

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik der Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**Simultane intra- und extravaskuläre Applikation von
Hochdosisdiltiazem in einem koronaren Schweine-
Organkulturmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Eva Stefanie Gruber
aus München

2005

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. Rainer Voisard
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Detlef Michel
Tag der Promotion:	20.10.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
A. EINLEITUNG	
1. Entstehung der Arteriosklerose	2
2. Restenose nach Angioplastie	4
3. Lösungsansätze	5
4. Organkultur	7
5. Die Thematik der vorliegenden Arbeit	8
B. MATERIAL	
1. Präparation und Kultivierung	10
2. Aufarbeitung und Auswertung	12
3. Immunhistologie	13
C. METHODEN	
1. Präparation von Schweinekoronararterien	16
2. In-vitro-Ballonisierung von Koronararterien	16
3. Kultivierung von Organkulturen	16
4. Fixierung, Einbettung, Schnitttechnik	17
5. Elastika-van-Gieson-Färbung	18
6. Immunhistologie	18
7. Auswertung	20
8. Statistik	21
D. ERGEBNISSE	
1. Kultivierung von Koronararterien des Schweins nach Angioplastie	22
2. Morphometrische Auswertung der Schweine-Koronar-	

Organkulturen nach Angioplastie	22
3. Zellproliferation Schweine-Koronar-Organ- kulturen nach Angioplastie	27
4. Glattmuskuläres α -Aktin in Schweine-Koronar- Organ- kulturen	33
5. Von-Willebrand-Faktor-Nachweis in Schweine-Koronar- Organ- kulturen	37
E. DISKUSSION	
1. Simultane endo- und perivaskuläre Applikation von Antiproliferativa	39
2. Applikation von Antiproliferativa im koronaren Schweineorgankulturmodell	40
3. Zellproliferation nach Angioplastie und Diltiazemapplikation	42
4. Neointimabildung nach Angioplastie und Diltiazemapplikation: Morphometrie	43
5. Zytoskelett nach Angioplastie und Diltiazemapplikation	44
6. Endothel nach Angioplastie und Diltiazemapplikation	44
7. Strategien der Restenosehemmung	45
F. ZUSAMMENFASSUNG	48
G. LITERATURVERZEICHNIS	50
H. DANKSAGUNG	58
I. LEBENSLAUF	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- Alpha (α)-SM-Aktin = Alpha-Aktin der glatten Muskelzelle
- Aqua dest. = destilliertes Wasser
- BRDU = 5-Bromo-2'Desoxyuridin
- d = Tage (in Kultur)
- D = Diltiazem
- \bar{x}_M = Mittelwert
- d-Cyt. = 2'Desoxycytidin
- DMEM = Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
- DNA = Desoxyribonukleinsäure
- EC = Endothelial cell = Endothelzelle
- fcs = fetales Kälberserum
- H₂O₂ = Wasserstoffperoxid
- HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
- mM = milliMol
- μ M = mikroMol
- PBS⁻ = Phosphate Buffered Saline ohne Calcium/Magnesium
- Pen/Strep = Penicillin-/Streptomycin
- % = Prozent
- PTCA = Perkutane transluminale Coronar-Angioplastie
- RIVA = Ramus interventricularis anterior
- SD = Standardabweichung
- σ_{n-1} = Standardabweichung
- SMC = Smooth muscle cell = Glatte Muskelzelle
- vWF = von Willebrand-Faktor
- WHO = World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
- WMF 12 = Waymouth's / Ham's F 12 Nutrient Mixture

A.EINLEITUNG

Seit 1977 hat sich die Ballonkatheterdilatation (PTCA) als Standardverfahren zur Behandlung von arteriosklerotisch bedingten koronaren Gefäßstenosen, deren Komplikationen zum Myokardinfarkt führen können, etabliert. Der hohen Akuterfolgsrate von 90-96% (unmittelbare Verbesserung der Perfusion) bei einer geringen Rate schwerer Komplikationen steht allerdings die hohe Restenosierungsrate von bis zu 57% innerhalb der ersten sechs Monate nach PTCA gegenüber (31, 32). Eine Reihe von pharmakologischen Lösungsansätzen erbrachte bisher keine wegweisenden Ergebnisse, wobei zu bedenken ist, daß meist entweder die systemische Anwendung mit eher geringen lokal erreichten Dosierungen oder – jeweils für sich genommen - die endo- oder perivaskuläre Antiproliferativa-Applikation untersucht wurden. Die Entwicklung alternativer Angioplastieverfahren wie die Radiofrequenzangioplastie (RFCA), die Hochfrequenzrotationsangioplastie (HFRCA), die Excimer-Laserangioplastie (ELCA) und die direktionale Artherektomie (DCA) konnte die hohe Rezidivrate nicht verringern, lediglich die Implantation von koronaren Stents konnte die In-Stent-Restenoserate leicht senken (14, 26, 69, 70).

1.Entstehung der Arteriosklerose

Arteriosklerose wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgendermassen definiert: „Arteriosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Media.“

Diesen Veränderungen liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde. Eine wichtige Rolle spielen verschiedene Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung: Unter Ersteren sind Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus zu nennen, zu den Letzteren zählt man Adipositas, Hyperurikämie, Stress, Bewegungsmangel und hormonelle Faktoren. Nicht zuletzt sind auch lokale hämodynamische Faktoren von Bedeutung: Atheromatöse Veränderungen bilden sich bevorzugt an Gefäßabgängen oder – aufzweigungen.

Die arterielle Gefäßwand besteht aus drei Schichten: innen die Tunica intima (kurz Intima), dann die Tunica media (Media) und die Tunica externa oder adventitia (Adventitia). Die Intima begrenzt das Lumen mit einer einlagigen Schicht von

Endothelzellen (EC), darunter befindet sich ein z.T. zellfreier Raum, der als subendothelialer Raum bezeichnet wird. Als Grenze zur Media folgt die Lamina elastica interna, eine elastische Membran. Glatte Muskelzellen (SMC), Kollagenfasern, elastische Fasern und helikal verlaufende Grundsubstanz der Media regulieren die Gefäßwandspannung. Eine weitere elastische Membran, die Lamina elastica externa, bildet die Grenze zwischen Media und Adventitia. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe, in das Nerven und Vasa vasorum eingebettet sind, und bindet das Gefäß in das umliegende Gewebe ein.

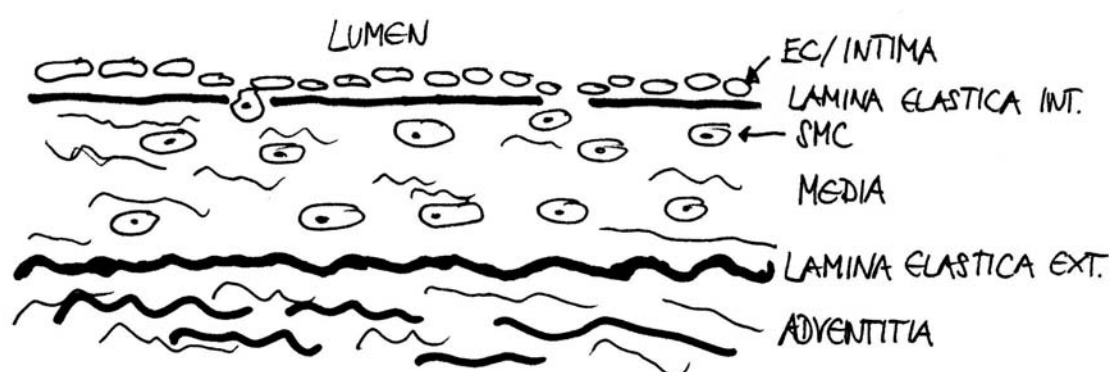


Abbildung 1: Aufbau der Arterienwand. EC: Endothelzellen; SMC: glatte Muskelzellen.

Zur Pathogenese der Arteriosklerose gibt es eine grosse Anzahl sich z.T. überlappender Theorien, wie etwa die Filtrations-, die Endothelläsions- oder die thrombotische Theorie. Roessner et al. (58) beschrieben die Abläufe zusammenfassend wie folgt:

Läsionen im Endothel, die durch Hypertonie, Nikotin, Immunmechanismen, hämodynamische Faktoren oder eine Hyperlipidämie verursacht sein können, erhöhen dessen Permeabilität für Plasmabestandteile. Dadurch kommt es zu einem Lipoproteineinstrom (insbesondere von LDL) und einer Einwanderung von Monozyten in die Intima, wo Makrophagen LDL-gebundene Cholesterinester aufnehmen und zu sogenannten Schaumzellen werden. Zudem sezernieren Makrophagen Interleukine (IL-1) und den Tumor-Nekrosefaktor (TNF), die zum einen eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen auslösen, zum anderen glatte Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten aktivieren. Die atherosklerotische Plaque wächst mit Vermehrung der Schaumzellen, wodurch Endothel und Intima zusätzlich mechanisch geschädigt werden

können. Dies begünstigt die Adhäsion von Thrombozyten, die den Wachstumsfaktor PDGF sezernieren, der wiederum glatte Muskelzellen zu weiterer Proliferation anregt. SMC kommen physiologischerweise vereinzelt in der Arterienintima vor und befinden sich normalerweise in der G₀-Phase des Zellzyklus, sie können jedoch in den Mitosezyklus eintreten und so von einer kontraktilen zu einer sekretorisch aktiven Zelle mutieren. Die sezernierten Kollagene und Proteoglykane verstärken das Plaquewachstum. Schaumzellen werden nekrotisch und zerfallen. Im Laufe der Zeit kommt es zum Vollbild der Arteriosklerose mit komplexen Läsionen, die nekrotische Bereiche aus Zelldetritus, Lipiden und Cholesterinkristallen, zusätzlich Kalziumablagerungen enthalten, bedeckt von einer fibrösen Kappe.

2. Restenose nach Angioplastie

In den letzten Jahren kam man zunehmend zu der Ansicht, dass es sich beim Prozess der Restenose um eine spezielle Art der Wundheilung handelt (23, 24, 28), bei der die glatten Muskelzellen der Media (SMC) eine herausragende Rolle spielen (55, 58, 72). Die Gefässverletzung führt zur SMC-Proliferation und Migration in den subendothelialen Raum, in dem dann weitere SMC-Proliferation – auch von intimalen SMC - und Sekretion von extrazellulärer Matrix durch SMC des synthetischen Phänotyps stattfindet (55, 58, 78). Zudem spielt das vaskuläre Remodeling, das Vasokonstriktion und Entfernung der überschüssigen extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteasen beinhaltet, eine Rolle. Alle diese Vorgänge sind für sich betrachtet als ganz normale physiologische Reaktionen zu sehen, bei der Restenose in Ausmass und Dauer jedoch überproportional stark ausgeprägt (14) und führen so in Kombination wohl zur Verengung des Gefäßlumens.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die SMC-Proliferation bei der Restenoseentwicklung nach Ballondilatation eine wichtige Rolle spielt. Die für deren Regulation verantwortlichen Wachstumsfaktoren und Zytokine sind zahlreich (46, 52, 63-65, 73, 100) und verschiedene Signaltransduktionswege spielen oftmals ineinander, so dass es sich schwierig gestaltet, experimentell gesehene erwünschte Effekte auf die Hemmung eines bestimmten Botenstoffes zurückzuführen.

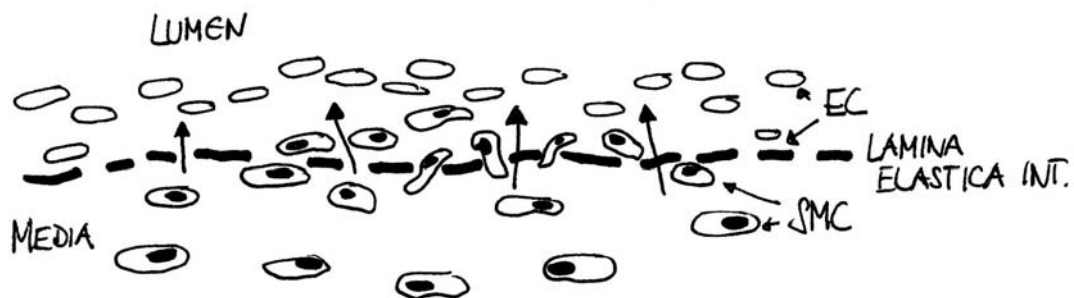


Abbildung 2: Schematische Darstellung des mutmaßlichen Ablaufs der Neointimabildung. SMC aus der verletzten Arterienmedia migrieren in den subendothelialen Raum und verursachen durch anschließende Proliferation und damit Neointimabildung eine Stenose des Gefäßes.

EC: Endothelzellen; SMC: glatte Muskelzellen

3. Lösungsansätze

3.1. Instrumentelle Ansätze

Das Standardverfahren zur nichtoperativen Beseitigung von Koronargefäßstenosen ist heute die perkutane transluminale Angioplastie (PTCA), ein von Grüntzig 1977 entwickeltes und eingeführtes Verfahren. Durch technische Verbesserungen und grössere Erfahrungen der Kardiologen im Lauf der Jahre weist die PTCA mit einer Akuterfolgsrate von 90-96% und einer Rate schwerer Komplikationen von unter 2% sehr gute Ergebnisse auf. Zudem hat sich das Indikationsspektrum für die PTCA seit 1977 erheblich ausgeweitet: In der Anfangsphase dilatierete man nur proximale und nichtverkalkte konzentrische Stenosen, heute behandelt man Patienten mit den unterschiedlichsten anatomischen Formen von Stenosen bei Ein-, Zwei- oder Dreifässerkrankung; während früher Patienten mit instabiler Angina pectoris, frischem Myokardinfarkt oder chronischen kollateralisierten Koronararterienverschlüssen die PTCA nicht zur Verfügung stand, ist dies heute sogar mit gutem Erfolg der Fall (32).

In den letzten Jahren wurden mehrere alternative Angioplastieverfahren entwickelt. Hierzu zählen die Radiofrequenzangioplastie (RFCA), die Hochfrequenzrotationsangioplastie (HFRCA), die Excimer-Laser-Angioplastie (ELCA) und die direktionale Artherektomie (DCA). All diese Verfahren weisen eine mindestens ebenso hohe Rezidivrate wie die PTCA auf, wobei die Akutkomplikationsrate eher höher anzusiedeln ist, so dass alle genannten Verfahren keine echte Alternative zur PTCA darstellen.

Eine Ausnahme ist lediglich die Implantation von Gefäßstützen (Stents), ein Verfahren, das erstmals 1986 von Sigwart (70) angewendet wurde und insbesondere bei primär ungenügendem PTCA-Erfolg, z. B. bei elastischer Rückstellung des dilatierten Gefäßes, bei Stenosen in Bypassgefäßen, als Notfallmassnahme bei Gefäßverschluss nach PTCA oder zur Behandlung von Restenosen zum Einsatz gelangt. Zwar zeigten Untersuchungen von Komatsu und Farb (21, 38), dass die Stentimplantation per se eine reaktive Zellproliferation auslöst, die mechanische Unterbindung des elastischen Rückstellmechanismus der Gefäßwand aber überwiegt und so eine geringere Restenoseentwicklung resultiert (44). Studien sprechen von signifikant niedrigeren Restenoseraten und besserem klinischen Verlauf als nach PTCA, wobei allerdings eine höhere Rate an akuten Komplikationen (Blutungen, Transfusionen, reparative gefäßchirurgische Massnahmen) zu beobachten ist (68, 69).

3.2. Pharmakologische Ansätze

In den letzten Jahren gab es vielfältige Untersuchungen zum antiproliferativen Potential verschiedenster Pharmaka (4-8), wie etwa Doxycyclin, Kortikosteroide, verschiedene Zytostatika und Kalziumkanalblocker. Obwohl in etlichen experimentellen Studien eine Restenosehemmung gezeigt werden konnte (30, 34, 53, 54, 56, 94), konnte der antiproliferative Effekt in der klinischen Testung oftmals nicht bestätigt werden oder die systemische Applikation in ausreichend hoher Dosierung kam aufgrund von z.T. schweren Nebenwirkungen nicht in Frage (7,8).

Die klinischen Daten zur Restenoseprävention durch Kalziumantagonisten sind widersprüchlich. In einigen Studien wurde kein signifikanter Unterschied zwischen mit Kalziumantagonisten oder mit Placebo behandelten Patienten gefunden, weder von Whitworth et al. (97), die Nifedipin in einer Dosierung von 40 mg/d verabreichten, noch von Corcos et al. (18) bzw. O'Keefe et al. (56), die 240 –360 mg Diltiazem pro Tag applizierten. Unverdorben et al. (79) berichten jedoch von einer signifikanten Rezidivreduktion mit 180 mg Diltiazem pro Tag, wobei die Nachbeobachtungsperiode in dieser Studie nur drei Monate betrug- ein längeres Follow-Up hätte möglicherweise mehr Patienten mit Restenosen aufgedeckt. Die Verapamil-Angioplastie-Studie (VAS) zeigte verminderte Restenoseinzidenz mit 480 mg Verapamil pro Tag bei Patienten mit stabiler Angina und hohem Restenoserisiko (29). Möglicherweise ist die Pathophysiologie der Restenose noch nicht genügend verstanden, oder die experimentellen Untersuchungen

simulieren die Bedingungen *in vivo* nicht in ausreichend ähnlicher Masse – dies könnte die widersprüchlichen Daten erklären (20, 22, 51).

Eine weitere Applikationsmöglichkeit ist der Einsatz von Stents, die mit antiproliferativen Substanzen beschichtet sind und so lokal ausreichende hohe Konzentrationen ermöglichen.

4. Organkultur

Die Entwicklung einer Restenose nach PTCA wird in erster Linie auf die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Media in den subendothelialen Raum zurückgeführt.

In Organkulturen ist die Möglichkeit gegeben, Reaktionen der Gefäßwand auf Angioplastie unter definierten Bedingungen *in vitro* zu beobachten (39, 41). Das in unserer Untersuchung verwandte modifizierte Organkulturmodell mit Schweinekoronararterien wurde erstmals von Pederson 1985 (57), Fingerle 1987 (23), Carere et al. 1992 (10) und zuletzt 1995 von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (84). In einem Organkulturmodell mit Aorten von Schweinen (39, 40), Kaninchen (74) und Mäusen (49) konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Verletzung der Gefäßwand eine Proliferation der glatten Muskelzellen ausgelöst wird, was zur Verbreiterung der Intima führt. Aorten sind wie die in vielen Modellen verwandten Karotiden oder Iliakalarterien Gefäße vom elastischen Typ, während Koronararterien als organnahe Arterien zu den Arterien vom muskulären Typ zählen und daher auch im Verhältnis mehr glatte Muskelzellen enthalten (64). Dadurch sind Koronararterien für ein Organkulturmodell zur Untersuchung der Restenose geeigneter, wenn man die SMC-Proliferation als Schlüsselereignis zugrunde legt.

Zur Beobachtung der SMC-Proliferation stehen unterschiedliche Modelle zur Verfügung (3, 5): Ausser der Organkultur bietet sich auch das Zellkultursystem oder das Transfilter-Co-Kultur-Modell an, wobei jede dieser Möglichkeiten Vor- und Nachteile bietet. In Zellkulturen mit isolierten SMC können etliche wichtige Einflüsse isoliert beobachtet werden, aber die enge Beziehung zur umgebenden interzellulären Matrix und dem Endothel bleibt unberücksichtigt. Zur Dosisfindung von antiproliferativen Pharmaka sind sie jedoch sehr gut geeignet. Um das Wachstum der Neointima beurteilen zu können, greift man besser auf Organkulturmodelle zurück, da hierbei die natürlichen Strukturen der Gefäßwand weitgehend erhalten bleiben. Organkultursysteme sind also ebenso wie das Transfilter-Co-Kultur-Modell hervorragend geeignet, im Anschluss an das Prescreening den Effekt und den richtigen Zeitraum für den Einsatz von antiproliferativen Substanzen genauer zu betrachten. Störfaktoren, wie sie beim Studium des SMC-Verhaltens im

intakten Tier auftreten (wie etwa Einflüsse von Thrombozyten, Entzündungsmediatoren, Immunzellen und Thromben, vasomotorische und hämodynamische Einflüsse) fallen weg. Trotz der Ähnlichkeit in Anatomie und Pathophysiologie können Ergebnisse der Schweinekoronararterien-Organkultur nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Daten aus Tiermodellen, Zellkulturen und klinischen Studien am Menschen müssen mit den gewonnenen Ergebnissen verglichen werden und in deren Bewertung mit einfließen.

5. Die Thematik der vorliegenden Arbeit

In der vorgestellten Studie arbeiteten wir mit einem modifizierten Organkultursystem mit Schweinekoronararterien, das 1992 von Carere et al. vorbeschrieben wurde. Damit wollten wir den Einfluß einer simultanen endo- und perivaskulären Hochdosistherapie mit Diltiazem auf die SMC-Proliferation nach Angioplastie untersuchen. Dieses System imitiert die in-vivo-Situation so weit wie möglich. Koronararterien von Hausschweinen sind denen des Menschen morphologisch und strukturell sehr ähnlich, und die sich entwickelnde experimentelle Restenose nach Angioplastie beim Schwein gleicht der Restenose des Menschen. Die makroskopischen und histopathologischen Ergebnisse im Schweinekoronararterienmodell scheinen identisch mit denen der humanen Restenose zu sein (64), weshalb wir uns gerade für dieses Organkultursystem entschieden.

Bisherige Studien untersuchten zumeist entweder die endo- oder die perivaskuläre Antiproliferativa-Applikation oder die systemische Anwendung. Erstere greift vorwiegend an den inneren Gefäßwandschichten an, erreicht aber kaum die distale Media und die Adventitia, wo sie wachstumsstimulierende Signalkaskaden blockieren könnte. Bei rein perivaskulärer Applikation stellt sich dieses Problem in umgekehrter Weise, und die systemische Zufuhr ist mit den oben genannten Problemen der unzureichenden Konzentrationen vor Ort und Nebenwirkungen behaftet.

Unser Ziel war es, herauszufinden, ob simultane endo- und perivaskuläre Applikation von Diltiazem in einer ausreichend hohen Dosierung von 50 µg/ml die Ausbildung einer Restenose nach Angioplastie verhindern bzw. deren Ausprägung reduzieren kann. Die Schweinekoronararterien wurden jeweils mit 9 bar Dilatationsdruck für 60 Sekunden aufgedehnt und 7 oder 28 Tage lang kultiviert. Die Kultivierungsdauer wurde so gewählt, da Daten über eine Stagnation der SMC-Proliferation nach etwa vier Wochen vorliegen (15, 16), während das Proliferationsmaximum beim Schwein 7 Tage nach Dilatation anzusiedeln ist (14, 16, 17, 27, 75). Die Angioplastie erfolgte mit 9 bar, da bei diesem

Dilatationsdruck in früheren Untersuchungen eine maximale Zellproliferation gefunden wurde (84, 90).

B. MATERIAL

1. Präparation und Kultivierung

1.1. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial wurden die Herzen von frisch geschlachteten Hausschweinen aus einem lokalen Schlachthof verwendet. Das proximale Drittel des Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde jeweils steril herauspräpariert.

1.2. Kulturmedien und Seren

1.2.1. Transport- und Präparationsmedium

Für die Präparation wurde folgendes Medium verwendet:

DMEM (Dulbecco's modified eagles medium; Bio Whittaker, Verviers, Belgien), mit 15 mM HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-ethansulfonsäure) gepuffert (Sigma, Taufkirchen).

1.2.2. Kulturmedium

Waymouth's Medium (WM; Bio Whittaker Cambrex, Verviers, Belgien) und Ham's F12 (Nährlösungsmix Ham's F12; Bio Whittaker Cambrex, Verviers, Belgien) im Verhältnis 1:1.

Den Kulturmedien wurde 15% fetales Kälberserum (fcs, Lot-Nr.6SB0002X; Bio Witthaker Cambrex, Verviers, Belgien) zugesetzt.

Außerdem wurde den Kulturmedien eine antibiotische Lösung zugegeben, bestehend aus 10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin (Penicillin-Streptomycin Solution, 100×, Gibco BRL, Eggenstein).

1.3. Pufferlösungen

Als Pufferlösungen dienten:

1.3.1. HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-ethansulfonsäure in H₂O; Pufferlösung 1 mol/l (Bio Whittaker Cambrex, Verviers, Belgien).

1.3.2. PBS: Phosphate buffered saline Dulbecco'A (Gibco, Eggenhausen)

1.3.3. *PBS*⁺ (Bio Whittaker Cambrex, Verviers, Belgien)

1.4. BRDU-Markierung

BRDU wird in der S-Phase der Zellteilung in sich teilende Zellen eingebaut. Jeder Organkultur wurde 18 Stunden vor der Fixierung 5-Bromo-2'Desoxyuridin (BRDU; Serva, Heidelberg) und 2'Desoxycytidin (d-Cyt.; Serva, Heidelberg) in einer 2mM-Stammlösung hinzugefügt.

1.5. Fixierung

Zum Fixieren der Organkulturen wurde Formaldehyd 3,5-3,7% (Otto Fischer, Saarbrücken) benutzt.

1.6. Präparationsschalen

Silikonbeschichtete Präparationsschalen:

Polysterol-Petrischalen(Greiner, Nürtingen), die mit einer 1 cm dicken Schicht Silikon(Sylgard 184 Kit; Sasco, Stuttgart) ausgegossen wurden. Dazu wurden 9 Teile Sylgard und 1 Teil Vernetzer gemischt, im Exsikkator entgast und bei 60°C polymerisiert.

1.7. Kulturgefäße

6-Loch-Schalen Falcon (Becton Dickinson Labware, Heidelberg).

1.8. Ballonkatheter

Zur in-vitro-Ballonisierung wurden Ballonkatheter mit einem Durchmesser von 3 mm (Millenia 20, Medtronic, Düsseldorf) benutzt.

1.9. Präparationsbesteck

- sterile Einmalskalpelle (Dahlhausen, Köln)
- Insektennadeln (Meier, München)
- Uhrmacherpinzetten (Aeskulap, Tuttlingen)
- Scheren (Aeskulap, Tuttlingen)

1.10. Geräte

- Laminarflowbank Klasse 2, Type UVF 6.18 S (BDK, Sonnenbühl)

- Wasserbad Julabo Type SW 20 C (VWR, Ulm)
- Inkubator Heraeus 5060 EC/CO₂ Partialdruck (Heraeus, Hanau)
- Nikon TMS-Inversmikroskop mit ELWD-Konversator und den Phasenkontrastobjektiven CF Plan Achromat 4/0,13 DL (Nikon, Düsseldorf)

1.11. Pharmakologische Testsubstanz

Jeder Organkultur (außer den Kontrollen) wurde Dilzem® 100mg parenteral (Diltiazemhydrochlorid als Trockensubstanz, gelöst in Wasser für Injektionszwecke, Dilzem®; Gödecke, Berlin) für unterschiedliche Zeiträume hinzugefügt.

2. Aufarbeitung und Auswertung

2.1. Paraffineinbettung

Die Entwässerung der fixierten Organkulturen erfolgte in einem Vakuum-Infiltrations-Prozessor: VIP Vakuum-Infiltrationsprozessor.

Die Schweineorgankulturen wurden in Einbettkassetten (Einbettkassette-Biopsie orange mit Deckel, Kabe Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth) gegeben.

2.2. Färbetechnik

Elastika-van-Giesson-Färbung.

Reagenzien: -Weigerts Hämatoxylin (Eisen-Hämatoxylin A, Chroma, Köngen; Eisen-Hämatoxylin B, Chroma, Köngen; Lösung A : Lösung B= 2:1)
 -van-Giesson-Lösung (Chroma, Köngen)
 -Resorcinfuchsin nach Weigert (Chroma, Köngen)
 -Alkohol 100%, 96%, 80% (Merck, Darmstadt)
 -Xylol (Merck, Darmstadt)
 -HCl-Alkohol (12ml 25%-ige HCl mit 1l 70%-igem Alkohol mischen)
 -Vitroclud® Eindeckmedium (Langenbrinck, Emmendingen)

2.3. Morphometrie

Zur morphometrischen Analyse wurde verwendet:

- Summa Sketch 3 (12×12) Graphiktablett mit Zeigergerät (Cursor) (Summagraphics Corporation, Seymour/ USA)
- Rechnerprogramm BIOQUANT™ System 4 ©1989 R&M BIOMETRICS, INC. (Bilaney Consulting, Düsseldorf)
- Mikroskop (Nikon, Düsseldorf)

2.4. Mikroskopie und Mikrophotographie

Mikroskop: Nikon-Optiphot-2-Mikroskop mit den Hellfeldobjektiven CF Planapochromat 4/0,20, CF Planapochromat 10/0, 40, CF Planapochromat 40/1,0 oil (Nikon, Düsseldorf).

Kamera: c-Nikon F-601 M Kameragehäuse für die Mikrophotographie (Nikon, Düsseldorf).

Film: Fujichrome® professional, RTP 135-36, 64 ASA für Farbdias.

2.5. Geräte

Mikrotom: Universalmikrotom Jung RM 2045 (Leica, Stuttgart)

3. Immunhistologie

3.1. Avidin-Biotin-Methode am Paraffinschnitt

3.1.1. Antikörper zum Nachweis von BRDU

–Erstantikörper: Anti-BRDU. Monoklonaler Antikörper gegen BRDU (Bromodesoxyuridin; Dakopatts, Hamburg), Arbeitslösung in PBS⁻ mit 0,5% Tween 80 (Serva, Heidelberg).

–Zweitantikörper: Pferde-Anti-Maus biotinyliert (Camon, Hamburg) in PBS⁻.

3.1.2. Antikörper zum Nachweis von α -SM-Aktin an glatten Muskelzellen

–Erstantikörper: Anti- α -SM-Aktin (Clone asm 1; Renner, Darmstadt) in PBS⁻

–Zweitantikörper: Pferde-Anti-Maus biotinyliert (Camon, Hamburg) in PBS⁻

3.1.3. Antikörper zum Nachweis des von-Willebrand-Faktors an Endothelzellen

–Erstantikörper: Anti-von-Willebrand-Faktor (Pharma International, Mainz) in PBS⁻

–Zweitantikörper: Pferde-Anti-Ziege biotinyliert (Camon, Hamburg) in PBS⁻

3.1.4. Normalserum

Pferde-Serum (Dianova, Hamburg)

3.1.5. Protease und Immunkomplex

–0,1%-ige Protease (Sigma, Taufkirchen)

–Immunkomplex: Avidin-Biotin-Peroxydase-Komplex (AB-Reagenz; Camon, Hamburg)

3.1.6. Pufferlösungen

– PBS⁻: Phosphate buffered saline Dulbecco' A

Reagenzien: - NaCl: Natriumchlorid (Fluka Chemie, Buchs/ Schweiz)

- KCl: Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

- Na₂HPO₄ × 2 H₂O: di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

- KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Für 5 l PBS⁻: 40,0 g NaCl

1,0 g KCl

1,0 g KH₂PO₄

7,2 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O

in Aqua bidest. lösen und pH 7,4 einstellen.

–0,1 M Acetatpuffer pH 5,2:

210 ml 0,1 N Essigsäure (5,75 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua dest.)

und 700 ml 0,1 M Natriumacetat (13,61 g Natriumacetat trihydrat, Riedel de Haen, Stuttgart) in 1 l Aqua dest.) mischen.

3.1.7. Substrat

AEC-Komplex (3-Amino-9-ethylcarbazole) :

3-Amino-9-ethylcarbazole (Sigma, Taufkirchen) in 1 ml N'N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) lösen ; 14 ml Acetatpuffer pH 5,2 (siehe 2.1.6.) und 15 µl 30%-iges H₂O₂ (Merck, Darmstadt) hinzufügen.

3.1.8. Färbelösungen/ Differenzierungslösung

Färbelösungen:

- Hämalaun : Mayers Hämalaun (Chroma, Köngen)
- Weigerts Hämatoxylin, Mischung aus Lösung A und B im Verhältnis 2:1 (Chroma, Köngen)

Differenzierungslösung HCl-Alkohol: 12 ml 25%-ige HCl in 1l 70%-igem Alkohol

3.1.9. Eindeckmedium

Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt)

C. METHODEN

1. Präparation von Schweinekoronararterien

Vor der Präparation wurden alle dazu notwendigen Schalen 30 Minuten (siehe B, 1.6.) unter UV-Licht gestellt, um sie zu sterilisieren. Nicht angeschnittene Herzen von frischgeschlachteten Hausschweinen wurden aus einem lokalen Schlachthof in einem sterilen Eimer ins Labor gebracht, anschließend wurde der Ramus interventricularis anterior (RIVA) unmittelbar nach dem Abgang aus der Aorta zu zwei Dritteln mit steriler Pinzette und Skalpell unter der Sterilbank abpräpariert. Die Gefäßstücke wurden sofort in Hepes- gepuffertes Präparationsmedium (siehe B, 1.2.1.) gelegt. Auch die Feinpräparation mittels kleiner Schere und Uhrmacherpinzette erfolgte im Hepes-gepufferten Medium: Die RIVA-Stücke wurden hierzu auf einer silikonbeschichteten Präparationsschale (siehe B, 1.6.) mit Hilfe von Insektennadeln aufgespannt, das Muskelgewebe vollständig und das umgebende Fettgewebe größtenteils entfernt. Das fertigpräparierte Gefäß wurde in ca. 5mm große Stücke geschnitten, die wiederum in Präparationsmedium gegeben wurden.

2. In-vitro-Ballonisierung von Koronararterien

Mit Ausnahme der Kontrollen wurden die 5 mm großen RIVA-Stücke je 60 Sekunden lang mit einem sterilen Ballonkatheter (siehe B, 1.8.) mit 9 bar dilatiert.

3. Kultivierung von Organkulturen

3.1. Routinekultivierungstechnik

Die dilatierten Stücke wurden in 5ml Kulturmedium in einer 6-Loch-Schale 7 oder 28 Tage kultiviert, wobei das Kulturmedium aus Waymouth-Medium und Ham's F 12-Nährlösungsmix zu gleichen Teilen mit 15% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch bestand (siehe auch B, 1.2.2.). Der Mediumwechsel erfolgte jeden 2. bzw. 3. Tag.

3.2. Zusatz der pharmakologischen Testsubstanz

Jeder Organkultur außer den dilatierten und nichtdilatierten Kontrollen wurde Diltiazemstammlösung (5mg/ml Aqua inject.) für unterschiedliche Zeiträume (1,2,3,4,5,6

oder 7 Tage)zugegeben, so dass die Endkonzentration im Medium 50µg/ml betrug. Nach dem Mediumwechsel wurde jeweils frisch angesetztes Diltiazem zugefügt. Bei Wechsel von diltiazemhaltigem zu reinem Medium wurde ein zusätzlicher Spülschritt mit 5ml Kulturmedium durchgeführt.

3.3. BRDU-Markierung

Zum Einbau des Thymidin-Basenanalogs 5-Brom-2'Desoxyuridin (BRDU) in die DNA sich teilender Zellen wurde allen Organkulturen 18 Stunden vor der Fixierung eine 2mM Lösung mit BRDU und 2'Desoxycytidin (d-Cyt.) zugegeben. Die Endkonzentration betrug 20 µM.

4. Fixierung, Einbettung, Schnittechnik

4.1. Formalinfixierung

Jede Organkultur wurde zweimal mit je 5ml PBS⁺ gespült und danach in 3,5-3,7%-iger Formalinlösung in Einbettkassetten (siehe B,1.5.) fixiert.

4.2. Paraffineinbettung

Die fixierten Organkulturen wurden in den Einbettkassetten im Vakuum-Infiltrations-Prozessor in Paraffin überführt.

Folgende Arbeitsschritte führte der Vakuum-Infiltrationsprozessor vollautomatisch durch:

- Entwässern: -Herauswaschen des Fixierungsmittels mit Leitungswasser: 60 Min.
-Aufsteigende Isopropanolreihe: 50%, 70%, 2×90%-iges Isopropanol je 60 Min., 2×99,9%-iges Isopropanol je 120 Min.
- Überführung ins Intermedium: Xylol rein 150 Min., Xylol rein 30 Min.
- Einbettmedium: Paraffin 30 Min., Paraffin 60 Min., Paraffin 90 Min., Paraffin 120 Min.

Anschließend wurden die Gefäßsegmente in Paraffin (57°C) gegossen und ausgehärtet.

4.3. Paraffinschnittechnik

Von jedem RIVA-Segment wurden mit dem Semi-Dünnschnitt-Universal-Mikrotom 4µm-Paraffinschnitte hergestellt.

5. Elastika-van-Gieson-Färbung

In der Elastica-van-Gieson-Färbung stellen sich Kerne schwarz, elastische Fasern und Bindegewebe rot und Muskulatur gelb dar.

- Arbeitsschritte: – Entparaffinieren:
- 2× 10 Minuten Xylol
 - 2× 5 Minuten 100%-iger Alkohol
 - 2× 5 Minuten 96%-iger Alkohol
 - 5 Minuten 80%-iger Alkohol.
- Resorcin-Fuchsin: 30 Minuten
 - Spülschritte: - 2× 80%-iger Alkohol
 - Aqua dest.
 - Hämatoxylin nach Weigert: 8 Minuten
 - Differenzieren: Schnitte 1× in HCl-Alkohol eintauchen
 - 10 Minuten in Leitungswasser bläuen
 - mit Aqua dest. spülen
 - 2 Minuten van-Gieson-Lösung
 - 96%-iger Alkohol
 - 2× 100%-iger Alkohol
 - Xylol
 - Eindecken in Vitroclud®

6. Immunhistologie

6.1. Avidin-Biotin-Methode am Paraffinschnitt

6.1.1. Nachweis von Bromdesoxyuridin

Zunächst wurden die Schnitte wie unter 5. beschrieben bis PBS⁻ entparaffiniert (es folgte noch zusätzlich 2× 70%-iger Alkohol für 5 Minuten), anschließend wurden analog der Avidin-Biotin-Immunperoxidase-Technik folgende Schritte durchgeführt:

- 0,1% Protease 10 Min. bei 37°C im Wasserbad
- in PBS⁻ spülen
- H₂O₂ in Methanol 10 Min. bei Raumtemperatur (5ml 30% H₂O₂ /200ml Methanol) zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität
- in PBS⁻ spülen
- 1 N HCl 20 Min. bei Raumtemperatur

- in PBS⁻ spülen
- Inkubation: Pferdeserum 1:10 in PBS⁻ 20 Min.
- Inkubation: Erstantikörper: Anti-BRDU 1:100 in 0,5% Tween 80 in PBS⁻ 40 Min. (1µl/ml Antikörperkonzentration)
- in PBS⁻ spülen
- Inkubation: Zweitantikörper: Pferde-Anti-Maus biotinyliert 1:100 in PBS⁻ 10 Min.
- in PBS⁻ spülen
- Inkubation: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex 1:100 in PBS⁻ 10 Min.
- in PBS⁻ spülen
- AEC-Komplex (3-Amino-9-ethylcarbazole): Herstellung des Substrates wie unter B, 3.1.7. beschrieben. Sofern das Präzipitat auftritt, die Mischung filtrieren. 10-20 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- in PBS⁻ spülen
 - Hämalaun 10 Sek.
 - in Leitungswasser 10 Min. bläuen
 - in Kaisers Glyceringelatine einbetten.

Die Inkubationsschritte wurden bei 37°C in feuchter Kammer, die Spülschritte mit PBS⁻ bei Raumtemperatur durchgeführt.

6.1.2. Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin

Entsprechend den Arbeitsvorschriften zum BRDU-Nachweis wurde der Nachweis des glattmuskulären Aktins durchgeführt (siehe 6.1.1.). Der HCl-Schritt fällt weg, die Protease wurde bei Raumtemperatur und nur 10 Min. verwendet.

Als Erstantikörper wurden monoklonale Antikörper der Maus gegen α -SM-Aktin 1:300 in PBS⁻ 40 Min. inkubiert (1µl/ml Antikörperkonzentration). Als Zweitantikörper diente Pferde-Anti-Maus biotinyliert 1:100 in PBS⁻, inkubiert für 10 Min..

6.1.3. Nachweis von von-Willebrand-Faktor

Der Nachweis des von-Willebrand-Faktors wurde analog den Arbeitsvorschriften zum BRDU-Nachweis durchgeführt (siehe 6.1.1.), wobei der HCl-Schritt ebenfalls wegfällt und die Protease ebenfalls für 10 Min. bei Raumtemperatur verwendet wird.

Als Erstantikörper wurde Anti-von-Willebrand-Faktor 1:100 in PBS- 40 Min (1µl/ml Antikörperkonzentration), als Zweitantikörper Pferde-Anti-Ziege biotinyliert 1:100 in PBS⁻ für 10 Min. inkubiert.

7. Auswertung

7.1. Morphometrie

Für die computergestützte morphometrische Analyse der Neointima wurden die angefertigten Serienschritte mit einer Elastika-van-Gieson Färbung angefärbt. Die Analyse wurde dann mit dem Softwareprogramm BIOQUANTTM System 4 ©1989 der Firma BIOMETRICS und dem Summa Sketch 3 (12×12) Graphiktablett mit Zeigergerät (Cursor) computerunterstützt vorgenommen, wobei das 4×-Objektiv des Mikroskops verwendet wurde. Bei der Umfahrung mit dem Cursor projizierten sich die Flächenumrisse auf die digitalisierte Unterlage, diese vermittelte die Signale zur Flächenberechnung an den Computer weiter. Die Flächeneinheit der vorläufigen Messergebnisse wurde in Quadratmillimetern angegeben.

Mit dem Cursor wurden jeweils das Lumen, die Lamina elastica interna (als Grenzlinie zwischen Intima und Media) und die Lamina elastica externa (als Abgrenzung zwischen Media und Adventitia) abgefahren.

Um den verschiedenen Größenverhältnissen (Durchmesser) der Schweinekoronararterien Rechnung zu tragen, berechneten wir, nach dreimaliger Umfahrung der relevanten Strukturen und Bildung des Mittelwertes (x), für jeden Schnitt den relativen (prozentualen) Anteil der Neointima im Vergleich zu Media und Intima zusammen als:

$$\text{Neointimafläche} / (\text{Neointimafläche} + \text{Mediafläche}) \times 100$$

Anschließend wurden die Daten in Graphiken dargestellt.

7.2. Bromdesoxyuridin (BRDU)

Die Zellproliferation der Organkulturen wurde nach Einbau des Thymidinanalogs BRDU quantitativ bestimmt. Dazu wurden an mindestens fünf Schnitten von verschiedenen RIVA-Segmenten die BRDU-positiven Zellen und die Gesamtzellzahl in der Intima und Media in 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Anzahl der proliferierenden Zellen in Prozent berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Zahl der BRDU-positiven Zellen/ Gesamtzellzahl} \times 100$$

7.3. Glattmuskuläres α -Aktin

Die α -Aktin-Expression glatter Muskelzellen in der Intima und Media wurde semiquantitativ bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Es bedeuten:

- +++ Starke Expression
- ++ Mäßige Expression
- + Schwache Expression
- negativ

7.4. Von-Willebrand-Faktor

Der von-Willebrand-Faktor wird als Schlüsselmarker für den Nachweis von Endothelzellen angesehen. Die Schnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung nach folgenden Kriterien semiquantitativ ausgewertet:

- +++ von-Willebrand-Faktor-positiv: geschlossener EC-Ring
- ++ von-Willebrand-Faktor-positiv: viele EC's
- + von-Willebrand-Faktor-positiv: nur vereinzelte EC's
- +/- von-Willebrand-Faktor-positiv, jedoch keine EC's
- von-Willebrand-Faktor negativ, keine EC's

8. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung in Prozent angegeben. Um die statistische Signifikanz der Differenzen zwischen den Kontrollen und den dilatierten Organkulturen zu ermitteln, wurde der zweiseitige U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

D. ERGEBNISSE

1. Kultivierung von Koronararterien des Schweins nach Angioplastie

1.1. Sterile Präparation und Dilatation

Es standen insgesamt 25 frische, nicht angeschnittene Schweineherzen von 3 bis 5 Monate alten Schweinen mit durchschnittlichem Gewicht von 100 bis 120 kg von einem lokalen Schlachthof zur organkulturellen Aufarbeitung bereit. Der Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde jeweils ca. 2 cm distal des Abgangs aus der Aorta sorgfältig und steril präpariert, in 5mm lange Segmente geschnitten und unmittelbar danach in HEPES-gepuffertes (15mM) Präparationsmedium (DMEM= Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) überführt.

Die einzelnen RIVA-Segmente wurden dann - mit Ausnahme der Kontrollen- mit einem 3mm-Standard-Ballonkatheter jeweils 60 Sekunden mit 9 bar dilatiert. Nach der Angioplastie wurden die Koronararterienstücke in ein mit 15% fetalem Kälberserum angereichertes Kulturmedium (Waymouth's MB und Ham's F12 im Verhältnis 1:1) gegeben. Bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Organkulturen entweder 7 oder 28 Tage lang in Kultur gehalten. Pro Kultivierungsdauer wurden mindestens fünf Segmente mit jeweils 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 Tage Diltiazemzusatz kultiviert; außerdem wurde immer eine Kontrolle (ohne Angioplastie und ohne Pharmakon) und eine dilatierte Kontrolle (ohne Diltiazemzusatz) mitgeführt.

2. Morphometrische Auswertung der Schweine-Koronar-Organkulturen nach Angioplastie

Die angefertigten Serienschnitte von 4µm Dicke wurden mit einer Elastika-van Gieson-Färbung angefärbt und die Dicke der Neointima computergestützt morphometrisch ausgewertet. Das prozentuale Neointimawachstum bezieht sich auf Neointima und Media zusammen als 100%. Wir ermittelten den Mittelwert in % \pm der Standardabweichung in % ($x_M \pm \sigma_{n-1}$). Die Fallzahl (n) betrug im Durchschnitt 5 RIVA-Segmente pro einzelne Kultivierungsdauer bzw. pro Zeitraum des Diltiazemzusatzes. Zur Berechnung des durchschnittlichen Neointimawachstums wurden mindestens 5 Schnitte unterschiedlicher

RIVA-Segmente je dreimal pro Experiment morphometrisch vermessen, so dass ein Mittelwert den Durchschnitt der Daten von mindestens 5 RIVA-Segmenten darstellt.

2.1. Ergebnisse nach 7-tägiger Kultivierungsdauer

Nach 7 Tagen in Kultur kam es bei allen Ansätzen zu einem Neointimawachstum unterschiedlicher Ausprägung: Das Wachstum steigerte sich von $4,2 \pm 2,99\%$ ($x_M \pm SD$) bei 1-tägigem Zusatz von Diltiazem (1 d D) über $8,1 \pm 8,8\%$ bei 2 d D auf $12,8 \pm 11,0\%$ bei 3 d D. Danach fielen die Werte bis auf $3,7 \pm 4,1\%$ bei 7 d D ab (4 d D: $9,1 \pm 6,3\%$, 5 d D: $4,0 \pm 5,0\%$, 6 d D: $4,0 \pm 4,5\%$). Die dilatierten Kontrollen zeigten mit $10,3 \pm 4,8\%$ ein deutlich höheres Wachstum als die nichtdilatierten Kontrollen mit $5,5 \pm 4,0\%$.

Statistische Signifikanz wurde nur beim Wert der dilatierten gegenüber der nicht dilatierten Kontrolle erreicht ($n = 2$), ansonsten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

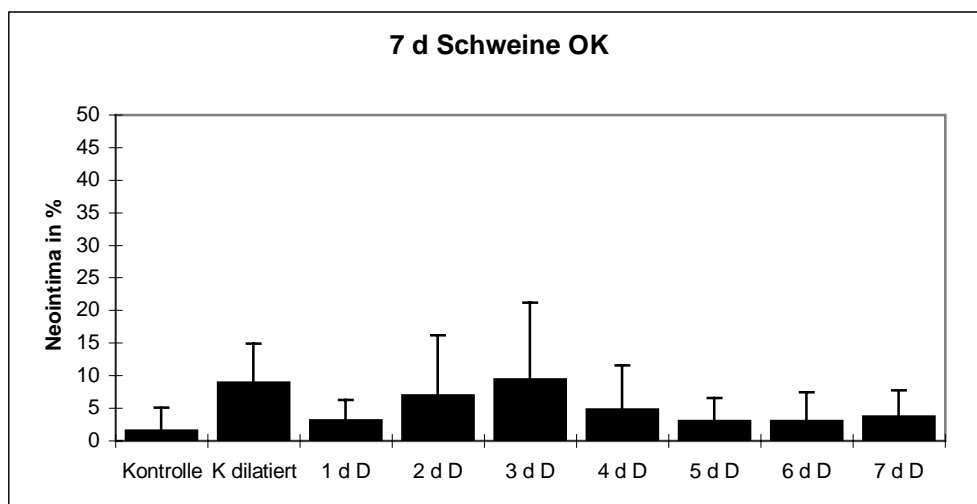


Abbildung 3: Neointima in Abhängigkeit von der Dauer des Diltiazemzusatzes nach 7 Tagen in Kultur ($n = 5$ pro Balken; $x_M \pm SD$).

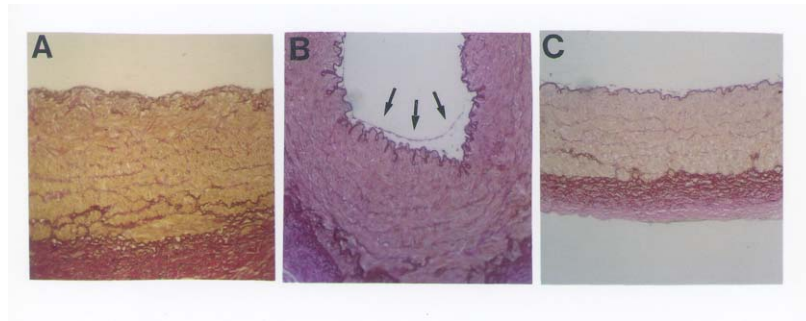


Abbildung 4: Neointimabildung 7 Tage nach in vitro-Angioplastie: Koronare Organkulturen ohne Angioplastie (A), nach Ballonangioplastie mit 9 bar (B) und nach Ballonangioplastie mit 9 bar und zusätzlicher Hochdosis-Inkubation mit Diltiazem (50 µg/ml, C). Pfeile: Neointimabildung. Elastika van Gieson-Färbung.

2.2. Ergebnisse nach 28-tägiger Kultivierungsdauer

Auch nach 28-tägiger Kultivierung war bei allen Ansätzen ein Neointimawachstum zu beobachten, am ausgeprägtesten war dies bei den dilatierten Kontrollen und nach 1-tägigem Zusatz von Diltiazemlösung ($28,4 \pm 17,3$ bzw. $17,8\%$). Ein nur wenig geringeres Wachstum war bei 2 d D zu sehen ($21,2 \pm 10,0\%$). Das Wachstum bei 3 d D war mit $4,08 \pm 5,9\%$ am geringsten, etwas höher war es nach 6-bzw. 7-tägigem Diltiazemzusatz mit $5,1 \pm 10,2\%$ bzw. $6,8 \pm 12,1\%$. Die Werte für 4 und 5 d D betragen $7,7 \pm 8,8\%$ und $13,3 \pm 8,0\%$, die nichtdilatierten Kontrollen zeigten mit $10,5 \pm 11,0\%$ ein fast doppelt so hohes Wachstum wie nach 7 Tagen in Kultur.

Eine Signifikanz der Werte im Vergleich zur nichtdilatierten Kontrolle ergab sich mit $p < 0,05$ für die dilatierte Kontrolle sowie für 3, 6 und 7 d D, die anderen Werte waren nicht signifikant.

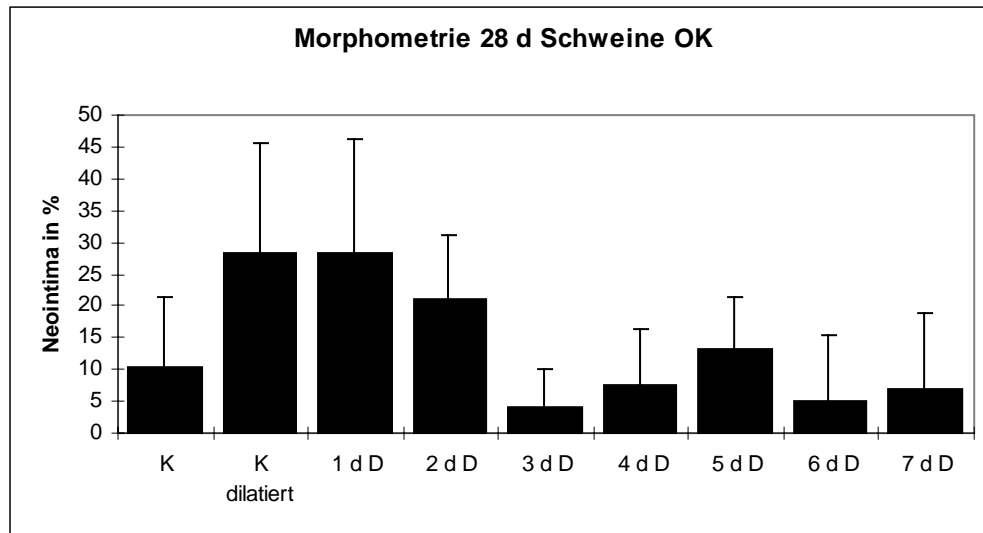


Abbildung 5: Neointima in Abhängigkeit von der Dauer des Diltiazemzusatzes nach 28 Tagen in Kultur ($n = 5$ pro Balken; $x_M \pm SD$).

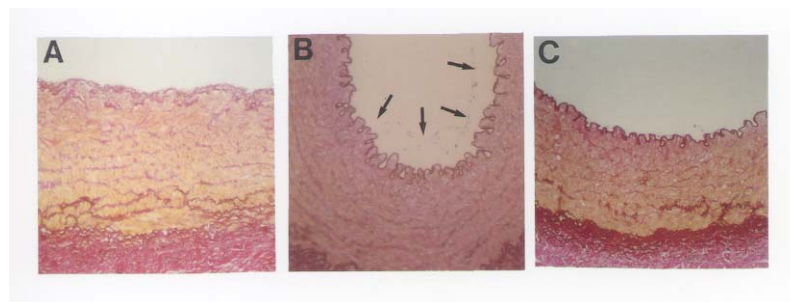


Abbildung 6: Neointimabildung 28 Tage in vitro-Angioplastie: Koronare Organkulturen ohne Angioplastie (A), nach Ballonangioplastie mit 9 bar (B) und nach Ballonangioplastie mit 9 bar und zusätzlicher Hochdosis-Inkubation mit Diltiazem ($50 \mu\text{g/ml}$, C). Pfeile: Neointimabildung. Elastika van Gieson-Färbung.

2.3. Morphometrie der Schweineorgankulturen: Neointimabildung in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und Diltiazemzusatz

Die Effekte von Angioplastie und Diltiazemzusatz nach Auswertung der Organkulturen sind in Abbildung 7 zusammenfassend dargestellt.

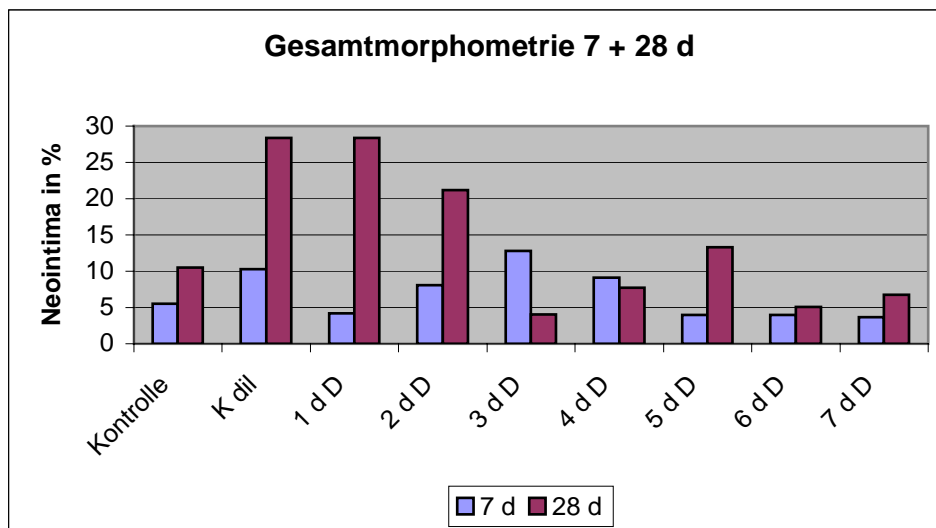


Abbildung 7: Neointimabildung in Schweineorgankulturen in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und Dauer des Diltiazemzusatzes (n = 5 pro Balken; $x_M \pm SD$).

Es zeigte sich bei den nichtdilatierten Kontrollen ein Wachstum der Neointima, das zum Teil sogar stärker ausgeprägt war als bei Segmenten, die einer Angioplastie unterzogen worden waren (z.B. 6 und 7 Tage Diltiazemzusatz). Dies war sowohl bei 7 wie auch bei 28 Tagen Kultivierungsdauer der Fall, wobei das Wachstum beim 28-Tages-Ansatz fast immer stärker ausgeprägt war als beim 7-Tages-Ansatz (mit Ausnahme von 3 und 4 Tage Diltiazemzusatz).

Die dilatierten Kontrollen zeigten erwartungsgemäß ein starkes (und gegenüber den Kontrollen auch signifikantes), jedoch nicht das stärkste Neointimawachstum: Bei 7-tägiger Kultivierung war nach 3 Tagen Diltiazemzusatz das ausgeprägteste Wachstum zu sehen, bei 28-tägiger Kultivierung war das Wachstum nach 1-tägigem Diltiazemzusatz zumindest genauso groß wie beim dilatierten Kontrollsegment ohne pharmakologische Testsubstanz.

Nach 7-tägiger Kultivierungsdauer war das Wachstum beim 1-tägigen Diltiazemzusatz deutlich geringer als sowohl bei der angioplastierten als auch bei der nichtdilatierten Kontrolle, nach 2 Tagen war es sowohl bei 7- als auch bei 28-tägiger Kultivierung stärker als beim Kontrollsegment, jedoch schwächer als bei der dilatierten Kontrolle.

Nach 3-tägigem Zusatz des Medikamentes kam es bei 7 Tagen in Kultur zum stärksten, bei 28-tägiger Kultivierung hingegen zum schwächsten Neointimawachstum überhaupt (letzterer Wert war auch signifikant gegenüber der Kontrolle). Nach 4 Tagen war bei 7-tägiger Kultivierung ein abgeschwächtes, bei 28-tägiger Kultivierung ein gesteigertes

Wachstum zu beobachten. Dieser Trend setzte sich beim 5-tägigen Zusatz von Diltiazem fort.

Nach 6-tägigem Diltiazemzusatz blieb bei 7 Tagen in Kultur das Wachstum gleich niedrig wie nach 5 Tagen, bei 28 Tagen in Kultur fiel es hingegen deutlich ab, wobei sich auch eine Signifikanz gegenüber dem Kontrollsegment ergab.

Nach 7-tägigem Zusatz der Testsubstanz war das Wachstum bei 7 Tagen in Kultur nochmals reduziert, wohingegen es bei 28-tägiger Kultivierung wieder anstieg und der Wert wieder mit $p < 0,05$ signifikant gegenüber der Kontrolle war.

Die Schweineorgankulturen konnten bis zu 28 Tagen in Kultur gehalten werden.

3. Zellproliferation in Schweine-Koronar-Organkulturen nach Angioplastie

Die Zellproliferation in Organkulturen nach Angioplastie wurde nach Markierung mit Bromdesoxyuridin quantitativ bestimmt. Die BRDU-positiven Zellen in Neointima und Media der koronaren Organkulturen wurden jeweils ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl der Intima bzw. Media in Prozent gesetzt.

3.1. Zellproliferation nach 7-tägiger Kultivierungsdauer

3.1.1. Neointima

Nach 7-tägiger Kultivierungsdauer und Angioplastie wurden als höchster Wert nach 3-tägigem Zusatz von Diltiazem $6,6 \pm 10,4\%$ ($x_M \pm SD$) BRDU-positive Zellen gezählt. Die geringste Anzahl BRDU-positiver Zellen fand sich beim 6 d D-Ansatz ($0,32 \pm 0,7\%$), nur wenig darüber lag der 4 d D-Ansatz mit $0,83 \pm 1,05\%$. Es folgten $1,07 \pm 1,77\%$ positive Zellen nach 2-tägigem Diltiazemzusatz, nach 7 d D betrug die Zahl $1,2 \pm 1,8\%$, bei 5 d D $1,85 \pm 3,6\%$ und nach 1 d D $2,76 \pm 6,06\%$. Eine von der Zusatzdauer von Diltiazem abhängige Zellproliferation war also nicht zu beobachten. Bei den Kontrollen trat mit $0,11 \pm 0,34\%$ eine geringe Proliferationsrate auf, bei den dilatierten Kontrollen erwartungsgemäß eine deutlich höhere Anzahl BRDU-positiver Zellen von $4,33 \pm 5,62\%$. Es ergaben sich keine signifikanten Werte.

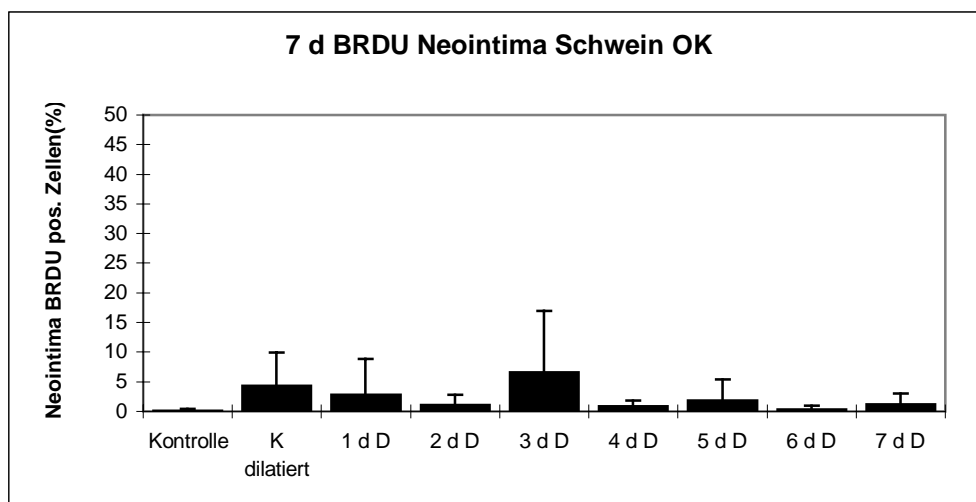


Abbildung 8: Zellproliferation in der Neointima koronarer Schweineorgankulturen nach 7 Tagen in Kultur ($n = 5$ pro Balken; $x \pm SD$).

3.1.2. Media

In der Media wurde bei den Kontrollen nach 7 Tagen in Kultur keine Zellproliferation beobachtet, ebensowenig nach 2-tägigem Zusatz von Diltiazem. Der höchste Wert ließ sich wiederum beim 3 d D-Ansatz mit $0,72 \pm 1,33\%$ ($x_M \pm SD$) feststellen, der niedrigste beim 4 d D-Ansatz mit $0,02 \pm 0,03\%$. Dazwischen lagen Werte von $0,03 \pm 0,04\%$ (7 d D) über $0,06 \pm 0,09\%$ (6 d D) und $0,07 \pm 0,04\%$ (1 d D) bis zu $0,12 \pm 0,19\%$ (5 d D). Die Anzahl der BRDU-positiven Zellen in den dilatierten Kontrollen betrug $0,15 \pm 0,19\%$.

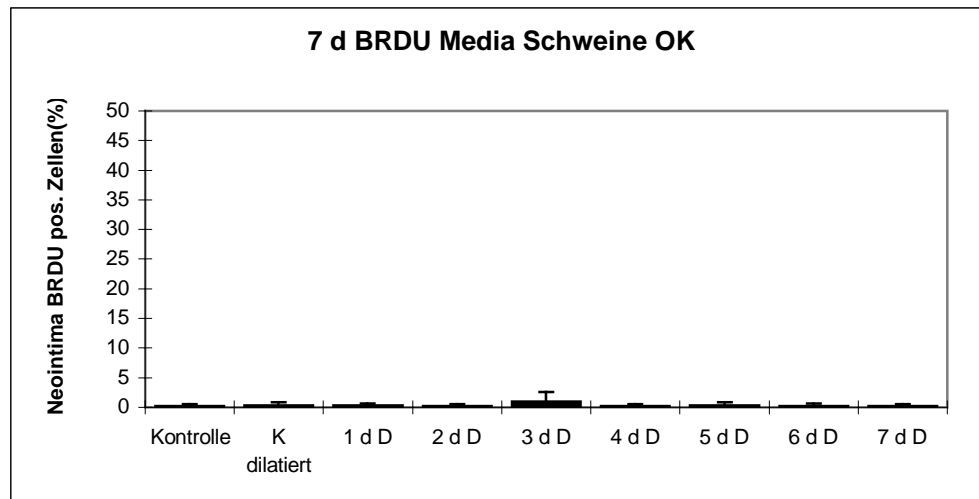


Abbildung 9: Zellproliferation in der Media koronarer Schweineorgankulturen nach 7 Tagen in Kultur (n = 5 pro Balken; $x \pm SD$).

Die Werte für die Media waren nicht signifikant.

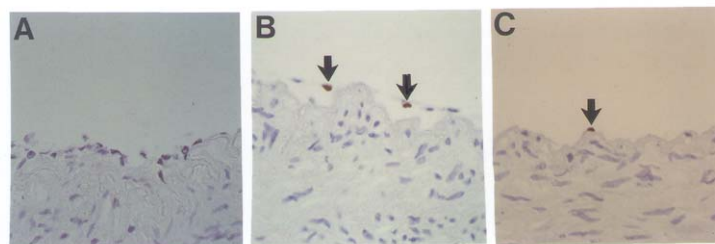


Abbildung 10: Reaktive Zellproliferation 7 Tage nach in vitro-Angioplastie. Immunhistologischer Nachweis von BrdU (Avidin-Biotin-Färbung): Koronare Organkulturen ohne Angioplastie (A), nach Ballonangioplastie mit 9 bar (B) und nach Ballonangioplastie mit 9 bar und zusätzlicher Hochdosis-Inkubation mit Diltiazem (50 µg/ml, C). Pfeil: BrdU-positive Zelle.

3.2. Zellproliferation nach 28-tägiger Kultivierungsdauer

3.2.1. Neointima

Nach 28 Tagen in Kultur war die Anzahl der BRDU-positiven Zellen deutlich geringer: Sowohl für den 1- als auch für den 6-tägigen Diltiazemzusatz wurde keine Zellproliferation gefunden, desgleichen wiesen die beiden Kontrollen (dilatiert und nicht dilatiert) keine BRDU-positiven Zellen auf. Das niedrigste Zellwachstum stellten wir beim 3-tägigen Zusatz von Diltiazem fest ($0,07 \pm 0,2\%$) ($x_M \pm SD$), ein Anstieg über $1,07 \pm 2,04\%$ (7 d D), $1,18 \pm 2,6\%$ (2 d D) und $2,2 \pm 5,9\%$ (4 d D) bis auf $3,2 \pm 7,2\%$ BRDU-positive Zellen beim 5 d D-Ansatz war zu beobachten. Die Werte waren nicht signifikant.

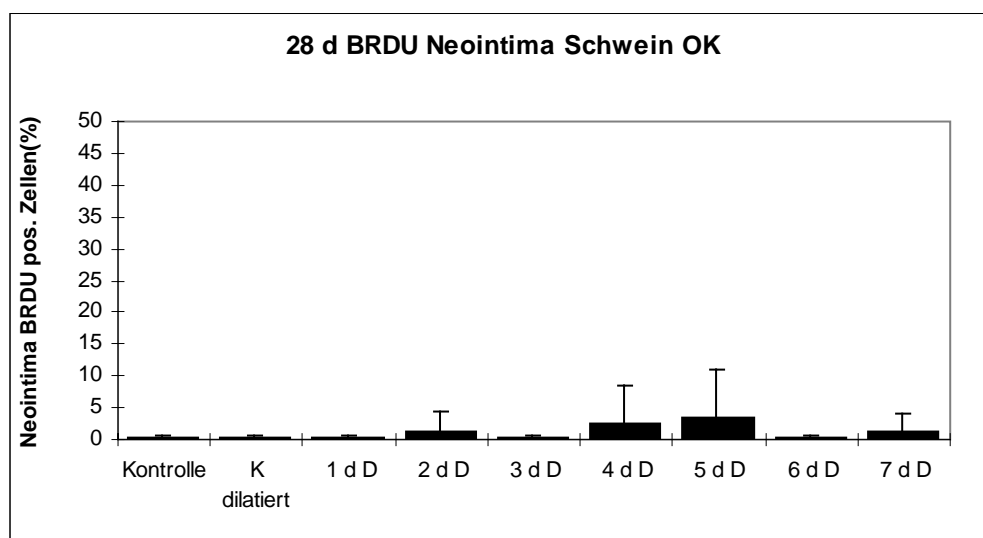


Abbildung 11: Zellproliferation in der Neointima koronarer Schweineorgankulturen nach 28 Tagen in Kultur (n = 5 pro Balken; $x \pm SD$).

3.2.2. Media

In der Media gab es nach 28-tägiger Kultivierung nur geringfügige Veränderungen gegenüber 7 Tagen in Kultur. Der höchste Wert wurde nach 4-tägigem Diltiazemzusatz festgestellt ($0,6 \pm 1,4\%$) ($x_M \pm SD$), während beim 3 d D-Ansatz mit $0,007 \pm 0,02\%$ die geringste Zahl BRDU-positiver Zellen zu sehen war. Dazwischen lagen Werte von $0,07 \pm 0,11\%$ (1 d D), $0,09 \pm 0,09\%$ (6 d D), $0,1 \pm 0,3\%$ (5 d D), $0,13 \pm 0,19\%$ (2 d D) und $0,16 \pm 0,35\%$ (7 d D). Erstaunlicherweise ergab sich für die Kontrolle ein kleines Wachstum von $0,003 \pm 0,01\%$, während bei der dilatierten Kontrolle keine positiven Zellen zu finden waren.

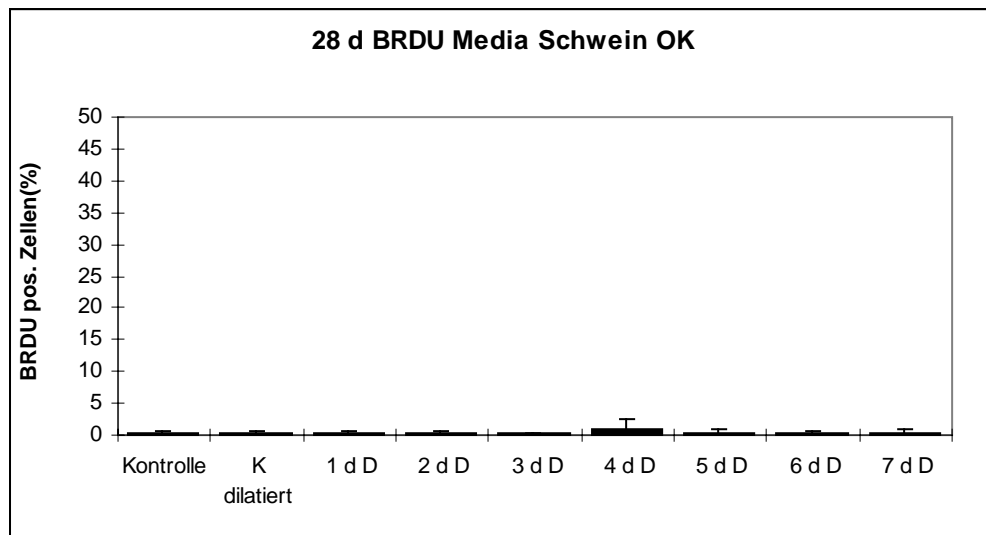


Abbildung 12: Zellproliferation in der Media koronarer Schweineorgankulturen nach 28 Tagen in Kultur (n = 5 pro Balken; $\bar{x} \pm SD$).

Auch nach 28-tägiger Kultivierung ergaben sich in der Media keine signifikanten Werte.

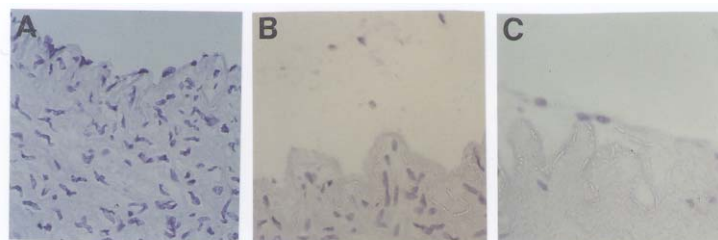


Abbildung 13: Reaktive Zellproliferation 28 Tage nach in vitro-Angioplastie. Immunhistologischer Nachweis von BrdU (Avidin-Biotin-Färbung): Koronare Organkulturen ohne Angioplastie (A), nach Ballonangioplastie mit 9 bar (B) und nach Ballonangioplastie mit 9 bar und zusätzlicher Hochdosis-Inkubation mit Diltiazem (50 µg/ml, C).

3.3. Zellproliferation in Organkulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

3.3.1. Neointima

In Abbildung 14 ist die Anzahl der Zellen in der Neointima dargestellt, die BRDU bei der DNA-Synthese eingebaut haben (in Relation zur Gesamtzellzahl in Prozent).

Jedes Kästchen bzw. jeder Balken repräsentiert im Durchschnitt eine Fallzahl von mindestens fünf verschiedenen RIVA-Segmenten (Mittelwert \pm Standardabweichung).

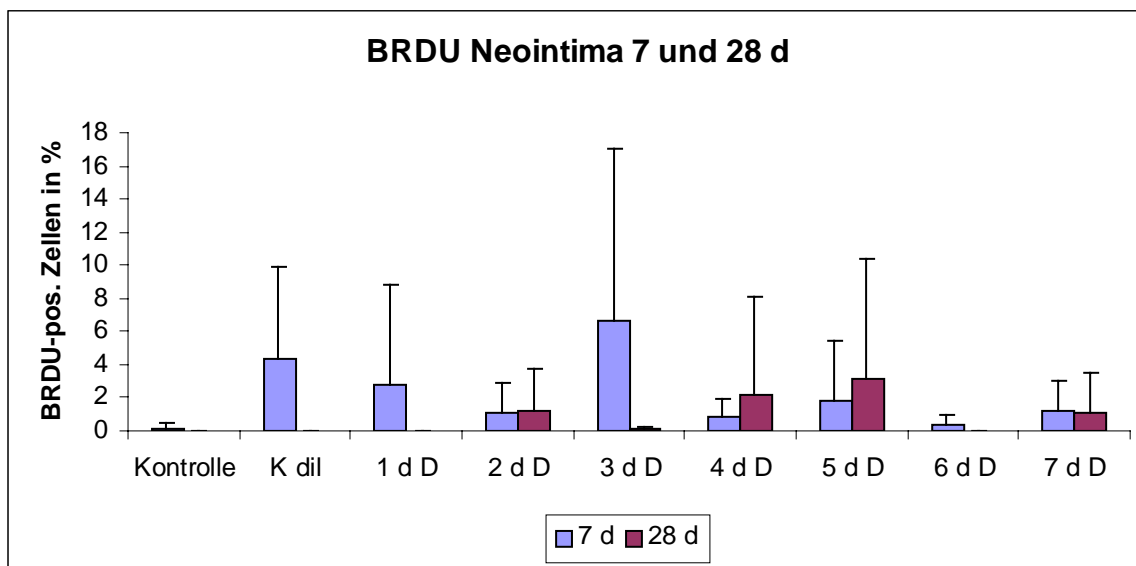


Abbildung 14: BRDU-positive Zellen in der Neointima der koronaren Organkulturen nach 7 und 28 Tagen in Kultur.

Nach 7-tägiger Kultivierung war bei den Kontrollsegmenten eine nur ganz geringfügige, bei den dilatierten RIVA-Segmenten hingegen eine ausgeprägte Anfärbung mit Anti-BRDU-Antikörpern zu beobachten, deren Ausmaß nach 3-tägigem Diltiazemzusatz jedoch noch größer war. Die Syntheseraten in der Neointima der restlichen Ansätze lagen alle höher als bei den Kontrollsegmenten, eine Abhängigkeit von der Dauer des Medikamentenzusatzes war dabei nicht ersichtlich.

Nach 28 Tagen in Kultur konnte bei den nichtdilatierten und den dilatierten Kontrollen überhaupt keine Anfärbung mit Anti-BRDU-Antikörpern festgestellt werden, ebenso wenig war dies beim 1- und 6-tägigem Diltiazemzusatz der Fall. Bei den übrigen Ansätzen

waren unterschiedlich geringe Proliferationsraten zu sehen, die zum Teil (nach 2-, 4- und 5-tägigem Zusatz von Diltiazem) diejenigen nach 7 Tagen in Kultur übertrafen.

Die Werte waren im Vergleich zur Kontrolle alle nicht signifikant.

3.3.2. Media

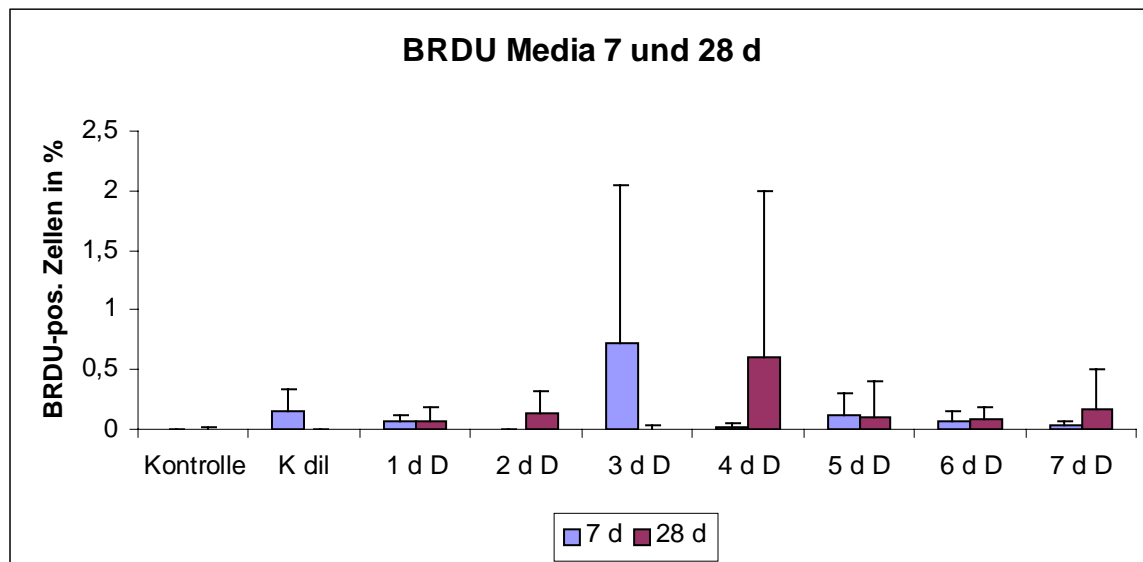


Abbildung 15: BRDU-positive Zellen in der Media der koronaren Organkulturen nach 7 und 28 Tagen in Kultur.

Bei den Kontrollen war nach 7 Tagen in Kultur keinerlei positive Reaktion auf Anti-BRDU-Antikörper feststellbar, bei 28-tägiger Kultivierung eine nur ganz geringe.

Bei den dilatierten Kontrollen verhielt es sich umgekehrt: während bei 7-tägiger Kultivierung eine geringe Syntheserate beobachtet wurde, war dies nach 28 Tagen in Kultur nicht der Fall.

Bei den übrigen Ansätzen fanden wir durchwegs geringe Syntheseraten zwischen 0,007 und 0,16%, wobei zwei Werte aus der Reihe fielen: Eine ausgesprochen stark positive Anfärbung mit Anti-BRDU-Antikörpern war sowohl nach 7 Tagen in Kultur bei 3-tägigem Diltiazemzusatz als auch nach 28 Tagen in Kultur bei 4-tägigem Zusatz der Testsubstanz zu sehen.

4. Glattmuskuläres α -Aktin in Organkulturen

Der Gehalt an α -Aktin-positiven glatten Muskelzellen (SMC) in koronaren Organkulturen ist in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst und in Abbildung 16 dargestellt. Die einzelnen

Schnitte wurden semiquantitativ ausgewertet. Jedes Kästchen repräsentiert im Durchschnitt eine Fallzahl von 5 verschiedenen RIVA-Segmenten.

4.1. Neointima

In der Neointima der Schweineorgankulturen war die Reaktion mit Antikörpern gegen α -SM-Aktin nur sehr vereinzelt positiv. Es war kein Unterschied zwischen Kontrollen und mit Angioplastie bzw. Diltiazem behandelten RIVA-Segmenten festzustellen, bei den 28-Tage-Ansätzen waren überhaupt keine positiven Zellen nachweisbar.

Der α -Aktin-Gehalt der Neointima von koronaren Schweineorgankulturen in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und Dauer des Diltiazemzusatzes ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 1: α -SM-Aktin in der Intima von Organkulturen

Dauer des Diltiazemzusatzes /Kultivierungsdauer	7 Tage	28 Tage
Kontrolle	-	-
Kontrolle dilatiert	-	-
1 d D	-	-
2 d D	+/-	-
3 d D	-	-
4 d D	+/-	-
5 d D	-	-
6 d D	-	-
7 d D	-	-

Legende: +/- vereinzelt α -SM-Aktin-positive Zellen
 - keine α -SM-Aktin-positiven Zellen

4.2. Media

In der Media der Schweineorgankulturen war die Reaktion mit Antikörpern gegen α -SM-Aktin immer positiv.

Tabelle 2: α -SM-Aktin in der Media von Organkulturen

Dauer des Diltiazemzusatzes /Kultivierungsdauer	7 Tage	28 Tage
Kontrolle	+++	++/+++
Kontrolle dilatiert	++	+
1 d D	+++	++
2 d D	+++	+ /+++
3 d D	+++	++
4 d D	+++	++
5 d D	++/+++	+
6 d D	++/+++	+
7 d D	++	+

Legende: +++ starke Expression
 ++ mäßige Expression
 + schwache Expression

Mit zunehmender Kultivierungsdauer nahm die Expression von α -SM-Aktin deutlich ab.

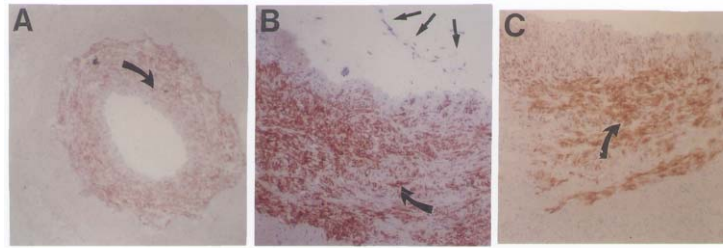


Abbildung 16: Avidin-Biotin-Färbung des glattmuskulären α -Aktins zum Nachweis von glatten Muskelzellen: Koronare Organkulturen ohne Angioplastie (A), nach Ballonangioplastie mit 9 bar (B) und nach Ballonangioplastie mit 9 bar und zusätzlicher Hochdosis-Inkubation mit Diltiazem (50 μ g/ml, C). Gebogene Pfeile: α -Aktin in glatten Muskelzellen. Gerade Pfeile: Neointimabildung.

5. Von-Willebrand-Faktor-Nachweis in Organkulturen

Von-Willebrand-Faktor als Nachweis für Endothelzellen (EC) in koronaren Organkulturen ist in Tabelle 3 und Abbildung 17 dargestellt. Die einzelnen Schnitte wurden wiederum semiquantitativ ausgewertet. Jedes Kästchen repräsentiert im Durchschnitt eine Fallzahl von 5 verschiedenen RIVA-Segmenten.

Bei den Segmenten der Kontrollgruppe, die nicht dilatiert worden waren, fanden wir eine deutlich positive Reaktion mit Antikörpern gegen den von-Willebrand-Faktor sowohl nach 7 als auch nach 28 Tagen in Kultur. Bei fast allen einer Angioplastie ausgesetzten Organkulturen war die Anzahl der von-Willebrand-Faktor-positiven Zellen klar vermindert. Ein Zusammenhang mit der Dauer des Diltiazemzusatzes war hier nicht ersichtlich.

Tabelle 3: Von-Willebrand-Faktor in koronaren Organkulturen

Dauer des Diltiazemzusatzes /Kultivierungsdauer	7 Tage	28 Tage
Kontrolle	++	++
Kontrolle dilatiert	+	+/-
1 d D	+	+/>+++
2 d D	+/-	+
3 d D	+	+
4 d D	+	+
5 d D	+	+
6 d D	+	+
7 d D	+/>+++	+

Legende:

- +++ von-Willebrand-Faktor positiv: geschlossener EC-Ring
- ++ von-Willebrand-Faktor positiv: viele ECs
- + von-Willebrand-Faktor positiv: nur vereinzelte ECs
- +/- von-Willebrand-Faktor positiv, jedoch keine ECs
- von-Willebrand-Faktor negativ, keine ECs

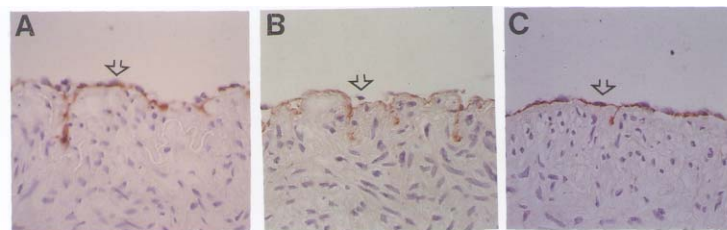


Abbildung 17: Avidin-Biotin-Färbung des von-Willebrandfaktors in Endothelzellen (Pfeile). Koronare Organkulturen ohne Angioplastie (A), nach Ballonangioplastie mit 9 bar (B) und nach Ballonangioplastie mit 9 bar und zusätzlicher Hochdosis-Inkubation mit Diltiazem (50 µg/ml, C).

E. DISKUSSION

1. Simultane endo- und perivaskuläre Applikation von Antiproliferativa

Nach Verletzung von Gefäßen wie etwa durch Angioplastie werden verschiedenste Signalkaskaden aktiviert (98), nicht nur in der Intima, sondern in allen Schichten der Gefäßwand. Dies führt außer zu Gefäßwandverletzung, elastischen Rückstellmechanismen, Thrombozytenaggregation, Leukozytenaktivierung und „Remodeling“ auch zur Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) (22, 23, 24), was von vielen Gruppen für ein Schlüsselereignis in der Restenoseentwicklung nach Angioplastie gehalten wird. Ciezki et al. (13) untersuchten Gefäße von Patienten, die in den Monaten vor ihrem Tod einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie unterzogen wurden und stellten mittels immunhistochemischer Färbemethoden fest, dass Zellproliferation nicht auf die periluminale Region beschränkt ist, sondern in der gesamten Gefäßwand stattfindet. Daher kann man annehmen, dass eine rein endovaskuläre Anwendung von Antiproliferativa zwar Signalkaskaden, die die SMC-Proliferation anregen, in der Intima und proximalen Media effektiv hemmt, in der distalen Media und Adventitia jedoch keine ausreichende Hemmung des Wachstums entfalten kann. Dies könnte erklären, warum in einer Studie von Simon et al. (71) endoluminale Hochdosis-Substanzapplikation (via Scimed Dispatch Coronary Infusion Catheter) keinen Erfolg zeigte. Vor dem umgekehrten Problem steht man bei rein perivaskulärer Applikation von antiproliferativen Pharmaka. Diesbezüglich wurde in den letzten Jahren die Nutzung des Perikards als perivaskuläres Medikamentendepot von verschiedenen Autoren vorgestellt (87, 89): Verrier (81) berichtete von einem transatrialen Perikardzugang bei sechs Hunden und 13 Schweinen, Waxman (94, 95) untersuchte diesen an 20 Hausschweinen. Laham et al. (45) gelang ein subxiphoider Zugang bei 49 Yorkshire-Schweinen. Die Gefahr von peri- oder myokardialen Verletzungen oder Perikarditiden scheint dabei gering zu sein. Über den subxiphoiden Zugangsweg liegen auch bereits erste klinische Erfahrungsberichte vor (50), die diese Methode als eine schnelle, sichere und effektive Alternative zur herkömmlichen Perikardiozentese erscheinen lassen. Waxman et al. (94) untersuchten die vasodilatierende Wirksamkeit von transatrial ins Perikard eingebrachten Nitraten und berichteten von stärkerer Vasodilatation und geringerer systemischer Hypotension im Vergleich zu intrakoronärer Anwendung. Stoll et al. (76) verglichen endoluminale und intraperikardiale

Applikation von FGF, PDGF und anderen Proteinen und stellten höhere und länger andauernde intrakoronare Konzentrationen bei perikardialer Applikation fest.

Die endovaskuläre Applikation durch beschichtete Stents ist schon seit längerem bekannt (1).

Da beide Therapieansätze Wirkungslücken aufweisen, sollte die Kombination beider Möglichkeiten, also simultane endo- und perivaskuläre Applikation von Antiproliferativa, diskutiert werden. Möglicherweise kann eine solche Therapiestrategie alle Stimulationswege in der gesamten Gefäßwand kontrollieren.

2. Applikation von Antiproliferativa im koronaren Schweineorgankulturmodell

Koronararterien von Hausschweinen zeigen ähnliche Reaktionen auf Gefäßverletzung wie diejenigen des Menschen (11, 64). Steele et al. (75) untersuchten die Reaktion von Schweinekoronararterien auf Ballonangioplastie in vivo: Es kam zu endothelialer Denudation, Thrombozytenablagerung und Thrombusformation, Dissektion der Lamina elastica interna und SMC-Verletzung in der Media. Das koronare Organkulturmodell mit Schweinekoronararterien aus einem städtischen Schlachthof ist für die Untersuchung antiproliferativer Effekte von Pharmaka gut geeignet, so dass weniger weitaus aufwändigere Tierexperimente notwendig sind. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (84, 90) mit diesem Modell zeigte sich das Proliferationsmaximum der SMC 7 Tage nach Angioplastie, das stärkste Neointimawachstum nach 28 Tagen. Da sowohl die Gefässinnen- als auch –ausenfläche vollen Kontakt zum Kulturmedium und damit auch zu darin gelösten Antiproliferativa haben, kann man mit dem Schweinekoronarorgankulturmodell gut die simultane endo- und perivaskuläre Applikation solcher Substanzen untersuchen.

Unser Labor konnte in früheren Studien die starke antiproliferative Wirkung von Diltiazem in einer Konzentration von 50 µg/ml demonstrieren (85). In klinischen Studien konnte dieser Effekt bisher jedoch nicht gezeigt werden (18, 56, 77), mit Ausnahme einer Untersuchung von Unverdorben et al. (79), die allerdings nur als Abstract vorliegt. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man sich vor Augen führt, dass die Plasma-Spitzenpiegel von Diltiazem nach oraler Zufuhr zwischen 0.12 µg/ml (90 mg/Tag) und 0.15 µg/ml (120 mg/Tag) variieren (9) und die in den genannten Studien verabreichte Dosis zwischen 90 mg zweimal täglich (77), 90 mg dreimal täglich (18) und 120 mg dreimal täglich (56)

schwankte. Die *in vitro* effektive Konzentration liegt also mehr als 300mal so hoch wie die klinisch maximal erreichten- von dieser Werte aus betrachtet wäre ein restenosehemmender Effekt von systemisch verabreichtem Diltiazem erstaunlich gewesen. Schlant und King (62) vermuten, dass Kalziumantagonisten das Restenoserisiko bei Patienten mit Koronarspasmen, welche einen Risikofaktor für das Auftreten einer Restenose darstellen, reduzieren, indem sie diesen entgegenwirken.

In der Verapamil-Angioplastie-Studie konnte mit 480 mg täglich eine signifikante Senkung der Restenoserate nur für eine Untergruppe von Patienten mit stabiler Angina pectoris und hohem Restenose-Risiko erzielt werden (29, 30). Whitworth et al. fanden in einer Studie mit 10 mg Nifedipin täglich für sechs Monate keine Auswirkungen auf die Restenoseinzidenz (97). Johanson et al. stellten fest, dass auch die Verabreichung von Betablockern – alleine oder in Kombination mit Kalziumantagonisten – keinerlei Einfluß auf die Bildung einer Restenose hat (34). In der ACCORD- Studie wurde eine leichte Verbesserung des langfristigen angiographischen Ergebnisses mit der Gabe von NO-Donatoren (Linsidomin und Molsidomin) erzielt, ein günstigerer klinischer Verlauf ging damit jedoch nicht einher (43).

Wilson et al. untersuchten in einem koronaren Schweine-Organkultur-Modell die Wirkung des ACE-Hemmers Captopril und der Angiotensin II-Rezeptorantagonisten Losartan und PD 123319 auf ballondilatierte Gefäße und fanden eine signifikante antiproliferative Potenz für beide Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten, nicht jedoch für Captopril (100). Dies deckt sich mit den Ergebnissen klinischer Studien, die für ACE-Hemmer keine Senkung der Restenoserate ergaben.

Das *ex-vivo*-Organkulturmodell hat den Vorteil, dass Ergebnisse mit *in-vivo*-Modellen der gleichen Spezies gut vergleichbar sind, da sowohl im Schweine-Organkulturmodell (84, 90) als auch in der entsprechenden *in-vivo*-Studie mit Hausschweinen (11) der Peak der reaktiven Zellproliferation am 7. Tag und das Maximum der reaktiven Intimaverdickung am 28. Tag nach Angioplastie auftreten.

Ein generelles Problem der Restenoseforschung besteht in der Unzuverlässigkeit, mit der Daten aus *ex-* oder *in-vivo*-Tiermodellen auf die Situation im menschlichen Körper übertragen werden können (11). In Untersuchungen unseres Labors konnte gezeigt werden, dass das SMC-Proliferationsmaximum in humanen Organkulturen erst am 21. Tag nach Angioplastie auftritt, also deutlich später als beim Schwein (82, 83). Die maximale Neointimabildung hat sich entsprechend am 56. Tag entwickelt. Diese speziestypischen Unterschiede müssen natürlich Beachtung finden, wenn man simultane endo- und

perivaskuläre Medikamentenapplikation am Menschen plant. Das Schweineorgankulturmodell hat den Nachteil, dass Einflussgrößen wie Blutdruck, Scherkräfte oder Leber- und Nierenaktivität nicht berücksichtigt werden, deshalb muss die proliferationshemmende Diltiazemkonzentration von 50 µg/ml als absolutes Minimum betrachtet werden, ebenso wie die Anwendungsdauer des Medikamentes am Patienten modifiziert werden müsste. Es ist aber vorstellbar, dass zwischen Daten aus humanen Organkulturen und jenen im menschlichen Körper die gleichen Korrelationen bestehen wie zwischen Schweine-Organokulturen und der in-vivo-Situation beim Hausschwein, und dass man mittels der drei bekannten Variablen Rückschlüsse auf die vierte, noch unbekannte – die Situation beim Patienten – ziehen könnte.

3. Zellproliferation nach Angioplastie und Diltiazemapplikation

In der Neointima der Kontroll-Organokulturen ohne Angioplastie fand sich so gut wie keine Proliferation, was mit Ergebnissen anderer Gruppen übereinstimmt (23, 57). Schweinekoronararterien, die zwar dilatiert wurden, jedoch keinen Diltiazemzusatz erhielten, zeigten erwartungsgemäss eine starke Zellproliferation (90).

Die stärkste Zellproliferation war nach dreitägiger Inkubation mit Diltiazem zu sehen, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass das Wachstum der SMC schon drei bis vier Tage nach Ballondilatation sehr ausgeprägt ist (wenn auch das Maximum erst um den 7. Tag erreicht wird), während Diltiazem seinen antiproliferativen Effekt erst nach längerer Inkubationszeit entfalten kann.

Die reaktive SMC-Proliferation nach Angioplastie war in den Schweinekoronararterien, die für 4, 5, 6 oder 7 Tage mit Diltiazem inkubiert waren, um mehr als die Hälfte reduziert (n.s.). Diese Proliferationshemmung durch Hochdosis-Diltiazem in einer Konzentration von 50 µg/ml konnte in unserem Labor auch in früheren Untersuchungen mit verschiedenen Restenosemodellen gezeigt werden (85).

Munro et al. untersuchten die Effekte verschiedener Kalzium-Antagonisten an humanen glatten Muskelzellen aus der V. saphena bzw. aus Stenosen in venösen Bypässen. Sie stellten fest, dass Amlodipin und Verapamil die Proliferation humaner venöser SMC in einer Konzentration von 10 µM signifikant reduzierten, während dies bei Diltiazem in gleicher Konzentration nicht der Fall war (54). Da das Proliferationsmaximum humaner SMC zumindest in Arterien erst bei ca. 21 Tagen nach Angioplastie liegt (91, 92) und die Kultivierungsdauer in diesem Fall nur 14 Tage betrug, kann ein proliferationshemmender Effekt allerdings kaum zuverlässig nachgewiesen werden. Ide et al. (33) verglichen den

antiproliferativen Effekt von Benidipin mit dem anderer Kalziumantagonisten an isolierten glatten Muskelzellen des Schweins und stellten fest, dass dieser stärker ausgeprägt war als u. a. bei Nitrendipin, Felodipin, Nifedipin, Verapamil und Diltiazem. Anschliessend verabreichten sie lebenden Ratten nach endothelialer Denudation der Aorta Benidipin (5 mg/kg) und sahen 48 Stunden nach Ballondilatation verminderte Proliferation von SMC.

In der Media der Schweinekoronarorgankulturen war kaum SMC-Proliferation festzustellen. Dies steht im Einklang mit einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe mit dem koronaren Schweine- Organkulturmodell (84) und Berichten von Carere et al. (10). Im Gegensatz hierzu berichteten Webster et al. von einer Zellproliferation nach Angioplastie in der Media von Schweinekarotiden (96), die allerdings zum größten Teil in den ersten 48 Stunden beobachtet wurde und somit in unserem Experiment nicht detektiert werden konnte. Das Nichtvorhandensein eines medialen Proliferates könnte darauf hindeuten, dass mediale SMC erst nach Migration in den subendothelialen Raum zu proliferieren beginnen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass im subendothelialen Raum bereits SMC vorhanden sind, die das neointimale Wachstum verursachen, wie von Thomas et al. und Scott et al. im Schweine-Modell beschrieben wurde (67, 78).

Zwei Werte fielen durch stark positive Anfärbung mit Anti-BRDU-Antikörpern aus der Reihe: nach drei- bzw. viertägigem Zusatz von Diltiazem nach sieben bzw. 28 Tagen in Kultur.

4. Neointimabildung nach Angioplastie und Diltiazemapplikation: Morphometrie

Bei den nichtdilatierten Kontrollsegmenten war überraschenderweise sowohl nach sieben als auch nach 28 Tagen Kultivierungsdauer ein Neointimawachstum zu sehen. Teilweise war dieses sogar stärker ausgeprägt als bei angioplastierten Organkulturen (z. B. nach sechs- und siebentägigem Diltiazemzusatz). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Endothelzellschicht von Gefässen sehr empfindlich ist und nicht nur durch Angioplastie, sondern bereits durch Quetschungen beim Hantieren mit der Pinzette im Rahmen der Präparation beschädigt bzw. zerstört worden sein könnte. Über die Rolle von Endothelverletzung bei der Stimulation des SMC-Wachstums wurde in der Literatur vielfach berichtet (38, 40).

Das Wachstum der Neointima in den dilatierten Kontrollkoronarien war erwartungsgemäss gross. Eintägige Diltiazeminkubation resultierte in überhaupt keiner, zweitägiger Medikamentenzusatz in nur geringfügiger Verringerung, was dafür spricht, dass der

kurzzeitige Einsatz von Diltiazem dessen antiproliferative Wirkung nicht zum Einsatz kommen lässt.

Die Neointimabildung war nach drei-, sechs- und siebentägiger Inkubation mit Diltiazem signifikant vermindert.

5. Zytoskelett nach Angioplastie und Diltiazemapplikation

In der Media der Schweinekoronararterien fand sich konstant eine positive Anfärbung mit Antikörpern gegen α -SM-Aktin, wobei es keine Unterschiede zwischen den dilatierten Organkulturen und den Kontrollen gab und die Anfärbung auch unabhängig von der Kultivierungsdauer war. Zu diesem Ergebnis kamen auch Koo und Gotlieb 1991 (40) und unsere Arbeitsgruppe 1995 (84). In Übereinstimmung mit Daten, dass Diltiazem in einer Konzentration von 50 μ g/ml keinen Einfluss auf die α -Aktin-, Vimentin- und α -Tubulin-Strukturen humaner SMC in vitro zeigte (85), veränderte auch in unserem Experiment der Zusatz von Diltiazem in gleicher Konzentration die α -SM-Aktin-Ausprägung der SMC nicht.

In der Neointima konnten wir weder nach 7 noch nach 28 Tagen Kultivierungsdauer α -Aktin-Strukturen nachweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die These von Kocher et al. (37) sein, dass aktiv proliferierende SMC einen von der α -Form unterschiedlichen F-Aktin-Phänotyp exprimieren, den der Anti- α -SM-Aktin-Antikörper nicht detektieren kann. Dies wird durch die in unserer Studie erhöhte Zellproliferation in der Neointima bei geringer Proliferation in der Media gestützt.

6. Endothel nach Angioplastie und Diltiazemapplikation

Eine klar positive Anfärbung von Endothelzellen mit dem vWF-Antikörper war in allen unbehandelten Kontrollen der Schweinekoronararterien zu sehen und blieb selbst bei 28-tägiger Kultivierungsdauer erhalten. Die Behandlung mit dem Ballonkatheter ging mit z.T. erheblicher Verminderung der Endothelzellzahl einher, ohne dass Unterschiede zwischen 7- und 28-tägiger Kultivierung festzustellen waren. Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese, dass Endothelverletzung ein wesentlicher Stimulus für reaktive SMC-Proliferation nach Angioplastie ist, überein. Eine Reendothelialisierung konnten wir in unseren Organkulturen nicht beobachten, was daran liegen könnte, dass kein EC-spezifisches Kulturmedium verwendet wurde. Es wurde berichtet, dass gesunde Endothelzellen in den Carotiden der Ratte aus einer nicht verletzten Gefäßregion in die

dilatierte Region einwachsen und die SMC-Proliferation hemmen können (12). Da in unserer Studie das gesamte Gefäßsegment mit dem Ballonkatheter dilatiert wurde und es somit keine unverletzten Gefäßregionen gab, konnte auch kein Einwachsen von gesunden Endothelzellen erfolgen, was ebenfalls eine Erklärung für die fehlende Regeneration des Endothels in unserem Experiment sein könnte. Dass Endothelzellen sehr druckempfindliche Zellen sind, wurde mehrfach untersucht (82).

Die Inkubation mit Diltiazem reduzierte die Anzahl der EC nicht weiter, so dass davon auszugehen ist, dass eine Reendothelialisierung in vivo von Diltiazem nicht beeinträchtigt würde.

Die Rolle von Endothelzellen bei der Neointimabildung ist noch immer nicht ganz geklärt. In zahlreichen Untersuchungen wurde die Entfernung der Endothelzellschicht mit einem Ballonkatheter zur Induktion einer experimentellen Neointima verwendet (66, 67). Nach Ross (59, 60) könnte eine funktionelle Endothelverletzung auch ohne komplette Denudation die reaktive SMC-Proliferation stimulieren („response-to-injury“-Hypothese). In Übereinstimmung hiermit wurde gezeigt, dass Endothelzellen mit gesteigerter Synthese und Freisetzung von einem PDGF-ähnlichen Protein auf bestimmte Verletzungen reagieren, das in vitro die SMC-Proliferation anregt (25). Sjölund et al. (73) berichteten andererseits auch von PDGF-ähnlichen Proteinen, die von den glatten Muskelzellen selbst produziert und sezerniert wurden.

7. Strategien der Restenosehemmung

Lechleitner et al. verabreichten ihren Patienten eine Woche vor Angioplastie hohe Dosen eines Omega-3-Fettsäuren-Nahrungszusatzes und berichteten von einem verminderten Restenoserisiko (47). Die Autoren bezweifeln allerdings den Nutzen dieser Therapie, wenn diese erst einen Tag oder noch kürzer vor dem Eingriff begonnen würde, woraus sich im klinischen Alltag Umsetzungsprobleme ergeben. Auch Meier berichtet vom erfolgreichen Einsatz von Fettsäurederivaten (Eicosanoiden), dieser ist jedoch nur mit hohen Dosen zu erreichen und völlig ineffektiv in geringerer Menge (51).

Auch über Methoden zur gezielten endovaskulären Applikation von Medikamenten wurde schon des öfteren in der Literatur berichtet. Wilensky et al. (99) injizierten unter Druck eine Suspension mit Mikropartikeln in die Femoralarterien von Kaninchen sofort nach Angioplastie mittels einem porösen Ballonkatheter und konnten diese Mikropartikel bis zu 14 Tagen nach dem Eingriff in allen Gefäßwandschichten nachweisen. Daraus schlossen sie, dass solche Mikropartikel als Medikamentencarrier in der Restenosebehandlung

einsetzbar seien. Über das Einbringen von Substanzen in die menschliche Arterienwand ebenfalls mit einem porösen Ballonkatheter berichteten Wolinsky et al. in einer Postmortem-Angioplastie-Studie (101).

Simon et al. untersuchten, ob endoluminal applizierte Basenanaloga die Restenoseentwicklung beeinflussen. Diese wurden mittels porösem Ballonkatheter (Scimed Dispatch Coronary Infusion Catheter) in die Koronararterien von 12 Hausschweinen eingebracht. Nach durchschnittlich 49 Tagen wurden die Schweine geschlachtet und die behandelten Koronarien histologisch untersucht. Ein Einfluss auf die Neointimabildung konnte nicht festgestellt werden (71).

Vielversprechende Ergebnisse erbrachten verschiedene Studien zur endovaskulären Bestrahlung als Restenoseprophylaxe. Diese kann mit Beta- oder Gammastrahlen durchgeführt werden: erstere haben eine nur geringe Reichweite, was den Strahlenschutz erleichtert, aber zu Problemen beim Erreichen einer gleichmäßig verteilten Bestrahlung führt; mit letzteren lässt sich eine gleichmäßige Bestrahlung aller Gefäßwandschichten erreichen, da sie tiefer ins Gewebe eindringen, was jedoch kompliziertere Strahlenschutzmaßnahmen erfordert. Bevorzugt wird der Betastrahler Rhenium 188 in Form eines flüssigkeitsgefüllten Ballons, der in klinischen Studien bereits ermutigende Ergebnisse zeigte (42). Vor kurzem wurde zudem der antiproliferative Effekt von Betastrahlern wie Gallium 68 untersucht, die eine kürzere Halbwertszeit als Rhenium 188 haben und somit im Falle einer Ballonruptur ungefährlicher sind. Gallium 68 erwies sich hierbei als gleich effektiv wie Rhenium 188 (76).

Muller et al. (53) implantierten Stents in die Karotiden von 14 Yorkshire-Schweinen und fixierten an der Gefäßaussenseite eine mit Dexamethason beschichtete Kunststoffmatrix. Nach 35 Tagen untersuchten sie die Karotiden und stellten fest, dass in den Gefäßarealen, die der Dexamethasonbeschichtung angelegen hatten, zwar perivaskuläre und adventitielle Fibrosierung geringer waren als in anderen Bereichen, die Intimahyperplasie jedoch in allen Gefäßarealen gleich stark war.

Auch in der Gentherapie wurden besonders in letzter Zeit einige Ansätze zur Restenoseverhinderung verfolgt. So berichteten etwa Morishige et al. über angiographisch verminderte Restenoseraten bei Schweinen, in deren Koronarien unmittelbar nach Ballondilatation natriuretisches Peptid vom C-Typ mittels Adenoviren transferiert wurde (52).

Creel et al. untersuchten das Zytostatikum Paclitaxel auf seine restenosehemmende Potenz an ex-vivo-Organkulturen aus Karotiden von Kälbern. Paclitaxel wurde entweder endo-

oder perivaskulär appliziert und die Gefäßsegmente dabei von Nährmedium perfundiert, was den Blutfluß in vivo simulieren sollte. Je nachdem, ob das Zytostatikum endoluminal oder perivaskulär appliziert wurde, waren höhere Konzentrationen in der Intima oder in der Adventitia zu finden, wobei die absolute Menge des Medikamentes in der Gefäßwand bei endovaskulärer Anwendung fast doppelt so hoch war. Die Autoren hoben besonders hervor, dass Paclitaxel aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften länger im Gewebe verbleibt als hydrophile Substanzen (19).

Seit Ende der achtziger Jahre wurde mit gentherapeutischen Ansätzen versucht, Mittel zur Restenoserezidivprophylaxe zu finden. Eine Rolle spielten hierbei etwa die Hemmung von NF- κ B, einem Transskriptionsfaktor, der von Mitogenen aktiviert wird und Einfluß hat auf die vermehrte Produktion von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und vasoaktiven Substanzen (2), das Einschleusen von β -Interferon oder den Wachstumsfaktoren VEGF, bFgF und PDGF in Zellen verletzter Gefäße (35, 36, 80, 93) oder auch die Induktion einer NO-Synthase in Endothelzellen (12, 48). Insgesamt wird die Gentherapie als vielversprechender Ansatz gehandelt (35, 36).

F. ZUSAMMENFASSUNG

Im Schweinekoronar-Organkulturmodell kann der Effekt antiproliferativer Substanzen auf die Restenoseentwicklung besonders gut untersucht werden, da sowohl innere als auch äußere Gefäßwandschichten gleichmäßig in einer definierten Konzentration von der Testsubstanz umspült werden. Bisherige Studien beschränkten sich auf die Untersuchung der entweder endo- oder perivaskulären Applikation, wo entweder in erster Linie innere oder äußere Gefäßwandschichten in Kontakt mit der Testsubstanz kommen, oder der systemischen Anwendung von Antiproliferativa, die mit den Problemen der unzureichenden Konzentrationen vor Ort und dosisabhängigen Nebenwirkungen behaftet ist. Von ca. vier Monate alten Hausschweinen aus einem lokalen Schlachthof wurde jeweils der Ramus interventricularis anterior (RIVA) 2 cm distal des Abgangs aus der Aorta steril präpariert. Diese Gefäße wurden in 5 mm lange Segmente zerteilt und mit einem 3mm-Ballonkatheter jeweils für 60 Sekunden mit einem Druck von 9 bar dilatiert, da bei diesem Dilatationsdruck die maximale Zellproliferation vorzuliegen scheint. Die Kultivierung der Gewebeproben erfolgte in mit Waymouth's/ Ham's F-12 Nutrient Mixture und 15% fetalem Kälberserum in 6-Loch-Schalen, die Zugabe von Diltiazem erfolgte in einer ausreichend hohen Konzentration von 50µg/ml. Die Kultivierungsdauer betrug maximal 28 Tage, da nach der aktuellen Datenlage die Proliferation der glatten Muskelzellen nach ca. 4 Wochen stagniert. Das Proliferationsmaximum beim Schwein liegt im Bereich von 7 Tagen. Daher wurde nach 7 bzw. 28 Tagen den Kulturen 18 Stunden vor Fixierung das Thymidin-Basenanalogen 5-Brom-2'Desoxyuridin (BRDU) zugegeben, um Zellteilungen zu detektieren. Nach Einbettung der Gefäßsegmente in Paraffin wurden 4 µm-Serienschnitte mit einem Mikrotom angefertigt. Die mit einer Elastika-van-Gieson-Färbung gefärbten Schnitte wurden mit einem computergestützten morphometrischen Auswertungssystem auf Neointimabildung hin beurteilt. Dabei zeigte sich bei den nichtdilatierten Kontrollen nach 7 Tagen in Kultur eine ganz geringe, nach 28 Tagen eine deutliche Intimaverdickung. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das Endothel während der Präparation leicht gequetscht wurde und dies bereits einen ausreichenden Proliferationsstimulus darstellte. Die dilatierten Kontrollen zeigten ausgeprägtes Neointimawachstum. Nach 7-tägiger Kultivierung konnte ein im Vergleich zur dilatierten Kontrolle geringeres, jedoch nicht signifikantes Neointimawachstum erst ab 4-tägigem Diltiazemzusatz festgestellt werden. Nach 28-tägiger Kultivierung fand sich ein signifikant vermindertes Neointimawachstum bei 6- bzw. 7-tägigem Zusatz von Diltiazem.

Der prozentuale Anteil BRDU-positiver Zellen wurde am Paraffinschnitt durch immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen BRDU dargestellt. Nach 7 Tagen in Kultur war weder in Intima noch Media eine von der Dauer des Diltiazemzusatzes abhängige Zellproliferation zu beobachten. Bei den nichtdilatierten Kontrollen trat erwartungsgemäß kaum Proliferation auf, während dies bei den angioplastierten Kontrollen sehr deutlich der Fall war. Nach 28 Tagen in Kultur fanden sich in Intima und Media insgesamt weitaus weniger BRDU-positive Zellen als nach 7 Tagen, ein Einfluß der Testsubstanz ließ sich jedoch auch hier nicht nachweisen.

Zur Detektierung glatter Muskelzellen (SMC) wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen Aktin gefärbt und semiquantitativ ausgewertet. In der Media war diese Reaktion immer positiv ohne Unterschied zwischen Kontrollen und dilatierten und mit Diltiazem inkubierten Organkulturen, wobei nach 28-tägiger Kultivierungsdauer die Ausprägung geringer war als nach 7 Tagen in Kultur. In der Intima konnte unabhängig von der Kultivierungsdauer keine positive Reaktion beobachtet werden.

Zur Identifikation von Endothelzellen wurden die Paraffinschnitte mit einem Antikörper gegen vWF (von-Willebrand-Faktor) angefärbt und ebenfalls semiquantitativ ausgewertet. Bei den unbehandelten Kontrollen war die Reaktion auf Anti-vWF-Antikörper immer klar positiv, die Endothelzellschicht blieb selbst nach 28 Tagen in Kultur erhalten. Bei fast allen dilatierten Organkulturen war der Anteil der vWF-positiven Zellen deutlich reduziert und die Endothelzellschicht somit zumindest partiell zerstört und nicht regeneriert. Es zeigte sich keine Abhängigkeit von der Inkubation mit Diltiazem.

Schlussfolgerung: Das Organkultur-Modell mit Koronararterien des Schweins ist sehr gut geeignet, die Rahmenbedingungen und den Effekt einer simultanen endo- und perivaskulären Applikation von Antiproliferativa unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Durch BRDU-Identifikation konnte eine Hemmung der reaktiven Zellproliferation um mehr als 50% (n.s.) durch Diltiazem in Konzentration von 50 µg/ml für 4,5,6 und 7 Tage nachgewiesen werden. Die Neointimabildung konnte nach 6- und 7-tägiger Inkubation mit Hochdosis-Diltiazem signifikant vermindert werden. Ein simultaner intra- und extravaskulärer Therapieansatz und die Berücksichtigung der speziesspezifischen Proliferations- und Neointimaverdickungsmaxima könnte zukünftig einen wichtigen Beitrag zur Senkung der Restenoseinzidenz leisten.

G. LITERATUR

1. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Fliedner T, Erhard W, Schömig A: Inhibition of neointima formation after coronary stenting- a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 101: 1453-1458 (2000)
2. Autieri MV, Yue TL, Ferstein GZ, Ohlstein E: Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 827-836 (1995)
3. Bauters C, Van Belle E, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand ME: Restenosis after angioplasty. *Arch Mal Coeur Vaiss* 92:1579-1582 (1999)
4. Betz E: Cell culture systems to study progression and inhibition of intimal proliferations. *Basic Res Cardiol* 86: 79-86 (1991)
5. Betz E, Fallier-Becker P, Wolburg-Buchholz K, Fotev Z: Proliferation of smooth muscle cells in the inner and outer layers of the tunica media of arteries: an in vitro-study. *J Cell Physiol* 147: 385-395 (1991)
6. Betz E, Hämmerle H, Strohschneider T: Inhibition of smooth muscle cell proliferation and endothelial permeability with flunarizine in vitro and in experimental artheromas. *Res Exp Med* 185: 325-340 (1985)
7. Betz E, Hämmerle H, Strohschneider T: Inhibitory actions of calcium entry blockers on experimental artheromas. In: Godfraind et al. (eds.): Calcium entry blockers and tissue protection. Raven press, New York: 117-127 (1985)
8. Betz E, Hämmerle H, Viele D: Ca²-entry blockers and artherosclerosis. *Inter Angio* 3: 33-42 (1984)
9. Buckley MMT, Grant SM, Goa KL, McTavish D, Sorkin EM: Diltiazem: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 39: 757-806 (1990)
10. Carere RG, Koo EW, Liu PP, Gotlieb AI: Porcine coronary artery organ culture: a model for the study of angioplasty injury. *Cardiovasc Pathol* 1: 107-115 (1992)
11. 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)
12. Chen L, Daum G, Forough R, Clowes M, Walter U, Clowes AW: Overexpression of human endothelial nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells and in balloon-injured carotid artery. *Circ Res* 82: 862-870 (1998)

13. Ciezki JP, Hafeli UO, Song P, Urankar-Nagy N, Ratliff NB, Rybicki L, Brill K, Meier D: Parenchymal cell proliferation in coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a human tissue bank study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1: 963-968 (1999)
14. Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA: Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J Cardiovasc Pharm* 14: 12-15 (1989)
15. Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle cell growth in chronically denuded vessels. *Lab Invest* 54: 295-303 (1986)
16. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. Smooth muscle cell growth in absence of endothelium. *Lab Invest* 49: 327-332 (1983)
17. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM: Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 49: 208-215 (1983)
18. Corcos T, David PR, Val PG, Renkin J, Dangoisse V, Rapold HG, et al. : Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 109: 926-931 (1985)
19. Creel CJ, Lovich MA, Edelman ER: Arterial paclitaxel distribution and deposition. *Circ Res* 86: 879-884 (2000)
20. Currier JW, Faxon DP: Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target? *J Am Coll Cardiol* 25: 516-520 (1995)
21. Farb A, Sangiorgi C, Carter AJ, Walley WM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R: Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 99: 44-52 (1999)
22. Ferns GA, Avades TY: The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol* 81: 63-88 (2000)
23. Fingerle J, Kraft T: The induction of smooth muscle cell proliferation in vitro using an organ culture system. *Inter Angio* 6: 65-72 (1987)
24. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J: A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 17: 758-769 (1991)
25. Fox PL, DiCorleto PE: Regulation of a production of a platelet-derived growth factor-like protein by cultured bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* 121: (abstract) 298 (1984)
26. 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)

27. Hanke H, Karsch KR: Role of smooth muscle cell proliferation after balloon angioplasty. *Herz* 17: 300-308 (1992)
28. Hanke H, Oberhoff M, Hanke S, Hassenstein S, Kamenz J, Schmid KM, Betz E, Karsch KR: Inhibition of cellular proliferation after experimental balloon angioplasty by low-molecular-weight heparin. *Circulation* 85:1548-1556 (1992)
29. Hoberg E: The effects of calcium antagonists after PTCA. *Eur Heart J* 16: 9-12 (1995)
30. Hoberg E: Calcium antagonists and prevention of postangioplasty restenosis. *Arch Mal Coeur Vaiss* 88: 29-34 (1995)
31. Holmes DR, Vliestra RE, Smith HC, et al.: Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) : a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol* 53: 77-81 (1984)
32. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M: Rezidivstenose nach Koronarangioplastie. *Z Kardiol* 84: 5-21 (1995)
33. Ide S, Kondoh M, Satoh H, Karasawa A: Anti-proliferative effects of benidipine hydrochloride in porcine cultured vascular smooth muscle cells and in rats subjected to balloon catheter-induced endothelial denudation. *Biol Pharm Bull* 17: 627-631 (1994)
34. Johanson SR, Lamm C, Bondjers G, Emanuelsson H, Hjalmarson A: Role of beta-adrenergic blockers after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 15: 915-920 (1990)
35. Kibbe M, Billiar T, Tzeng E: Gene therapy and vascular disease. *Adv Pharmacol* 46: 85-150 (1999)
36. Kibbe M, Billiar T, Tzeng E: Gene therapy for restenosis. *Circ Res* 86: 829-833 (2000)
37. Kocher O, Skalli O, Bloom WS, Gabbiani G: Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells: normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest* 50: 645-652 (1984)
38. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker A: Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 98: 224-233 (1998)
39. Koo EW, Gotlieb AI: Endothelial stimulation of intimal cell proliferation in a porcine aortic organ culture. *Am J Pathol* 134: 497-503 (1989)
40. Koo EW, Gotlieb AI: Neointimal formation in the porcine aortic organ cultures: Cellular dynamics over 1 month. *Lab Invest* 64: 743-753 (1991)

41. Koo EW, Gotlieb AI: The use of organ cultures to study vessel wall pathobiology. *Scanning Microsc* 6: 827-835 (1992)
42. Kotzerke J, Hanke H, Höher M: Endovascular brachytherapy for the prevention of restenosis after angioplasty. *Eur J Nucl Med* 27: 223-236 (2000)
43. Lablanche JM, Grollier G, Lusson JR, Bassand JP, Drobinski G, Bertrand B, Battaglia S, Desveaux B, Juillièrè Y, Juliard JM, Metzger JP, Coste P, Quiret JC, et al.: Effect of the direct nitric oxide donors linsidomine and molsidomine on angiographic restenosis after coronary balloon angioplasty: The ACCORD study. *Circulation* 1: 83-89 (1997)
44. Lafont A, Durand E, Rahal S, de Oliveira M, Guerin Y, Fernandez F, Desnos M, Guerot C : Restenosis : physiopathology, treatments and prevention. *Ann Cardiol Angiol* 44: 349-353 (1995)
45. Laham RJ, Simons M, Hung D: Subxiphoid access of the normal pericardium: a novel delivery technique. *Catheter Cardiovasc Interv* 47: 109-111 (1999)
46. Landzberg BR, Frishman WH, Lerrick K: Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 361-398 (1997)
47. Lechleitner P, Genser N, Dienstl F: Preventive drug therapy following coronary bypass surgery or PTCA. *Wien Med Wochenschr* 15: 277-281 (1990)
48. von der Leyen, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ: Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci* 92: 1137-1141 (1995)
49. Lindner V, Fingerle J, Reidy MA: Mouse model of arterial injury. *Circ Res* 73: 792-796 (1993)
50. Macris MP, Igo SR: Minimally invasive access of the normal pericardium: initial clinical experience with a novel device. *Clin Cardiol* 22: 36-39 (1999)
51. Meier B: Prevention of restenosis after coronary angioplasty: a pharmacological approach. *Eur Heart J* 10: 64-68 (1989)
52. Morishidge K, Shimokawa H, Yamawaki T, Miyata K, Eto Y, Kandabashi T, Yogo K, Higo T, Egashira K, Ueno H, Takeshita A: Local adenovirus-mediated transfer of C-type natriuretic peptide suppresses vascular remodelling in porcine coronary arteries in vivo. *J Am Coll Cardiol* 15: 1040-1047 (2000)
53. Muller DW, Golomb G, Gordon D, Levy RJ: Site-specific dexamethasone delivery for the prevention of neointimal thickening after vascular stent implantation. *Coron Artery Dis* 5: 435-442 (1994)

54. Munro E, Patel M, Chan P, Betteridge L, Gallagher K, Schachter M, Wolfe J, Sever P: Effect of calcium channel blockers on the growth of human vascular smooth muscle cells derived from saphenous vein and vascular graft stenosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 23: 779-784 (1994)
55. Nikol S, Hofling B: Regulation of smooth muscle cell proliferation and its possible role in preventing restenosis postangioplasty. *Wien Klin Wochenschr* 107: 379-389 (1995)
56. O'Keefe JH, Giorgi LV, Hartzler GO, Good TH, Ligon RW, Webb DL: Effects of diltiazem on complications and restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 67: 373-376 (1991)
57. Pederson DC, Bowyer DE: Endothelial injury and healing in vitro: Studies using an organ culture system. *Am J Pathol* 119: 264-272 (1985)
58. Roessner A, Schmitz G, Sorg C: What's new in the pathology of atherosclerosis? *Pathol Res Pract* 182: 694-698 (1987)
59. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-808 (1993)
60. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126 (1999)
61. Sachs L: *Angewandte Statistik*, 6. Aufl, Springer, Berlin: S. 230-235 (1984)
62. Schlant RC, King SB: Usefulness of calcium entry blockers during and after percutaneous transluminal coronary artery angioplasty. *Circulation* 80: 88-92 (1989)
63. Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ: The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 20: 1284-1293 (1992)
64. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR: Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 82: 2190-2200 (1990)
65. Schwartz SM, Haudenschild CC, Eddy EM: Endothelial regeneration in rat aortic intima. *Lab Invest* 38: 568-580 (1978)
66. Schwartz SM, Stemerman MB, Benditt EP: The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation. *Am J Pathol* 81: 15-42 (1975)
67. Scott RF, Reidy MA, Kim DN, Schmee J, Thomas WA: Intimal cell mass-derived atherosclerotic lesions in the abdominal aorta of hyperlipidemic swine Part 2. Investigation of endothelial cell changes and leukocyte adherence associated with early smooth muscle cell proliferative activity. *Atherosclerosis* 62: 27-38 (1986)

68. Serruys PW, Macaya C, de Jaegere P, Kiemenji F, Putsch W, Hendrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belarde J, Buller N, Colombo A, Goy JJ, Delcan J, Morel M: Interim analysis of the Benestent trial. *Circulation* 88: (abstract) 3195 (1993)
69. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemenji F, Macaya C, Putsch W, Hendrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P: A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 331: 489-495 (1994)
70. Sigwart U, Puel J, Mirkowitch V, Joffre F, Kappenberger L: Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 316: 701-706 (1987)
71. Simon AD, Giedd KN, Schwartz A, Wang A, Sun J, Chen HJ, Marboe C, Stein CA, Rabbiani LE: Porous balloon delivery of S-dC28 does not prevent restenosis in the porcine coronary artery model of balloon injury. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 549-553 (1999)
72. Simons M, Leclerc G, Safian RD, Isner JM, Weir L, Baim DS: Relation between activated smooth muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after arterectomy. *N Engl J Med* 328: 608-613 (1993)
73. Sjölund M, Hedin U, Sejersen T, Heldin CH, Thyberg J: Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) a chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and exogenous PDGF in a phenotype- and growth state dependent manner. *J Cell Biol* 106: 403-413 (1988)
74. Spaet TH, Stemerman MB, Veith FJ, Lejnieks I: Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta: Medial smooth muscle cells as a source of neointima. *Circ Res* 36: 58-70 (1975)
75. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster W: Balloon Angioplasty: Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 57: 105-112 (1985)
76. Stoll HP, Hutchins GD, Winkle WL, Nguyen AT, Appledorn CR, Janzen I, Seifert H, Rube C, Schieffer H, March KL: Advantages of short-lived positron-emitting radioisotopes for intracoronary radiation therapy with liquid-filled balloons to prevent restenosis. *J Nucl Med* 42: 1375-1383 (2001)
77. Tanajura LF, Sousa AG, Feres F, Atallah T, Pinto IM, Centemero MP, Chaves AJ, Mattos LA, Martins HC, Abud RL, et al.: Inefficacy of diltiazem in restenosis prevention after coronary angioplasty. *Arq Bras Cardiol* 62: 99-102 (1994)
78. Thomas WA, Reiner JM, Florentin RA, Scott RF : Population dynamics of arterial cell during atherogenesis VIII. Separation of the roles of injury and growth stimulation in early aortic atherogenesis in swine originating in preexisting smooth muscle cell masses. *Exp Molec Path* 31: 124-144 (1979)

79. Unverdorben M, Kunkel B, Leucht M, Bachmann K: Reduction of restenosis after PTCA by diltiazem? *Circulation* 86: (abstract) 53 (1992)
80. Van Belle E, Maillard L, Tio FO, Isner JM: Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 311-316 (1997)
81. Verrier RL, Waxman S, Lovett EG, Moreno R: Transatrial access to the normal pericardial space: a novel approach diagnostic sampling, pericardiocentesis, and therapeutic interventions. *Circulation* 98: 2331-2333 (1998)
82. Voisard R, Axel D, Roth D, Seitzer U, Kochs M, Betz E, Hombach V: Wachstumsverhalten von kultivierten Endothelzellen des Menschen nach Druckbelastung mit 3 bar in vitro. In: Heinle H, Schulte H, Schäfer HE (Hrsg): *Diätetik und Arteriosklerose*. Vieweg, Braunschweig, S. 440-444 (1993)
83. Voisard R, von Eicken J, Baur R, Gschwend JE, Wenderoth U, Kleinschmidt K, Hombach V, Höher M: A human arterial organ culture model of postangioplasty restenosis: results up to 56 days after ballooning. *Artherosclerosis* 144: 123-134 (1999)
84. Voisard R, Jensch V, Baur R, Höher M, Hombach V: A coronary porcine organ culture system for studies of postangioplasty cell proliferation. *Coron Artery Dis* 6: 657-665 (1995)
85. Voisard R, Koschnick S, Baur R, Vogel U, Mattfeldt T, Hemmer W, Hannekum A, Höher M, Hombach V: High dose diltiazem prevents migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in various in vitro models of human coronary restenosis. *Coron Artery Dis* 8: 189-201 (1997)
86. Voisard R, Kucharczyk E, Deininger U, Baur R, Hombach V: Lokale Hochdosistherapie mit Diltiazem hemmt die Restenoseentwicklung 28 Tage nach Angioplastie in einem koronaren Organkultur-Modell. *Perfusion* 2: (abstract) 113 (2000a)
87. Voisard R, Kucharczyk E, Deininger U, Baur R, Hombach V: Simultaneous intra/extraluminal drug administration as new approach for the treatment of reactive smooth muscle cell proliferation after vascular injury: Use of the pericardium as additional drug depot? *Eur Heart J* 21: (abstract) 1550 (2000b)
88. Voisard R, Kucharczyk E, Deininger U, Baur R, Hombach V: Lokale Hochdosistherapie mit Diltiazem hemmt die Restenoseentwicklung 28 Tage nach Angioplastie in einem koronaren Organkultur-Modell. In: Heinle H, Schulte H, Hanefeld M (Hrsg): *Atherogenese und Metabolisches Syndrom*. Köhler, Tübingen, S. 203-206 (2001)
89. Voisard R, Kucharczyk E, Deininger U, Baur R, Hombach V: Simultaneous intra/extravascular administration of antiproliferative agents as a new strategy to inhibit restenosis: The peak of reactive cell proliferation as a hallmark for the duration of the treatment. *BMC Cardiovascular Disorders* 2:2 (2002)

90. Voisard R, Mattfeldt T, Baur R, Kochs M, Hombach V: High pressure ballooning causes less cellular response: Results of a coronary porcine organ culture system. *Eur Heart J* 14: (abstract) 1166 (1993)
91. Voisard R, Seitzer U., Baur R, Dartsch PC, Osterhues HH, Höher M, Hombach V: Corticosteroid agents inhibit proliferation of smooth muscle cells from human atherosclerotic arteries in vitro. *Internat J Cardiol* 43: 257-267 (1994)
92. Voisard R, Seitzer U, Baur R, Dartsch PC, Osterhues HH, Höher M, Hombach V: A prescreening system for potential antiproliferative agents: implications for local treatment strategies of postangioplasty restenosis. *Internat J Cardiol* 51: 15-28 (1995)
93. Waltenberger J: Modulation of growth factor action: implication for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 96: 4083-4094 (1997)
94. Waxman S, Moreno R, Rowe KA, Verrier RL: Persistent primary coronary dilation induced by transatrial delivery of nitroglycerin into the pericardial space: a novel approach for local cardiac drug delivery. *J Am Coll Cardiol* 33: 2073-2077 (1999)
95. Waxman S, Pulerwitz TC, Rowe KA, Quist WC, Verrier RL: Preclinical safety testing of percutaneous transatrial access to the normal pericardial space for local cardiac drug delivery and diagnostic sampling. *Catheter Cardiovasc Interv* 49: 472-477 (2000)
96. Webster MWI, Chesebro JH, Grill DE, Badimon JJ, Badimon L: Influence of deep and mild arterial injury on smooth muscle cell proliferation after angioplasty. *Circulation* 84: (abstract) 1178 (1991)
97. Whitworth HB, Roubin GS, Hollman J, et al.: Effect of nifedipine on recurrent stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 8: 2171-1276 (1986)
98. Wilcox JN: Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention. *Am J Cardiol* 72: 88-95 (1993)
99. Wilensky RL, March KL, Hathaway DR: Direct intraarterial wall injection of microparticles via a catheter: a potential drug delivery strategy following angioplasty. *Am Heart J* 122: 1136-1140 (1991)
100. Wilson DP, Saward L, Zahradka P, Cheung PK: Angiotensin II receptor antagonists prevent neointimal proliferation in a porcine coronary artery organ culture model. *Cardiovasc Res* 42: 761-772 (1999)
101. Wolinsky H, Lin CS: Use of the perforated balloon catheter to infuse marker substances into diseased coronary artery walls after experimental postmortem angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 17: 174-178 (1991)

H. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Rainer Voisard für die freundliche Überlassung des Themas und die immer rasche Unterstützung, wenn Schwierigkeiten auftraten. Ich danke auch der Abteilung Innere II unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Vinzenz Hombach für die Möglichkeit, sämtliche Räumlichkeiten und Apparatschaften jederzeit zu nutzen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau R. Baur und Frau U. Deininger für die freundliche und geduldige Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken, für die tatkräftige Unterstützung bei Problemen aller Art und das sehr freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima.

Dank auch an alle Kollegen und Freunde, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie an alle Doktoranden des Labors für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke vor allem auch meinen Eltern und meiner Schwester für ihre tatkräftige ideelle und materielle Unterstützung, die die ganze Zeit über ganz wesentlich zu meiner Motivation zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Ehemann Prof. Dr. Oliver Gruber für seine liebevolle Hilfe und seinen tatkräftigen Beistand in der Spätphase dieser Arbeit ganz herzlich bedanken.

I. LEBENSLAUF

Eva Gruber, geb. Kucharczyk

Geboren am 16. März 1975 in München

Familienstand: verheiratet mit Prof. Dr. Oliver Gruber, keine Kinder
Eltern: Dr. med. Max Kucharczyk, Internist und Kardiologe
 Dr. med. Dorle Kucharczyk, geborene Müller, Allgemeinärztin
Geschwister: Anja Kucharczyk, Ärztin

Ausbildung:

1981 bis 1984	Grundschule in München/Laim
1984 bis 1985	Grundschule in Weißenhorn
1985 bis 1994	Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium in Weißenhorn
1994	Allgemeine Hochschulreife
1994 bis 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
1996	Ärztliche Vorprüfung
1997	Erstes Staatsexamen
2000	Zweites Staatsexamen
09. November 2001	Drittes Staatsexamen und Erlaubnis für die Tätigkeit als Ärztin im Praktikum

Berufliche Erfahrung:

01.03. bis 15.06.2002	Ärztin im Praktikum an der Psychiatrischen Universitätsklinik Ulm
16.06.2001 bis 15.06.2003	Ärztin im Praktikum im Austauschjahr an der Neurologischen Universitätsklinik
01.07.2003 bis 15.09.2003	Ärztin im Praktikum an der Psychiatrischen Universitätsklinik Homburg/Saar
seit 16.09.2003	Assistenzärztin an der Psychiatrischen Universitätsklinik Homburg/Saar