Universitätklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. V. Hombach

Zellkinetische und morphologische Veränderungen in Media und Adventitia in der Frühphase nach Brachytherapie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 im Vergleich zur alleinigen Ballonangioplastie am Kaninchenmodell

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Nils Ploetz
aus St.Georgen im Schwarzwald

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Hanke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kratzer

Tag der Promotion: 20.05.2010

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 3

2.1 Versuchstiere und Haltung 3

2.2 Strahlungsquelle und Dosimetrie 3

2.3 Versuchsgruppeneinteilung 4

2.4 Operatives Vorgehen bei der Ballonangioplastie 5

2.5 Entnahme der Gefäße 7

2.6 Fixierung und Präparation der Gefäße 7

2.7 Histologische und immunhistologische Aufarbeitung 8

2.7.1 Herstellung von Semidünnschnitten 8

2.7.2 Hämalaun-Eosin-Färbung 8

2.7.3 Elastika-van-Gieson-Färbung 8

2.7.4 Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode 9

2.7.5 Proliferationsnachweis mit Ki-67-Antikörper 12

2.8 Auswertung der histologischen Präparate 15

2.8.1 Morphologische Auswertung 15

2.8.2 Morphometrische Auswertung 15

2.8.3 Auswertung der TUNEL-Methode 16

2.8.4 Auswertung der Ki-67-Methode 16

2.9 Statistik 17

3. Ergebnisse 18

3.1 Kontrollgruppe 18

3.1.1 Histologisch-morphologische Auswertung 18

3.1.2 Morphometrische Auswertung 18

3.1.3 Auswertung der TUNEL-Methode 19

3.1.4 Auswertung der Ki-67-Methode 19

3.2 Bestrahlungsgruppe 20

3.2.1 Histologisch-morphologische Auswertung 20

3.2.2 Morphometrische Auswertung 20

3.2.3 Auswertung der TUNEL-Methode 20

3.2.4 Auswertung der Ki-67-Methode 21

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 21
3.3.1 Histologisch-morphologische Beobachtung 21
3.3.2 Morphometrische Beobachtung 24
3.3.3 Beobachtung zur TUNEL-Methode 26
3.3.4 Beobachtung zur Ki-67-Methode 29
4. Diskussion 32
4.1 Methodenkritik 32
4.1.1 Tiermodell und Studiendesign 32
4.1.2 Intervention und thrombotische Komplikationen 33
4.2 Morphometrische Ergebnisse und Zellkinetik in Media und Adventitia 35
4.3 Schlussfolgerung 39
5.Zusammenfassung 42
6. Literaturverzeichnis 44
Danksagung 71

Abkürzungsverzeichnis

AES	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DES	drug eluting stent
DUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
EvG	Elastika-van-Gieson
Fc	Fragment crystaline
Gbq	Gigabequerelle
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
kDa	Kilodalton
KeV	kiloelektronen-Volt
KG	Körpergewicht
M-CSF	mononuclear phagozyte colony-stimulating factor
MeV	Megaelektronen-Volt
PBS	Phosphat buffered saline
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
TBS	Tris-Base
TdT	Terminale desoxynukletidyl Transferase
TLD	Thermoluminiszenz-Dosimetrie
TUNEL	TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling

1. Einleitung

Die Einführung der perkutanen transluminalen Coronarangioplastie (PTCA) im Jahre 1978 durch A. Grüntzig war ein Durchbruch in der Behandlung der koronaren Gefäßerkrankung und ist bis heute unter Verwendung von Stents Methode der Wahl bei einem akuten Koronarereignis. Durch stetige technische Verbesserungen und steigender Erfahrung konnte die primäre Erfolgsrate bei einfachen Stenosen auf deutlich über 90% gesteigert werden, bei komplexen Stenosen bis 90% [18, 70, 92, 135, 152]. Trotz der sehr hohen primären Erfolgsraten, ist die PTCA mit zwei schwerwiegenden Komplikationen behaftet. Zum einen stellt ein akuter Gefäßverschluss innerhalb der ersten Wochen mit ca. 1 – 2 % ein deutliches Risiko dar, meist bedingt durch eine In-Stent-Thrombose [112, 142]. Dabei sind die folgenden Komplikationen mit Auftreten eines Myokardinfarktes mit hoher Mortalität behaftet. Zum anderen kommt es bei 10 – 20 % der interventionell behandelten Gefäßstenosen innerhalb der ersten 6 Monate zu Restenosen [103, 146], definiert als Reduktion des Gefäßdurchmessers am dilatierten Areal von 50% oder mehr in der Kontrollangiographie. Die Pathogenese der Restenose ist ein komplexes Zusammenspiel zellbiologischer Abläufe wie Thrombozytenaktivierung und -aggregation, Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren, Überproduktion extrazellulärer Matrix, Recoil der Gefäßwand und Vasospasmen, sowie Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, und scheint die biologische Folge der Gefäßwandverletzungen zu sein, die nach der Durchführung einer perkutanen Intervention entstehen [11, 22, 45, 88, 89, 123, 125, 132, 134]. Nach 6 Monaten ist die Wahrscheinlichkeit einer Restenose sehr gering und basiert auf dem Fortschreiten der artheriosklerotischen Gefäßwandveränderungen [51]. Die Pathogenese der Restenose nach Stentimplantation ist jedoch different im Vergleich zur Restenose nach PTCA [102]. Die ausgeprägte intimale Hyperplasie, die sich nach Entstehung einer Neointima über den implantierten Stent ausbildet, entsteht in erster Linie durch exzessive Proliferation glatter Muskelzellen [50, 77, 106, 170].

Verschiedene Methoden zur Behandlung der Restenose und In-Stent-Restenose wurden angewendet [97, 98], wie die erneute Angioplastie [95], Excimer-Laser-Angioplastie [12, 55, 78, 96], das erneute Implantieren eines Stent [97], der

Cutting-Ballon [1, 3, 23], die direkte Atherektomie [110, 126], die Rotablation [40, 137] und die Brachytherapie [14, 121], sowie zuletzt die Medikamenten freisetzenden Stents [107, 113], die sich im Alltag schließlich durchgesetzt haben.
Vor der Entwicklung der Medikamenten freisetzenden Stents war die Brachytherapie mit einem γ- oder β- Strahler das am meisten Erfolg versprechende Verfahren zur Reduktion der Restenose, v.a. der In-Stent-Restenose [66, 80, 98]. In verschiedenen experimentellen [154, 156, 157, 159, 162, 163] und klinischen Studien [26, 63, 74, 148, 158] konnte nachgewiesen werden, dass die postinterventionelle Brachytherapie zu einer Reduktion der Restenoserate nach Ballonangioplastie führt. Die genauen Mechanismen, die zu der Reduktion der Restenose führen scheinen sehr komplex zu sein und sind noch nicht genau verstanden [16, 33, 39, 153].
In einer früheren Studie wurde nach einer Dosisfindung am Kaninchenmodell [166] eine signifikante Hemmung der neointimalen Proliferation 4 Wochen nach der postinterventionellen Brachytherapie mit dem β-Strahler Rhenium-188 beobachtet. Weitere Untersuchungen am Kaninchenmodell zeigten Zellverluste in Media und Adventita sowie Proliferationshemmung schon 7 Tage nach Intervention. Ziel dieser Arbeit ist es, die Zellkinetik in Media und Adventita in der Frühphase 2, 3, 6, 12, 24 und 72 Stunden nach Brachytherapie am Kaninchenmodell zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden 87 männliche Neuseeland- Albino- Kaninchen (Firma Harlan, Deutschland) verwendet. Das Ausgangsgewicht betrug 2,89 kg ± 0,39 kg. Die Tiere wurden während des gesamten Versuchszeitraumes in Einzeltierhaltung gehalten und mit einer handelsüblichen 0,2 prozenteigen Cholesterindiät (Firma Altromin, Deutschland) gefüttert.

2.2. Strahlungsquelle und Dosimetrie

Als Strahlungsquelle wurde der flüssige β-Strahler Rhenium-188 verwendet, der aus einem Wolfram-188/ Rhenium-188-Generator mit Kochsalzlösung eluiert wurde. Durch Anionenaustauschersäulen wurde die spezifische Aktivität auf 3,7 Gbq/ ml erhöht. Die maximale β-Partikelenergie betrug 2,12 MeV, die mittlere β-Partikelenergie 764 keV. Rhenium-188 hat eine Halbwertszeit von 17 Stunden und besitzt neben der β-Strahlung einen 15 % Anteil an γ-Strahlung (155 keV). Die hochenergetische β-Strahlung, der geringe Anteil an γ-Partikel und die Halbwertszeit von 17 Stunden erlaubt die therapeutische Anwendung von Rhenium-188 in der Brachytherapie.

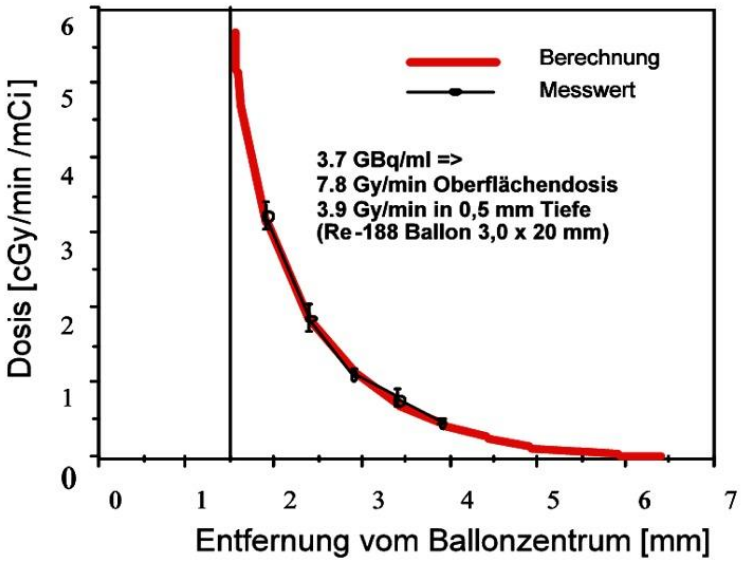


Abbildung 1: *Graphische Darstellung der Strahlendosisreduktion des β-Strahlers Rhenium-188 in Abhängigkeit zur Strahlenquellendistanz (Ballonkatheter 3,0 x 20 mm), Messung durch die Thermoluminiszenz-Dosimetrie (TLD) mit Standardabweichung*

Die Strahlendosis, die von einem mit Rhenium-188 gefülltem Ballonkatheter ausgeht, wurde mittels Thermoluminiszenz-Dosimetrie bestimmt [81]. Dabei wurde in einer Distanz von 0,5 mm von der Ballonkatheteroberfläche, entsprechend 2,0 mm vom Ballonkatheterzentrum, eine Abnahme der Strahlendosis um 50 % gemessen (Abb. 1). Bei einer spezifischen Aktivität von 3,7 GBq/ ml ließ sich bei Anwendung eines herkömmlichen Ballonkatheters (3,0 mm x 20 mm, 135 µl) an dessen Oberfläche eine Strahlendosis von 7,8 Gy/ min erzielen. Um die gewünschte Gesamtdosis von 60 Gy an dem Gefäßendothel zu erreichen, waren Katheterliegezeiten von maximal 8 Minuten nötig.

2.3. Versuchsgruppeneinteilung

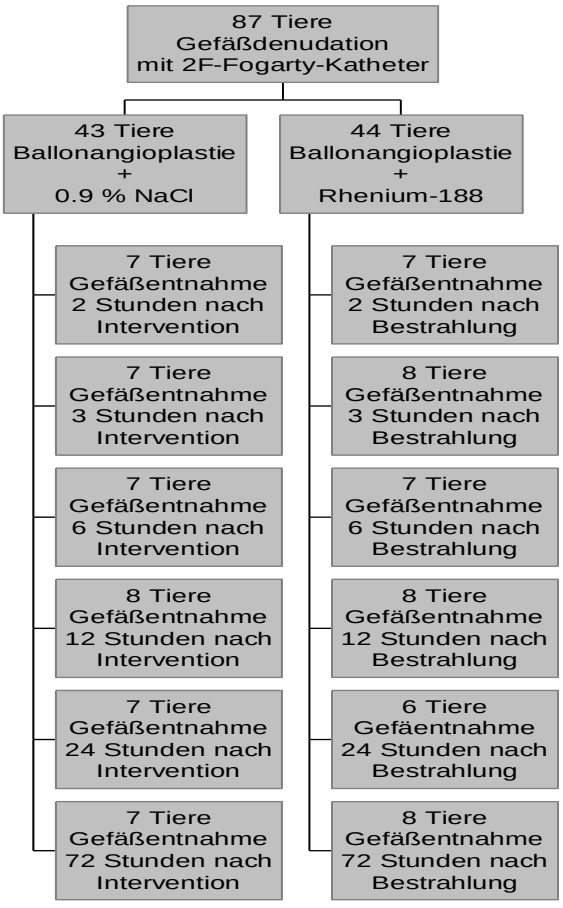


Abbildung 2: *Studiendesign. Bei 87 Neuseeland-Kaninchen Denudation der Arteria carotis communis rechts und Ballonangioplastie, in der Kontrollgruppe Füllung des Ballonkatheters mit Natriumchlorid, in der Bestrahlungsgruppe mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 mit einer Zieldosis von 60 Gy. Entnahme der Gefäße nach 2, 3, 6, 12, 24 und 72 Stunden*

Die insgesamt 87 Tiere wurden zufällig den Untersuchungszeiträumen 2 Stunden, 3 Stunden, 6 Stunden, 12 Stunden, 1 Tag, 3 Tage und der Bestrahlungs- oder der Kontrollgruppe zugeteilt (Abb. 2). Die Tiere wurden nach der Ballonangioplastie der rechten Arteria carotis communis dem Untersuchungszeitraum entsprechend abgetötet und die Gefäße entnommen.

2.4. Operatives Vorgehen bei der Ballonangioplastie

Voruntersuchungen konnten zeigen, dass eine Operation in Form der Arteriotomie der Arteria carotis communis ohne anschließende Intervention keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Thromben oder auf das Proliferationsverhalten der Gefäßwand hat [58].

Die Narkose der Tiere wurden über einen Venenverweilkatheter in der Ohrvene mit 15 mg Ketamin/ kg KG und 0.8 mg Xylazin/ kg KG geführt. Das Operationsareal wurde anschließend gründlich rasiert und desinfiziert. Danach erfolgte die sterile Abdeckung der Tiere. Es wurde ein Hautschnitt auf der ventralen Halsseite in Medianlinie auf einer Länge von 3 – 5 cm durchgeführt. Nach der Spaltung der Fascia cervicalils superficialis wurde entlang des rechten Musculus sternocleidomastoideus bis zur Unterzungenbeinmuskulatur präpariert und die rechte Arteria carotis communis auf einer Länge von 2 – 3 cm dargestellt. Nun wurden zwei Gefäßklemmen zur Unterbrechung des Blutflusses im Abstand von ca.1,5 cm am Gefäß platziert.

Die nachfolgenden Operationsschritte bis zur Gefäßnaht wurden unter Verwendung eines Operationsmikroskops durchgeführt (Firma Leica-Jung, Deutschland). Mit einer Mikroschere erfolgte zwischen den beiden Gefäßklemmen eine ca. 1,0 mm lange transversale Inzision an der A. carotis communis. Die kraniale Gefäßklemme wurde entfernt und ein 2F-Fogarty-Katheter (Firma Edwards Lifesciences, USA) über die Inzision in das Gefäß nach kranial 4 - 5 cm vorgeschoben. Nun erfolgte die Füllung des Ballons unter manuellem Druck. Der gefüllte Ballon wurde bis kurz vor die Inzision zurückgezogen, sodass die A. carotis communis auf einer Länge von 4 - 5 cm kranial der Inzision denudiert wurde. Diese Prozedur wurde pro Tier dreimal durchgeführt. Der 2F-Fogarty-Katheter wurde im entfüllten Zustand aus dem Gefäß entfernt und anschließend der Ballonkatheters (Firma Cordis Europa, Niederlande) im Gefäß so platziert, dass der Ballon in der Mitte des Denudationsareals kranial der Inzision zu liegen

kam. Nun erfolgte die Füllung des Ballons unter manuellem Druck entweder mit herkömmlicher 0,9 % Kochsalzlösung oder mit flüssigem Rhenium- 188. Bei der Verwendung der Kochsalzlösung wurde ein gewöhnliches System bestehend aus einer 10 ml Spritze und einem 3-Wege-Hahn verwendet. Bei der Anwendung von Rhenium 188 wurde eine mit Plexiglas ummantelte Spritze eingesetzt, um die β-Strahlung gegenüber dem Operateur abzuschirmen (Abb. 3).

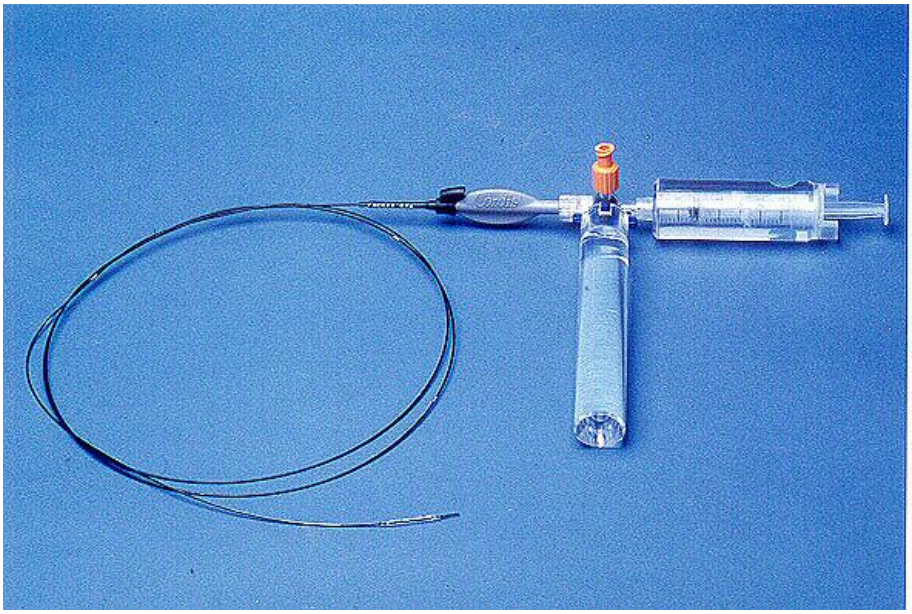


Abbildung 3: *10 ml-Spritze mit Plexiglasummantelung zur Abschirmung des β-Strahlers Rhenium-188, 3-Wege-Hahn und Ballonkatheter (3,0 mm x 20 mm) zur intraluminalen Anwendung im Zuge einer Ballonangioplastie.*

Die für die gewünschte Oberflächendosis von 60 Gy nötigen Katheterliegezeiten wurden vor der Platzierung des Ballonkatheters berechnet und betrugen 417,5 Sekunden ± 42,6 Sekunden. Die Katheterliegezeiten bei Kochsalzverwendung wurde denen der Bestrahlungsgruppe angepasst. Nach der entsprechenden Zeit wurde der Ballonkatheter geleert, vorsichtig aus dem Gefäß entfernt und anschließend die Gefäßklemme wieder an das Gefäß gesetzt. Die Inzision der A. carotis communis wurde mit 2 - 3 Einzelkopfnähten Prolene 7/0 (Firma Ethicon, Johnson&Johnson, Deutschland) verschlossen. Nach dem Entfernen der beiden Gefäßklemmen wurde der Verschluss der Inzision durch die Gefäßnaht und die Durchgängigkeit der A. carotis communis überprüft. Zuletzt erfolgte der schichtweise Wundverschluss des Halses mit Adaptation der Wundränder. Die Fascia cervicalis supervicialis wurde mit einer fortlaufenden Naht Vicryl 3/0 (Firma

Ethicon, Johnson&Johnson, Deutschland), die Haut in Einzelkopfnaht Vicryl 2/0 (Firma Ethicon, Johnson&Johnson, Deutschland) verschlossen.
Während der gesamten Operation wurden freiliegende Weichteile mit 0,9 % Kochsalzlösung regelmäßig befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Postoperativ wurden die Tiere bis zum Erwachen aus der Narkose sorgfältig überwacht.

2.5. Entnahme der Gefäße

Nach Ablauf des entsprechenden Untersuchungszeitraumes wurde eine Narkose wie unter 2.4. beschrieben vorgenommen. Es wurde ein Hautschnitt vom Operationsareal über das Sternum bis zum Processus xyphoideus in der Medianlinie durchgeführt. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax mit der Longitudinal-Spaltung des Sternums. Nach Abklemmung der Pulmonalgefäße wurde mit einer großlumigen Kanüle der linke Ventrikel punktiert. Über diesen Zugang wurde das arterielle Gefäßsystem mit 0,5 Liter neutral-gepufferter 2 %-Formalinlösung (Hausapotheke) perfusionsfixiert. Im Anschluss daran erfolgte die Präparation, wie unter 2.4. beschrieben, und Entnahme der linken und rechten A. carotis communis. Die rechte A. carotis communis wurde mit der Gefäßnaht auf einer Länge von ca. 6 cm entnommen, die linke A. carotis communis auf einer Länge von 3 - 4 cm. Die linke A. carotis communis diente jeweils zur Gewinnung von Referenzdaten unbehandelter Gefäße.

2.6. Fixierung und Präparation der Gefäße

Die entnommenen Gefäßpräparate wurden sofort nach der Entnahme in 2 % Formalinlösung für 24 - 48 Stunden immersionsfixiert.
Danach erfolgte die sorgfältige Präparation der Gefäße. Diese wurden von umgebenden Binde- und Fettgewebe befreit. Im Anschluß an die Präparation der A. carotis communis wurde diese in 7 Segmente unterteilt, jeder Zylinder mit einer Länge von ca. 5 mm. Der erste Zylinder beinhaltete die Gefäßnaht, die weiteren 6 Zylinder die Region proximal des Ballons, das Ballon-Areal und das Gebiet kurz danach. Alle Gefäß-Segmente verblieben bis zur Einbettung in Paraffin in Biopsie-Kassetten immersionsfixiert.

2.7. Histologische und immunhistochemische Aufarbeitung

2.7.1. Herstellung von Semidünnschnitten

Die immersionsfixierten Gefäßzylinder wurden innerhalb der nächsten 24 Stunden in Paraffin gebettet, um Einflüsse des Formalins auf nachfolgende immunhistochemische Untersuchungen nach zu langer Fixierung vorzubeugen. Die Präparate wurden dazu in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, anschließend in einem Vakuum-Infiltrationsprozessor (Tissue-Tek III, Bayer Diagnostik, Ludwigshafen, Deutschland) in Paraffin überführt und schließlich in Parafinblöcke eingebettet. Danach erfolgte mit einem Microtom (Firma Leica-Jung, RM 2045, Deutschland) die Anfertigung von transversalen 4 µm Semidünnschnitten, die auf handelsübliche Objektträger aufgezogen wurden.

2.7.2. Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämalaun-Eosin-Färbung diente der morphologischen Beurteilung und der Bestimmung der Zellzahl in Media und Adventitia der Gefäßwände.

Nach einer 20 Minuten andauernden Entparaffinierung in Xylol (Firma Merck, Ulm, Deutschland) wurden die Gefäßpräparate in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % → 96 % → 70 %) über 30 Minuten hydriert und anschließend in vollentsalztem Wasser gespült. Danach erfolgte die Färbung mit Hämalaun (Firma Chroma, Köngen, Deutschland) für 10 Minuten. Nach einer erneuten Spülung in vollentsalztem Wasser erfolgte für 10 Minuten in Leitungswasser der pH-Umschlag. Einer weiteren Spülung in vollentsalztem Wasser folgte die kurze Färbung in Eosin (Firma Chroma, Köngen, Deutschland). In direktem Anschluss an die Eosin-Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich mit Vitroclud (Firma Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckelt. Der basische Farbstoff Hämalaun färbt das Chromatin bläulich, das acide Eosin das Zytoplasma und die Interzellularsubstanz rötlich an.

2.7.3. Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG-Färbung)

Durch die Elastica-van-Gieson-Färbung lassen sich die verschiedenen Schichten einer Gefäßwand morphologisch beurteilen.

Wie bei der H.E.-Färbung wurden die Schnitte in Xylol 20 Minuten lang entparaffiniert und über eine 25 Minuten andauernde absteigende Alkoholreihe (100 % → 96 % → 80 %) hydriert. Die Präparate wurden im Anschluss an die

Hydratation 30 Minuten mit Resorcin-Fuchsin gefärbt und in 80 % Alkohol und vollentsalztem Wasser gespült. Nun erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin nach Weigert (Eisen-Hämatoxylin A und Eisen-Hämatoxylin B im Verhältnis 2:1, Firma Chroma) für 10 Minuten und die anschließende Spülung in HCl-Alkohol (12 ml 25 % HCl und 1 Liter 70 % Alkohol). Nach dem 10 minütigem pH-Umschlag in Leitungswasser wurden die Schnittpräparate für 2 Minuten in der van-Gieson-Lösung (Firma Chroma) gehalten. Schließlich wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (96 % → 100 %) wieder entwässert und mit Vitruclud auf den Objektträgern eingedeckelt.
Durch die Elastika-van-Gieson-Färbung können elastische Fasern braun-schwarz angefärbt werden, so dass sich Strukturen wie die Lamina elastica interna und Lamina elastica externa darstellen lassen und morphometrisch ausgewertet werden können. Kollagenfasern wurden durch das Resorcin-Fuchsin rot, Zellkerne durch das Hämatoxylin blau gegengefärbt.

2.7.4. Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode

Mit der von Gavrieli et al. vorgestellten TUNEL Methode (TDT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling) steht ein in situ Nachweisverfahren für apoptotische Zellen zur Verfügung [41].

2.7.4.1. Grundlagen der TUNEL-Methode

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, stellt eine Art des Zelltodes dar. Der Selbstmord-Mechanismus ist in jeder Zelle genetisch codiert und spielt bei vielen verschiedenen physiologischen Vorgängen eine essentielle Rolle, wie bei der Maturation, bei der Bildung des Immunsystems oder bei der Entwicklung des Nervensystems. Die Apoptose lässt sich von der Nekrose morphologisch, biochemisch und molekular unterscheiden. Schon bevor morphologische Veränderung am Zellkern und am Nukleolus sichtbar werden, treten in frühen Stadien der Apoptose ausgeprägte molekulare Ereignisse wie die prälytische DNA-Fragmentierung auf. Dabei wird die DNA durch endogene Calcium- und Magnesium-abhängige Endonukleasen in oligonukleosomale DNA-Fragmente geschnitten [4, 83]. Es wurden verschiedene Methoden beschrieben, die diesen zentralen Vorgang des programmierten Zelltodes nutzten, um apoptotische Zellen

nachzuweisen [2, 19, 29]. Der in situ Nachweis der Apoptose an einzelnen Zellen oder an Zellkulturen war jedoch mit diesen Methoden nicht möglich.
Mit der TUNEL-Färbung stellte Gavrieli et al. eine Methode vor, mit der apoptotische Zellen in Gewebeschnitten und in Zellkulturen nachweisbar waren [41]. Die DNA-Fragmentierung durch die Endonucleasen stellt ein zentrales und spezifisches Ereignis der Apoptose dar [4] und wird bei der Methode nach Gavrieli et al. als Nachweis genutzt. Das modifizierte Nucleotid Fluorescein-dUTP markiert mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) freie 3'OH-Enden der DNA-Fragmente (nick end labeling). An das Fluorescein bindet sich in einem zweiten Inkubationschritt ein Anti-Fluorescein-Antikörper, der mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Diese reagiert als Elektronendonator mit dem Substrat Fast Red, welches schließlich in einer Farbreaktion Zellkerne mit freien 3'OH-Enden rot markiert.

2.7.4.2. Durchführung der TUNEL-Methode

Um keine falschpositiven Ergebnisse durch die Wirkungen fremder Proteinasen und DNAsen zu erhalten, wurden alle Gefäße und Instrumentarien vor der Anwendung für 6 Stunden bei 190 °C sterilisiert. Außerdem wurde für die Waschvorgänge steriles destiliertes Wasser verwendet (Firma Böhringer-Ingelheim, Deutschland)
Nach der Entparaffinierung in Xylol für 20 Minuten und der 30 Minuten dauernden Hydratation durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % → 96 % → 70 %) wurden die Präparate in destilliertem Wasser gespült. Es erfolgte eine Inkubation mit Proteinase K (Firma Promega, Madison, USA) in einer Konzentration von 30 µg/ ml destiliertem Wasser für 10 Minuten bei 37 °C, um die Zellkerne von Proteinen zu trennen. Anschließend wurden die Schnitte erneut in destiliertem Wasser gespült. Eine Positivkontrolle wurde für 10 Minuten mit DNAse-I (Firma Sigma, Deutschland) in einer Konzentration von 0,8 µg/ µl DN-Puffer bei 37 °C inkubiert und danach sorgfältig in einem separatem Gefäß mit destiliertem Wasser gespült. Nun wurde das TUNEL-Reaktionsgemisch (In situ cell death detection AP, Firma Roche, Mannheim, Deutschland) hergestellt und jeder Schnitt mit 50 µl dieses Gemisches für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Erneutem Waschen in destilliertem Wasser und TBS-Puffer folgte für die spätere Farbreaktion die Ankopplung der Alkalischen Phosphatase für 30 Minuten bei 37 °C. Nach

nochmaligem Waschen in TBS-Puffer wurden die Schnittpräparate schließlich bei 37 °C kurz mit Fast-Red-Komplex inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Präparate in TBS-Puffer beendet. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (Mayers Hämalaun, Firma Chroma, Deutschland) und die Einbettung in Kaiser`s Glyceringelatine (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland).

In jedem Färbedurchgang wurde mindestens eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, um die korrekte Durchführung überprüfen zu können. Als Negativ-Kontrolle verwendeten wir Kaninchendarmpräparate, die nur mit 50 µl Fluorescein-dUTP ohne Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TDT) inkubiert wurden. So konnte in jedem Färbegang eine Kreuzreaktion des Farbstoffes mit anderen Komponenten ausgeschlossen werden. Als einfach positive Kontrolle wurde immer ein Kaninchendünndarmpräparat mitgeführt, da es in diesem Gewebe ein typisches physiologisches Verteilungsmuster von apoptotischen Zellen gibt. Außerdem wurde noch zusätzlich jeweils ein Gewebepräparat zuvor mit DNAse-I behandelt, das schließlich auch als Positiv-Kontrolle gewertet werden konnte.

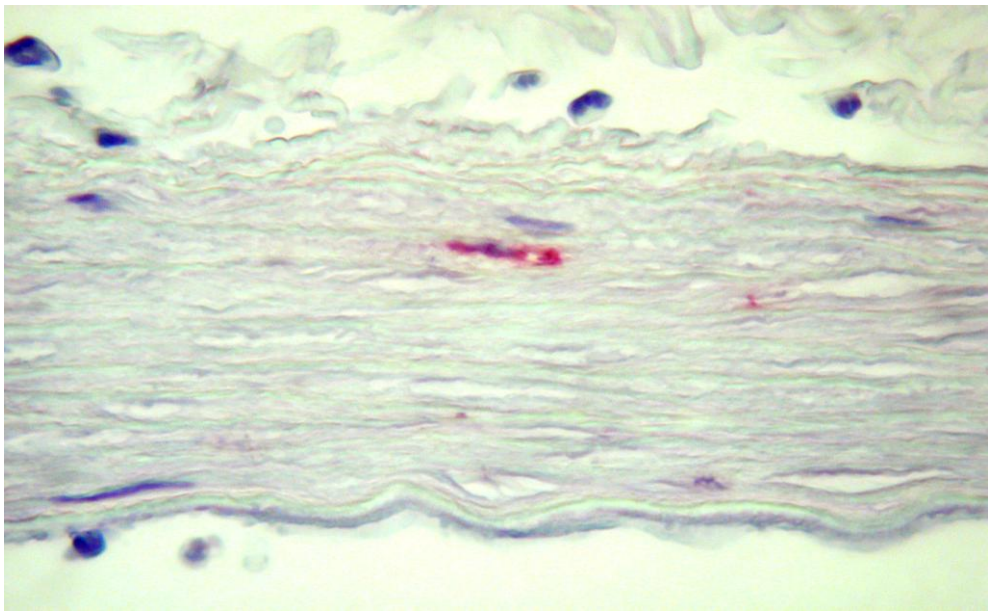


Abbildung 4: *Färbung nach der TUNEL-Methode (TDT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling) eines Gefäßquerschnittes der Arteria carotis communis nach Ballonangioplastie am Kaninchenmodell mit einem rot angefärbten apoptotischen Zellkern in der Media (60-fache Vergrößerung).*

2.7.4.3. Herstellung des TBS- und DN-Puffers

Zur Herstellung des TBS-Puffers wurden 6,05 g Tris-HCl (Firma Sigma), 1,4 g Tris-Base (Firma Sigma) und 8,775 g NaCl (Firma Merck) in 1 Liter vollentsalztem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt.

Für den DN-Puffer wurde zuerst eine 30 mM Trizma-base-Lösung hergestellt, indem 0,3633 g Trizma-base in 100 ml destilliertem Wasser gelöst wurde und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt wurde. Zu dieser Lösung wurden 2,24 g Cacodylate (Dimethylarsinsäure, Firma Merck), 0,0813 g MgCl2 (Firma Merck) und 0,0015 g Dithiothreit (DTT, Firma Merck) hinzugegeben.

Vor Gebrauch wurden die gekühlten Puffer auf Raumtemperatur erwärmt.

2.7.5. Proliferationsnachweis mit dem Ki-67-Antikörper

Durch die kurzen Untersuchungszeiträume, die bei dieser Arbeit gewählt wurden (2, 3, 6, 12, 24, 72 Stunden) war es nicht möglich, die in den vorangegangenen Studien verwendeten Verfahren für den histologischen Nachweis proliferierender Zellen, die Markierung mit ^{3}H-Thymidin und die Applikation von 5-Bromo-2`-Desoxyuridin (BrdU), anzuwenden [48]. Beide Verfahren benötigen einen entsprechend langen Inkubationszeitraum, um proliferierende Zellen nachzuweisen, in dem ^{3}H-Thymidin oder BrdU in die DNA sich teilender Zellen eingebaut wird.

Eine weitere Möglichkeit des in situ Nachweises proliferierender Zellen bietet die Detektierung des Ki-67-Proteins mit Hilfe der Avidin-Biotin-Methode [52].

2.7.5.1. Grundlagen zum Ki-67-Antigen

Das Ki-67-Antigen ist ein Zellkern-Protein [43], von dem zwei Isoformen mit 345 kDa und 395 kDa bekannt sind [44]. Es ist während des Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und M-Phase vorhanden, jedoch nicht während der G0-Phase. Da das Ki-67-Antigen eine sehr kurze Halbwertszeit hat [133] und nicht bei DNA-Reparaturmechanismen auftritt, kann es als Marker für aktive Proliferation verwendet werden [73, 93, 116]. Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen dieses Protein vom MIB-1-Klon in Form des IgG1-Isotyp verwendet (Firma Bio-Trend, Köln).

2.7.5.2. Grundprinzip der Avidin-Biotin-Methode

Nach der Inkubation mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen ein gesuchtes Antigen gerichtet ist, wird der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser Sekundärantikörper, dessen Fc-Teil biotinyliert ist, reagiert spezifisch mit dem Primärantikörper. Avidin besitzt eine sehr hohe Affinität zu Biotin, das mehrere Bindungsstellen für Avidin besitzt. Daher binden sich mehrere zugegebene Streptavidin-Peroxidase-Komplexe an das biotinylierte Ende eines Sekundär-antikörpers. Die an das Avidin gekoppelte Peroxidase oxidiert hinzugegebene Elektronendonatoren in Form von Farbkomplexen, zum Beispiel AEC-Komplex (3-amino-9-Ethylcarbazol) oder DAB-Substrat (3,3`-Diaminobenzidin Tetra-hydrochlorid), und sorgt so für eine Farbreaktion, durch die das gesuchte Antigen spezifisch sichtbar gemacht wird.

2.7.5.3. Durchführung der Ki-67-Avidin-Biotin-Methode

Die Schnittpräparate wurden zur Entparaffinierung für 30 min bei 60 °C in einem Brutschrank aufbewahrt und anschließend für 20 Minuten in Xylol belassen. Über eine absteigende Alkoholreihe (100 % → 96 % → 70 %) wurden die Schnitte wie schon bei den anderen Färbungen für 30 Minuten hydriert und schließlich in PBS-Puffer gespült. Nun wurden die Präparate für 20 Minuten in 10 mM Citratpuffer (pH = 6,0) in der Mikrowelle gekocht. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte erneut in PBS-Puffer gespült und anschließend für 10 Minuten in einer 1,4 % Wasserstoffperoxid/ Methanol-Lösung (30 % H_2O_2 Firma Merck in 200 ml Methanol) bei Raumtemperatur inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Hierauf erfolgte nach Spülen der Schnitte in PBS-Puffer+Tween20 die Inkubation mit Pferdeserum (Firma Dianova), das 1:4 mit PBS-Puffer verdünnt wurde, für 15 Minuten bei 37 °C, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach wurde das verdünnte Pferdeserum abgesaugt und die Präparate für 60 Minuten bei 37 °C mit dem 1:40 in PBS-Puffer verdünntem Primärantikörper gegen das Ki-67-Antigen (Klon MIB-1, Firma Bio-Trend, Köln) inkubiert.

Die Schnittpräparate wurden nun nochmals in PBS-Puffer + Tween20 gespült und daraufhin mit dem Sekundärantikörper Pferd-anti-Maus-biotinyliert (Firma Camon, Hamburg) 1:100 mit PBS verdünnt für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß an eine erneute Spülung in PBS+Tween20 erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Firma Dianova, Hamburg) in einer

Konzentration von 1:500 in PBS für 15 Minuten bei 37 °C. Jetzt wurden die Präparate mit dem AEC-Komplex (Firma Vektor, USA) bei Raumtemperatur für 10 - 20 Minuten inkubiert, bis die als Positiv-Kontrolle mitgeführte humane Tonsille eine mikroskopische Rotfärbung der Follikel erkennen ließ. Danach folgte die Spülung in PBS-Puffer+Twenn20, die Gegenfärbung mit Mayers-Hämalaun (Firma Chroma) und schließlich die Einbettung in Kaiser`s Glyceringelatine (Firma Merck, Darmstadt).

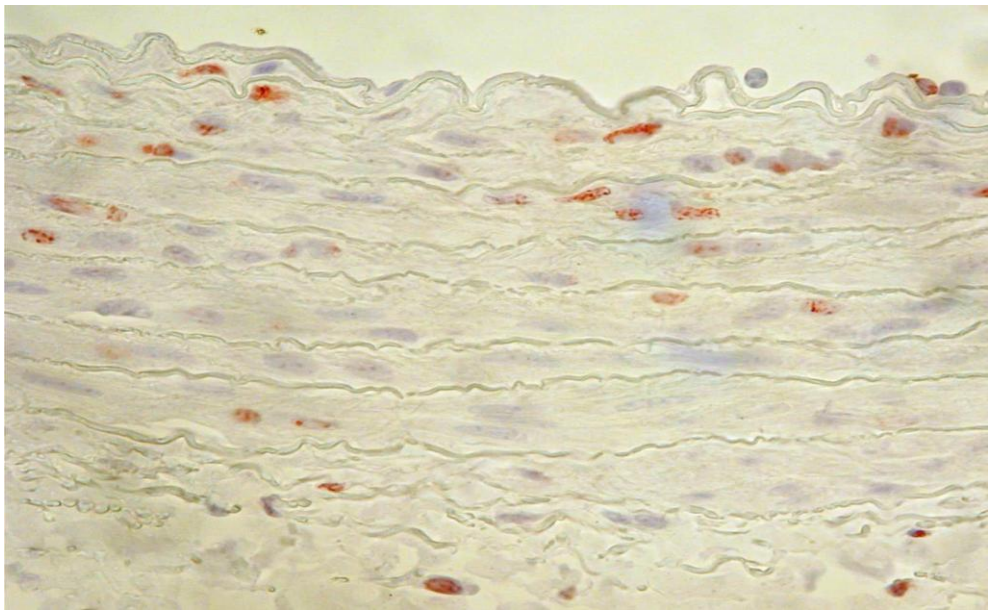


Abbildung 5: *Färbung mit der Ki-67-Avidin-Biotin-Methode eines Gefäßquerschnittes der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie zum Zellproliferationsnachweis mit mehreren positiven rot angefärbten Zellkernen in Media und Adventitia (60-fache Vergrößerung)*

2.7.5.4. Herstellung des Citrat- und PBS-Puffers

Der Citrat-Puffer besteht aus zwei Lösungen, der Stammlösung A und B. Die Stammlösung A beinhaltet 0,1 M Zitronensäure, die durch Lösung von 21,01 g Zirtonensäure ($C_6H_8O_7xH_20$, Firma Merck) in einem Liter destilliertem Wasser gefertigt wird. Die Stammlösung B besteht aus 29,41 g Natriumcitrat ($C_6H_5O_7Na_3x2H_2O$, Firma Merck), das auch in einem Liter destilliertem Wasser gelöst wird. Man erhält daraus eine 0,1 M Natriumcitrat-Lösung. Die Stammlösungen werden kurz vor Gebrauch des Citrat-Puffers gemischt. 18 ml der Stammlösung A mit 82 ml der Stammlösung B und 900 ml destilliertem Wasser ergeben schließlich einen 10 mM Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0.

Zur Herstellung des PBS-Puffers werden in einem Liter destilliertem Wasser 8,0 g Natrium-Chlorid (NaCl, Firma Merck), 0,2 g Kalium-Chlorid (KCl, Firma Merck), 0,2 g Kaliumdihydrogenhosphat (KH_2PO_4, Firma Merck) und 1,45 g Dinatrium-hydrogenphosphat ($Na_2HPO_4x2H_2O$, Firma Merck) gelöst. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.8. Auswertung der histologischen Präparate

Für die Auswertung der histologischen Präparate wurde ein Lichtmikroskop Optiphot-2 (Firma Nikon, Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

2.8.1. Morphologische Auswertung

Anhand der HE- und EvG-Färbung wurden die Schnittpräparate allgemein beurteilt. Dabei wurde besonders auf Gefäßwandeinblutungen, intraluminale Thromben und deren Lokalisation im Gefäßverlauf, sowie auf Rupturen der Gefäßwand bzw. deren Abschnitte geachtet.

Von besonderem Interesse war die Gesamtzellzahl der Media und der Adventitia. Diese wurde mittels der HE-Färbung bei 40-facher Vergrößerung mit einem manuellem Zählgerät bestimmt. Es wurden nur Zellen als positiv gewertet, bei denen die Zellkernmorphologie noch weitgehend intakt war.

2.8.2. Morphometrische Auswertung

Bei der EvG-Färbung lassen sich besonders gut die einzelnen Gefäßwandabschnitte unterscheiden und ausmessen. Die Messung wurde mit dem computergestütztem Sketch-III-Digitalisierungsbrett (Firma Summa; Software Firma Bilany Consulting, Düsseldorf, Deutschland) an einem Lichtmikroskop mit Seitentubus (Drawing Tube 1,25 x, Firma Nikon) durchgeführt. Dabei wurden die Kreisflächen innerhalb eines Wandabschnittumfanges dreimal gemessen und der Mittelwert berechnet. Um die Größe der Adventitiafläche zu erhalten, wurde die Kreisfläche unter der Lamina elastica externa von der Kreisfläche unter der äußeren Adventitiabegrenzung subtrahiert, für die Mediafläche wurde die Kreisfläche unter der Lamina elastica interna von der Fläche unter der Lamina elastica externa abgezogen (Abb.6).

Aus dem Quotient von Gesamtzellzahl und der Media- bzw. Adventitiafläche ließ sich nun die Zelldichte berechnen.

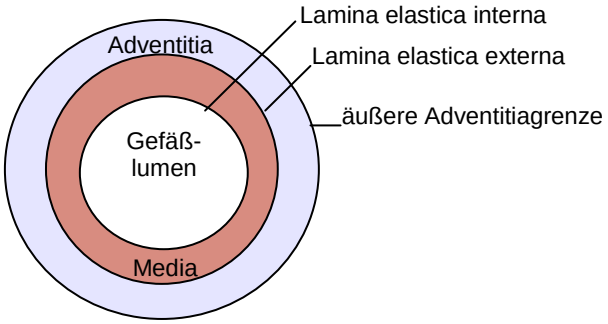


Abbildung 6: *Schematische Darstellung eines Gefäßquerschnittes. Zur Flächenberechnung von Media und Adventitia werden die entsprechenden Kreisflächen unterhalb der Lamina elastica interna, externa und der äußeren Adventitiagrenze voneinander subtrahiert*

2.8.3. Auswertung der TUNEL-Methode

Apoptotische Zellkerne wurden durch den Farbkomplex Fast-Red intensiv rot angefärbt. Dennoch bedarf die Auszählung großer Sorgfalt, da sich durch deutlich erhöhte Apoptose viele DNA-Trümmer ohne erkennbare Zellkernzugehörigkeit in den Gefäßwandabschnitten befinden und diese sich ebenfalls rot anfärben und so zu einem deutlich roten Background führen. Wie schon bei der Auswertung der Gesamtzellzahl wurden auch bei der TUNEL-Auswertung Zellkerne nur als positiv gewertet, wenn die Anfärbung mit dem morphologischen Korrelat eines in Apoptose befindlichen Zellkernes übereinstimmte.

Die Auszählung wurde unter 40-facher Vergrößerung mit einem manuellen Zählgerät durchgeführt. Aus dem Quotient apoptotischer Zellen durch die Gesamtzellzahl ließ sich die Apoptoserate in Prozent zur Gesamtzellzahl berechnen.

2.8.4. Auswertung der Ki-67-Methode

Beim Nachweis von proliferierenden Zellen wurden die Schnitte wieder unter dem Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung und mit Hilfe eines manuellen Zählgerätes ausgezählt. Die durch den anti-Ki-67-Antikörper markierten Zellkerne wurden durch den AEC-Komplex rot-braun angefärbt. Aus dem Quotienten von Ki-67-positiven Zellen und der Gesamtzellzahl ließ sich die Proliferationsrate in Prozent zur Gesamtzellzahl berechnen.

2.9. Statistik

Aus den erhobenen Daten der einzelnen Untersuchungsgruppen wurde jeweils der Mittelwert gebildet und die dazugehörige Standardabweichung ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollgruppe

3.1.1 Histologisch-morphologische Auswertung

Zwei Tiere sind intraoperativ verstorben, ein Tier während des postinterventionellen Beobachtungszeitraumes. Gefäßthromben konnten bei 21 Tieren festgestellt werden, davon 3 Nahtthrombosen, 17 lokale wandständige Thrombosen und eine komplette Thrombose. Plaquebildung konnte in dem kurzen Versuchszeitraum bei keinem der Tiere beobachtet werden. Die Zahl der Intimazellen war minimal nachweisbar, wurde aber auf Grund der Fragestellung nicht ausgewertet.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte an HE-gefärbten Schnitten mittels eines manuellen Zählgerätes für Media und Adventitia. Die Gesamtzellzahl der Media betrug nach 2 Stunden im Durchschnitt 626 ± 232, nach 3 Stunden 414 ± 126, nach 6 Stunden betrug sie im Durchschnitt 402 ± 329, nach 12 Stunden 505 ± 125, nach 24 Stunden 337 ±173 und nach 72 Stunden betrug sie 464 ± 370.

In der Adventitia wurden nach 2 Stunden im Durchschnitt 160 ± 52 Zellen gezählt, nach 3 Stunden 140 ± 71, nach 6 Stunden 396 ± 147, nach 12 Stunden 258 ± 68, nach 24 Stunden 319 ± 133 und nach 72 Stunden 533 ±193 Zellen gezählt. Die Daten sind in der Abbildung 7 und 8 mit der Interventionsgruppe zu vergleichen.

Setzt man die Gesamtzellzahl in Relation zu der Media- und Adventitiafläche, erhält man die Gesamtzelldichte.

3.1.2 Morphometrische Auswertung

Die computergestützte Ausmessung der Media an EvG-gefärbten Präparaten ergab im Durchschnitt eine Mediafläche nach 2 Stunden von 0,36 mm² ± 0,08 mm², nach 3 Stunden von 0,32 mm² ± 0,05 mm², nach 6 Stunden von 0,31 mm² ± 0,05 mm², nach 12 Stunden von 0,36 mm² ± 0,05 mm², nach 24 Stunden von 0,29 mm² ± 0,08 mm² und nach 72 Stunden von 0,39 mm² ± 0,08mm².

Bei der Bestimmung der Adventitiafläche wurde nach 2 Stunden eine Fläche von 0,36 mm² ± 0,11 mm², nach 3 Stunden von 0,27 mm² ± 0,05 mm², nach 6 Stunden von 0,31 mm² ± 0,08 mm², nach 12 Stunden von 0,32 mm² ± 0,03 mm², nach 24 Stunden von 0,32 mm² ± 0,08 mm² und nach 72 Stunden von 0,4 mm² ± 0,11mm²

ermittelt. Die Daten sind in der Abbildung 11 und 12 im Vergleich mit der Interventionsgruppe dargestellt.

3.1.3 Auswertung der TUNEL-Methode

Mit der TUNEL-Methode ließ sich die Anzahl der apoptotischen Zellen bestimmen, und daraus im Verhältnis zur Gesamtzellzahl die Apoptoserate in Prozent errechnen. Diese betrug für die Media im Schnitt nach 2 Stunden 47,2 % ±28,1 %, nach 3 Stunden 45,2 % ± 10,8 %, nach 6 Stunden 39,8 % ± 28,2 %, nach 12 Stunden 13,3 % ± 11,3 %, nach 24 Stunden 1,3 % ± 1,5 % und nach 72 Stunden 5,9 % ± 10,1 %.

Die Bestimmung der Apoptoserate bei der Adventitia ergab nach 2 Stunden 25,7 % ± 8,9 %, nach 3 Stunden 22,9 % ± 18,3 %, nach 6 Stunden 6,4 % ± 6,0 %, nach 12 Stunden 13,3 % ± 12,4 %, nach 24 Stunden 1,0 % ± 0,6 % und nach 72 Stunden 1,3 % ± 1,7 %.

Durch den Quotienten aus Apoptose-positiven Zellen und Media- bzw. Adventitiafläche läßt sich der Apoptoseindex errechnen.

In den Abbildungen 13 und 16 ist die Apoptoserate der Media und der Adventitia zusammen mit den Daten der Interventionsgruppe graphisch dargestellt.

3.1.4 Auswertung der KI-67-Methode

Durch die KI-67-Färbemethode konnten proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Wie bei der TUNEL-Methode wurde auch hier die Anzahl der KI-67-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt und daraus die Proliferationsrate berechnet. Für die Media ergab sich daraus eine Proliferationsrate nach 2 Stunden von 0,0 % ± 0,0 %, nach 3 Stunden von 0,3 % ± 0,7 %, nach 6 Stunden von 0,3 % ± 0,4 %, nach 12 Stunden von 4,8 % ± 5,4 %, nach 24 Stunden von 0,4 % ± 0,5 % und nach 72 Stunden von 16,5 % ± 8,9 %.

Für die Adventitia wurden Proliferationsraten nach 2 Stunden von 0,3 % ± 0,5 %, nach 3 Stunden von 1,7 % ± 2,8 %, nach 6 Stunden von 3,8 % ± 6,2 %, nach 12 Stunden von 3,7 % ± 3,9 %, nach 24 Stunden von 1,2 % ± 2,2 % und nach 72 Stunden von 27,2 % ± 15,0% bestimmt. Die Daten sind in den Abbildungen 17 und 18 zusammen mit der Interventionsgruppe dargestellt.

3.2 Bestrahlungsgruppe

3.2.1 Histologisch-morphologische Auswertung

Die Gesamtzellzahl in Media und Adventitia der Bestrahlungsgruppe wurde wie bei der Kontrollgruppe mit einem mechanisch-manuellem Zählgerät nach den selben Kriterien bestimmt. Für die Media wurden nach 2 Stunden im Mittel 442 ± 175 morphologisch intakte Zellen gezählt, nach 3 Stunden 362 ± 197 Zellen, nach 6 Stunden 166 ± 168, nach 12 Stunden 229 ± 137 Zellen, nach 24 Stunden 223 ± 132 und nach 72 Stunden 174 ± 108 Zellen.

In der Adventitia wurden im Durchschnitt, bei gleichem Auswertungsverfahren, nach 2 Stunden 134 ± 41 Zellen gezählt, nach 3 Stunden 111 ± 64, nach 6 Stunden 225 ± 114 Zellen, nach 12 Stunden 192 ± 110, nach 24 Stunden 253 ± 138 und nach 72 Stunden 192 ± 46 Zellen gezählt. Die Daten sind in den Abbildungen 7 und 8 mit der Kontrollgruppe zu vergleichen.

3.2.2. Morphometrische Auswertung

Bei der Interventionsgruppe wurde computergestützt für die Media nach 2 Stunden eine Fläche von 0,28 mm² ± 0,03 mm², nach 3 Stunden von 0,31 mm² ± 0,08 mm², nach 6 Stunden 0,29 mm² ± 0,06 mm², nach 12 Stunden eine Fläche von 0,33 mm² ± 0,11 mm², nach 24 Stunden 0,26 mm² ± 0,03 mm² und nach 72 Stunden von 0,28 mm² ± 0,03 mm² ausgemessen. Die Daten sind in den Abbildungen 11 und 12 im Vergleich mit der Kontrollgruppe dargestellt.

3.2.3 Auswertung der TUNEL-Methode

Wie bereits bei der Kontrollgruppe, wurde auch bei der Bestrahlungsgruppe die Zahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode ausgewertet und zur Gesamtzellzahl als Apoptoserate in Relation gesetzt. Für die Media ergab sich dabei nach 2 Stunden eine Apoptoserate von 34,9 % ± 8,5 %, nach 3 Stunden 50,7 % ± 16,4 %, nach 6 Stunden 47,6 % ± 24,1 %, nach 12 Stunden 23,8% ± 20,5 %, nach 24 Stunden 5,3 % ± 4,1 % und nach 72 Stunden 3,4 % ± 1,3 %.

Bei der Auswertung der TUNEL-Färbung der Adventitia stellten wir nach 2 Stunden eine Apoptoserate von 22,4 % ± 8,6 %, nach 3 Stunden von 44,1 % ± 36,2 %, nach 6 Stunden eine Apoptoserate von 14,5 % ± 13,2 %, nach 12 Stunden von 16,3 % ± 20,5 %, nach 24 Stunden von 2,6 % ± 2,3 % und nach 72

Stunden eine Apoptoserate von 0,5 % ± 0,7%. In den Abbildungen 13 und 16 ist die Apoptoserate der Media und Adventitia zusammen mit den Daten der Kontrollgruppe graphisch dargestellt.

3.2.4. Auswertung der KI-67-Methode

Bei der Auswertung der KI-67-Färbung der Bestrahlungsgruppe wurde, wie bei der Kontrollgruppe, die Zahl der proliferierenden Zellen durch die Gesamtzellzahl geteilt und so die Proliferationsrate in Prozent berechnet. Für die Media im Gefäßschnitt erhielten wir nach 2 Stunden eine Proliferationsrate von 0,0 % ± 0,1 %, nach 3 Stunden von 0,5 % ± 1,1 %, nach 6 Stunden eine Proliferationsrate von 0,3 % ± 0,5 %, nach 12 Stunden von 10,7 % ± 10,9 %, nach 24 Stunden von 0,8 % ± 0,9 % und nach 72 Stunden eine Proliferationsrate von 1,8 % ± 1,4 %.

In der Adventitia konnte nach 2 Stunden eine Proliferationsrate von 0,4 % ± 0,2 %, nach 3 Stunden von 0,6 % ± 0,9 %, nach 6 Stunden von 1,8 % ± 2,5 %, nach 12 Stunden von 8,6 % ± 6,7 %, nach 24 Stunden von 0,7 % ± 0,6 % und nach 72 Stunden eine Proliferationsrate von 5,0 % ± 3,2 % festgestellt werden. Die Daten der KI-67-Methode sind zusammen mit den Daten der Kontrollgruppe in den Abbildungen 17 und 18 veranschaulicht.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.3.1 Histologisch-morphologische Beobachtung

Die Gesamtzellzahl in der Media nahm in der Kontrollgruppe innerhalb der ersten 3 Stunden von 721,5 ± 70,8 als Referenzwert um mehr als 40 % auf 414 ± 126 ab, in der Gruppe der bestrahlten Tiere um die Hälfte auf 362 ± 197. Während in der Kontrollgruppe sich die Gesamtzellzahl zwischen 3 und 6 Stunden kaum noch änderte, reduzierte sich die Zellzahl in der Bestrahlungsgruppe weiter deutlich auf 166 ± 168 Zellen. Nach 12 Stunden war eine leichte Zunahme der Gesamtzellzahl in beiden Untersuchungsgruppen zu beobachten, die in der Bestrahlungsgruppe gegenüber der Gruppe der Kontrolltiere deutlich geringer ausfiel. Nach einem Tag hatte sich die Gesamtzellzahl in beiden Versuchsgruppen nochmals verringert, um in der Kontrollgruppe nach 3 Tagen auf 464 ± 370 Zellen anzusteigen, während sich die Gesamtzellzahl in der Gruppe der bestrahlten Tiere weiter auf 174 ± 108

verminderte. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes war die Gesamtzellzahl der Bestrahlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe verringert.

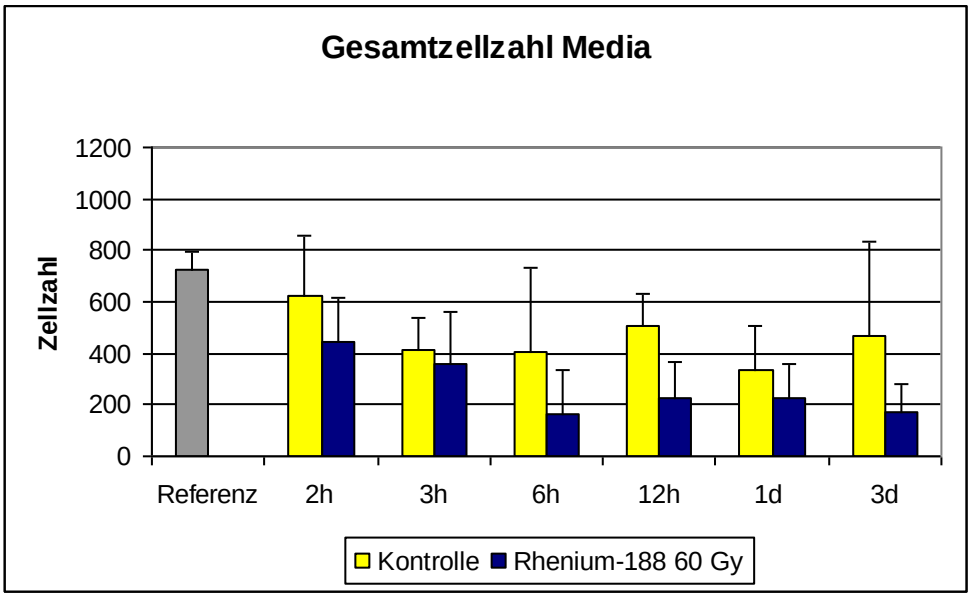


Abbildung 7: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Mediagesamtzellzahl in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Gesamtzellzahl eines unbehandelten Gefäßes als Referenz.*

Auch in der Adventitia reduzierte sich die Gesamtzellzahl in Kontroll- und Bestrahlungsgruppe nach 2 und 3 Stunden gegenüber dem Referenzwert von 231,1 ± 38,7 auf 159.8 ± 51.9 bzw. 140.3 ± 70.9 bei den Kontrolltieren und 134.1 ± 40.5 bzw. 110.8 ± 64.4 bei den bestrahlten Tieren. Die Zellzahl in der Bestrahlungsgruppe war gegenüber der Kontrollgruppe nur gering vermindert. Nach 6 Stunden kam es in beiden Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Zellzahl in der Adventitia, bei der Kontrollgruppe auf 396 ± 146.9 Zellen, bei der Bestrahlungsgruppe auf 225 ± 113.7. In der Gruppe der bestrahlten Tiere änderte sich die Gesamtzellzahl der Adventitia bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 3 Tagen nicht wesentlich und schwankte um den Referenzwert. In der Kontrollgruppe kam es jedoch nach einem Abfall nach 12 Stunden auf 257.5 ± 68.2 zu einem erneuten deutlichen Anstieg nach einem und nach drei Tagen auf 319.3 ± 133.2 und 532.6 ± 192.7 Zellen, so dass eine erhebliche Differenz nach 3 Tagen zwischen der Gesamtzellzahl der Kontrollgruppe und jener, der Bestrahlungsgruppe resultierte. Die Zellzahl der

Kontrollgruppe hatte sich nach 3 Tagen auch im Vergleich zum Referenzwert mehr als verdoppelt.

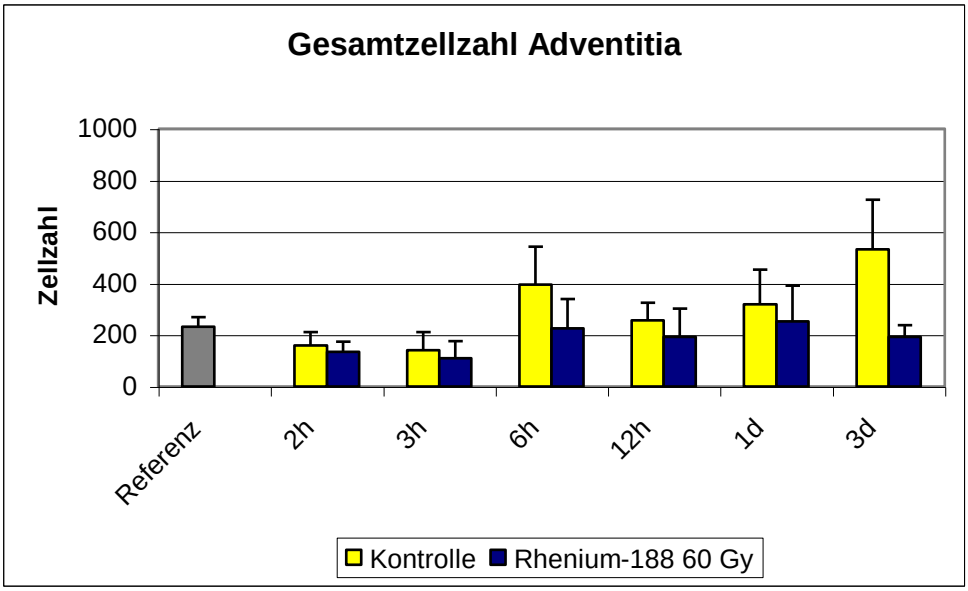


Abbildung 8: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Adventitiagesamtzellzahl in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Gesamtzellzahl eines unbehandelten Gefäßes als Referenz*

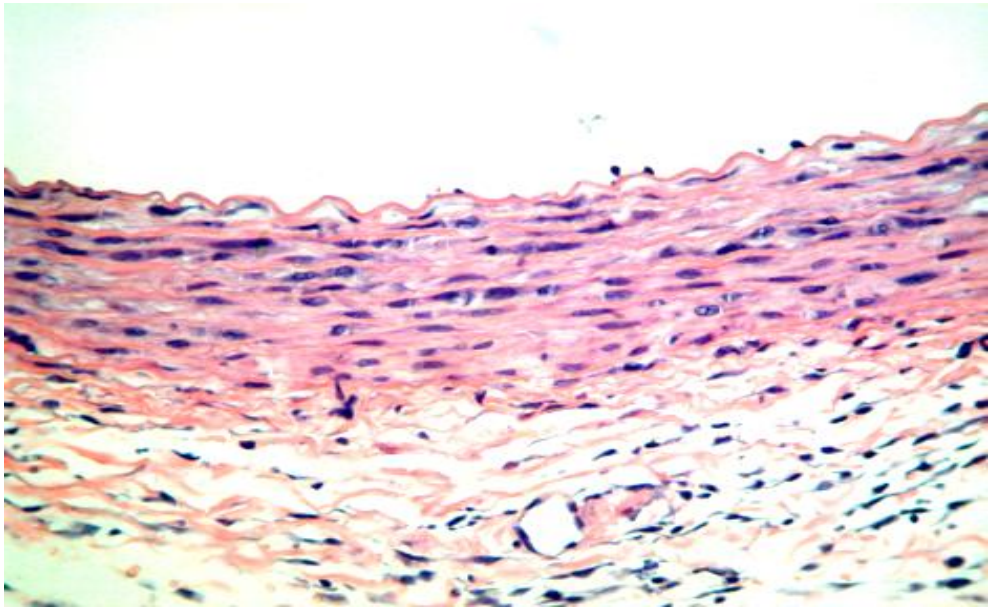


Abbildung 9: *Querschnitt und Hämalaun-Eosin-Färbung der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell aus der Kontrollgruppe 3 Tage nach Ballonangioplastie mit Natriumchlorid 0.9 %. Hohe Zelldichte in Media und Adventitia (40-fache Vergrößerung).*

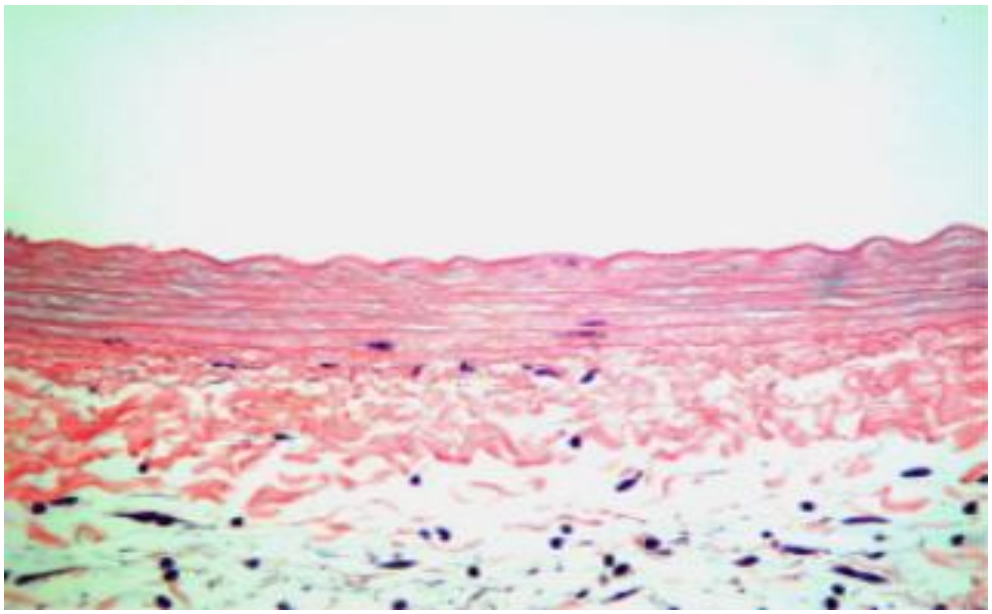


Abbildung 10: *Querschnitt und Hämalaun-Eosin-Färbung der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell aus der Bestrahlungsgruppe 3 Tage nach Ballonangioplastie mit dem β-Strahler Rhenium-188. Intakte, aber zellarme Media und Adventitia (40-fache Vergrößerung).*

3.3.2 Morphometrische Beobachtung

Die Mediaflächen nahmen in den ersten sechs Stunden nach dem Eingriff sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Bestrahlungsgruppe leicht ab. Die Mediaflächen der Bestrahlungsgruppe waren stets niedriger, als die der Kontrollgruppe. Ein großer Unterschied lag jedoch nicht vor. Nach einem minimalen Anstieg nach 12 Stunden, kam es nach einem Tag zu einer weiteren Abnahme der Mediafläche in beiden Untersuchungsgruppen. Drei Tage nach der Intervention kam es bei den Tieren der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Werten nach einem Tag zu einer Zunahme der Mediafläche um ein Drittel von 0,29 mm² ± 0,08 mm² auf 0,39 mm² ± 0,08 mm².

In der Bestrahlungsgruppe stieg die Mediafläche nach 3 Tagen im Vergleich zu den Werten nach einem Tag von 0,26 mm² ± 0,03 mm² auf 0,28 mm² ± 0,03 mm² jedoch unwesentlich an.

Bei der morphometrischen Ausmessung der Adventitia zeigte sich, dass sich die Querschnittsflächen bereits nach zwei Stunden deutlich unterschieden, wobei die Adventitiafläche der Kontrollgruppe mit 0,36 mm² ± 0,11 mm² um ein Drittel größer war, als die der Bestrahlungsgruppe mit 0,24 mm² ± 0,07 mm². Nach drei Stunden hatte die Adventitiafläche der Kontrollgruppe deutlich auf 0,27 mm² ± 0,05 mm²

abgenommen, die der Bestrahlungsgruppe hatte ganz leicht auf 0,25 mm² ± 0,04 mm² zugenommen.

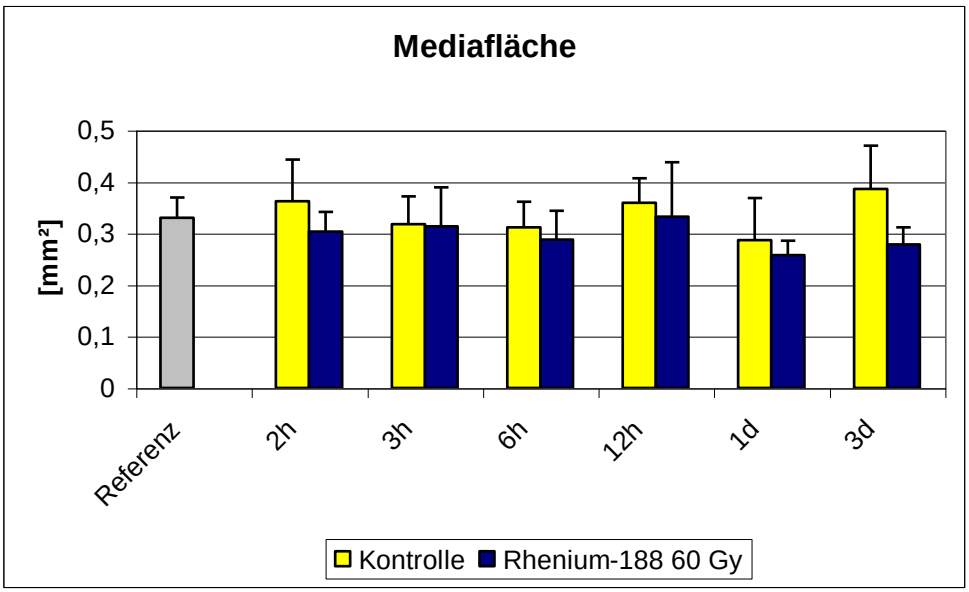


Abbildung 11: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Mediafläche in mm² in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Mediafläche eines unbehandelten Gefäßes als Referenz*

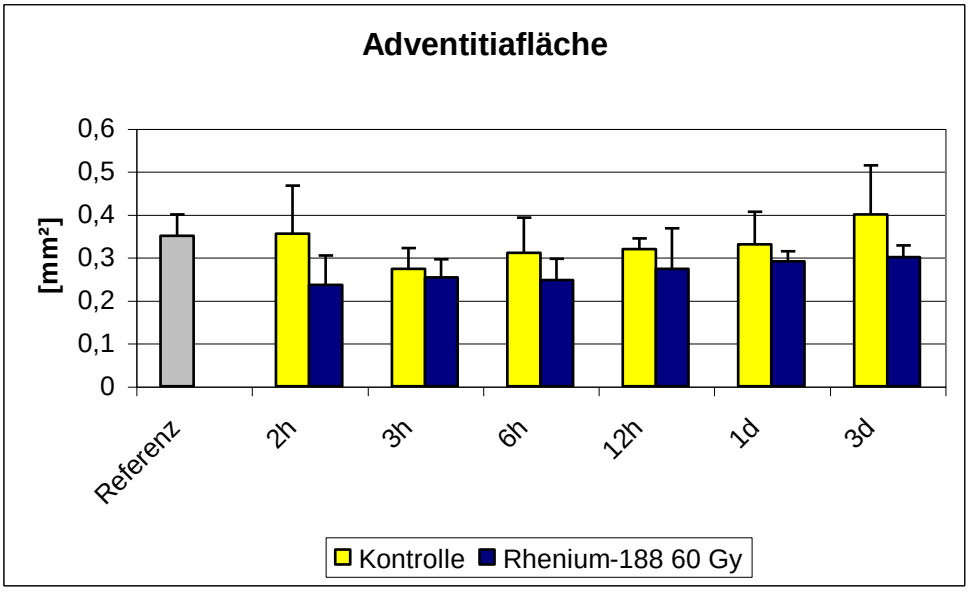


Abbildung 12: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Adventitiafläche in mm² in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Adventitiafläche eines unbehandelten Gefäßes als Referenz*

Über den Zeitraum 6 Stunden, 12 Stunden bis zu einem Tag nach Intervention nahmen die Adventitiaflächen beider Versuchsgruppen im fast gleichen Verhältnis zu, die Kontrollgruppe auf 0,33 mm² ± 0,08 mm² und die Bestrahlungsgruppe auf 0,29 mm² ± 0,02 mm². Nach drei Tagen war die Größe der Adventitiafläche der Bestrahlungsgruppe im Vergleich zu den Werten nach einem Tag nahezu unverändert, die der Kontrollgruppe hatte hingegen nochmals deutlich auf 0,40 mm² ± 0,11 mm² zugenommen.

3.3.3 Beobachtungen zur TUNEL-Methode

Die Apoptoserate der Media war bereits nach 2 Stunden sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Gruppe der bestrahlten Tiere im Vergleich zum Referenzwert von 0,5 % enorm erhöht, wobei die Apoptoserate der Kontrolltiere mit 47,2 % ± 28,1 % jene der Bestrahlungstiere mit 34,9 % ± 8,9 % etwas überstieg.

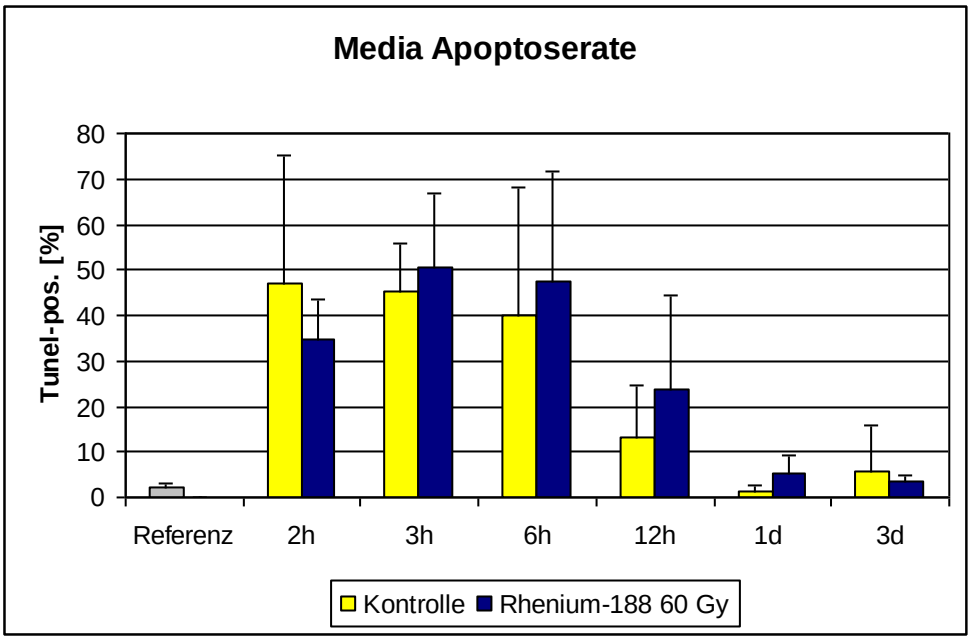


Abbildung 13: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Media-Apoptoserate in % zur Gesamtzellzahl in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Mediafläche eines unbehandelten Gefäßes als Referenz*

Während die Zelltodrate der Kontrolltiere mit 45,2 % ± 10,8 % nach 3 Stunden und mit 39,8 % ± 28,2 % sechs Stunden nach der Intervention sich gering verringerte,

stieg die der bestrahlten Tiere sogar noch weiter auf 50,7 % ± 16,4% 3 Stunden nach dem Eingriff an. 6 Stunden nach der Intervention kam es auch bei der Bestrahlungsgruppe zu einer leichten Reduktion der Apoptoserate auf 47,6 % ± 24,1 %. Nach 12 Stunden war die Apoptoserate der Zellen der Media beider Untersuchungsgruppen vergleichend zum Referenzwert mit 2 % noch immens erhöht, hatten jedoch zu den kürzeren Untersuchungszeiträumen wieder deutlich abgenommen. Die Zelltodrate war bei den Tieren der Bestrahlungsgruppe dabei mit 23,8 % ± 20,5 % fast doppelt so hoch wie die der Kontrollgruppe mit 13,3 % ± 11,3 %. Nach 24 Stunden war die Apoptoserate beider Untersuchungsgruppen weiter deutlich rückläufig, die Apoptoserate der Kontrolltiere sank auf 1,3 % ± 1,5 %, die der bestrahlten Tiere auf 5,3 % ± 4,1 %. Nach 72 Stunden hatte sich die Apoptoserate in der Media der Bestrahlungsgruppe nochmals auf 3,4 % ± 1,3 % etwas vermindert, während in der Kontrollgruppe ein erneuter geringer Anstieg auf 5,9 % ± 10,1 % zu beobachten war.

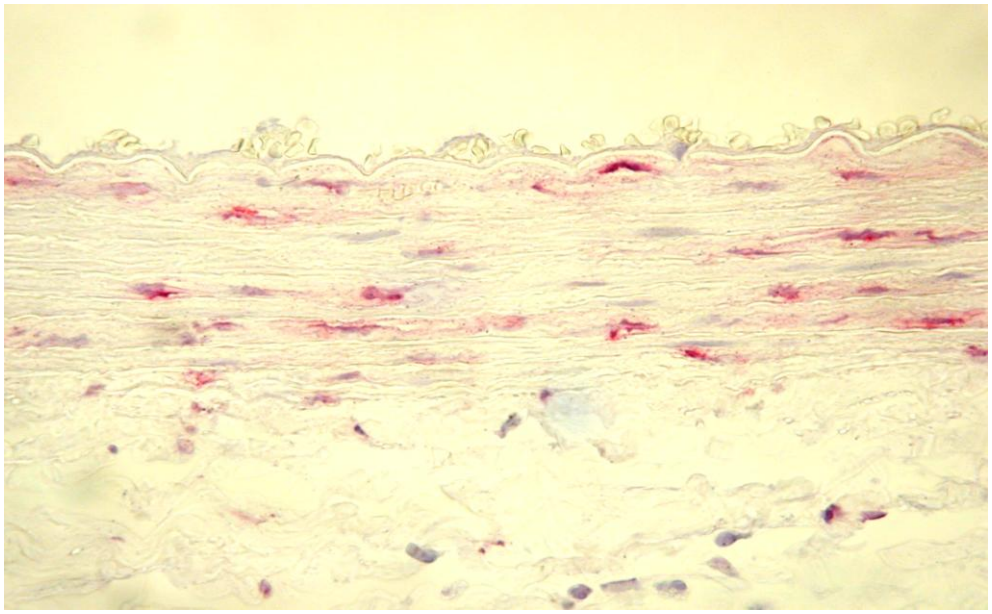


Abbildung 14: *Querschnitt der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell und Anfärbung nach der TUNEL-Methode (TDT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling) zum Apoptosenachweis 3 Stunden nach herkömmlicher Ballongangioplasie. Mehrere rot angefärbte positive Zellen in Media und Adventitia (40-fache Vergrößerung).*

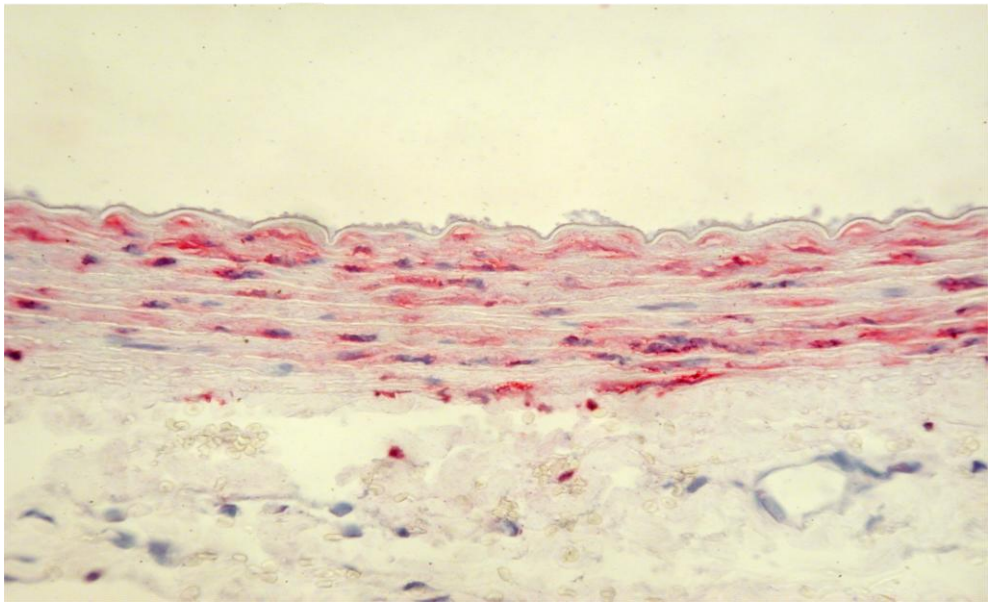


Abbildung 15: *Querschnitt der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell und Anfärbung nach der TUNEL-Methode (TDT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling) zum Apoptosenachweis 3 Stunden nach Ballongangioplasie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188. Viele positive Zellen in Media und einige in Adventitia mit apoptosetypischer Zellkernmorphologie. Lamina interna intakt (40-fache Vergrößerung).*

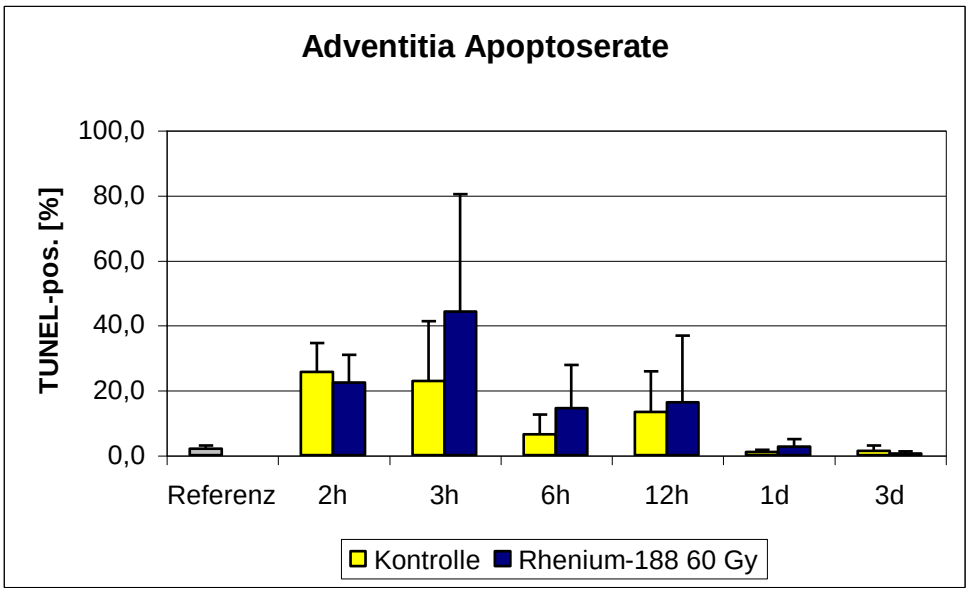


Abbildung 16: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Adventitia-Apoptoserate in % zur Gesamtzellzahl in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Mediafläche eines unbehandelten Gefäßes als Referenz.*

Auch in der Adventitia stieg die Apoptoserate nach 2 Stunden in Bestrahlungs- und Kontrollgruppe deutlich über den Referenzwert von 0,3 % ± 0,4 % auf 34,9 % ± 8,5 % in der Bestrahlungsgruppe und 25,7% ± 8,9 % in der Kontrollgruppe, im Vergleich zur Media jedoch weniger intensiv. Während die Apoptoserate der Kontrollgruppe nach 2 Stunden bereits Ihren Höhepunkt erreicht hatte und allmählich wieder abnahm, stieg die der Bestrahlungsgruppe erst nach 3 Stunden auf Ihr Maximum von 44,1 % ± 36,2 %. Nach 6 Stunden waren die Apoptoseraten beider Gruppen deutlich gefallen und haben sich nach 3 Tagen dem Referenzwert angeglichen.

3.3.4 Beobachtungen zur KI-67 Methode

Die Proliferationsrate der Media verlief in den ersten sechs Stunden für die Kontrollgruppe und für die Interventionsgruppe sehr niedrig. Sie betrug nach sechs Stunden für die Kontrollgruppe 0,3 ± 0,4 % und für die Bestrahlungsgruppe 0,3 ± 0,5 %. Der Referenzwert für die Proliferationsrate bei einem unbehandeltem Gefäß liegt im gleichen Bereich. Nach 12 Stunden kam es zu einem deutlichen Anstieg der Proliferation der Mediazellen in beiden Untersuchungsgruppen. In der Kontrollgruppe stieg die Prolifertionsrate auf 4,8 ± 5,4 %, in der Gruppe der bestrahlten Tiere auf 10,7 ± 10,9 %. Nach einem Tag war die Proliferationsrate beider Untersuchungsgruppen wieder unter ein Prozent abgesunken. Drei Tage nach dem Eingriff stieg die Proliferationsrate der Media in der Kontrollgruppe deutlich auf 16,5 ± 8,9 % an, in der Bestrahlungsgruppe kam es nur zu einem dezenten Anstieg der Proliferationsrate auf 1,8 ± 1,4 %. In der Adventitia war ein allmählicher Anstieg der Proliferationsrate in der Bestrahlungsgruppe vom Beobachtungsbeginn bis zu 12 Stunden nach Intervention auf 8,6 ± 6,7 % zu beobachten. In der Kontrollgruppe kam es ebenfalls zu einem Anstieg nach 12 Stunden, der jedoch mit 3,7 ± 3,9 % geringer ausfiel. Nach 24 Stunden kam es wie in der Media zu einem Abfall der Proliferation in beiden Untersuchungsgruppen, die Prolifertionsrate der Bestrahlungsgruppe sank auf 0,7 ± 0,6 %, die der Kontrollgruppe verringerte sich auf 1,2 ± 2,2 %. Nach 72 Stunden kam es in der Adventitia der Kontrollgruppe zu einer deutlichen Zunahme der Proliferationsrate auf 27,2 ± 15,0 %, die Proliferationsrate der Bestrahlungstiere nahm im Vergleich dazu nur schwach zu auf 5,0 ± 3,2 %.

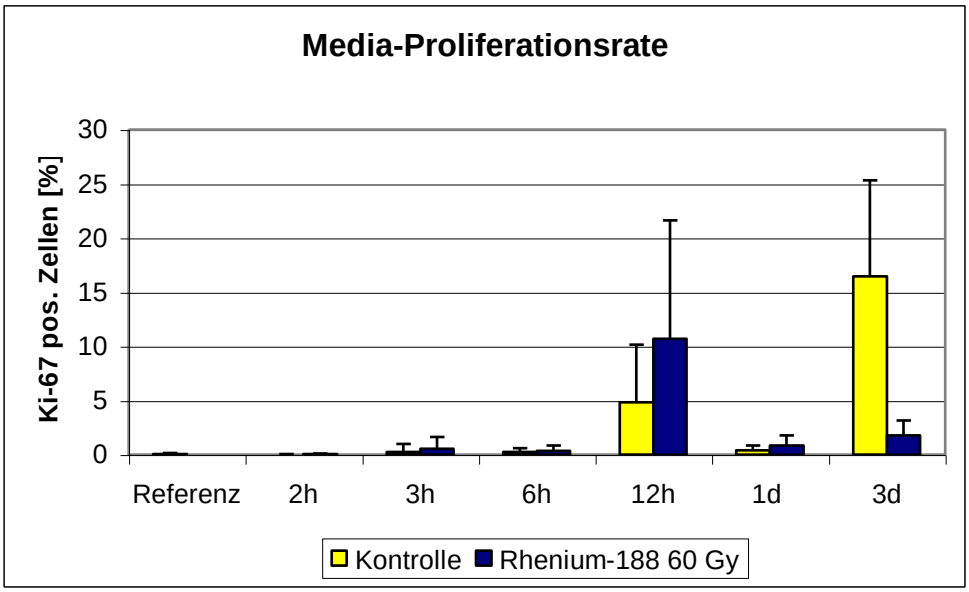


Abbildung 17: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Mediaproliferationsrate in % zur Gesamtzellzahl in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Mediaproliferationsrate eines unbehandelten Gefäßes als Referenz.*

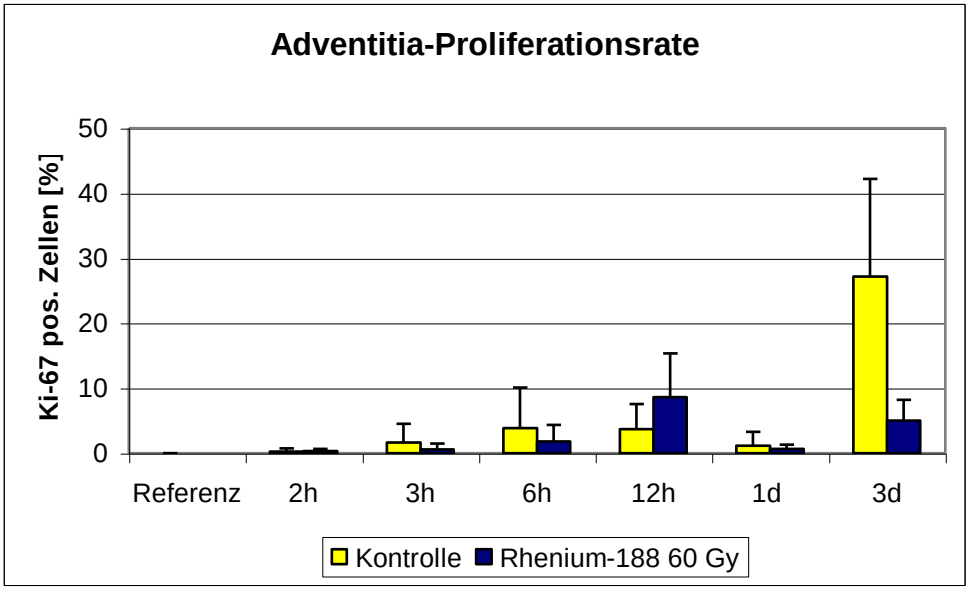


Abbildung 18: *Mittelwerte mit Standardabweichung der Adventitiaproliferationsrate in % zur Gesamtzellzahl in der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 in der Zeit von 2 Stunden bis 3 Tagen. Bei der Kontrollgruppe Füllung des Ballons mit Natriumchlorid 0.9 %. Die Adventitiaproliferationsrate eines unbehandelten Gefäßes als Referenz.*

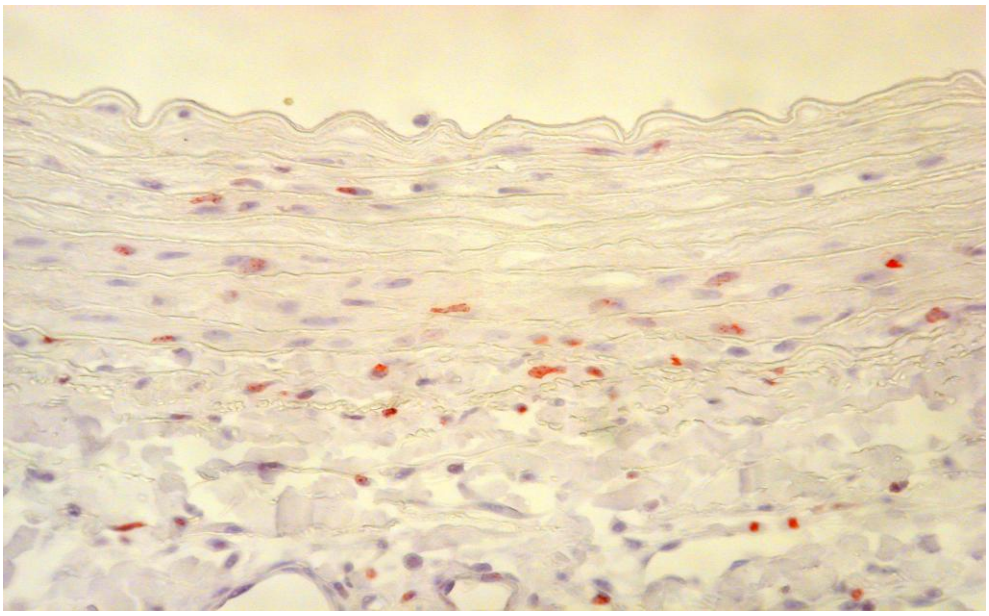


Abbildung 19: *Gefäßquerschnitt der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell und Anfärbung nach der Ki-67-Methode zum Nachweis proliferierender Zellen in der Kontrollgruppe 3 Tage nach herkömmlicher Ballonangioplastie. Zahlreiche Ki-67-positive Zellen in Media und Adventitia. Beide Gefäßschichten beinhalten bereits wieder viele Zellkerne. Die Media erscheint im Vergleich zur Bestrahlungsgruppe (Abbildung 20) verplumpt (40-fache Vergrößerung).*

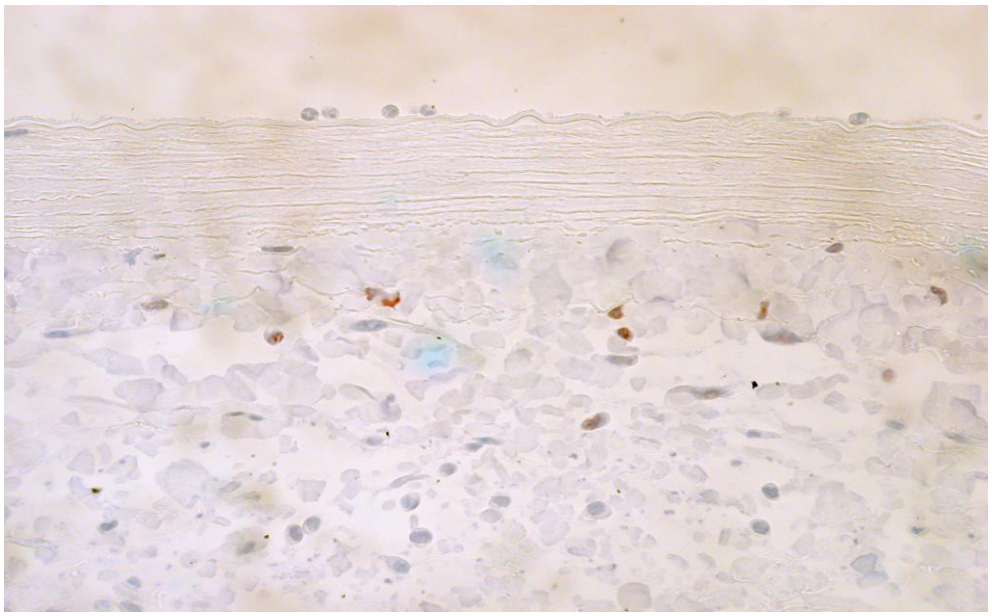


Abbildung 20: *Gefäßquerschnitt der Arteria carotis communis am Kaninchenmodell und Anfärbung nach der Ki-67-Methode zum Nachweis proliferierender Zellen aus der Bestrahlungsgruppe 3 Tage nach Ballonangioplastie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188. Wenige Ki-67-positive Zellen in der Adventitia, die Media erscheint äußerst zellarm (40-fache Vergrößerung).*

4. Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1. Tiermodell und Studiendesign

Das Kaninchenmodel wurde erstmals durch Nikolaj Anitschkow (1885-1964) als Tiermodel zur Erforschung atherosklerotischer Gefäßveränderungen beschrieben [36] und hat sich bis heute mehrfach etabliert [24, 32, 58, 71, 117, 154]. Jedoch sind die Ergebnisse, wie bei jeder tierexperimentellen Studie, auf humane Organismen nur eingeschränkt übertragbar und nur partiell repräsentativ. Das Kaninchenmodell zeichnet sich insbesondere durch die operationstechnischen und ökonomischen Vorteile im Vergleich zu größeren Versuchstierspezies, wie zum Beispiel dem Schwein, aus [139]. Die Tierhaltung gestaltet sich wenig aufwendig und auf Grund der geringen Speziesgröße bedarf es nur kleiner Räumlichkeiten für Haltung und Versuchsdurchführung. Des Weiteren ist die Züchtung der Tiere verhältnismäßig unkompliziert und daher auch aus wirtschaftlicher Sicht interessant. Die geringe Speziesgröße lässt jedoch in der Restenoseforschung Untersuchungen nur an zentralen Gefäßen zu. Dabei haben sich insbesondere die thorakale Aorta und die Arteria carotis communis bewährt. Diese Gefäße sind vom elastischen Typ mit einem hohen Elastingehalt. Im Vergleich dazu gehören die Koronararterien aller Säuger dem muskulären Typ an mit sehr geringem Elastingehalt. Diesem Bestandteil der Gefäßwandstruktur wird eine große Bedeutung an postinterventionellen Reaktionen, wie zum Beispiel dem sogenannten „recoil“ zugesprochen. Die Übertragung der Forschungsergebnisse an zentralen Gefäßen auf Koronargefäße sind also eingeschränkt [7, 108]. Eine orientierende Einschätzung und Vergleichbarkeit ist jedoch auf Grund des Vorliegens zahlreicher ähnlicher Studien am Kaninchenmodel, welches zur Arteriosklerosеforschung am häufigsten genutzt wird [5, 139, 151], dennoch möglich.

Bei dem Problem der Restenose steht unter klinischen Aspekten in erster Linie die gesteigerte Proliferation der Intima im Vordergrund. Obwohl auch in der prolifertierten Intima glatte Muskelzellen vorkommen, ist die Zellmorphologie im Vergleich zur unveränderten Gefäßwand deutlich heterogener [5, 124, 167]. Da die Empfindlichkeit auf mechanische Schädigung und radioaktive Strahlung bei

unterschiedlichen Zelltypen verschieden ist [33, 60, 79, 161, 164, 165], würden vermutlich auch die Abfolge der Apoptoseinduktion und das Ausmaß der Apoptose in den verschiedenen Zellreihen der Intima unterschiedlich ausfallen. Durch die Zunahme der Gesamtgefäßwanddicke bei entsprechend ausgebildeter Intima würde unter atherosklerotischen Veränderungen das Ausmaß der mechanischen Schädigung und die Strahlendosis entsprechend den Eigenschaften eines β-Strahlers an Media und Adventitia abnehmen [54, 117]. Dies könnte sich erheblich auf die Zellkinetik in Media und insbesondere Adventitia auswirken.

Die geringe Zahl der Versuchstiere der einzelnen Untersuchungsgruppen schränkt die allgemeine Gültigkeit der gewonnen Erkenntnisse dieser Studie natürlich ein. Um die Zellkinetik in dem geplanten Zeitraum möglichst lückenlos abzudecken, war jedoch die entsprechende Gruppenzahl notwenig. Bei beschränkter Gesamtzahl der Versuchstiere mussten geringere Gruppengrößen akzeptiert werden.

Um möglichst einheitliche Versuchsdurchführungen zu gewährleisten, wurden die operativen Eingriffe durch einen erfahrenen, mit dem Verfahren vertrauten Operateur durchgeführt. Auch die Durchführung der Färbemethoden und die Auswertungen und Ausmessungen der Gefäßschnitte wurden stets durch ein und derselben Person vorgenommen, um möglichst einheitliche Bedingungen zu gewährleisten. Dennoch bleiben Auszählung und insbesondere mikroskopische Auswertungen eine subjektive Beurteilung nach vorgegebenen objektiven Kriterien. Auch die verschiedenen Färbemethoden lassen trotz standardisierter Verfahren und Mitführung von Kontrollschnitten Abweichungen von der Idealfärbung zu.

4.1.2. Intervention und thrombotische Komplikationen

Die Ballongangioplastie/ Brachytherapie wird in der klinischen Anwendung stets an atherosklerotischen Gefäßabschnitten bzw. In-Stent-Restenosen mit langdauernder Entstehung und differenter Gefäßwandveränderungen durchgeführt. Durch das Vorhandensein atherosklerotischer Plaques kann es bei der Ballondilatation zu erheblichen Gefäßwandverletzungen kommen [21, 94, 109, 145] mit Freisetzung thrombogenen Materials. In dieser Studie wurde jedoch die Zellkinetik an gesunden, nicht sklerotischen Gefäßen untersucht. Um die möglichen Schäden eines atherosklerotischen Plaques an der Gefäßwand bei der

Durchführung der Angioplastie zu simulieren, wird bei dem Kaninchentiermodell häufig, wie auch in dieser Studie, das lokalinduktive Modell nach Baumgartner angewendet [9, 13, 34]. Dabei wird eine lokale Endotheldenudation mit einem Ballonkatheter durchgeführt. Es kommt zur Schädigung des Endothels und Präsentation thrombogenen Materials und Induktion proliferativer Mechanismen [24, 34, 119].

Ein weiterer Unterschied zur klinischen Anwendung ist der gewählte intravasale Zugang. Bei der koronaren Ballonangioplastie am Menschen wird als Standardzugang die Punktion der Arteria femoralis gewählt. Eine Freilegung des Gefäßes findet nicht statt. Für unsere Studie wurde die Arteria carotis communis gewählt, da sie leicht zugänglich ist und von ihren Ausmaßen in etwa denen einer menschlichen Koronararterie entspricht. Dies ermöglicht die Anwendung eines herkömmlichen Ballonkatheters des klinischen Alltages. Zum sicheren Einbringen des Ballonkatheters musste die Arteria carotis communis jedoch freigelegt und inzidiert werden. Daraus resultieren natürlich die Freisetzung thrombogener humoraler Faktoren und das Gefäßtrauma durch die Gefäßnaht nach Beendigung der Ballonangioplastie. Die Freilegung des Gefäßabschnittes aus der bindegewebigen Umgebung, die Gefäßwandverletzung mit Freilegung thrombogener Gefäßwandbereiche und die Gefäßnaht in unmittelbarer Nähe des Untersuchungsabschnittes und die damit verbundene geringe Reduktion des Gefäßdurchmessers an dieser Stelle könnten zu Störungen der physiologischen Abläufe führen. Insbesondere die Fließeigenschaften und mögliche intravasale Turbulenzen in Kombination mit thrombogenem Material könnten die Studienbedingungen beeinflussen. Obwohl in früheren Studien mit einer Kontrollgruppe, an der lediglich der direkte Gefäßzugang ohne weitere Intervention vorgenommen wurde, gezeigt werden konnte, dass der direkte Gefäßzugang keinen signifikanten Einfluss auf das zu untersuchende Gefäßareal bezüglich der Thrombenbildung oder Proliferationsverhanlten hat [57, 58], muss trotzdem eher mit Veränderungen der Gefäßphysiologie im Vergleich zur fernen perkutanen transluminalen Intervention gerechnet werden. Es konnten mehrfach wandständige Thromben im zu untersuchenden Gefäßabschnitt festgestellt werden. Diese Komplikationen wurden jedoch in früheren Studien auch bei dem perkutanem transluminalem Zugang beobachtet [27, 69, 86, 136, 153, 155] und sind vermutlich Folgen der unmittelbaren Ballonintervention. Im Vergleich zum

klinischen Vorgehen wurde bei unserer Studie auf das übliche Medikamentenregime zur Thrombozytenaggregationshemmung verzichtet. Des Weiteren konnten wir jedoch auch Thromben an unserer Gefäßnaht finden, selten sogar komplette Gefäßverschlüsse, beginnend an der Gefäßnaht, die mit der eigentlichen Ballonkatheteranwendung vermutlich nicht in Zusammenhang stehen und am ehesten auf den direkten Gefäßzugang zurückzuführen sind. Dies schränkt den Vergleich mit der klinischen Anwendung weiter ein. Gefäße mit ausgeprägter Thrombusbildung an der Naht wurden aus der Studie daher ausgeschlossen.

4.2. Morphometrische Ergebnisse und Zellkinetik in Media und Adventitia

In der vorliegenden Studie kam es bereits innerhalb der ersten 3 Stunden zu einem erheblichen Zellverlust in Media und Adventitia in der Kontroll- und Bestrahlungsgruppe. Dafür scheint die enorme Zunahme der Apoptoserate verantwortlich zu sein, die in beiden Untersuchungsgruppen in der Adventitia über 20% und in der Media über 40% der Zellen betraf. Da es sowohl in der Bestrahlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Apoptoserate kam, scheint die Induktion des programmierten Zelltodes in der Frühphase nach Ballongangioplastie primär durch den mechanischen Reiz bedingt zu sein. In anderen Arbeiten konnte im Tiermodel bereits gezeigt werden, dass mechanische Schäden zu einem großen Verlust von glatten Gefäßmuskelzellen und der Gesamt-DNA in der Media und Adventitia führen [8, 25, 28, 56, 68, 71, 101, 114, 120]. Dass die Apoptoserate der Adventitia in beiden Untersuchungsgruppen unter jener der Media blieb, würde ebenfalls für eine mechanische Induktion der Apoptose sprechen, da davon auszugehen ist, dass die mechanische Schädigung von der Gefäßinnenwand zur Außenwand abnimmt [117]. Es ist bekannt, dass der Zellverlust der Gefäßwand vom Ausmaß ihrer Schädigung abhängt [122]. Es wurden bereits einige komplexe Mechanismen auf molekularer Ebene in verschiedenen Arbeiten beschrieben [46, 65, 85, 117, 118, 168], die eine frühe extrazelluläre Apoptoseinduktion induzieren könnten.

Interessanterweise war bei der vorliegenden Arbeit die Gesamtzellzahl nach zwei Stunden in der Media der Bestrahlungsgruppe um über 30 % niedriger als in der Kontrollgruppe, obwohl in dieser zum selben Zeitpunkt die Apoptoserate im Vergleich zur Bestrahlungsgruppe um 26 % erhöht war. Offenbar kommt es schon

sehr früh nach der Bestrahlung zu einem Mechanismus, der die Induktion der Apoptose unterstützt, was die große Diskrepanz bei der Gesamtzellzahl nach zwei Stunden zwischen beiden Interventionsgruppen erklären könnte. Daraus lässt sich evtl. auch schließen, dass der Prozess der Apoptose sehr schnell abläuft und zu raschem Zellverlust führt. Die ionisierende Strahlung mit einer hohen Dosis scheint die Induktion der Apoptose auf verschiedene Wege einzuleiten und zu beschleunigen. Zum einen durch direkte DNA-Schäden und verschiedenen dadurch aktivierten komplexen Mechanismen, die u.a. durch das Tumorsuppressorprotein p53, das Bax-Protein [17, 99, 100, 170], und den CD95-Rezeptor [38, 72, 127, 149] getriggert werden. Zum anderen wurde von Heimovitz-Friedman et al eine direkte Interaktion der Zellmembranen von Endothelzellen der Schweineaorta mit ionisierender Strahlung beschrieben [53]. Dabei kommt es durch Hydrolyse von Sphingomyelin zu einer Bildung von Ceramid, welches die Apoptose induziert, wodurch die rasch einsetzende Apoptose ebenfalls zu erklären wäre [30, 115]. Auch freie Radikale, die Einfluß auf die Freisetzung von Kaspase- aktivierenden Faktoren haben, können den Apoptosevorgang einleiten [37, 49]. Eine zentrale Rolle bei der Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung scheint die mitochondriale Freisetzung des Cytochrom C zu sein, welches die Aktivierung der Kaspase-9 bewirkt und schließlich über weitere Signalwege zur Initiierung der Kernfragmentation führt [84, 149, 172]. Die verschiedenen zur Apoptose führenden intra- und extrazellulären Mechanismen scheinen sehr komplex und miteinander verknüpft zu sein [6, 41, 140, 143, 171] und bedürfen zum genaueren Verständnis noch weiterer Klärung. Die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf das Gewebe hängt zum einen vom Zelltyp ab, zum anderen von der Strahlendosis. Durch die Eigenschaften des β-Strahlers nahm die Dosis von der Media bis zur Adventitia deutlich ab, sodass die geringere Apoptoserate der Adventitia auch bei strahleninduziertem Zelltod erklärbar ist. Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass bei einer hohen Strahlendosis eine gewisse Anzahl der Zellen nicht durch den programmierten Zelltod, sondern durch Nekrose zu Grunde gehen [59]. Diese Zellen werden durch die hier verwandte TUNEL-Methode zum Nachweis der Apoptose nicht erfasst, tragen dennoch zur Reduktion der Gesamtzellzahl bei.

Während die Gesamtzellzahl sechs Stunden nach dem Eingriff in der Media der bestrahlten Tiere weiter abfiel, hielt sich die der Kontrolltiere etwa konstant im

Vergleich zu der Gesamtzellzahl nach drei Stunden. In beiden Versuchsgruppen, Bestrahlungs- und Kontrollgruppe, war die Apoptoserate mit 47,6 % und 39,8 % jedoch immer noch deutlich erhöht. Eine erhöhte lokale Zellproliferation, welche eine unveränderte Gesamtzellzahl bei erhöhter Apoptoserate in der Kontrollgruppe erklären könnte, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Konstanz der Gesamtzellzahl in der Kontrollgruppe trotz erhöhter Apoptoserate und normal niedriger Proliferationsrate ist nicht sicher zu erklären. Möglicherweise wird sie durch eine gesteigerte Zellmigration hervorgerufen. Dadurch würden in Apoptose befindliche Zellen durch nicht geschädigte Zellen ersetzt werden. Denkbar wäre die Migration undifferenzierter multipotenter Zellen aus dem Gefäßlumen, aus angrenzenden Vasa vasorum oder aus den distalen und proximalen angrenzenden Gefäßwandabschnitten der Media und Adventitia. Es gibt verschieden Arbeiten, die diese Theorie der immigrierenden Zellen unterstützen [10, 87, 90, 131, 160, 169]. Dabei werden unter anderem dendritischen Zellen und undifferenzierten Zellen des hämatopoetischen Systems die Fähigkeit zu Migration aus dem Gefäßlumen zugesagt [20, 138, 141]. Eine verminderte Perfusion des betroffenen bestrahlten Gefäßes könnte daher zu einer Störung der zellulären Migrationsvorgänge nach Gefäßwandschädigung und so bei weiterhin hoher Apoptoserate zu einer weiteren Reduktion des Gesamtzellpools nach Brachytherapie führen [76]. Es wurden erhebliche Perfusionsstörungen durch Gefäßspasmen beobachtet, die bei Anwendung einer hohen intravasalen Strahlendosis auftraten [15, 128, 158]. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass der Einfluss der vorübergehenden Perfusionsstörung auf die Gesamtzellzahl nur gering ist. Im Widerspruch zur Zellmigration aus dem Gefäßlumen stehen eigene Beobachtungen aus einer Arbeit der intravasalen Brachytherapie in-vitro am Organkulturmodell. Auch hier scheint die Zellmigration einen entscheidenden Faktor darzustellen bei nicht nachweisbarer Proliferation, ein systemischer Einfluss aus der Blutbahn konnte hier jedoch modellbedingt ausgeschlossen werden.

Sicher scheint, dass es bei der Schädigung und Irritation der Gefäßwand durch eine Ballonangioplastie zu einer Auslösung verschiedenster entzündlicher Reaktionen kommt [45, 82, 87, 111, 130, 170]. Unter anderem fand Finkelstein et al. in einer Studie heraus, dass die Expression von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem-Faktor (M-CSF), ein proinflammatorisches Protein, das die

Differenzierung und Proliferation von Makrophagen und glatten Muskelzellen reguliert und eine wichtige Rolle bei der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen zu spielen scheint [61, 147], bereits 24 Stunden nach Ballonangioplastie im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ist. Diese Expression von M-CSF wird durch intracoronare Brachytherapie deutlich vermindert [35]. Vermutlich setzt die Induktion proinflammatorischer Faktoren unmittelbar nach dem schädigenden Ereignis ein und führt sehr früh zur Bereitstellung proliferierter Zellen in dem geschädigten Gefäßareal [144]. Dieser Sachverhalt wurde in unserer Studie nicht untersucht, würde jedoch die Konstanz der Gesamtzellzahl in der Kontrollgruppe nach 6 Stunden, bzw. den weiteren Verlust in der Bestrahlungsgruppe erklären.

Die verschiedenen Thesen zur Zellmigration scheinen sehr komplex, werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert und sind Gegenstand verschiedener aktueller Studien. Möglicherweise liegt auch eine Kombination verschiedener Migrationswege vor. Weitere Arbeiten zur Klärung dieser Thesen sollten angestrebt werden.

Dem immensen Zellverlust in der Media beider Beobachtungsgruppen in den ersten Stunden nach der Intervention steht ein Proliferationsanstieg nach 12 Stunden gegenüber. Ob die gesteigerte Proliferation durch bereits vorhandene Zellen bedingt ist, oder ob zur Zellproliferation „externe“ Zellen eingewandert sind, ist in dieser Arbeit nicht geklärt. Wie dem auch sei, die erhöhte Proliferationsrate führt in der Media zu einer leichten Zunahme der Gesamtzellzahl bei noch erhöhter Apoptoserate. Bereits 24 Stunden nach der Intervention ist die vermehrte Proliferation der Media in beiden Tiergruppen wieder auf unter 1 % gesunken. Es scheint ein sensibles Gleichgewicht zwischen proliferationsfördernden und proliferationshemmenden Mechanismen zu geben, die bereits bei geringen Veränderungen eine erhebliche zellkinetische Wirkung zur Folge haben. Andere Arbeiten lassen vermuten, dass die Regulationsmechanismen für Proliferation und Apoptose in engem Zusammenhang stehen [31, 83]. Möglicherweise führt auch die stark verminderte Zelldichte der Media zu einem neuen Proliferationsreiz, der bereits nach kurzer Zeit wieder unterdrückt wird [42, 47, 62, 105, 150]. Eine konkrete Ursache für den Proliferationsanstieg ist jedoch noch nicht erkannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Nach 3 Tagen kam es in der Kontrollgruppe zu einem starken Anstieg der Proliferationsrate, in der Media auf über 15 % und in der Adventitia auf über 25 %. Die Proliferation in der Bestrahlungsgruppe nahm auch etwas zu, jedoch deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Hinzu kam die nun deutlich reduzierte Apoptoserate im Vergleich zu früheren Untersuchungszeiträumen. Es kam daher in der Kontrollgruppe in beiden Gefäßwandabschnitten zu einem enormen Zuwachs der Zellzahl, vermutlich durch Proliferation und evtl. auch Zellmigration bedingt. Entsprechend der deutlichen Zunahme der Gesamtzellzahl kam es auch zu einem Anstieg der Gefäßwandflächen. Diese Zunahme der Zellzahl blieb bei der Bestrahlungsgruppe aus. Wie bereits schon in vielen anderen Studien gezeigt [153, 157, 166] hemmt die Bestrahlung mit dem β-Strahler Rhenium-188 die proliferation- und/ oder migrationsfördernden Mechanismen und damit die Zunahme der Gesamtzellzahl bereits nach 3 Tagen deutlich.

4.3. Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass bereits 2 Stunden nach einer Ballonangioplastie eine enorme Apoptoseinduktion statt gefunden hat mit folgender deutlicher Reduktion der Gesamtzellzahl in Media und Adventitia des intervenierten Gefäßabschnittes. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten [56, 114] und identifiziert die mechanische Irritation als Apoptoseinduktor [68, 101]. Dabei sind die genauen Regelmechanismen noch nicht genau verstanden. Die radioaktive Bestrahlung mit dem β-Strahler wirkt in dieser Arbeit additiv auf die Apoptose, sie führt nach 3 Stunden jedoch nicht zu einem signifikant höheren Zellverlust. Auch die strahleninduzierte Apoptose scheint sehr komplex [37, 38, 171, 172] und bedarf zum genaueren Verständnis weiterer Forschung. Die enorme Apoptoserate führte innerhalb der ersten 3 Stunden nach Intervention zu einem Untergang von ungefähr der Hälfte aller Zellen in Media und Adventitia beider Untersuchungsgruppen. Bei weiterhin erhöhter Apoptoserate wird nach 6 bis 12 Stunden ein Persistieren bzw. ein Anstieg der Gesamtzellzahl in der Gruppe ohne Bestrahlung beobachtet. Eine lokale Zellteilung findet jedoch nicht statt. Woher die Zellen tatsächlich stammen und welche Regelmechanismen dafür verantwortlich sind, kann mit der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Die Zellmigration scheint eine mögliche Ursache zu sein [10, 131, 169], und sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden. Welche zellkinetischen Vorgänge für diese

Beobachtung auch in Frage kommen, sie werden wesentlich durch die Bestrahlung mit dem β-Strahler Rhenium-188 unterdrückt. Erste Proliferationsnachweise lassen sich frühestens 12 Stunden nach Intervention nachweisen, wobei der wesentliche Anstieg mit deutlicher Zunahme der Gesamtzellzahl erst nach 3 Tagen in Media und Adventitia der Kontrollgruppe zu verzeichnen ist. Die lokale Proliferation wird durch die Bestrahlung bereits in der Frühphase nach Ballonangioplastie signifikant gehemmt und bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten [154, 157, 166]. Dabei bleibt festzuhalten, dass die genauen Mechanismen der Proliferationshemmung weiterhin unklar sind. Eine direkte Hemmung der Proliferation durch die Bestrahlung scheint unwahrscheinlich, da die Strahlungsquelle bei Einsetzen der Proliferation längst entfernt wurde. Vielmehr scheint die Bestrahlung ein schnelles Wiederauffüllen der zugrunde gegangenen Zellen zu blockieren, die in der Kontrollgruppe vermutlich durch Zelleinwanderung ersetzt werden und den folgenden Proliferationsanstieg bewirken. Auch eine Hemmung entzündlicher Reaktionen als möglicher Proliferationsreiz könnte für den zu beobachtenden Effekt verantwortlich sein [35]. Es bedarf weiteren Untersuchungen um zu klären, welche Zellen nach Angioplastie proliferieren und woher sie stammen.

Die Arbeit zeigte wie bereits andere zuvor, dass die Anwendung des flüssigen β-Strahlers Rhenium-188 sicher und für die Reduktion der Restenose geeignet ist, auch in der klinischen Anwendung [64, 67, 80, 91, 156]. Dennoch wird die intracoronare Brachytherapie in Zukunft klinisch vermutlich nur in Ausnahmefällen bzw. bei in-stent Restenosen zum Einsatz kommen bzw. zur Grundlagenforschung herangezogen werden. Die Durchführung der Brachytherapie mit dem β-Strahler Rhenium-188 setzt eine nuklearmedizinische Abteilung voraus, die in der Lage ist, Rhenium zu eluieren [75]. Ein Transport einer entfernten Nuklearmedizin ist ungeeignet, da Rhenium-188 mit einer Halbwertszeit von 17 Stunden relativ rasch an Aktivität verliert. Dies würde zu einer längeren Katheterliegezeit führen, um die entsprechende lokale Strahlendosis zu erreichen. Des Weiteren müssen bei allen Anwendungen die Sicherheitsrichtlinien für den Umgang mit radioaktivem Material beachtet und eingehalten werden. Zuletzt stehen noch andere Methoden zur Reduktion der Restenose zur Verfügung. Insbesondere die drug-eluting stents (DES) haben in der klinischen Anwendung große Vorteile im Vergleich zur Brachytherapie und erzielen eine im klinischen Alltag ausreichende Reduktion der

Restenoserate [103, 104, 107, 113, 146]. Insbesondere die Handhabung erweist sich als deutlich einfacher als die Arbeit mit dem β-Strahler Rhenium-188. Des Weiteren liegt keine wesentliche zeitliche Abhängigkeit von Herstellung und Anwendung vor, wie dies bei der Brachytherapie mit Rhenium-188 der Fall ist. Eine Vorhaltung dieser Stents ist wie bisher möglich, und damit sind sie auch für die Akuttherapie geeignet, was mit Rhenium-188 nicht möglich ist. Auf Grund der Möglichkeit, DES in jedem herkömmlichen Herzkatheterlabor einzusetzen, unabhängig von einer Nuklearmedizin und von zeitlichen Faktoren und ohne weitere Sicherheitsvorschriften, haben sich DES gegenüber der Brachytherapie im klinischen Alltag durchgesetzt. Die Brachytherapie mit dem β-Strahler Rhenium-188 hat in der klinischen Anwendung lediglich in einzelnen Ausnahmefällen, zum Beispiel bei wiederholten Restenosen und In-Stent-Restenosen [14, 121, 129] noch eine Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Die Restenose stellt trotz rasanter technischer Entwicklungen und regelhafter medikamentöser Therapie weiterhin ein wesentliches Problem der perkutanen transluminalen Coronarangioplastie und Stentimplantation dar. Es wurden verschiedene Methoden zur Behandlung einer entstandenen Restenose entwickelt, wie zum Beispiel die Rotablation, der Excimer-Laser oder der Cutting-Ballon. Die Brachytherapie mit dem β-Strahler Rhenium-188 führt zu einer Reduktion der Restenoserate, wobei die dafür verantwortlichen Mechanismen noch nicht bekannt sind. Wesentliche Veränderungen in der Gefäßwand werden jedoch sehr früh nach der Bestrahlung des betroffenen Areals angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung nach den zellkinetischen und morphologischen Veränderungen in Media und Adventitia in der Frühphase und im weiteren zeitlichen Verlauf nach Brachytherapie mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 im Vergleich zur alleinigen Ballonangioplastie am Kaninchenmodell untersucht. Hierzu wurde an 87 Tieren eine Gefäßdenudation an der rechten Arteria carotis communis vorgenommen und anschließend ein Ballonkatheter in dem Denudationsareal platziert. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde dieser Ballon mit 0.9 % Kochsalzlösung oder mit dem flüssigen β-Strahler Rhenium-188 gefüllt. Die Gefäße wurden den Zeiteinteilungen entsprechend nach 2, 3, 6, 12, 24 und 72 Stunden entnommen und histologisch aufgearbeitet. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Gefäßschnitte nach der Hämalaun-Eosin-Methode angefärbt zur morphometrischen Beurteilung der Gefäßwandschichten die Elastika-van-Gieson-Färbung. Die anschließende Ausmessung der Wandschichten erfolgte an einem computergestützten Digitalisierungsbrett. Die quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen wurde durch die TUNEL-Methode (TDT-mediated dUTP-flurescein nick end labeling) möglich. Im Verhältnis zur Gesamtzellzahl konnte so die Apoptoserate bestimmt werden. Die Erfassung proliferierender Zellen gelang mit dem Nachweis des Ki-67-Antigen.

Bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl zeigte sich bereits 3 Stunden nach Intervention ein Zellverlust der Media in der Kontrollgruppe und Bestrahlungsgruppe um fast die Hälfte. Während im weiteren Verlauf die Zellzahl der Media bei der Bestrahlungsgruppe weiter abnahm, kam es in der Kontrollgruppe zu einer Zunahme der Gesamtzellzahl. In der Kontrollgruppe kam es im weiteren Verlauf zu einer deutlichen Zunahme der Gesamtzellzahl nach 3

Tagen, während sich die Zellzahl nach Bestrahlung kaum änderte. Morphometrisch kam es in der Media der Bestrahlungsgruppe zu keiner wesentlichen Änderung. Bei der Kontrollgruppe zeigte sich tendenziell eine Zunahme der Mediafläche, die nach 3 Tagen am stärksten ausfiel. Eine erhöhte Apoptoserate konnte sowohl in der Media, als auch in der Adventitia bereits 2 Stunden nach der Intervention festgestellt werden. Ein relevanter Unterschied zwischen Bestrahlungsgruppe und Kontrolle bestand nicht. Nach einem Tag konnte keine gesteigerte Apoptose mehr festgestellt werden. Ein erster Proliferationsgipfel lässt sich nach 12 Stunden in der Media feststellen, wobei die Rate in der Gruppe der bestrahlten Tiere höher ist. Nach einem Sistieren der Proliferation nach einem Tag kommt es am 3. Tag zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation in Media und Adventitia der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Untersuchung einen massiven Zellverlust innerhalb der ersten 3 Stunden in Media und Adventita, wobei der Effekt in der Media deutlicher ist. Es kommt sowohl bei der Bestrahlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe zu dem starken Zellverlust. Der mechanische Reiz der Gefäßwand bei einer Ballondilatation scheint der Hauptinduktor der Apoptose zu sein. Nach Brachytherapie fällt dieser Zellverlust jedoch stärker aus, möglicherweise durch die addiditiv wirkende strahleninduzierte Apoptose bedingt. Ob dieses Phänomen entscheidende Auswirkung für die weitere Zellkinetik im Sinne einer Reduktion der potentiell proliferationsfähigen Zellen hat, ist momentan noch nicht endgültig zu klären. Im weiteren Verlauf bleibt die Gesamtzellzahl der Media der Kontrollgruppe konstant bei weiterhin hoher Apoptose und noch ausbleibender Proliferation. Dies lässt vermuten, dass es zu einem Auffüllen des Zellverlustes kommt, ohne dass sich vor Ort befindliche Zellen teilen. Eine Zellmigration aus dem Gefäßlumen wäre eine mögliche Erklärung. Eine genauere Differenzierung der proliferierenden Zellen könnte Aufschluss auf diese Frage geben. Die starke Proliferation am Ende des Untersuchungszeitraumes nach 3 Tagen in der Kontrollgruppe wird durch die Bestrahlung mit dem β-Strahler Rhenium-188 effektiv gehemmt.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass im Restenoseprozess nach Ballonangioplastie bereits in der unmittelbaren Frühphase die proliferative Reaktion der Gefäßwand getriggert wird. Dabei handelt es sich um einen zweigipfeligen Verlauf, der durch eine lokale Brachytherapie überwiegend im 2. Proliferationsgipfel entscheidend beeinflusst wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Adamian M, Colombo A, Briguori C, Nishida T, Marsico F, Di Mario C, Albiero R, Moussa I, Moses JW. Cutting balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis: a matched comparison with rotational atherectomy, additional stent implantation and balloon angioplasty. J Am Coll Cardiol 38: 672-679 (2001)

2. Afanasyev VN, Korol BA, Matylevich NP, Pechatnikov VA, Umansky SR. The use of flow cytometry for the investigation of cell death. Cytometry 14: 603-609 (1993)

3. Albiero R, Silber S, Di Mario C, Cernigliaro C, Battaglia S, Reimers B, Frasheri A, Klauss V, Auge JM, Rubartelli P, Morice MC, Cremonesi A, Schofer J, Bortone A, Colombo A. Cutting balloon versus conventional balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis: results of the restenosis cutting balloon evaluation trial (RESCUT). J Am Coll Cardiol 43: 943-649 (2004)

4. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am J Pathol 136: 593-608 (1990)

5. Armstrong ML, Heistad DD. Animal models of atherosclerosis. Atherosclerosis 85: 15-23 (1990)

6. Baatout S, Derradji H, Petitfour O, von Suchodoletz H, Mergeay M. Mechanisms of radio-induced apoptosis. Can J Physiol Pharmacol 80: 629-637 (2002)

7. Badimon JJ, Ortiz AF, Meyer B, Mailhac A, Fallon JT, Falk E, Badimon L, Chesebro JH, Fuster V. Different response to balloon angioplasty of carotid and coronary arteries: effects on acute platelet deposition and intimal thickening. Atherosclerosis 140: 307-314 (1998)

8. Baumgartner HR, Studer A. Controlled over-dilatation of the abdominal aorta in normo- and hypercholesteremic rabbits. Pathol Microbiol 26: 129-148 (1963)

9. Baumgartner HR, Studer A. Effects of vascular catheterization in normo- and hypercholesteremic rabbits. Pathol Microbiol 29: 393-405 (1966)

10. Bauriedel G, Jabs A, Skowasch D, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V, Welsch U, Luderitz B. Dendritic cells in neointima formation after rat carotid balloon injury: coordinated expression withanti-apoptotic Bcl-2 and HSP47 in arterial repair. J Am Coll Cardiol 42: 930-938 (2003)

11. Bertrand ME, Lablanche JM, Fourrier JL, Gommeaux A, Ruel M. Relation to restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty to vasomotion of the dilated coronary arterial segment. Am J Cardiol 63: 277-281 (1989)

12. Bittl JA. Clinical results with excimer laser coronary angioplasty. Semin Interv Cardiol 1: 129-134 (1996)

13. Block PC, Baughman KL, Pasternak RC, Fallon JT. Transluminal angioplasty: correlation of morphologic and angiographic findings in an experimental model. Circulation 61: 778-785 (1980)

14. Bonvini RF, Hendiri T, Leo G, Aeby N, Noble J, Sigwart U, Verin V. Feasibility and safety of intra-coronary Beta irradiation with 144Ce/Pr for prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty of in-stent restenotic lesions. Acute Card Care 8: 217-223 (2006)

15. Bourlier V, Diserbo M, Joyeux M, Ribuot C, Multon E, Gourmelon P, Verdetti J. Early effects of acute gamma-radiation on vascular arterial tone. Br J Pharmacol 123: 1168-1172 (1998)

16. Brenner DJ, Miller RC. Long-term efficacy of intracoronary irradiation in inhibiting in-stent restenosis. Circulation 103: 1330-1332 (2001)

17. Bristow RG, Benchimol S, Hill RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. Radiother Oncol 40: 197-223 (1996)

18. Brueck M, Scheinert D, Wortmann A, Bremer J, von Korn H, Klinghammer L, Kramer W, Flachskampf FA, Daniel WG, Ludwig J. Direct coronary stenting versus predilatation followed by stent placement. Am J Cardiol 90: 1187-1192 (2002)

19. Bryson GJ, Harmon BV, Collins RJ. A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment. Immunol Cell Biol 72: 35-41 (1994)

20. Campbell JH, Han CL, Campbell GR. Neointimal formation by circulating bone marrow cells. Ann N Y Acad Sci 947: 18-25 (2001)

21. Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. J Am Coll Cardiol 24: 1398-1405 (1994)

22. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. Circulation 86: 723-729 (1992)

23. Cin VG, Pekdemir H, Akkus MN, Camsari A, Doven O, Yenihan S. Cutting balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis in diabetics: A matched comparison of 6 months' outcome with conventional balloon angioplasty. Angiology 57: 445-452 (2006)

24. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab Invest 49: 327-333 (1983)

25. Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. Circ Res 56: 139-145 (1985)

26. Condado JA, Waksman R, Gurdiel O, Espinosa R, Gonzalez J, Burger B, Villoria G, Acquatella H, Crocker IR, Seung KB, Liprie SF. Long-term angiographic and clinical outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty and intracoronary radiation therapy in humans. Circulation 96: 727-732 (1997)

27. Costa MA, Sabate M, van der Giessen WJ, Kay IP, Cervinka P, Ligthart JM, Serrano P, Coen VL, Levendag PC, Serruys PW. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. Circulation 100: 789-792 (1999)

28. Couffinhal T, Dufourcq P, Jaspard B, Daret D, Allieres C, Alzieu P, Serre P, Bonnet J, Duplaa C. Kinetics of adventitial repair in the rat carotid model. Coron Artery Dis 12: 635-648 (2001)

29. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry 13: 795-808 (1992)

30. Deng X, Yin X, Allan R, Lu DD, Maurer CW, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Shaham S, Kolesnick R. Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of C. elegans. Science 322: 110-115 (2008)

31. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell 69: 119-128 (1992)

32. Fang SM, Zhang QH, Jiang ZX. Developing a novel rabbit model of atherosclerotic plaque rupture and thrombosis by cold-induced endothelial injury. J Biomed Sci 16: 39 (2009)

33. Fareh J, Martel R, Kermani P, Leclerc G. Cellular effects of beta-particle delivery on vascular smooth muscle cells and endothelial cells: a dose-response study. Circulation 99: 1477-1484 (1999)

34. Faxon DP, Sanborn TA, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Restenosis following transluminal angioplasty in experimental atherosclerosis. Arteriosclerosis 4: 189-195 (1984)

35. Finkelstein A, Makkar R, Doherty TM, Vegesna VR, Tripathi P, Liu M, Bergman J, Fishbein M, Hausleiter J, Takizawa K, Rukshin V, Shah PK, Rajavashisth TB. Increased expression of macrophage colony-stimulating factor after coronary artery balloon injury is inhibited by intracoronary brachytherapy. Circulation 105: 2411-2415 (2002)

36. Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. Atherosclerosis 135: 1-7 (1997)

37. Friesen C, Lubatschofski A, Glatting G, Debatin KM, Reske SN. Activation of intrinsic apoptotic pathway by Re-188 irradiation and paclitaxel in coronary artery smooth muscle cells. Q J Nucl Med Mol Imaging 52: 289-295 (2008)

38. Friesen C, Lubatschofski A, Kotzerke J, Buchmann I, Reske SN, Debatin KM. Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells. Eur J Nucl Med Mol Imaging 30: 1251-1261 (2003)

39. Gajdusek CM, Tian H, London S, Zhou D, Rasey J, Mayberg MR. Gamma radiation effect on vascular smooth muscle cells in culture. Int J Radiat Oncol Biol Phys 36: 821-828 (1996)

40. Gambhir DS, Singh S, Sinha SC, Kaul UA, Arora R. High speed rotational atherectomy for diffuse in-stent restenosis: short- and mid-term follow-up results. Indian Heart J 51: 41-46 (1999)

41. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501 (1992)

42. George SJ, Beeching CA. Cadherin:catenin complex: a novel regulator of vascular smooth muscle cell behaviour. Atherosclerosis 188: 1-11 (2006)

43. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133: 1710-1715 (1984)

44. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol 138: 867-873 (1991)

45. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. Cell 104: 503-516 (2001)

46. Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper RI, Davis RJ, Harlow E, Sanchez I. Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 3302-3307 (1997)

47. Goodman LV, Majack RA. Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor-beta receptor phenotypes as a function of cell density in culture. J Biol Chem 264: 5241-5244 (1989)

48. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474-475 (1982)

49. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 281: 1309-1312 (1998)

50. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. J Am Coll Cardiol 35: 157-163 (2000)

51. Gruentzig AR, King SB, 3rd, Schlumpf M, Siegenthaler W. Long-term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The early Zurich experience. N Engl J Med 316: 1127-1132 (1987)

52. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem 27: 1131-1139 (1979)

53. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med 180: 525-535 (1994)

54. Hall EJ, Miller RC, Brenner DJ. Radiobiological principles in intravascular irradiation. Cardiovasc Radiat Med 1: 42-47 (1999)

55. Hamburger JN, Foley DP, de Feyter PJ, Wardeh AJ, Serruys PW. Six-month outcome after excimer laser coronary angioplasty for diffuse in-stent restenosis in native coronary arteries. Am J Cardiol 86: 390-394 (2000)

56. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liau G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. Am J Pathol 147: 267-277 (1995)

57. Hanke H, Haase KK, Hanke S, Oberhoff M, Hassenstein S, Betz E, Karsch KR. Morphological changes and smooth muscle cell proliferation after experimental excimer laser treatment. Circulation 83: 1380-1389 (1991)

58. Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. Circ Res 67: 651-659 (1990)

59. Harms-Ringdahl M, Nicotera P, Radford IR. Radiation induced apoptosis. Mutat Res 366: 171-179 (1996)

60. Henning E, Dittmann H, Wiskirchen J, Bantleon R, Kehlbach R, Claussen CD, Duda SH. Dose dependent effects of the combined beta-gamma-emitter 188Rhenium on the growth of human vessel wall cells. Rofo 176: 404-408 (2004)

61. Herembert T, Gogusev J, Zhu DL, Drueke TB, Marche P. Control of vascular smooth-muscle cell growth by macrophage-colony-stimulating factor. Biochem J 325: 123-128 (1997)

62. Hneino M, Bouazza L, Bricca G, Li JY, Langlois D. Density-dependent shift of transforming growth factor-beta-1 from inhibition to stimulation of vascular smooth muscle cell growth is based on unconventional regulation of proliferation, apoptosis and contact inhibition. J Vasc Res 46: 85-97 (2009)

63. Hoher M, Wohrle J, Wohlfrom M, Hanke H, Voisard R, Osterhues HH, Kochs M, Reske SN, Hombach V, Kotzerke J. Intracoronary beta-irradiation with a liquid (188)re-filled balloon: six-month results from a clinical safety and feasibility study. Circulation 101: 2355-2360 (2000)

64. Hoher M, Wohrle J, Wohlfrom M, Kamenz J, Nusser T, Grebe OC, Hanke H, Kochs M, Reske SN, Hombach V, Kotzerke J. Intracoronary beta-irradiation with a rhenium-188-filled balloon catheter: a randomized trial in patients with de novo and restenotic lesions. Circulation 107: 3022-3027 (2003)

65. Holm AM, Andersen CB, Haunso S, Hansen PR. Effects of L-arginine on vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis after balloon injury. Scand Cardiovasc J 34: 28-32 (2000)

66. Holmes DR, Jr. In-stent restenosis. Rev Cardiovasc Med 2: 115-119 (2001)

67. Holmes DR, Jr., Teirstein PS, Satler L, Sketch MH, Jr., Popma JJ, Mauri L, Wang HP, Schleckser PA, Cohen SA. 3-year follow-up of the SISR (Sirolimus-Eluting Stents Versus Vascular Brachytherapy for In-Stent Restenosis) trial. JACC Cardiovasc Interv 1: 439-448 (2008)

68. Jamal A, Bendeck M, Langille BL. Structural changes and recovery of function after arterial injury. Arterioscler Thromb 12: 307-317 (1992)

69. Jaster M, Fuster V, Rosenthal P, Pauschinger M, Tran QV, Janssen D, Hinkelbein W, Schwimmbeck P, Schultheiss HP, Rauch U. Catheter based intracoronary brachytherapy leads to increased platelet activation. Heart 90 : 160-164 (2004)

70. Jensen LO, Thayssen P, Kassis E, Rasmussen K, Saunamaki K, Thuesen L. Percutaneous coronary intervention in Denmark from 1989 to 1998. Results from the Danish PTCA registry. Ugeskr Laeger 165: 2809-2812 (2003)

71. Kamenz J, Seibold W, Wohlfrom M, Hanke S, Heise N, Lenz C, Hanke H. Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. Cardiovasc Res 45: 766-776 (2000)

72. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 51: 6304-6311 (1991)

73. Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. J Immunol Methods 177: 113-117 (1994)

74. King SB, 3rd, Williams DO, Chougule P, Klein JL, Waksman R, Hilstead R, Macdonald J, Anderberg K, Crocker IR. Endovascular beta-radiation to reduce restenosis after coronary balloon angioplasty: results of the beta energy restenosis trial (BERT). Circulation 97: 2025-2030 (1998)

75. Knapp FF, Jr., Beets AL, Guhlke S, Zamora PO, Bender H, Palmedo H, Biersack HJ. Availability of rhenium-188 from the alumina-based tungsten-188/rhenium-188 generator for preparation of rhenium-188-labeled radiopharmaceuticals for cancer treatment. Anticancer Res 17: 1783-1795 (1997)

76. Kohler TR, Jawien A. Flow affects development of intimal hyperplasia after arterial injury in rats. Arterioscler Thromb 12: 963-971 (1992)

77. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. Circulation 98: 224-233 (1998)

78. Koster R, Kahler J, Terres W, Reimers J, Baldus S, Hartig D, Berger J, Meinertz T, Hamm CW. Six-month clinical and angiographic outcome after successful excimer laser angioplasty for in-stent restenosis. J Am Coll Cardiol 36: 69-74 (2000)

79. Kotzerke J, Gertler R, Buchmann I, Baur R, Hombach V, Norbert Reske S, Voisard R. Different radiosensitivity of smooth muscle cells and endothelial cells in vitro as demonstrated by irradiation from a Re-188 filled balloon catheter. Atherosclerosis 152: 35-42 (2000)

80. Kotzerke J, Hanke H, Hoher M. Endovascular brachytherapy for the prevention of restenosis after angioplasty. Eur J Nucl Med 27: 223-236 (2000)

81. Kotzerke J, Rentschler M, Glatting G, Schneider E, Stabin M, Knapp FF, Jr., Reske SN. Dosimetry fundamentals of endovascular therapy using Re-188 for the prevention of restenosis after angioplasty. Nuklearmedizin 37: 68-72 (1998)

82. Kozinski M, Sukiennik A, Rychter M, Kubica J, Sinkiewicz W. Restenosis after coronary angioplasty: pathomechanism and potential targets for

therapeutic intervention. Focus on inflammation. Postepy Hig Med Dosw 61: 58-73 (2007)

83. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. FASEB J 9: 1277-1287 (1995)

84. Labedzka K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondria and cell death. Postepy Hig Med Dosw 60: 439-446 (2006)

85. Lambert DL, Malik N, Shepherd L, Gunn J, Francis SE, King A, Crossman DC, Cumberland DC, Holt CM. Localization of c-Myb and induction of apoptosis by antisense oligonucleotide c-Myb after angioplasty of porcine coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 1727-1732 (2001)

86. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE. Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. N Engl J Med 344: 250-256 (2001)

87. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 420: 868-874 (2002)

88. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. Circulation 86: 47-52 (1992)

89. Liu MW, Roubin GS, King SB, 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. Circulation 79: 1374-1387 (1989)

90. Mackenzie JR, Hackett M, Topuzlu C, Tibbs DJ. Origin of arterial prosthesis lining from circulating blood cells. Arch Surg 97: 879-885 (1968)

91. Maeder MT, Pfisterer ME, Buser PT, Roser HW, Roth J, Weilenmann D, Nietlispach FP, Zellweger MJ, Amsler B, Kaiser CA. Long-term outcomes after intracoronary Beta-irradiation for in-stent restenosis in bare-metal stents. J Invasive Cardiol 20: 179-184 (2008)

92. Mattos LA, Sousa AG, Pinto IM, Silva ER, Carneiro JK, Sousa JE, Mangione JA, Caramori P, Lima V, Bueno RL. A comparison of rescue and primary percutaneous coronary interventions for acute myocardial infarction: a multicenter registry report of 9,371 patients. Arq Bras Cardiol 82: 440-444 (2004)

93. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. Histopathology 22: 355-360 (1993)

94. Meerkin D, Lee SH, Tio FO, Grube E, Wong SC, Hong MK. Effects of focused force angioplasty: pre-clinical experience and clinical confirmation. J Invasive Cardiol 17: 203-206 (2005)

95. Mehran R, Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Mechanisms and results of balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis. Am J Cardiol 78: 618-622 (1996)

96. Mehran R, Mintz GS, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Bucher TA, Popma JJ, Leon MB. Treatment of in-stent restenosis with excimer laser coronary angioplasty: mechanisms and results compared with PTCA alone. Circulation 96: 2183-2189 (1997)

97. Mintz GS, Hoffmann R, Mehran R, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. In-stent restenosis: the Washington Hospital Center experience. Am J Cardiol 81: 7-13 (1998)

98. Mintz GS, Mehran R, Waksman R, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Leon MB. Treatment of in-stent restenosis. Semin Interv Cardiol 3: 117-121 (1998)

99. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene 9: 1799-1805 (1994)

100. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80: 293-299 (1995)

101. More RS, Rutty G, Underwood MJ, Brack MJ, Gershlick AH. A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. J Pathol 172: 287-292 (1994)

102. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. Am J Cardiol 84: 462-466 (1999)

103. Morice MC, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, Sousa E, Stoll HP. Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial. JAMA 295: 895-904 (2006)

104. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. N Engl J Med 346: 1773-1780 (2002)

105. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. Cell 63: 245-247 (1990)

106. Moses JW, Kipshidze N, Leon MB. Perspectives of drug-eluting stents: the next revolution. Am J Cardiovasc Drugs 2: 163-172 (2002)

107. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. N Engl J Med 349: 1315-1323 (2003)

108. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. J Am Coll Cardiol 19: 418-432 (1992)

109. Najarian S, Sharifzadeh H. Effects of balloon inflation on the atherosclerotic plaque. Biomed Sci Instrum 37: 337-341 (2001)

110. O'Brien ER, Glover C, Labinaz M. Acute outcome with the flexicut directional coronary atherectomy catheter for the treatment of coronary in-stent restenosis. J Invasive Cardiol 13: 618-622 (2001)

111. Okamoto E, Couse T, De Leon H, Vinten-Johansen J, Goodman RB, Scott NA, Wilcox JN. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. Circulation 104: 2228-2235 (2001)

112. Ong AT, Hoye A, Aoki J, van Mieghem CA, Rodriguez Granillo GA, Sonnenschein K, Regar E, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, de Jaegere PP, de Feyter P, van Domburg RT, Serruys PW. Thirty-day incidence and six-month clinical outcome of thrombotic stent occlusion after bare-metal, sirolimus, or paclitaxel stent implantation. J Am Coll Cardiol 45: 947-953 (2005)

113. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, Lee CW, Choi D, Jang Y, Lam R, Weissman NJ, Mintz GS. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. N Engl J Med 348: 1537-1545 (2003)

114. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. Circulation 95: 981-987 (1997)

115. Pilane CM, LaBelle EF. NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase. J Cell Physiol 199: 310-315 (2004)

116. Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, Bell JA, Elston CW, Nicholson R, Robertson JF, Blamey RW, Ellis IO. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. Br J Cancer 71: 146-149 (1995)

117. Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. Circ Res 84: 113-121 (1999)

118. Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. J Biol Chem 272: 21388-21395 (1997)

119. Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. Lab Invest 44: 301-308 (1981)

120. Reis ED, Roque M, Cordon-Cardo C, Drobnjak M, Fuster V, Badimon JJ. Apoptosis, proliferation, and p27 expression during vessel wall healing: time course study in a mouse model of transluminal femoral artery injury. J Vasc Surg 32: 1022-1029 (2000)

121. Reynen K, Kockeritz U, Kropp J, Wunderlich G, Knapp FF, Schmeisser A, Strasser RH. Intracoronary radiotherapy with a (188)rhenium liquid-filled PTCA balloon system in in-stent restenosis: acute and long-term angiographic results, as well as 1-year clinical follow-up. Int J Cardiol 95: 29-34 (2004)

122. Rivard A, Luo Z, Perlman H, Fabre JE, Nguyen T, Maillard L, Walsh K. Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous gene transfer to the vessel wall. Hum Gene Ther 10: 711-721 (1999)

123. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 340: 115-126 (1999)

124. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. N Engl J Med 314: 488-500 (1986)

125. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature 362: 801-809 (1993)

126. Sanchez PL, Rodriguez-Alemparte M, Colon-Hernandez PJ, Pomerantsev E, Inglessis I, Mahdi NA, Leinbach RC, Palacios IF. Directional coronary atherectomy vs. rotational atherectomy for the treatment of in-stent restenosis of native coronary arteries. Catheter Cardiovasc Interv 58: 155-161 (2003)

127. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J 17: 1675-1687 (1998)

128. Scheinert D, Strnad V, Muller R, Burckhard R, Ropers S, Sauer R, Daniel WG, Bonan R, Ludwig J. High-dose intravascular beta-radiation after de novo stent implantation induces coronary artery spasm. Circulation 105: 1420-1423 (2002)

129. Schiele TM, Konig A, Rieber J, Erhard I, Leibig M, Theisen K, Siebert U, Klauss V. Sirolimus-eluting stent implantation and beta-irradiation for the treatment of in-stent restenotic lesions: comparison of underlying mechanisms of acute gain and late loss as assessed by volumetric intravascular ultrasound. Am Heart J 150: 351-357 (2005)

130. Schillinger M, Minar E. Restenosis after percutaneous angioplasty: the role of vascular inflammation. Vasc Health Risk Manag 1: 73-78 (2005)

131. Schober A, Weber C. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. Antioxid Redox Signal 7: 1249-1257 (2005)

132. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 38: 297-306 (2001)

133. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 182: 311-322 (2000)

134. Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. J Am Coll Cardiol 20: 1284-1293 (1992)

135. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. N Engl J Med 331: 489-495 (1994)

136. Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, Bertrand ME, Puel J, Rickards AF, Meier B, Goy JJ, Vogt P, Kappenberger L, et al. Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent. N Engl J Med 324: 13-17 (1991)

137. Sharma SK, Duvvuri S, Dangas G, Kini A, Vidhun R, Venu K, Ambrose JA, Marmur JD. Rotational atherectomy for in-stent restenosis: acute and long-term results of the first 100 cases. J Am Coll Cardiol 32: 1358-1365 (1998)

138. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. Nat Med 7: 738-741 (2001)

139. Shimizu T, Nakai K, Morimoto Y, Ishihara M, Oishi H, Kikuchi M, Arai H. Simple rabbit model of vulnerable atherosclerotic plaque. Neurol Med Chir 49: 327-332 (2009)

140. Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. J Cell Mol Med 5: 240-253 (2001)

141. Shoji M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Sato T, Iso Y, Shibata M, Suzuki H, Koba S, Geshi E, Katagiri T. Temporal and spatial characterization of cellular constituents during neointimal hyperplasia after vascular injury: Potential contribution of bone-marrow-derived progenitors to arterial remodeling. Cardiovasc Pathol 13: 306-312 (2004)

142. Silber S, Hoffmeister HM, Bode C. Optimal platelet inhibition after coronary stent implantation. Current status. Herz 33: 244-253 (2008)

143. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol 144: 281-292 (1999)

144. Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, da Luz PL, Augusto O, Laurindo FR. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. Free Radic Biol Med 28: 1232-1242 (2000)

145. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR, Jr., Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. Circ Res 57: 105-112 (1985)

146. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D, O'Shaughnessy CD, DeMaio S, Hall P, Popma JJ, Koglin J, Russell ME. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. JAMA 294: 1215-1223 (2005)

147. Tashiro H, Shimokawa H, Sadamatsu K, Aoki T, Yamamoto K. Role of cytokines in the pathogenesis of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Coron Artery Dis 12: 107-113 (2001)

148. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. N Engl J Med 336: 1697-1703 (1997)

149. Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. J Clin Invest 103: 971-978 (1999)

150. Uglow EB, Slater S, Sala-Newby GB, Aguilera-Garcia CM, Angelini GD, Newby AC, George SJ. Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. Circ Res 92: 1314-1321 (2003)

151. Van Herck J, De Meyer G, Ennekens G, Van Herck P, Herman A, Vrints C. Validation of in vivo plaque characterisation by virtual histology in a rabbit model of atherosclerosis. EuroIntervention 5: 149-156 (2009)

152. Varani E, Balducelli M, Lucchi GR, Vecchi G, Maresta A. Ad-hoc coronary angioplasty: organizational model, clinical results and costs. Ital Heart J Suppl 3: 630-637 (2002)

153. Verin V, Popowski Y, de Bruyne B, Baumgart D, Sauerwein W, Lins M, Kovacs G, Thomas M, Calman F, Disco C, Serruys PW, Wijns W. Endoluminal beta-radiation therapy for the prevention of coronary restenosis after balloon angioplasty. The Dose-Finding Study Group. N Engl J Med 344: 243-249 (2001)

154. Verin V, Popowski Y, Urban P, Belenger J, Redard M, Costa M, Widmer MC, Rouzaud M, Nouet P, Grob E, et al. Intra-arterial beta irradiation prevents neointimal hyperplasia in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model. Circulation 92: 2284-2290 (1995)

155. Waksman R, Bhargava B, Mintz GS, Mehran R, Lansky AJ, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Leon MB. Late total occlusion after intracoronary

brachytherapy for patients with in-stent restenosis. J Am Coll Cardiol 36: 65-68 (2000)

156. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Palmer SJ, Wang C, Cipolla GD, King SB, 3rd. Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries. Circulation 92: 1383-1386 (1995)

157. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Wang C, Gravanis MB, Cipolla GD, Hillstead RA, King SB, 3rd. Intracoronary low-dose beta-irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in the swine restenosis model. Circulation 92: 3025-3031 (1995)

158. Weinberger J. Intracoronary radiation using radioisotope solution-filled balloons. Herz 23: 366-372 (1998)

159. Weinberger J, Amols H, Ennis RD, Schwartz A, Wiedermann JG, Marboe C. Intracoronary irradiation: dose response for the prevention of restenosis in swine. Int J Radiat Oncol Biol Phys 36: 767-775 (1996)

160. Welt FG, Tso C, Edelman ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, Rogers C. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. Vasc Med 8: 1-7 (2003)

161. Wexberg P, Muck K, Windberger U, Lang S, Osranek M, Weidinger F, Maurer G, Gottsauner-Wolf M. Adventitial response to intravascular brachytherapy in a rabbit model of restenosis. Wien Klin Wochenschr 116: 190-195 (2004)

162. Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces neointimal proliferation after balloon angioplasty in swine: persistent benefit at 6-month follow-up. J Am Coll Cardiol 25: 1451-1456 (1995)

163. Wiedermann JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J. Intracoronary irradiation markedly reduces restenosis after balloon angioplasty in a porcine model. J Am Coll Cardiol 23: 1491-1498 (1994)

164. Williams JR, Zhang Y, Zhou H, Gridley DS, Koch CJ, Slater JM, Little JB. Overview of radiosensitivity of human tumor cells to low-dose-rate irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 72: 909-917 (2008)

165. Wiskirchen J, Dittmann H, Gebert R, Burgbacher B, Betsch A, Schober W, Johst U, Dohmen BM, Kehlbach R, Rodemann HP, Bares R, Duda SH. Dose-dependent effects of the combined beta/gamma emitter 186-Rhenium on the growth of human vessel wall cells. Rofo 173: 72-76 (2001)

166. Wohlfrom M, Kotzerke J, Kamenz J, Eble M, Hess B, Wohrle J, Reske SN, Hombach V, Hanke H, Hoher M. Endovascular irradiation with the liquid beta-emitter Rhenium-188 to reduce restenosis after experimental wall injury. Cardiovasc Res 49: 169-176 (2001)

167. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. Nat Rev Cardiol 7: 77-86 (2010)

168. Yamanouchi D, Kato K, Ryer EJ, Zhang F, Liu B. Protein kinase C delta mediates arterial injury responses through regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Cardiovasc Res 85: 434-443 (2010)

169. Yokote K, Take A, Nakaseko C, Kobayashi K, Fujimoto M, Kawamura H, Maezawa Y, Nishimura M, Mori S, Saito Y. Bone marrow-derived vascular cells in response to injury. J Atheroscler Thromb 10: 205-210 (2003)

170. Yutani C, Ishibashi-Ueda H, Suzuki T, Kojima A. Histologic evidence of foreign body granulation tissue and de novo lesions in patients with coronary stent restenosis. Cardiology 92: 171-177 (1999)

171. Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJ, Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene 9: 3743-3751 (1994)

172. Zhou L, Yuan R, Serggio L. Molecular mechanisms of irradiation-induced apoptosis. Front Biosci 8: 9-19 (2003)

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Hanke für die Überlassung des Dissertationsthemas und die sehr gute persönliche und angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Kotzerke danke ich für die persönliche Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen.

Besonderem Dank gilt Herrn Dr. med. J. Kamenz und Frau Christina Lenz, die mich zu jeder Zeit in der praktischen Durchführung der Arbeit und Auswertung der gewonnen Daten anleiteten und unterstützen.

Meinen Eltern Maie und Wilhelm Ploetz gebührt mein tiefer Dank und Respekt für die Ermöglichung des Studiums und die großartige Unterstützung in jeder Phase meiner Ausbildung.