Stentimplantation das postinterventionelle Neointimawachstum reduziert. Zur Hemmung der postinterventionellen vaskulären Entzündungsreaktion könnte sich die Besiedlung mit endothelialen oder endothelähnlichen Zellen als besonders wirksam erweisen. Hierdurch würde eine raschere Normalisierung der Oberflächenstruktur des behandelten Gefäßes erreicht, was die Rekrutierung von Entzündungszellen, insbesondere von Granulozyten und Monozyten, reduzieren dürfte. Außerdem könnten die zu implantierenden Zellen ex vivo genetisch manipuliert werden mit dem Ziel eine lokale Überexpression von natürlichen antiinflammatorischen Substanzen, wie etwa Interleukin-1-Rezeptorantagonist, zu erreichen. Als Quelle für die zu implantierenden Zellen könnten ausdifferenzierte autologe Endothel-Vorläuferzellen, die aus dem zirkulierenden Blut zu gewinnen sind, herangezogen werden.

Um das „Cell-seeding“ erfolgreich in der Prävention der Neointimahyperplasie einsetzen zu können, müssen zunächst die kathetertechnischen und zellbiologischen Randbedingungen geklärt werden, unter denen eine Implantation von Zellen in durchströmten Arterien möglich ist. Dies zu untersuchen, war Ziel der vorliegenden Doktorarbeit.

4. Material und Methodik

4.1. Herstellung der Zellsuspension

4.1.1. Zellkultur

4.1.1.1. ECV-304 (ECV)

Bei der Zelllinie ECV-304 handelt es sich um ein Derivat aus der humanen Harnblasen-Carcinom-Zelllinie T-24. Die Zellen weisen etliche endotheliale Charakteristika auf: Sie zeichnen sich durch ein pflastersteinartiges, adhärentes, einschichtiges und konfluentes Wachstum aus. Die Zellverbände sind auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren hoch proliferativ. Als Wachstumsmedium wurde ein Gemisch aus 90% Medium-199 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 5-10% FCS (Gibco), 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma) und ca. 0,3% L-Glutamin (Sigma) verwendet.

4.1.1.2. Primäre glatte Muskelzellen vom Schwein (pSMC)

Die primären glatten Muskelzellen wurden aus einem frisch explantierten Abschnitt der Aorta (Aorta ascendens bis Aorta abdominalis) von Schweinen, die bei Versuchen in der experimentellen Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar, München, geopfert wurden, steril gewonnen. Zum Transport ins Labor wurde die entnommene Aorta in eine Flasche mit sterilem PBS gegeben. Im Labor wurde die Aorta auf einer sterilen Ablage von Blutresten und perivaskulärem Bindegewebe gereinigt, longitudinal entlang der abgehenden Gefäße eröffnet und mit der luminalen Seite nach oben in einer Petrischale aufgespannt. Um ein Austrocknen zu vermeiden wurde das Gefäß mit sterilem PBS bedeckt. Die Endothelzellschicht wurde mit einem Skalpell abgeschabt und das PBS mit den abgelösten Endothelzellen abgesaugt. Um die weiteren Endothelzellreste zu entfernen erfolgten zwei zusätzliche Spülgänge mit PBS. Im Anschluss wurde die Aorta in mehrere 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke zerteilt und davon etwa sechs Stücke mit der luminalen Seite nach unten zusammen mit 2ml Vollmedium in eine Kulturflasche (75mm²) zum Auswachsen der glatten Muskelzellen gegeben. Nach

30-minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Zugabe von weiteren 8ml Vollmedium in die Flasche und die Inkubation über Nacht. Tags darauf wurde das Medium vorsichtig gewechselt, ohne dabei die Position der Stückchen zu verändern und danach alle zwei bis drei Tage erneuert. Das Auswachsen der Zellen von den Aortenstücken konnte nach etwa einer Woche lichtmikroskopisch erkannt werden.

Für die Versuche wurden Zellen der dritten bis fünften Passage eingesetzt. Als Wachstumsmedium wurde ein Gemisch aus 1/3 SmBN (+Zusätze, Clonetics), 2/3 DMEM+ 25mM Hepes (Gibco BRL), 50ml FCS (GibcoBRL), 5ml Penicillin-Streptomycin (Sigma) und 5ml L-Glutamin (Sigma) verwendet.

4.1.1.3. Primäre Endothelzellen vom Schwein (pEC)

Die primären glatten Muskelzellen wurden ebenfalls aus einem frisch explantierten Abschnitt der Aorta von Schweinen (Aorta ascendens bis Aorta abdominalis) gewonnen. Transport und Präparation erfolgten wie oben beschrieben (s. Kap. 4.1.1.2.). Nach Eröffnung und Aufspannen der Aorta, wurde ein Gemisch aus 10ml Trypsin, 100µl CaCl₂ und 10mg Kollagenase zur Ablösung der Endothelzellschicht gegeben. Es folgte eine 10minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Das Trypsin-Gemisch mit den darin gelösten Endothelzellen wurde in ein 50ml Falcon gegeben, die Aorta zweimalig mit jeweils 10ml Vollmedium gewaschen, um noch anhaftende Endothelzellen abzulösen, und das Medium in den Falcon dazugegeben. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 1300 rpm wurde der Überstand verworfen, das bodenständige Zellpellet wieder in 20ml Vollmedium aufgenommen und davon jeweils 10ml in zwei Kulturflaschen gegeben, welche über Nacht im Inkubator gelagert wurden. Tags darauf wurden nicht adhärente Zellen beim Mediumwechsel entfernt. Zellen für die Versuche stammten aus der zweiten Passage. Als Nährmedium wurde ein Gemisch aus 90% Medium-199 (Sigma), 5-10% FCS (Gibco), 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma) und ca. 0,3% L-Glutamin (Sigma) verwendet.

4.1.2. DiI-Färbung

Die Zellen wurden vor der Implantation mit dem Tracer DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine pechlorat) der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande) markiert. Dazu wurden zunächst 50µg DiI in 50µl DMSO gelöst. Nach Absaugen des Nährmediums und Waschen der Zellen mit PBS-Puffer, wurden die Zellen mit 7ml EDTA-

Trypsin pro Kulturflasche vom Nährboden gelöst, mit 10ml PBS neutralisiert und die Suspension in einen 50ml-Falcon aufgenommen. Es wurden pro Flasche 15µl der hergestellten DiI-Lösung hinzugegeben und die Zelllösung zuerst für 5 min bei 37 °C, dann für 15 min bei 4 °C inkubiert und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abheben des Überstandes erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS und ein weiterer Zentrifugationsgang mit 1000rpm für 5 min. Nach Absaugen des Überstandes wurde schließlich das entstandene Zellpellet je nach gewünschter Konzentration in Nährmedium M199 gelöst und zum Transport in 2ml-Eppendorf-Cups gegeben.

4.2. Tiervorbereitung

4.2.1. Tierart

Für die Versuche wurden Schweine der Deutschen Landrasse mit Gewichten zwischen 18 und 44 kg (weiblich, männlich kastriert) verwendet. Die Tiere stammten aus einem staatlichen Zuchtbetrieb. Zwei Tage vor Operation wurden die Tiere in die Tierstallungen der experimentellen Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar verbracht. Dort erfolgte die Haltung der Tiere in Gruppen zu je zwei Tieren in acht Quadratmeter großen Boxen mit automatischer Tränkevorrichtung.

4.2.2. Medikation und Anästhesie

Zunächst erfolgte die Prämedikation des am Versuchstag nüchtern gehaltenen Schweins durch tiefe intramuskuläre Injektion einer Mischung aus Atropinsulfat 0,5 mg/Tier (Firma Braun AG, Melsungen), Azaperon 2mg/kgKG (Stresnil®, Firma Janssen-Cliag GmbH, Neuss) und Ketaminhydrochlorid 1,5mg/kgKG (Narketan®, Firma Chassot AG, Ravensburg). Ein peripherer venöser Zugang wurde mittels einer Braunüle (Venflon Pro® 20GA 1,26 IN 1,1x32mm, Firma Ohmeda, Helsingborg, Schweden) in die Vena auricularis lateralis des Tieres hergestellt. Hierauf wurde die Narkose durch intravenöse Gabe von Eunarkon® (5-(2-Bromalkyl)-5-isopropyl-1-methylbarbitursäure, Natriumsalz, Phenazon 1ml/10kg) eingeleitet. Nach Lagerung auf dem Rücken, Intubation und Anschluss an das Beatmungsgerät („Sulla“, Firma Draeger, Lübeck), erfolgte während der gesamten Intervention eine Inhalationsnarkose mittels Sauerstoff und Lachgas im Verhältnis 2:1 und Isofluran 1% (Forene®, Firma Abott

GmbH, Wiesbaden). Um eine ausreichende Analgesie zu erreichen wurde praeoperativ Fentanyl Dihydrogencitrat 0,0025mg/kgKG (Fentanyl-Janssen®) verabreicht und bei Bedarf während der Operation nachinjiziert. Das intrainerventionelle Monitoring erfolgte anhand Pulsoximeter (Physiocontrol Lifestat 1600R®, Firma Physiocontrol, Redmond USA), Kapnometer (Capnomac Ultima®, Firma Multicap Datex, Helsinki, Finnland) und fortlaufender EKG-Kontrolle (HBV20, Firma Biotronik vorgenommen. Die intraoperative Flüssigkeitssubstitution erfolgte mit Ringer-Laktat-Lösung in einer Dosierung von ca. 10ml/kgKG (Sterofundin®, Firma Braun AG, Melsungen).

4.3. Zellapplikation in die Koronargefäße

4.3.1. Operative Zugänge

Das mit dem Rücken auf den Operationstisch gelagerte Schwein wurde mit sterilen Tüchern unter Freilassen des Halsbereichs abgedeckt. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Nach Rasur und Desinfektion des Zugangsgebietes mit einer Jodlösung wurde im Bereich des linken Halsdreiecks ein Hautschnitt von etwa 7cm Länge vorgenommen. Hier erfolgte zunächst die Präparation der V. jugularis sinistra. Nach einer Längsinzision von etwa 5mm wurde ein zentraler Venenkatheter (Cavatheter®, Firma Fresenius, Gräfelting) eingebracht, etwa 15 cm in Richtung rechter Vorhof vorgeschoben, fixiert und mit einem 3-Wege-Hahn konnektiert. Somit war ein zentraler Zugang hergestellt und die blutige Blutdruckmessung ermöglicht. Dann wurde die A. carotis interna sinistra freipräpariert, distal der Zugangsstelle ligiert und proximal mit einem Gummiband unterbunden. Dazwischen wurde nach einer Längsinzision von ca. 3mm eine 7French-Schleuse eingebracht und diese nach Lösen der proximalen Unterbindung fixiert. Nach Gabe von

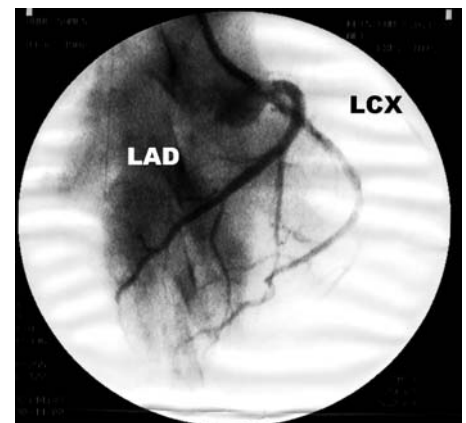


Abb. 4.1: Praeoperatives Angiogramm zur Darstellung der LAD und LCX

5000 IE Heparin, 500mg Aspisol® und 150mg Amiodaronhydrochlorid (Cordarex®) wurde ein J-förmiger 7French-Guiding-Katheter unter Blutdruckkontrolle und Durchleuchtung (Phillips BV 25, Firma Phillips, München) bis zum Ostium der linken Koronararterie vorgebracht und diese nach Kontrastmittelapplikation (Imeron 350®) radiologisch dargestellt und zur Orientierung fotografiert (siehe Abb. 4.1).

Nach Identifikation des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra (LAD), wurde in diesen durch den Guiding-Katheter ein feiner Führungsdraht (Durchmesser 0,35 mm) eingebracht. Er wurde am distalen Ende etwas vorgebogen und von außen durch einen aufgebrauchten Torquer (ein Kunststoff-Hohlzylinder mit einer Art Bohrfutter) gesteuert. Der Draht wurde nun bis weit in die Peripherie der LAD vorgebracht und diente als Schiene für den nachfolgend einzubringenden Dilatationsballon.

4.3.2. Gefäßwandverletzung durch Dilatation

Zuerst wurde die Größenwahl des Ballons (\varnothing 2.5, 3.0, 3.5 mm im inflatierten Zustand) durch radiologische Beurteilung der koronaren Lumenweite vorgenommen. Nach Entfernung des Torquers wurde der PTCA-Ballon auf den Führungsdraht aufgefädelt und bis zu dem zu dilatierenden Bereich der LAD unter Durchleuchtung vorgeschoben. Als Dilatationsstelle wurde ein seitenastarmer Gefäßabschnitt der LAD bevorzugt, um bei der späteren Zellapplikation einen unnötigen Verlust durch Ausschwemmen der Suspension in die Peripherie zu umgehen. Nach Füllung des Ballons mit einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Kontrastmittel zu je gleichen Teilen erfolgte die Inflation mittels einer Druckpumpe. Ziel war es dabei, das Gefäß etwa um den Faktor 1,4 zu überdehnen. Der endgültige Dilatationsdruck von etwa 8-10 atü wurde dabei durch schrittweises Erhöhen des Drucks innerhalb von bis zu 3 Inflatationsdurchgängen erreicht. Die Länge der Durchgänge betrug jeweils 20s und richtete sich nach Ischämiekorrelaten im EKG (Ausmaß der ST-Hebungen, Rhythmusstörungen). Nach dem letzten Durchgang wurde der noch teilweise inflatierte Ballon zurückgezogen, um die Endothelschicht zu denudieren, und bei noch liegendem Führungsdraht aus dem Gefäß entfernt. Insgesamt sollte so durch Dilatation und Rückzug des Katheters ein kontrolliertes Gefäßwandtrauma erzeugt werden.

4.3.3. Applikation der Zellsuspension

Im nächsten Schritt wurde die wie oben beschrieben vorbereitete Zellsuspension appliziert. Dazu wurde der Dispatch®-Katheter (Scimed) verwendet (s.Abb. 4.2).

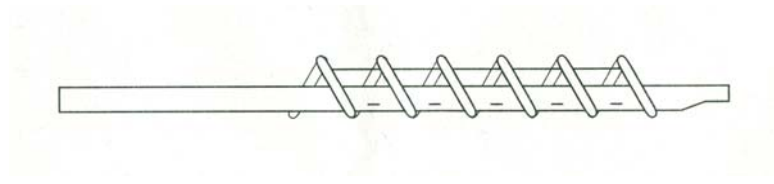


Abb. 4.2: DISPATCH® Coronary Perfusion/Infusion Catheter (Scimed), distales Ende

Dieses Instrument wurde entwickelt, um lokal Suspensionen in Gefäße einzubringen und hat dafür einen doppelwandigen Schaft, der am distalen Ende eine ca. 20mm lange, aufblasbare Spirale besitzt. Diese Spirale, eingekapselt von einer dünnen Polyurethan-Membran, erlaubt es im aufgeblasenen Zustand, die intrakoronare Applikationsstelle genauer zu lokalisieren, zu isolieren und verhindert durch Herstellung eines abgeschlossenen Kompartments weitgehend das Ausschwemmen der eingebrachten Lösung in die Peripherie. Gleichzeitig wird durch die Membran eine Öffnung hergestellt, die während der gesamten Intervention die distale Blutversorgung aufrechterhält. Das größere Lumen des Schafts wird zum Transport der Lösung benutzt und hat am distalen Ende mehrere schlitzförmige Öffnungen, durch welche die Suspension in das Kompartiment infundiert wird. Im Zentrum des Schafts befindet sich über die ganze Länge ein weiteres Lumen. Durch dieses verläuft während der Intervention der koronare Führungsdraht, wodurch der Katheter in der Richtung gesteuert werden kann.

Der proximale Teil des Katheters besitzt drei Anschlüsse. Der mit „BAL“ markierte Anschluss dient dazu, um die Spirale aufzublasen. Zum Infundieren der Suspension

verwendet man den mit „INFUSE“ markierten Anschluss. Der dritte unbeschriftete Zugang ist mit dem inneren Lumen verbunden, durch den der Führungsdraht läuft (s.Abb. 4.3).

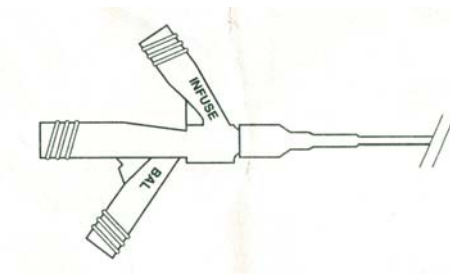


Abb. 4.3: DISPATCH® Coronary Perfusion/Infusion Catheter (Scimed), proximales Ende

Nach Einführen des Katheters und Positionierung an der vorverletzten Applikationsstelle, erfolgte die Inflation der Spirale mit 4 atü, wodurch zwischen Gefäßwand und Lumen ein isoliertes Kompartiment entstand. Die vorbereitete Zellsuspension wurde, mit einem Tropfen Heparin versetzt, in eine 5ml große Spritze mit Luer-Lock-System aufgezogen, und diese an den mit „INFUSION“ beschrifteten Anschluss des Dispatch-Katheters geschraubt. Jetzt wurde mit der Applikation der Zellen begonnen, wobei je nach ischämiebedingten EKG-Veränderungen (ST-Hebungen, Arrhythmien) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von etwa 0,4-0,2 ml/min vorgegangen wurde. Somit wurden die Zellen in das Kompartiment eingebracht und kamen dort in Kontakt mit der Endothelschicht, um sich dort anzuheften. Da aufgrund der Katheterkonstruktion ja gleichzeitig die distale Perfusion freigegeben war, waren lange Infusionszeiten von bis zu 15 min ohne Ischämiezeichen möglich.

Nach Applikationsende wurde der Katheter nach Ablassen des Drucks vorsichtig zurückgezogen, um die an das Endothel angebrachte Zellschicht nicht sofort wieder abzulösen und zusammen mit dem Führungsdraht aus der Schleuse entfernt.

War eine lange Stehzeit des Schweins bis zum nächsten Tag vorgesehen, wurden die Schleuse und der zentrale Zugang für die Behandlung am nächsten Tag in den Gefäßen belassen. Nach chirurgischem Verschluss der Faszien und der Haut durch den Tierarzt wurde die Narkose ausgeleitet und das Schwein extubiert. Das Tier wurde unter tierärztlicher Beobachtung in den Stall gebracht und verbrachte dort die Nacht unter klinischer Beobachtung durch qualifiziertes

Tierpflegepersonal. Bei Feststellung etwaiger Schmerzen des Tieres wurde Metamizol nach Wirkung verabreicht.

Tags darauf erfolgte die Applikation einer weiteren Zellsuspension in den Ramus circumflexus (LCX) der Arteria coronaria sinistra des gleichen Tieres ebenfalls nach oben beschriebener Vorgehensweise. Nach Applikationsende und Entfernen des Dispatch-Katheters schloss sich eine Reperusionszeit von 15 bis 105 Minuten an, worauf das Tier durch intravenöse Gabe einer letalen Kaliumchloridlösung geopfert und das gesamte Herz explantiert wurde.

Bei den Tieren, die für eine kurze Stehzeit vorgesehen waren, erfolgte die Behandlung der LCX gleich im Anschluss an die Behandlung der LAD.

Die behandelten Koronargefäße wurden präpariert, zusammen mit dem perivaskulärem Fettgewebe auf einer Strecke von 2cm proximal und distal des behandelten Gefäßabschnitts herausgelöst (s. Abb. 4.4), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur histologischen Aufarbeitung im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

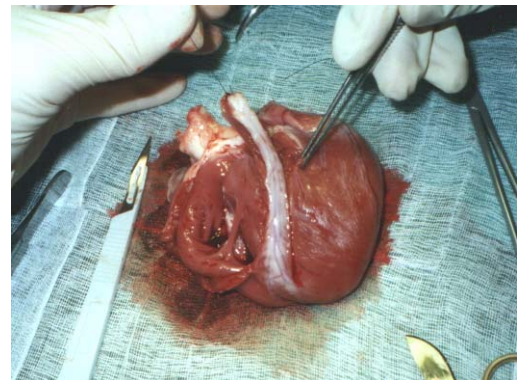


Abb. 4.4: Praeparation und Entnahme der LAD am explantierten Herzen zusammen mit perivaskulärem Muskel- und Fettgewebe. Der proximale Anteil ist mit einem Faden gekennzeichnet.

4.4. Zellapplikation in die Femoralgefäße

4.4.1. Operativer Zugang

Die Versuchsdurchführung an den Femoralgefäßen fand immer vor der Behandlung der Koronargefäße statt.

Nach chirurgischer Desinfektion und Rasur des Schenkels wurde an der Schenkelinnenfläche ein etwa 6 cm langer Hautschnitt vorgenommen und die Arteria femoralis aufgesucht, die in der Tiefe zwischen den beiden Ursprungsschenkeln des M. satorius liegt.

Es erfolgte die Auswahl eines etwa 6cm langen, seitenastarmen Abschnitts der Arteria femoralis für die Dilatation und Applikation. Nach proximaler Ligatur mittels eines Gummibandes wurde durch eine ca. 3mm lange Längsinzision mit einer Gefäßschere eine 7French-Schleuse als Zugang für die Dilatation und Applikation eingebracht.

4.4.2. Gefäßwandverletzung durch Dilatation

Nach Größenwahl des Ballons (\varnothing 3.0 oder 3.5 mm im inflatierten Zustand) wurde dieser über die Schleuse in den zu behandelnden Gefäßabschnitt der Arteria femoralis eingebracht. Nach Füllung des Ballons mit einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Kontrastmittel zu je gleichen Teilen erfolgte die Inflation mittels einer Druckpumpe. Ziel war es dabei, das Gefäß etwa um den Faktor 1,4 zu überdehnen. Es folgte nun der Dilatationsvorgang mit einem Druck von 10atü für eine Dauer von 30s. Nach Senken des Drucks auf ca. 2atü wurde der Ballon noch mehrmals entlang des dilatierten Abschnitts hin- und herbewegt, um die luminale Schicht des Endothels zu denudieren, und schließlich wieder aus dem Gefäß entfernt. Ziel dieses Vorgangs war die Erzeugung eines kontrollierten Gefäßwandtraumas.

4.4.3. Zellapplikation

Als Zellen wurden die, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, vorbereiteten Zellsuspensionen verwendet. Zunächst wurde der Dispatch-Katheter über die Schleuse eingeführt und an der vorverletzten Applikationsstelle positioniert. Es erfolgte die Inflation der Spirale mit 4 atü. Die vorbereitete Zellsuspension wurde in eine 5ml große Spritze mit Luer-Lock-System aufgezogen und mit einem Tropfen Heparin versetzt. Die Spritze wurde an den mit „INFUSION“ beschrifteten Anschluss des Dispatch-Katheters konnektiert und die Suspension in einem Zeitraum von 15min langsam über die Schleuse appliziert. Anschließend wurde der Druck der Katheter-Spirale abgelassen und der Katheter vorsichtig aus dem Gefäß entfernt.

Sobald die wie in Abschnitt 4.3 beschriebene Behandlung der Koronargefäße abgeschlossen und das Herz explantiert worden war wurden die behandelten Femoralgefäße auf einer Länge von 2cm proximal und distal des dilatierten Gefäßabschnitts entnommen und ebenfalls mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur histologischen Aufarbeitung erfolgte im Gefrierschrank bei -20°C .

4.5. Herstellung der Gefrierschnitte

Die Herstellung der Gefrierschnitte von den explantierten Gefäßen erfolgte mit Hilfe des Gefrierschnittautomaten Mod.2700 – Frigocut der Firma Reichert-Jung. Die gefrorenen Femoral- und Koronargefäßpräparate wurden in etwa 8mm lange Blöcke unterteilt. Bei jedem zu untersuchenden Gefäß wurden fünf Blöcke ausgewertet: jeweils ein Block proximal und distal der Applikationsstelle und drei Blöcke innerhalb der Applikationsstelle (s. Abb.4.5).

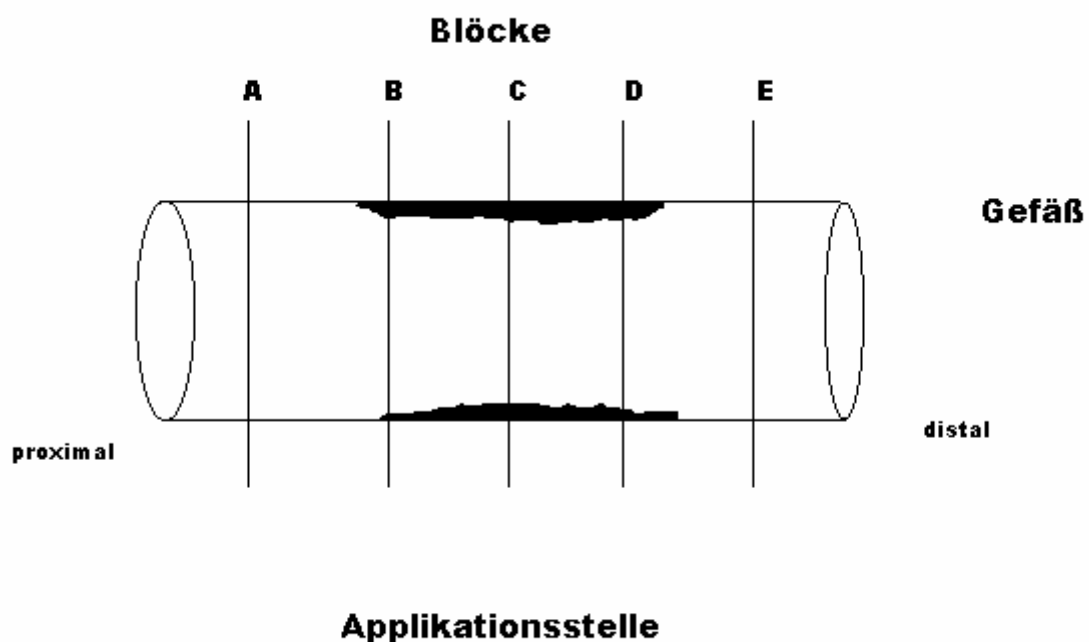


Abb. 4.5: Einteilung des Präparates in 5 Blöcke, davon je ein Block distal und proximal der Applikationsstelle und 3 Blöcke innerhalb der Applikationsstelle

Nach Einbettung in Gefrierschnittmedium (Tissue-Tek, Sakura) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden von den Blöcken Schnitte mit einer Dicke von $7\mu\text{m}$ hergestellt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

4.6. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Gefrierschnitte der beim Versuch behandelten Gefäßabschnitte wurden nun unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und digital fotografiert. Die Auswertung erfolgte am Computer mit dem Programm ImageJ 1.28u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Dabei wurden zunächst die luminale Gesamtzirkumferenz des auszuwertenden Gefäßes und der mit DiI-positiven Zellsignalen bedeckte Anteil der luminalen Zirkumferenz bestimmt, und diese beiden Werte ins Verhältnis gesetzt.

4.7. Methoden der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel für Windows 98. Zur Berechnung statistischer Unterschiede für Mehr-Gruppen Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet. Bivariate Vergleiche wurden anhand des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Die Angaben des Mittelwertes erfolgten zusammen mit dem standard error of the mean (MW \pm SEM). Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt bei einem Signifikanzniveau von 5%.

5. Ergebnisse

5.1. Gesamtübersicht des Cell-seeding

Im Rahmen der Arbeit wurden 26 behandelte Gefäße histologisch untersucht, die aus Versuchen im Zeitraum vom 24.06.99 bis zum 07.02.01 stammten. Von den 26 untersuchten Gefäßen gingen 6 aufgrund unzureichender Gewebe- oder DiI-Signalqualität nicht in die Auswertung ein. Weitere 5 Gefäße konnten nicht verwertet werden, da es während der Versuchsdurchführung zum plötzlichen Tod des Versuchstieres gekommen war, wodurch keine Zellapplikation möglich war.

Somit gingen letztendlich 15 der 26 behandelten Gefäße in die Auswertung ein, die in Tab.5.1 dargestellt werden.

Lfd.Nr.	Gefäß	Zellart	Zellzahl/ μ l	Dilatationsdruck [atü]	Stehzeit n. Appl. [min]	Dil-positive Zirkumferenz
1	LAD	pSMC	5000	6	45	0,173
2	A.fem.re.	pEC	10000	8	60	0,508
3	LAD	pSMC	6000	6	30	0,254
4	LAD	pSMC	5000	8	53	0,269
5	LCX	pSMC	10000	15	13	0,571
6	A.fem.li.	pEC	10000	8	140	0,742
7	A.fem.li.	ECV	10000	6,8,10	100	0,501
8	LCx	ECV	10000	8	39	0,538
9	LAD	ECV	7000	8	26	0,484
10	LAD	ECV	5000	3x8	23,5 Std.	0,479
11	LCX	ECV	7000	3x8	52	0,457
12	LAD	ECV	5000	6, 8, 10	36	0,410
13	LAD	ECV	7000	6, 8, 10	23 Std.	0,183
14	LAD	ECV	6000	6, 8, 10	23 Std.	0,364
15	LAD	pEC	10000	6, 8, 10	21,5 Std.	0,393

Tab. 5.1: Gesamtübersicht der ausgewerteten Versuche an den Gefäßen

Die Dauer der Applikation der Zellen durch den Dispatch-Katheter und damit die Zeit, während der die Zellsuspension ohne Einfluss der Blutströmung mit dem Endothel in Kontakt treten konnte, betrug durchschnittlich $15,3 \pm 0,72$ min.

5.2. Einfluss des Zelltyps auf das Cell-seeding

Von den 15 untersuchten Koronargefäßen wurden 8 Gefäße mit der ECV304-Zelllinie (53%), 4 Gefäße mit der pSMC-Zelllinie (27%) und 3 Gefäße mit der pEC-Zelllinie (20%) behandelt. Dabei ergab sich bei den mit ECV304 behandelten Gefäßen eine durchschnittliche Dil-positive Lumenbedeckung von $42,7\% \pm 0,040$, bei den mit pSMC behandelten Gefäßen von $31,7\% \pm 0,084$ und bei den mit pEC behandelten Gefäßen von $54,8\% \pm 0,087$. Der Unterschied ist nicht signifikant (globaler p-Wert im 3-Gruppenvergleich: 0,294) (siehe Tab 5.2 und Abb 5.1).

Gruppe	Anzahl(n)	Dil-positive Zirkumferenz	SEM
ECV	8	0,427	0,040
pSMC	4	0,317	0,084
pEC	3	0,548	0,087

Tab. 5.2: Durchschnittliche Dil-positive Zirkumferenz differenziert nach Zelltyp

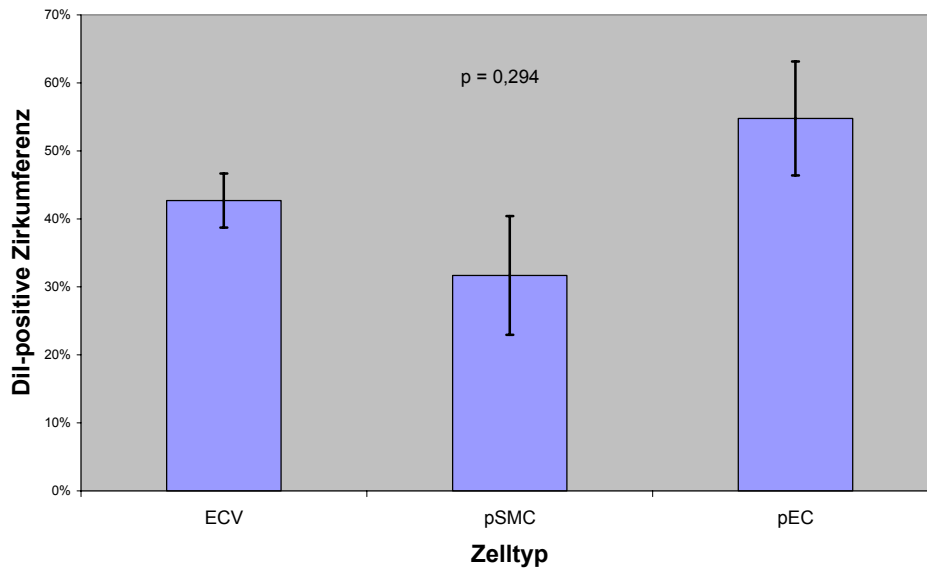


Abb. 5.1: Vergleich der durchschnittlichen DiI-positiven Zirkumferenz differenziert nach Zelltyp

5.3. Einfluss der Stehzeit des Schweins auf das Cell-seeding

Die Einteilung der Ergebnisse bezogen auf die Stehzeit des Schweines post applicationem bis zur Opfierung erfolgt in zwei Gruppen. Bei den 4 Gefäßen (27%), bei denen die Opfierung nach einer langen Stehzeit ($\varnothing 22,75 \pm 0,43$ h) vorgenommen wurde, konnte eine durchschnittliche DiI-positive Lumenbedeckung von $35,5 \% \pm 0,062$ festgestellt werden. Bei den 11 Gefäßen (73%) mit kurzer Stehzeit ($58,8 \pm 33$ min) ergab sich eine durchschnittliche DiI-positive Lumenbedeckung von $44,6 \% \pm 0,049$. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,226$) (s. Tab. 5.3 und Abb. 5.2)

Stehzeit	Anzahl(n)	Dil-positive Zirkumferenz	SEM
lange	4	0,355	0,062
kurz	11	0,446	0,049

Tab. 5.3: Durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz differenziert nach der Stehzeit

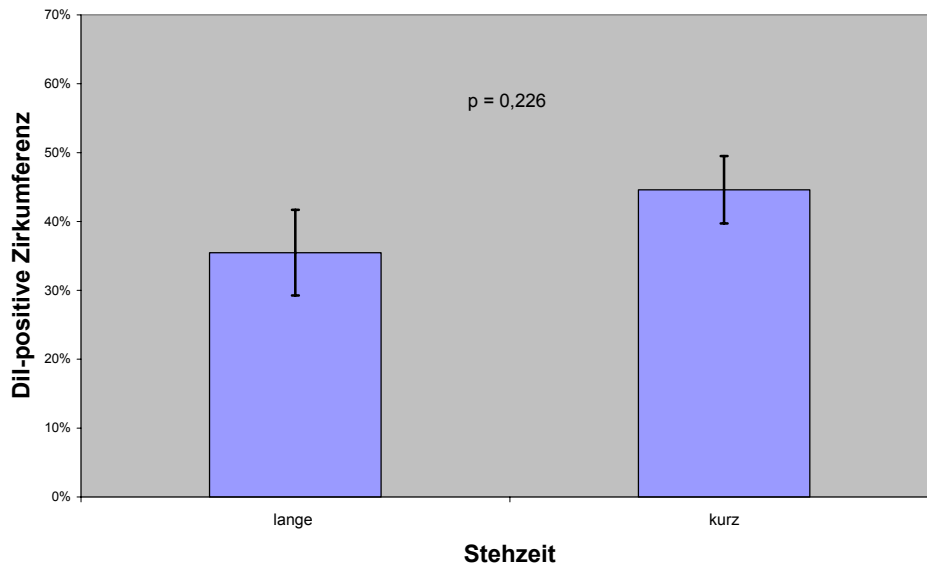


Abb. 5.2: Auswirkung der Dauer der Stehzeit post applicationem auf die durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz

5.4. Einfluss der Art der Vorverletzung auf das Cell-seeding

Vor der Applikation der Zellen wurde ein Gefäßtrauma durch Überdehnung des Koronargefäßes mit einem Dilatationsballon erzeugt. Bei 6 Gefäßen (53%) wurde dabei eine einmalige Dilatation für die Dauer von 20s mit einem mittleren Druck von $8,375 \pm 1$ atü vorgenommen. Dabei ergab sich eine durchschnittliche DiI-positive Lumenbedeckung von $44,2 \% \pm 0,068$.

Bei 7 Gefäßen (47%) wurde das Trauma durch 3 jeweils 20s dauernde Dilatationen mit ansteigenden Drücken von 6, 8 und 10 atü erzeugt. Bei dieser Gruppe ergab sich eine durchschnittliche DiI-positive Lumenbedeckung von $39,8 \% \pm 0,040$. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,6$) (s. Tab 5.4 und Abb. 5.3).

Vorverletzung	Anzahl(n)	DiI-positive Zirkumferenz	SEM
einfach	8	0,442	0,068
mehrfach	7	0,398	0,040

Tab. 5.4: Durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz differenziert nach Art der Vorverletzung

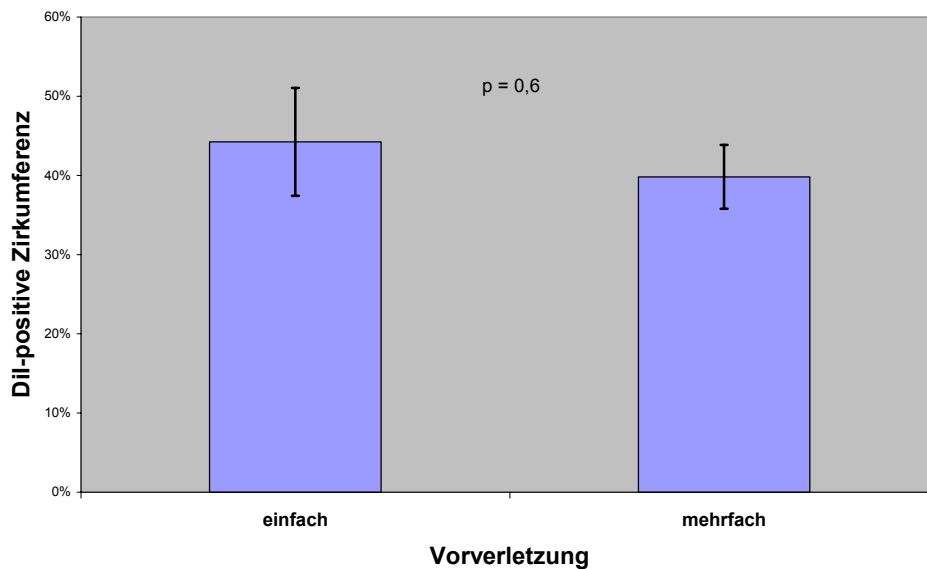


Abb. 5.3: Auswirkung der Vorverletzungsart durch Überdehnung mit dem Ballon auf die DiI-positive Zirkumferenz

5.5. Einfluss der Zellkonzentrationen auf das Cell-seeding

Bei der Applikation der Zellsuspensionen lagen die Zellen in verschiedenen Konzentrationen vor. 6 Gefäße (40%) wurden mit einer Konzentration von 10000 Zellen pro μl behandelt, und wiesen eine DiI-positive Lumenbedeckung von durchschnittlich $54,2\% \pm 0,047$ auf. Die 3

Gefäße (20 %), die mit einer Konzentration von 7000 Zellen pro μl behandelt wurden, wiesen durchschnittlich $37,5 \% \pm 0,096$ DiI-positive luminale Bedeckung auf. 2 weitere Gefäße (13%) wurden mit einer Konzentration von 6000 Zellen pro μl behandelt, und ergaben eine DiI-positive Lumenbedeckung von durchschnittlich $30,9 \% \pm 0,055$. Bei 4 Gefäßen (27%) wurde schließlich eine Suspension mit 5000 Zellen pro μl verwendet, wodurch sich eine durchschnittliche DiI-positive Lumenbedeckung von $33,3 \% \pm 0,069$ ergab. Der Unterschied ist signifikant (globaler p-Wert im 4-Gruppenvergleich: 0,026) (s. Tab. 5.5 und Abb.5.4)

Zellkonzentration	Anzahl(n)	DiI-positive Zirkumferenz	SEM
10000/ μl	6	0,542	0,047
7000/ μl	3	0,375	0,096
6000/ μl	2	0,309	0,055
5000/ μl	4	0,333	0,069

Tab. 5.5: Durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz differenziert nach verwendeter Zellkonzentration

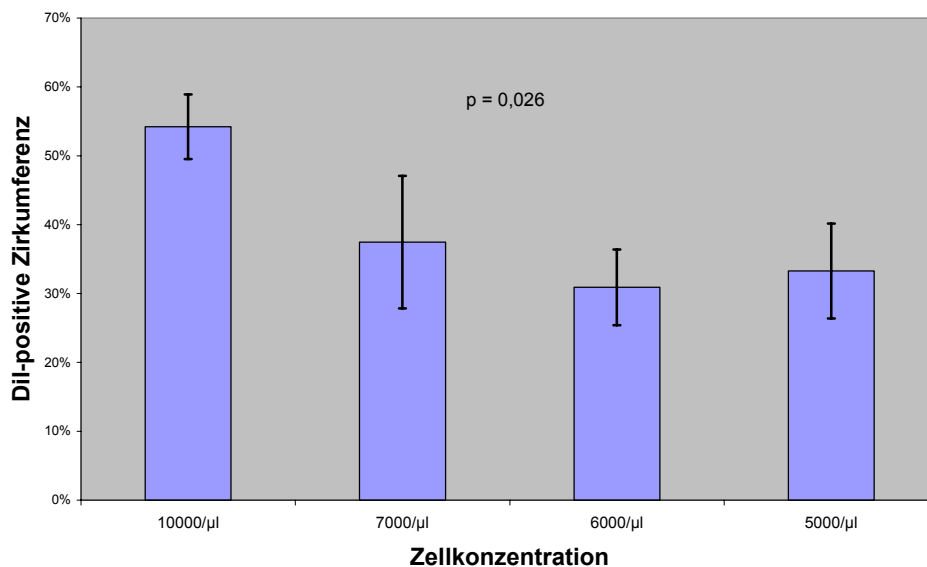


Abb. 5.4: Vergleich der durchschnittlichen DiI-positiven Zirkumferenz differenziert nach verwendeter Konzentration der Zellsuspension

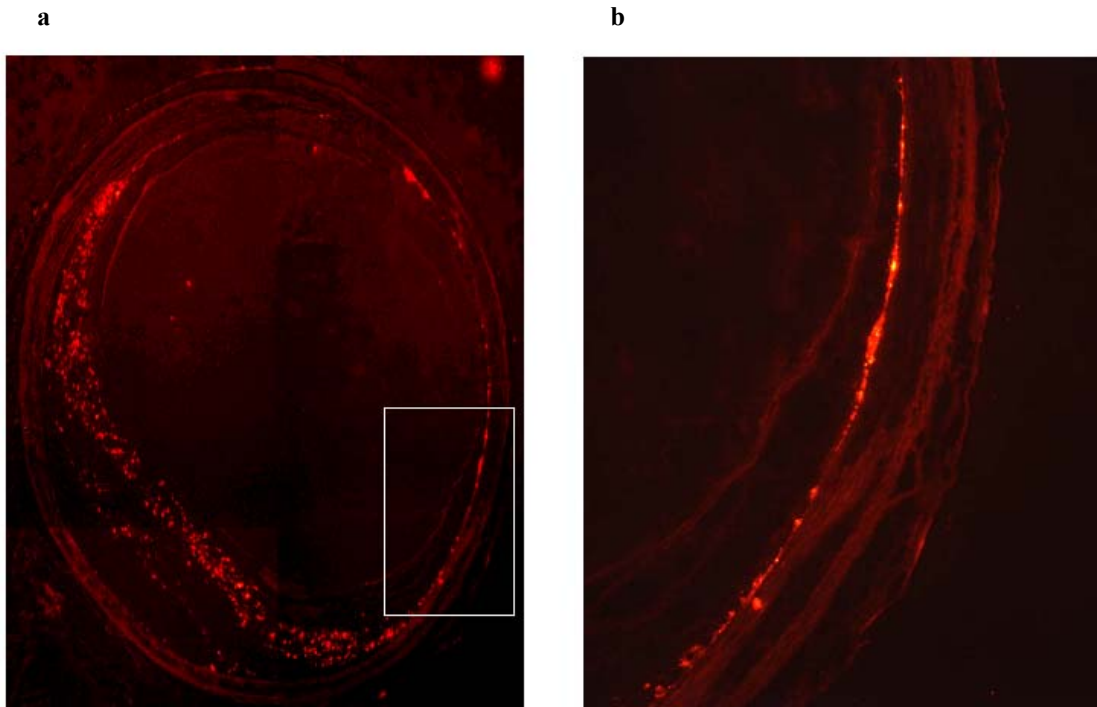
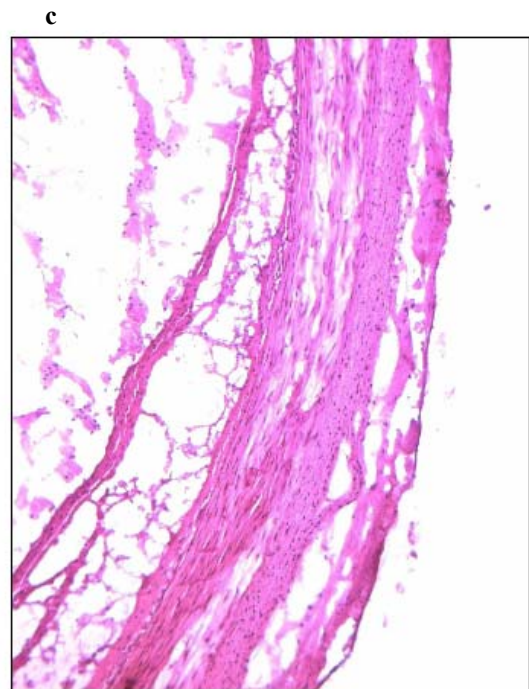
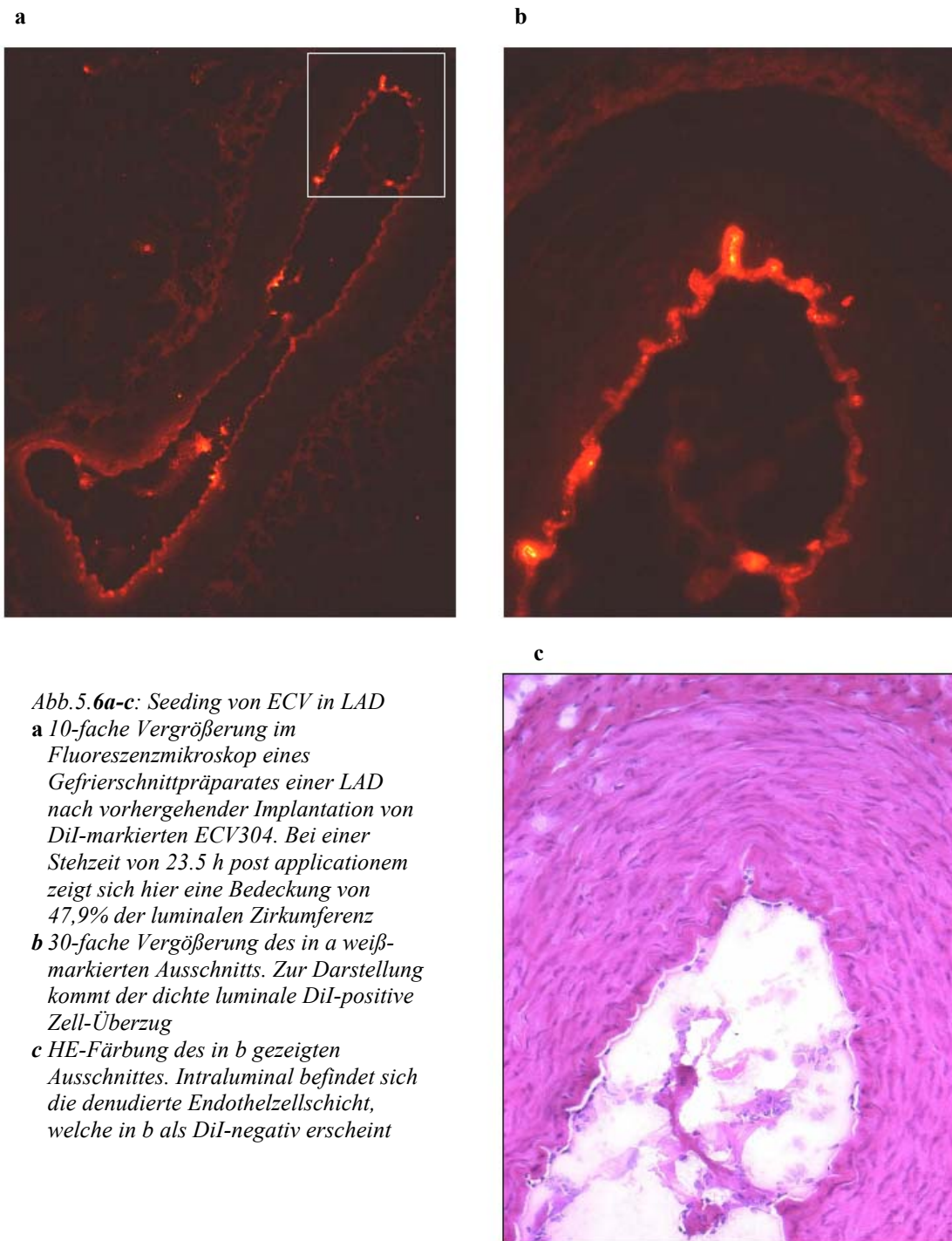


Abb. 5.5a-c: pEC-Seeding in Art.femoralis
a 5-fache Vergrößerung im Fluoreszenz-Mikroskop eines Gefrierschnitt-Präparates einer Art. femoralis, in welche zuvor DiI-markierte pEC implantiert wurden. Bei einer Stehzeit von 140 min. post applicationem zeigt sich eine luminale Bedeckung von 74,2% der Zirkumferenz
b 20-fache Vergrößerung des in a weiß-markierten Ausschnittes. Deutlich zu sehen ist der DiI-positive Zellsaum.
c In der HE-Färbung bei 20-facher Vergrößerung desselben Präparates wird neben den sichtbaren anatomischen Wandstrukturen die Ablösung der denudierten Endothel-Zellschicht deutlich





5.6. Vergleich des Cell-seeding in die Koronargefäße zu den Femoralgefäßen

Die folgende Aufstellung berücksichtigt die 6 Gefäße, die mit einer Zellkonzentration von 10000/ μ l behandelt wurden. Es soll hierbei der Unterschied des Cell-seeding bezogen auf die Gefäßart dargestellt werden.

In dieser Gruppe wurden 3 Koronargefäße (50%) und 3 Femoralgefäße (50%) behandelt. Die durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz der Femoralgefäße von $58,4\% \pm 0,079$ war dabei insgesamt höher als die durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz der Koronargefäße mit $50,1\% \pm 0,055$. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,44$)

Nachfolgend ist der Vergleich noch einmal tabellarisch und graphisch dargestellt (siehe Tab 5.6 und Abb. 5.7)

Gruppe	Anzahl(n)	DiI-positive Zirkumferenz	SEM
Koronargefäße	3	0,501	0,055
Femoralgefäße	3	0,584	0,079

Tab. 5.6: Durchschnittliche DiI-positive Zirkumferenz der unterschiedlichen Gefäßarten

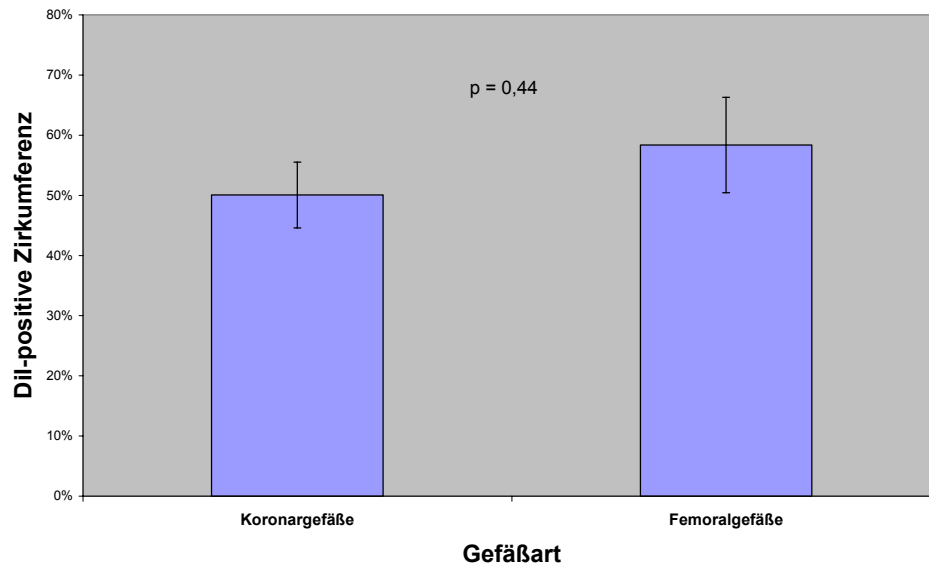


Abb. 5.7: Vergleich der durchschnittlichen DiI-positiven Zirkumferenz in den Versuchsgruppen KoronargefäÙe und FemoralgefäÙe

6. Diskussion

6.1. Einfluss verschiedener Faktoren auf das Ergebnis des Cell-seeding

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die Möglichkeit des intravaskulären cell-seedings nach Endothelverletzung durch PTCA auf. Es wurden endothelähnliche immortalisierte Zellen, porcine glatte Muskelzellen (pSMCs) sowie porcine Endothelzellen (pECs) verwendet. Im Hinblick auf die verwendete Zellart zeigte das Ergebnis des luminalen Wandbewuchses keine signifikanten Unterschiede zueinander. Auch der Versuch, die Zellen in die methodisch weniger kompliziert zu behandelnden Femoralgefäße zu implantieren, brachte im Vergleich zu den Koronargefäßen kein signifikant höheres Ergebnis an positiver Gefäßwandbedeckung.

Hingegen konnte ein signifikanter Einfluss der Zellkonzentration der injizierten Suspension auf das Ergebnis festgestellt werden. Gefäße, die mit einer Konzentration von 10000 Zellen pro μl behandelt wurden, zeigten einen deutlich höheren Anteil an positiv bewachsener Zirkumferenz. Eine weitere Erhöhung der applizierten Zellzahl würde zwar einerseits in einer noch höheren Bedeckung der Gefäßwand resultieren, könnte aber andererseits auch die Gefahr eines Gefäßverschlusses direkt nach Applikation steigern.

Die Variation der Gefäßverletzung durch Dilatation von einmalig 20s mit 8 atü zu einer dreimaligen Dilatation für je 20s mit ansteigenden Drücken von 6, 8 und 10 atü erfolgte mit der Überlegung, durch eine stärkere Verletzung das Endothel stärker zu denudieren und damit eine höhere Adhäsivität der Gefäßwand für die implantierten Zellen erreichen zu können.

Wie von Hamon et al. ¹⁷ beschrieben, besteht zwischen neointimaler Proliferation und dem Ausmaß der Endothelverletzung eine direkte Beziehung. Jedoch stellte sich bei unseren Untersuchungen kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen bezogen auf die Vorverletzung dar. Es ist wohl davon auszugehen, dass der Zeitraum von Verletzung bis zur Opferung zu kurz war, um längerfristige Auswirkungen der Verletzungsintensität zu beobachten, oder aber dass die vorgenommene Variation zu geringfügig war, um die Intensität der vaskulären Verletzung überhaupt zu verändern.

In unseren Versuchen wurde außerdem gezeigt, dass das positive Ergebnis des Cell-seeding auch längerfristig aufrechterhalten werden konnte. Die Versuche, bei denen die Tiere am selben Tag nach kurzer Stehzeit geopfert wurden, wiesen kein signifikant besseres Ergebnis auf als die Versuche, bei denen die Tiere nach längerer Stehzeit am nächsten Tag geopfert wurden. Sicherlich müsste das Langzeitergebnis des Cell-seeding in Versuchen mit einer noch längeren Stehzeit überprüft werden.

6.2. Eignung der ECV304-Zelllinie für das endotheliale Cell-seeding-Modell

Die in einem Teil unserer Versuche verwendete ECV304-Zelllinie konnte erfolgreich an die Gefäßwand angesiedelt werden. Wie jedoch in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben, handelt es sich dabei um ein Derivat aus der humanen Harnblasen-Carcinom-Zelllinie T24, und eigentlich nicht um eine endotheliale Zellart. Trotz der ursprünglichen Herkunft konnten in genaueren Untersuchungen für die ECV304-Zellen einige endotheliale Charakteristika ausgemacht werden. So haben die Zellen zum einen die Fähigkeit konfluent und dicht zu wachsen, zum anderen exprimieren sie auch endothelspezifische Proteine, wie Thrombomodulin, ICAM, VCAM, CD51 und Vimentin^{16;24}. Sie scheinen sich also als endotheliales Modell gut zu eignen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Möglichkeit aufgezeigt werden, ECV304-Zellen intraluminal zu platzieren, auch über einen längeren Zeitraum von 24 Std. Nur unter Vorbehalt sind jedoch Rückschlüsse auf die längerfristige Übertragbarkeit des ECV304-Modells auf den Menschen möglich, da ECV304-Zellen durchaus auch epithelspezifische Eigenschaften aufweisen²⁴ und auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren ein sehr hohes proliferatives Potential aufweisen, welches dann in vivo wohl schwer kontrollierbar wäre.

6.3. Lokale Zellapplikation mit dem Dispatch®-Katheter

Obwohl in bisherigen Versuchen mit dem Dispatch®-Katheter überwiegend die Applikation von Pharmaka^{28;44} oder der Gentransfer⁴⁵ beschrieben wurde, konnten wir in unseren Versuchen auch die Möglichkeit der lokalen Applikation von Zellsuspensionen demonstrieren. Ein entscheidender Vorteil dieses Instruments gegenüber anderen Applikationssystemen wie z.B. dem Doppelballon¹⁴ oder dem porösen Ballon⁵⁰ ist die geringere Okklusion des Gefäßes, da aufgrund der Konstruktion für den Zeitraum der Applikation eine Perfusion besteht. Da Applikationen von 30 bis 60 Minuten ohne Ischämiezeichen möglich sind²⁷, kann so für die zu implantierenden Zellen eine ausreichend lange Inkubationszeit mit der Gefäßwand erreicht werden. Auch die Zellabgabe an die Gefäßwand verläuft atraumatischer als beispielsweise eine Applikation mit dem Nadelinjektionskatheter¹³. Vorteilhaft ist außerdem, dass das System aufgrund seiner Ähnlichkeit mit der Angioplastie-Technik, relativ einfach zu handhaben ist, was wiederum die Übertragbarkeit dieses Applikationsmodells vom Tierversuch auf den Menschen als realistisch erscheinen lässt.

6.4. Übertragbarkeit des Cell-seeding vom Schweinmodell auf den Menschen

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass applizierte Zellen nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit mit der Gefäßwand von etwa 15 min erfolgreich implantiert werden konnten. Über den Adhäsions-Mechanismus gibt es bisher nur Vermutungen. Yamamoto et al.⁵¹ beschreiben, dass glatte Muskelzellen über $\alpha1\beta1$ - und $\alpha2\beta1$ - Integrine mit Fibronectin und Typ1-Kollagen in Kontakt treten und adhären können.

In diesem Zusammenhang wurde auch eine verstärkte Zelladhäsion glatter Muskelzellen im Anschluss an die Aktivierung von β 1-Integrinen beschrieben²⁵. Da es im Rahmen der Verletzung des Endothels nach PTCA zur Freilegung von Fibronectin kommt¹, welches Bestandteil der extrazellulären Matrix in der Media ist, könnte dies eine Erklärung für die Adhäsion der SMCs an der Gefäßwand darstellen. Vermutlich sind ähnliche Rezeptoren auf den in unserer Arbeit verwendeten ECV304- und Endothelzellen vorhanden, zumal in unseren Versuchen kein signifikanter Unterschied des Seeding-Ergebnisses bezogen auf die Zellart festzustellen war.

Grundsätzlich ist die kardiovaskuläre Anatomie und Physiologie des Schweins der des Menschen sehr ähnlich, was das Schwein zu einem geeigneten Modell für die Untersuchung der Restenose macht¹⁷, wie in mehreren Studien bewiesen wurde. Eine entscheidende Frage ist jedoch, inwieweit das Fehlen der atherosklerotischen Gefäßvorschädigung bei unseren Versuchstieren die Adhäsivität der applizierten Zellen zur Gefäßwand beeinflusst. Da es im Rahmen der Atherosklerose zu einem vermehrten Vorhandensein von Fibronectin und auch Kollagen Typ I kommt, kann von einer erhöhten Zelladhäsivität ausgegangen werden. Dies könnte sich bei einer Übertragung des Modells auf den Menschen positiv im Ergebnis des Cell-seedings niederschlagen.

6.5. Therapeutischer Einsatz des Cell-seedings

Ob sich der Einsatz des dargestellten Modells der intravaskulären Zellimplantation zur Praevention der Restenose eignet, ist hier nicht mit Sicherheit zu klären. Grundsätzliche Überlegungen könnten jedoch einen Einsatz dieser Methode interessant machen.

Eine der wichtigsten angenommenen Ursachen für die Initiierung des Restenoseprozesses ist die Verletzung der endothelialen Integrität, wie oben beschrieben (s. Kap.2.1.2). Im Hinblick darauf scheint der Versuch einer schnellen Wiederherstellung der Endothelschicht ein entscheidender Eingriff in die Entwicklung der Restenose zu sein. Jedoch zeigten Versuche an Kaninchen, bei denen nach Ballonverletzung durch Endothelzelltransfer die Endothelschicht wiederhergestellt werden konnte, keinen signifikanten Einfluss auf die Neointimaprolieration⁴⁹. Somit bleibt offen, ob unser Modell der frühen Reendothelialisierung durch Implantation von Zellen in die verletzte Gefäßwand zur

Restenosepraevention geeignet ist. Vielversprechender scheint hingegen der Einsatz ex vivo genetisch modifizierter Zellen zur Implantation zu sein. Dabei könnten Zellen eingesetzt werden, die nach ex vivo erfolgter Modifikation lokal antiinflammatorische Substanzen überexprimieren.

7. Zusammenfassung

Die Verletzung der Integrität der endothelialen Zellschicht im Koronargefäß nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie führt zu einer Änderung der Gefäßgeometrie und der lokalen Flussverhältnisse. Die sich anschließende Entzündung und Proliferation der Neointima führt letztendlich zum Wiederverschluß des Gefäßes, der so genannten Restenose. Frühe Reendothelialisierung und lokale Überexpression spezieller Inhibitoren würde die Neointimabildung und somit auch die Restenoserate senken.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit des intravaskulären Transfers von ECV304-Zellen, pSMC und pEC mittels eines speziellen Infusionskatheters, dem Dispatch®-Katheter, nach Denudierung der Endothelschicht durch Ballondilatation am Schweinemodell dargestellt. Die Implantation erfolgte in Femoral- und Koronargefäße. Dabei konnte ein positiver luminaler Wandbewuchs unabhängig von dem behandelten Gefäßtyp und der verwendeten Zellart, aber abhängig von der Konzentration der applizierten Zellsuspension gezeigt werden. Die Adhärenz der implantierten Zellen war auch nach einer verlängerten Stehzeit von 24 Stunden nachweisbar.

Diese Ergebnisse eröffnen eine weitere Möglichkeit der lokalen Therapie mit gentechnisch modifizierten Zellen zur Restenosereduktion.

8. Literaturverzeichnis

1. Bauters C, Marotte F, Hamon M, Oliviero P, Farhadian F, Robert V, Samuel JL, Rappaport L. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs after balloon denudation of rabbit arteries. *Circulation* 1995;92:904-11.
2. Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand ME. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovasc.Res.* 1996;31:835-46.
3. Baykal D, Schmedtje JF, Jr., Runge MS. Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. *Am.J.Cardiol.* 1995;75:82B-7B.
4. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation* 1992;86:723-9.
5. Chapman GD, Lim CS, Gammon RS, Culp SC, Desper JS, Bauman RP, Swain JL, Stack RS. Gene transfer into coronary arteries of intact animals with a percutaneous balloon catheter. *Circ.Res.* 1992;71:27-33.
6. Cox DA, Anderson PG, Roubin GS, Chou C, Agrawal SK, Cavebder JB. Effect of local delivery of heparin and methotrexate on neointimal proliferation in stented porcine coronary arteries. *Coronary Artery Dis* 1992;237-48.
7. der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:1137-41.

8. Elliott JM, Berdan LG, Holmes DR, Isner JM, King SB, Keeler GP, Kearney M, Califf RM, Topol EJ. One-year follow-up in the Coronary Angioplasty Versus Excisional Atherectomy Trial (CAVEAT I). *Circulation* 1995;91:2158-66.
9. Fischell TA, Derby G, Tse TM, Stadius ML. Coronary artery vasoconstriction routinely occurs after percutaneous transluminal coronary angioplasty. A quantitative arteriographic analysis. *Circulation* 1988;78:1323-34.
10. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N.Engl.J.Med.* 1994;331:496-501.
11. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1991;17:758-69.
12. Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb.Haemost.* 1995;74:552-9.
13. Gonschior P, Backfisch G, Muth G, Schiele R, Vogel-Wiens C, Pahl C, Sponer G. Local Drug Delivery Via Transvascular Injection. *J.Invasive.Cardiol.* 1999;11:600-7.
14. Gonschior P, Pahl C, Huehns TY, Gerheuser F, Erdemci A, Larisch K, Dellian M, Deil S, Goetz AE, Lehr HA. Comparison of local intravascular drug-delivery catheter systems. *Am.Heart J.* 1995;130:1174-81.

15. Guzman RJ, Hirschowitz EA, Brody SL, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:10732-6.
16. Haller C, Kiessling F, Kubler W. Polarized expression of heterologous membrane proteins transfected in a human endothelial-derived cell line. *Eur.J.Cell Biol.* 1998;75:353-61.
17. Hamon M, Bauters C, McFadden EP, Wernert N, Lablanche JM, Dupuis B, Bertrand ME. Restenosis after coronary angioplasty. *Eur.Heart J.* 1995;16 Suppl I:33-48.
18. Hanet C, Wijns W, Michel X, Schroeder E. Influence of balloon size and stenosis morphology on immediate and delayed elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1991;18:506-11.
19. Hanke H, Oberhoff M, Hanke S, Hassenstein S, Kamenz J, Schmid KM, Betz E, Karsch KR. Inhibition of cellular proliferation after experimental balloon angioplasty by low-molecular-weight heparin. *Circulation* 1992;85:1548-56.
20. Hehrlein C, Gollan C, Donges K, Metz J, Riessen R, Fehsenfeld P, von Hodenberg E, Kubler W. Low-dose radioactive endovascular stents prevent smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation* 1995;92:1570-5.
21. Hermans WR, Rensing BJ, Strauss BH, Serruys PW. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the search for a "magic bullet". *Am.Heart J.* 1991;122:171-87.

22. Herrman JP, Hermans WR, Vos J, Serruys PW. Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? (Part I). *Drugs* 1993;46:18-52.
23. Höfling B, Gonschior P, Nikol S, Bauriedel G, Welsch U, and Nerlich A. Medikamentöse und instrumentelle Ansätze zur Restenoseprophylaxe. (313-8). 1995. *Z Kardiol* 83.
24. Kiessling F, Kartenbeck J, Haller C. Cell-cell contacts in the human cell line ECV304 exhibit both endothelial and epithelial characteristics. *Cell Tissue Res.* 1999;297:131-40.
25. Koyama N, Seki J, Vergel S, Mattsson EJ, Yednock T, Kovach NL, Harlan JM, Clowes AW. Regulation and function of an activation-dependent epitope of the beta 1 integrins in vascular cells after balloon injury in baboon arteries and in vitro. *Am.J.Pathol.* 1996;148:749-61.
26. Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1996;28:1643-51.
27. Lincoff AM, Topol EJ, Ellis SG. Local drug delivery for the prevention of restenosis. Fact, fancy, and future. *Circulation* 1994;90:2070-84.
28. McKay RG, Fram DB, Hirst JA, Kiernan FJ, Primiano CA, Rinaldi MJ, Azrin MA, Mitchel JF, Waters DD. Treatment of intracoronary thrombus with local urokinase infusion using a new, site-specific drug delivery system: the Dispatch catheter. *Cathet.Cardiovasc.Diagn.* 1994;33:181-8.

29. Meyer BJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Falk E, Badimon L, Michael AD, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Local delivery of r-hirudin by a double-balloon perfusion catheter prevents mural thrombosis and minimizes platelet deposition after angioplasty. *Circulation* 1994;90:2474-80.
30. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, Hong MK, Kovach JA, Leon MB. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:35-43.
31. Mitchel JF, Azrin MA, Fram DB, Hong MK, Wong SC, Barry JJ, Bow LM, Curley TM, Kiernan FJ, Waters DD. Inhibition of platelet deposition and lysis of intracoronary thrombus during balloon angioplasty using urokinase-coated hydrogel balloons. *Circulation* 1994;90:1979-88.
32. Mitchel JF, Fram DB, Palme DF 2nd, Foster R, Hirst JA, Azrin MA, Bow LM, Eldin AM, Waters DD, McKay RG. Enhanced intracoronary thrombolysis with urokinase using a novel, local drug delivery system. In vitro, in vivo, and clinical studies. *Circulation* 1995;91:785-93.
33. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 1990;249:1285-8.
34. Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, Horiuchi H, Nosaka H, Hamasaki N, Yokoi H, Kim K. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1991;17:433-9.

35. Oberhoff M, Herdeg C, Baumbach A, Shamet K, Kranzhofer A, Weingartner O, Rubsamen K, Kluge M, Karsch KR. Time course of smooth muscle cell proliferation after local drug delivery of low-molecular-weight heparin using a porous balloon catheter. *Cathet.Cardiovasc.Diagn.* 1997;41:268-74.
36. Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 1994;265:781-4.
37. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J.Clin.Invest* 1996;98:2277-83.
38. Riessen R, Rahimizadeh H, Blessing E, Takeshita S, Barry JJ, Isner JM. Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon. *Hum.Gene Ther.* 1993;4:749-58.
39. Rodriguez A, Santaera O, Larribeau M, Sosa MI, Palacios IF. Early decrease in minimal luminal diameter after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty predicts late restenosis. *Am.J.Cardiol.* 1993;71:1391-5.
40. Schwartz RS. The vessel wall reaction in restenosis. *Semin.Interv.Cardiol.* 1997;2:83-8.
41. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N.Engl.J.Med.* 1994;331:489-95.

42. Sigwart U. Coronary stents. *Z.Kardiol.* 1995;84 Suppl 2:65-77.
43. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Van Langenhove G, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* 2001;104:2007-11.
44. Suzuki T, Hayase M, Hibi K, Hosokawa H, Yokoya K, Fitzgerald PJ, Yock PG, Cooke JP, Suzuki T, Yeung AC. Effect of local delivery of L-arginine on in-stent restenosis in humans. *Am.J.Cardiol.* 2002;89:363-7.
45. Tahlil O, Bami M, Feldman LJ, Branellec D, Steg PG. The Dispatch catheter as a delivery tool for arterial gene transfer. *Cardiovasc.Res.* 1997;33:181-7.
46. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N.Engl.J.Med.* 1997;336:1697-703.
47. Topol EJ, Leya F, Pinkerton CA, Whitlow PL, Hofling B, Simonton CA, Masden RR, Serruys PW, Leon MB, Williams DO. A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. The CAVEAT Study Group. *N.Engl.J.Med.* 1993;329:221-7.
48. Topol, E. J. and Moliterno DJ. Restenosis In: *Textbook of Cardiovascular Medicine.* 2065-2100. 1998.
49. Villa AE, Guzman LA, Chen W, Golomb G, Levy RJ, Topol EJ. Local delivery of dexamethasone for prevention of neointimal proliferation in a rat model of balloon angioplasty. *J.Clin.Invest* 1994;93:1243-9.

50. Wolinsky H, Thung SN. Use of a perforated balloon catheter to deliver concentrated heparin into the wall of the normal canine artery. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1990;15:475-81.
51. Yamamoto K, Yamamoto M. Cell adhesion receptors for native and denatured type I collagens and fibronectin in rabbit arterial smooth muscle cells in culture. *Exp.Cell Res.* 1994;214:258-63.

9. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr.med. Franz-Josef Neumann danke ich herzlichst für die Überlassung der Arbeit. Frau Dr. Ott und Herrn Dr. Valina danke ich für die kompetente Einweisung und Betreuung.

Allen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Chirurgie der TU München, vor allem den Tierärzten Frau Dr. Erika Schneider und Frau Dr. Franziska Wegener möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der Tier-Versuche danken.

Ebenso sei den Mitarbeitern am Labor des deutschen Herzzentrums München für die Unterstützung und Anleitung bei meiner Arbeit gedankt.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Luise Schmidt, ohne deren geduldige Einweisung, Unterstützung und stetige Motivation die Beendigung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein herzlicher und großer Dank gebührt meinen Eltern Brigitte und Helmut Springer, sowie meinen Schwestern Birgit und Carolin, die mir durch Liebe und familiären Rückhalt meinen Werdegang unterstützt und überhaupt erst ermöglicht haben.

Martina, danke für alles.