

Aus der Klinik für Diagnostische Radiologie

(Direktor: Prof. Dr. med. M. Heller)

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Der Einfluss des Serinproteaseinhibitors Elafin auf die
Ausbildung einer Intimahyperplasie im Denudationsmodell
der Arteria iliaca der Ratte

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

NILS MARKUS BUDACH

aus Essen

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Heller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Wiedow

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.07.2013

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Claus-Christian Glüer
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Glossarium	1
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	3
1.	Einleitung	5
1.1	Die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der pAVK	5
1.2	Definition der Intimahyperplasie	7
1.3	Therapeutische Ansätze zur Prophylaxe der Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie oder Stenteinlage	8
1.4	Rationale für die Verwendung von Elafin	10
2.	Materialien und Methoden	12
2.1	Studiendesign	12
2.2	Materialien	12
2.2.1	Versuchstiere	12
2.3	Methoden	13
2.3.1	Tierhaltung	13
2.3.2	Denudation und Implantation der Alzet®-Pumpen	13
2.3.3	Sonographie	17
2.3.3.1	Vevo 770 High Resolution in vivo imaging system	17
2.3.3.2	Durchführung der Ultraschalluntersuchungen	18
2.3.4	Entnahme des Gefäßpräparates	20

2.3.5	Histologie (morphologisch)	20
2.3.5.1	Herstellung der histologischen Nativpräparate	20
2.3.5.2	Herstellung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE)	22
2.3.5.3	Herstellung der kombinierten Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung	22
2.3.5.4	Morphometrische Auswertung der histologischen Schnitte	23
2.3.6	Immunhistochemie	25
2.3.6.1	Vorbereitung der Paraffinschnitte	25
2.3.6.2	Antikörperfärbungen	25
2.3.6.3	Semiquantitative Auswertung von Ki-67, SMA, ED-1, RECA-1 und ICAM-1	26
2.3.6.4	Quantitative Auswertung von Caspase-3, Ki-67 und SMA	27
2.3.7	Statistische Verfahren	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Erfolgsrate des Denudationsverfahrens	30
3.2	Auswertung der sonographischen Messungen	30
3.3	Auswertung der Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung	33
3.3.1	Darstellung der Intimahyperplasie mittels Masson-Goldner-Kossa-Elastika-Färbung	33
3.3.2	Elafin- vs. Kontrollgruppe: Schnitte mit Intimahyperplasie auf der denudierten Seite	34
3.3.3	Verteilung der Intimahyperplasie innerhalb der Arterie	35
3.3.4	Vergleich der Flächen von Neointima, Media und Lumen der Elafin- und Kontrollgruppe	36

3.4	Korrelation zwischen Sonographie und Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung	39
3.5	Auswertung der Immunhistochemie	40
3.5.1	Manuelle Auswertung der Immunhistochemie	40
3.5.2	Automatisierte Auswertung der Immunhistochemie	42
4.	Diskussion	45
4.1	Diskussion des Tiermodells	45
4.2	Diskussion der sonographischen Messungen	48
4.3	Diskussion der histologischen Färbungen	51
4.4	Diskussion der Korrelation zwischen den sonographischen Messungen und der Masson-Golder-Elastika-Kossa-Färbung	56
4.5	Diskussion der immunhistochemischen Färbungen	57
4.6	Fazit	59
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literatur	62
7.	Anhang	74
7.1	Liste der Materialien	74
7.2	Abstract	87
7.3	Danksagung	89
7.4	Lebenslauf	90

Glossarium

2F	Zwei french
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
DAB	Diaminobenzidin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IH	Intimahyperplasie
IHC	Immunhistochemie
IMA	Intima-Media-Area = Intima-Media-Fläche
IMT	Intima-Media-Thickness = Intima-Media-Dicke
HRT	Horseradish Peroxidase
M.	Musculus
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	Platelet-derived growth factor
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie

PTA	perkutane transluminale Angioplastie
RECA-1	Rat Endothelial Cell Antibody 1
SE	standard error = Standardfehler
SMA	alpha smooth muscle actin
TBS	Tris-buffered Saline
TGF- β	Transforming Growth Factor β

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. Nr.	Titel der Abbildung	Seite
Abb. 1:	Sonographische B-Mode-Darstellung von Aorta und Iliakalarterien im Querschnitt	-15-
Abb. 2:	Sonographische B-Mode-Darstellung der proximalen A. iliaca mit inflatiertem Ballon im Längsschnitt	-16-
Abb. 3:	Sonographische B-Mode-Darstellung der anatomischen Verhältnisse der Gefäßwand einer proximalen Iliakalarterie im Längsschnitt	-19-
Abb. 4:	Schema der Gefäßpräparate	-21-
Abb. 5:	Masson-Goldner-Elastika-Kossa-gefärbter Schnitt einer denudierten Iliakalarterie	-24-
Abb. 6:	Caspase-3-Färbung einer denudierten Iliakalarterie	-28-
Abb. 7:	Mittelwerte und Standardfehler der Intima-Media-Dicke (IMT) der Tiere der Elafin- und Kontrollgruppe jeweils für das denudierte Bein und das Kontrollbein	-31-
Abb. 8:	Interobserver-Korrelation der sonographisch ermittelten Intima-Media-Dicke.	-32-
Abb. 9:	Masson-Goldner-Elastika-Kossa-gefärbte Schnitte eines denudierten Gefäßes von vier verschiedenen Tieren.	-33-
Abb. 10:	Absolute Anzahl an Schnitten mit Intimahyperplasie (IH) und ohne (keine IH) der denudierten Seite	-34-
Abb. 11:	Überblick über die Anzahl der Schnitte mit (hellgrau) und ohne Intimahyperplasie (IH; dunkelgrau).	-35-

Abb. 12:	Neointimafläche von Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau) nach Gefäßabschnitt (proximal vs. distal) und Intervention (denudiert vs. Kontrollbein).	-36-
Abb. 13:	Mediafläche von Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau) nach Gefäßabschnitt (proximal vs. distal) und Intervention (denudiert vs. Kontrollbein).	-37-
Abb. 14:	Lumenfläche von Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau) nach Gefäßabschnitt (proximal vs. distal) und Intervention (denudiert vs. Kontrollbein).	-38-
Abb. 15:	Korrelation zwischen Intima-Media-Dicke (IMT) und Intima-Media-Fläche (IMA).	-39-
Abb. 16:	Ki-67- und ED-1-gefärbte Schnitte eines denudierten Gefäßes von verschiedenen Wistar-Ratten.	-40-
Abb. 17:	ICAM-1- [A) und B)], RECA-1- [C) und D)] und SMA- [E) und F)] gefärbte Schnitte eines denudierten Gefäßes von verschiedenen Wistar-Ratten	-41-
Abb. 18:	Native Darstellung von Caspase-3- und Ki-67-gefärbten Schnitten einer denudierten Iliakalarterie verschiedener Wistar-Ratten	-42-
Abb. 19:	Native Darstellung von SMA-gefärbten Schnitten einer denudierten Iliakalarterie verschiedener Wistar-Ratten	-43-
Abb. 20:	Automatisierte Auswertung der SMA-Färbung.	-44-
<u>Tabellen</u>		
Tabelle 1:	Primär- und Sekundärantikörper in der angewendeten Verdünnung.	-26-
Tabelle 2:	Quantitatives Ausmaß der Intimahyperplasie unter Therapie- und Kontrollbedingungen ausgewählter Studien.	-54-
Tabelle 3:	Faktoren, die das Ausmaß der Intimahyperplasie beeinflussen können, zusammengestellt für verschiedene Studien mit systemischen Medikamenten.	-55-

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der pAVK

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen in Deutschland die häufigste Todesursache dar. Laut Statistischem Bundesamt starben im Jahr 2010 352.689 Menschen an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung, was einem Anteil von 41 % an allen Todesursachen entspricht. Die wichtigste spezifische Todesursache stellten dabei mit 133.226 Sterbefällen die ischämischen Herzkrankheiten dar.¹ Hauptursache ist die Arteriosklerose, die sich jedoch nicht nur in den Herzkrankgefäßen manifestiert, sondern auch in den Arm- und in über 90 % in den Becken-Bein-Arterien durch hämodynamisch relevante Gefäßeinengungen als sog. periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) in Erscheinung tritt.² Die pAVK ist eine Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität. Sie betrifft laut verschiedenen epidemiologischen Studien zwischen 3 % und 10 % der europäischen und US-amerikanischen Gesamtbevölkerung und steigt mit dem Alter an. So beträgt die Prävalenz bei den über 70 jährigen Personen bis zu 20 %³, bei Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren sogar 29 %⁴. Die 5-Jahres-Überlebensrate symptomatischer Patienten variiert zwischen 70 % bei Patienten mit schmerzbedingter Einschränkung der Gehstrecke, der sog. Claudicatio intermittens, und 30 % bei Patienten mit kritischer Ischämie der betroffenen Extremität.⁵ Dabei ist die enge Assoziation mit der koronaren Herzkrankheit und der zerebralen Gefäßkrankheit in Form von Herzinfarkt und Schlaganfall ursächlich für die hohe Sterblichkeit der pAVK⁶ mit einer drei- bis fünffach erhöhten kardiovaskulären Mortalität^{5,7}. Patienten mit kritischer Ischämie einer Extremität weisen zudem im ersten Jahr nach Diagnosestellung ihrer Erkrankung eine Amputationsrate von 25 % auf.^{6,8} Aus diesen Gründen ist die rechtzeitige Diagnose und Behandlung der pAVK von entscheidender Bedeutung. Für viele atherosklerotisch bedingte vaskuläre Engstellen stellen minimalinvasive interventionell-radiologische perkutane Revaskularisationsverfahren die Therapie der ersten Wahl dar, da sie eine niedrigere Morbidität und Mortalität verglichen mit chirurgischen Rekanalisierungsverfahren aufweisen.^{9,10} Am häufigsten wird die sog.

perkutane transluminale Ballonangioplastie (PTA) eingesetzt, ein Verfahren, welches erstmalig von Charles Dotter 1964 beschrieben wurde¹¹ und durch Andreas Grüntzig weiterentwickelt wurde¹², der diese Methode erstmals bei der Behandlung von Stenosen der Herzkrankgefäße 1977 eingesetzt hat¹³. Im Rahmen der PTA wird ein Katheter mit einem aufblasbaren Ballon über einen Führungsdraht unter Lokalanästhesie ante- oder retrograd in die Arteria femoralis communis eingeführt und bis in den Bereich der Gefäßstenose vorgeschoben. Je nach Beschaffenheit der Stenose wird der Ballon mit einem Druck von mehreren physikalischen Atmosphären inflatiert. Dieser Vorgang wird gegebenenfalls mehrfach wiederholt, bis durch Frakturierung und Verlagerung des artherosklerotischen Plaques aus der Intima in die Media eine Erweiterung des Lumens herbeigeführt wird.¹⁴ Trotz hoher primärer Erfolgsraten der PTA von bis zu 95 %⁶ kommt es bei 30 %¹⁵-63 %¹⁶ der behandelten Patienten bereits nach einem Jahr zu einer Restenose, die eine erneute Behandlung erforderlich machen kann. Mechanismen, die zu einer PTA-bedingten Restenose führen können, sind durch die elastischen Rückstellkräfte des Gefäßes, negatives Remodeling und eine überschießende Intimabildung, genannt Intimahyperplasie, bedingt.¹⁷ Die elastischen Rückstellkräfte sind für das akute Schrumpfen des Gefäßdurchmessers innerhalb von 15 Minuten nach der Intervention verantwortlich¹⁸ und können bis zu 50 % des initial durch Ballonangioplastie gewonnenen Gefäßdurchmessers nivellieren¹⁹. Die elastischen Rückstellkräfte können ebenso wie das negative Remodeling, das infolge von Umbauprozessen der extrazellulären Matrix (EZM) durch Verdickung der Adventitia und narbige Kontraktion innerhalb von Monaten zu einer Einengung des Gefäßlumens führt²⁰, erfolgreich durch die Einlage einer Gefäßstütze, des sog. Stents, in ihrer Wirkung gemindert werden²¹. Ein Problem der Restenose-Therapie mit Stents in den Becken-Bein-Gefäßen ist die hohe In-Stent-Restenoserate, die bei älteren Stentmodellen bis zu 78 % im ersten Jahr²² beträgt und im Wesentlichen durch die Intimahyperplasie bedingt ist²³. Auch neuere Stentmodelle, die sog. Nitinolstents, die aus einer speziellen Nickel-Titan-Legierung bestehen, haben den Einfluss der Intimahyperplasie zwar verringern, aber mit Restenoseraten von 18 %²⁴ -40 %¹⁶ im ersten Jahr nicht aufheben können. Zum besseren Verständnis der intimahyperplasiebedingten Restenose und möglicher Therapieoptionen werden die pathophysiologischen Prozesse im Zuge der Neointimaformation im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.2 Definition der Intimahyperplasie

Der Begriff Intimahyperplasie beschreibt einen überschießenden Heilungsprozess, der pathophysiologisch nach Verletzungen der Tunica intima der Gefäßwand, im Rahmen von entzündlichen Gefäßwandveränderungen oder im Zuge einer verstärkten Wandschubspannung – dies entspricht der Reibung, die durch das Blut mit seinen Bestandteilen an der Gefäßwand ausgelöst wird – auftritt.²⁵ Aber auch unter physiologischen Bedingungen kann es zur Entstehung einer überschießenden Neointima kommen, beispielsweise im Zuge des Verschlusses des Ductus arteriosus botalli oder der distalen Nabelschnurarterie.²⁶ Im Rahmen der Behandlung der pAVK können eine Reihe von Behandlungsmöglichkeiten zu einer überschießenden Neointima führen, unter anderem venöse oder künstliche Bypässe, Endarterektomie, Ballonangioplastie²⁷ sowie die Einlage von Stents.

Eine Verletzung der Intima führt zur Exposition subintimaler Gefäßschichten (Tunica media, Tunica adventitia) mit zirkulierenden Blutbestandteilen.²⁸ Wenige Sekunden nach Traumatisierung der Intima kommt es zum Kontakt zwischen den subintimalen glatten Muskelzellen und Thrombozyten, die daraufhin agglutinieren und an den subintimalen Bereich adhären.²⁹ Einige der Thrombozyten verweilen als einschichtige Zellschicht bis zu sieben Tagen in Adhäsion, wobei unter anderem Granula ausgeschüttet werden, die Zytokine und platelet-derived-growth-factor (PDGF) beinhalten, was zu einer verstärkten Proliferation führt und die glatten Gefäßmuskelzellen in einen Migrationszustand versetzt.³⁰ Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen wird initial durch Freisetzung des basic fibroblast growth factor als potentes Agens der Zellteilung gefördert.³¹ Chemotaktisch werden Leukozyten und Makrophagen angelockt.³² Letztere wandern in die Gefäßwand ein und produzieren dort PDGF³³ und Interleukin-1 (IL-1)³⁴, womit Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen weiter vorangetrieben werden. Die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen von der Media in die Intima beginnt ein bis drei Tage nach Verletzung der Intima³⁵ und wird durch eine aufgrund von Proteasen bedingte veränderte Zusammensetzung der EZM begünstigt³⁶. Eine Reihe von Enzymen sind für diesen Umbau der EZM verantwortlich, unter anderem Matrixmetalloproteinasen³⁷ und die endogene vaskuläre Elastase, eine Protease, die von glatten Gefäßmuskelzellen produziert und freigesetzt wird³⁸. In der Intima proliferieren die glatten Gefäßmuskelzellen weiter und beginnen, als Abgrenzung zum Lumen eine

Endothel-ähnliche Schicht zu bilden.³⁹ Gleichzeitig wachsen Endothelzellen von proximal und distal des denudierten Endothels in den verletzten Bereich ein und beginnen, diesen unter Bildung eines einzelligen Epithels zu schließen.⁴⁰ Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF- β ⁴¹ synthetisieren die glatten Gefäßmuskelzellen in großem Maßstab neue EZM, die zu großen Teilen aus Elastin, Kollagen⁴², Fibronectin und Proteoglykanen³⁶ besteht, bis zu 90 % der neu gebildeten Intima ausmacht⁴³ und damit entscheidend zur Einengung des Gefäßlumens beiträgt.

1.3 Therapeutische Ansätze zur Prophylaxe der Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie oder Einlage von Stents

Bisher wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Restenose nach PTA/PTCA bzw. Stenteinlage zu verhindern. Viele dieser Studien konzentrieren sich auf die Prävention der Intimahyperplasie, da diese die Hauptursache der In-Stent-Restenose darstellt.⁴⁴

Systemisch verabreichte Medikamente konnten sich bisher nicht durchsetzen, weil Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen Tiermodellen und dem Einsatz beim Menschen bestanden oder die erforderliche therapeutische Dosis nur mit toxischen Plasmaspiegeln des Wirkstoffs zu realisieren war.⁴⁵

Dem gegenüber haben lokale Therapiekonzepte den Vorteil, ihren Wirkstoff in ausreichender Konzentration direkt vor Ort freizusetzen, ohne dabei eine nennenswerte systemische Toxizität zu entwickeln.⁴⁶ Eines der ersten lokalen Verfahren stellt die endovaskuläre Brachytherapie dar, eine Methode aus der Strahlentherapie, bei der eine radioaktive Strahlenquelle vorübergehend oder dauerhaft in unmittelbarer Nähe des zu bestrahlenden Gefäßabschnittes deponiert wird.⁴⁷ Die endovaskuläre Brachytherapie konnte zwar eine kurz- und mittelfristige Suppression eines neointimalen Wachstums in koronaren Stents herbeiführen, langfristig traten jedoch erneute Restenosen und späte In-Stent-Thrombosen auf.⁴⁸

In der Anwendung der Prävention der intimahyperplasiebedingten Restenose in peripheren Gefäßen konnten diese Beobachtungen verifiziert werden. Zudem konnte ein ökonomisch sinnvoller Einsatz nicht belegt werden.² Ein weiterer Nachteil ist die Akzeptanz des Verfahrens per se, bedingt durch den technischen Aufwand und den Einsatz radioaktiver Substanzen.⁴⁹ Neben radioaktiver Strahlung wurde ultraviolette Strahlung in Verbindung mit dem photosensibilisierenden Medikament Psoralen zur Prävention der Restenose eingesetzt, welches jedoch zu keiner Verringerung der Intimahyperplasie führte und durch negatives Remodeling sogar eine Einengung des Gefäßlumens verursachte.⁵⁰

Ein weiteres Therapiekonzept ist die sog. passive Ummantelung von Stents, bei der das thrombogene und inflammatorische Potential einfacher Metallstents durch Beschichtung der Stentoberfläche mit organischen und anorganischen Materialien verringert werden soll. Es zeigte sich jedoch, dass die verwendeten Stoffe nur einen geringen Einfluss auf die Thrombogenität hatten und die Intimahyperplasie kaum verringerten.⁵¹

Vielversprechend hingegen scheint die Verwendung von sog. medikamentenbeschichteten Stents in der Prävention der koronaren In-Stent-Restenose. Klinische Studien mit den antiproliferativen Pharmaka Sirolimus⁵²⁻⁵⁴ und Paclitaxel⁵⁵⁻⁵⁶ konnten in verschiedenen Studien im Vergleich zu nicht beschichteten Stents eine ausgeprägte Verminderung der Restenose erzielen.

In der Therapie peripherer Restenosen existieren erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Antiproliferativa. Drake et al. erzielten durch den Einsatz von Paclitaxelbeschichteten Stents in der Arteria femoralis superficialis Ein-Jahres-Offenheitsraten von 83 % versus 33 % bei einfachen Metallstents.⁵⁷ Dem gegenüber wiesen mit Sirolimus beschichtete, selbst-expandierende Stents verglichen mit nicht beschichteten Stents in der peripheren Gefäßstrombahn der Arteria femoralis superficialis nach zwei Jahren keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Restenoserate auf.⁵⁸

Trotz dieser insgesamt aussichtsreichen Ergebnisse bleibt die späte In-Stent-Thrombose, auch Malapposition genannt, weiterhin ein ernsthaftes ungelöstes Problem medikamentenbeschichteter Stents. Langzeitergebnisse hinsichtlich unerwünschter Arzneiwirkungen müssen ebenfalls abgewartet werden.⁴⁶

Abschließend besteht nicht nur im Stentdesign, sondern auch in der Gestaltung der bei der PTA verwendeten Ballons eine therapeutische Möglichkeit, einer überschießenden Neointima vorzubeugen. Eines dieser Verfahren ist der sog. Cutting balloon, ein mit vier Klingen ausgestatteter Ballon, der überwiegend in der Behandlung stark verkalkter stenotischer Plaques eingesetzt wird.⁵⁹ Amighi et al. fanden jedoch in einer randomisierten klinischen Studie heraus, dass die Anwendung des Cutting balloon im Vergleich mit einem konventionellen Ballon sogar zu einer erhöhten Restenoserate führte.⁶⁰ Ein weiteres Verfahren ist die Beschichtung der Ballons mit Medikamenten. Klinische Studien untersuchten die therapeutische Verwendung von Paclitaxel-beschichteten Ballons im Vergleich mit konservativer PTA in femoropoplitalen Stenosen. Dabei konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Ausmaßes der Restenose zu Gunsten der beschichteten Ballons demonstriert werden. Der Nachteil dieser Studien wiederum ist einerseits die heterogene und geringe Studienpopulation⁶¹⁻⁶² und andererseits der kurze Beobachtungszeitraum von nur 6 Monaten, was weitere Nachuntersuchungen im Verlauf erforderlich macht⁶³.

1.4 Rationale für die Verwendung von Elafin

Humanes körpereigenes Elafin ist ein Protein, das von Epithelzellen der Bronchien und der Lunge⁶⁴, der Haut, des Mundes, des Pharynx, des Ösophagus⁶⁵, und des weiblichen Reproduktionstraktes gebildet wird⁶⁶. Neben antibakteriellen⁶⁷⁻⁶⁸ und antiviralen⁶⁹ Eigenschaften hemmt es als Antiprotease in erster Linie die Serinproteasen humane neutrophilen Elastase⁷⁰ und Proteinase-3⁷¹, die ihrerseits eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen, indem sie unter anderem proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interleukin 8 freisetzen⁷² und das Enzym Matrixmetalloproteinase 9 aktivieren, welches an proteolytischen Abbauvorgängen von Kollagen und somit am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist⁷³. Elafin-transgene Mäuse entwickelten im Gegensatz zu Kontrolltieren nach Endothelverletzung der A. carotis externa mit einem Draht in nur einem von neun Fällen eine Intimahyperplasie, was auf die Überexpression von Elafin zurückzuführen ist.⁷⁴

Darüber hinaus hemmt in vitro verabreichtes Elafin den durch Ballonangioplastie bedingten Anstieg der endogenen vaskulären Elastase.³⁸ Die von glatten Gefäßmuskelzellen produzierte endogene vaskuläre Elastase, die eine Bedeutung in der Pathogenese pulmonaler Gefäßerkrankungen hat⁷⁵, trägt höchstwahrscheinlich zur Verursachung der Intimahyperplasie bei. Einerseits fördern durch Elastasen freigesetzte Elastinpeptide die Produktion von Fibronectin, welches die Transformation glatter Gefäßmuskelzellen vom kontraktilen zum migratorischen Typ induziert.⁷⁵ Darüber hinaus stimulieren durch Elastasen freigesetzte Wachstumsfaktoren wie transforming growth factor β ⁷⁶ und Fibroblastenwachstumsfaktor die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Synthese extrazellulärer Matrix³⁸, die ein wesentliches Element der vaskulären Restenose⁴² ist und ca. 80²⁸-90 %⁴³ der Neointimafläche ausmacht. Andererseits erleichtern die Elastasen-vermittelte Unterbrechung der Basalmembran und der beschleunigte Umsatz der extrazellulären Matrix die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und Entzündungszellen in die Intima.³⁸

Aufgrund der Erkenntnisse gentherapeutischer⁷⁴ und in-vitro Studien mit Elafin³⁸ scheint demnach eine Anwendung von rekombinantem humanen Elafin in-vivo im Denudationsmodell der A.iliaca der Ratte vielversprechend zur Prävention einer Intimahyperplasie zu sein.

Daher war Ziel dieser Dissertation, den Einfluss von Elafin auf die Ausbildung einer Intimahyperplasie im Denudationsmodell der Arteria iliaca der Ratte zu evaluieren.

2. Materialien und Methoden

2.1 Studiendesign

Zwölf männliche Wistar-Ratten wurden zur Induktion einer Intimahyperplasie einer sonographisch gesteuerte Ballondenudation in einer proximalen Iliakalarterie unterzogen, die kontralaterale Arterie diente als Kontrollgefäß. Nach erfolgter Ballondenudation wurde jeweils fünf Tieren über eine dorsonuchal implantierte Alzet®-Pumpe kontinuierlich rekombinantes Elafin verabreicht. Die sieben Kontrolltiere erhielten Kochsalzlösung. Zur Darstellung einer möglichen Intimahyperplasie im Verlauf wurde kurz vor der Operation, sowie 7, 14 und 21 Tage postoperativ eine sonographische Bestimmung der Intima-Media- (IMT) und Intima-Media-Adventitia-Dicke durchgeführt.

Im Anschluss an die letzte sonographische Messung nach drei Wochen wurden die Tiere zur Gefäßentnahme getötet. Das Gefäßpräparat wurde in Paraffin eingebettet. Zur Verifikation und Quantifizierung einer Intimahyperplasie dienten histologische und immunhistochemische Schnitte. Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch unter Verwendung der bildmorphometrischen Software AxioVision evaluiert. Die erhobenen sonographischen, histologischen und immunhistologischen Messwerte wurden nachfolgend der statistischen Auswertung zugeführt.

2.2 Materialien

Eine vollständige Liste aller Materialien befindet sich im Anhang dieser Dissertation.

2.2.1 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar-Ratten der Firma Charles River Deutschland GmbH mit Sitz in Sulzfeld verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt des Denudationseingriffes zwischen 250 und 350 Gramm mit ausgewogener Verteilung auf die Elafin- und Kontrollgruppe.

2.3 Methoden

2.3.1 Tierhaltung

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und Ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

Im Anschluss an die Lieferung durch die Firma Charles River wurden die männlichen Wistar-Ratten zur Akklimatisation und Reduktion von Stress eine Woche lang im Tierhaus des UKSH, Campus Kiel unter der Betreuung einer examinierten Tierpflegerin gehalten. Zur Unterstützung des natürlichen Verhaltens wurden die Tiere in dieser Woche vor der Denudations-Operation in Gruppenkäfigen der Größe 590 mm x 380 mm x 200 mm, ausgekleidet mit kubischen Weichholzgranulaten, zu maximal vier Tieren gehalten. Nach der Operation wurden die Tiere zur Vermeidung von Stress und gegenseitigen Manipulationen an den Operationsnähten in Einzelkäfige à 425 mm x 265 mm x 150 mm gesetzt.

Die Ratten wurden in einem fensterlosen Raum gehalten, in welchem eine konstante Luftfeuchtigkeit von 45 % bei 21°C Raumtemperatur herrschte. Die Raumluft wurde durch ein Hepa-Filtersystem (High Efficiency Particulate Airfilter) gereinigt. Eine Beleuchtungsanlage sorgte für einen konstanten, zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus jeweils zwischen 6 und 18 Uhr.

Trinkwasser und Nahrung standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Während der Versuchszeit wurden die Kästen zweimal wöchentlich gereinigt und die Streu wurde ausgetauscht. In der versuchsfreien Zeit geschah dies einmal pro Woche.

2.3.2 Denudation und Implantation der Alzet®-Pumpen

Die Wistar-Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat 4 % und Tramadol analgosediert. Es wurde 1 ml Chloralhydrat und 0,9 µl Tramadol auf 100 g Körpergewicht verwendet. Die erfolgreich narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage mit ihren Extremitäten mittels Durapore™ Medical Tape auf einer

Heizmatte fixiert, über die ein Abdecktuch gespannt war. Zur weiteren Vermeidung von Unterkühlung stand eine 75 W Rotlicht-Wärmelampe zur Verfügung, die in 70 cm bis einem Meter Entfernung oberhalb der Ratten platziert wurde. Um ein Austrocknen der Augen und Infektionen vorzubeugen, wurden die Tiere mit Bepanthen-Augensalbe versorgt.

Zur Entfernung der Haare wurde Enthaarungscème auf das Fell des Abdomens, der proximalen Beine und den Halsbereich aufgetragen. Nach einer Einwirkdauer von ca. 5 min wurde das betreffende Fell vorsichtig mit einem Skalpell entfernt. Vor Beginn des operativen Eingriffs wurden Narkosetiefe und Analgesie durch Kompression des Schwanzes der Ratte überprüft. Bei Bedarf wurden erneut Tramadol oder Choralhydrat injiziert.

Mit einer chirurgischen Schere wurde nun die Haut in kaudo-kranialer Richtung im linksmedialen Halsbereich aufgeschnitten. Nachfolgend wurden die darunter liegende Halsfaszie sowie Anteile der Schilddrüse stumpf mit einer Präparierklemme durchtrennt und verdrängt, so dass die tieferliegenden Faszien des Musculus sternocleidomastoideus und der prätrachealen Muskulatur zum Vorschein kam. Im Zuge der weiteren stumpfen Präparation durch die Faszie der Halsmuskulatur konnte die Gefäß-Nerven-Scheide dargestellt werden. Nach vorsichtiger Eröffnung der Gefäß-Nerven-Scheide wurde die Arteria carotis communis in ihrem Verlauf präpariert. Um den Zugangsweg zum Gefäß offen zu halten und die Sicht auf den nachfolgenden Operationssitus optimal zu gestalten, wurden die prätracheale Halsmuskulatur, der M. sternocleidomastoideus und die angrenzenden Muskelfaszien durch Spreizen der Präparierklemme aus dem Operationsgebiet entfernt.

Als nächstes wurde die A. carotis communis unter Zuhilfenahme einer feinen anatomischen Pinzette untertunnelt und kranial sowie kaudal jeweils mit einem Prolene®-Faden umschlungen. Die kraniale Schlinge wurde zugezogen, verknotet und an einer Arterienklemme befestigt, über die ein Zug auf das Gefäß ausgeübt werden konnte. Die kaudale Schlinge wurde lose um die A. carotis communis gelegt. Sie diente als Sicherheitsmaßnahme zur Vermeidung von Blutungen. Anschließend wurde die Arterie mit einer Augenschere eröffnet. Durch das Einführen der beiden Spitzen einer gebogenen Splitterpinzette konnte das Gefäß offen gehalten werden. Unter leichtem Zug an der als Widerlager dienenden kranialen Gefäßschlinge wurde

der mit 0,9 %iger NaCl-Lösung benetzte Ballonkatheter in die A. carotis communis eingeführt, bis zur dritten Markierung vorgeschoben und mit einem Gefäßclip an der Arterie fixiert.

Sodann erfolgte die Umlagerung der Ratten auf eine Plattform für Ratten des Kleintiersonographiegerätes Vevo 770 der Firma VisualSonics. Eine detaillierte Beschreibung aller für die Sonographie erforderlichen Prozesse erfolgt im Abschnitt „2.3.3 Sonographie“. Nach beidseitiger ultraschallgesteuerter Messung der Intima-Media- (IMT) und Intima-Media-Adventitia-Dicke wurde die Katheterspitze zunächst in der Aorta aufgesucht, bevor sie in einer proximalen Iliakalarterie positioniert wurde (Abb.1).

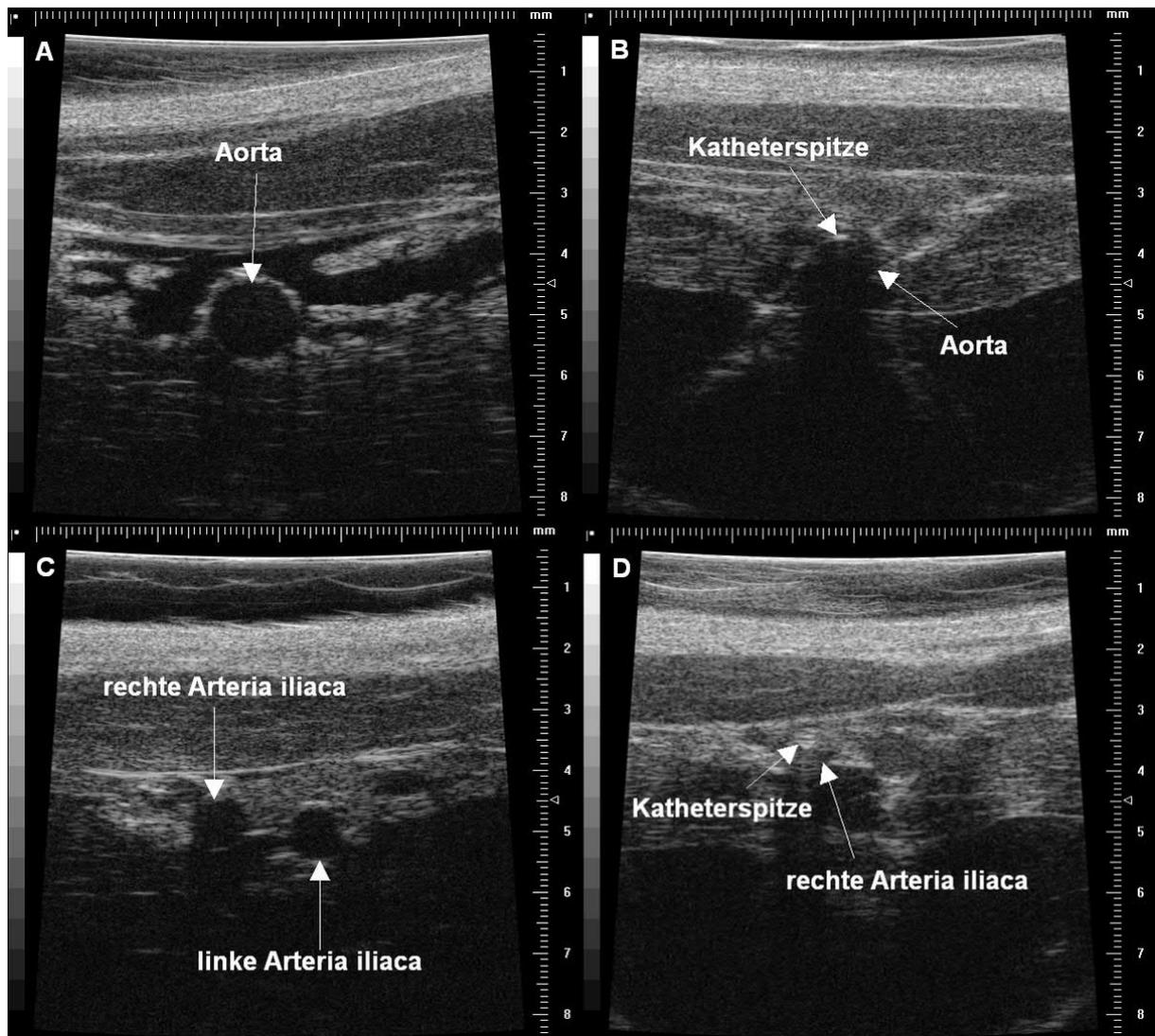


Abbildung 1: Sonographische Darstellung von Aorta (A, B) und Iliakalgefäßen (C, D) im Querschnitt. Iliakalarterie ohne (A, C) und mit einliegendem Katheter (B, D).

Nachdem der Fogarty-Katheter korrekt positioniert wurde, erfolgte die Inflation des Ballons mit 0,4 ml isotoner NaCl-Lösung (Abb. 2). Zur Entfernung des Gefäßendothels (=Denudation) und Induktion einer Intimahyperplasie wurde der Ballon inflatiert, sonographisch gesteuert über eine kurze Strecke von der Aortenbifurkation in die Iliakalarterie und zurück bewegt und schließlich deflatiert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Im Anschluss daran wurde der Katheter entfernt und die A. carotis communis durch Zuziehen der kaudalen Gefäßschlinge verschlossen.

Im Anschluss an die Fasziennaht wurde die Implantation einer osmotischen Minipumpe der Firma Alzet mit einem Fassungsvermögen von 2000 µl wie folgt

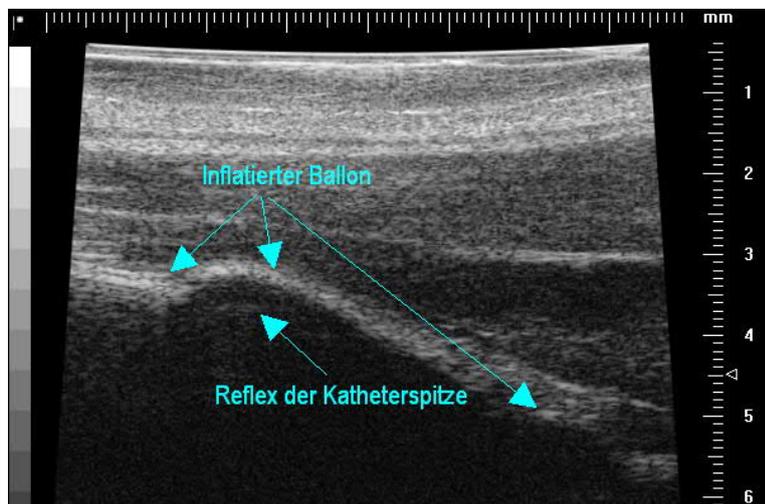


Abbildung 2: Sonographische B-Mode-Darstellung der proximalen A. iliaca mit inflatiertem Ballon im Längsschnitt. Der Ballon überdehnt die Gefäßwand und das umliegende Bindegewebe.

durchgeführt: Die Pumpe wurde bei 5 Tieren mit 1,79 mg/kg KG Elafin befüllt, gelöst in 0,9 % NaCl-Trägerlösung, das über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubierte. Bei den 7 Kontrolltieren wurde reine 0,9 % NaCl-Lösung verwendet. Die Dosierung des Elafins wurde entsprechend den Ergebnissen im Kaninchenmodell der Arbeitsgruppe um Cowan et al. adaptiert.⁷⁷ Die Pumpen wurden so eingestellt, dass sie ihren Inhalt über eine Woche bei einer Rate von $11,27 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ pro Stunde in das venöse System der Ratte abgaben. Bei der narkotisierten und analgesiierten Ratte wurde zunächst eine „Tasche“ im dorsonuchalen subkutanen Fettgewebe geschaffen, in die das Pumpsystem dann implantiert wurde. Vor Implantation der Pumpe erhielt jede Ratte der Therapiegruppe einen Elafinbolus von 0,675 mg pro 300 g Körpergewicht, gelöst in 0,9 % NaCl, intravenös über die linke äußere Jugularvene. Über den aus Silastik bestehenden Alzet®-Jugularvenenkatheter, der in die linke äußere Jugularvene nach deren Eröffnung mittels einer Gefäßschere eingeführt

wurde, wurde die Pumpe mit dem venösen System der Wistar-Ratten verbunden. Der außerhalb des Gefäßes verlaufende Katheteranteil wurde anschließend mit einem Prolene-Faden an der Jugularvene befestigt.

Im Anschluss daran wurde die Haut der Wistar-Ratten mit einer fortlaufenden Naht aus Vicryl verschlossen. Zur postoperativen Analgesie wurde eine Caprofen-Injektionslösung (5-10 mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert. Die Ratten wurden danach in Einzelkäfigen untergebracht. Alle diese Prozeduren wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt.

2.3.3 Sonographie

2.3.3.1 Vevo 770 High Resolution in vivo imaging system

Um Veränderungen der A.iliaca communis im Verlauf der Intimahyperplasiebildung bei der Lewis-Ratte nicht-invasiv und in Echtzeit mit makroskopisch-morphologischer Bildgebung darstellen zu können, wurde das Vevo 770 Hochfrequenzultraschallgerät der Firma Visual Sonics eingesetzt. Das Vevo 770 wurde speziell für die Kleintiersonografie entworfen und verfügt über eine hochauflösende Bildgebung im Bereich von 30-50 Mhz.

Bei unseren Messungen wurde der RMV-708 im B-Modus bei einer Bildwiederholrate von 32 Hertz benutzt. Dieser Schallkopf arbeitet mit einer Zentralfrequenz von 55 MHz bei einer axialen Auflösung von 30 µm, einer lateralen Auflösung von 70 µm und einem Fokus von 4,5 mm. Es ist damit gut geeignet, die relativ oberflächlich gelegene Arteria iliaca hochauflösend darzustellen.

Des Weiteren ist das Gerät mit einer speziellen Untersuchungsplattform für Ratten und einer daran angeschlossenen externen Kontrolleinheit zur Überwachung von Vitalparametern ausgestattet. An der Oberfläche der Untersuchungsplattform sind vier Elektrodenfelder zum Ableiten elektrischer Aktionen eingearbeitet, die an die Kontrolleinheit über ein Verbindungskabel weitergeleitet werden können. So können Herzfrequenz und Atmung der Tiere überwacht werden.

Das Vevo 770 verfügt über eine integrierte Software, die das Aufzeichnen, Bearbeiten und Archivieren einzelner Bilder („frames“) oder ganzer Bildsequenzen

(„cine loops“) im B-Modus ermöglicht. Innerhalb einer Bildsequenz können einzelne Bilder ausgewählt, bearbeitet und gesondert auf einer internen Festplatte abgespeichert werden.

2.3.3.2 Durchführung der Ultraschalluntersuchungen

Zur Vorbereitung auf eine optimale Bildgebung wurden die Ratten zunächst durch peritoneale Injektion mit Chloralhydrat 4 % in Narkose versetzt. Dann wurde das Fell der Ratten ventral im Bereich des unteren Abdomens, des Beckens und der proximalen medialen Oberschenkel beidseits unmittelbar vor Untersuchungsbeginn mit Enthaarungscreme vollständig entfernt. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch positioniert und jede Gliedmaße wurde in Extensionsstellung mittels Durapore™ Medical Tape an der jeweiligen Elektrode befestigt. Überschüssige Enthaarungscreme wurde mit Zellstoff abgetragen, um Artefakte zu vermindern. Nach Auftragen von Ultraschallgel wurden nacheinander jeweils die rechte und linke A. iliaca von der Aortenbifurkation bis zu ihrer Aufzweigung in weitere Gefäße als Bildsequenz im Quer- und Längsschnitt dargestellt, um das denudierte Areal und den entsprechenden Abschnitt des Kontrollgefäßes bildmorphologisch zu erfassen.

Für die Aufzeichnung dieser Bildsequenzen wurden Ergebnisse einer Arbeitsgruppe um A. Razuvaev genutzt, die das Vevo 770 zur sonographischen Darstellung einer Intimahyperplasie in der A. carotis communis etablierte.⁷⁸

Innerhalb einer Längsschnitt-Bildsequenz wurden während der Diastole Bilder ausgewählt, auf denen die Wandschichtung, bestehend aus Intimareflex, Membrana elastica interna und externa, artefaktfrei zu erkennen war. Dabei erstreckt sich die Intima-Media-Dicke (Intima Media Thickness, IMT) von der Grenzfläche zwischen Lumen und Intima bis zur Grenzfläche zwischen Media und Adventitia; die Intima-Media-Adventitia-Dicke schließt überdies die Adventitia ein (Abb. 3). Beide Parameter wurden im Bereich der maximalen Gefäßwanddicke sowohl auf der Denudationsseite als auch der Kontrollseite pro Gefäß jeweils drei Mal als Strecke in Millimetern gemessen. Die sonographischen Untersuchungen wurden durch zwei Untersucher geblindet durchgeführt.

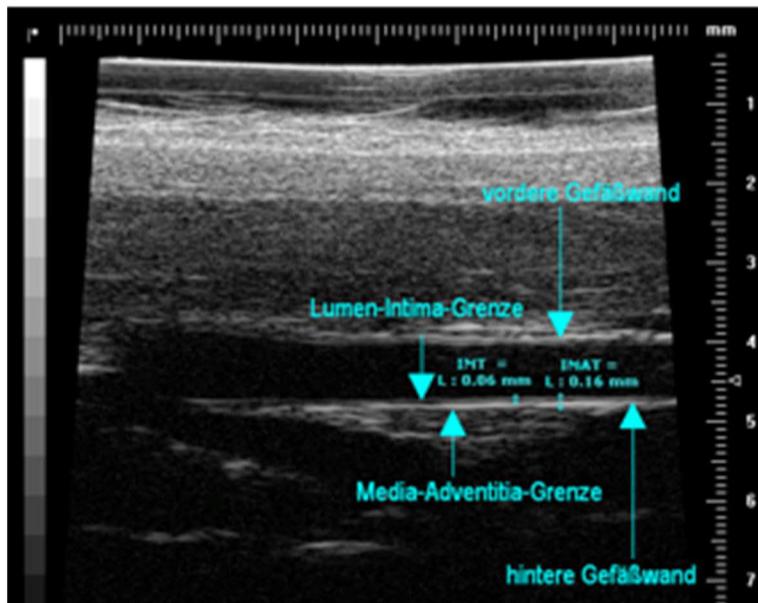


Abbildung 3: Um die IMT zu ermitteln, wird innerhalb der hinteren Gefäßwand eine Strecke von der echogenen Lumen-Intima-Grenze zum Beginn der Media-Adventitia-Grenze gemessen. Die Intima-Media-Adventitia-Dicke schließt überdies die Adventitia ein.

Abbildung 3: Sonographische B-Mode-Darstellung der anatomischen Verhältnisse der Gefäßwand einer proximalen Iliakalarterie im Längsschnitt.

2.3.4 Entnahme des Gefäßpräparates

An Tag 21 des Versuchs wurde im unmittelbaren Anschluss an die letzte sonographische Messung das Gefäßpräparat entnommen. Dazu wurden die bereits narkotisierten und teilrasierten Wistar-Ratten hinsichtlich Analgesie analog des Denudationseingriffes vorbereitet.

In der Folge wurde das Abdomen der Tiere mit Hilfe einer chirurgischen Schere über einen medianen Längsschnitt eröffnet. Um eine möglichst gute Sicht auf den Operationsbereich zu gewährleisten, wurden Teile des Dün- und Dickdarmes sowie der Mesenterien verdrängt und außerhalb des Peritoneums gelagert. Dann wurden die beiden Iliakalarterien mitsamt der Aorta abdominalis in stumpfer Präparation mit einer atraumatischen Pinzette dargestellt. Die Aorta abdominalis wurde mit einem Prolene®-Faden kranial umschlungen und durch Verknotung abgebunden. In gleicher Weise wurden die beiden Arteriae iliacae distal ligiert. Um nachfolgende Verwechslungen auszuschließen, wurde für die Ligatur dieser Gefäße jeweils ein Faden mit deutlich unterschiedlicher Länge verwendet.

Das Gefäßpräparat wurde anschließend mit der chirurgischen Schere herausgeschnitten und durch Spülen mit NaCl von Blutbestandteilen gereinigt. Nach Markierung des denudierten Gefäßbereiches mit gelber Tusche wurde das Gefäßpräparat mit Stecknadeln auf einem Korkplättchen fixiert, um einem späteren Zusammenziehen der Arterien entgegenzuwirken. Die so vorbereiteten Präparate verweilten ca. 24h in 10 %igem Formaldehyd bis die weitere histologische Aufarbeitung folgte.

2.3.5 Histologie (morphologisch)

2.3.5.1 Herstellung der histologischen Nativpräparate

Die Präparate wurden zunächst in einen Gewebefiltrationsautomaten über Nacht eingebettet, und dann in eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung und Entfettung eingetaucht. Die Alkoholreihe begann mit 70 %igem Ethanol und endete mit 100 %igem Alkohol und nachfolgend Xylol. Im Anschluss daran wurden die Präparate in flüssiges Paraffinwachs bei 60 °C getränkt.

Danach wurde das Gefäßpräparat in einen aortalen, proximalen und distalen Abschnitt unterteilt. Der aortale Abschnitt wurde in der Regel in drei Blöcke á 3 mm unterteilt, wobei der dritte Block nahezu immer die Bifurkation der abdominellen Aorta in die rechte und linke Iliakalarterie enthielt und somit bereits den ersten Abschnitt der proximalen Arteria iliaca darstellte. Der proximale und distale Abschnitt der Arteria iliaca wurde in je zwei Blöcke à 3 mm zurechtgeschnitten. Für die Feststellung, in welchem Gefäßabschnitt denudiert wurde, wurden der letzte aortale Abschnitt (Aa3 oder Aa4), der die Bifurkation in die beiden Iliakalgefäße beinhaltete, und die ersten beiden Blöcke einer Iliakalarterie dem proximalen Segment zugeordnet, der dritte und vierte Iliakalblock entfielen auf das distale Segment (Abb. 4). Die Teilstücke wurden mit dem proximalen Ende nach oben in gesonderte Kassetten in der Ausgussstation eingebettet.

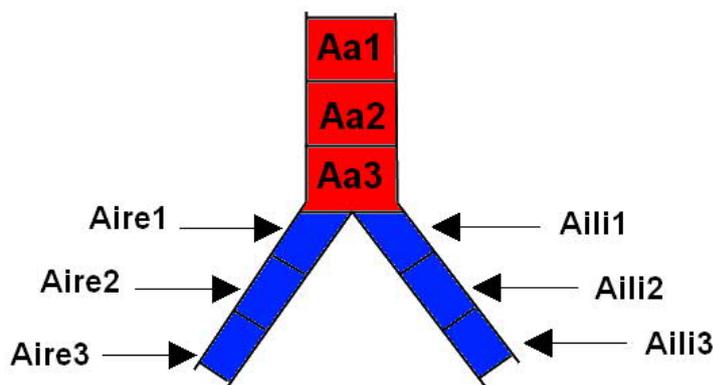


Abbildung 4: Schema der Gefäßpräparate. Aa: Aorta; Aire: rechte A. iliaca; Aili: linke Iliakalarterie. Die einzelnen Blöcke haben jeweils eine Länge von 3 mm.

Die Kassetten wurden dann bei -15 °C auf einer Kühlplatte gekühlt. Nach dem Kühlen wurden die Teilstücke in Form geschnitten. Anschließend wurden am Mikrotom 3-4 µm dicke histologische Nativschnitte erstellt. Um das Aufziehen auf die Glasobjektträger zu erleichtern, wurden die Nativschnitte für kurze Zeit in einem Streckbecken mit warmem destilliertem Wasser aufbewahrt.

Zur Fertigstellung der Nativpräparate wurden die Rohschnitte 24 Stunden lang bei 37 °C getrocknet und Verunreinigungen wurden durch Xylol-Tränkung über zehn Minuten in einer Wiegeküvette ausgewaschen.

2.3.5.2 Herstellung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE)

Als erstes wurden die Nativschnitte in eine absteigende Alkoholreihe getaucht und dann unter fließendem Leitungswasser sowie mit destilliertem Wasser kalt gewässert. Dann wurden die Präparate mit Hämalaun (nach Mayers) gefärbt. Zur Differenzierung wurde ein Gemisch aus 975 ml absolutem Ethanol, 125 ml destilliertem Wasser und 5 ml rauchender Salzsäure auf die Objektträger gegeben. Nach erneuter Wässerung unter warmem Leitungswasser sowie destilliertem Wasser wurden die Präparate 5 min mit Eosin gefärbt. Zum Schluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe imprägniert. Die Objektträger wurden mit einem Eukitt®-Medium eingedeckt.

2.3.5.3 Herstellung der kombinierten Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung

Die histologischen Nativpräparate wurden zunächst in eine absteigende Alkoholreihe getaucht.

Als erstes folgte die Kalk-Färbung nach Kossa, bei der die Präparate unter dem Licht einer Neonleuchte 30-60 Minuten in 5 %igem Silbernitrat inkubierten. Dann wurden die Objektträger wiederholt mit destilliertem Wasser gespült und anschließend jeweils zwei Minuten mit 1 %igem Hydrochinon sowie 5 %igem Natriumsulfit reduziert. Mittels 5 %iger wässriger Natriumthiosulfatlösung und Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Präparate im Anschluss fixiert.

Als zweites folgte die Elastika-Färbung, bei der die Kossa-gefärbten Präparate 30 Minuten lang bei 50- 60 °C in Resorzin-Fuchsin-Lösung nach Weigert inkubierten. Nach Spülung unter Leitungswasser und destilliertem Wasser wurden die Präparate mit 80 %igem Ethanol fixiert.

Zum Schluss wurde die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung durchgeführt, die aus drei aufeinander folgenden Färbungen bestand. Als erstes erfolgte die Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin, in der die Präparate einige Sekunden bis eine Minute inkubierten. Nachfolgend wurden die Präparate im zweiten Färbeschritt in warmen fließenden Wasser gespült und 5 min mit Ponceau-Säurefuchsin-Azlophloxin imprägniert, in 1 %iger Essigsäure gespült und anschließend mit Orange-G-Lösung dedifferenziert. Der letzte Schritt der Dreifachfärbung bestand in einer Gegenfärbung

mit 0,5 %igem Lichtgrün. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe imprägniert. Die Objektträger wurden mit einem Eukitt®-Medium eingedeckt.

2.3.5.4 Morphometrische Auswertung der histologischen Schnitte

Zur morphometrischen Auswertung der Masson-Goldner-Elastika-Kossa gefärbten Schnitte wurde das Lichtmikroskop „Axioskop 50“ der Firma Carl Zeiss (Carl Zeiss AG, LAB A1 mit Fototubus, Göttingen, Deutschland) verwendet. Sämtliche Schnitte wurden unter einem zehnfach vergrößernden Okular (E-PL 10x/20) und einem fünffach vergrößernden Objektiv (Plan Apochromat 5x/0,16) – also bei insgesamt 50-facher Vergrößerung – betrachtet. Mit einem integrierten Kamerasystem (Carl Zeiss AxioCam MR Colour) konnten die Bilder auf einen Computer mit der Software Axiovision Version 3.1 maßstabsgetreu übertragen und evaluiert werden. Innerhalb der Software wurden über die Programmfunktion „measurement“ Konturen um den äußersten Bereich der Tunica media, Neointima und des Lumens gezogen. Zur Orientierung dienten die Membrana elastica externa als äußere anatomische Begrenzung der Media zur Adventitia und die Membrana elastica interna als innere Begrenzung der Media zum Lumen bzw. zur Neointima. Die von der jeweiligen Kontur umschlossene Fläche wurde automatisch in μm^2 berechnet; die Fläche des Lumens konnte somit direkt abgelesen werden, die Flächen der Media und Neointima wurden durch Subtraktion ermittelt (Abb. 5).

In Schnitten, in denen eine Neointima vorhanden war, wurde die Fläche innerhalb der Kontur der Neointima von der Fläche innerhalb der Kontur der Media subtrahiert, um die Fläche der Media zu erhalten. In Schnitten ohne Neointima wurde die das Lumen umschließende Fläche von der die Media umschließenden Fläche abgezogen, um die Fläche der Media zu berechnen.

Um die Fläche der Neointima zu ermitteln, wurde die Lumenfläche von der Fläche innerhalb der Kontur der Neointima subtrahiert.

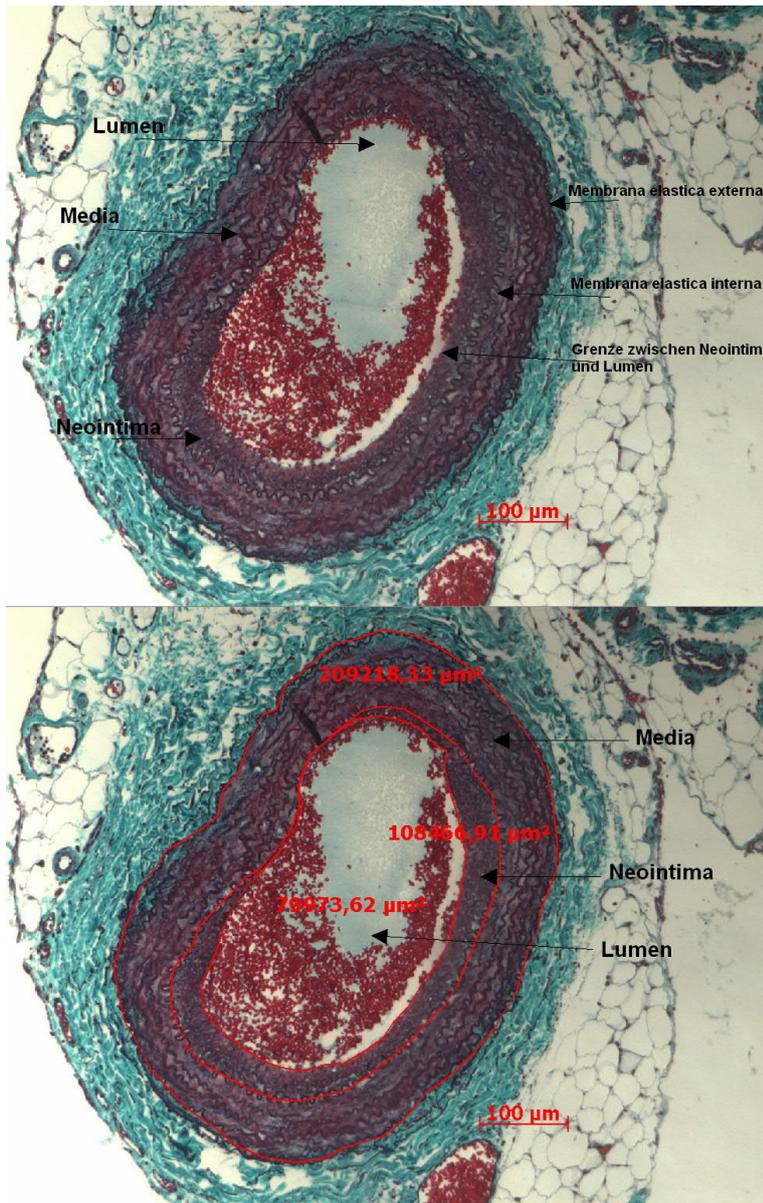


Abbildung 5: Masson-Goldner-Elastika-Kossa gefärbter Schnitt einer denudierten Iliakalarterie ohne (oben) und mit (unten) manueller Konturierung der äußeren Begrenzungen von Media, Neointima und Lumen. Die in μm^2 angegebene Zahlen beziehen sich auf die gesamte von einer Kontur umgebene Fläche. Der Wert des Lumens kann direkt abgelesen werden. Die Fläche der Media ermittelt sich durch Subtraktion der Fläche der mittleren Kontur ($=108466,91 \mu\text{m}^2$) von der Fläche der äußeren Kontur ($=209218,33 \mu\text{m}^2$), die Fläche der Neointima ergibt sich durch Subtraktion der Lumenfläche von der Fläche der mittleren Kontur.

2.3.6 Immunhistochemie

2.3.6.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Zunächst wurden die histologischen Nativpräparate einer absteigenden Alkoholreihe (= Entparaffinierreihe) zugeführt, dann unter fließendem Leitungswasser und schließlich destilliertem Wasser gespült. Zur Wiederherstellung verlorengegangener Epitope erfolgte eine Antigendemaskierung mit einem Citratpuffer bei pH 6,0 über drei Minuten im Drucktopf. Nach Abkühlung der Präparate wurden diese mit destilliertem Wasser gespült und mit einem TBS-Puffer gereinigt. Um ein Zerfließen von nachfolgend auf die Objektträger aufgetragenen Flüssigkeiten zu verhindern, wurden die Objektträger an vorgesehen Stellen mit einem PAP-Pen markiert und dann erneut einem TBS-Puffer unterzogen. Anschließend wurde eine Peroxidaselösung auf die Präparate aufgetragen und nach 15 Minuten Einwirkdauer mit einem TBS-Puffer entfernt. Dies diente der Vermeidung einer unspezifischen Färbung. Für die Färbung von RECA-1 und ED-1 wurde dem Peroxidase-Block eine Antigendemaskierung mit Bond Enzym in einer vorgewärmten Kammer bei 37° C über 15 Minuten zugefügt. Für die ICAM-1-Färbung wurde vor dem Peroxidase-Block zusätzlich ein Rodent-Block 30 Minuten lang aufgetragen. Dieser dient dem Blockieren von endogenen Ratten-IgGs und unspezifischem Hintergrund in Rattengewebe und roten Blutzellen [Biocare Medical, LLC].

2.3.6.2 Antikörperfärbungen

Auf die vorbereiteten Schnitte wurden die Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (s. Tabelle 1) für jeweils 60 min aufgetragen. Im Anschluss an eine dreimalige Reinigung mit TBS-Puffer für jeweils 5 min wurden die Schnitte mit den passenden Sekundärantikörpern für jeweils 30 min inkubiert (Tabelle 1). Nach weiterem dreimaligen Waschen mit TBS-Puffer für jeweils 5 min schloss sich die DAB-Färbung an. Hierzu wurde zunächst 1 ml destilliertes Wasser mit 20 µl Puffer (pH 7,5) gemischt, mit 20 µl DAB versetzt, erneut gemischt und schließlich nach Zugabe von 20 µl H₂O₂ wiederholt gemischt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Gemisch für 4 min (Ki-67, SMA, RECA-1, ED-1) bzw. 10 min inkubiert (Caspase-3, ICAM-1).

Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate für 4 min zur Gegenfärbung in Hämalun eingetaucht, 10 min unter warmem, fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend mit destilliertem Wasser gespült.

Zum Schluss erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Pertex, nachdem die Präparate einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt wurden.

Primärantikörper		Sekundärantikörper	
Name	Verdünnung	Name	Verdünnung
Anti-Caspase-3	1:50	HRP-Polymer anti-rabbit	600 µl Sekundärantikörper + 15 µl XR-Faktor
Anti-Ki-67	1:300	HRP-Polymer anti-rabbit	600 µl Sekundärantikörper + 15 µl XR-Faktor
Anti-ICAM-1	1:100	HRP-Polymer anti-goat	600 µl Sekundärantikörper + 15 µl XR-Faktor
Anti-SMA	1:400	HRP-Polymer anti-mouse	1250 µl Sekundärantikörper + 15 µl XR-Faktor
Anti-RECA-1	1:50	HRP-Polymer anti-mouse	1800 µl Sekundärantikörper + 30 µl XR-Faktor
Anti-ED-1	1:50	HRP-Polymer anti-mouse	1500 µl Sekundärantikörper + 30 µl XR-Faktor

Tabelle 1: Primär- und Sekundärantikörper in der angewendeten Verdünnung.

2.3.6.3 Semiquantitative Auswertung der Immunhistochemiefärbungen Ki-67, SMA, ED-1, RECA-1 und ICAM-1

Die oben genannten Färbungen wurden im Lichtmikroskop unter 400-facher Vergrößerung betrachtet und ausgewertet.

Für ED-1 wurden braun gefärbte Makrophagen und für Ki-67 braun gefärbte Zellkerne innerhalb von Media und Neointima jeweils pro Hauptgesichtsfeld ausgezählt. Dabei entspricht ein Hauptgesichtsfeld dem sichtbaren Bereich eines

histologischen Präparates bei 400-facher Vergrößerung. Je nach Größe des Gefäßquerschnittes wurden ein bis zwei Hauptgesichtsfelder pro Schnitt evaluiert.

Für SMA, RECA-1 und ICAM-1 wurden die Intensität der Färbung in Bezug auf das jeweilige Gewebe angegeben. Dabei entspricht „0“ einer nicht erkennbaren Färbung und „3“ einer sehr starken Färbung.

2.3.6.4 Quantitative Auswertung von Caspase-3, Ki-67 und SMA

Die immunhistologischen Schnitte wurden unter einem 10x vergrößernden Okular (E-PL 10x/20) und einem 5x vergrößernden Objektiv (Plan Apochromat 5x/0,16) betrachtet und über ein integriertes Kamerasystem (Carl Zeiss AxioCam MR Colour) auf einen PC mit der Software AxioVision Release 4.7.1 importiert. Gewebe, das unter lichtmikroskopischer Betrachtung in einem bestimmten Brauntönen in Erscheinung trat, wurde als „positiv“ bewertet. Mit einem Skript innerhalb des Programms wurden alle Flächen arteriellen Gewebes, die die entsprechende Braunfärbung aufwiesen, markiert. Im Anschluss daran wurden manuell die äußereren Begrenzungen der Media, Neointima (falls vorhanden) und des Lumens festgelegt, indem nacheinander geschlossene Linien um die anatomische äußere Begrenzung des jeweiligen Gewebeabschnitts gezogen wurden (Abb. 6). Die von einer Linie umschlossene Fläche wurde automatisch berechnet und in μm^2 angegeben. Das Skript berechnete anschließend zunächst die Flächen von Media und Neointima und ermittelte dann den prozentualen Anteil positiv gefärbten Gewebes der jeweiligen Fläche.

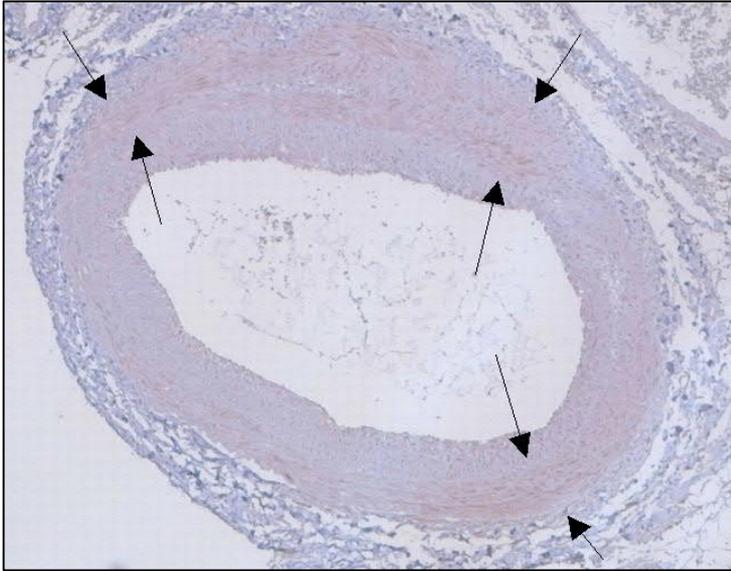
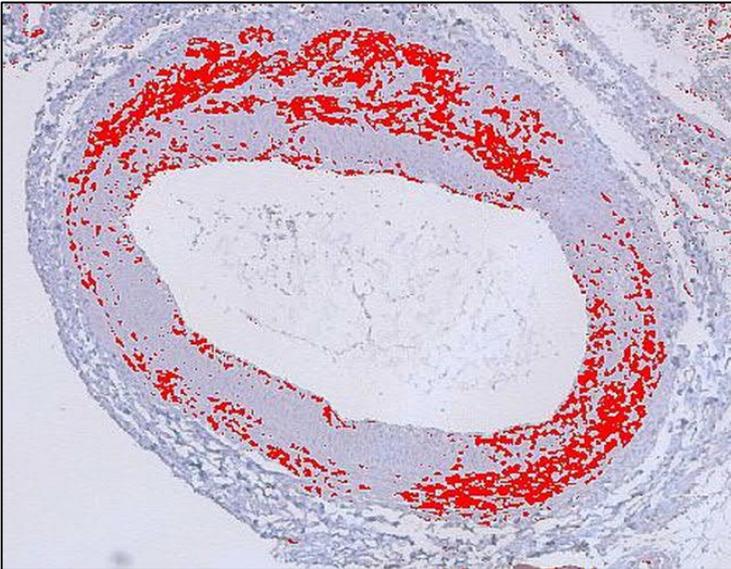
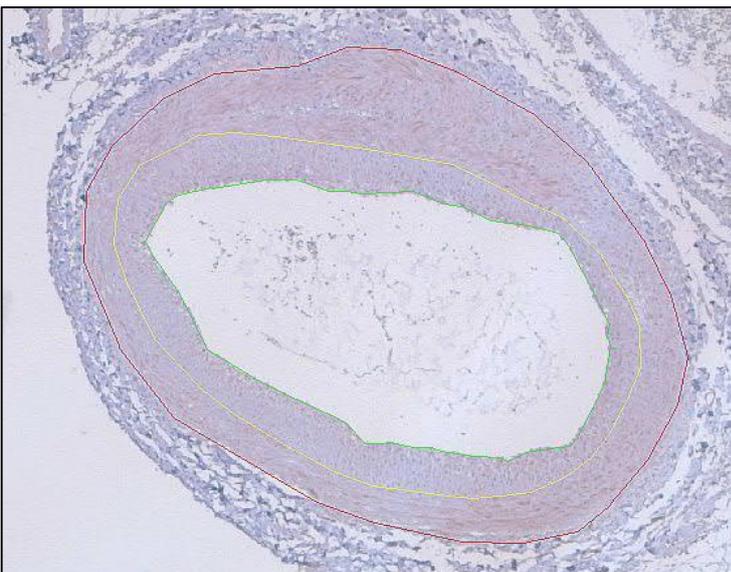


Abbildung 6 oben: Caspase-3-Färbung einer denudierten Iliakalarterie. Positive Färbung: braun. Die Pfeile weisen auf Bereiche mit besonders ausgeprägter Anfärbung des Gewebes.



Mitte: Gleicher Schnitt mit automatisierter Markierung aller Pixel eines bestimmten Brauntönen, der zuvor manuell festgelegt wurde.



Unten: Gleicher Schnitt mit Konturen um Media (rot), Neointima (gelb) und Lumen (grün). Anhand der Konturen wurden nachfolgend die Flächen von Media und Neointima automatisiert ermittelt, so dass der Anteil markierten Gewebes an der jeweiligen Fläche (Media oder Neointima) ermittelt werden konnte.

2.3.7 Statistische Verfahren

Zur Testung auf Signifikanz wurde das Programm JMP Version 9 (SAS Institute Inc.) benutzt. Es wurden die nichtparametrischen Tests nach Wilcoxon, Kruskal-Wallis sowie ein 2-Stichproben- und Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

Die mit Elafin behandelten Ratten zeigten im Anschluss an die Operation ein normales Trink-, Fress- und Sozialverhalten. Stuhl und Urin waren unauffällig und die Tiere hatten eine altersentsprechende Gewichtszunahme im weiteren postoperativen Verlauf.

Insgesamt konnten von zwölf Wistar-Ratten sonographische, morphologisch-histologische und immunhistologische Daten erhoben werden. Die Daten einer Ratte wurden verworfen, da dieses Tier versehentlich auch im Kontrollgefäß denudiert wurde. Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse beziehen sich also auf fünf mit Elafin behandelte Tiere und sechs Kontrolltiere.

3.1 Erfolgsrate des Denudationsverfahrens

Alle sechs Kontrolltiere weisen in der Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung nach morphometrischer Auswertung eine Intimahyperplasie auf, was einem Denudationserfolg von 100 Prozent entspricht. Damit konnte die Erfolgsrate des Modells, auf dem diese Arbeit basiert, von 71,4 % [Brüske, N: Bildgebung peripher-arterieller Verschlüsse nach Ballondilatation mittels Hochfrequenzultraschall am Modell der A. iliaca der Ratte. Med. Diss., Kiel; Publikation in Vorbereitung] um 28,6 % gesteigert werden.

3.2 Auswertung der sonographischen Messungen

Es wurden sonographische Bestimmungen der Intima-Media-Dicke für das denudierte Gefäß und das Kontrollgefäß der Wistar-Ratten beider Gruppen (Elafin- und Kontrollgruppe) zu vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Messungen an Zeitpunkt 0 fanden einige Minuten vor dem Denudationseingriff statt, die Messungen an Zeitpunkt 1, 2 und 3 wurden eine, zwei und drei Wochen nach der Denudation durchgeführt.

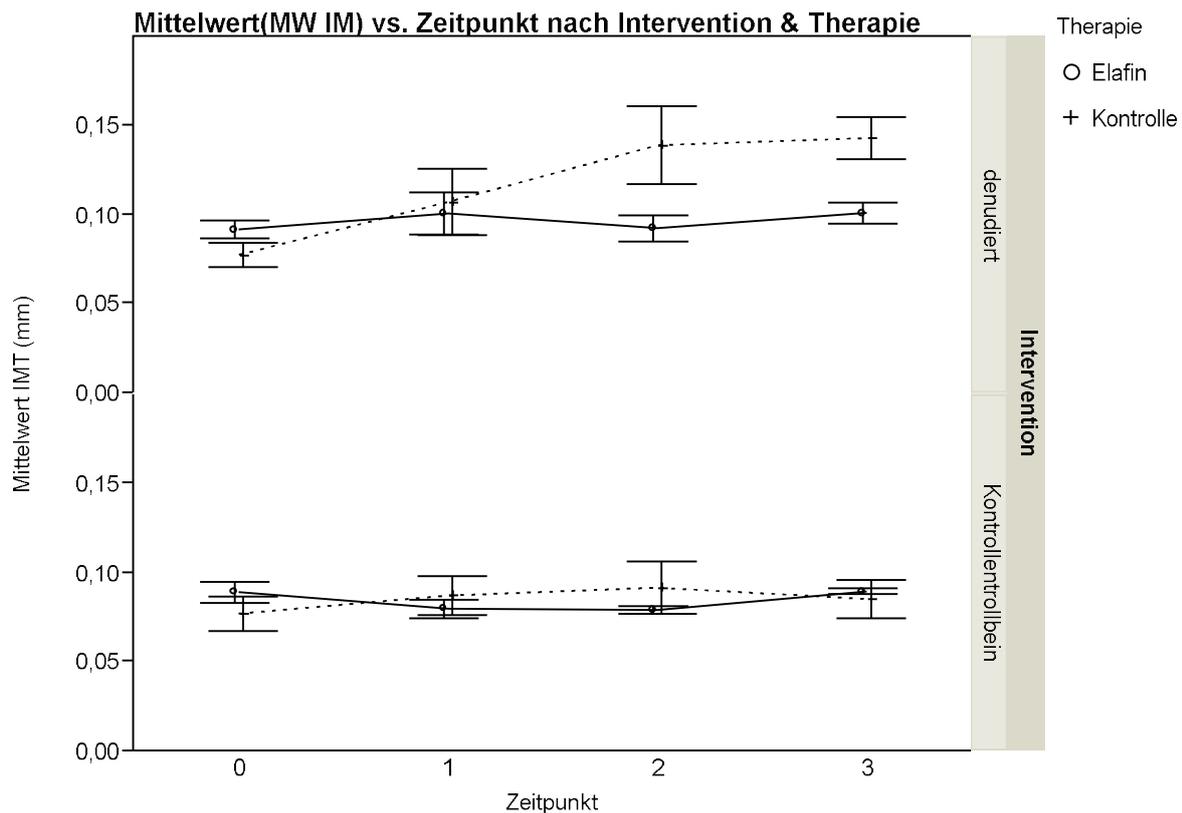


Abbildung 7: Mittelwerte und Standardfehler der Intima-Media-Dicke (IMT) der Tiere der Elafin- und Kontrollgruppe jeweils für das denudierte Bein und das Kontrollbein. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe auf der denudierten Seite liegen zum Zeitpunkt 2 und 3 signifikant über denen der mit Elafin behandelten Gruppe. Die Mittelwerte der Intima-Media-Dicke für das „Kontrollbein“ der Elafin- und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Der Mittelwert der IMT aller Tiere unterscheidet sich zum Zeitpunkt 0 nicht signifikant und bleibt für die nicht denudierte Seite auch über die Zeit konstant (Abb. 7). Im Gegensatz hierzu liegt der Mittelwert der IMT des denudierten Beins der Kontrollgruppe ab dem Zeitpunkt 2 (14 Tage nach Intervention) signifikant über der IMT des nicht-denudierten Beins. Die IMT des denudierten Beins unter Elafintherapie hingegen bleibt über die Zeit konstant auf dem Niveau der nicht-denudierten Beine.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 für die Einzelmessungen der IMT zwischen beiden Untersuchern beträgt 0,893. Die Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchern hinsichtlich der Messung der Intima-Media-Dicke ist also relativ gut (Abb. 8).

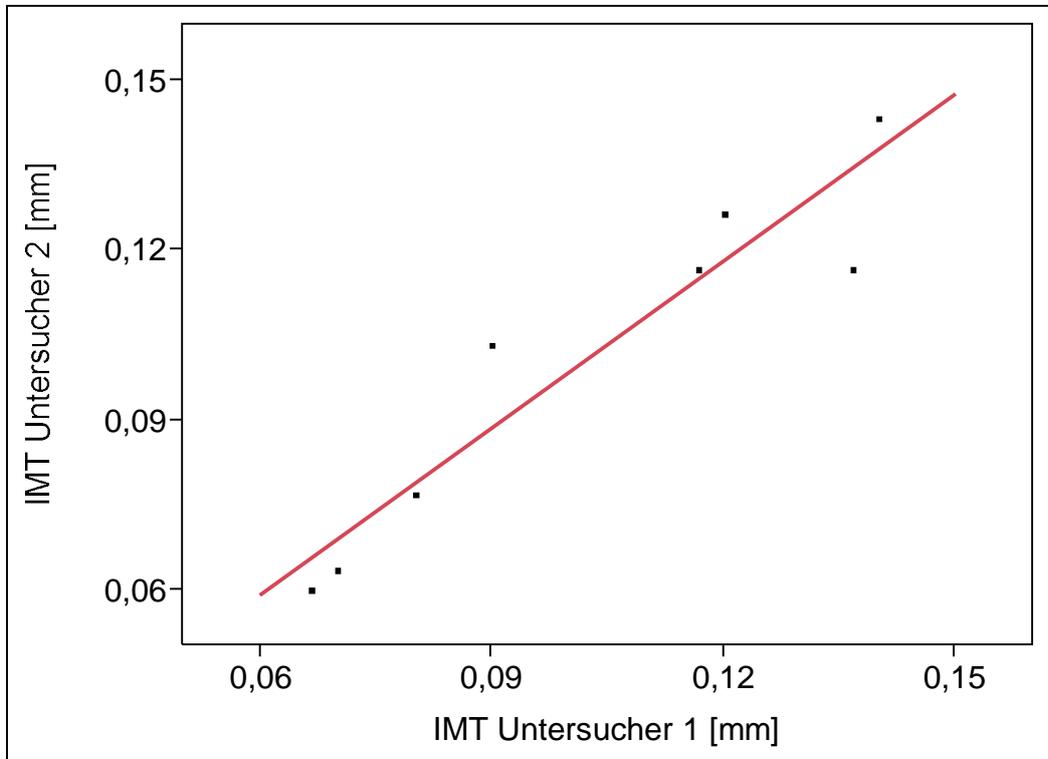


Abbildung 8: Interobserver-Korrelation der sonographisch ermittelten Intima-Media-Dicke (IMT). Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,893.

3.3 Auswertung der Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung

3.3.1 Darstellung der Intimahyperplasie mittels Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung

Die Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung erlaubt durch die differenzierte Anfärbung zellulärer und extrazellulärer Komponenten eine problemlose Abgrenzung der Neointima von den übrigen Gefäßwandabschnitten (Abb. 9). Hierdurch konnte eine schnelle Einarbeitung und valide Auswertung gewährleistet werden.

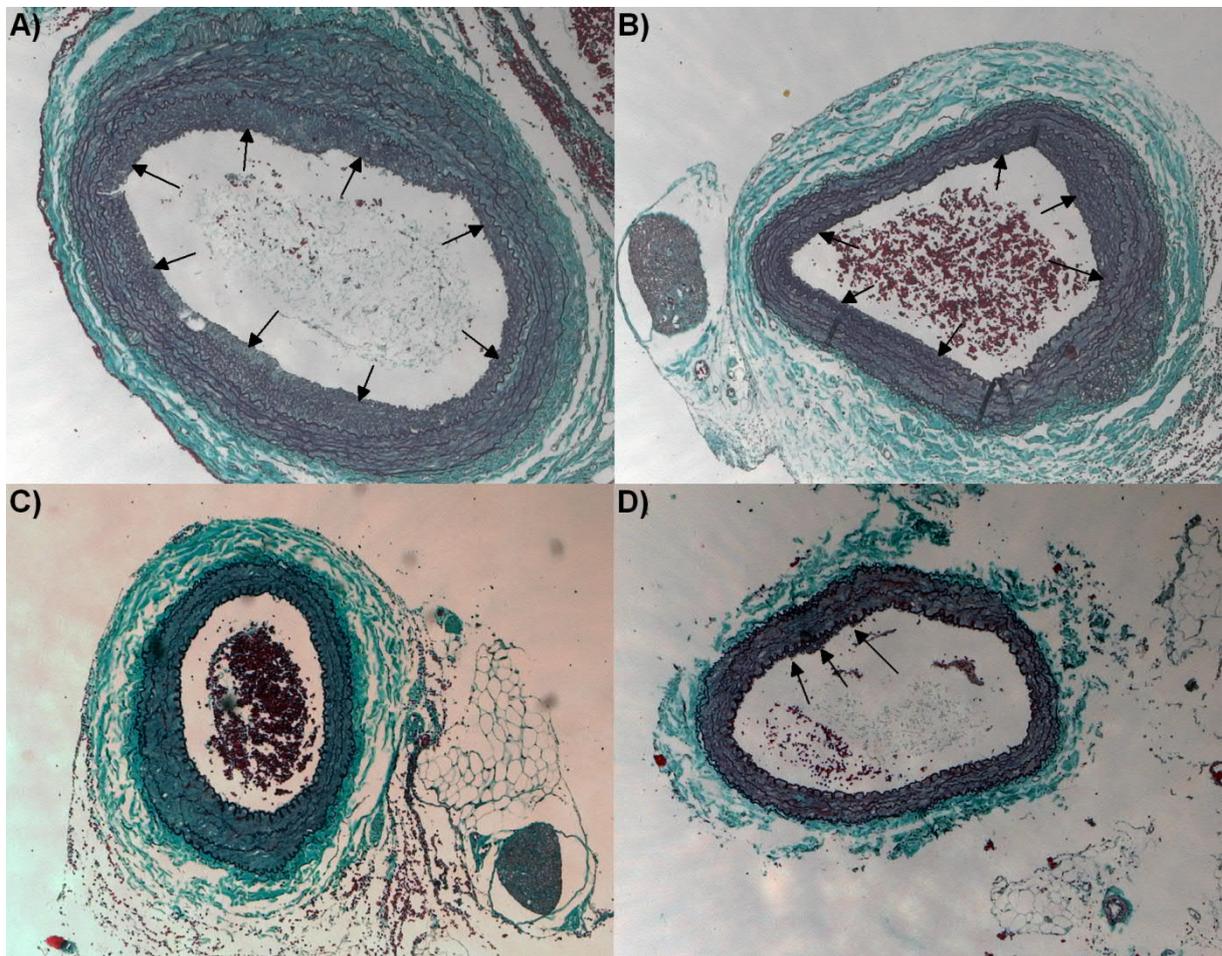


Abbildung 9: Masson-Goldner-Elastika-Kossa-gefärbte Schnitte eines denudierten Gefäßes von vier verschiedenen Tieren. A) und B) stellen Gefäße aus der Kontrollgruppe dar. C) und D) sind Gefäße aus der Elafingruppe. Die Pfeile weisen auf Regionen mit Intimahyperplasie. Während die Schnitte der Kontrolltiere eine deutlich ausgeprägte, ubiquitär [A)] oder anteilig [B)] zirkuläre Intimahyperplasie aufweisen, haben die Schnitte der mit Elafin behandelten Tiere keine [C)] oder nur eine gering ausgeprägte [D)] Neointima.

3.3.2 Elafin- vs. Kontrollgruppe: Schnitte mit Intimahyperplasie auf der denudierten Seite

Um einen Überblick über die Verteilung der Intimahyperplasie zu erhalten, wurden alle Schnitte der denudierten Seite zunächst qualitativ auf das Vorhandensein einer Neointima überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass signifikant mehr Schnitte der unbehandelten Kontrolltiere eine Intimahyperplasie aufweisen, als bei Wistar-Ratten der Elafin-Gruppe (Abb. 10).

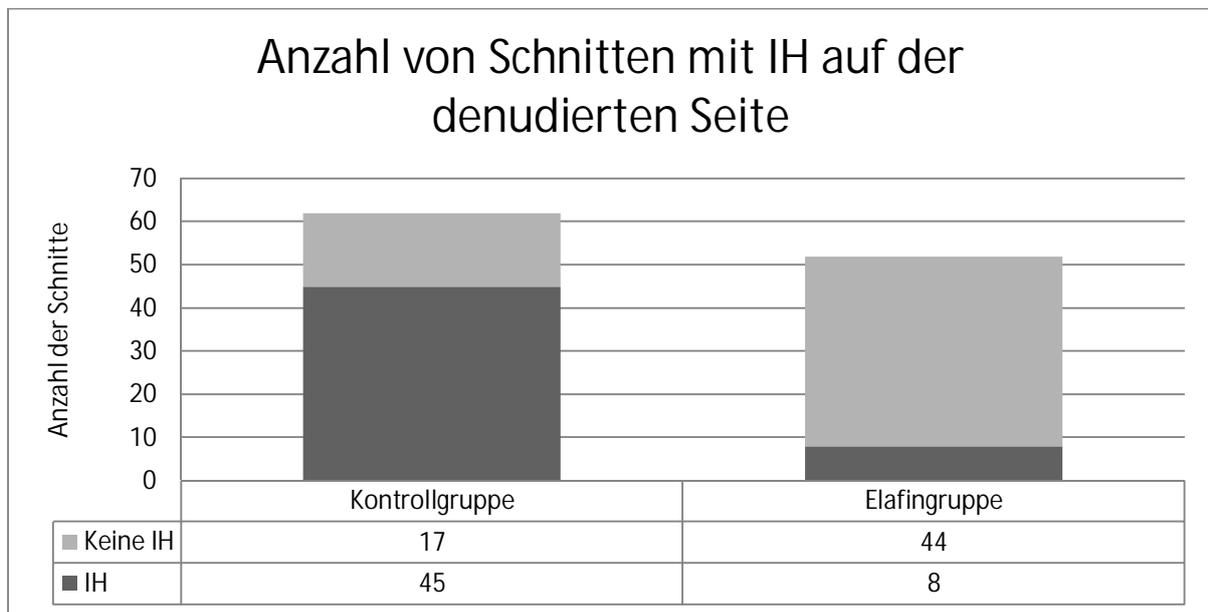


Abbildung 10: Absolute Anzahl an Schnitten mit Intimahyperplasie (IH) und ohne (keine IH) der denudierten Seite. Die Säulen enthalten jeweils Schnitte der Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau). Es zeigte sich, dass signifikant mehr Schnitte der Kontrollgruppe als der Elafin-Gruppe eine Intimahyperplasie aufweisen.

3.3.3 Verteilung der Intimahyperplasie innerhalb der Arterie

Um einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, sollten alle Wistar-Ratten möglichst im proximalen Gefäßabschnitt einer Iliakalarterie denudiert werden. Dieser umfasst in der Regel eine Länge von drei Blöcken à 3 mm, also 9 mm. Zur Überprüfung dessen erfolgte bei der Auswertung der Schnitte eine weitere Einteilung in „proximal“ (= 173 Schnitte) und „distal“ (= 28 Schnitte). Abbildung 11 zeigt, dass dies immer gelungen ist, da nur proximal eine Intimahyperplasie vorhanden ist. Das Tier der Kontrollgruppe, das versehentlich einer proximalen Denudation auch des Kontrollbeins unterzogen wurde, wurde aus der Auswertung ausgeschlossen.

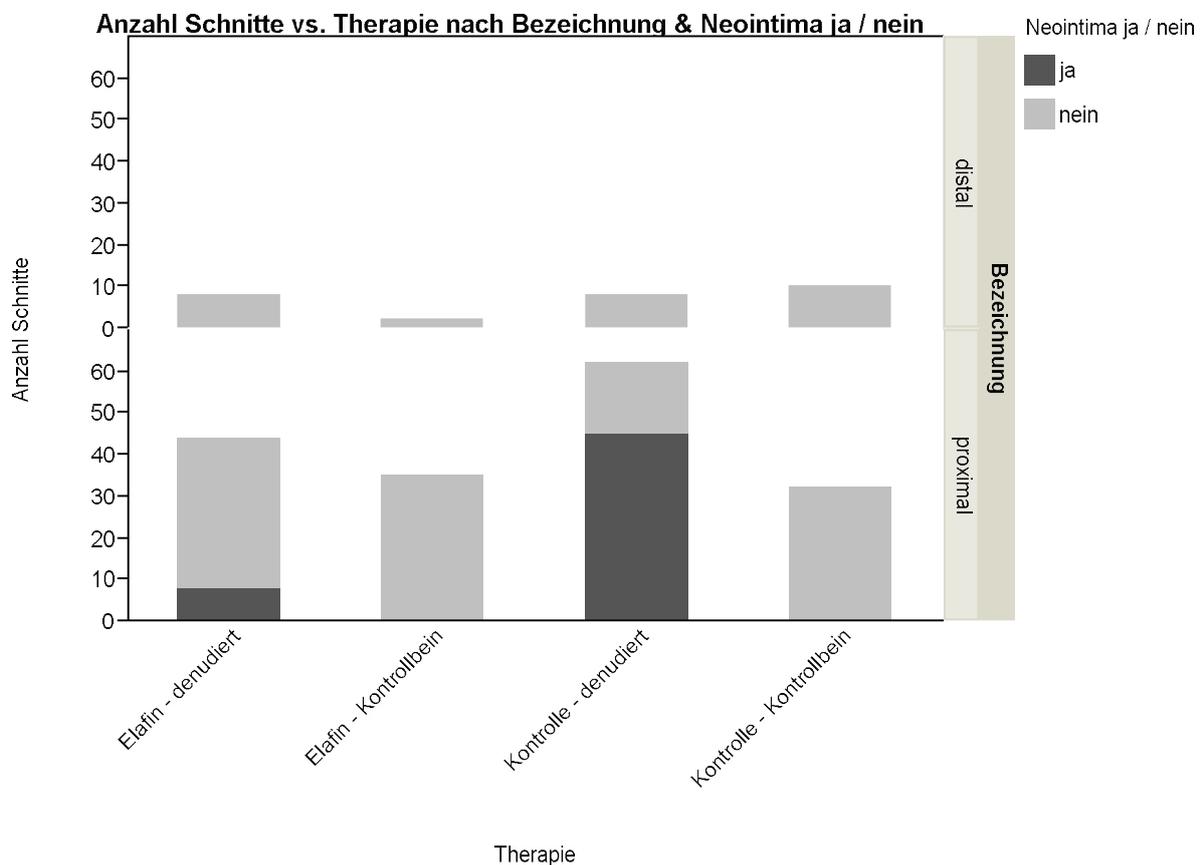


Abbildung 11: Überblick über die Anzahl der Schnitte mit (hellgrau) und ohne Intimahyperplasie (IH; dunkelgrau). Die Kontrolltiere weisen signifikant mehr Schnitte mit IH auf als die mit Elafin behandelten Tiere. Das Maximum der Denudation wurde, dem Protokoll entsprechend, im proximalen Gefäßabschnitt erreicht. Bei einem Tier wurde versehentlich der proximale Anteil der Kontrollseite ebenfalls denudiert, dieses wurde aus der Auswertung ausgeschlossen.

3.3.4 Vergleich der Flächen von Neointima, Media und Lumen der Elafin- und Kontrollgruppe

An die qualitative Analyse schloss sich eine quantitative Bestimmung der Gefäßwandflächen von Neointima, Media und Lumen im Querschnitt an, um den Wirkungsgrad von Elafin auf die Ausbildung einer Intimahyperplasie genauer evaluieren zu können. Im Folgenden werden die Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SE) der einzelnen Flächen präsentiert.

Bei insgesamt drei der fünf mit Elafin behandelten Ratten konnte eine Neointima im proximalen Abschnitt des denudierten Beines gefunden werden. Von den sechs Kontrolltieren hatten alle eine Intimahyperplasie, ebenfalls proximal. Der MW der Neointimafläche beträgt $10839 \mu\text{m}^2$ ($\text{SE} = 1847 \mu\text{m}^2$) für die Elafingruppe und $36005 \mu\text{m}^2$ ($\text{SE} = 6487 \mu\text{m}^2$) für die Kontrollgruppe (Abb. 12). Damit ist die Neointimafläche im Trend bei den Ratten der Kontrollgruppe größer (2-Stichproben-Test: $p = 0,06$).

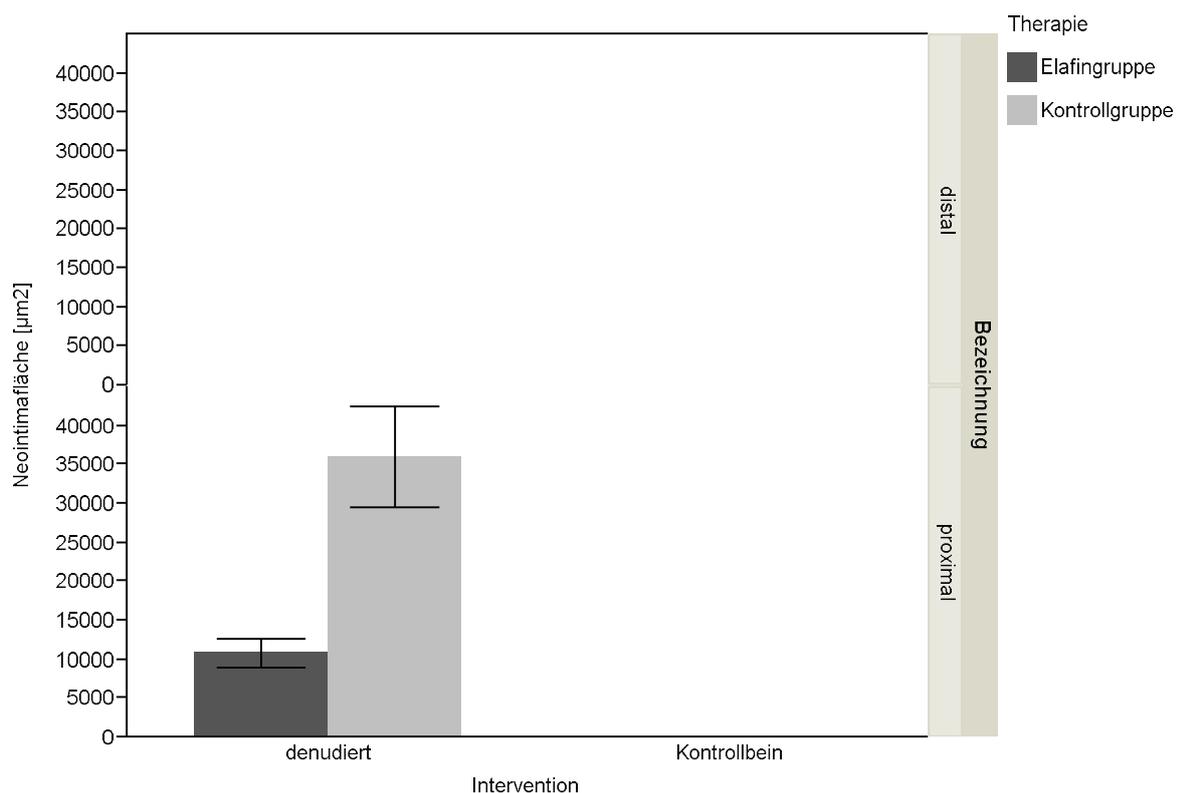


Abbildung 12: Neointimafläche von Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau) nach Gefäßabschnitt (proximal vs. distal) und Intervention (denudiert vs. Kontrollbein). Mittelwerte mit Fehlerbalken des Standardfehlers.

Der MW der Mediafläche des denudierten Gefäßes weist proximal eine Fläche von 131171 μm^2 (SE = 4215 μm^2) für die Elafingruppe und 145975 μm^2 (SE = 6036 μm^2) für die Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,16$) auf. Distal ergibt sich ein MW von 118278 μm^2 (SE = 7144 μm^2) für die Elafingruppe und 69882 μm^2 (SE = 4012 μm^2) für die Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,001$). Für das proximale Kontrollgefäß beträgt der MW der Mediafläche 113595 μm^2 (SE = 4584 μm^2) für die Elafingruppe und 101079 μm^2 (SE = 4282 μm^2) für die Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,07$). Im distalen Kontrollgefäß liegt der MW bei 101642 μm^2 (SE = 6069 μm^2) in der Elafingruppe und 55265 μm^2 (SE = 4078 μm^2) in der Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,0014$). Im distalen Gefäßabschnitt ist die Mediafläche der Elafintiere demnach signifikant größer als die Mediafläche der Kontrolltiere (Abb. 13).

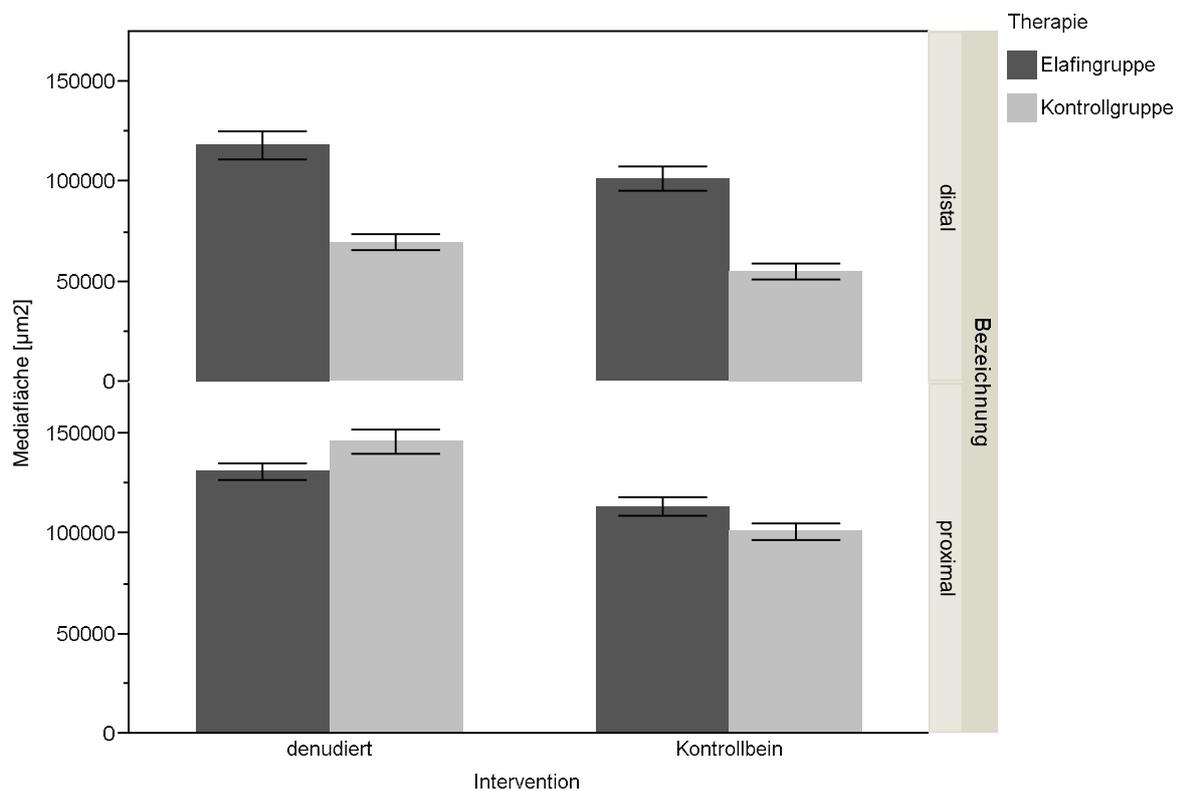


Abbildung 13: Mediafläche von Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau) nach Gefäßabschnitt (proximal vs. distal) und Intervention (denudiert vs. Kontrollbein). Mittelwerte mit Fehlerbalken des Standardfehlers.

Der MW der Lumenfläche des denudierten Gefäßes beträgt proximal 128324,03 μm^2 (SE = 7845 μm^2) für die Elafingruppe und 140714 μm^2 (SE = 8834 μm^2) für die Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,76$). Distal liegt der MW bei 122447 μm^2 (SE = 2968 μm^2) für die Elafingruppe und 77360 μm^2 (SE = 11056 μm^2) für die Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,017$). Für das proximale Kontrollgefäß beträgt der MW 120643 μm^2 (SE = 5483 μm^2) für die Elafingruppe und 98774 μm^2 (SE = 6246 μm^2) für die Kontrollgruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,006$). Im distalen Kontrollgefäß weist der MW der Lumenfläche ein Areal von 101845 μm^2 (SE = 13106 μm^2) in der Elafingruppe und 54812 μm^2 (SE = 4702 μm^2) in der Kontrollgruppe auf (2-Stichproben-Test: $p = 0,008$). Die mit Elafin behandelten Wistar-Ratten haben vor allem distal ein signifikant größeres Lumen als die Ratten der Kontrollgruppe (Abb. 14).

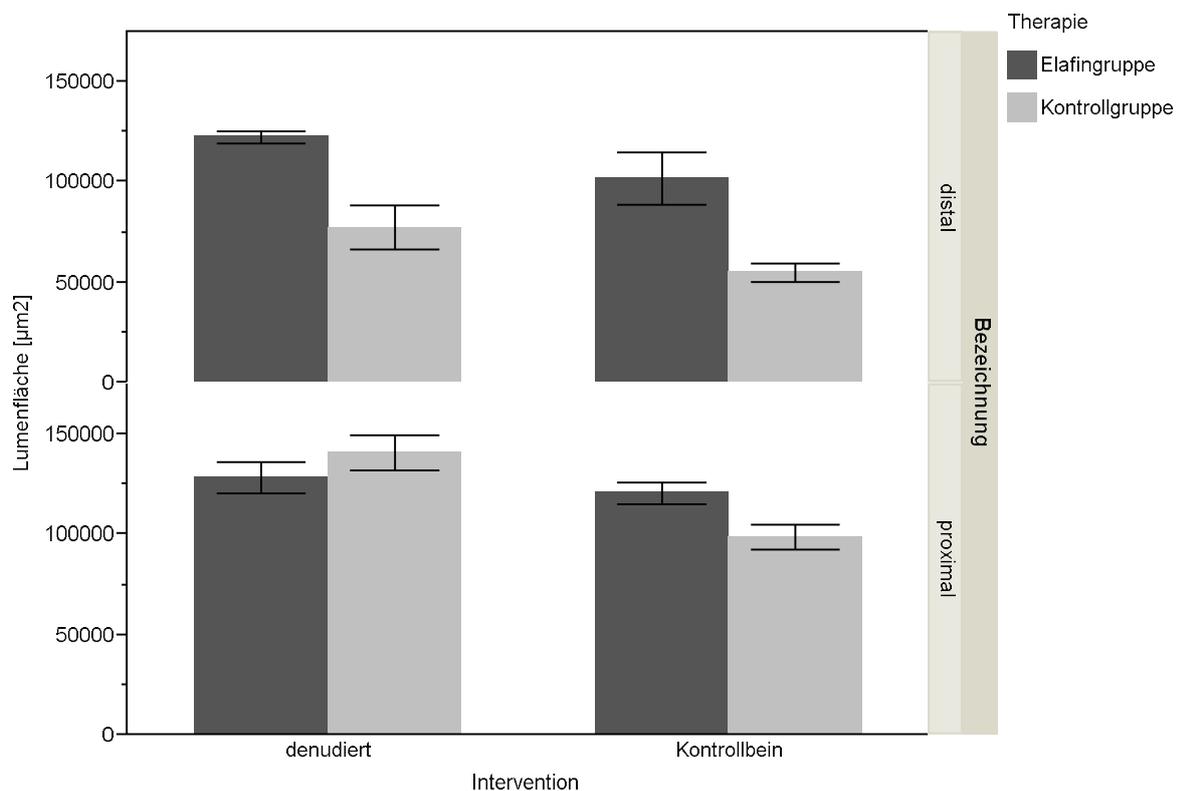


Abbildung 14: Lumenfläche von Elafin- (dunkelgrau) und Kontrollgruppe (hellgrau) nach Gefäßabschnitt (proximal vs. distal) und Intervention (denudiert vs. Kontrollbein). Mittelwerte mit Fehlerbalken des Standardfehlers.

3.4 Korrelation zwischen Sonographie und Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung

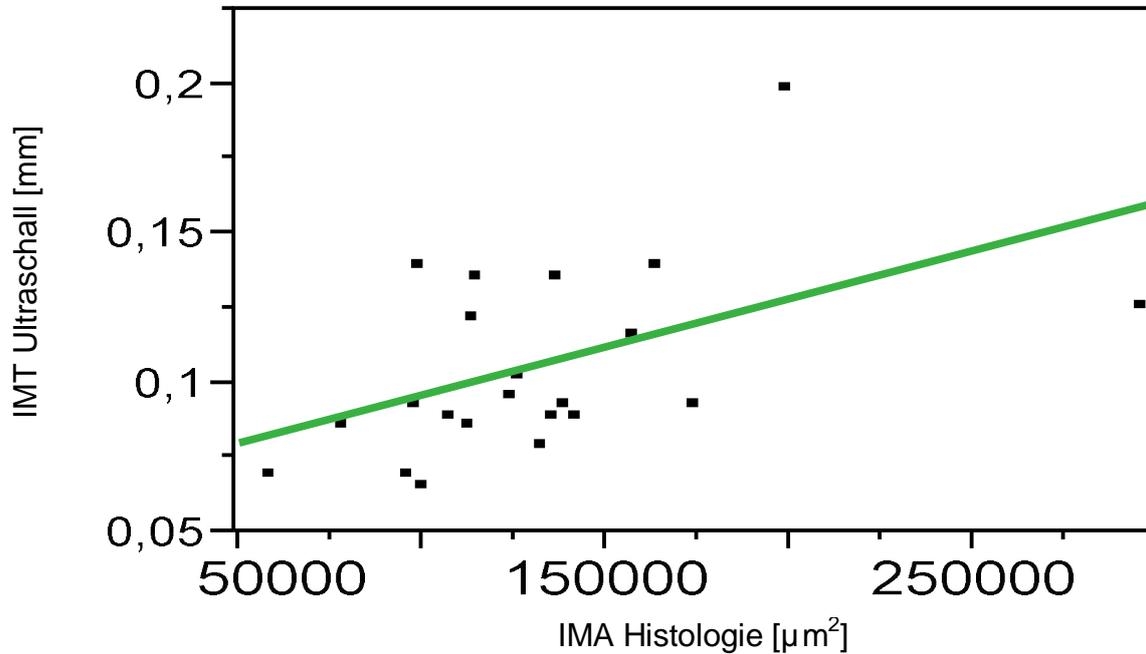


Abbildung 15: Korrelation zwischen Intima-Media-Dicke (IMT) und Intima-Media-Fläche (IMA). Histologisch und sonographisch gemessener Mittelwert der IMT korrelieren nicht ($R^2 = 0,25$).

Um festzustellen, ob die drei Wochen nach Denudation durchgeführten sonographischen Bestimmungen der Intima-Media-Dicke mit der histologisch ermittelten Intima-Media-Fläche korrelieren, wurde eine bivariate Anpassung durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass aufgrund des Bestimmtheitsmaßes R^2 mit 0,25 keine Korrelation zwischen der sonographischen Intima-Media-Dicke nach drei Wochen und der in der Histologie ermittelten Intima-Media-Fläche anzunehmen ist (Abb. 15).

3.5 Auswertung der Immunhistochemie

3.5.1 Manuelle Auswertung der Immunhistochemie

Wie bereits unter 2.3.6.3 beschrieben, wurden die immunhistologischen Färbungen von Ki-67, SMA, ED-1, RECA-1 und ICAM-1 manuell ausgewertet, indem für ED-1 braun gefärbte Makrophagen und für Ki-67 braun gefärbte Zellkerne innerhalb von Media und Neointima jeweils pro Hauptgesichtsfeld ausgezählt wurden. Für SMA, RECA-1 und ICAM-1 wurden die Intensität der Färbung in Bezug auf das jeweilige Gewebe angegeben (0: nicht nachweisbar – 3: sehr stark). Für keine dieser Färbungen kann ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Elafingruppe oder zwischen denudiertem und nicht denudiertem Bein gefunden werden (Abb. 16 und 17).

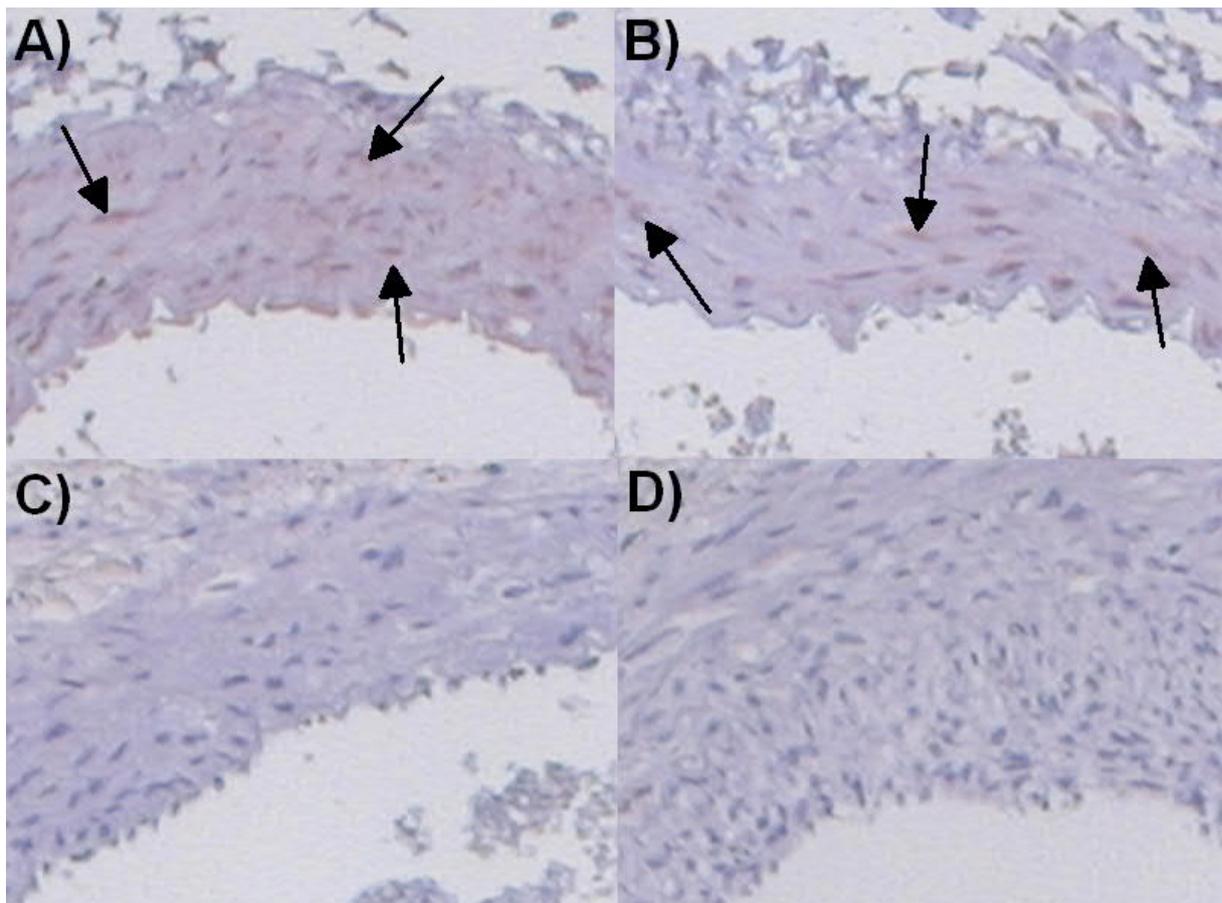


Abbildung 16: Ki-67- [A) und B)] und ED-1- [C) und D)] gefärbte Schnitte eines denudierten Gefäßes von verschiedenen Wistar-Ratten. A) und C) sind Schnitte von mit Elafin behandelten Ratten, B) und D) stammen von Kontrolltieren. Die Pfeile weisen auf Ki-67-gefärbte Zellkerne.

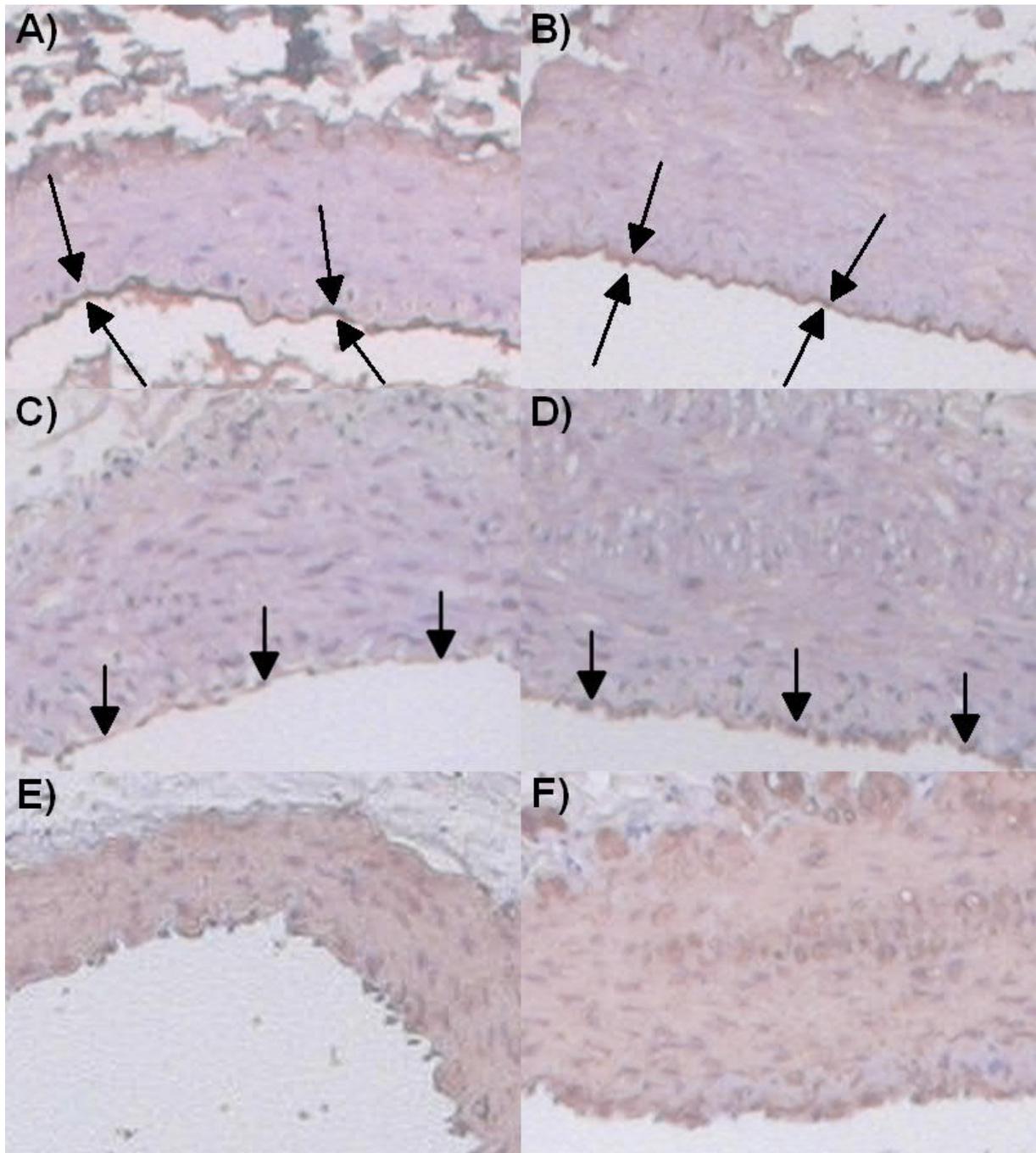


Abbildung 17: ICAM-1- [A) und B)], RECA-1- [C) und D)] und SMA- [E) und F)] gefärbte Schnitte eines denudierten Gefäßes von verschiedenen Wistar-Ratten. A), C) und E) sind Schnitte von mit Elafin behandelten Ratten, B), D) und F) stammen von Kontrolltieren. Die Pfeile weisen auf ICAM-1- bzw. RECA-1-gefärbtes Gewebe. Das mit Antikörpern gegen SMA markierte Gewebe stellt sich in einem rotbraunen Farbton dar [E) und F)].

3.5.2 Automatisierte Auswertung der Immunhistochemie

Wie bereits unter 2.3.6.4 beschrieben, wurden die immunhistologischen Färbungen von Caspase-3, Ki-67 und SMA mit der Software AxioVision 4.7.1 quantitativ ausgewertet. Dabei wurden die Flächen von Media und Neointima auf der denudierten Seite berechnet und der Anteil markierten Gewebes an der jeweiligen Fläche durch zwei Untersucher prozentual ermittelt.

Bezüglich der Caspase-3- und Ki-67-Färbung können für die prozentual mit dem jeweiligen Antikörper angefärbte Media keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Abb. 18).

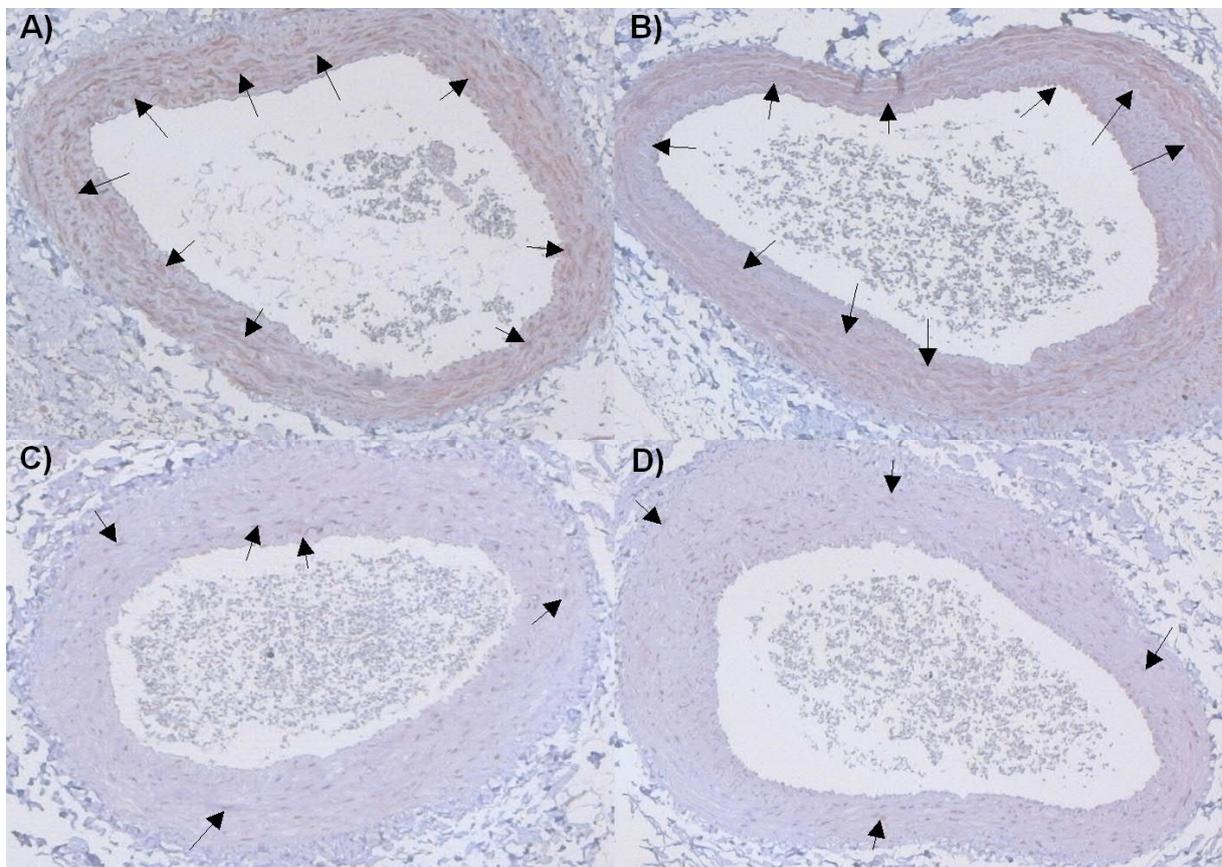


Abbildung 18: Native Darstellung von Caspase-3- [A) und B)] und Ki-67- [C) und D)] gefärbten Schnitten einer denudierten Iliakalarterie verschiedener Wistar-Ratten. A) und C) sind Schnitte von mit Elafin behandelten Ratten, B) und D) stammen von Kontrolltieren. Die Pfeile weisen auf mit den jeweiligen Antikörpern angefärbtes Gewebe, das sich hier bräunlich darstellt.

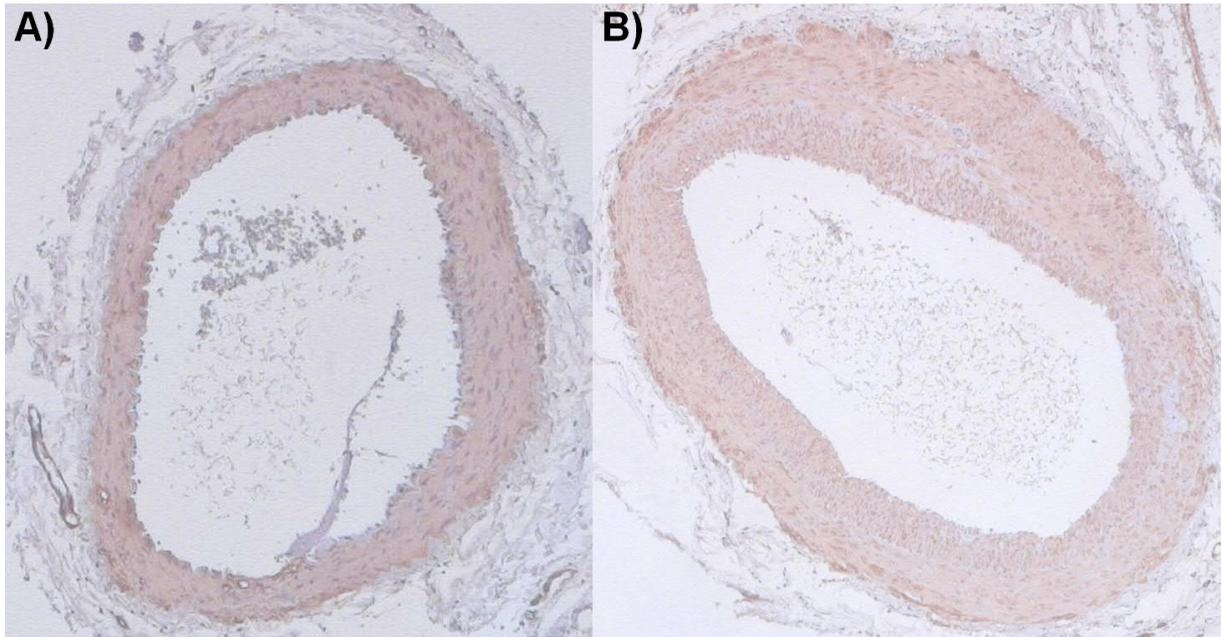


Abbildung 19: Native Darstellung von SMA-gefärbten Schnitten einer denudierten Iliakalarterie verschiedener Wistar-Ratten. A) stammt von einer mit Elafin behandelten Ratte, B) von einem Kontrolltier. Das gegen SMA gefärbte Gewebe erscheint in einem rotbraunen Farbton.

Hinsichtlich der SMA-Färbung weist die Media der Kontrollgruppe eine signifikant stärkere Anfärbung auf als die Media der Elafingruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,007$). In den Schnitten, die eine Intimahyperplasie haben, zeigt sich eine signifikant stärkere Anfärbung der Neointima der Kontrollgruppe als der Elafingruppe (2-Stichproben-Test: $p = 0,002$), wobei nur bei einem mit Elafin behandelten Tier überhaupt eine Neointimabildung nachgewiesen werden kann (Abb. 19 und 20).

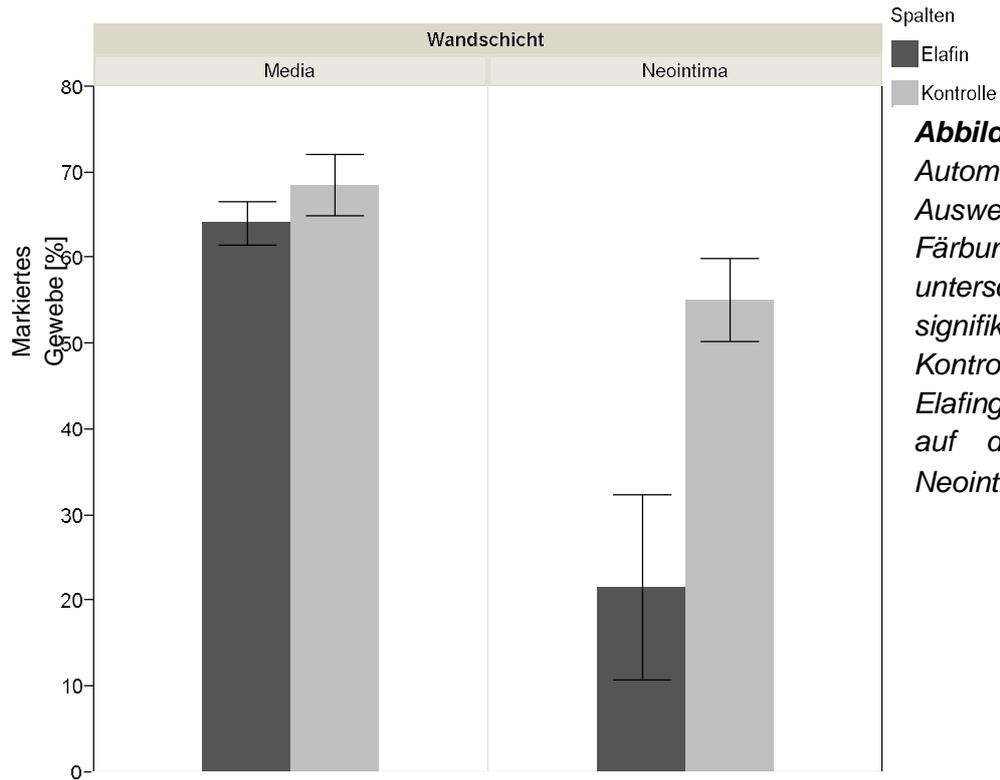


Abbildung 20:
Automatisierte Auswertung der SMA-Färbung. Diese unterscheidet sich signifikant zwischen Kontroll- und Elafingruppe in Bezug auf die Media und Neointima.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Serinproteaseninhibitor Elafin die Ausprägung einer Intimahyperplasie in vivo im Denudationsmodell der Arteria iliaca der Ratte mindern kann. Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, die in vitro-Experimente mit Elafin³⁸ bzw. mit Elafin-transgenen Mäusen⁷⁴ durchgeführt haben, lassen darauf schließen, dass lösliches i.v. appliziertes Elafin in vivo eine Reduktion neointimalen Wachstums herbeiführen kann.

4.1 Diskussion des Tiermodells

Ein ideales Tiermodell, um Effekte neuer Therapien der Intimahyperplasie-bedingten Restenosierungen nach PTA zu untersuchen, sollte die menschliche Pathophysiologie nach Möglichkeit exakt nachahmen, technisch einfach durchführbar, zuverlässig, reproduzierbar und wenig störanfällig sowie aus ethischer und ökonomischer Sicht vertretbar sein.⁷⁹ Das Denudationsmodell der Arteria iliaca der Ratte stellt einen Versuch dar, möglichst viele der oben genannten Prinzipien zu vereinen und sei im Folgenden näher erläutert.

Für unseren Versuch wurden junge, männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-350 g verwendet. In der Literatur zeigt sich, dass ältere Ratten eine ausgeprägtere Intimahyperplasie entwickeln als jüngere Tiere⁸⁰ und aufgrund ihres höheren Körpergewichts einen größeren Arterienquerschnitt haben⁸¹. Weil ein größerer Arterienquerschnitt auch mit einem größeren Gefäßlumen und einer dickeren Gefäßwand einhergeht, müsste das Einführen des 2F-Fogarty-Katheters in die Arteria carotis communis theoretisch leichter zu praktizieren und weniger komplikationsträchtig sein als bei jungen Ratten. Aus Vorversuchen zur Etablierung unseres Tiermodells (Ergebnisse unveröffentlicht) geht jedoch hervor, dass das Risiko für Narkose- und OP-Komplikationen mit dem Alter und Gewicht der Tiere zunimmt. Allerdings zeigte sich auch, dass Wistar-Ratten mit einem Gewicht von unter 200 g erschwert zu katheterisieren sind. Folglich ist die Nutzung junger Ratten, die zwischen 250 und 350 g schwer sind, erfolgversprechender in Hinblick auf ein

komplikationsloses Gelingen von Denudations-OP und Einbau der osmotischen Pumpen.

Um den Einfluss von Elafin auf die Ausbildung einer Intimahyperplasie möglichst frei von hormonellen Störfaktoren beurteilen zu können, wurden männliche Ratten eingesetzt, da Östrogene in verschiedenen Tiermodellen zu einer Abschwächung neointimalen Wachstums führen.⁸²⁻⁸⁵ Obwohl Testosteron die Neointimabildung in der Aorta von Kaninchen⁸⁶ und den Koronararterien von Schweinen⁸⁷ verringern kann, bewirkt es bei Ratten in arteriovenösen Fisteln eher eine Zunahme der Gefäßwanddicke⁸⁸. Daher eignen sich männliche Tiere, eine Elafin-vermittelte Minderung der Intimahyperplasie zu untersuchen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Arterien auf den gleichen Denudationsreiz in unterschiedlichem Ausmaß mit überschießender Neointimaproliferation reagieren. So ist die Intimahyperplasie in Koronargefäßen von Mini-Schweinen stärker ausgeprägt als in den Iliakalarterien.⁸⁹ Auch das weit verbreitete Denudationsmodell der Arteria carotis communis der Ratte weist Unterschiede hinsichtlich einer Neointimaformation gegenüber iliakal denudierten Tieren auf. Diese Differenzen beruhen wahrscheinlich auf anatomischen Gegebenheiten wie einem höheren Anteil an elastischen Fasern in der Tunica media, der Vasa vasorum der Tunica adventitia und einem größeren Gefäßdurchmesser der Arteria iliaca.⁹⁰ Folglich entschieden wir uns mit der Arteria iliaca der Ratte für ein Gefäß, das ähnliche pathophysiologische Voraussetzungen bezüglich einer intimahyperplasiebedingten Restenose wie die arterielle Beckenstrombahn des Menschen nach PTA aufweist.

Auch die Art und das Ausmaß der Gefäßverletzung spielen eine entscheidende Rolle für den anschließenden Heilungsprozess sowie die qualitative und quantitative Ausprägung der Intimahyperplasie. Dies kann durch mehrere tierexperimentelle Modelle und eine klinische Studie belegt werden. Sarembock et al. konnten im Kaninchenmodell der PTA zeigen, dass der Schweregrad der Intimahyperplasie mit dem Inflationsdruck und der Größe des Ballons korreliert.⁹¹ Guzman et al. fanden bei Kaninchen, die in der Arteria femoralis mit PTA behandelt wurden, heraus, dass eine höhere Anzahl an Balloninflationen einen schwereren Schaden der Gefäßwand und eine stärker überschießende Neointimabildung zur Folge hat.⁹² Asada et al. stellten im Denudationsmodell der Aorta des Kaninchens fest, dass die Ausprägung der

Neointima abhängig vom Inflationsdruck des Ballons ist, aber kein proportionales Verhältnis zwischen der Schwere der Gefäßverletzung und dem Kaliber der Intimahyperplasie besteht.⁹³ In einer klinischen Studie mit 28 Patienten wurde ein proportionaler Zusammenhang zwischen der vaskulären Überdehnung von Koronararterien durch einen Stent und des Ausmaßes der infolge dessen entstandenen Intimahyperplasie ermittelt.⁹⁴

In Anlehnung an die Erkenntnisse der oben genannten Studien positionierten wir einen 2F-Fogarty-Katheter sonographisch gesteuert in der proximalen A. iliaca, die proximal durch die Aortenbifurkation und distal durch das Leistenband begrenzt ist und somit reproduzierbar bei allen Wistar-Ratten aufgefunden werden konnte. Um einen ausreichend starken, reproduzierbaren und vergleichbaren Wachstumsreiz für die Neointimabildung auszulösen, wurde der Ballon des Katheters mit 0,4 ml isotoner NaCl-Lösung inflatiert und zwischen Bifurkation und Leistenband hin- und hergezogen. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Die gegenüberliegende Iliakalarterie wurde als Kontrollgefäß benutzt. Ein Vorteil des Denudationsmodells der Arteria iliaca der Ratte ist die Möglichkeit der Verwendung der kontralateralen Iliakalarterie als Kontrollgefäß. Somit ist keine Sham-Gruppe erforderlich, was zu einer Reduktion der Anzahl an Versuchstieren führt.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass eine Schädigung der Gefäßwand nach PTA/PTCA zu anderen Heilungsmechanismen führen kann, als eine durch einen Fogarty-Katheter hervorgerufene Endothelverletzung. So konnten Doornekamp et al. im Kaninchenmodell zeigen, dass eine Fogarty-Ballondilatation der Arteria carotis communis eine stärkere Intimahyperplasie auslöst, als dies nach PTA/PTCA der Fall ist.⁹⁵

Jedoch bietet das Denudationsmodell der Arteria iliaca der Ratte den Vorteil, dass das Operationsgebiet zum Einführen des Katheters in die Arteria carotis communis und der Ort der Intervention in der Arteria iliaca anatomisch weit genug auseinander liegen, dass Wundheilungsprozesse und Entzündungen im operativen Zugangsweg die Darstellung mit morphologischer oder funktioneller Bildgebung des denudierten Gefäßes nicht beeinflussen.

In Zusammenschau aller oben genannten Aspekte ist das Denudationsmodell der Arteria iliaca der Ratte geeignet, um die Auswirkungen von Elafin auf die Ausbildung einer Intimahyperplasie zu untersuchen.

4.2 Diskussion der sonographischen Messungen

Razuvaev et al. fanden im Denudationsmodell der Arteria carotis communis der Ratte heraus, dass die Bestimmung der IMT mittels Kleintiersonographie hervorragend mit der histologisch ermittelten Intimafläche korreliert. Sie erklärten dies damit, dass die Media-Dicke nach Ballondenudation nahezu unverändert bleibt und Veränderungen der IMT auf Änderungen der Intima-Dicke beruhen. Somit ist die IMT ein indirektes Maß für die Intima-Dicke.⁷⁸

Für die vorliegende Arbeit wurde das Vevo770 Kleintiersonographiegerät zur Verlaufskontrolle einer sich entwickelnden Intimahyperplasie kurz vor dem Denudationseingriff sowie nach einer, zwei und drei Wochen eingesetzt. Die Messungen wurden nach dem „leading edge Prinzip“ durchgeführt.⁹⁶ Dieses Vorgehen ermöglicht eine nicht-invasive Bestimmung der IMT in-vivo und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet.^{78,97} Weil mittels Sonographie die Erhebung von Daten bei einer Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten möglich ist, kann die Anzahl der Versuchstiere im Gegensatz zu konventionellen histologischen Evaluierungen, die für die Datenerhebung eine Euthanasierung der Tiere erfordern, erheblich reduziert werden.⁷⁸

Es gibt jedoch auch Limitationen der Kleintiersonographie, die einerseits durch die Methode an sich und andererseits durch das vorliegende Tiermodell bedingt sind. Ein Problem des Verfahrens ist die Tatsache, dass Schallwellen bei hohen Impedanzsprüngen (= Änderungen der Ausbreitung von Schallwellen in Gewebe), beispielsweise wegen Dichteunterschieden zwischen Gewebe und Luft oder Gewebe und Knochen, annähernd vollständig reflektiert werden und somit die Darstellung tiefer liegenden Gewebes beeinträchtigen.⁹⁸

Um die Aorta abdominalis und die Iliakalarterien abzubilden, musste häufig der kranial der Gefäße liegende Dick- oder Dünndarm durchschallt werden. Da die Darmschlingen gelegentlich mit Luft gefüllt waren, war die Gefäßdarstellung in diesen

Fällen erschwert. Zur Lösung des Problems versuchten die Untersucher, die Luft durch Aufdrücken des Schallkopfes auf das Abdomen der Ratte aus dem Sichtfeld zu schieben, was jedoch nicht immer gelang. Daher konnte die Schichtung der arteriellen Gefäßwand in einigen Fällen nicht einwandfrei abgebildet werden. Falls keine Rekonstruktion möglich war, mussten diese Daten verworfen werden.

Auch die Tatsache, dass die Ratten zur Durchführung der Ultraschalluntersuchungen narkotisiert werden müssen, birgt ein gewisses mit der Anästhesie verbundenes Risiko. Eine Narkotisierung ist jedoch zur Vermeidung von Stress der Tiere unvermeidlich.⁹⁸ Sie erleichtert außerdem die technische Ausführung der sonographischen Messungen, weil das Bewegungsausmaß der Ratten stark eingeschränkt ist und verbessert somit die Bildqualität.

Eine Gegenüberstellung der Mittelwerte der IMT des denudierten Gefäßes der Kontrollgruppe mit dem Kontrollgefäß der Kontrollgruppe zeigt, dass die Denudation der A. iliaca hat, wie erwünscht, zur Ausprägung einer Intimahyperplasie geführt hat. Während die IMT des denudierten Gefäßes kontinuierlich anstieg und nach zwei Wochen ein Plateau erreichte, blieb die IMT des Kontrollgefäßes nahezu unverändert. Die Schwankungen der IMT von etwa 0,01 mm zwischen den einzelnen Messzeitpunkten des Kontrollgefäßes beruhen vermutlich auf geringfügig veränderten Messbedingungen.

Der Mittelwert der IMT des denudierten Gefäßes der Kontrollseite betrug vor der Intervention etwa 0,08 mm. Nach einer Woche stieg er auf ca. 0,11 mm an und erreichte nach zwei Wochen ein Plateau bei etwa 0,14 mm. Razuvaev et al. erzielten im Denudationsmodell der A. carotis communis nach zwei und drei Wochen ähnliche Werte für die IMT des Kontrollgefäßes auf der Interventionsseite mit einem Median bei 0,15 mm. Überdies wurde auch hier ein Plateau der IMT nach zwei Wochen erreicht.⁷⁸ Ein exakter Vergleich dieser Studie mit der vorliegenden Arbeit ist wegen der unterschiedlichen denudierten Gefäße nicht uneingeschränkt möglich. Es kann jedoch die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Entstehung und das Ausmaß der Intimahyperplasie indirekt über die IMT erfolgreich mittels Kleintiersonographie ermittelt werden kann, was in dieser Arbeit auch gelungen ist.

Nach einer Woche lag der Mittelwert der IMT des denudierten Gefäßes der Elafingruppe noch bei ca. 0,1 mm und unterschied sich damit nicht wesentlich vom Mittelwert des Interventionsgefäßes der Kontrollgruppe mit 0,11 mm. Nach der ersten Woche erreichte der Mittelwert der Elafingruppe jedoch ein Plateau und stieg nicht weiter an (messbedingte Schwanken von 0,01 eingerechnet) im Gegensatz zum Mittelwert der Kontrollgruppe, der sich weiter auf 0,14 mm erhöhte. Dies lässt darauf schließen, dass Elafin die Intimahyperplasie nach Denudation der A. iliaca der Ratte mindert. Die IMT des Kontrollgefäßes änderte sich wie erwartet nicht im Verlauf.

Es ist bekannt, dass Ultraschall im Gegensatz zu anderen radiologischen Verfahren in hohem Maße abhängig von der ausführenden Person ist. Um akkurate, hochwertige Bilder und wiederholbare Messergebnisse zu produzieren, bedarf es eines qualifizierten Untersuchers.⁹⁸ Da eine Beeinflussung der Messergebnisse durch ein einzelnes Individuum nicht ausgeschlossen werden kann, entschieden wir uns, die Kleintiersonographie mit zwei Untersuchern geblindet durchzuführen. Dabei waren dem Sonographeur weder die Gruppe (Elafin-/Kontrollgruppe) noch der Interventionsstatus des Gefäßes (denudiertes Gefäß/Kontrollgefäß) bekannt. Die Ermittlung der IMT wurde nicht während der Untersuchung, sondern nachträglich anhand von Cineloops vollzogen.

Ein Bestimmtheitsmaß von 0,89 zwischen beiden Untersuchern hinsichtlich der IMT weist auf ein hohes Maß an Übereinstimmung hin. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass beide Untersucher im Vorfeld dieser Arbeit von einem erfahrenen Radiologen im Umgang mit dem Vevo770 Kleintiersonographiegerät über längere Zeit geschult wurden. Nach einer gewissen Einarbeitungszeit stellt die Kleintiersonographie ein valides und reliables Verfahren zur Bestimmung der IMT und somit Entwicklung der Intimahyperplasie dar.

4.3 Diskussion der histologischen Färbungen

Die morphologische Histologie im Sinne einer Hämatoxylin-Eosin- (HE) oder Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (Trichrom-Färbung) ist die Methode der Wahl, eine Intimahyperplasie in Gefäßen nachzuweisen sowie ihre Ausprägung zu bestimmen und wird von fast allen Arbeitsgruppen im Bereich der Intimahyperplasieforschung eingesetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Masson-Golder-Elastika-Kossa-Färbung stellt eine Erweiterung der Masson-Golder-Trichrom-Färbung dar und ermöglicht das Erkennen von elastischen Fasern (Elastika) sowie Kalk (Kossa). Somit kann die Membrana elastica interna, die die Grenze zwischen Media und Neointima markiert und zum großen Teil aus elastischen Fasern besteht, im Vergleich zur Trichrom-Färbung noch besser erkannt werden und die Fläche der Intimahyperplasie genauer bestimmt werden.

Zur optimalen Darstellung der Ausprägung und Verteilung der Neointima sind idealerweise Serienschnitte des kompletten Gefäßes notwendig. Dies ist jedoch, bedingt durch den großen Arbeitsaufwand, nicht zu rechtfertigen. Damit stets die gleichen Regionen der Gefäßpräparate mit einander verglichen werden können, müssen standardisierte Bedingungen herrschen. In der vorliegenden Dissertation wurde dies durch die standardisierte Einbettung der Gefäßpräparate zu jeweils 3 mm-Blöcken und Zuordnung der Blöcke zum proximalen bzw. distalen Gefäßabschnitt sowie die standardisierte Anfertigung von Schnitten innerhalb der Blöcke sichergestellt. Da bei Fixierung und Einbettung der Gefäßpräparate Schrumpfungsartefakte entstehen können, wurden die Gefäße im Vorfeld sorgfältig und schonend präpariert, um dieser Schrumpfung vorzubeugen. Für die nachfolgende Auswertung muss das Gefäß orthograd geschnitten sein, um die Gefäßanatomie korrekt zu erfassen. Dies wurde durch eine standardisierte, senkrechte Einbettung der Präparate sichergestellt. Ein Restfehler kann dennoch nicht ausgeschlossen werden und bleibt methodenimmanent.

Um einen Überblick über die Verteilung der Neointima in der Elafin- und Kontrollgruppe zu bekommen, wurden die Masson-Goldner-Kossa-Elastica gefärbten Schnitte qualitativ auf das Vorhandensein von Intimahyperplasie überprüft.

Es zeigte sich, dass die mit Elafin behandelten Ratten auf der Interventionsseite in deutlich weniger Schnitten eine Intimahyperplasie aufweisen, als die Tiere der Kontrollgruppe. Während in der Elafingruppe nur 15 % aller Schnitte des denudierten Gefäßes eine Intimahyperplasie haben, weisen in der Kontrollgruppe 73 % der Schnitte der Interventionsseite eine Neointima auf. Somit wird die erste Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der Ultraschallmessungen, die Erzeugung einer Neointima durch Denudation der A. iliaca, bestätigt. Weiterhin lässt dies auf eine Hemmung bzw. Verhinderung der Intimahyperplasie durch Elafin schließen, was ebenfalls durch die sonographischen Ergebnisse unterstrichen wird.

Durch Erkenntnisse aus Vorversuchen zu dieser Arbeit sowie aus der Literatur ist bekannt, dass der Gefäßquerschnitt und die Gefäßwanddicke von Arterien nach distal abnehmen.⁹⁹ Beim Vergleich proximaler mit distalen Gefäßabschnitten muss daher die unterschiedliche Anatomie beachtet werden. Um möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen, sollten alle Wistar-Ratten in der proximalen A. iliaca kurz nach Abgang aus der Aorta abdominalis denudiert werden. Dies wurde unter sonographischer Bildgebung kontrolliert und histologisch verifiziert. In dieser Dissertation stammen alle Schnitte mit Intimahyperplasie auf der denudierten Seite der Kontroll- und Elafingruppe aus dem proximalen Gefäßabschnitt.

Insgesamt wurden vier Schnitte mit IH im proximalen Segment des Kontrollgefäßes einer Ratte gefunden. Sie beruhen wahrscheinlich auf einer versehentlichen Balloninflation in der Aorta abdominalis mit konsekutiver Neointimagenese bis in das Ostium der untersuchten A. iliaca. Zur validen Vergleichbarkeit von Elafin- und Kontrollgruppe wurden sämtliche Schnitte der betroffenen Ratte für die Datenauswertung ausgeschlossen.

Zusätzlich zur qualitativen Analyse fand eine quantitative Auswertung der Gefäßwandflächen Neointima, Media und Lumen anhand von Masson-Goldner-Elastika-Kossa-gefärbten Gefäßpräparaten im Querschnitt statt.

Alle sechs Wistar-Ratten der Kontrollgruppe weisen im denudierten Iliakalgefäß eine Intimahyperplasie auf, die im Durchschnitt eine Fläche von 36005 μm^2 hat. Demgegenüber haben nur drei der fünf mit Elafin behandelten Ratten eine Neointima, die im Mittel mit 10840 μm^2 Fläche deutlich geringer ausfällt als in der

Kontrollgruppe. Die Tatsache, dass dieser Unterschied nur eine Tendenz darstellt und knapp nicht signifikant ist ($p = 0,06$), beruht vermutlich auf der großen Differenz an Schnitten mit IH zwischen der Elafin- ($n = 8$) und Kontrollgruppe ($n = 45$). Die geringe Anzahl an Schnitten mit IH und die kleinere Fläche der Neointima lassen darauf schließen, dass Elafin sowohl eine Minderung der IH herbeiführen als auch grundsätzlich das Entstehen einer Neointima verhindern kann. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.^{38,74}

Neben der Ausbildung einer Neointima führt die Denudation der Gefäßwand auch zu Veränderungen in der Media. So weisen die denudierten Gefäße beider Gruppen proximal signifikant größere Werte für die Mediafläche auf als die Kontrollgefäße, wobei dieser Effekt für die Ratten der Kontrollgruppe stärker ($p < 0,0001$) ausgeprägt ist als für die Elafintiere ($p = 0,001$). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Gefäßwandschädigung zu einer Verdickung der Media führt, und diese Mediaverdickung durch den Einfluss von Elafin geringer ausgeprägt ist. Zwischen den Elafin- und den Kontrolltieren konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Mediafläche nachgewiesen werden. Die Kontrolltiere weisen auch distal eine signifikant größere Mediafläche im denudierten als im Kontrollbein auf ($p = 0,04$), obwohl dieser Gefäßabschnitt nicht denudiert wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Reaktion der Gefäßwand auf den Denudationsreiz über den geschädigten Bereich hinausreicht. Interessanterweise haben die mit Elafin behandelten Wistar-Ratten distal eine signifikant größere Mediafläche als die Kontrolltiere ($p = 0,001$), wobei sich die Mediafläche zwischen denudiertem und Kontrollbein in der Elafingruppe nicht unterscheidet. Möglicherweise sind Serinproteasen für ein Gleichgewicht von Auf- und Abbau der Gefäßwand zuständig. Bei Hemmung der Serinproteasen könnte der Aufbau der Media im nicht verletzten Gefäßbereich durch noch unbekannte Prozesse dominieren, wohingegen die Entstehung und das Ausmaß einer Neointimabildung gehemmt werden. Dieser Aspekt sollte in weiteren experimentellen Studien genauer untersucht werden.

Die Elafintiere weisen distal in beiden Iliakalgefäßen signifikant größere Lumina auf als die Kontrolltiere (denudiertes Gefäß: $p = 0,017$; Kontrollgefäß: $p = 0,008$) wobei sich das Lumen des denudierten Gefäßes nicht vom Lumen des Kontrollgefäßes unterscheidet. Auch in der Kontrollgruppe unterscheiden sich die Lumina distal nicht zwischen denudiertem und Kontrollbein. Proximal unterscheiden

sich die Lumina des denudierten und des Kontrollgefäßes bei den Elafintieren ebenfalls nicht, allerdings weisen die Kontrolltiere im denudierten Gefäß ein signifikant größeres Lumen auf als im Kontrollgefäß ($p = 0,0007$). Dies beruht vermutlich darauf, dass das Gefäß auf die Neointima-bedingte Einengung des Lumens mit positivem Remodelling reagiert. Hierdurch hebt sich der Lumenunterschied zwischen Elafin- und Kontrollgruppe im proximalen denudierten Bein auf.

Um genauer einschätzen zu können, wie stark Elafin die Entstehung einer IH hemmt, wurden die quantitativen Daten der morphologisch ermittelten Intimahyperplasiefläche (IA) sowie IH-beeinflussende Faktoren wie Zeitpunkt der Messungen nach Intervention, Gewicht der Ratten, Art der Gefäßverletzung und verwendetes Gefäß mit anderen systemischen Medikamenten verglichen (siehe Tabelle 2 und 3).

Studie	I/M-ratio		Intimafläche (μm^2)		IAth/IAko
	Kontrolle	Therapie **	Kontrolle	Therapie	
Budach et al.	0,21 ± 0,18	0,11 ± 0,09	36005	10839	0,30
Chang et al. ¹⁰⁰	N/A	N/A	200000	120000	0,60
Zhang et al. ¹⁰¹	1,70	0,40	3300000	1000000	0,30
Fürst et al. ¹⁰²	1.14 ± 0.45	0.57 ± 0.23	N/A ***	N/A ***	NA
Jahnke et al. ¹⁰³	0,28 ± 0,09	0,05 ± 0,03	N/A	N/A	N/A
Razuvaev et al. ¹⁰⁴	1.1 ± 0.15	0.54 ± 0.24	144000	67000	0,47
Hashiya et al. ^{105 *}	1,30	0,60	N/A	N/A	N/A
Waller et al. ¹⁰⁶	1,47	0,79	N/A	N/A	N/A
Wu et al. ¹⁰⁷	1,73 ± 0,18	0,72 ± 0,12	N/A	N/A	N/A
Camozzi et al. ^{108 *}	1,80	1,10	N/A	N/A	N/A
Li et al. ^{109 *}	1,30	0,60	134286	60000	0,45

Tabelle 2: Quantitatives Ausmaß der Intimahyperplasie unter Therapie- und Kontrollbedingungen ausgewählter Studien. I/M-ratio = Intima zu Media-Verhältnis; IAth/IAko = Verhältnis der Intimafläche der Therapiegruppe zur Intimafläche der Kontrollgruppe – dies wurde nachträglich durch den Verfasser der vorliegenden Dissertation ermittelt; N/A = Daten

nicht vorhanden. * = Daten anhand von Graphiken näherungsweise abgelesen; ** = jeweils wirksamste Dosierung und Applikationsform; *** = Umrechnungsfehler in der Originalarbeit

Studie	Zeitpunkt nach Intervention (Tage)	Gewicht (g)	Gefäß	IH-Reiz
Budach et al.	21	250-350	A. iliaca	Ballondenudation
Chang et al. ¹⁰⁰	21	250-300	CCA	Ballondenudation
Zhang et al. ¹⁰¹	14	300-350	CCA	Ballondenudation
Fürst et al. ¹⁰²	14	250-275	CCA	Ballondenudation
Jahnke et al. ¹⁰³	21	250-300	Aorta	double injury
Razuvaev et al. ¹⁰⁴	14	300-400	CCA	Ballondenudation
Hashiya et al. ¹⁰⁵	14	400-500	CCA	Ballondenudation
Waller et al. ¹⁰⁶	28	N/A	CCA	Ballondenudation
Wu et al. ¹⁰⁷	14	300-500	CCA	Ballondenudation
Camozzi et al. ¹⁰⁸	28	N/A	CCA	Ballondenudation
Li et al. ¹⁰⁹	14	280-320	CCA	Ballondenudation

Tabelle 3: Faktoren, die das Ausmaß der Intimahyperplasie beeinflussen können, zusammengestellt für verschiedene Studien mit systemischen Medikamenten. CCA = Arteria carotis communis. N/A = Daten nicht verfügbar

Das Intima-Media-Verhältnis (I/M-ratio) ist eine in der Literatur übliche Methode, das Ausmaß einer IH zu quantifizieren. Je größer der Wert der I/M-ratio ist, desto stärker ist der Grad der IH. Um einen therapeutischen Effekt nachzuweisen, ist der Vergleich der I/M-ratio von Therapie- und Kontrollgruppe (als Basalwert) diesbezüglich von besonderem Interesse. In der vorliegenden Dissertation beträgt der Mittelwert der I/M-ratio für die Elafingruppe $0,11 \pm 0,09$ und für die Kontrollgruppe $0,21 \pm 0,18$. Damit ist die I/M-ratio der Therapiegruppe etwa halb so groß wie die der Kontrollgruppe. Im Verhältnis zu den anderen in Tabelle 2 und 3 aufgeführten I/M-

ratios sind sowohl der Wert für die Kontrollgruppe als auch der Wert für die Therapiegruppe relativ gering und lassen sich am ehesten mit den Werten der I/M-ratio von Jahnke et al. vergleichen, die eine Double-injury der Aorta durchgeführt haben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Ausmaß der IH gefäßspezisch ist und sowohl die Iliakalarterien der Ratte als auch die Aorta Vasa vasorum besitzen, wohingegen diese in der A. carotis communis fehlen.⁹⁰

Als weiteres Maß für die Wirksamkeit der IH-Hemmung wurde in dieser Dissertation der Quotient der Intimafläche des therapierten Gefäßes zur Intimafläche des Kontrollgefäßes (= I_{Ath}/I_{Ako}) verwendet. Je kleiner der Wert dieses Quotienten ist, desto wirksamer ist das eingesetzte Therapeutikum. Mit einem I_{Ath}/I_{Ako}-Quotienten von 0,3 weisen die mit Elafin behandelten Tiere dieser Disseration einen im Vergleich sehr niedrigen Wert auf, was auf eine hohe Wirksamkeit von Elafin auf die Hemmung einer IH schließen lässt.

4.4 Diskussion der Korrelation zwischen den sonographischen Messungen und der Masson-Golder-Elastika-Kossa-Färbung

In dieser Arbeit besteht keine Korrelation zwischen der sonographischen IMT und der histologischen IMA ($R^2 = 0,25$). Folglich könnte man annehmen, dass die Sonographie in der vorliegenden Dissertation nicht zur Verlaufskontrolle der IH geeignet ist. Die Tatsache, dass jedoch eine gute Interobserverkorrelation vorliegt ($R^2 = 0,89$) lässt auf valide sonographische Einzelmessungen schließen. Darüberhinaus ist das Profil der Werte für die denudierte Gefäßseite der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf mit den Messwerten der Gruppe um A. Razuvaev vergleichbar.

Die schlechte Korrelation von IMT und IMA könnte in der Methodik begründet sein. Sowohl in der Kleintiersonographie (dreimalige Messung im Bereich der maximalen Gefäßwanddicke) als auch in der morphologischen Histologie (Stufenschnitte) wurden punktuelle Messungen durchgeführt, die die Gefäßwand nicht lückenlos erfassen. Zukünftig könnte dieses Problem gelöst werden, indem Anfang und Ende des Bereichs der Gefäßwand, der sonographisch verändert imponiert, mittels

Gefäßclip oder Markierung mit z.B. Toluidinblau vor Resektion gekennzeichnet werden. Es ist überdies möglich, dass die Gefäßwand teilweise nicht genau orthograd getroffen wurde, wodurch Messfehler resultieren. In der Sonographie wurde die Bildqualität zum Teil durch Luft in den Darmschlingen, die nicht immer aus dem Bild entfernt werden konnte, beeinträchtigt. Die künstliche Erzeugung eines milden Aszites zur besseren Verdrängung der Darmschlingen könnte in Zukunft hilfreich sein. Eine nicht vermeidbare Ursache der Histologie stellen Schrumpfungartefakte dar, die bei Anfertigung der histologischen Nativpräparate entstehen und zu einer artifiziellen Verkleinerung der Flächen innerhalb der Gefäßwand führen.

Weiterhin kann die geringe Korrelation dateninherent begründet sein. Weil vergleichsweise kleine Unterschiede in den absoluten Zahlen der sonographischen IMT-Messwerte zwischen den Gruppen bestehen, führen selbst kleine Messfehler zu großen Auswirkungen in der Korrelation.

4.5 Diskussion der immunhistochemischen Färbungen

Die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima mit nachfolgender Synthese von extrazellulärer Matrix stellen wesentliche Elemente der Ätiopathogenese der Intimahyperplasie dar.^{30,33,35,41,43} Um die Wirkungsweise von Elafin innerhalb dieses Prozesses zu untersuchen, wurde eine Reihe von immunhistologischen Färbungen an den denudierten Gefäßen der Elafin- und Kontrollgruppe drei Wochen nach der Intervention durchgeführt. Ki-67 diente als Proliferationsmarker, Caspase-3 wurde als Apoptosemarker eingesetzt, ICAM-1 und RECA-1 dienten als Reendothelialisierungsmarker, SMA wurde für die selektive Darstellung glatter Gefäßmuskelzellen und ED-1 für die Darstellung von Makrophagen verwendet. Sämtliche Marker wurden zuvor erfolgreich in anderen Studien für die Einschätzung von pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen der Intimahyperplasie in Arterien angewendet.¹¹⁰⁻¹¹⁴

Während für Caspase-3, Ki-67, ICAM-1, RECA-1 und ED-1 in der Gesamtübersicht keine relevanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestehen, ist der Anteil von SMA-markiertem Gewebe an der Media für die Kontrollgruppe signifikant höher als

für die Elafingruppe ($p = 0,007$). In der Neointima ist diese Differenz sogar noch größer ($p = 0,002$).

Um die oben genannten Unterschiede verstehen zu können, sei an dieser Stelle die Rolle der Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- β für die SMA-Expression im Zuge der Neointimaentstehung erläutert. In einer Zellkultur aus glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte konnte gezeigt werden, dass PDGF die SMA-Expression vermindert.¹¹⁵ TGF- β hingegen führte in Zellkulturen zu einem Anstieg der SMA-Spiegel.^{116,117} Nach Verletzung des Gefäßendothels produzieren Thrombozyten und Endothelzellen PDGF, wodurch die glatten Gefäßmuskelzellen in einen Migrationszustand versetzt werden.³⁰ Die SMA-Expression sinkt zunächst in den ersten Tagen nach Denudation, steigt dann aber wieder kontinuierlich an.¹¹⁸ Dies ist durch die Proteasen-vermittelte Freisetzung von TGF- β zu erklären, der die glatten Gefäßmuskelzellen in einen Synthesezustand umwandelt und somit die Produktion von extrazellulärer Matrix fördert.⁴¹

Der geringere Anteil von SMA in der Media und vor allem Neointima der Elafingruppe lässt darauf schließen, dass Elafin durch die Hemmung von Serinproteasen den Umsatz der EZM und die Freisetzung von TGF- β verringert. Dies wurde bereits von Barolet et. al. in vitro über die Elastasenaktivität und in vivo mittels viral in die Gefäßwand transfiziertem Elafin herausgefunden³⁸ und konnte in der vorliegenden Arbeit mit löslichem Elafin in vivo bestätigt werden.

Weiterhin könnte der niedrigere Anteil von SMA in der Elafingruppe ein Anzeichen dafür sein, dass sich weniger Matrix-synthetisierende glatte Gefäßmuskelzellen in der Neointima befinden, als in der Kontrollgruppe und könnte damit eine Folge von verminderter Migration oder Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sein. Da keine Unterschiede für die Ki-67- und Caspase-3 Verteilung zwischen der Elafin- und Kontrollgruppe gefunden werden konnten, konnte eine direkte Beeinflussung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch Elafin drei Wochen nach Denudation in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass Zellvermehrung und Zellwanderung vorwiegend in den ersten zwei Wochen nach Endothelverletzung stattfinden, die immunhistologischen Färbungen der vorliegenden Arbeit jedoch nach drei Wochen angefertigt wurden. Unterstützt wird diese These damit, dass die Elastase-Aktivität, die die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen maßgeblich erhöht, infolge der Intimaverletzung in

unbehandelten Kontrollgefäßen nach einer Woche ihren Gipfel erreicht³⁸, bereits nach zwei Wochen deutlich nachlässt¹¹⁹ und nach vier Wochen wieder zu ihrem Ausgangswert zurückkehrt³⁸.

Die Reduktion der Intimahyperplasie durch Elafin ist demnach vorrangig der Hemmung der Elastasen-bedingten Freisetzung von TGF- β und somit einer verringerten Produktion von extrazellulärer Matrix durch die glatten Gefäßmuskelzellen zuzuschreiben.

4.6 Fazit

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Elafin die Ausbildung einer Intimahyperplasie im Denudationsmodell der A. iliaca der Ratte weitgehend verhindern kann. Dies lässt sich nichtinvasiv mittels Ultraschall im Verlauf verfolgen. Weitere Studien sind notwendig, um sowohl die genauen zellulären und molekularen Mechanismen besser zu verstehen, als auch das Therapieregime zu optimieren. Die Toxizität von Elafin wurde in einer Phase-I-Studie mit gesunden Probanden und zwei Phase-II-Studien als sehr gering eingestuft.¹²⁰ Eine abgeschlossene Phase-II-Studie, die an Patienten mit Ösophagektomie nach Ösophaguskarzinom durchgeführt wurde, konnte zeigen, dass Elafin zu einer Verringerung der Aufenthaltszeit auf der Intensivstation führt [Pressemitteilung von Proteo, Inc. vom 23.02.2011]. Langfristig könnte es sich bei Elafin um einen erfolgversprechenden Kandidaten für einen klinischen Einsatz zur Intimahyperplasieprophylaxe nach angiographischer Intervention handeln.

5. Zusammenfassung

Die pAVK ist eine Gefäßkrankheit mit hoher Morbidität und Mortalität, deren rechtzeitige Diagnose und Therapie von entscheidender Bedeutung ist. Die PTA ist das am häufigsten eingesetzte perkutane Rekanalisierungsverfahren zur Behandlung der pAVK und stellt für viele artherosklerotisch bedingte Stenosen die Behandlungsmethode der Wahl dar. Trotz primär hoher Erfolgsraten der PTA führt die postinterventionelle überschießende Neointimabildung oftmals zur erneuten Verengung der behandelten Gefäße. Um dieser Restenosierung vorzubeugen, werden heutzutage u. a. medikamentenbeschichtete Stents eingesetzt. Aber auch in den Stents tritt oft eine „In-Stent-Restenose“ auf, die überwiegend durch die Intimahyperplasie bedingt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Serinproteaseinhibitors Elafin auf die Ausbildung einer Intimahyperplasie im Denudationsmodell der A. iliaca der Ratte untersucht. Dabei konnte mit mehreren diagnostischen Verfahren demonstriert werden, dass Elafin die Ausprägung einer Neointima vermindern bzw. ihre Entstehung verhindern kann. In der Kleintiersonographie, die zur nichtinvasiven Verlaufskontrolle eingesetzt wurde, wiesen mit Elafin behandelte Wistar-Ratten mit ca. 0,1 mm eine eindeutig geringere Intima-Media-Dicke (IMT) nach zwei und drei Wochen auf, als die Kontrolltiere (IMT: 0,14 mm). Mittels histologischer Färbungen wurden nach drei Wochen signifikant weniger Schnitte mit Intimahyperplasie in der Elafin- als in der Kontrollgruppe gefunden. Die Fläche der Neointima war in der Elafin- als in der Kontrollgruppe deutlich kleiner als in der Kontrollgruppe. Zudem wiesen zwei mit Elafin therapierte Ratten keinerlei Intimahyperplasie auf. In der immunhistochemischen Färbung gegen alpha smooth muscle actin (SMA), das Bestandteil von Extrazellulärmatrix- (EZM) synthetisierenden glatten Gefäßmuskelzellen ist, konnte ein signifikant größerer Anteil von SMA-positivem Gewebe innerhalb der Media und Neointima der Kontrolltiere ermittelt werden, als bei den Elafin-Tieren. Damit unterstützt diese Dissertation die These anderer Arbeitsgruppen, dass Elafin durch Inhibition von Proteasen die Freisetzung von EZM-gebundenen Wachstumsfaktoren mindert und damit die Neubildung von EZM, die den Hauptbestandteil der Neointima ausmacht, durch glatte Gefäßmuskelzellen verringert.

Elafin, dessen gute Verträglichkeit in einer Phase-I-Studie an gesunden Probanden sowie in einer Phase-II-Studie bei Patienten mit Ösophagektomie nach Ösophaguskarzinom belegt wurde, könnte unter Berücksichtigung der Resultate bisheriger Studien und der Ergebnisse dieser Dissertation zur Therapie der Intimahyperplasie-bedingten Restenose nach PTA eingesetzt werden. Allerdings sollten die Erkenntnisse dieser Dissertation noch in weiteren tierexperimentellen Studien verifiziert werden.

6. Literatur

1. stat. Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 354
2. Gorenoi V, Dintsios CM, Schonermack MP, Hagen A. Intravascular brachytherapy for peripheral vascular disease. *GMS Health Technol Assess.* 2008; 4: Doc08.
3. Ostchega Y, Paulose-Ram R, Dillon CF, Gu Q, Hughes JP. Prevalence of peripheral arterial disease and risk factors in persons aged 60 and older: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *J Am Geriatr Soc.* 2007 Apr; 55 (4): 583-9.
4. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA.* 2001 Sep 19; 286 (11): 1317-24.
5. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med.* 1992 Feb 6; 326 (6): 381-6.
6. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan; 45 Suppl S: S5-67.
7. Leng GC, Lee AJ, Fowkes FG, Whiteman M, Dunbar J, Housley E, et al. Incidence, natural history and cardiovascular events in symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol.* 1996 Dec; 25 (6): 1172-81.
8. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Associations for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease)--summary of recommendations. *J Vasc Interv Radiol.* 2006 Sep; 17 (9): 1383-97; quiz 98.

9. Morgenstern BR, Getrajdman GI, Laffey KJ, Bixon R, Martin EC. Total occlusions of the femoropopliteal artery: high technical success rate of conventional balloon angioplasty. *Radiology*. 1989 Sep; 172 (3 Pt 2): 937-40
10. Hunink MG, Wong JB, Donaldson MC, Meyerovitz MF, de Vries J, Harrington DP. Revascularization for femoropopliteal disease. A decision and cost-effectiveness analysis. *JAMA*. 1995 Jul 12; 274 (2): 165-71.
11. Dotter CT, Judkins MP. Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application. *Circulation* 1964; 30: 654-70.
12. Gruntzig A, Kumpe DA. Technique of percutaneous transluminal angioplasty with the Gruntzig ballon catheter. *AJR Am J Roentgenol*. 1979 Apr; 132 (4): 547-52.
13. Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1979 Jul 12; 301 (2): 61-8.
14. Louis EL, Provan JL, Gray RR, Grosman H, Ameli FM, Elliott DS. Percutaneous transluminal angioplasty in peripheral vascular disease: a review. *Can Fam Physician*. 1982 Feb; 28: 291-4.
15. Clowes AW, Reidy MA. Prevention of stenosis after vascular reconstruction: pharmacologic control of intimal hyperplasia--a review. *J Vasc Surg*. 1991 Jun; 13 (6): 885-91.
16. Schillinger M, Sabeti S, Loewe C, Dick P, Amighi J, Mlekusch W, et al. Balloon angioplasty versus implantation of nitinol stents in the superficial femoral artery. *N Engl J Med*. 2006 May 4; 354 (18): 1879-88.
17. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, et al. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Aug; 283 (2): H760-7.
18. Caixeta AM, Arie S, Sandoli de Brito F, Jr., Piva de Albuquerque C, Fukushima JT, Garcia DP, et al. [Analysis of elastic retraction in the 1st 15 minutes after coronary balloon angioplasty]. *Arq Bras Cardiol*. 1996 Jan; 66 (1): 5-9.
19. Rodriguez AE, Palacios IF, Fernandez MA, Larribau M, Giraudo M, Ambrose JA. Time course and mechanism of early luminal diameter loss after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1995 Dec 1; 76 (16): 1131-4.

20. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1996 Mar 15; 93 (6): 1141-7.
21. Indolfi C, Esposito G, Stabile E, Cavuto L, Pisani A, Coppola C, et al. A new rat model of small vessel stenting. *Basic Res Cardiol*. 2000 Jun; 95 (3): 179-85.
22. Gray BH, Sullivan TM, Childs MB, Young JR, Olin JW. High incidence of restenosis/reocclusion of stents in the percutaneous treatment of long-segment superficial femoral artery disease after suboptimal angioplasty. *J Vasc Surg*. 1997 Jan; 25 (1): 74-83.
23. Weintraub WS. The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol*. 2007 Sep 3; 100 (5A): 3K-9K.
24. Laird JR, Katzen BT, Scheinert D, Lammer J, Carpenter J, Buchbinder M, et al. Nitinol stent implantation versus balloon angioplasty for lesions in the superficial femoral artery and proximal popliteal artery: twelve-month results from the RESILIENT randomized trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2010 Jun 1; 3 (3): 267-76.
25. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol*. 2000 Feb; 190 (3): 300-9.
26. Subbotin VM. Analysis of arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis. *Theor Biol Med Model*. 2007; 4: 41.
27. Johnston KW, Rae M, Hogg-Johnston SA, Colapinto RF, Walker PM, Baird RJ, et al. 5-year results of a prospective study of percutaneous transluminal angioplasty. *Ann Surg*. 1987 Oct; 206 (4): 403-13.
28. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest*. 1983 Aug; 49 (2): 208-15.
29. Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov; 86 (21): 8412-6.
30. Ross R. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis*. 1981 Sep-Oct; 1 (5): 293-311.
31. Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*. 1991 Jan; 68 (1): 106-13.

32. Mitra AK, Del Core MG, Agrawal DK. Cells, cytokines and cellular immunity in the pathogenesis of fibroproliferative vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005 Aug-Sep; 83 (8-9): 701-15.
33. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 1986 Jul 18; 46 (2): 155-69.
34. Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest.* 1988 Feb; 81 (2): 487-98.
35. Chen Z, Lee FY, Bhalla KN, Wu J. Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Mol Pharmacol.* 2006 May; 69 (5): 1527-33.
36. Ahanchi SS, Tsihlis ND, Kibbe MR. The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg.* 2007 Jun; 45 Suppl A: A64-73.
37. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 1994 Sep; 75 (3): 539-45.
38. Barolet AW, Nili N, Cheema A, Robinson R, Natarajan MK, O'Blenes S, et al. Arterial elastase activity after balloon angioplasty and effects of elafin, an elastase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Aug; 21 (8): 1269-74.
39. Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. *Lab Invest.* 1986 Mar; 54 (3): 295-303.
40. Reidy MA, Clowes AW, Schwartz SM. Endothelial regeneration. V. Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab Invest.* 1983 Nov; 49 (5): 569-75.
41. Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu CB, Dong G, Woodward RN, et al. Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9; 95 (12): 6983-8.
42. Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, Gotlieb AI, Logan RA, Armstrong PW. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res.* 1994 Oct; 75 (4): 650-8.
43. Casscells W, Engler D, Willerson JT. Mechanisms of restenosis. *Tex Heart Inst J.* 1994; 21 (1): 68-77.

44. Garza L, Aude YW, Saucedo JF. Can we prevent in-stent restenosis? *Curr Opin Cardiol*. 2002 Sep; 17 (5): 518-25.
45. Lincoff AM, Topol EJ, Ellis SG. Local drug delivery for the prevention of restenosis. Fact, fancy, and future. *Circulation*. 1994 Oct; 90 (4): 2070-84.
46. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004 Sep; 4 (3): 275-87.
47. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, et al. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*. 1997 Jun 12; 336 (24): 1697-703.
48. Hafeez N. Prevention of coronary restenosis with radiation therapy: a review. *Clin Cardiol*. 2002 Jul; 25 (7): 313-22.
49. Chavan A, Luthe L, Schmuck B. [Peripheral vascular disease of iliac and femoropopliteal arteries: state-of-the-art endoluminal revascularization]. *Radiologe*. 2010 Jan; 50 (1): 16-22.
50. Perree J, van Leeuwen TG, Velema E, Borst C. Psoralen and long wavelength ultraviolet radiation as an adjuvant therapy for prevention of intimal hyperplasia and constrictive remodeling after balloon dilation: a study in the rabbit iliac artery. *Lasers Surg Med*. 1998;23 (5): 281-90.
51. Kraitzer A, Kloog Y, Zilberman M. Approaches for prevention of restenosis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 May; 85 (2): 583-603.
52. Morice MC, Serruys PW, Barragan P, Bode C, Van Es GA, Stoll HP, et al. Long-term clinical outcomes with sirolimus-eluting coronary stents: five-year results of the RAVEL trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 2; 50 (14): 1299-304.
53. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003 Oct 2; 349 (14): 1315-23.
54. Morice MC, Serruys PW, Barragan P, Bode C, Van Es GA, Stoll HP, et al. Long-term clinical outcomes with sirolimus-eluting coronary stents: five-year results of the RAVEL trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 2; 50 (14): 1299-304.
55. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17; 348 (16): 1537-45.

56. Silber S, Colombo A, Banning AP, Hauptmann K, Drzewiecki J, Grube E, et al. Final 5-year results of the TAXUS II trial: a randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for de novo coronary artery lesions. *Circulation*. 2009 Oct 13; 120 (15): 1498-504.
57. Dake MD, Ansel GM, Jaff MR, Ohki T, Saxon RR, Smouse HB, et al. Paclitaxel-eluting stents show superiority to balloon angioplasty and bare metal stents in femoropopliteal disease: twelve-month Zilver PTX randomized study results. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011 Oct 1; 4 (5): 495-504.
58. Duda SH, Bosiers M, Lammer J, Scheinert D, Zeller T, Oliva V, et al. Drug-eluting and bare nitinol stents for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery: long-term results from the SIROCCO trial. *J Endovasc Ther*. 2006 Dec; 13 (6): 701-10.
59. Barath P, Fishbein MC, Vari S, Forrester JS. Cutting balloon: a novel approach to percutaneous angioplasty. *Am J Cardiol*. 1991 Nov 1; 68 (11): 1249-52.
60. Amighi J, Schillinger M, Dick P, Schlager O, Sabeti S, Mlekusch W, et al. De novo superficial femoropopliteal artery lesions: peripheral cutting balloon angioplasty and restenosis rates--randomized controlled trial. *Radiology*. 2008 Apr; 247 (1): 267-72.
61. Tepe G, Zeller T, Albrecht T, Heller S, Schwarzwald U, Beregi JP, et al. Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14; 358 (7): 689-99.
62. Werk M, Langner S, Reinkensmeier B, Boettcher HF, Tepe G, Dietz U, et al. Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries: paclitaxel-coated versus uncoated balloon: femoral paclitaxel randomized pilot trial. *Circulation*. 2008 Sep 23; 118 (13): 1358-65.
63. Rittger H, Brachmann J, Sinha AM, Waliszewski M, Ohlow M, Brugger A, et al. A randomized, multicenter, single-blinded trial comparing paclitaxel-coated balloon angioplasty with plain balloon angioplasty in drug-eluting stent restenosis: the PEPCAD-DES study. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Apr 10; 59 (15): 1377-82.
64. Sallenave JM, Marsden MD, Ryle AP. Isolation of elafin and elastase-specific inhibitor (ESI) from bronchial secretions. Evidence of sequence homology and immunological cross-reactivity. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1992 Jan; 373 (1): 27-33.

65. Pfundt R, van Ruissen F, van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, et al. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest.* 1996 Sep 15; 98 (6): 1389-99.
66. Ghosh M, Shen Z, Fahey JV, Cu-Uvin S, Mayer K, Wira CR. Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-human immunodeficiency virus-1 molecule of the human female reproductive tract. *Immunology.* 2010 Feb; 129 (2): 207-19.
67. Meyer-Hoffert U, Wichmann N, Schwichtenberg L, White PC, Wiedow O. Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2003 Aug; 12 (4): 418-25.
68. Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, Lachmann PJ, Sallenave JM. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics. *Curr Pharm Des.* 2004; 10 (23): 2891-905.
69. Bingle CD, Vyakarnam A. Novel innate immune functions of the whey acidic protein family. *Trends Immunol.* 2008 Sep; 29 (9): 444-53.
70. Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5; 265 (25): 14791-5.
71. Wiedow O, Lüademann J, Utecht B. Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jan 15; 174 (1): 6-10.
72. Padrines M, Wolf M, Walz A, Baggiolini M. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.* 1994 Sep 26; 352 (2): 231-5.
73. Ferry G, Lonchamp M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, Tucker GC. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett.* 1997 Feb 3; 402 (2-3): 111-5.
74. Zaidi SH, You XM, Ciura S, O'Blenes S, Husain M, Rabinovitch M. Suppressed smooth muscle proliferation and inflammatory cell invasion after arterial injury in elafin-overexpressing mice. *J Clin Invest.* 2000 Jun; 105 (12): 1687-95.
75. Rabinovitch M. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am J Physiol.* 1999 Jul; 277 (1 Pt 1): L5-12.
76. Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3; 270 (9): 4689-96.

77. Cowan B, Baron O, Crack J, Coulber C, Wilson GJ, Rabinovitch M. Elafin, a serine elastase inhibitor, attenuates post-cardiac transplant coronary arteriopathy and reduces myocardial necrosis in rabbits after heterotopic cardiac transplantation. *J Clin Invest.* 1996 Jun 1; 97 (11): 2452-68.
78. Razuvaev A, Lund K, Roy J, Hedin U, Caidahl K. Noninvasive real-time imaging of intima thickness after rat carotid artery balloon injury using ultrasound biomicroscopy. *Atherosclerosis.* 2008 Aug; 199 (2): 310-6.
79. Vesselinovitch D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1988 Oct; 112 (10): 1011-7.
80. Hariri RJ, Alonso DR, Hajjar DP, Coletti D, Weksler ME. Aging and arteriosclerosis. I. Development of myointimal hyperplasia after endothelial injury. *J Exp Med.* 1986 Oct 1; 164 (4): 1171-8.
81. Murray-Lion RM. The relation between bodyweight and arterial cross-section. *J Exp Biol* 1930 7: 221-234
82. Rhee CY, Spaet TH, Stemerman MB, Lajam F, Shiang HH, Caruso E, et al. Estrogen suppression of surgically induced vascular intimal hyperplasia in rabbits. *J Lab Clin Med.* 1977 Jul; 90 (1): 77-84.
83. Selzman CH, Gaynor JS, Turner AS, Johnson SM, Horwitz LD, Whitehill TA, et al. Ovarian ablation alone promotes aortic intimal hyperplasia and accumulation of fibroblast growth factor. *Circulation.* 1998 Nov 10; 98 (19): 2049-54.
84. Selzman CH, Turner AS, Gaynor JS, Miller SA, Monnet E, Harken AH. Inhibition of intimal hyperplasia using the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Arch Surg.* 2002 Mar; 137 (3): 333-6.
85. Nyalala JO, Brown AT, Luo S, Deng H, Moursi MM. Estrogen replacement attenuates exaggerated neointimal hyperplasia following carotid endarterectomy in rats. *Vasc Endovascular Surg.* 2011 Nov; 45 (8): 720-6.
86. Gui QF, Xu ZR, Lou YM, Yang YM. [Effect of testosterone on neointimal proliferation and blood lipids after balloon-induced aorta injury in rabbits]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2008 Jul; 37 (4): 393-8.
87. Tharp DL, Masseau I, Ivey J, Ganjam VK, Bowles DK. Endogenous testosterone attenuates neointima formation after moderate coronary balloon injury in male swine. *Cardiovasc Res.* 2009 Apr 1; 82 (1): 152-60.
88. Dorsett-Martin WA, Hester RL. Sex hormones and aortic wall remodeling in an arteriovenous fistula. *Gen Med.* 2007 Jun; 4 (2): 157-69.

89. Ward MR, Kanellakis P, Ramsey D, Jennings GL, Bobik A. Response to balloon injury is vascular bed specific: a consequence of de novo vessel structure? *Atherosclerosis*. 2000 Aug; 151 (2): 407-14.
90. Gabeler EE, van Hillegersberg R, Stadius van Eps RG, Sluiter W, Gussenhoven EJ, Mulder P, et al. A comparison of balloon injury models of endovascular lesions in rat arteries. *BMC Cardiovasc Disord*. 2002 Sep 27; 2: 16.
91. Sarembock IJ, LaVeau PJ, Sigal SL, Timms I, Sussman J, Haudenschild C, et al. Influence of inflation pressure and balloon size on the development of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. A study in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*. 1989 Oct; 80 (4): 1029-40.
92. Guzman LA, Mick MJ, Arnold AM, Forudi F, Whitlow PL. Role of intimal hyperplasia and arterial remodeling after balloon angioplasty: an experimental study in the atherosclerotic rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Mar; 16 (3): 479-87.
93. Asada Y, Kisanuki A, Tsuneyoshi A, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Effects of inflation pressure of balloon catheter on vascular injuries and subsequent development of intimal hyperplasia in rabbit aorta. *Atherosclerosis*. 1996 Mar; 121 (1): 45-53.
94. Koyama J, Owa M, Sakurai S, Shimada H, Hikita H, Higashikata T, et al. Relation between vascular morphologic changes during stent implantation and the magnitude of in-stent neointimal hyperplasia. *Am J Cardiol*. 2000 Oct 1; 86 (7): 753-8
95. Doornekamp FN, Borst C, Haudenschild CC, Post MJ. Fogarty and percutaneous transluminal coronary angioplasty balloon injury induce comparable damage to the arterial wall but lead to different healing responses. *J Vasc Surg*. 1996 Nov; 24 (5): 843-50.
96. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol*. 1991 Nov; 11 (6): 565-77.
97. Gan LM, Gronros J, Hagg U, Wikstrom J, Theodoropoulos C, Friberg P, et al. Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy. *Atherosclerosis*. 2007 Feb; 190 (2): 313-20.
98. Coatney RW. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR J*. 2001; 42 (3): 233-47.

99. Bjarnegard N, Lanne T. Arterial properties along the upper arm in humans: age-related effects and the consequence of anatomical location. *J Appl Physiol*. 2010 Jan; 108 (1): 34-8.
100. Chang W, Lim S, Song H, Song BW, Kim HJ, Cha MJ, et al. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol*. 2008 Nov 12; 597 (1-3): 64-9.
101. Zhang S, Deng J, Gao Y, Yang DL, Gong QH, Huang XN. Ginsenoside Rb (1) inhibits the carotid neointimal hyperplasia induced by balloon injury in rats via suppressing the phenotype modulation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2012 Jun 15; 685 (1-3): 126-32.
102. Furst R, Zirrgiebel U, Totzke F, Zahler S, Vollmar AM, Koch E. The Crataegus extract WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR-beta. *Atherosclerosis*. 2010 Aug; 211 (2): 409-17.
103. Jahnke T, Schafer FK, Bolte H, Rector L, Schafer PJ, Brossmann J, et al. 2005 Dr. Gary J. Becker Young Investigator Award: periprocedural oral administration of the leflunomide analogue FK778 inhibits neointima formation in a double-injury rat model of restenosis. *J Vasc Interv Radiol*. 2005 Jul; 16 (7): 903-10.
104. Razuvaev A, Henderson B, Girnita L, Larsson O, Axelson M, Hedin U, et al. The cyclolignan picropodophyllin attenuates intimal hyperplasia after rat carotid balloon injury by blocking insulin-like growth factor-1 receptor signaling. *J Vasc Surg*. 2007 Jul; 46 (1): 108-15.
105. Hashiya N, Aoki M, Tachibana K, Taniyama Y, Yamasaki K, Hiraoka K, et al. Local delivery of E2F decoy oligodeoxynucleotides using ultrasound with microbubble agent (Optison) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 30; 317 (2): 508-14.
106. Waller JR, Brook NR, Bicknell GR, Murphy GJ, Nicholson ML. Mycophenolate mofetil inhibits intimal hyperplasia and attenuates the expression of genes favouring smooth muscle cell proliferation and migration. *Transplant Proc*. 2005 Jan-Feb; 37 (1): 164-6.
107. Wu J, Peng L, McMahon GA, Lawrence DA, Fay WP. Recombinant plasminogen activator inhibitor-1 inhibits intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Oct; 29 (10): 1565-70.

108. Camozzi M, Zacchigna S, Rusnati M, Coltrini D, Ramirez-Correa G, Bottazzi B, et al. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Sep; 25 (9): 1837-42.
109. Li X, Du JR, Yu Y, Bai B, Zheng XY. Tanshinone IIA inhibits smooth muscle proliferation and intimal hyperplasia in the rat carotid balloon-injured model through inhibition of MAPK signaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 2010 May 27; 129 (2): 273-9.
110. Doornekamp FN, Borst C, Post MJ. Endothelial cell recoverage and intimal hyperplasia after endothelium removal with or without smooth muscle cell necrosis in the rabbit carotid artery. *J Vasc Res.* 1996 Mar-Apr; 33 (2): 146-55.
111. Orlandi A, Marcellini M, Pesce D, Calvani M, Spagnoli LG. Propionyl-L-carnitine reduces intimal hyperplasia after injury in normocholesterolemic rabbit carotid artery by modulating proliferation and caspase 3-dependent apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2002 Jan; 160 (1): 81-9.
112. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1986 Dec; 103 (6 Pt 2): 2787-96.
113. Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y, et al. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther.* 2001 Nov; 8 (21): 1635-42.
114. Deuse T, Koyanagi T, Erben RG, Hua X, Velden J, Ikeno F, et al. Sustained inhibition of epsilon protein kinase C inhibits vascular restenosis after balloon injury and stenting. *Circulation.* 2010 Sep 14; 122 (11 Suppl): S170-8.
115. Blank RS, Owens GK. Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1990 Mar; 142 (3): 635-42.
116. Bjorkerud S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1991 Jul-Aug; 11 (4): 892-902.
117. Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK. A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18; 272 (16): 10948-56.

118. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 Jul; 84 (3): 767-801.
119. Forough R, Lea H, Starcher B, Allaire E, Clowes M, Hasenstab D, et al. Metalloproteinase blockade by local overexpression of TIMP-1 increases elastin accumulation in rat carotid artery intima. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 May; 18 (5): 803-7.
120. Shaw L, Wiedow O. Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans.* 2011 Oct; 39(5): 1450-4.

7. Anhang

7.1 Liste der Materialien

Materialien für die Tierhaltung

„Gruppenkäfig“ aus Polycarbonat	Typ 4 Polycarbonat, EBECO VTH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Gitterdeckel für „Gruppenkäfige“	Deckel Typ 4/50, EBECO VTH, Castrop-Rauxel, Deutschland
„Einzelkäfig“ aus Polycarbonat	Typ 3 PSU, EBECO VTH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Gitterdeckel für „Einzelkäfige“	Deckel Typ 3, EBECO VTH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Einstreu	LGNOCEL S 8-15, SSNIFF® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Trennblech	Typ 1-4, EBECO VTH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Tränkflasche	F50 mit konischem Hals, 500 ml Fassungsvermögen, EBECO VTH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Tiernahrung	SSNIFF® R/M- H, 10mm Pellets, nitrosearm, SSNIFF® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

Haferflocken bei postoperativem Mehrbedarf
Leitungswasser
Zellstofftücher
Nierenschalen aus gepresstem Zellstoff

Materialien für Denudationseingriff, Kleintiersonografie und Gefäßentnahme

Einmalkittel "Besucherkittel", NOBA
Verbandmittel Danz GmbH &
Co. KG, Wetter, Deutschland,
REF: 665115

OP-Haube Surgine® OP-Haube
Astronautenform, Mölnlycke
Healthcare, Erkrath,
Deutschland, REF: 42073

Mundschutz Barrier® Facemask, high
filtration, Mölnlycke Healthcare,
Erkrath, Deutschland,
REF: 428901

Waschlotion S&M® Waschlotion, Schülke &
Mayr, Norderstedt,
Deutschland, PZN-Nr.4427592

Desinfektion u. Sterilisation Sterillium® classic pure, BODE
Chemie, Hamburg,
Deutschland, REF: 975512

Einmalhandschuhe	Powder free Handschuhe Digitil® PF, Hartmann Healthcare, Hildenheim, Deutschland, REF: 942161
Flächendesinfektionsmittel	Isopropanol 70 %, 500 ml Flacon, LEYH-PHARMA GMBH,Trusetal, Deutschland, PZN 4581040
Narkotikum: Chloralhydrat 4 %	Chloralhydrat Injektionslösung Merck, Darmstadt, Deutschland
Analgesie: Tramadol	Tramal®100, Grünenthal, Aachen, Deutschland
Post-OP-Analgesie: Caprofen	Rimadyl®, Caprofen- Injektionslösung(20ml Ampulle), Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Abdecktuch	Barrier®, Mönlycke Healthcare, Erkrath, Deutschland, REF: 800430
Augensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Health Care AG, Kiel, Deutschland
Enthaarungscème	Pilca-soft® GSK Consumer Healthcare, Neuss, Deutschland
Wattestäbchen	Lilibé® Wattestäbchen Lilibé Cosmetics, DIRK ROSSMANN GmbH, Burgwedel, Deutschland

Einwegskalpell	Feather® disposable scalpel No.11, SOCOREX®, Ecublens, Schweiz
Haartrimmer	Phillips® Haartrimmer QC5015/30, Phillips®, Hamburg, Deutschland
Korkplatte	
Wärmelampe 75 Watt	
Heizmatte	
Fixierung	3M™ Durapore™ Medical Tape 3M Deutschland, Neuss, Deutschland
Chirurgische Pinzette(Hakenpinzette)	Aesculap® BD533R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Chirurgische Schere	Aesculap® BC303R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Präparierklemme	Aesculap® BJ009R B.Braun Melsungen AG, , Melsungen, Deutschland
Feine anatomische Pinzette	Aesculap® BD210R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Atraumatische Pinzette	Aesculap® FB400R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Gebogene Splitterpinzette	Aesculap® BD311R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Augenschere	Aesculap® OC496R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Gebogene Mikropinzette	Aesculap® BD333R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Arterienklemme	Aesculap® BH807 B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Gefäßclip	Aesculap® Biemer Clip FD561R B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bohrkanüle	ACUFIRM Punktionskanüle, gebogen Ernst Kratz GmbH, Dreieich, Deutschland
Kanüle, lila	BD Microlance™ 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland, REF: 304100
1 ml Spritze	BD 1 ml Syringe, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland, REF: 309628
3 ml Spritze	BD 3 ml Syringe, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland, REF: 300910

NaCl-Lösung 0,9 %	Isotone Natriumchloridlösung B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Faden zur Gefäßligatur	Prolene 3-0 Faden Ethicon®(Johnson&Johnson), Norderstedt, Deutschland
Faden zur Hautadaptation	Vicryl 6-0 Faden Ethicon®(Johnson&Johnson), Norderstedt, Deutschland
Ballonkatheter	2-french Fogarty- Arterienembolektomiekatheter, Edwards Lifesciences, Unterschleissheim, Deutschland, REF: 120602F
Elafin	Recombinant human Elafin, Proteo Biotech AG, Kiel, Deutschland
Alzet®-Pumpe	alzet® osmotic pump model 2ML1, DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
Alzet® mini osmotic pump flow moderator	DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
Alzet®-Jugularvenenkatheter	alzet® rat jugular catheter DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
Füllungskanüle zum Befüllen der Alzet®-Pumpe	
Kleintiersonografiegerät	Vevo770 VisualSonics Inc.®, Amsterdam, Niederlande

Ultraschallgel	Aquasonic® 100 Ultraschallgel, PARKER LABORATORIES INC., Fairfield, New Jersey, USA
Rattenplattform	Rat handling plattform II, SA1- 1550; VisualSonics Inc.®, Amsterdam, Niederlande
Kontrolleinheit für physiologische Parameter	Physiology controller unit VisualSonics Inc.®, Amsterdam, Niederlande

Materialien für die histologische Aufbereitung und Färbung der Gefäßpräparate

Formaldehyd 10 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland
Kanüle, lila	BD Microlance™ 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland, REF: 304100
Korkplatte, zurechtgeschnitten	
Tusche, gelb	
Tusche, blau	
Gewebeinfiltrationsautomat	Einbettstrasse, LEICA TP1020, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
Aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol	Zunehmende Konzentration des Alkohol- Aqua dest.

	Gemisches (70-100 %), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland
Paraffin-Wachs	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland
Wärmebad	Streckbecken mit vollentsalztem oder destilliertem Wasser
Einbettkapseln/- kassetten	LEICA IP ActivFlo™, Surgipath Biopsy I Cassettes, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
Ausgußstation	Paraffinspender, LEICA EG1120, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte	LEICA EG1130, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	HN 40, Reichert Jung, Heidelberg, Deutschland/ Wien, Österreich
Objektträger, Glas	Snowcoat® Clipped Corner Slide, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland

Abdeckglas	Premier coverglass, Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
Absteigende Alkoholreihe	Ethanol/ Aqua dest. Gemisch 100 %- 70 %
Aqua dest.	Destilliertes Wasser, Baxter S.A., Unterschleissheim, Deutschland
Salzsäure HCL ("rauchend")	37 %, 12 mol/l HCl in Aqua dest., Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin- Stammlösung	17 g Eosin + 1000 ml Ethanol 96 % + 1 ml konzentrierte Essigsäure KiGaA , gelblich (C.I. 45380), Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Fa Waldeck GmbH & Co KG/ Division Chroma, Münster, Deutschland
Eindeckel- Medium EUKITT®	O. Kindler GmbH und Co, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Silbernitrat krist. reinst. 5 %	(50 g), 10 g Silbernitrat auf 200 ml Aqua dest., Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrochinon 1 %	2 g Hydrochinon auf 200 ml Aqua dest., Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumsulfit 5 %	(50 g), 10 g auf 200 ml Aqua dest., Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat 5 %	(500 g), 10 g auf 200 ml Aqua dest., Merck, Darmstadt, Deutschland
Resorzin- Fuchsin nach Weigert- Lösung	500 ml, X877.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Weigerts Eisenhämatoxylin Kit- Lösung	2x 500 ml Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau- Säurefuchsin- Azophloxin	500 ml, (40 ml+ Azophloxin Sigma + 2 Tropfen Eisessig + 140 ml Aqua dest.), Goldner- Lösung I, Dr. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Azophloxin- Lösung	25 g, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 1 %	4 ml Eisessig auf 400 ml Aqua dest.
Orange G Lösung	500 ml, Goldner- Lösung III (Phosphorwolframsäure- Orange G), Dr. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Neonleuchte	
Lichtgrün SF gelblich Fluka	25 g, 0,5 % Lichtgrün in 0,2 % Essigsäure, Dr. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland

Materialien für die immunhistologische Aufbereitung und Färbung der Gefäßpräparate

Demaskierungslösungen und Puffer

Bond-Enzym-Demaskierungslösung	7 ml Bond Enzym Diluent 1 Tropfen Bond Enzym Konzentrat
Citratpuffer (pH 6,0)	18 ml Stock Solution A(0,1 M Zitronensäure) 82 ml Stock Solution B(0,1 M Natriumcitrat) 900 ml Aqua dest.
Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0)	10 mmol/l Tris-Puffer 1mmol/l EDTA 1000 ml Aqua dest.
TBS-Puffer nach D.A. Müller HL	12,1 g Tris 87,8 g NaCl 1 l Aqua dest. pH 7,4-7,6 mit 5M HCL einstellen

Primärantikörper

Anti-Caspase-3	Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA 01923, USA
----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anti-Ki-67	Ki-67(Rabbit monoclonal) SP6, Lab Vision Corporation, Fremont, CA 94538-6406, USA
Anti-ICAM-1	Anti-rat ICAM-1 Antibody (AF583), R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, OX14 3NB, UK
Anti-SMA	SMA (mouse monoclonal against rat)
RECA-1	Mouse monoclonal [RECA-1] to endothelial Cell (ab9774), Abcam PLC, Cambridge, MA 02139-1517, USA
ED-1	CD68(ED-1): sc-59103 mouse monoclonal against rat, Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, California 95060, USA

Sekundärantikörper, XR-Faktor und Verdünnungsmedien

HRP Polymer anti-Rabbit	ZytoChem Plus HRP Polymer anti-Rabbit, ZYTOMED Systems GmbH, 14163 Berlin, REF: ZUC032-006
HRP Polymer anti-Mouse	ZytochemChem Plus HRP Polymer anti-Mouse, ZYTOMED Systems GmbH, 14163 Berlin, REF: ZUC032- 100
Goat-HRP Polymer	Goat HRP-Polymer Kit against Mouse, Rat and Human Tissues, BIOCARE MEDICAL,

LLC., Concord, Ca 94920, USA
Control number: 902-GHP516-
111210

XR-Faktor

XR-Factor Blocking reagent,
ZYTOMED Systems GmbH,
14163 Berlin, Control number:
902-XRF964-010611

Antibody-Diluent

Dako REAL™ Antibody Diluent
S3022, Dako Denmark A/S,
2600 Glostrup, Dänemark

Blocking-Solutions

Peroxidase-Block

Dako REAL™ Peroxidase-
Blocking Solution, Dako
Denmark A/S, 2600 Glostrup,
Dänemark

Rodent Block

Rodent Block R, Blocking
reagent, ZYTOMED Systems
GmbH, 14163 Berlin, Control
number: 902-RBR962-020108

7.2 Abstract

Hochfrequenzultraschall gesteuerte Denudierung der A. iliaca der Ratte: ein neues Tiermodell zur Induktion und zum in vivo Monitoring der Intimahyperplasie in einem peripheren Gefäss

J Trentmann, C Heneweer, N Budach, N Brüske, PJ Schäfer, N Charalambous, T Hümme, T Jahnke, M Heller

Ziel: Etablierung eines alternativen Tiermodells, welches die gezielte Denudierung eines peripheren Gefässabschnittes und die in vivo Verlaufskontrolle der Intimahyperplasie mittels Kleintierultraschall zulässt.

Material und Methoden: In 7 männlichen Wistar Ratten (250-300 g) wurde ein 2F Fogarty Katheter (Johnson&Johnson) via linker A. carotis in die Aorta abdominalis vorgebracht und anschliessend ultraschallgesteuert (Vevo 770, Visualsonics, Toronto) in die rechte A. iliaca gelenkt. Die Balloninfaltung wurde unter Sicht durchgeführt, bis eine Dissektion des Gefässabschnitts dokumentiert werden konnte. An Tag 14 erfolgte die in vivo Messung der Intima-Media-Dicke (IMD) mittels Hochfrequenzultraschall. Die nicht behandelte Gegenseite fungierte als Kontrolle.

Ergebnisse: Die sonographisch gesteuerte Denudierung der A. iliaca ist problemlos durchzuführen. Der Gefässabschnitt ist einer sonographischen Verlaufskontrolle leicht zugänglich. Die sonographisch ermittelte Zunahme der IMD entsprach nach 14 Tagen 0,054 mm (Stabw 0,01 mm) und war im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant (-0,0049, Stabw 0,0069 mm), $p < 0,0001$.

Schlussfolgerung: Mit dem hier vorgestellten neuen Denudierungsmodell ist die gezielte Induktion und das in vivo Monitoring der Intimahyperplasie in einem peripheren Gefässabschnitt möglich. Aufgrund der Entfernung zum OP- Gebiet kann

auf eine Sham-Gruppe verzichtet werden und die Anzahl der Versuchstiere deutlich gesenkt werden. Weiterhin können frühe pathologische Veränderungen differenziert von postoperativen Veränderungen untersucht werden, was insbesondere im Hinblick auf die in vivo Bildgebung zu frühen Zeitpunkten nach OP einen Vorteil zum Standardverfahren darstellt. Darüberhinaus entspricht die anatomische Region derjenigen, die für pAVK-Modelle geeigneter zu sein scheint als die A. carotis.

7.3 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mir das Schreiben dieser Dissertation ermöglicht und mich auf dem Weg dorthin unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank meinen Doktorvater, Prof. Dr. med. Martin Heller, der mich als Doktoranden übernommen hat. Ein großer Dank geht auch an die Arbeitsgruppe um Dr. med. Jens Trentmann - Frau Nadja Brüske und Dr. med. Jens Trentmann - die mich beim Durchführen des experimentellen Teiles der Arbeit begleitet haben und mir stets mit viel Engagement zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. med. Carola Heneweer bedanken, die die Betreuung dieses Projekts in der letzten Phase übernommen hat und mir dabei mit viel Fachwissen das wissenschaftliche Arbeiten nahegebracht hat und sich trotz vieler anderer Verpflichtungen stets die Zeit nahm, meine Fragen zu beantworten, mich bei der statistischen Auswertung zu unterstützen und meine Arbeit zu korrigieren.

Ein besonderer Dank gilt unserer MTA, Frau Gabriele Trompke, die die histologischen und immunhistochemischen Präparate angefertigt hat. Ohne die Geduld, den Einsatz und das Fachwissen von Frau Trompke wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch PD Dr. Jan-Hinrich Bräsen danken, der mich bei der Be- und Auswertung der histologischen Präparate stets unterstützt und uns die notwendige Infrastruktur zu Verfügung gestellt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei unseren Tierpflegerinnen, die sich stets mit Hingabe und Fachkenntnissen um das Wohl der Wistar-Ratten gekümmert haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff bedanken, der uns freundlicherweise die Arbeitsräume seiner Einrichtung zur Verfügung gestellt hat.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Freundin, die mir mit Ratschlägen, Korrekturlesen und anderen Hilfestellungen sehr geholfen haben.

7.4 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Nils Markus Budach
Wohnort	Drakestraße 8a 12205 Berlin
Geburtstag und – ort	19.01.1985 in Essen
Eltern	Prof. Dr. med. Volker Budach Facharzt für Strahlentherapie Gabriele Budach MTRA
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1991-1995	Grundschule
1995-2004	Internatsgymnasium Schloß Plön Abitur, Numerus clausus: 1,5
Fremdsprachen	Englisch, Latein und Grundkenntnisse Französisch

Denudationsmodell der Arteria iliaca der
Ratte