

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

**Eingereicht über die Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
(Innere Medizin und Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität  
Gießen**

**Lokale Applikation von Paclitaxel mit dem  
Schneider-Doppelballon  
nach experimenteller Stentimplantation  
an den Koronararterien des Schweines**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
ABDUL RASOOL AL-GHOBAINY

Gießen 2001

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. med. Karsch

**Eingereicht über die Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
(Innere Medizin und Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität  
Gießen**

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. med. vet. M. Wendt

**Lokale Applikation von Paclitaxel mit dem  
Schneider-Doppelballon  
nach experimenteller Stentimplantation  
an den Koronararterien des Schweines**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**ABDUL RASOOL AL-GHOAINY**  
Tierarzt aus Bagdad (Irak)  
Gießen 2001

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan: Herr Prof. Dr. M. Reinacher**

**1. Berichterstatter: Professor Dr. med. K. R. Karsch**

**2. Berichterstatter: Professor Dr. med. vet. M. Wendt**

**Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.01**

**Widmung: Meiner Großmutter, Frau Fahime Al-Ghobainy,  
meinem Bruder Salam Al-Ghobainy  
in Dankbarkeit gewidmet.**

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung .....	9
2.	Literaturübersicht .....	15
2.1.	Paclitaxel.....	15
2.1.1.	Einführung.....	15
2.1.2.	Pharmakologie .....	17
2.1.3.	Wirkungsmechanismus .....	19
2.1.3.1.	Physiologische Grundlagen .....	19
2.1.3.2.	Wirkungsmechanismus von Paclitaxel.....	22
2.1.4.	Pharmakokinetik.....	25
2.1.5.	Toxikologie .....	25
2.2.	Das Problem der Restenose nach Koronarangioplastie.....	26
2.3.	Anwendung von Paclitaxel zur Prophylaxe / Therapie der Restenose ...	32
3.	Material und Methodik.....	34
3.1.	Versuchstiere und Gruppeneinteilung .....	34
3.2.	Doppelballon-Katheter .....	36
3.2.1.	Beschreibung .....	36
3.2.2.	Daten .....	36
3.2.3.	Mechanismus.....	37
3.2.4.	Vorteile .....	37
3.2.5.	Einschränkungen .....	38
3.3.	Operatives Vorgehen .....	39
3.3.1.	Vorbehandlung der Tiere .....	39
3.3.2.	Narkose.....	39
3.3.2.1.	Prämedikation .....	39
3.3.2.2.	Inhalationsnarkose.....	40
3.3.3.	Darstellung der Arteria carotis communis .....	40
3.3.4.	Operativer Eingriff .....	41
3.3.5.	Doppelballon-Katheter .....	41
3.3.6.	Stentimplantation .....	42

3.3.7.	Verschuß der Operationsstelle.....	43
3.4.	Entnahme der Herzen.....	43
3.5.	Histologische Aufarbeitung der Gefäße.....	44
3.5.1.	Fixierung.....	44
3.5.2.	Einbetten in Paraffin.....	45
3.5.3.	Anfertigung von Semidünnschnitten.....	45
3.6.	Standardfärbungen.....	46
3.6.1.	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	46
3.6.2.	Elastica-Van-Gieson-Färbung.....	46
3.7.	Immunhistochemische Färbungen.....	46
3.7.1.	Grundlage der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.....	46
3.7.2.	$\alpha$ -Aktin-Biotin-Avidin-Methode am Paraffinschnitt.....	47
3.8.	Auswertung der Präparate.....	47
3.8.1.	Histologisch-morphologische Auswertung.....	47
3.8.2.	Morphometrische Daten.....	48
3.9.	Statistik.....	53
4.	Ergebnisse.....	54
4.1.	Technische Ergebnisse.....	54
4.2.	Ergebnisse der histologisch-morphometrischen Auswertung.....	55
4.2.1.	Histologische Ergebnisse.....	55
4.2.1.1.	Stententfaltung.....	55
4.2.1.2.	Artefaktbildung.....	56
4.2.1.3.	Intima.....	57
4.2.1.4.	Lamina elastica interna.....	57
4.2.1.5.	Media.....	58
4.2.1.6.	Lamina elastica externa.....	59
4.2.1.7.	Ergebnisse des immun-histochemischen Alpha-Aktin-Nachweises.....	60
4.3.	Ergebnisse der Auswertung der morphometrischen Daten.....	61
4.3.1.	Lumenfläche.....	61
4.3.2.	Neointimadicke.....	62

4.3.3	Grad der Stenose.....	63
4.3.4	Neointima-Gesamtfläche .....	64
4.3.5.	Mediafläche.....	65
5.	Diskussion.....	66
5.1.	Methodik-Histologische Färbungen und Proliferationsnachweis .....	70
5.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	72
5.2.1.	Sicherheit des Kathetersystems und der lokalen Applikation von Paclitaxel.....	72
5.2.2.	Histologische Auswertung.....	72
5.3.	Schlußbetrachtung .....	75
6.	Zusammenfassung.....	77
	Summary.....	79
7.	Anhang.....	80
8.	Danksagung.....	87
9.	Literaturverzeichnis .....	88
	Abbildungsverzeichnis .....	105
	Tabellenverzeichnis.....	106

Tab. 1: Im Text verwendete Abkürzungen.

ABC	Komplex
AEC	3-Amino-9-Athycarbazol
$\alpha$ -SM-Aktin	Alpha-Smooth-Muscle-Aktin
Co.	Control
D	Draht des Stent
EEL	Vessel area
Fr.	French
GDP	Guanosin-5-Diphosphat
GTP	Guanosin-5-Triphosphat
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
ICR	Intercostalraum
In.	Inch
L	Lumen
M	Media
NA	Neointimal area
NI	Neointima
PAS	Percent area stenosis
PTCA	Perkutane transluminal Koronarangioplastie
PDGF-A	Platelet derived Growth Factor
$r^2$	Regressiongerade
RIVA	Ramus interventricularis anterior
SMC-Proliferation	Smooth Muscle cell-Proliferation
TIMI	Thrombolysis in Myocardial Infarction atrial (Einteilung für Koronarfluß-Verhältnisse)
TIMI 1	Gefäßverschluss
TIMI 2	Verzögerter Koronarfluß
TIMI 3	Normaler Koronarfluß

## 1. Einleitung

Im Jahre 1929 öffnete der damals 25 Jahre alte Chirurg FORSSMANN eine Vene seines linken Armes, führte einen Ureterkatheter ein und lief sodann mit dem Katheter im rechten Vorhof seines eigenen Herzens in die radiologische Abteilung der Klinik, um die Lage der Katheterspitze mit einer Röntgenaufnahme zu dokumentieren. Die erste „Herzkatheteruntersuchung“ am lebenden Menschen hatte stattgefunden, und FORSSMANN erhielt 1956 den Nobelpreis (FORSSMANN 1929).

Schon 1844 war die Katheterisierung eines Herzens zum ersten Mal gelungen, als BERNARD einen Katheter über die Vena jugularis und Arteria carotis in den rechten und linken Ventrikel eines Pferdes vorschob (COURNAND 1975). Erst im Jahre 1977 jedoch wurden aus den bisher nur zu diagnostischen Zwecken genutzten Herzkathetern therapeutische Instrumente, nachdem GRÜNTZIG die erste koronare Ballondilatation am Menschen durchgeführt hatte. Damit begann die Ära der nichtchirurgischen interventionellen Kardiologie (GRÜNTZIG 1978, 1979, BAIM 1992).

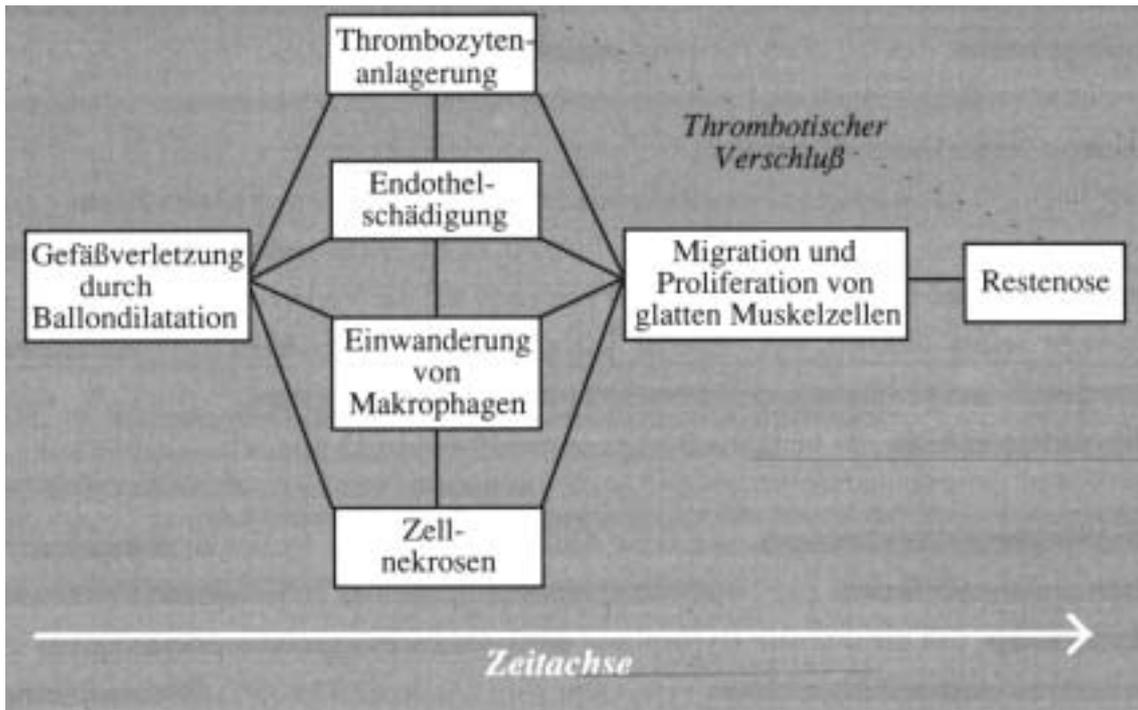
Vor dem Hintergrund, daß die koronare Herzerkrankung die häufigste zum Tode führende Erkrankung in der westlichen Welt ist, fand die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) eine rasche Verbreitung und ist heute zu einem Standardtherapieverfahren geworden. Über 600 000 Angioplastien zur koronaren Revaskularisation sind allein im Jahre 1993 weltweit durchgeführt worden (BAIM 1992).

Durch steigende Erfahrung und rasante Fortschritte in der Technologie verbesserten sich die Akutergebnisse der PTCA stetig, und so liegt die primäre Erfolgsrate heute bei weit über 90 %. Ein erhebliches Problem ist jedoch das Wiederauftreten der primär erfolgreich dilatierten Stenosen. Mit einer Rezidivquote von 20 - 50% stellt die sogenannte Restenose die Hauptlimitation

dieses Verfahrens dar und ist deshalb in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt (POPMA et al. 1991).

Für das Verständnis der Restenoseentstehung ist freilich die Kenntnis der Mechanismen, die zur Stenose geführt haben, unabdingbar. Trotz intensivster Forschung bleiben jedoch viele Fragen zur Entstehung und Progredienz der Arteriosklerose bis heute unbeantwortet (SCHWARTZ et al. 1992, SHAH u. AMIN 1992, WILENSKY et al. 1995).

Übereinstimmend wird heute eine initiale Endothelschädigung als Voraussetzung für die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen angesehen. Das Spektrum der Schädigungen reicht hierbei von Änderungen in der Permeabilität des Endothels bei abnormer Blutzusammensetzung bis zum kompletten Endothelverlust durch mechanische Einwirkung. Somit können die schädigenden Einflüsse metabolischer, toxischer, immunologischer und mechanischer Natur sein. Unabhängig von der Art der Schädigung aber reagiert das Endothel mit der Expression von Wachstumsfaktoren und interagiert dabei mit Thrombozyten, Monozyten und glatten Muskelzellen, die ihrerseits eine Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren abgeben. Dieses hochkomplexe Wechselspiel aus gegenseitiger Beeinflussung und Aktivierung resultiert schliesslich in einer gesteigerten Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen. Dies führt zu vermehrter Produktion von extrazellulärer Matrix, intimaler Hyperplasie und damit zur Stenose (ROSS u. GLOMSET 1976, ROSS 1986, KARSCH 1992, LIBBY et al. 1992, SHAH u. AMIN 1992, WILENSKY et al. 1995).



**Abb. 1:** Vereinfachte Übersicht über die „Reaktion auf Verletzung“ die letztendlich zur Restenose führt. Nach initialer Verletzung kommt es zu einem hochkomplexen Wechselspiel verschiedener Faktoren, welches dann nach gemeinsamer Endstrecke im Auftreten einer Restenose resultiert.

Beim restenotischen Prozess scheint die Reaktion des Gefäßes auf Verletzung relativ vergleichbar abzulaufen, unabhängig von der auslösenden Schädigung. Wegen des starken mechanischen Traumas durch die PTCA müssen jedoch bei der Entwicklung der Restenose auch Wundheilungsprozesse und adaptive Vorgänge wie die Schrumpfung des überdehnten Gefäßes berücksichtigt werden.

Restenoseentstehung nach Ballonangioplastie wurde lange Zeit ausschließlich auf eine vermehrte Neointimaentwicklung zurückgeführt. In humanen und tierexperimentellen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß das geometrische Remodeling ebenfalls einen wesentlichen Einfluß auf die Restenoseentstehung hat (DE SMET et al. 1998). Im Rahmen des geometrischen Remodeling spielt die Gefäßrückstellkraft (Elastic Recoil) eine entscheidende Rolle, sie ist definiert als der Unterschied zwischen

Gefäßdurchmesser bei inflatiertem Ballon und dem postinterventionellen Gefäßdurchmesser. Das Ausmaß des Elastic Recoil ist abhängig von den plastischen Eigenschaften der Plaque und der Gefäßwand. Der Großteil des Elastic Recoil tritt innerhalb von 30 Minuten nach der PTCA auf, kann mit einer bis zu 50% Lumenreduktion einhergehen und tritt häufiger nach einer PTCA von exzentrischen oder ostialen Stenosen auf (FISHMAN et al. 1994). Die andere wichtige Komponente des geometrischen Remodeling ist das positive bzw. negative Remodeling im Sinne einer Lumenerweiterung bzw. -verengung als Antwort des Gefäßes auf die Intervention.

In Europa und den USA werden zur Zeit bei ca. 60-70% der koronaren Interventionen Stents implantiert. Es konnte gezeigt werden, daß Stents in bestimmten Gefäßlokalisationen die Restenoserate senken konnten. In zwei Studien (RENSING et al. 1960, SERRUYS et al. 1994) wurde über eine angiographische Restenoserate von 20 und 30% berichtet. In diesen Studien wurden kurze, de-novo-Läsionen in nativen Koronararterien behandelt. Stents verhindern das negative Remodeling und heben weitgehend das Elastic recoil auf. Jedoch führt die Implantation eines Stents initial zu einer erheblichen Entzündungsreaktion. Anschließend kommt es zu einer ausgeprägten Proliferation glatter Muskelzellen und der Einwanderung in das Stentlumen. Bislang zeigten alle Stents ein solches Verhalten. Die Behandlung der In-stent-Restenose ist bislang ein ungeklärtes Problem.

Für eine Prophylaxe und mögliche Therapie der In-stent-Restenose gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Neue interventionelle Verfahren wie Laserangioplastie, Rotablation, Atherektomie und Stentimplantation sowie zahlreiche medikamentöse Massnahmen wurden in den letzten Jahren im klinischen Einsatz erprobt.

Obwohl im Tierversuch oft vielversprechend, erfüllten die bisher in klinischen Studien am Menschen systemisch eingesetzten Medikamente die Erwartungen nicht. Ein Hauptgrund hierfür ist sicherlich die im Vergleich zum Tierversuch 10-

70-fach niedrigere Dosis bei der humanen Anwendung. Mögliche schwere systemische Nebenwirkungen und eine lokal nicht ausreichende Wirkstoffmenge limitierten somit bisher die medikamentöse Therapie (POWELL et al. 1991, HANKE u. KARSCH 1992, WILENSKY et al. 1995).

In jüngster Zeit entwickelte sich wissenschaftlich das Interesse an einer lokalen Applikation möglicher Wirkstoffe direkt an den Ort der Intervention. Mit dem porösen Ballonkatheter steht seit kurzem für eine solche Therapie ein Instrument zur Verfügung, das die erforderlichen Eigenschaften aufweist. Unter Druck wird die Wirkstofflösung über die Applikationsöffnungen des Katheters direkt in die Gefäßwand injiziert mit dem Vorteil einer hohen Wirkstoffkonzentration vor Ort, minimierten systemischen Nebenwirkungen und möglicherweise einem verlängerten Verbleiben der Substanz an der gewünschten Stelle (WOLINSKY u. THUNG 1990, WILENSKY et al. 1991, GIMPLE et al. 1992, HONG et al. 1993, FRAM et al. 1994, LINCOFF et al. 1994).

Thema der vorliegenden Arbeit ist es, die lokale Medikamentenapplikation mittels eines Doppelballon-Katheters auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit hin zu untersuchen. Als Wirkstoff wurde das antimetabolisch wirksame Medikament Paclitaxel gewählt.

Das antimetabolisch wirksame Medikament Paclitaxel beeinflusst den Gleichgewichtszustand im Zytoskelett, in dem es die Bildung ungewöhnlich stabiler Mikrotubuli fördert und ihre Depolymerisation hemmt. Dadurch werden mehrere zelluläre Funktionen wie Proliferation, Migration und Signalübertragung beeinflusst. Selbst nach einmaliger Kurzzeitapplikation bewirkt Paclitaxel in der Zellkultur eine sehr wirksame und lang anhaltende Hemmung der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (AXEL et al. 1997).

Diese Eigenschaften machen Paclitaxel zu einem vielversprechenden Medikament in der Restenose-Therapie über lokaler Applikation. Man erreicht mit diesem Medikament eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration am Interventionsort. Zusätzlich hat Paclitaxel einen lang anhaltenden inhibitorischen Effekt auf die Muskelzell-Proliferation und Migration in der Media der Gefäßwand, hierbei bleiben die systemischen Nebenwirkungen recht gering.

Bei der Handhabung dieses Medikamentes gibt es aber auch einige bisher nicht befriedigend gelöste Probleme: Mit den bisher vorhandenen Applikationssystemen ist es recht schwierig, einen hohen Wirkstofftransfer in die Gefäßwand zu erreichen. Und je nach verwendetem System (z.B. poröser Ballonkatheter) kann es zu zusätzlicher Schädigung der Gefäßwand kommen. Unter diesen Umständen scheint es wichtig zu sein, eine derartige Kombination aus Medikament und Applikationssystem zu finden, die diese erwähnten Nachteile soweit wie möglich behebt.

Die lokale Medikamentenapplikation ist ein neues Therapieverfahren, und die experimentellen Erfahrungen mit Doppelballon-Katheter sind noch sehr gering. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Wirksamkeit der lokalen Applikation von Paclitaxel nach Stentimplantation bei Schweinen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Paclitaxel-Behandlung zu untersuchen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Paclitaxel**

#### **2.1.1. Einführung**

Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>, Bristol-Myers, Squibb, England) ist eine organische Verbindung und der erste Wirkstoff aus der Klasse der Taxane, der sich als antineoplastisch erwiesen hat (DOUROS u. SUFFNESS 1978, 1981, NATIONAL CANCER INSTITUTE 1990, CHABNER 1991). Der Wirkstoff von Paclitaxel wurde im Jahre 1967 aus der Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*, isoliert. 1971 gelang es WANI et al., die Strukturformel von Paclitaxel zu identifizieren und die zytotoxische Wirkung gegen verschiedene murine Tumoren nachzuweisen.

Die weitere Erforschung dieser Substanz erfolgte aus zwei Gründen sehr langsam: Zum einen war es zunächst nicht möglich, den Wirkstoff Paclitaxel in größeren Mengen zu isolieren, zum anderen war, aufgrund der sehr geringen Wasserlöslichkeit von Paclitaxel, die Entwicklung einer klinisch anwendbaren galenischen Formulierung schwierig (DENIS u. GREENE 1988, DEUTSCH et al. 1989, ROWINSKY et al. 1990, BORMANN 1991). Die jetzigen Forschungsarbeiten konzentrieren sich vor allem auf neue Verfahren zur Gewinnung von Paclitaxel auf synthetischem Wege. So wird Paclitaxel heute schon aus einer Vorstufe, die aus nachwachsenden Pflanzenteilen (Nadeln und Ästen) anderer Eibenarten (z. B. *Taxus baccata*) isoliert wird, synthetisch hergestellt (APPENDINO et al. 1993).

Erst 1979 wurde der eigentliche Wirkungsmechanismus von Paclitaxel aufgeklärt. Im Vergleich zu bisher bekannten antineoplastisch wirksamen Substanzen verfügt Paclitaxel über einen völlig neuartigen Wirkungsmechanismus (SCHIFF u. HORWITZ 1981, HORWITZ et al. 1982). Paclitaxel fördert Aggregation von Mikrotubuli aus Tubulindimeren und

stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation. Außerdem induziert Paclitaxel eine abnorme Anordnung und Bündelung von Mikrotubuli während des gesamten Zellzyklus und führt zur Bildung multipler mikrotubulärer Teilungssterne während der Mitose. Dies führt zur Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes, das für vitale Zellfunktionen in der Interphase und während der Mitose von entscheidender Bedeutung ist (WANI et al. 1971).

Im Jahre 1983 wurden Phase-I-Studien über die intravenöse Anwendung von Paclitaxel bei Patienten begonnen, wobei verschiedene Behandlungsschemata eingesetzt wurden. In diesen Studien erwies sich eine medikamentöse antiallergische Prophylaxe bei Anwendung von Paclitaxel als erforderlich. Eine dosislimitierende Nebenwirkung ist die Myelosuppression, in erster Linie die Neutropenie (DONEHOWER et al. 1987, KRIS et al. 1986, LEGHA et al. 1986, BROWN et al. 1991).

Bereits in den Phase-I-Studien zeigte sich die Wirksamkeit von Paclitaxel bei verschiedenen Karzinomen, insbesondere beim Ovarialkarzinom, beim Mammakarzinom und bei den Bronchialkarzinomen. Daraufhin wurden Phase-II-Studien mit Paclitaxel bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom durchgeführt, das sich gegenüber einer First-line-Therapie mit Platin initial als refraktär erwiesen hatte oder trotz einer Remission rezidierte. Bei diesen Studien betragen die Remissionsraten nach Paclitaxel-Therapie zwischen 23% und 48% (EINZIG et al. 1990, ARBUCK et al. 1993, CALDAS u. MCGUIRE 1993).

Inzwischen wurde Paclitaxel in zahlreichen klinischen Studien weiter geprüft. In den USA ist die Kombination von Paclitaxel und Platinderivaten bereits Standard-Therapie für die Behandlung von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach vorausgegangener Operation.

Paclitaxel erhielt, nach der Zulassung für das platinrefraktäre Ovarialkarzinom, jetzt auch die Zulassung zur Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms in Deutschland. Paclitaxel wurde in unterschiedlichen Studien als Monotherapie oder Bestandteil einer Kombinationstherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Als Monosubstanz erreichte es, abhängig von der Vorbehandlung und Dosierung, Remissionsraten von 20-62% bei Remissionsdauern von 3-9 Monaten. Zur Zeit werden Kombinationen mit Doxorubicin und Epirubicin sowie 5-Fluorouracil, Cyclophosphamid oder auch Cisplatin untersucht. Besonders interessant erscheint hier die Kombination mit Doxorubicin, bei der eine komplette Remission bei 28% der Patientinnen sowie eine partielle Remission bei 56% beobachtet wurde (GIANNI et al. 1994).

Darüber hinaus wird Paclitaxel in einer Vielzahl klinischer Studien beim kleinzelligen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, beim Melanom, bei Kopf/Hals-Tumoren und weiteren Indikationen, z.B. beim Non-Hodgkin-Lymphom, akuter Leukämie, Harnblasen-Karzinom und Ösophagus-Karzinom untersucht.

### **2.1.2. Pharmakologie**

INN: Paclitaxel

Summenformel:  $C_{47}H_{52}NO_{14}$

Molekulargewicht: 853,9

Struktur: Paclitaxel ist ein Pflanzeninhaltsstoff. Paclitaxel ist der erste Vertreter einer Substanzklasse, der Taxane, und hat keine strukturelle Ähnlichkeit mit anderen verfügbaren antineoplastischen Medikamenten (KINGSTON et al. 1990).

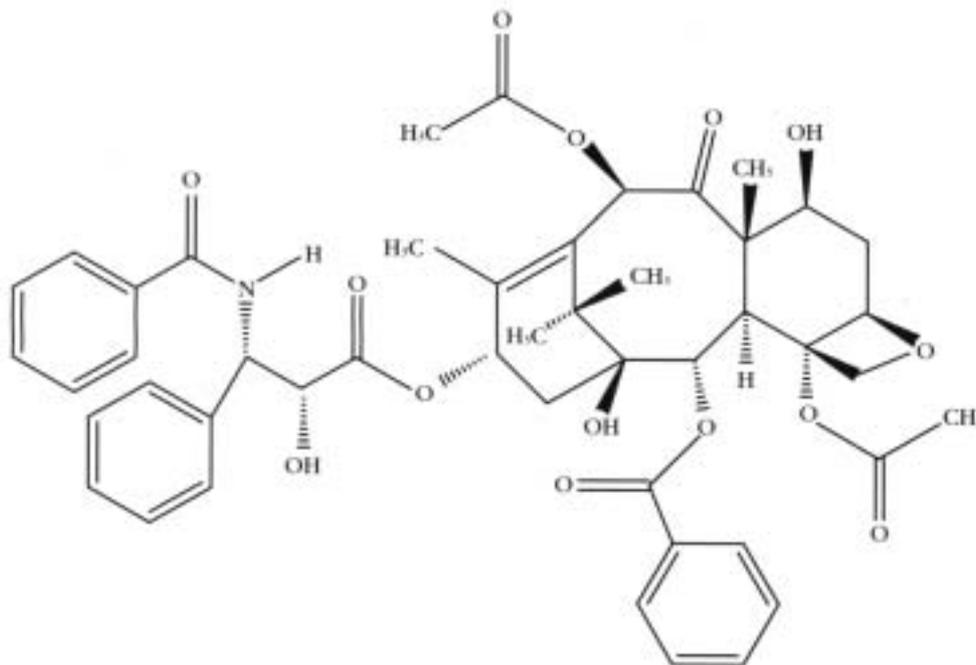
### Makroskopisches

**Aussehen:** Paclitaxel ist ein weißes bis gebrochen weißes kristallines Pulver.

**Löslichkeit:** Paclitaxel ist löslich in Methanol, Ethanol, Benzol, Chloroform, Methylchlorid, Tetrahydrofuran, Poly (oxyethylen)-35- Rizinusöl. Schwer löslich in Butanol, Octanol, Propylenglycol. Sehr schwer löslich in Hexan. Unlöslich in Wasser.

**Schmelzpunkt:** 213-217 °C

**Relative Dichte:** Die relative Dichte von Paclitaxel (Infusionslösungskonzentrat) ist 0,931 bei 20 °C.



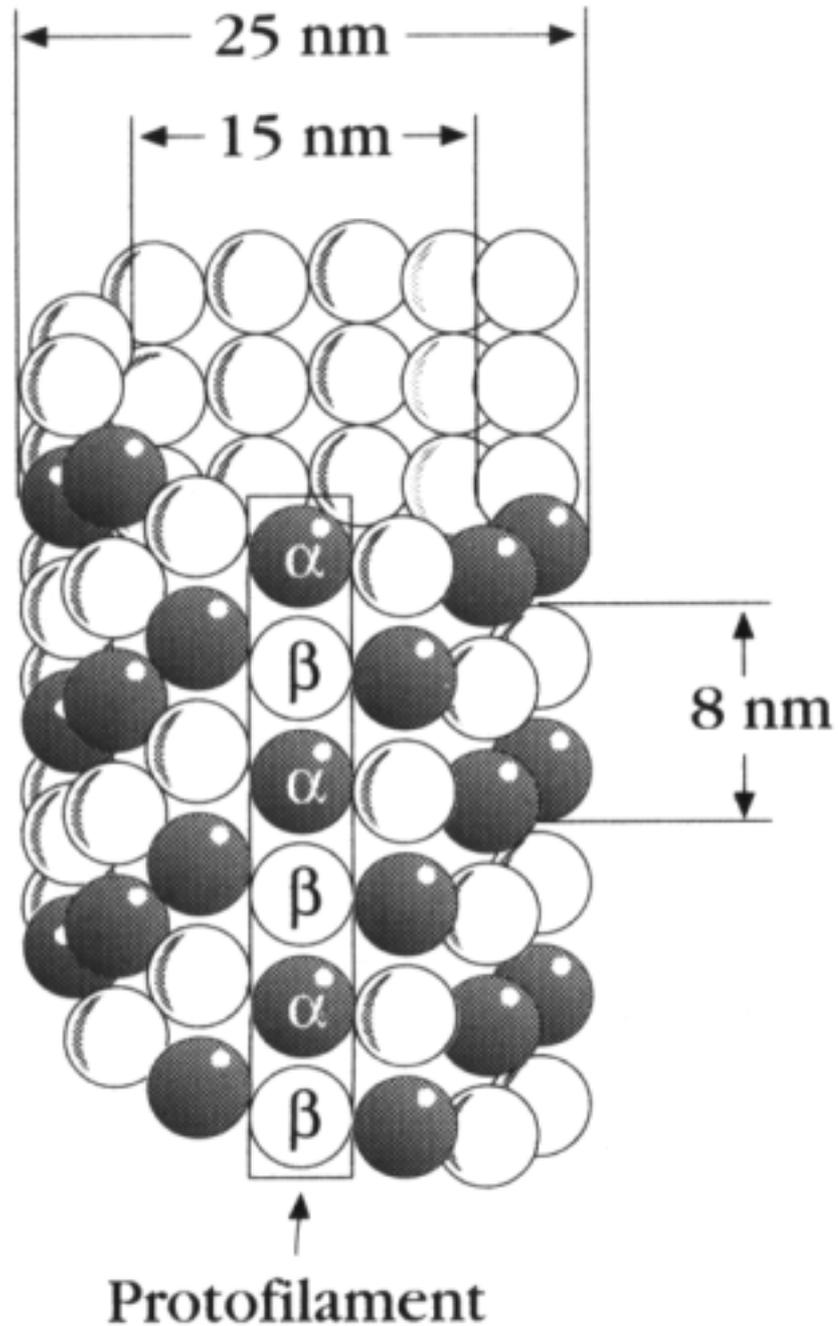
**Abb. 2:** Strukturformel des Paclitaxel

## **2.1.3. Wirkungsmechanismus**

### **2.1.3.1. Physiologische Grundlagen**

Mikrotubuli sind essentielle Strukturelemente in allen eukaryonten Zellen und befinden sich als Komponenten des Zytoskeletts im Zytoplasma. Während der Interphase sind sie von entscheidender Bedeutung für viele Zellfunktionen, einschließlich der Aufrechterhaltung der Zellform, der zellulären Beweglichkeit und des intrazellulären Transports (DUSTIN 1980, ROWINSKY et al. 1990). Zytoplasmatische Mikrotubuli können auch Interaktionen zwischen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren auf der Zelloberfläche modulieren und dadurch proliferative Transmembransignale beeinflussen, die durch diese Interaktionen erzeugt werden. Mikrotubuli sind darüber hinaus die Hauptkomponenten der mitotischen Zellspindel, die sich während der Mitose bildet.

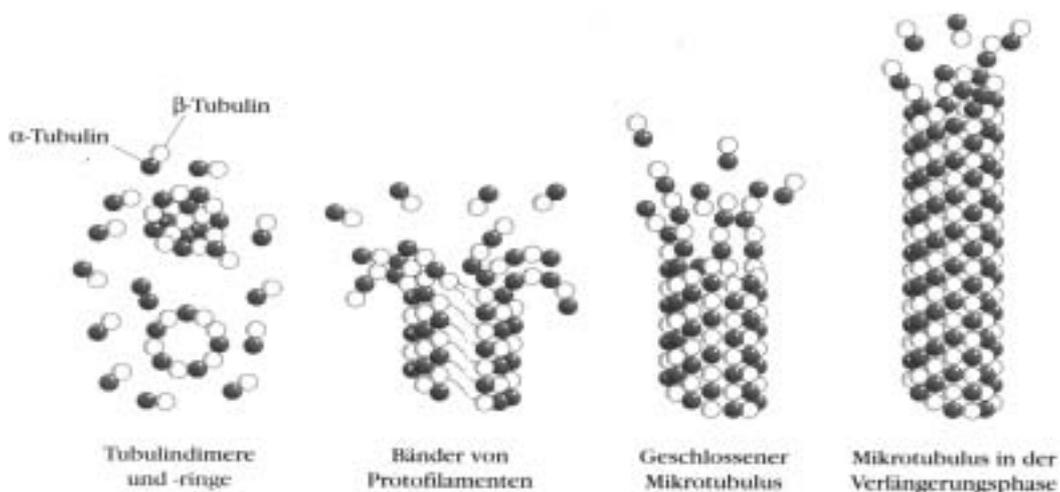
Strukturell sind die Mikrotubuli längliche, zylinderförmige Röhren mit einem Außendurchmesser von ca. 25 nm und einem Innendurchmesser von ca. 15 nm (SCHIFF et al. 1979, SCHIFF u. HORWITZ 1980). Die Länge der Mikrotubuli variiert zwischen einem bis zu mehreren Mikrometern (Abb.3). Mikrotubuli sind Tubulinpolymere, die in einem dynamischen Gleichgewicht mit Tubulinheterodimeren stehen. Jedes Dimer besteht aus zwei Proteinuntereinheiten, dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, die beide ein Molekulargewicht von ungefähr 55.000 Dalton haben.



**Abb. 3: Schematisches Diagramm eines Mikrotubulus**

Jedes Tubulindimer verfügt über zwei Nukleotid-Bindungsstellen. An der einen Bindungsstelle kommt es zu einem raschen Austausch mit freiem Guanosin-5'-Triphosphat (GTP), während an der anderen Bindungsstelle ein solcher Austausch nur sehr langsam oder überhaupt nicht stattfindet. GTP, erforderlich

für die Bildung der Mikrotubuli und deren Wachstum, wird während der Polymerisation zu Guanosin-5'-Diphosphat (GDP) hydrolysiert. Assoziiert mit den Mikrotubuli sind eine Reihe weiterer Proteine, die als Mikrotubuli-assoziierte Proteine bezeichnet werden. Diese Proteine sind für die Polymerisation des Tubulins erforderlich und binden sich über ihre gesamte Länge an die Mikrotubuli. Mikrotubuli-organisierende Zentren, zu denen auch die Zentriolen gehören, sind in lebenden Zellen an der Teilungskontrolle der Mikrotubuli beteiligt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Polymerisation eines Mikrotubulus *in vitro*.

Die Bildung und der Abbau von Mikrotubuli erfolgt in Abhängigkeit von den Bedürfnissen der Zelle. Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Tubulindimeren und Mikrotubuli wird durch Signale bestimmt, die während spezifischer Zellzyklusphasen durch GTP, Kalzium und andere intrazelluläre chemische Mediatoren erzeugt werden. *In vitro* ist vor dem Beginn der Polymerisation Tubulin in Form von freien Dimeren und Oligomeren vorhanden. Die Polymerisation beginnt mit dem Öffnen der Ringe, so daß sich kurze Protofilamente bilden können. Diese wiederum lagern sich entweder Seit-zu-Seit oder End-zu-End aneinander an (Abb.4). Gleichzeitig lagern sich zusätzliche Dimere an die Protofilamente und deren Aggregate an. Wenn 13 Protofilamente vorhanden sind, faltet sich dieses Band von Protofilamenten zu der zylindrischen Mikrotubulusstruktur. An beiden Enden dieses Mikrotubulus

lagern sich weitere Dimere an, wobei die dadurch erreichte Verlängerung des Mikrotubulus an einem Ende besonders rasch verläuft. Unter Gleichgewichtsbedingungen findet an beiden Enden des Mikrotubulus eine ständige Polymerisations- und Depolymerisationsreaktion statt.

### **2.1.3.2. Wirkungsmechanismus von Paclitaxel**

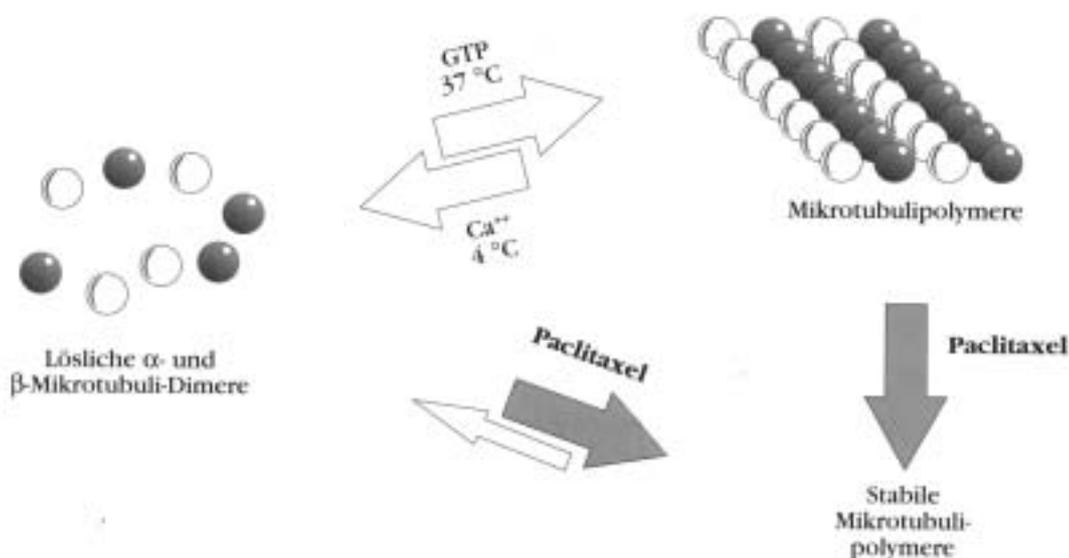
Bereits vor der genauen Erforschung des Wirkungsmechanismus von Paclitaxel waren mehrere Substanzen bekannt, deren Zytotoxizität auf Wirkungen an den Mikrotubuli beruht, insbesondere auf einer Wirkung als Mitoseinhibitoren. Dazu gehört unter anderem Colchicin, das zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli führt. Auch von den Vincaalkaloiden Vinblastin und Vincristin ist bekannt, daß ihre Wirkung auf der Hemmung der Polymerisation von Mikrotubuli beruht. Dadurch kommen die Mitose und andere Zellfunktionen zum Erliegen. Paclitaxel hat eine andere Bindungsstelle an den Mikrotubuli als Colchicin oder die Vincaalkaloide. Es bindet spezifisch und reversibel an die Mikrotubuli und weniger an die Tubulindimere. Vorzugsweise bindet Paclitaxel kovalent an die  $\alpha$ -Untereinheiten des Tubulins. Paclitaxel ist die erste bekannte zytotoxische Substanz, die die Bildung von anormalen Mikrotubuli fördert und zu einer Stabilisierung der gebildeten Mikrotubuli führt.

Der einzigartige Wirkungsmechanismus von Paclitaxel (Abb.5) wurde zuerst von HORWITZ et al. im Jahre 1979 beschrieben.

Bei Untersuchungen mit gereinigten Tubulinen konnten folgende Hauptwirkungen von Paclitaxel nachgewiesen werden:

1. Verstärkte Bildung von Mikrotubuli in vitro.
2. Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Tubulindimeren und -polymeren zugunsten der Polymere, Verminderung der erforderlichen kritischen Tubulinkonzentrationen für die Mikrotubulusbildung.

3. Durch Verstärkung der Polymerisationsreaktionen und Stabilisierung der gebildeten Mikrotubuli unter Gleichgewichtsbedingungen fördert Paclitaxel die zusätzliche Bildung von Mikrotubuli, einerseits durch Verlängerung bereits existierender Mikrotubuli und andererseits durch die Neubildung von Mikrotubuli. Während für die normale Mikrotubulusbildung die Anwesenheit von GTP und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen erforderlich ist, fördert Paclitaxel die Zusammenlagerung von Tubulindimeren auch bei Fehlen dieser Faktoren (POWELL et al. 1991).



**Abb. 5: Wirkungsmechanismus von Paclitaxel**

Klinisch relevante Konzentrationen von Paclitaxel (0,1-10 mol/l) lösen bei den zellulären Mikrotubuli zwei unterschiedliche Wirkungen aus. Zum einen bilden mit Paclitaxel behandelte Zellen im Übermaß eine sternförmige Strahlung von unorganisierten Mikrotubuli, die sich während des gesamten Zellzyklus in parallelen Bündeln anordnen. Diese parallelen Bündel sind funktionsunfähig und auch nicht in der Lage, sich wieder aufzulösen. Daher kann sich keine normale Mitosespindel bilden mit entsprechenden negativen Folgen für die Teilungsphase. Zum anderen induziert Paclitaxel die Bildung von zahlreichen anormalen sternförmigen Konfigurationen während der Mitose. Normalerweise wandern die Mikrotubuli-organisierenden Zentren mit ihren Zentriolen während

der Mitose (ROBERTS et al. 1989) zu entgegengesetzten Polen der Zelle, wobei jedes Mikrotubuli-organisierende Zentrum eine mitotische Spindel bildet, die aus Mikrotubuli besteht. Mit Paclitaxel behandelte Zellen bilden hingegen in exzessiver Zahl anomale Sterne, für deren Entstehung die Mikrotubuli-organisierenden Zentren nicht erforderlich sind. Diese Sterne, bis zu 20 in vielen Zellen, interagieren offensichtlich nicht mit den Chromosomen, die sich wiederum auch nicht in der für die Mitose typischen Art und Weise anordnen. Auch diese Paclitaxel-Wirkung führt zu einer Beeinträchtigung der Zellteilung (DE BRABANDER et al. 1982).

Obwohl diese morphologischen Veränderungen darauf hinweisen, daß Paclitaxel entscheidende Funktionen der Mikrotubuli beeinträchtigt, sowohl während der Mitose als auch während der Interphase, ist der genaue Mechanismus, der zum Zelltod führt, unklar. Die Wirkungen von Paclitaxel während der Interphase können zumindest teilweise durch dessen Einfluß auf das Zellskelett, durch die Hemmung der dynamischen Anpassung an Zellfunktionen und durch die Schädigung des Tubulins der Zellmembran erklärt werden. Zahlreiche vitale Zellfunktionen können durch Paclitaxel gestört werden, z.B. die Beweglichkeit, der intrazelluläre Transport und die Übertragung von proliferativen Transmembransignalen. In Walker-256-Sarkomzellen hemmt Paclitaxel die Beweglichkeit der Zellen und Veränderungen der Zellform. Diese Veränderungen können mit dem invasiven und metastatischen Potential dieser Tumorzellen in Zusammenhang stehen. Paclitaxel ist ein potenter Hemmer der Replikation von menschlichen HeLa-Zellen und murinen Fibroblasten (SCHIFF u. HORWITZ 1980, ROWINSKY et al. 1990). Diese Hemmung erfolgt bei Paclitaxel-Konzentrationen, die nur zu einer minimalen Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese führen. Mit Paclitaxel behandelte HeLa-Zellen akkumulieren in der G2- und M-Phase des Zellzyklus. Alle Paclitaxel-Effekte beruhen somit offensichtlich auf einer Störung der Mikrotubulusfunktion (ROWINSKY et al. 1990). Es liegen weiterhin Berichte vor, daß Paclitaxel Makrophagen für die Produktion des Tumornekrosefaktors und von Interleukin-1 triggert. Diese Wirkungen von Paclitaxel könnten zu der

zytostatischen Wirkung dieser Substanz beitragen (BOGDEN et al. 1987, CHABNER 1991).

#### **2.1.4. Pharmakokinetik**

Vor Beginn der klinischen Prüfung wurden mehrere analytische Assays für Paclitaxel entwickelt. Diese erwiesen sich jedoch für größere klinische Untersuchungen als nicht praktikabel, weil es sich um wenig zuverlässige und wenig sensible Methoden handelte. Mit einem biochemischen Assay wurde bei Kaninchen nachgewiesen, daß Paclitaxel nahezu vollständig an Plasmaproteine gebunden wird (92%) und daß eine rasche, biexponentielle Clearance aus dem Serum erfolgt. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Halbwertszeit betrug 2,7 bzw. 45 Minuten nach intravenöser Bolusinjektion.

Bei Nagern wurde nach Applikation von radioaktiv markiertem Paclitaxel Radioaktivität weder im Gehirn noch im peripheren Nervensystem nachgewiesen. Bei diesen Studien wurden Gewebeextraktionsmethoden und autoradiographische Untersuchungen eingesetzt (KLECKER et al. 1992, LESSER et al 1993). Bei Ratten wurden nur 10% der applizierten Paclitaxel-Dosis renal ausgeschieden. Metabolite im Plasma und im Urin wurden nicht nachgewiesen. 40% der applizierten Dosis wurden in unveränderter Form oder als Metabolite innerhalb von 24 Stunden über die Galle ausgeschieden (MONSARRAT et al. 1992 a, 1992 b).

#### **2.1.5. Toxikologie**

Die präklinische Toxikologie von Paclitaxel wurde bei Mäusen, Ratten und Hunden untersucht. Die LD<sub>50</sub> bei Ratten beträgt bei Einmaldosierung 206 mg/m<sup>2</sup> und 51 mg/m<sup>2</sup>/Tag bei 5-tägiger Behandlung. Dies ist ein Hinweis auf eine kumulative Toxizität. Die toxischen Wirkungen von Paclitaxel waren besonders deutlich bei rasch proliferierenden Geweben, z.B. den Zellen des hämatopoetischen und lymphatischen Systems sowie des Gastrointestinaltraktes und

des Genitaltraktes. Wirkungen auf andere Organsysteme wie das Nervensystem, das kardiovaskuläre System und die Nieren waren weniger ausgeprägt.

Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit enthält die galenische Zubereitung von Paclitaxel eine Mischung aus Cremophor EL und dehydriertem Ethanol im Verhältnis 4 : 1. Bei Versuchstieren traten bei Anwendung von Cremophor EL Überempfindlichkeitsreaktionen, Vasodilatation, Atemnot, Lethargie und niedriger Blutdruck auf. Einige versuchstiere starben (DATA ON FILE 1992).

Das kanzerogene Potential von Paclitaxel wurde bisher nicht untersucht. In vitro führt Paclitaxel zu Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten. Im Mikronukleustest bei Mäusen wirkt Paclitaxel mutagen. Paclitaxel führte bei intravenöser Verabreichung einer Dosis von 1 mg/kg KG ( $6 \text{ mg/m}^2$ ) bei Ratten zu einer geringeren Fertilität und zu fetotoxischen Wirkungen. Paclitaxel erwies sich bei Kaninchen, die das Medikament während der Organogenese intravenös in einer Dosierung von 3 mg/kg ( $33 \text{ mg/m}^2$ ) erhielten, als maternal-toxisch sowie als embryo- und fetotoxisch (DATA ON FILE 1992).

## **2. 2. Das Problem der Restenose nach Koronarangioplastie**

Nach primär erfolgreicher Dilatation einer stenosierten Koronararterie mit dem Ballonkatheter kommt es in 20-50 % der Fälle zu einer klinisch bedeutsamen Restenose innerhalb der ersten 6 Monate nach Intervention (POPMA et al. 1991, BAIM 1992). Als initiales Ereignis, das den restenotischen Prozeß in Gang setzt, wird heute unstrittig die bei der Intervention auftretende Gefäßverletzung angesehen, die ihrerseits eine hochkomplexe Reaktion des Organismus auf diese Verletzung nach sich zieht (ROSS u. GLOMSET 1976, ROSS 1986, HAUDENSCHILD 1993). Diese „response to injury“-Hypothese wurde erstmals im Jahre 1976 von ROSS formuliert (ROSS u. GLOMSET 1976), später überarbeitet (ROSS 1986, 1993) und ist heute in wesentlichen Punkten unumstritten.

Die "Reaktion auf Verletzung" impliziert allerdings auch, daß es sich um eine, zumindest im Ansatz, sinnvolle physiologische Reaktion handelt, mit dem Ziel, den durch die Verletzung entstandenen Schaden für den Organismus zu begrenzen (HAUDENSCHILD 1993). Tatsächlich haben für die Entwicklung einer Restenose bedeutsame Vorgänge, wie Thrombozytenanlagerung, Invasion von Makrophagen oder Proliferation neuen Gewebes, mit der Wundheilung viel gemein. So sollte der Begriff Restenoserate auch nicht darüber hinwegtäuschen, daß bei allen Patienten nach Ballondilatation dieser „response to injury“ einsetzt. Das Problem, ob und warum ein Patient eine klinisch bedeutsame Restenose bekommt, ein anderer jedoch nicht, ist allerdings längst noch nicht in allen Einzelheiten verstanden (GIBSON et al. 1993). Akutergebnis der Intervention und verschiedene Risikofaktoren lassen zwar eine gewisse Vorhersagewahrscheinlichkeit zu (VALLBRACHT et al. 1987, HAUDENSCHILD 1993, SIMONS et al. 1993), davon unberührt bleibt aber die Tatsache, daß sich die Reaktion des Organismus auf die Verletzung bei manchen Patienten selbst limitiert, bei anderen jedoch offenbar überschießt (HAUDENSCHILD 1993). Bei diesen Patienten kommt es dann zu hämodynamischen Konsequenzen, verursacht durch intimale Hyperplasie, das heißt, die Restenose manifestiert sich klinisch.

Vor dem Auftreten klinischer Symptome ist die Restenose ein relativ uniformer Prozeß (HANKE u. KARSCH 1992); zahlreiche tierexperimentelle und Post-mortem-Studien haben gezeigt, dass die intimale Hyperplasie durch Proliferation glatter Muskelzellen und die Synthese extrazellulärer Matrix verursacht wird (GIRALDO et al. 1985, LIU et al. 1989, KARSCH et al. 1991). Bis es allerdings dazu kommt, läuft ein hochkomplexes, erst in Teilen verstandenes Wechselspiel regulativer Prozesse ab, zusätzlich kompliziert durch die Tatsache, daß es sich nicht einfach um Reparaturmechanismen eines gesunden Gefäßes handelt, sondern um ein Gefäß mit arteriosklerotischer Vorerkrankung - selbst eine nur teilweise verstandene Krankheit (KARSCH 1992, SCHWARTZ et al. 1992, HAUDENSCHILD 1993, ROSS 1993, WILENSKY et al. 1995).

Durch Aufdehnung des Ballons kommt es bei der Angioplastie zu Intimaverletzungen mit Einrissen, Endotheldefekten und Zellnekrosen bis in die Media. Im verletzten Gefäßbereich lagern sich daraufhin sofort Thrombozyten an. Abhängig von Art und Ausmaß der Verletzung kann sich aus diesen lokalen Thrombusformationen ein okkludierender Thrombus bilden; der resultierende Gefäßverschluß wird dann „frühe“ Restenose genannt. Durch Thrombozytendegranulation, geschädigte Endothelzellen, Makrophagen, die zerstörtes Gewebe abräumen, und die nekrotischen Zellen selbst werden eine Vielzahl an mitogenen Stimuli und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Sie führen zu einer Aktivierung von intimalen glatten Muskelzellen, die daraufhin ihren Phänotyp vom sogenannten kontraktiven Typ mit zahlreichen kontraktiven Fasern und geringer Syntheseleistung zum synthetischen Typ mit vielen Syntheseorganellen, gesteigerter Teilungsrate und wenigen kontraktiven Elementen hin ändern (SIMONS et al 1993). Neben der Proliferation von intimalen Muskelzellen spielen auch die Migration von medialen glatten Muskelzellen in die Neointima und ihre dortige Proliferation eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer intimalen Hyperplasie (ROSS u. GLOMSET 1976, ROSS 1986, 1993, HANKE u. KARSCH 1992, KARSCH 1992, LIBBY et al. 1992, HAUDENSCHILD 1993, WILENSKY et al. 1995).

Die Entwicklung einer Restenose ist ein kontinuierlicher Prozeß, jedoch weisen die daran beteiligten Einzelkomponenten eine sehr unterschiedliche Dynamik auf. Innerhalb weniger Minuten nach der Gefäßschädigung durch Ballondilatation ist bereits das Maximum der Thrombozytenaggregation erreicht, und auch die multiform und kaskadenartig ablaufende Aktivierung der glatten Muskelzellen ist nach anderthalb Tagen sicher nachweisbar. Das Maximum der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen ist im Tierexperiment nach 3 - 7 Tagen erreicht und danach stark rückläufig. In diesem Zeitraum haben weder Versuchstiere noch Menschen eine Restenose entwickelt, sofern es nicht durch thrombotischen Verschluß zur „frühen“ Restenose gekommen ist. Tierexperimente und Post-mortem-Studien haben vielmehr gezeigt, daß es durch Synthese extrazellulärer Matrix zu einer weiteren kontinuierlichen

Größenzunahme der Neointima kommt, die bei 20 - 50 % der Patienten dann nach 3 - 6 Monaten zur „späten“ Restenose führt. Die hier nur grob vereinfacht dargestellten Vorgänge sind durch ein erst in Ansätzen verstandenes System gegenseitiger Beeinflussung durch stimulierende und hemmende Faktoren miteinander verbunden (CLOWES et al. 1983, 1986, FAXON et al. 1984, GIRALDO et al. 1985, LIU et al. 1989).

	Endothelzelle	Muskelzelle	Makrophage	T-Zelle
IL-1	+	+	++	-
TNF	-	+	+	+
LT	-	-	-	+
IL-2	-	-	-	+
IL-6	+	++++	++	+
IL-8	+	?	+	-
MCP-1/MCAF	+	+	+	-
M-CSF/CSF-1	+	+	+	-
IFN- $\gamma$	-	-	-	+
PDGF-A	+	++	+	-
PDGF-B	++	-	+	-
Acidic FGF	+	+	?	?
Basic FGF	+	+	+	?
HG EGF	?	+	++	?

**Tab. 2: Zytokine und Wachstumsfaktoren, Die von Restenose-assoziierten Zellen exprimiert werden. Tabelle modifiziert nach LIBBY (LIBBY et al. 1992) : IL: Interleukin; TNF: tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin; LT: lymphotoxin (TNF- $\beta$ ); MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; MCAF: macrophage chemo-attractant and activating factor; M-CSF: macrophage colony stimulin factor; CSF-1: colony stimulating factor 1; IFN- $\gamma$ : gamma interferon; PDGF: platelet-derived growth factor; FGF: fibroblast growth factor; HB-EGF: heparin-binding epidermal growth factor; - = gar nicht oder wenig vorhanden,+ = Exprimierung in unterschiedlichem Ausmaß.**

Diese komplexen Interaktionen werden durch eine grosse Anzahl an Mediatoren, meist Polypeptiden (siehe Tab. 2), gesteuert, und es ist zu erwarten, dass durch die grossen Fortschritte auf zell- und molekularbiologischem Gebiet noch eine ganze Reihe von bisher unbekanntem Mediatoren identifiziert werden können (LIBBY et al. 1992, HAUDENSCHILD 1993, ROSS 1993, BENNETT u. SCHWARTZ 1995).

Kürzlich gelang BERK et al. (1991) der Nachweis, dass PDGF-A, ein potenter Wachstumsfaktor für die glatte Muskelzelle, von dieser auch selbst exprimiert wird. Für das Verständnis der sich selbst verstärkenden, nicht limitierten restenotischen Proliferation könnte die Entdeckung dieses autokrinen Stimulationsmechanismus besonders interessant sein. Weitere neu entdeckte Komponenten der zellulären und extrazellulären Interaktion sind interzelluläre Adhäsionsmoleküle und direkte Kontakte einer Zelle zu den benachbarten Zellen (SUZUKI et al. 1994, WANG et al. 1995), wobei der Endothelzelle als Schnittstelle zwischen Blutstrom und Gefässwand eine zentrale Rolle zukommt (ROSS u. GLOMSET 1976, CLOWES et al. 1983, HANKE u. KARSCH 1992, ROSS 1993).

Damit es den einzelnen Zellarten möglich ist, auf verschiedene Einflüsse flexibel zu reagieren, stehen den Wachstumsfaktoren und mitogenen Stimuli antagonistisch Faktoren mit hemmendem Einfluss gegenüber. Schon im Ruhezustand der Gefässwand balancieren inhibitorische und aktivierende Faktoren ein „steady-state“ mit einer Zellteilungsrate der glatten Muskelzellen von unter 0,1 % pro Tag aus. Wird dieser Ruhezustand gestört, z. B. durch eine mechanische Verletzung wie bei der Ballondilatation, dann verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der Wachstumsfaktoren und aktivierenden Stimuli, zusätzlich verstärkt durch einen Verlust inhibitorischer Signale (CLOWES et al. 1983, GRIFFITH et al. 1984, ROSS 1993).

Es hat viele Versuche gegeben, auf die Entwicklung einer Restenose mit Medikamenten einzuwirken. In der klinischen Erprobung befanden sich unter

anderem Kalziumantagonisten (COREOS et al. 1985), ACE-Hemmer, Prostazyklinderivate (GERSHLICK et al. 1994), Thromboxan-A<sub>2</sub>-Antagonisten (SERRUYS et al. 1991), Fischölderivate und Lipidsenker (WEINTRAUB et al. 1994). Eine entscheidende Verringerung der Restenosierungsraten konnte allerdings nicht erreicht werden.

Entsprechend der Dynamik des restenotischen Prozesses mit initialem Beginn, kaskadenartig aufgefächertem Fortgang und uniformem Schluß konzentrieren sich die Versuche einer medikamentösen Therapie deshalb immer mehr auf eine sehr früh ansetzende Hemmung der Thrombozytenaggregation und die Hemmung der späten Proliferation glatter Muskelzellen, in der Hoffnung, damit zwei uniforme Mechanismen der restenotischen Proliferation beeinflussen zu können. Obwohl im Tierversuch vielversprechend, liessen sich diese positiven Ergebnisse in ersten klinischen Studien bislang nicht nachvollziehen. Ein Ausblick auf zukünftige medikamentöse Strategien umfasst deshalb, aus obigen Erfahrungen lernend, folgende Überlegungen:

1. Die Blockade eines Mechanismus der restenotischen Proliferation sollte möglichst keine alternativen Stimulations- und Aktivationswege offenlassen. Ob solch ein zentraler Ansatzpunkt in der Entwicklung zur Restenose bei den ungeheuer komplexen Vorgängen an der Gefäßwand allerdings überhaupt existiert, ist äusserst fraglich.
2. Eine Kombination mehrerer Medikamente mit unterschiedlichen Ansatzpunkten könnte sich in ihren Wirkungen addieren. Heparin und Cortison zeigten bereits im Tierexperiment synergistische Effekte (BERK et al. 1991).
3. Viele klinische Studien blieben wahrscheinlich trotz hoher Wirksamkeit der verwendeten Substanzen ohne messbare Ergebnisse wegen der engen Grenzen, die Dosierung und Anwendungsdauer durch eine systemische Applikation gesetzt werden. Hohe Wirkstoffspiegel vor Ort

könnten durch neue lokale Applikationssysteme erreicht werden (WILENSKY et al. 1991, LINCOFF et al. 1994, SPEARS et al. 1994).

4. Gentechnologische Methoden eröffnen ganz neue Möglichkeiten der medikamentösen Intervention durch ihre direkte Wirkung am Zellkern (NABEL et al. 1990, CHAPMAN et al. 1992, GAL et al. 1993, MORISHITA et al. 1993, BENNETT u. SCHWARTZ 1995).
5. Es ist nicht wünschenswert, ja sogar gefährlich für das betroffene Gefäß, die Reaktion des Organismus auf Verletzung vollständig zu blockieren (HAUDENSCHILD 1993). Eine Modulation der Gefäßwand, die nur die überschüssige Proliferation neuen Gewebes verhindert, wäre ideal (MITSUKA et al. 1993). Die Stärkung von natürlich im Organismus vorkommenden Wachstumsinhibitoren mit multiplen Wirkungen auf verschiedene Zellsysteme wäre ein Beispiel für solch eine modulative Therapie.

### **2.3. Anwendung von Paclitaxel zur Prophylaxe / Therapie der Restenose**

Paclitaxel, das aus der Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* gewonnen wird (DOUROS u. SUFFNESS 1981), ist ein antineoplastischer Wirkstoff, der diese antiproliferative Wirkung durch einen außergewöhnlichen Mechanismus entfaltet. Indem es das biochemische Gleichgewicht der Mikrotubuli zugunsten einer Mikrotubulusanhäufung verschiebt, bilden sich innerhalb des Zytoplasmas zahlreiche dezentralisierte und unorganisierte Mikrotubuli. Diese Art von Veränderungen im Zytoskelett beeinflussen mehrere Zellfunktionen wie Proliferation, Motilität und Migration, intrazellulärer Transport und „transmembrane signaling“. Paclitaxel hat seinen antiproliferativen Effekt auf Zellen der glatten Muskulatur der Ratte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. In einer früheren Studie konnte belegt werden, daß sogar nach einer kurzen einmaligen Applikation von Paclitaxel (10 mmol/l in 10 min) auf eine

menschliche Zellkultur glatter Muskelzellen ein andauernder antiproliferativer Effekt folgte. Diese Wirkung dauerte über eine Periode von 14 Tagen, ohne dabei einen Rebound- oder zytotoxischen Effekt hervorzurufen (AXEL et al. 1997).

Die Idee für die Evaluierung einer lokalen Paclitaxelapplikation mit einem Doppelballon-Katheter in vivo basierte deshalb auf folgenden Überlegungen:

1. Die In-Vitro-Ergebnisse in menschlichen Mono- und Co-Kulturen sind sehr vielversprechend.
2. Paclitaxel ist sehr lipophil und hat eine lang andauernde Wirkung in der Zelle aufgrund der strukturellen Veränderung des Zytoskeletts.
3. Der Doppelballon-Katheter ist ein passives Applikationssystem, welches das Medikament mit nur geringer vaskulärer Verletzung verabreicht.
4. Die erfolgreiche Zellkultur-Methode (10 mmol/l in 10 min) kann auf das In-vivo-Experiment übertragen werden.

### **3. Material und Methodik**

Ziel der Tierversuche war die Untersuchung der Wirkung und Sicherheit der lokalen Applikation von Paclitaxel in Koronararterien von Schweinen nach Stent-Implantation mit dem Doppelballon-Katheter im Hinblick auf Akut- und Langzeitkomplikationen. Die Effektivität der Anwendung wird durch die Ergebnisse der histologischen Auswertung gezeigt.

#### **3.1. Versuchstiere und Gruppeneinteilung**

Für die Untersuchungen wurden 24 weibliche und männliche Hausschweine mit einem Gewicht von 25 kg verwendet. Die Tiere wurden von einem örtlichen Züchter bezogen. Die Tiere wurden mit 100 mg Aspirin oral über drei Tage vorbehandelt. Die Tierversuche wurden unter der Antragsnummer M 7/96 vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

In ersten Vorversuchen wurde an menschlichen Zellkulturen die Wirksamkeit, Gewebeverträglichkeit und Toxizität, sowie die Löslichkeit des Paclitaxel untersucht (AXEL et al. 1997). Danach wurde das zu verabreichende Volumen und die darin enthaltene Wirkstoffmenge festgesetzt (10 ml, 10 mmol/l).

Das Protokoll sah vor, die Anwendung des Doppelballon-Katheter bei Stent-Implantation in der Kontrollgruppe ohne Anwendung von Paclitaxel und in der Behandlungsgruppe mit Verwendung von Paclitaxel zu vergleichen. In der Paclitaxelgruppe wurde das Paclitaxel mit 1 bar Injektionsdruck für 5 Minuten freigesetzt. Nach 28 Tagen erfolgte die Gefäßentnahme bei beiden Gruppen.

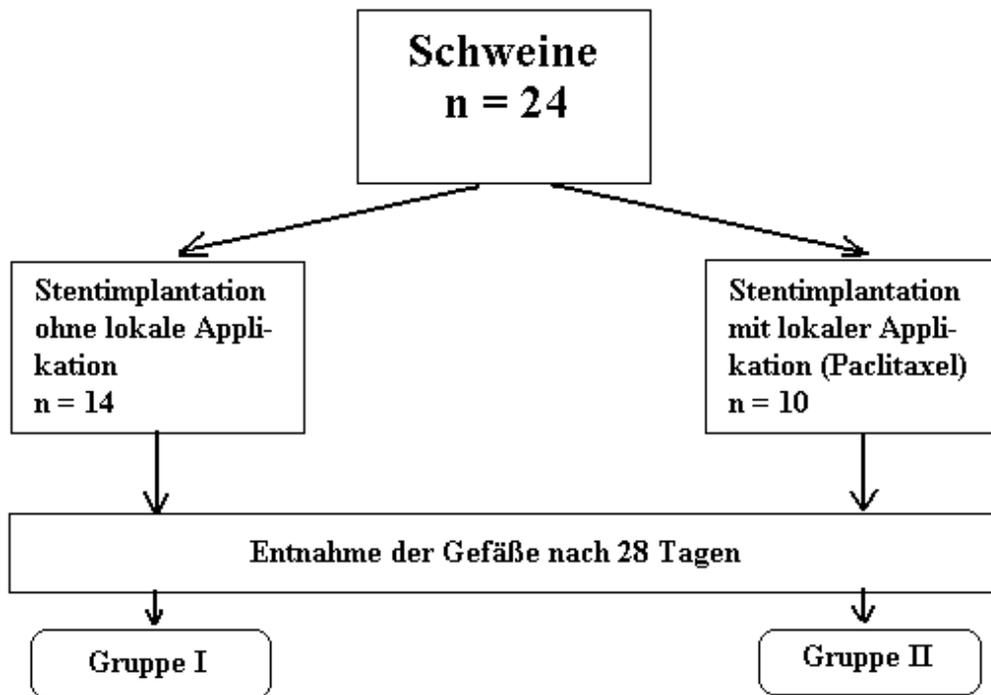


Abb. 6: Schematischer Überblick über die Versuchsgruppeneinteilung : Gruppe I dient als Kontrollgruppe, Gruppe II als Paclitaxelgruppe.

## 3.2. Doppelballon-Katheter

### 3.2.1. Beschreibung

Der Doppelballon-Katheter (Abb. 7) wurde für die lokale Applikation von Flüssigkeiten an ausgewählte Stellen in Blutgefäßen entwickelt. Die zu Grunde liegende Prämisse war, daß Flüssigkeiten, die zwischen 2 Ballons unter Druck gehalten werden, von der Gefäßwand absorbiert werden können.

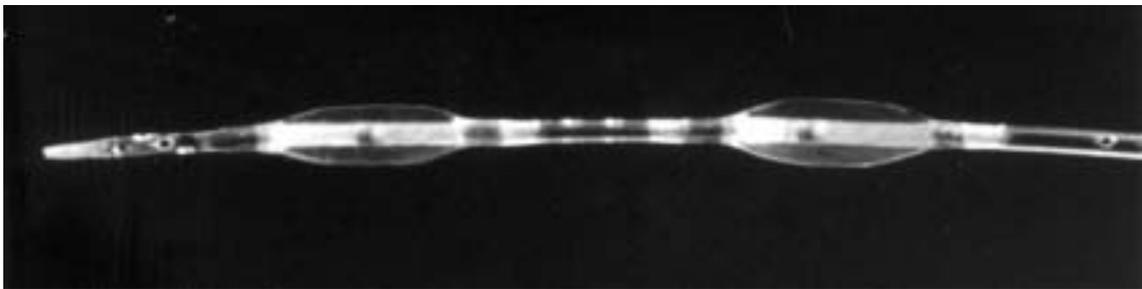


Abb. 7: Doppelballon-Katheter.

Zu erkennen sind die beiden Ballons im Zustand der Dilatation.

### 3.2.2. Daten

Der Doppelballon-Katheter ist ein Katheter für die lokale Applikation von Medikamenten mit einem 3-Lumen-3.5-French-Polyäthylen-Schaft von 135 cm Länge (siehe Abb. 8), mit 2 Ballons aus nachgiebigem Urethan, verbunden über eine distale Spitze. Die Ballons werden aufgepumpt und bilden einen Zwischenraum, in welchen Flüssigkeit appliziert werden kann. Die Ballon-Größen reichen von 2.0 bis 4.0 mm, in 0.5 mm Stufen. Die Spitze hat 2 röntgendichte Markierungsbänder an jedem Ende des Zwischenraumes, so daß der Behandlungsort klar markiert ist. Das Profil des Katheters hat einen maximalen Durchmesser von 0,05". Die maximale Leitungsfähigkeit ist 0,018". Die Inflationsdauer beträgt weniger als 15 Sekunden für alle Größen.

### **3.2.3. Mechanismus**

Nach der Angioplastie einer Läsion wird der Doppelballon-Katheter am Ort der Läsion plaziert und der proximale und distale Ballon werden mit 3 bar aufgepumpt, um die Blutzufuhr zu unterbrechen. Anschließend wird das Medikament in den Zwischenraum zwischen den 2 Ballons durch eine druckgesteuerte Spritze appliziert. Wenn der Sitz des Ballons im Gefäß korrekt gewählt wurde und zwischen den Ballons keine Seitenäste auftreten, entsteht nur ein minimaler systemischer Volumenverlust. Die Flüssigkeit tritt in die Media und Adventitia abhängig vom gewählten Druck über. Nach der Theorie, daß die Adventitia der Gefäßwand Nährstoffe zuführt, kann die Infusion über die Adventitia von Vorteil sein. Bei dem erkrankten Gefäß, das dilatiert wurde, nimmt die infundierte Flüssigkeit den Weg des geringsten Widerstandes und füllt die durch die Angioplastie entstandenen Gefäßspalten. Hier wäre das eingesetzte Medikament zur Restenoseprophylaxe am besten plaziert, da der Heilungsprozeß in diesem Bereich einsetzt.

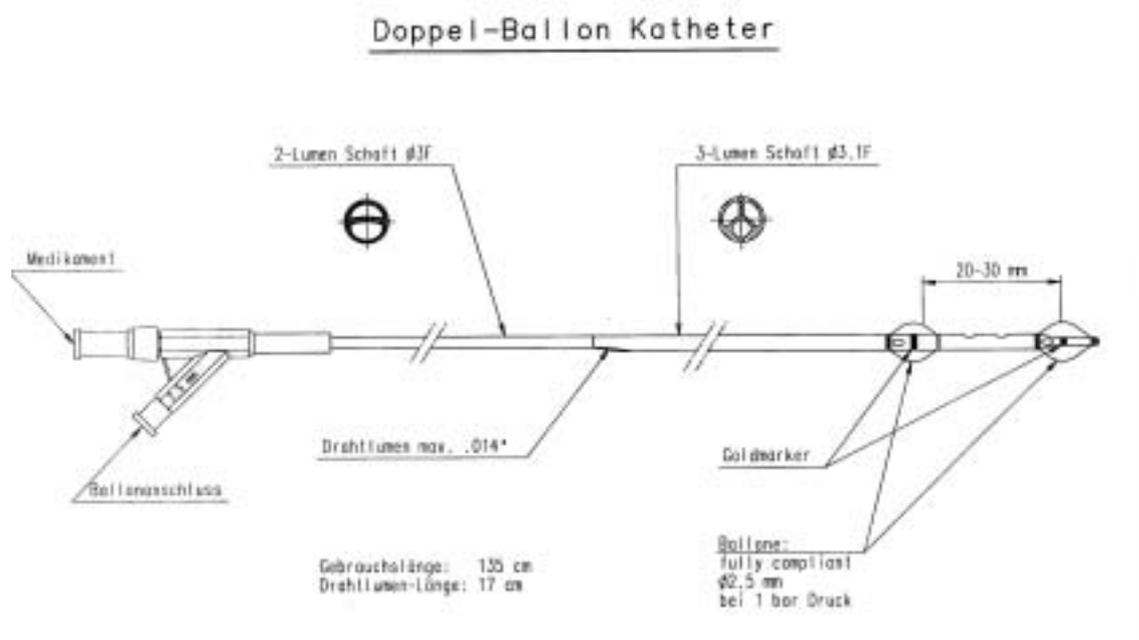
### **3.2.4. Vorteile**

Die Vorteile dieser Applikationsmethode bestehen darin:

- (1) Das eingesetzte Medikament kann lokal appliziert werden.
- (2) Der systemische Verlust ist minimal.
- (3) Das eingesetzte Medikament verbleibt in der Gefäßwand, wo es dem Restenoseprozeß am besten entgegenwirken kann.
- (4) Durch diese Technik kann die Gefäßwand der vollen Wirkung des Medikaments ausgesetzt werden, wobei die Wirkung durch Druckerhöhung verstärkt wird.

### 3.2.5. Einschränkungen

Die Distanz der beiden Ballons, die den Zwischenraum bilden, ist von größter Bedeutung, da das Auftreten von Seitenästen einen zu großen Medikamentenverlust verursachen kann, wenn die Distanz nicht angemessen gewählt wird. Diese Technik ist von dem angewandten Druck abhängig, der die Aufnahme durch die Gefäßwand unterstützt.



**Abb. 8:** Doppelballon-Katheter.

Inflatierte Ballons bilden einen „Zwischenraum“ in dem arteriellen Gefäßabschnitt zwischen den Ballons.

### **3.3. Operatives Vorgehen**

#### **3.3.1. Vorbehandlung der Tiere**

Die Tiere bekamen 3 Tage lang bis zum Op-Termin täglich jeweils 100 mg Aspirin p.os. Dieses Medikament wurde dem Futter beigemischt. Durch diese Vorbehandlung sollte vermieden werden, daß es während der Katheterbehandlung der Tiere zur Thrombusbildung kam.

#### **3.3.2. Narkose**

##### **3.3.2.1. Prämedikation**

Am Op-Termin wurden die Tiere im nüchternen Zustand vom Tierstall in den Op-Raum transportiert. Darauf folgte die Prämedikationsphase, die zirka 20 Minuten dauerte. Diese Prämedikation wurde mit 4 mg/kg Ketamin (50 mg/ml, Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davice GmbH, Berlin), 5 mg/kg Azaperon (40 mg/ml, Stresnil<sup>®</sup>, Jansen GmbH, 41470 Neuss), 0.1 ml/kg Flunitrazepam (2 mg/ml, Rohypnol<sup>®</sup>, Hoffmann La-Roche AG, 79630 Grenzach-Wyhlen), 0.5 mg/kg Atropinsulfat (0.5 mg/ml, Atropinsulfat Braun<sup>®</sup> 0.5 mg, B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) erreicht, welche intramuskulär in die Nackenmuskulatur appliziert wurden. Nach der Einwirkphase wurde das Tier auf dem Op-Tisch in Rückenlage fixiert.

Vor der Inhalationsnarkose mußten drei Schritte erfolgen:

1. Legen eines intravenösen Zuganges (Butterfly mit Dreiwegehahn) für die Applikation von Ringer-Laktat-Lösung und Medikamenten in die Vena auricularis lateralis.

## 2. Anschließen an das EKG-Gerät:

Für das Anlegen der EKG-Elektroden an der Brustwand mußte das Tier an bestimmten Stellen der Brustwand rasiert werden. Das Anlegen der Elektroden erfolgte folgendermaßen:

- Erste Elektrode : 7. Interkostalraum (ICR) Medioklavikularlinie links.
- Zweite Elektrode : 8. ICR Medioklavikularlinie rechts.
- Dritte Elektrode : 3. ICR parasternal links.

## 3. Intubation:

Bei Rückenlage wurde das Maul des Tieres geöffnet und die Zunge herausgezogen. Mit dem Laryngoskop wurde der Zungengrund nach ventral gedrückt, um den Zugang zur Epiglottis zu ermöglichen. Dann wurde der Pharyngotrachealtubus in die Trachea eingeführt und der Cuff mit 5 ml Luft aufgeblasen.

### **3.3.2.2. Inhalationsnarkose**

Der Pharyngotrachealtubus wurde an das Beatmungsgerät angeschlossen. Die Narkose erfolgte mit Isofluran und einer Lachgas-Sauerstoff-Mischung (Verhältnis 1/3 zu 2/3). Die Isofluran-Narkose erfolgte bis zum Ende des Versuches.

### **3.3.3. Darstellung der Arteria carotis communis**

Der sagitale Hautschnitt erfolgte im paratrachealen Halsabschnitt rechts, zirka 10 cm kranial vom Sternum. Vor dem Hautschnitt mußte diese Stelle rasiert, mit Seife und lauwarmem Wasser gewaschen werden. Nach der anschließenden Desinfektion mit Betaisadonna wurde das Tier bis auf die zu operierende Stelle steril abgedeckt.

Mit dem Skalpell erfolgte ein 3 cm langer sagitaler Hautschnitt, das subkutane Fettgewebe wurde freipräpariert, die beiden Muskeln M. hyoideus und M. sternocephalicus wurden mit einer chirurgischen Pinzette und Schere auseinandergespannt. Somit war der Zugang zu den Strukturen Arteria carotis communis, Vena jugularis interna und Nervus vagus möglich. Der nächste Schritt bestand darin, daß man die Arteria carotis communis von den restlichen zwei Strukturen freipräparierte. Um die Angioplastie durchführen zu können, mußte das Gefäß auf einer Länge von 2 cm freipräpariert werden. Zur besseren Handhabung wurde die Arterie mit zwei Haltefäden, kranial und kaudal plziert, fixiert. Anschließend wurde der Blutstrom der Arteria carotis communis durch Setzen zweier Ligaturen unterbrochen, um die Arteriotomie durchführen zu können. Zwischen den beiden Ligaturen wurde mit einer Mikroschere ein horizontaler Schnitt von etwa 1 mm Länge gesetzt. Durch diese Inzisionsstelle konnte der Doppelballon-Katheter eingeführt werden.

#### **3.3.4. Operativer Eingriff**

In der Zwischenzeit war eine Paclitaxellösung, so wie 5000 Einheiten Heparin (Heparin Natrium-Braun, B-Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) zur Applikation vorbereitet worden. Nachdem der Doppelballon-Katheter auf gleichmäßige Inflatierbarkeit und Durchgängigkeit der Applikationsöffnung geprüft worden war, wurde er mit der Paclitaxellösung gefüllt. Zur Applikation des Paclitaxel mit gleichbleibendem Druck wurde eine Handpumpe mit eingebautem Manometer benutzt, deren Reservoir ebenfalls mit Paclitaxel gefüllt worden war und die nun an den Katheter angeschlossen wurde.

#### **3.3.5. Doppelballon-Katheter**

Das Paclitaxel wurde mittels des Doppelballon-Katheters (Schneider-AG, Bülach, Schweiz) verabreicht. Durch die Inzisionsstelle in der rechten Arteria carotis communis wurde eine 8 Fr. Schleuse eingeführt, durch welche ein 8 Fr. Führungskatheter (Typ JL 3,5, Firma Cordis, U.S.A) vorgeschoben wurde.

Danach erfolgte die selektive Darstellung des Ramus interventricularis anterior (RIVA) durch Kontrastmittel via Angiographie. Anschließend erfolgten vier weitere Schritte:

1. Einführung eines Führungsdrahtes High Torque Floppy ( ACS, CA, USA) 0,014 inch über den Führungskatheter bis zum distalen Ende des Koronargefäßes.
2. Der Doppelballon-Katheter wurde über den Führungsdraht eingeführt und mit 3 bar über 5 Minuten inflatiert.
3. Während dieser 5 Minuten wurde Paclitaxel im Zwischenraum des Doppelballon-Katheters mit ca. 1 bar freigesetzt. Anschließend wurde der Doppelballon-Katheter deflatiert und entfernt.
4. Angiographische Kontrolle.

### **3.3.6. Stentimplantation**

Nach der Entfernung des Doppelballon-Katheters aus dem Koronargefäß wurde eine Stentimplantation vorgenommen. Der Wiktor-Stent (Medtronic, Düsseldorf, Deutschland) war auf einem Ballonkatheter (3,25 mm) aufgebracht. Durch Inflation des Ballonkatheters konnte der Stent an der gewünschten Stelle des Gefäßes entfaltet werden. Die Platzierung des implantierten Stent wurde durch Kontrastmitteldarstellung angiographisch kontrolliert. Anschließend wurde der Ballonkatheter deflatiert und entfernt.

### **3.3.7. Verschluß der Operationsstelle**

Nachdem der Ballonkatheter für die Stentimplantation, der Führungskatheter und die Schleuse entfernt worden waren, mußten zwei Ligaturen kranial und kaudal der Inzisionsstelle gemacht werden, um den Blutstrom in diesem Bereich zu unterbinden.

Schließlich wurde der Wundbereich schichtweise verschlossen (Unterhautnaht und U-Naht für die Haut). Zusätzlich erhielten alle Tiere intravenös 2 ml Metamizol-Natrium (Novalgin<sup>®</sup>, Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland). Bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose wurden die Schweine durchgehend überwacht. Postoperativ bekamen alle Tiere über 100 mg/kg über 3 Tagen Ampicillin (Ampicillin-Ratiopharm<sup>®</sup>, 1000 filmtbl., Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) ins Trinkwasser beigemischt.

### **3.4. Entnahme der Herzen**

Für die Entnahme des Herzens 28 Tage nach der Operation mußte das Tier zunächst betäubt werden. Die Narkose wurde mit 4 mg/kg Ketamin (50 mg/ml, Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davice GmbH, Berlin), 5 mg/kg Azaperon (40 mg/ml, Stresnil<sup>®</sup>, Jansen GmbH, 41470 Neuss), 0.1 ml/kg Flunitrazepam (2 mg/ml, Rohypnol<sup>®</sup>, Hoffmann La-Roche AG, 79630 Grenzach-Wyhlen), 0.5 mg/kg Atropinsulfat (0.5 mg/ml, Atropinsulfat Braun<sup>®</sup> 0.5 mg, B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) eingeleitet. Somit konnte das Tier in Rückenlagerung auf dem Op-Tisch fixiert werden. Für die Tötung wurden 12 ml Embutramid (T 61, Hoechst Roussel Vet, Holland) über eine Ohrvene intravenös appliziert.

Anschließend wurde die ventrale Thoraxseite rasiert sowie das Operationsfeld mit Seife und lauwarmen Wasser gewaschen. Nach der darauffolgenden Desinfektion mit Betaisodonna wurde der Hautschnitt gesetzt.

Der Thorax wurde schichtweise geöffnet:

1. Freipräparation des subkutanen Fettgewebes
2. Durchtrennen der Brustmuskulatur
3. Aufschneiden der Rippen
4. Mit dem Thoraxspreizer wurde der Thorax an der aufgeschnittenen Stelle auseinandergespreizt.

Für die Entnahme des Herzens war es notwendig, an den Gefäßen Vena cava superior, Vena cava inferior, Arteria pulmonalis und Aorta eine Ligatur zu legen. Nach der Entnahme wurde das Herz unter fließendem Wasser gewaschen, um Blutansammlungen im und um das Herz herum zu beseitigen. Die Fixation des Herzens erfolgte in 2% Paraformaldehyd-Lösung.

### **3.5. Histologische Aufarbeitung der Gefäße**

#### **3.5.1. Fixierung**

Fixierlösung: Die Gefäße wurden mit einer 2-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung in Cacodylatpuffer fixiert. Zur Herstellung des 0,1-molaren Cacodylatpuffers wurden 21,413 g Dimethylarinsäure pro Liter Aqua bidestillata gelöst und auf pH 7,4 titriert. Nach Zugabe von 20 g Paraformaldehyd pro Liter wurde die Lösung auf einer Heizplatte bei 500 Watt 30 min lang gerührt und anschließend filtriert.

**Durchführung:** Der Koronararterienabschnitt mit dem Stent wurde mit einem Skalpell aus dem Herzen herausgeschnitten. Zur Fixierung wurden die Gefäßstücke am einen Ende auf eine Metallkanüle aufgezogen und am freien Ende mit einer Gefäßklemme verschlossen. Über ein in die Kanüle mündendes Infusionsbesteck konnte nun die Fixierlösung unter Druck infundiert werden. Bei einem angelegten Druck von 70 mm Hg betrug die Dauer der Fixierung etwa 30 Minuten. Eine Nachfixierung über 12 Stunden, wiederum in

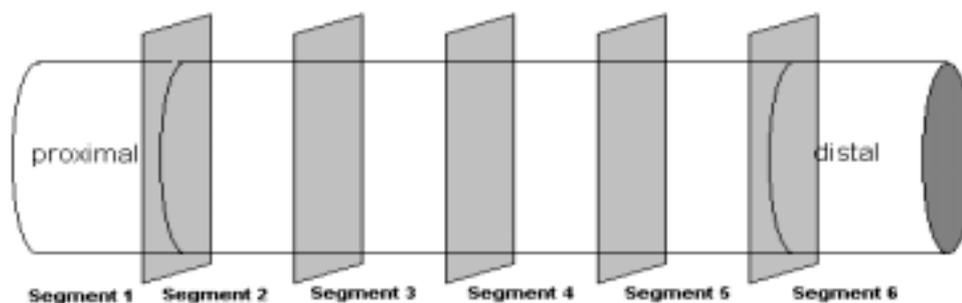
cacodylatgepuffertem 2-prozentigem Paraformaldehyd, schloß das Prozedere ab.

### 3.5.2. Einbetten in Paraffin

Die entnommenen Gefäße wurden einzeln, nach schrittweiser Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, in Paraffin eingebettet.

### 3.5.3. Anfertigung von Semidünnschnitten

Da der Doppelballon-Katheter über eine Länge von 2 cm auf das Gefäß einwirkt, wurde ein etwa 3,5 cm langes Gefäßstück entnommen. Nach Fixierung und Präparation konnten davon noch etwa 2,5 cm weiterverarbeitet und ausgewertet werden. Dieses Gefäßstück wurde in 4 bis 5 gleich große Segmente unterteilt, mittels eines Jung 2045 Multicut-Mikrotoms (Leica Instruments, Nussloch) wurden von jedem Segment zahlreiche Semidünnschnitte mit je 4 µm Dicke angefertigt (s. Abb. 9).



**Abb. 9:** Schematische Zeichnung des Schnittverfahrens zur Anfertigung von Semidünnschnitten

### **3.6. Standardfärbungen**

#### **3.6.1. Hämalun-Eosin-Färbung**

Zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen und zur Bestimmung der intimalen Zellagenzahl wurde eine kombinierte Färbung mit Hämalun und Eosin (HE) nach üblicher Vorgehensweise durchgeführt.

#### **3.6.2. Elastica-Van-Gieson-Färbung**

Mit dieser Färbetechnik stellen sich die Laminae elasticae der Media rotbraun dar. Die einzelnen Wandschichten eines Gefäßes lassen sich dadurch besonders gut voneinander abgrenzen. Deshalb wurde die gesamte morphometrische Vermessung der Präparate an Elastica-Van-Gieson-gefärbten Schnitten vorgenommen.

### **3.7. Immunhistochemische Färbungen**

#### **3.7.1. Grundlage der Avidin-Biotin-Komplex-Methode**

Alle nachfolgend beschriebenen immunhistochemischen Färbungen wurden mit der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode durchgeführt. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper wird bei der ABC-Methode ein biotinylierter, gegen den Erstantikörper gerichteter Zweitantikörper aufgetragen. Ein anschliessend zugegebener Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bindet aufgrund der starken Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Zweitantikörper an. Die Peroxidase im Avidin-Biotin-Komplex katalysiert enzymatisch eine Farbreaktion. Als Substrat für diese Farbreaktion dient 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), ein Elektronendonator, der sich durch Oxidation in ein rotes Reaktionsprodukt umwandelt.

Um ein Abschwimmen der Schnitte während des Färbevorganges zu verhindern, wurden alle für immunhistochemische Färbungen vorgesehenen

Präparate auf spezielle Deckgläschen aufgebracht, die zuvor mit L-Polylysin beschichtet worden waren.

### **3.7.2. $\alpha$ -Aktin-Biotin-Avidin-Methode am Paraffinschnitt**

Primärantikörper: Der hier benutzte monoklonale Antikörper **Anti- $\alpha$ -SM-Aktin** (Firma Renner, Dannstadt) ist spezifisch gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin gerichtet.

### **3.8. Auswertung der Präparate**

Alle Schnitte wurden blind ausgewertet. Die Zellzählungen bei der quantitativen Auswertung sowie die morphometrischen Messungen wurden von mehreren unabhängigen Untersuchern - wiederum blind - nachkontrolliert.

#### **3.8.1. Histologisch-morphologische Auswertung**

Alle Präparate wurden auf Veränderungen untersucht, die möglicherweise durch die Ballondilatation und die Anwendung der Stents verursacht wurden. Besonderes Augenmerk richtete sich auf Intimaverletzungen, Thrombozytenaggregate, Dissektionen, Zellkernnekrosen, Schädigungen der Lamina elastica interna, Mediaveränderungen und Einblutungen in die Adventitia.

Zur Auswertung der Schnitte wurden Hämalaun-Eosin- und Elastica-Van-Gieson-gefärbte Schnitte herangezogen.

### 3.8.2. Morphometrische Daten

Zur Gewinnung morphometrischer Daten wurde eine computerunterstützte Morphometrie-einrichtung verwendet (Mikroskop der Firma Olympus, Hamburg, digitalisierte Unterlage von Summagraphics Inc., Seymour, USA). Ein auf der digitalisierten Unterlage angebrachter Cursor projiziert sich über einen Seitentubus am Mikroskop auf die histologischen Präparate; sodann werden luminaler Endothelabschluss, Lamina elastica interna und externa manuell mit dem Cursor abgefahren. Über die digitalisierte Unterlage werden die Bewegungen des Cursors vom Computer aufgenommen und die von den jeweiligen Umfängen begrenzten Flächen bestimmt. Mittels einer Spezial-Software von Bilaney Consulting, Düsseldorf, wurden dann folgende Parameter bestimmt: Fläche des Lumens, Intimafläche, Stenosegrad, maximale Dicke der Intima, Mediafläche und maximale Dicke der Media.

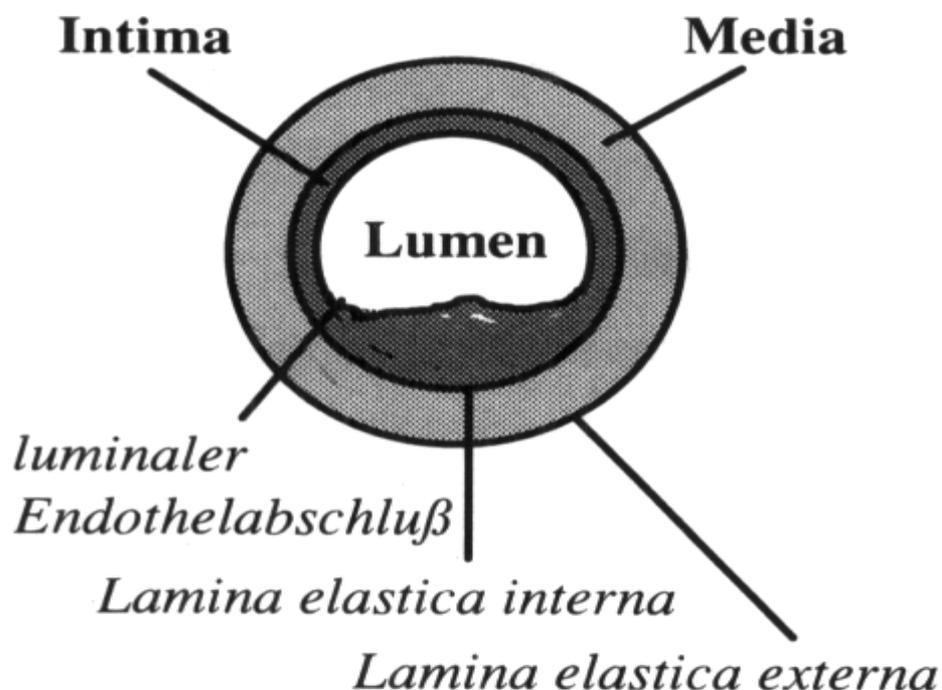
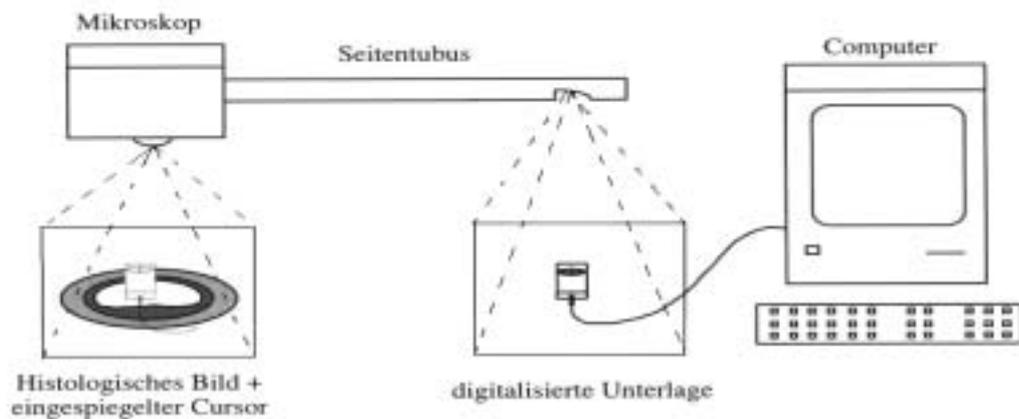


Abb. 10: Schematische Zeichnung eines Gefäßquerschnittes mit den notwendigen Strukturen zur Gewinnung morphometrischer Daten.



**Abb. 11: Schematisierte Wiedergabe der Morphometrie-Einrichtung**

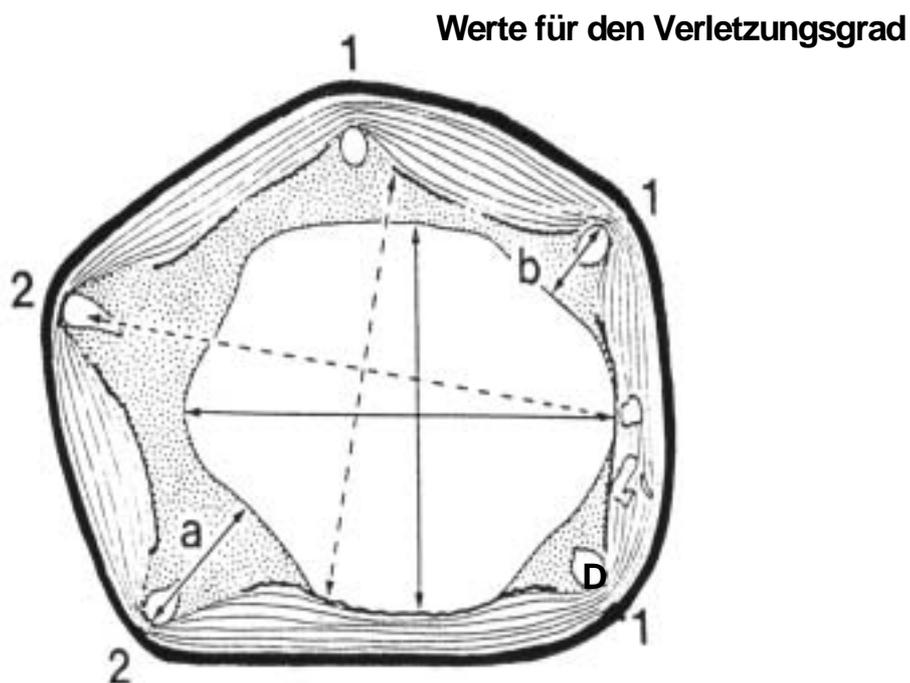
Jedes der Segmente einer Arterie wurde im Abstand von 5 mm untersucht, um den Bereich zu bestimmen, welcher die größte Einengung des Lumens zeigte, die durch den Stent entstanden war. Dasjenige Segment, das die größte Lumenstenose zeigte, wurde verwendet, um alle Messungen zu machen. Das Mikroskop mit kalibriertem Zählnetz wurde benutzt, um die größeren und kleineren Achsen, sowohl des originalen als auch des stenotischen (übriggebliebenen) Gefäßlumens zu messen.

Der Querschnitt jedes Lumens (original und stenotisch) wurde mit einer digitalen mikroskopischen Planimetrie gemessen, unter der Verwendung einer kalibrierten Software. Das Originallumen wurde mit der Planimetrie als derjenige Bereich gemessen, welcher sich innerhalb der Lamina elastica interna befindet, und das stenotische Lumen als das übriggebliebene Lumen der Arterie. Die Neointima ist die Differenz zwischen dem originalen und dem stenotischen Lumen (originale Fläche - stenotische Fläche).

Die stenotische Fläche in Prozent wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Stenose in \%} = 100 \times (1 - [\text{stenosierte Lumenfläche} / \text{originale Lumenfläche}])$$

Die quantitative Schwere der Gefäßverletzung und neointimale Reaktion wurden anhand der Elastica-van-Gieson-Färbung wie folgt berechnet.



- Abb. 12 :**
- **Schematische Zeichnung über die Messung im Gefäßquerschnitt**
  - **Durchbrochene Linienachse: Originallumen**
  - **Durchgehende Linienachse: Restlumen**
  - **Werte für den Verletzungsgrad sind außerhalb des Gefäßes als Zahlen angegeben.**
  - **a und b: Neointimadicke für die Drähte 3 und 5 (Zählung der Drähte erfolgt von oben ab gegen den Uhrzeigersinn)**
  - **D: Stentdraht**

Die Gefäßverletzung an jedem Draht wurde bestimmt durch die anatomische Arterienstruktur, die durch jeweils einen Draht penetriert wurde. Dem Gefäßverletzungsgrad entsprechend wurde eine numerische Bewertung durchgeführt. Die Werte variieren zwischen 0 (= geringste Gefäßverletzung)

und 3 (= größte Gefäßverletzung), wie aus der folgenden Tabelle (3) ersichtlich ist.

**Tab. 3: Bewertung des Verletzungsgrades des Gefäßes**

Wert	Beschreibung der Verletzung
0	Lamina elastica interna intakt; Endothel durchbrochen; Media komprimiert.
1	Lamina elastica interna durchbrochen; Media typischerweise komprimiert.
2	Lamina elastica interna durchbrochen; Media deutlich zerfetzt; Lamina elastica externa intakt, aber komprimiert.
3	Lamina elastica externa durchbrochen; typische flächenhafte Verletzungen der Media, die über die Lamina elastica externa hinausreichen. Stentdraht manchmal in die Adventitia verschoben.

Die neointimale Dicke an jedem Draht wurde, wie schematisch in Abbildung 12 dargestellt, gemessen.

Statistische Methoden: Der arterielle Verletzungsgrad für jedes stenotische Segment wurde berechnet als der mittlere Verletzungsgrad, der durch alle Drähte der Spirale in diesem Segment verursacht wird.

Mittlerer	Summe des Verletzungsgrades für alle Drähte
	= $\frac{\text{-----}}{\text{-----}}$
Verletzungsgrad	Anzahl der Drähte des Stents

Die mittlere neointimale Dicke für alle Drähte in diesem Schnitt wurde als der Index der Verletzungsreaktion verwendet. Zum Beispiel sind im arteriellen

Segment, in Abbildung (12), 5 Drähte vorhanden (die Zahl der Drähte ist abhängig von der Art des histologischen Schnittes der Gefäße, da ein geflochtener Stent benutzt wurde). Die Gefäßverletzungsgrad wird somit wie im Tabelle 4 berechnet.

Für jedes der 24 arteriellen Segmente in dieser Studie wurden somit folgende Werte aufgestellt:

- (1) Mittlerer Verletzungsgrad
- (2) Mittlere Dicke der neointimalen Reaktion
- (3) Totale neointimale Stenose
- (4) Totale neointimale Stenose in Prozent

**Tab. 4: Beispiel für die Berechnung des mittleren Verletzungsgrades.**

VERLETZUNGSGRAD DER EINZELNEN DRÄHTE EINES STENTS				
DRAHT 1	DRAHT 2	DRAHT 3	DRAHT 4	DRAHT 5
2	1	1	1	2
Mittlerer Verletzungsgrad	$7 : 5 = 1,4$			

### **3.9. Statistik**

Aus den ermittelten Einzelwerten der Tiere wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die morphometrischen Ergebnisse aus Kontroll- und Interventionsgruppe wurden mittels Wilcoxon-Test auf statistische Unterschiede untersucht. Der Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben, auch als Mann-Whitney-U-Test bekannt, prüft durch Rangreihenbildung die Verteilung der Stichproben, wenn die Bedingungen des t-Tests (Normalverteilung und gleiche Varianz) nicht sicher erfüllt sind. Als Signifikanzgrenze wurde  $p < 0,05$  gewählt.

Außerdem wurde nach der von SCHWARTZ et al. (1990) publizierten Methode eine Covarianzanalyse durchgeführt, welche die Beziehung zwischen Verletzungsindex und der Neointimadicke, dem Stenosegrad und der Neointima- bzw. Mediafläche berücksichtigt. Zur Veranschaulichung wurde eine Regressionsgerade mit 95% Konfidenzgrenzen erstellt (Software: SAS Institute, North Carolina, USA).

Die Covarianzanalyse berücksichtigt neben der eigentlichen Zielgröße, also dem Maß für die abgelaufene Proliferation, auch eine zusätzlich bestehende Einflußgröße wie sie die Verletzungsintensität darstellt. Diese Vorgehensweise erlaubt eine genaue und jedem Gefäßschnitt individuell angepaßte Auswertung der Daten.

In die morphometrische Auswertung kamen 14 Tiere der Kontrollgruppe, in der Paclitaxelgruppe wurden 10 Tiere ausgewertet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Technische Ergebnisse**

#### **Kontrollgruppe (14 Tiere):**

Bei 11 Tieren konnte der Doppelballon-Katheter problemlos plaziert werden. Bei einem Tier kam es zu Schwierigkeiten, da nach Entfernung des Führungsdrahtes keine Lageveränderung mehr möglich war und aus diesem Grund der Doppelballon-Katheter gewechselt werden mußte. Keinerlei Schwierigkeiten traten im Rahmen der Inflation und Deflation der Doppelballon-Katheter auf. Alle Ballons konnten den definierten Druck halten. Weder mit den verwendeten Druckpumpen, noch bei Applikation der Paclitaxellösung waren Probleme zu verzeichnen. Bei insgesamt zwei Tieren kam es im Rahmen der Plazierung des Führungsdrahtes zum Austreten des Führungsdrahtes im Bereich der proximalen Perfusionsöffnungen. Bei beiden Tieren gelang jedoch die korrekte Replazierung.

#### **Paclitaxelgruppe (10 Tiere) :**

Die Hälfte der Tiere zeigte deutliche Ischämiezeichen im Rahmen der lokalen Applikation. Diese Veränderungen waren aber nach Deflation des Doppelballon-Katheters komplett reversibel.

Insgesamt 5 Tiere zeigten nach der lokalen Applikation eine Unschärfe im Bereich des distalen Applikationsballons. 1 Tier zeigte eine ausgedehnte Dissektion im Bereich des gesamten Dilatationsareals. Alle Tiere zeigten jedoch einen TIMI 3 Fluß (normale Koronarfluß-Verhältnisse). Bei allen Tieren konnte der Stent problemlos plaziert werden.

Nach der Stentimplantation entwickelten insgesamt 4 Tiere einen vorübergehenden, auf 0,1 mg i.c.-Nitroglycerin ansprechenden Spasmus im

peripheren Gefäßanteil. Bei einem Tier kam es im Rahmen dieses Spasmus zu Kammerflimmern, es konnte erfolgreich reanimiert werden.

Bei einem weiteren Tier kam es im Rahmen dieses Spasmus zum distalen Gefäßverschluß.

## **4.2. Ergebnisse der histologisch-morphometrischen Auswertung**

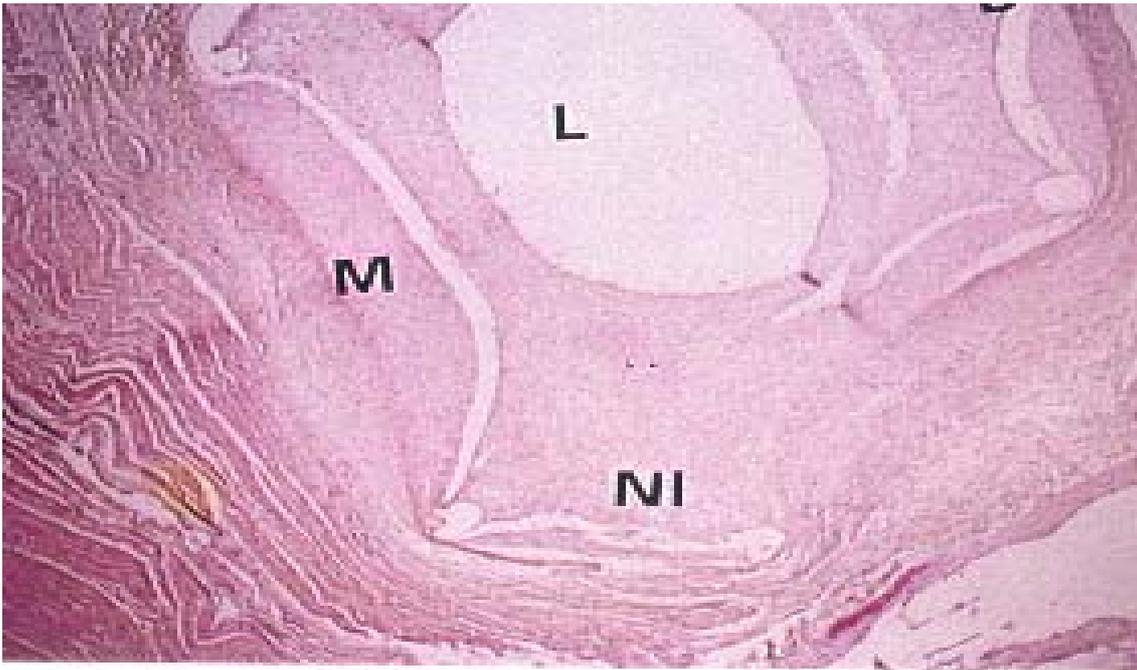
Bei einem Tier aus der Kontrollgruppe konnten Artefaktbildung, Intima, Lamina elastica interna, Media und Lamina elastica externa wegen eines okklusiven Thrombus bei der histologischen Befundung nicht ausgewertet werden (siehe Tab. 7). Ebenso konnte bei einem Tier der Paclitaxelgruppe die Lamina elastica interna, Media und Lamina elastica externa wegen eines gefäßverschließenden Thrombus nicht ausgewertet werden.

### **4.2.1. Histologische Ergebnisse**

#### **4.2.1.1. Stententfaltung**

28 Tage nach der Stentimplantation wurden die Tiere eingeschläfert. Bei 13 Tieren der Kontrollgruppe ohne die lokale Applikation von Paclitaxel war die Stententfaltung gut, in einem Fall war die Entfaltung des Stents unsymmetrisch (siehe Tab. 7).

Bei den Tieren der Paclitaxelgruppe (10 Tiere) war die Stententfaltung bei 7 Tieren gut (siehe Tab. 6). Bei dem Versuchstier P2, war die Media leicht komprimiert, und bei dem Versuchstier P4, verlief die Stententfaltung unsymmetrisch bis in die Lamina elastica externa. Auch bei dem Versuchstier P6 war die Stententfaltung bis in die Adventitia unsymmetrisch.



**Abb. 13:** Gefäßquerschnitt 28 Tage nach Stentimplantation bei einem Tier der Kontrollgruppe (Färbung: Hämalaun-Eosin, Vergrößerung: 90 fach). Die Proliferation der Neointima ist deutlich zu erkennen, sowie die Zerstörung der Lamina elastica interna durch die Stentimplantation. A: Artefakt; L: Lumen; NI: Neointima; M: Media; D: Draht des Stent.

#### 4.2.1.2. Artefaktbildung

Die Artefaktbildung durch die histologische Aufarbeitung war bei 9 Tieren der Kontrollgruppe (n=13) stark und bei 4 Tieren nur leicht ausgeprägt (siehe Tab. 7).

In der Paclitaxelgruppe war bei 8 Tieren eine Artefaktbildung stark bis sehr stark und bei den restlichen 2 Tieren nur geringgradig ausgeprägt (siehe Tab. 6).

#### **4.2.1.3. Intima**

Die Intima war bei 7 Tieren der Kontrollgruppe (n=13) konzentrisch und bei 6 Tieren exzentrisch proliferiert.

Bei der Paclitaxelgruppe war die Intima bei 7 Tieren konzentrisch proliferiert. Bei den restlichen 3 Tieren war die Intima exzentrisch proliferiert.

#### **4.2.1.4. Lamina elastica interna**

Die Fragmentierung der Lamina elastica interna innerhalb der Kontrollgruppe betrug bei 11 Tieren 10 bis 50 %. Nur bei 2 Tieren stellte sich die Lamina elastica interna intakt dar und somit unfragmentiert. (siehe Tab. 7).

Bei der Paclitaxelgruppe war die Lamina elastica interna bei 2 Tieren intakt. Eine Fragmentierung fand sich bei 6 Tieren, wobei ein Fragmentierungsgrad von 10 bis 50 % erreicht wurde. Das Gefäß eines Tieres der Paclitaxelgruppe war im Bereich des Stents fragmentiert, aber ansonsten war die Lamina elastica interna intakt (siehe Tab. 6).

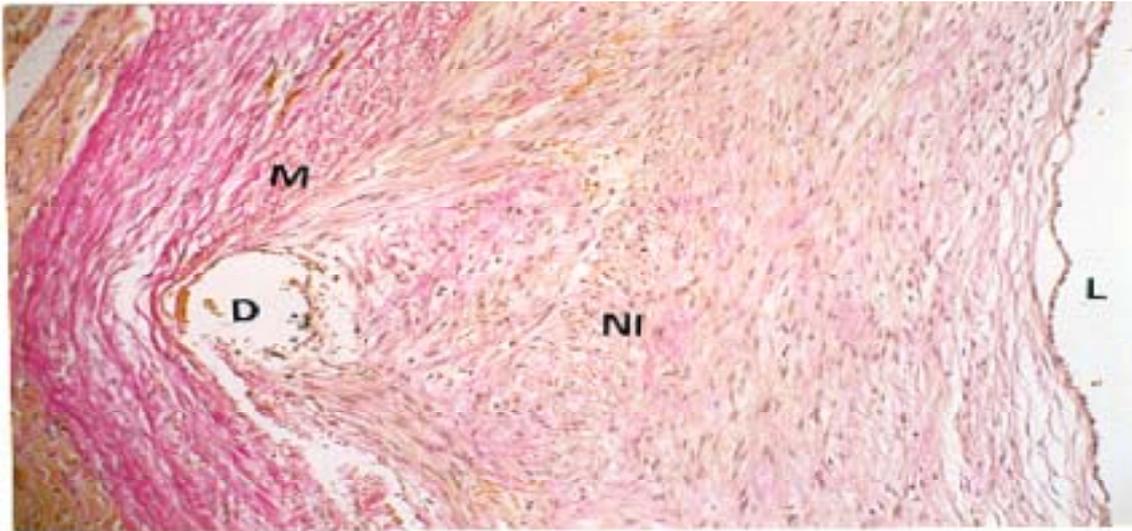


**Abb. 14:** Gefäßquerschnitt bei einem Tier der Paclitaxelgruppe 28 Tage nach lokaler Applikation von 10 ml Paclitaxel mit 1 bar Injektionsdruck. (Färbung: Elastica-Van-Gieson, Vergrößerung: 90 fach). Zu erkennen ist das konzentrische Proliferat mit Komprimierung der Media durch die Stentdrähte. A: Artefakt; L: Lumen; NI: Neointima; M: Media; D: Draht des Stent

#### 4.2.1.5. Media

Bei 5 Tieren der Kontrollgruppe war die Media normal strukturiert, bei 5 Tieren war die Media im Bereich der Lamina elastica interna fragmentiert und bei einem Tier sogar vollständig aufgelöst (siehe Tab. 6). Bei 2 Tieren war die Media zu ca. 35 % nicht abgrenzbar und zu 30 % aufgelöst.

Bei 6 Tieren der Paclitaxelgruppe war die Media im Bereich der Stents komprimiert bzw. durchbrochen. Geringe Alterationen zeigten dagegen die anderen 3 Tiere der Paclitaxelgruppe auf, zum Teil mit Dissektionen und Einblutungen behaftet (siehe Tab. 6).

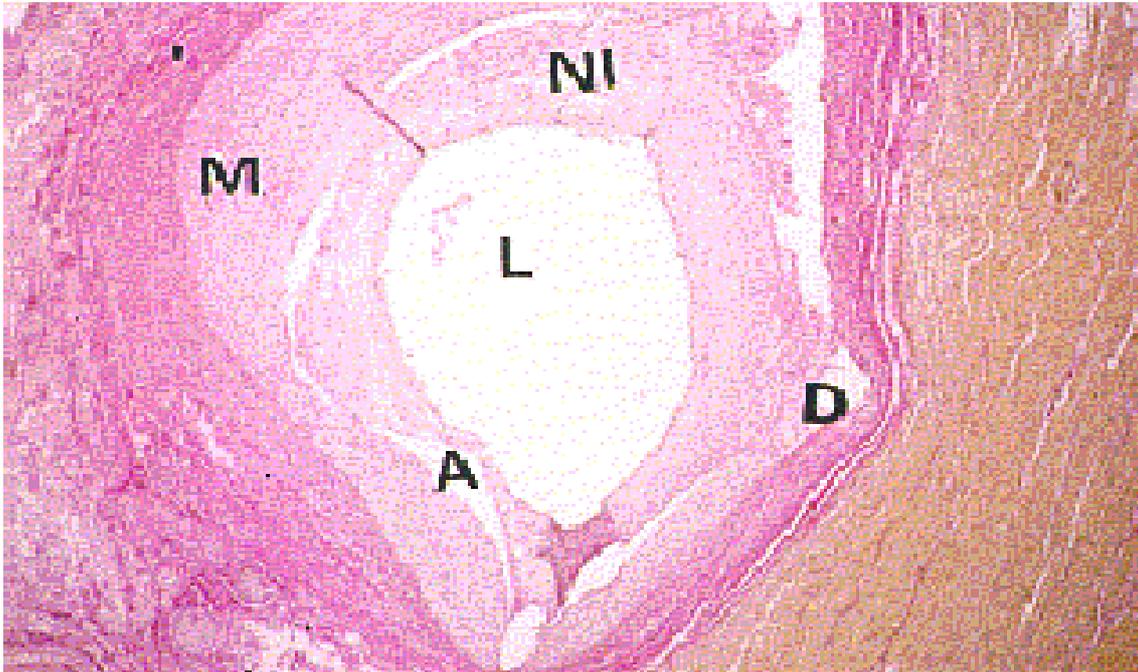


**Abb. 15:** Vergrößerung eines Gefäßquerschnitts bei einem Tier der Paclitaxelgruppe 28 Tage nach lokaler Applikation von 10 ml Paclitaxel mit 1 bar Injektionsdruck (Färbung: Elastica-Van-Gieson, Vergrößerung: 90 fach). Deutliche Zunahme der Neointima-Bildung und Komprimierung der Media. L: Lumen; NI: Neointima; M: Media; D: Draht des Stent.

#### 4.2.1.6. Lamina elastica externa

Bei 10 Tieren der Kontrollgruppe war die Lamina elastica externa intakt. Bei den restlichen 3 auswertbaren Tieren war diese massiv zelldurchsetzt, wobei 1 Tier davon eine 10 %-ige Auflockerung der Adventitia aufwies (siehe Tab. 7).

Bei der Paclitaxelgruppe war die Lamina elastica externa bei 6 Tieren intakt, bei 2 Tieren lediglich punktuell durchbrochen, bzw. auffällig verdickt und zellreich. Die Lamina elastica externa war auch bei einem weiteren Tier intakt, aber im Bereich eines Stents befand sich eine Zellnekrose (siehe Tab. 6).



**Abb. 16:** Vergrößerung eines Gefäßquerschnittes bei einem Tier der Paclitaxelgruppe 28 Tage nach lokaler Applikation von Paclitaxel 10 ml mit 1 bar Injektionsdruck (Färbung: Elastica-Van-Gieson, Vergrößerung: 90 fach). Konzentrisches Proliferat mit Komprimierung der Media bei unsymmetrischer Entfaltung des Stents. A: Artefakt; L: Lumen; NI: Neointima; M: Media; D: Draht des Stent.

#### 4.2.1.7 Ergebnisse des immun-histochemischen Alpha-Aktin-Nachweises

Mit dem immunhistologischen Nachweis von glattmuskulärem Alpha-Aktin konnte bei allen Tieren gezeigt werden, dass es sich bei den proliferierenden Zellen vorwiegend um glatte Gefäßwand-Muskelzellen handelte.

### **4.3. Ergebnisse der Auswertung der morphometrischen Daten**

#### **4.3.1. Lumenfläche**

Die Meßergebnisse der Lumenfläche wurden gegen den Verletzungsindex aufgetragen und die Werte der Kontrollgruppe mit den Werten der Paclitaxelgruppe verglichen.

Die Lumenfläche (siehe Tab. 8 Teil 1 und Tab. 9 Teil 1) ergab keinen relevanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Paclitaxelgruppe, (Kontrollgruppe :  $2,52 \pm 0,88 \text{ mm}^2$ ; Paclitaxelgruppe :  $2,55 \pm 1,40 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,301$ ).

### 4.3.2. Neointimadicke

Von den Gefäßabschnitten wurde an jedem Stentdraht ein Neointimadicke-einzelwert erhoben und daraus der Gefäßmittelwert berechnet. Die Anzahl der Einzelwerte war abhängig von der Schnittebene und der Stententfaltung und bewegte sich zwischen 3 und 7 Stentdrähten pro Gefäßschnitt.

Die Mittelwerte der Neointimadicke (y) wurden gegen den Verletzungsindex (x) aufgetragen und die Paclitaxelgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Der Verlauf der Regressionsgeraden für die Mittelwerte der Neointimadicke zeigt keine relevante Reduktion des Zielwerts nach lokaler Applikation von Paclitaxel (siehe Tab. 8 Teil 2 und Tab. 9 Teil 2). (Kontrollgruppe :  $0,74 \pm 0,25$  mm ; Paclitaxelgruppe:  $0,94 \pm 0,50$  mm,  $p = 0,513$ ). Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden lag für die Kontrollgruppe bei  $r^2=0,6177$  und für die Paclitaxelgruppe bei  $r^2=0,6955$ .

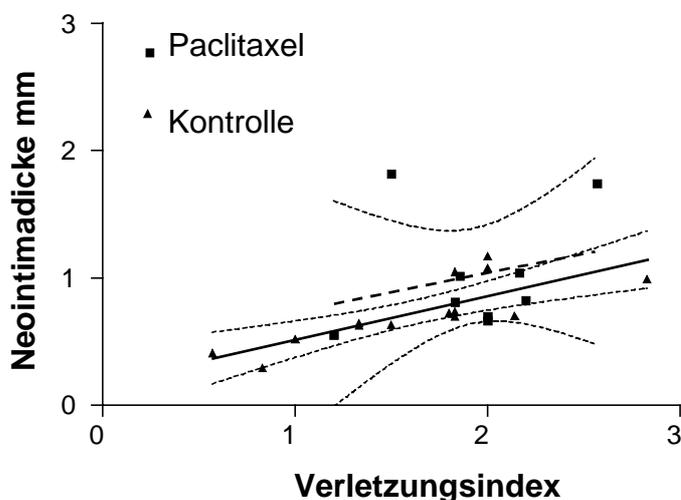


Abb. 17: Beziehung zwischen Neointimadicke und Verletzungsindex; Regressionsgeraden für Paclitaxelgruppe (gestrichelte Linie) und Kontrollgruppe (durchgezogene Linie) mit 95% Konfidenzgrenzen (gepunktete Linien).

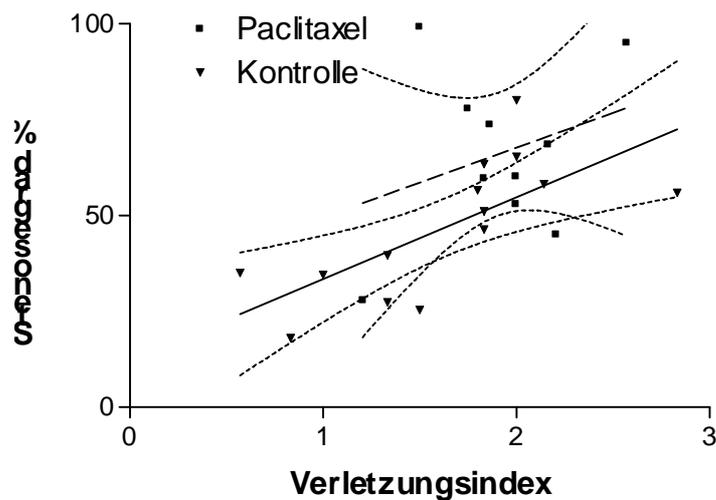
### 4.3.3 Grad der Stenose

Der Grad der Stenose wird nach der Formel

$$\frac{\text{Neointimafläche}}{(\text{Neointimafläche} + \text{Lumenfläche})} \times 100$$

berechnet.

Die Covarianzanalyse ergab keinen relevanten Unterschied der Gruppen (Kontrollgruppe :  $46,90 \pm 17,01$  %; Paclitaxelgruppe :  $65,99 \pm 21,82$  %,  $p = 0,203$ , siehe Tab. 8 Teil 2 und Tab. 9 Teil 2). Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden lag bei  $r^2=0,6081$  in der Kontrollgruppe, und  $r^2=0,1268$  in der Paclitaxelgruppe.



**Abb. 18:** Beziehung zwischen Stenosegrad und Verletzungsindex; Regressionsgeraden für Paclitaxelgruppe (gestrichelte Linie) und Kontrollgruppe (durchgezogene Linie) mit 95% Konfidenzgrenzen (gepunktete Linien).

#### 4.3.4 Neointima-Gesamtfläche

In gleicher Art und Weise wurden auch die Meßergebnisse der Neointima-Gesamtfläche gegen den Verletzungsindex aufgetragen und die Kontrollgruppe mit der Paclitaxelgruppe verglichen.

Das Ausmaß der Neointima-Gesamtfläche ergab einen Unterschied zu ungunsten des Paclitaxel zwischen Kontrollgruppe und Paclitaxelgruppe (Kontrollgruppe :  $0,57 \pm 0,11 \text{ mm}^2$ ; Paclitaxelgruppe :  $1,55 \pm 0,91 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,042$ , siehe Tab. 8 Teil 2 und Tab. 9 Teil 2). Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden lag bei  $r^2=0,2345$  in der Kontrollgruppe, und  $r^2=0,2967$  in der Paclitaxelgruppe.

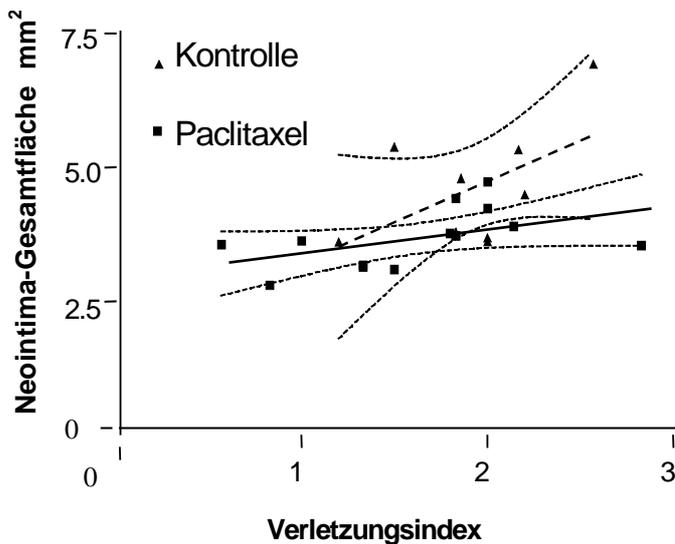


Abb. 19: Beziehung zwischen Neointima-Gesamtfläche und Verletzungsindex; Regressionsgeraden für Paclitaxelgruppe (gestrichelte Linie) und Kontrollgruppe (durchgezogene Linie) mit 95% Konfidenzgrenzen (gepunktete Linien).

#### 4.3.5. Mediafläche

Die ermittelten Werte der Mediafläche wurden gegen den Verletzungsindex aufgetragen und die Paclitaxelgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Nach lokaler Applikation von Paclitaxel fand sich eine signifikante Zunahme der Mediafläche (Kontrollgruppe :  $1,61 \pm 0,37 \text{ mm}^2$ ; Paclitaxelgruppe :  $3,33 \pm 2,31 \text{ mm}^2$  ,  $p = 0,003$ , siehe Tab. 8 Teil 1 und Tab. 9 Teil 1). Diese Zunahme der Media äußert sich deutlicher bei Verletzungsgrad 1 als bei Verletzungsgrad 2 und 3 (siehe Abb. 20). Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade lag bei  $r^2=0,005749$  in der Kontrollgruppe und  $r^2=0,2948$  in der Paclitaxelgruppe.

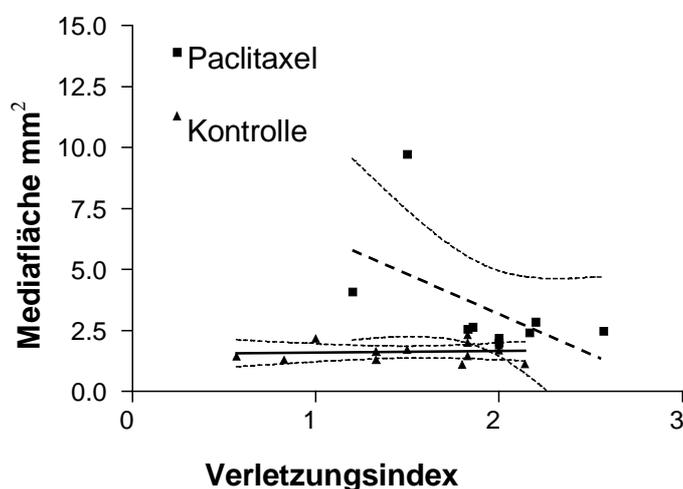


Abb. 20: Beziehung zwischen Mediafläche und Verletzungsindex; Regressionsgeraden für Paclitaxelgruppe (gestrichelte Linie) und Kontrollgruppe (durchgezogene Linie) mit 95% Konfidenzgrenzen (gepunktete Linien).

## 5. Diskussion

Die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen ist auch im Bereich der Koronarangioplastie ein viel diskutiertes Problem. Dies ist einer der Hauptgründe für die seit einiger Zeit verstärkte Suche nach Alternativen zum Tierversuch. So haben Forschungen an menschlichen Zellkulturen in den letzten Jahren einen kräftigen Aufschwung erfahren. Durch eindrucksvolle Verbesserungen auf diesem Gebiet ist es heute möglich geworden, verschiedene Zelllinien zu kokultivieren, ja sogar in Ansätzen eine arteriosklerotische Plaque in vitro zu imitieren (BAIM 1992). Auch das hier verwendete Paclitaxel wurde in umfangreichen Zellkulturversuchen auf seine Löslichkeit, Gewebeerträglichkeit und Toxizität sowie seine antiproliferative Wirksamkeit getestet.

Die lokale Applikation von Paclitaxel bei den menschlichen Zellkulturen führte zu einer reduzierten Neointimabildung und damit insgesamt zu einer Erweiterung des Lumens nach dem Eingriff. Somit konnte die Anwendung von Paclitaxel eine vielversprechende Methode für die Reduktion der Restenose nach PTCA sein (SERRUYS 1991, AXEL et al. 1997).

Erste Versuche mit der lokalen Anwendung von Paclitaxel wurden zur Dosisfindung bereits an Kaninchen und an isolierten Schweinenherzen durchgeführt. Nach der Applikation von 10 ml radioaktiv markiertem Paclitaxel (10 mmol/l) mit dem Doppelballon-Katheter verblieben 2,19 % der ursprünglich verabreichten Dosis in der Gefäßwand. Die Effektivität der Applikation der Kombination eines lipophilen Wirkstoffes mit dieser passiven Verabreichungsmethode ist 10 - 20 mal höher als im Vergleich zu einer früheren Studie mit einer hydrophilen Substanz [lokale Applikation von low molecular weight heparin (LMWH) mit dem porösen Ballonkatheter] (HERDEG et al. 1997a,b, 1999). Variierte man die Initialdosis zwischen 2 ml und 10 ml mit Injektionsdruck über 2 bar, änderte sich die absolute Menge des Wirkstoffes in der Gefäßwand proportional zur verabreichten Dosis, während der Prozentsatz

der Initialdosis (der in der Gefäßwand detektiert wurde) konstant über 2 % lag. Es konnten keine Schwellenwerte und Sättigungseffekte in diesem Dosierungsbereich beobachtet werden (BAUMBACH et al. 1999).

Im Unterschied zur aktiven lokalen Medikamentenverabreichungsform mit einer Endothel-zerreißenden Wirkungsweise (d.h. poröser Ballon-Katheter), wird die Wirkstoffmenge bei Anwendung des Doppelballon-Katheters, die hier durch druckbetriebene Flüssigkeitsaufnahme in die Gefäßwand zustande kommt, nicht durch lokale Verletzungen begrenzt (HERDEG et al. 1997a, b, 1999, BAUMBACH et al. 1999). Deshalb besteht die Hauptbeschränkung für die Wirkstoffmenge in den möglichen Nebenwirkungen von Paclitaxel.

Bei weitere Untersuchungen am Kaninchen wurden positive Effekte des Paclitaxel nach Plaque-Induktion und Ballon-Angioplastie festgestellt:

Nachdem durch Elektrostimulation in der rechten Arteria carotis von 66 Neuseeland-Kaninchen eine definierte Plaque induziert worden war, wurden 27 Tiere einer Ballondilatation und anschließend einer lokalen Paclitaxelapplikation (10 ml, 10 mmol/l) mittels eines Doppelballon-Katheters unterzogen. 29 Tiere dienten zur Kontrolle, indem sie nur angioplastiert wurden und die restlichen 10 Tiere blieben ausschließlich elektrostimuliert. Die Gefäße wurden 1, 4 und 8 Wochen nach der Intervention exzidiert. Die Immunhistochemie fand mit Antikörpern gegen Bromodesoxyuridin,  $\alpha$ -SM-Aktin, Makrophagen, von Willebrand-Faktor und  $\alpha$ -Tubulin statt. Veränderungen im Zytoskelett konnten elektronenmikroskopisch analysiert werden. Verglichen mit den Kontrolltieren (43,1 % acht Wochen nach Intervention, ( $p < 0,003$ )), nahm das Ausmaß der Stenose bei den mit Paclitaxel behandelten Tieren nur leicht zu (14,6 % nach einer Woche, 20,5 % nach acht Wochen). Verglichen mit den Kontrolltieren konnte ein deutlich weiteres Lumen zu jeder Zeit beobachtet werden (Lumenfläche nach 8 Wochen bei der Paclitaxelgruppe:  $0,754 \text{ mm}^2$ , bei Kontrollgruppe:  $0,417 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,004$ ). Färbungen der Mikrotubuli und die Elektronenmikroskopie zeigten Veränderungen der Mikrotubuli, die nur auf die

Intima begrenzt waren. Die Fähigkeit zur Vasokontraktilität nach der Paclitaxelbehandlung war deutlich vermindert (HERDEG et al. 1997 b, 1999).

Die spezifische Wirkung von Paclitaxel auf das Zytoskelett von Gefäßzellen läßt sich durch Färbung der Mikrotubuli und durch Elektronenmikroskopie nachweisen. Bei Paclitaxel behandelten Tieren (Kaninchen) zeigte die Färbung der Tubuli eine Zunahme an Fluoreszenzintensität, die auf eine Veränderung der Anhäufung der Mikrotubuli hindeutet. Dies war der Grund für weitere Untersuchungen der Wirkung von Paclitaxel auf die Gefäßwand mittels Elektronenmikroskopie. Tatsächlich konnten parallele Mikrotubuli-Bündel in den Zellen der glatten Muskulatur entdeckt werden, die einer lokalen Behandlung mit Paclitaxel unterzogen wurden (HERDEG et al. 1999). Es konnte schon früher gezeigt werden, daß diese parallel angeordneten Mikrotubuli-Bündel eine typische paclitaxelinduzierte Modifikation in der Mikrotubulusanordnung sind. Veränderungen dieser Art konnten bei den Kontrolltieren zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden (HERDEG et al. 1997 b). Die biologische Bedeutung dieser strukturellen Veränderungen wurden quantitativ in verschiedenen Interventionsgruppen erfaßt. Die morphologische Beobachtung des veränderten Zytoskeletts innerhalb der glatten Muskelzellen in der Neointima korreliert recht gut mit der signifikant reduzierten intimalen Proliferation zu einem frühen Zeitpunkt nach der Intervention bei Paclitaxel-behandelten Tieren (HERDEG et al. 1997 a, 1999).

Allerdings wird die Stenose nicht nur durch die neointimale Proliferation bedingt, sondern ebenso durch die Reduktion des residualen Lumens. Nach der lokalen Paclitaxelapplikation waren die Lumenfläche und der Querschnitt des gesamten Gefäßes immer größer als bei den Kontrolltieren (HERDEG et al. 1999). Theoretisch könnte dies durch einen zusätzlichen Dilatationseffekt der applizierten Flüssigkeit zwischen den beiden Ballons des Doppelballon-Katheters verursacht worden sein. Tatsächlich wurde auch eine Gefäßvergrößerung nach einer das Zytoskelett betreffenden Therapie ebenso von anderen Forschern beobachtet [BIOSTENT] (WILENSKY et al. 1991),

somit tragen die beiden Effekte von Paclitaxel auf die Proliferation und die Gefäßvergrößerung zur Bewahrung der Gefäßform bei und sind wahrscheinlich durch eine strukturelle Veränderung des Zytoskeletts bedingt. Paclitaxel wirkt nicht durch einen rezeptorvermittelten Effekt, und seine zelluläre Aufnahme wird gefördert durch den hochlipophilen Charakter des Wirkstoffes.

Hauptanliegen dieser Arbeit war es deshalb, das Paclitaxel mittels eines neuen interventionellen Systems (Doppelballon-Katheter) nach Einsetzen eines Stents in die Koronararterie lokal zu applizieren, um zu überprüfen, ob dadurch eine Restenose vermindert werden kann. Stents reduzieren den recoil-effect (erneute Lumeneinengung durch die elastischen Kräfte der Gefäßwand) nach Angioplastie. In letzter Zeit werden deshalb zunehmend Stentsysteme eingesetzt. Problematisch können jedoch die durch einen Stent bedingten Komplikationen sein. Dabei müssen vor allem Thrombusbildung, Infektion, chronische Entzündung im Sinne einer Fremdkörperreaktion, Gewebhyperplasie und Intimaproliferation beachtet werden.

Für diese Fragestellung gibt es keine Alternative zum Tierversuch. Die Wirksamkeit und Sicherheit der lokalen Paclitaxel-Therapie mittels Doppelballon-Katheter läßt sich nur in vivo erforschen. Gerade auch im Hinblick auf eine mögliche Anwendung beim Menschen erwachsen deshalb folgende Anforderungen an die Versuchstiere:

1. Das Zielorgan für die Anwendung des Doppelballon-Katheters im Tierversuch sollte dem Zielorgan beim Menschen - der Herzkranzarterie - in Aufbau und Größe möglichst ähnlich sein.
2. Die zu behandelnde arteriosklerotische Grundkrankheit sollte bei Versuchstier und Mensch möglichst vergleichbar sein.

Das Hausschwein erfüllt diese Kriterien nur im ersten Punkt: Die Koronararterie der Tiere ist, wie menschliche Koronarien auch, eine Arterie von muskulärem Typ und etwa gleich groß wie beim menschlichen Herzkranzgefäß. Es müssen keine kleineren Katheter als beim Menschen verwendet werden, so daß auch die Ergebnisse der Versuche mit dem Doppelballon-Katheter auf den Menschen besser übertragbar sind.

Bei der systemischen Anwendung des Paclitaxel zur Krebstherapie sind eine Reihe von toxischen Effekten bekannt. Die Hauptnebenwirkungen sind: hämatologische Toxizität (Neutropenie), Neurotoxizität (periphere Neuropathie) und Überempfindlichkeitsreaktionen. Herzrhythmusstörungen (meistens transiente asymptomatische Bradykardie) wurden ebenfalls beschrieben, allerdings traten all diese Nebenwirkungen bei Patienten auf, die unter einer hochdosierten Chemotherapie bei bösartigen Erkrankungen standen. Die Plasma-Konzentrationen von Paclitaxel bei diesen Patienten waren 100 – 1000-fach höher - und dies über einen längeren Zeitraum - als Plasmakonzentrationen, die aus einer lokalen Paclitaxelapplikation (10 ml, 10 mmol/l) resultierten. Bei einer Meßgrenze von ungefähr 50 nmol/l lag die Plasma-Konzentration nach lokaler Paclitaxelapplikation nicht einmal im meßbaren Bereich (ROWINSKY, et al. 1993). In dieser Studie beim Menschen traten keine der oben erwähnten Nebenwirkungen ein. In der eigenen Arbeit sollte deshalb die Paclitaxelapplikation weniger auf systemische als vielmehr auf lokale Nebenwirkungen in den Koronararterien kontrolliert werden.

### **5.1. Methodik-Histologische Färbungen und Proliferationsnachweis**

Für die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Färbungen haben folgende Überlegungen eine Rolle gespielt:

**Hämalaun-Eosin-Färbung:** HE- gefärbte Präparate sind schnell und einfach anzufertigen. Mit wenig Aufwand lässt sich so ein guter Überblick über die Präparate gewinnen. Alle Schnitte wurden deshalb zuerst mit HE gefärbt.

**Elastica-Van-Gieson-Färbung:** Für die morphometrische Auswertung ist die Elastica-Van-Gieson-Färbung aufgrund der guten Abgrenzbarkeit verschiedener Wandschichten den anderen Färbungen überlegen. Auch zur morphologischen Betrachtung von Wandveränderungen der Gefäße, wie Brüchen der Laminae elasticae oder Schädigungen der Medialamellen, ist diese Färbung besonders geeignet.

**Immunhistologie - Alpha-Aktin-Nachweis:**

Hauptziel bei der Arbeit mit den immunhistochemischen Methoden war, einzelne Zellarten, die bei der proliferativen Antwort nach Ballonangioplastie eine wichtige Rolle spielen, identifizieren und näher charakterisieren zu können. Arterielle, glatte Gefäßwandmuskelzellen exprimieren hauptsächlich Alpha-Aktin (HANKE u. KARSCH 1992, SIMONS et al. 1993). Mit dem immunhistologischen Nachweis von glattmuskulärem Alpha-Aktin konnte so gezeigt werden, dass es sich bei den Zellen der Neointima vorwiegend um glatte Muskelzellen handelt. Dieser Nachweis ist ein etabliertes und bewährtes Verfahren in der Immunhistologie.

Alle oben beschriebenen Färbungen wurden bei jedem Tier an den Präparaten aller Gefäßsegmente durchgeführt. Zusammen mit den neuentwickelten Schnittverfahren und Serienschnitten sowie umfangreichen morphometrischen und quantitativen Messungen wurde so eine möglichst genaue Dokumentation der Auswirkungen der lokaler Therapie angestrebt.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Beitrag auf dem Weg zu einer möglichen neuen Therapieform für den Menschen. In der Entwicklung von der Grundlagenforschung bis zur anwendungsbereiten Therapie steht das Tierexperiment dicht vor der Anwendung beim Menschen. Eingedenk aller Unterschiede und Grenzen tierexperimenteller Arbeit ist es darum unerlässlich, diejenigen Fragen zu stellen, die für eine Erprobung an Menschen von zentraler Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen deshalb nicht nur als Einzelergebnisse, sondern auch unter den Gesichtspunkten der Sicherheit bei der Anwendung und der Wirksamkeit der Therapie diskutiert werden.

### **5.2.1. Sicherheit des Kathetersystems und der lokalen Applikation von Paclitaxel**

Da der Doppelballon-Katheter in der Koronararterie des Schweins eingesetzt wurde, engt sich die Frage nach der Sicherheit auf die Interventionsfolgen für die Gefäßwand und mögliche systemische Wirkungen ein. Bei allen Tieren konnte das Kathetersystem bis auf geringe technische Schwierigkeiten problemlos eingesetzt werden. Nur bei einem Tier kam es im Rahmen der Stentapplikation zu schwerwiegenden Herzrhythmusstörungen. Die lokale Applikation von Paclitaxel ließ keine systemischen Nebenwirkungen erkennen.

### **5.2.2. Histologische Auswertung**

Die histologisch-morphologische Auswertung diente dazu, mögliche interventionsbedingte Veränderungen zu beschreiben. Die Expression von  $\alpha$ -SM-Aktin in der Neointima und Media verdeutlichte das Ausmaß und die Formation der glatten Muskelzellen in den untersuchten Gefäßschnitten. Der Flüssigkeitseinstrom während der lokalen Therapie und die Einwirkung der applizierten Substanzen verursachten keine morphologisch nachweisbaren Schäden der Gefäßstruktur.

Die Auswertung der morphometrischen Ergebnisse fügen sich neben den beschreibenden histologisch-morphologischen und immunhistochemischen Ergebnissen zu einem verständlichen Gesamtbild. Durch die Stentimplantation dominieren die proliferativen und synthetisierenden Restenosemechanismen, so daß die morphometrische Erfassung der Neointima und Media aufschlußreiche und aussagekräftige Ergebnisse liefert. Im besonderen die Lumenfläche, jedoch auch Neointima- und Mediadaten unterliegen möglichen präparationsbedingten Störgrößen, denen aber durch sorgfältige morphologische Betrachtung und ggf. Ausschluß aus der Auswertung Rechnung getragen wurde. Die erhobenen morphometrischen Parameter demonstrieren die bestehende Korrelation zum Verletzungsausmaß, d.h. mit Zunahme der Verletzungsintensität steigen die morphometrischen Größen, welche die Restenose dokumentieren, ebenfalls an. Eine Ausnahme bildet die Mediafläche bei der Versuchsgruppe.

In der eigenen Studie unterschied sich die Reendothelisation nach der Intervention nicht signifikant zwischen Paclitaxel-behandelten Tieren und Kontrolltieren bzw. war in der Versuchsgruppe für einzelne Parameter sogar stärker ausgeprägt. Bevor durch Stentimplantation in den linken Koronararterien von 24 Schweinen eine definierte Plaque induziert worden war, wurden 10 Tiere einer lokalen Paclitaxelapplikation (10 ml, 10 mmol/l, 5 min) mittels eines Doppelballon-Katheters unterzogen, die restlichen 14 Tiere dienten als Kontrollgruppe ohne Behandlung mit Paclitaxel. Die Gefäße wurden 4 Wochen nach der Intervention exzidiert. Verglichen mit den Kontrolltieren (46,90 % acht Wochen nach der Intervention, nahm das Ausmaß der Stenose in den mit Paclitaxel behandelten Tieren eher zu (65,99 %,  $p = 0,203$ ). Es konnte außerdem kein weiteres Lumen als bei den Kontrolltieren beobachtet werden (Lumenfläche nach 8 Wochen bei der Paclitaxelgruppe:  $2,55 \pm 1,40 \text{ mm}^2$ , bei Kontrollgruppe:  $2,52 \pm 0,88 \text{ mm}^2$ ). Während sich die Neointimadicke der Paclitaxel-Gruppe ( $0,94 \pm 0,50 \text{ mm}$ ,  $p = 0,513$ ) ebenfalls nicht von der Kontrollgruppe ( $0,74 \pm 0,25 \text{ mm}$ ) unterschied, war die gesamte Neointimafläche in der Versuchsgruppe sogar signifikant größer ( $1,55 \pm 0,91 \text{ mm}$ ,  $p = 0,042$ ) als

bei den unbehandelten Tieren ( $0,57 \pm 0,11 \text{ mm}^2$ ). Auch bei der Mediafläche fiel die Zunahme in der Paclitaxel-Gruppe signifikant stärker aus als bei der Kontrollgruppe ( $3,33 \pm 2,31 \text{ mm}^2$  bzw.  $1,61 \pm 0,37 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,003$ ) (s. Tab. 8 u. 9, Teil 1 und 2).

Eine mögliche Erklärung für das Versagen der lokalen Paclitaxeltherapie in der eigenen Studie ist die dauerhafte Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen durch die durch den Stent vermittelte Fremdkörperreaktion. Eine Studie von SCHWARTZ et al. (1990) belegt die negative Auswirkung von Stents. In dem Versuch wurde den Tieren nach einer Ballondilatation ein coil-stent implantiert. An 11 behandelten Schweinen konnte ein Stenosegrad mit einem mittleren Wert von  $73,4 \pm 24,4 \%$  und eine Originallumenfläche von  $3,6 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ , sowie ein Lumen von  $0,9 \pm 0,3 \text{ mm}^2$  festgestellt werden. Bei der Kontrollgruppe wurde an 5 Tieren nur eine Ballondilatation durchgeführt. Es konnte ein Stenosegrad mit einem mittleren Wert von  $34,8 \pm 11,3 \%$  und eine Originallumenfläche von  $4,2 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ , sowie ein Lumen von  $0,8 \pm 0,3 \text{ mm}^2$  festgestellt werden. Die Studien sind nicht vollständig vergleichbar, da keine Ballondilatation durchgeführt wurde und unterschiedliche Stents benutzt wurden.

Unklar bleibt in der eigenen Untersuchung die signifikante Zunahme der Mediafläche ( $p = 0,003$ ) nach lokaler Paclitaxeltherapie (siehe Abb. 20). Hypothetisch könnte dies durch eine vermehrte endothelische Durchlässigkeit mit klassischer medialer Ödembildung erklärt werden. Zusätzlich kann aber auch hier das Paclitaxel im verwendeten Stentmodell seine beschriebene positive Wirkung auf die Gefäßwände nicht entfalten.

### 5.3. Schlußbetrachtung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirksamkeit der lokalen Applikation von Paclitaxel durch einen Doppelballon-Katheter bei Stent-Implantation in einem experimentellen Tiermodell auf ihre Machbarkeit, Sicherheit und Wirksamkeit hin zu untersuchen.

Als Versuchstiere dienten Hausschweine, bei denen durch die Stent-Implantation eine arteriosklerotische Plaque in der Koronararterie erzeugt und die Wirksamkeit der lokalen Applikation von Paclitaxel auf die Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand untersucht wurde. Die Erfahrungen mit der lokalen Medikamentenapplikation durch Doppelballon-Katheter im Rahmen einer Stent-Implantation sind sehr gering. Eine der beiden Gruppen in der vorliegenden Arbeit erhielt nach intrakoronarer Stent-Implantation 10 ml Paclitaxel-Lösung (10 mmol/l, 5 min) mit 1 bar Injektionsdruck lokal durch den Ballon-Katheter appliziert. Die Gefäß wurden 28 Tage nach Intervention entnommen und in Paraffin eingebettet. An den histologischen Präparaten wurde zusätzlich zu den Standardfärbungen immunhistochemisch eine Alpha-Aktin:Färbung durchgeführt. Außer der morphometrischen Begutachtung umfaßte die Auswertung noch die morphometrischen Bestimmungen des Proliferationsumfanges.

Es zeigte sich, daß die Stent-Implantation mit einer reaktiven Traumatisierung der Gefäßwand verbunden ist. Anhand der Semidünnschnitte gelang der Nachweis von Gefäßwandveränderungen durch die Stent-Implantation vor allem in der Media.

Die gesamte histomorphometrische Auswertung zeigte keine positive Wirksamkeit der lokalen Applikation von Paclitaxel auf die Neointimabildung nach Stent-Implantation. Im Gegenteil zeigte sich eine Zunahme der Neointimafläche und der Mediafläche zu Ungunsten des Paclitaxel, die Letztere ist möglicherweise auf ein chronisches Ödem zurückzuführen.

Trotz sorgfältigem Festlegen der Interventionsparameter erscheint die einmalige Applikation von Paclitaxel mit dem Schneider-Doppel-Ballon nach Stent-Implantation ein unwirksames Verfahren zur Restenoseprophylaxe zu sein. Zwar ergaben sich keine schädlichen Nebenwirkungen durch das Paclitaxel, jedoch reduzieren die vorliegenden Ergebnisse die Hoffnung, am Menschen die Restenoserate durch die lokale Applikation von Paclitaxel mit dem Doppel-Ballon nach Stent-Implantation zu vermindern. Frühere nach Ballondilatation gewonnene positive Erkenntnisse für das Paclitaxel hinsichtlich einer Proliferationshemmung konnten für die Komplikationen nach Stentimplantation im eigenen Experiment nicht bestätigt werden.

## 6. Zusammenfassung

### **Lokale Applikation von Paclitaxel mit dem Schneider-Doppelballon nach experimenteller Stentimplantation an den Koronararterien des Schweines**

In der obengenannten Arbeit wurde die lokale Applikation von Paclitaxel mittels eines Doppelballon-Katheter in einem experimentellen koronaren Tiermodell auf ihre Durchführbarkeit, Sicherheit und Wirksamkeit im Hinblick auf eine klinische Anwendung untersucht. Als Versuchstiere dienten Hausschweine, bei denen vor einer koronaren Stentimplantation eine lokale Applikation der antiproliferativen Substanz Paclitaxel durchgeführt wurde. **Methode:** Die Tiere erhielten 10 ml (10 mmol/l) einer molaren Paclitaxel-Lösung mit 1 bar Injektionsdruck lokal durch den Doppelballon-Katheter über 5 min appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich eine Stentimplantation. Die Gefäße wurden 28 Tage nach der Intervention entnommen und in Paraffin eingebettet. An den Präparaten wurden zusätzlich zu den histologischen Standardfärbungen eine immunhistochemische Alpha-Actin-Färbung zum Nachweis von glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt. Die Schnitte wurden einer ausführlichen histopathologischen und histomorphometrischen Auswertung zugeführt. **Resultat:** Die Auswertung der histomorphometrischen Ergebnisse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Paclitaxelgruppe und der Kontrollgruppe im Hinblick auf Neointimadicke (Kontrollgruppe :  $0,74 \pm 0,25$  mm, Paclitaxelgruppe:  $0,94 \pm 0,50$  mm,  $p = 0,513$ ), Stenosegrad (Kontrollgruppe:  $46,90 \pm 17,01$  %, Paclitaxelgruppe:  $65,99 \pm 21,82$  %,  $p = 0,203$ ) und Lumenfläche (Kontrollgruppe:  $2,52 \pm 0,88$  mm<sup>2</sup>, Paclitaxelgruppe:  $2,55 \pm 1,40$  mm<sup>2</sup>,  $p = 0,301$ ). Bei der Neointimafläche und der Mediafläche der Versuchstiere zeigte sich sogar eine signifikante Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe. Neointimafläche (Kontrollgruppe:  $0,57 \pm 0,11$  mm<sup>2</sup>, Paclitaxelgruppe:  $1,55 \pm 0,91$  mm<sup>2</sup>,  $P = 0,042$ ), Mediafläche (Kontrollgruppe:  $1,61 \pm 0,37$  mm<sup>2</sup>, Paclitaxelgruppe:  $3,33 \pm 2,31$  mm<sup>2</sup>,  $p = 0,003$ ). **Schlussfolgerung:** Die lokale Eingabe von Paclitaxel war nicht in der Lage, die

von dem Stent ausgehenden ausgeprägten proliferativen Reaktionen zu unterbinden.

## Summary

### Local delivery of Paclitaxel after stent implantation using the perfusion double balloon in a porcine restenosis model

Paclitaxel is a new microtubule stabilizing drug with potent antitumor activity. It influences the cytoskeleton equilibrium by increasing the assembly of stable microtubules and therapy interacts with many cellular functions. The aim of this study was to evaluate the potential of Paclitaxel to prevent restenosis in vivo after intracoronary stent implantation. **Methods:** After local intracoronary delivery of 10 ml Paclitaxel (10 mmol/l) with the double balloon perfusion catheter, tantalum stent were placed in the application area of the left anterior descending artery in 10 pigs. Fourteen pigs served as control with stent implantation only. Vessels were excised 4 week following intervention. Histopathology was performed on all vessels. Morphometric parameters of restenosis and vascular remodeling namely neointimal area (NA), percent area stenosis (PAS), media area (MA), neointimal thickness (NT) and vessel area (EEL) were measured. **Results:** No significant difference to favour Paclitaxel was observed regarding to EEL ( $2.55 \pm 1,40 \text{ mm}^2$ , co.  $2.52 \pm 0,88 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,301$ ), PAS ( $65.99 \pm 21,82 \%$ , co.  $46.90 \pm 17.01 \%$ ,  $p = 0,203$ ) and NT ( $0,94 \pm 0,50 \text{ mm}$ , co.  $0,74 \pm 0,25 \text{ mm}$ ,  $p = 0,513$ ). However, NA ( $1.55 \pm 0.91 \text{ mm}^2$ , co.  $0.57 \pm 0.11 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,042$ ) and MA ( $3,33 \pm 2,31 \text{ mm}^2$ , co.  $1,61 \pm 0,37 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,003$ ) were increased in the Paclitaxel group after stent-implantation in comparison to the control group. **Conclusion:** Local Paclitaxel delivery had no beneficial effect on restenosis after stent-implantation. The lack of efficacy is most probably due to the strong and continuous proliferative action of the metal stent.

## 7. Anhang

Alle Zahlenwerte wurden auf 3 Stellen hinter dem Komma berechnet und gingen so auch in die Statistik ein. Nach Abschluß aller Berechnungen wurden bei der Wiedergabe der Einzelwerte die Absolutzahlen dann als ganze Zahlen gerundet. Die morphometrischen Daten wurden sämtlich in Millimeter bzw. Quadratmillimeter angegeben. Wegen der oft sehr kleinen Zahlen wurden alle Einzelwerte bis auf 3 Stellen hinter dem Komma angegeben. Prozentzahlen wurden – ebenfalls nach Berechnung bis auf 3 Stellen hinter dem Komma – auf 1 Stelle hinter dem Komma gerundet und stehen so in den nachfolgenden Tabellen.

**Tab. 5: Im Tabellenanhang verwendete Abkürzungen.**

LEI	Lamina elastica interna
LEE	Lamina elastica externa
NI-Dicke	Neointima-Dicke
NI-Gesamtfläche	Neointima-Gesamtfläche

Tab. 6: Histologie Paclitaxelgruppe

Tier-Nr.	Stent-Entfaltung	Artefakt-Bildung	Intima	LEI	Media	LEE bzw. Adventitia
1	Gut; Bis zur LEE	Sehr stark	Konzentrisches Proliferat. Reendothelialisiert	im Bereich der Stents rupturiert; sonst intakt	Im Bereich der Stents komprimiert; sonst unauffällig	Intakt
2*	Gut; Media leicht komprimiert	Sehr stark	Exzentrisches Proliferat	Intakt	z. T. im Bereich der Stents komprimiert; sonst unauffällig	LEE an einer Stelle durchbrochen; sonst intakt
3	Gut; bis zur LEE	Leicht	Exzentrisches Proliferat	Ca. 10 % fragmentiert	im Bereich der Stents durchbrochen; sonst unauffällig	Adventitia an einer Stelle auffällig verdickt und zellreich
4	Gut; unsymmetrisch; bis zur LEE	Leicht	Konzentrisches Proliferat. Reendothelialisiert	Ca. 10 % fragmentiert	im Bereich der Stents komprimiert; sonst unauffällig	Intakt
5*	Gut; bis zur Adventitia	Stark	Konzentrisches Proliferat; reendothelialisiert	Intakt	im Bereich der Stents komprimiert; sonst unauffällig	Intakt
6	Gut; unsymmetrisch; meist bis zur Adventitia	Stark	Konzentrisches Proliferat; Reendothelialisiert	Ca. 20 % fragmentiert	Im Bereich der Stents komprimiert; sonst unauffällig	Intakt
7*	Gut	Stark	Konzentrisches Proliferat; Reendothelialisiert	Ca. 30 % fragmentiert	ca. 20 % geschädigt, sonst unauffällig	Intakt
8**	Gut	Stark	Konzentrisches Proliferat; Reendothelialisiert	--	--	--
9	Gut; bis zur Adventitia	Stark	Exzentrisches Proliferat	Ca. 50 % fragmentiert	Zum Teil mit Nekrosen; sonst unauffällig	Intakt; nur im Bereich eines Stents Zellnekrosen
10	Gut	Sehr stark	Konzentrisches Proliferat	Ca. 30 - 40 % fragmentiert	Dissektionen mit Einblutungen; sonst unauffällig	Intakt

\* Im Lumen postmortal entstandener Thrombus

\*\* Gefäßverschießender, zum Teil organisierter Thrombus

Tab. 7: Histologie Kontrollgruppe

Tier-Nr.	Stent-Entfaltung	Artefakt-Bildung	Intima	LEI	Media	LEE bzw. Adventitia
1	Gut	Stark	Konzentrisches Proliferat	< als 10 % fragmentiert	Homogen strukturiert	Intakt
2	Gut	Leicht	Exzentrisches Proliferat	Intakt	Homogen strukturiert	Intakt
3	Gut	Stark	Konzentrisches Proliferat	Ca. 50 % fragmentiert	im Bereich der LEI-Rupturen sehr unruhig	Intakt
4	Gut	Stark	Exzentrisches Proliferat	Ca. 20 % fragmentiert	Gut erhalten	Intakt
5	Gut	Stark	Exzentrisches Proliferat	Ca. 10 % fragmentiert	Gut erhalten	Intakt
6	Gut; unsymmetrisch	Stark	Exzentrisches Proliferat	Ca. 20 – 30 % fragmentiert	im Bereich der LEI-Fragmente aufgelöst	Intakt
7	Gut	Stark	Exzentrisches Proliferat	Ca. 20 % fragmentiert	im Bereich der LEI-Fragmente aufgelöst	Intakt
8*	Gut	--	--	--	--	--
9	Gut	Leicht	Konzentrisches Proliferat	Ca. 50 % fragmentiert	ca. 35 % nicht abgrenzbar	Adventitia zu ca. 10 % aufgelockert
10**	Gut	Leicht	Konzentrisches atypisches Proliferat	Ca. 50 % fragmentiert	Vollständig aufgelöst	Adventitia massiv zelldurchsetzt
11	Gut	Stark	Exzentrisches Proliferat	Unfragmentiert	Homogen strukturiert	Intakt
12	Gut	Stark	Konzentrisches Proliferat	Ca. 30 – 40 % fragmentiert	im Bereich der LEI-Fragmente aufgelöst	Adventitia z. T. massiv zelldurchsetzt
13	Gut	Leicht	Konzentrisches Proliferat	Ca. 50 % fragmentiert	im Bereich der LEI-Fragmente aufgelöst	Überwiegend intakt
14	Gut	Stark	Konzentrisches Proliferat	Ca. 30 % fragmentiert	ca. 30 % aufgelöst	Überwiegend intakt

\* zum Teil reendothelialisierter Thrombus

\*\* schwerste entzündliche Reaktion (massive Zellinfiltrationen)

Tab. 8: Morphometrie Paclitaxelgruppe Teil 1

Tier-Nr.	Schnitt (mm <sup>2</sup> )	Lumen (mm <sup>2</sup> )	Neo-Intima (mm <sup>2</sup> )*	Original-Lumen (mm <sup>2</sup> )	Media (mm <sup>2</sup> )	Verletzungs- Index
P1	2	2,574	5,664	8,238	2,41	2,167
P2	2	5,819	2,235	8,054	4,082	1,2
P3	2	4,829	3,985	8,814	2,859	2,2
P4	2	1,627	4,589	6,216	2,64	1,857
P5	2	2,121	2,38	4,501	2,199	2
P6	2	1,768	2,592	4,361	2,562	1,83
P7	2	0,48	8,862	9,342	2,481	2,571
P8	2	0,051	5,774	5,825	9,73	1,5
P9	2	1,495	2,248	3,743	1,996	2
P10	3	0,719	2,590	3,309	2,370	1,750
Mittelwert		2,549	3,904	6,24	3,333	1,907
Standard-Abweichung		1,393	2,389	2,238	2,318	0,382
Signifikanzen zur Kontrollgruppe		n.s.	n.s.	n.s.	p=0,003	n.s.

n.s. = nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ )

\* Neointimafläche bei mehreren schnitten eines Gefäßes

Tier-Nr.	Schnitt	Verlet- zungsgr. Draht 1	Verlet- zungsgr. Draht 2	Verlet- zungsgr. Draht 3	Verlet- zungsgr. Draht 4	Verlet- zungsgr. Draht 5	Verlet- zungsgr. Draht 6	Verlet- zungsgr. Draht 7
P1	2	3	2	2	2	2	2	-----
P2	2	1	1	1	3	0	--	-----
P3	2	2	2	3	2	2		-----
P4	2	2	2	1	2	2	2	2
P5	2	2	2	2	2	2		-----
P6	2	1	3	3	2	1	1	-----
P7	2	3	3	2	2	2	3	3
P8	2	1	1	2	2	-----		-----
P9	2	2	2	2	-----	-----		-----
P10	3	3	1	1	2	-----		-----
Mittelwert		2	1,889	1,9	2,111	1,8	2	2,5
Standard- Abweichung		0,816	0,782	0,738	0,333	0,447	0,816	0,707

Tab. 8: Morphometrie Paclitaxelgruppe Teil 2

Tier-Nr.	Schnitt	NI-Dicke Draht 1 (mm)	NI-Dicke Draht 2 (mm)	NI-Dicke Draht 3 (mm)	NI-Dicke Draht 4 (mm)	NI-Dicke Draht 5 (mm)	NI-Dicke Draht 6 (mm)	NI-Dicke Draht 7 (mm)
P1	2	0,974	0,863	0,967	0,977	1,27	1,183	-----
P2	2	0,782	0,718	0,43	0,46	0,338	-----	-----
P3	2	0,953	0,986	0,84	0,623	0,711	-----	-----
P4	2	1,009	0,808	0,87	0,916	1,322	1,271	0,903
P5	2	0,72	0,666	0,482	0,715	0,754	-----	-----
P6	2	0,507	1,11	1,132	0,82	0,66	0,64	-----
P7	2	2,335	1,702	1,488	1,252	1,528	1,674	2,2
P8	2	1,403	1,368	2,468	2,023	-----	-----	-----
P9	2	0,65	0,799	0,645	-----	-----	-----	-----
P10	3	1,041	0,736	0,806	0,669	-----	-----	-----
Mittelwert		1,037	0,975	1,012	0,669	0,767	1,157	1,551
Standard-Abweichung		0,519	0,331	0,597	0,466	0,433	0,341	0,917

Tier-Nr.	Schnitt	Durchschnitt der NI-Dicke (mm)	NI-Gesamt-Fläche (mm <sup>2</sup> )*	Stenose-Grad in %	LEI-Bruch (%)	LEI-Umfang (mm)
P1	2	1,039	0,702	68,76	2,417	9,71
P2	2	0,55	0,354	27,75	3,99	7,532
P3	2	0,823	0,582	45,21	6,403	5,152
P4	2	1,014	0,635	73,83	5,766	5,902
P5	2	0,667	0,52	52,88	1,273	7,211
P6	2	0,812	0,503	59,46	3,238	4,567
P7	2	1,74	0,781	94,86	6,758	6,97
P8	2	1,816	0,372	99,12	5,74	3,208
P9	2	0,698	0,53	60,1	2,783	4,923
P10	3	0,813	0,552	78,0	1,971	4,550
Mittelwert		0,947	1,551	65,99	4,033	5,973
Standard-Abweichung		0,502	0,917	21,82	1,989	1,896
Signifikanz zur Kontrollgruppe		n.s.	0,042	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ )

\* Neointima Gesamtfläche bei einem schnitt eines Gefäßes

Tab. 9: Morphometrie Kontrollgruppe Teil 1

Tier-Nr.	Schnitt	Lumen (mm <sup>2</sup> )	Neo-Intima (mm <sup>2</sup> )*	Original-Lumen (mm <sup>2</sup> )	Media (mm <sup>2</sup> )	Verletzungs- Index
P1	5	2,860	2,474	5,334	1,991	1,833
P2	5	3,794	2,264	6,558	2,155	1,000
P3	2	2,228	3,853	6,081	2,301	1,833
P4	2	3,947	2,127	6,074	1,426	0,571
P5	2	3,533	1,201	4,734	1,708	1,500
P6	2	3,623	1,367	4,990	1,636	1,333
P7	5	1,968	1,293	3,261	1,278	1,333
P8	2	1,114	4,464	5,577	1,687	2,000
P9	5	1,528	2,558	4,526	1,111	1,800
P10	5	1,648	2,089	3,737	-----	2,833
P11	2	2,829	0,621	3,450	1,287	0,833
P12	2	1,849	3,476	5,326	1,892	2,000
P13	5	2,034	2,823	4,856	1,115	2,143
P14	2	2,356	2,455	4,811	1,438	1,833
Mittelwert		2,522	2,362	4,951	1,617	1,632
Standard- Abweichung		0,884	1,028	0,950	0,371	0,566

\* Neointimafläche bei mehreren schnitten eines Gefäßes

Tier-Nr.	Schnitt	Verlet- zungsgr. Draht 1	Verlet- zungsgr. Draht 2	Verlet- zungsgr. Draht 3	Verlet- zungsgr. Draht 4	Verlet- zungsgr. Draht 5	Verlet- zungsgr. Draht 6	Verlet- zungsgr. Draht 7
P1	5	2	1	3	1	2	2	----
P2	5	1	1	2	1	1	0	1
P3	2	2	2	1	1	2	3	----
P4	2	2	1	1	0	0	0	0
P5	2	1	1	2	2	----	----	----
P6	2	2	0	2	----	----	----	----
P7	5	1	2	1	----	----	----	----
P8	2	1	3	3	2	1	----	----
P9	5	2	2	1	2	2	----	----
P10	5	3	2	3	3	3	3	----
P11	2	0	1	2	2	0	0	----
P12	2	0	2	2	2	3	3	----
P13	5	2	3	3	2	2	2	1
P14	2	3	3	1	2	1	1	----
Mittelwert		1,571	1,714	1,929	1,667	1,545	1,556	0,667
Standard- Abweichung		0,904	0,881	0,799	0,745	0,988	1,257	0,471

Tab. 9: Morphometrie Kontrollgruppe Teil 2

Tier-Nr.	Schnitt	NI-Dicke Draht 1 (mm)	NI-Dicke Draht 2 (mm)	NI-Dicke Draht 3 (mm)	NI-Dicke Draht 4 (mm)	NI-Dicke Draht 5 (mm)	NI-Dicke Draht 6 (mm)	NI-Dicke Draht 7 (mm)
P1	5	0,673	0,856	1,218	0,708	0,468	0,496	-----
P2	5	0,609	0,303	0,363	0,560	0,778	0,475	0,560
P3	2	1,271	1,419	1,014	0,908	0,799	0,887	-----
P4	2	0,782	0,454	0,208	0,232	0,370	0,313	0,546
P5	2	0,440	0,496	0,820	0,775	-----	-----	-----
P6	2	0,810	0,208	0,919	-----	-----	-----	-----
P7	5	0,482	0,736	0,673	-----	-----	-----	-----
P8	2	0,423	0,972	1,549	1,602	1,310	-----	-----
P9	5	0,676	0,806	0,736	0,715	0,687	-----	-----
P10	5	1,088	0,803	0,877	1,035	0,933	1,204	-----
P11	2	0,208	0,331	0,458	0,486	0,116	0,158	-----
P12	2	0,669	0,866	1,215	1,401	1,173	1,151	-----
P13	5	0,627	0,996	0,817	0,673	0,613	0,687	0,507
P14	2	1,049	0,849	0,419	0,518	0,486	0,877	-----
Mittelwert		0,701	0,721	0,806	0,801	0,703	0,694	0,538
Standard-Abweichung		0,276	0,317	0,358	0,372	0,333	0,343	0,022

Tier-Nr.	Schnitt	Durchschnitt der NI-Dicke (mm)	NI-Gesamt-Fläche ( mm <sup>2</sup> )*	Stenose-Grad in %	LEI-Bruch (%)	LEI-Umfang (mm)
P1	5	0,737	0,554	46,38	6,053	3,687
P2	5	0,521	0,512	34,52	3,218	7,271
P3	2	1,050	0,626	63,36	4,771	5,204
P4	2	0,415	0,599	35,02	1,711	7,289
P5	2	0,633	0,13	25,37	2,508	5,592
P6	2	0,646	0,455	27,39	2,394	8,447
P7	5	0,630	0,503	39,66	2,891	4,060
P8	2	1,171	0,726	80,03	4,489	5,556
P9	5	0,724	0,697	56,51	3,746	4,563
P10	5	0,990	-----	55,89	4,246	2,856
P11	2	0,293	0,326	18,00	1,539	6,895
P12	2	1,079	0,648	65,27	3,394	5,412
P13	5	0,703	0,717	58,12	4,659	4,296
P14	2	0,700	0,631	51,03	3,600	5,796
Mittelwert		0,735	0,570	46,90	3,516	5,495
Standard-Abweichung		0,246	0,118	17,01	1,219	1,508

\* Neointima Gesamtfläche bei einem schnitt eines Gefäßes

## **8. Danksagung**

An erster Stelle danke ich meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. med. K. R. Karsch, Oberarzt der Abteilung III, Kardiologie, der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, sowie Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Wendt, Klinik für Wiederkäuer und Schweine (Innere Medizin und Chirurgie), Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, sehr herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben.

Herr Dr. Oberhoff war in allen Situationen ein unentbehrlicher und vorbildlicher Ratgeber und hat sich immer für mich eingesetzt. Dr. Oberhoff ist mir über die Arbeit hinaus wichtig geworden, und ich schätze mich glücklich, mit ihm befreundet zu sein.

Ebenfalls danke ich sehr herzlich Herrn Süha Cetin, Herrn Michael Angelo, Frau Simone Lindorfer, Frau Sabrina Bauer und Frau Sabine Dieckmann für ihre große Mühe bei den Korrekturen. Ebenso gilt mein Dank Frau Rosemarie Barth für ihre Hilfe, Frau Kathrin Wolf, Frau Sabine Dieckmann und Herr Dr. med. vet. O. Rau, Tierschutzbeauftragter der Universität Tübingen.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern Malihe und Hadi Al-Ghobainy sowie meinen Geschwistern Semir, Semire, Nasar, A. Amir, Salam, Anaam, Haidar, Iman, Luay, Alaa und Laith zu Dank verpflichtet. Ohne ihre Unterstützung hätte ich mein Ziel nicht erreicht.

## 9. Literaturverzeichnis

Appendino, G., Gariboldi, P., Gabetta, B., Apfel, C., Lipton, R., Arezzo, J. (1993) :

Four new taxanes from the needles of *Taxus baccata*.

Filoterapia 64, Suppl. 1, 47-51

Arbuck, S. G., Canetta, R., Onetto, N., Allwood, M., Wright., P. (1993) :

Current dosage and schedule issues in the development of paclitaxel (Taxol).

Semin Oncol 20, Suppl. 3, 31-39

Axel, D. I., Kunert, W., Göggelmann C., Oberhoff, M., Herdeg, C., Wild, D. H., Kuttner, A. Brehm, B. R., Riessen, R., Koveker, G., Karsch, K. R. (1997) :

Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell Proliferation and Migration in Vitro and in Vivo using local drug delivery

Circulation 96, 636-645

Baim, D. S. (1992) :

Interventional catheterization techniques: percutaneous transluminal balloon angioplasty, valvuloplasty, and related procedures.

In: Braunwald, E. (Hrsg.) : Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. Fourth edition.

W. B. Saunders, Philadelphia, 1365-1381

Baumbach, A., Herdeg, C., Kluge, M., Oberhoff, M., Lerch, M., Haase, K. K., Wolter, C., Schroder, S., Karsch, K., R. (1999) :

Local drug delivery: impact of pressure, substance characteristic, and stenting on drug transfer into the arterial wall.

Catheter Cardiovasc Interv 24, Suppl. 1, 102-6

Bennett, M. R., Schwartz, S. M. (1995) :

Antisense therapy for angioplasty restenosis: some critical considerations.

Circulation 92, 1981-1993

Berk, B. C., Gordon, J. B., Alexander, R. W. (1991) :

Pharmacologic roles of heparin and glucocorticoids to prevent restenosis after coronary angioplasty.

J Am Coll Cndiol 17, 111B-117B

Bogden, A. E., Kelton, D. E., Cobb, W. R., Murphy W. K., Fossella, F. V. Wirtz, R. (1987):

A rapid screening method for testing chemotherapeutic agents against human tumor xenografts.

In: Houchens, D. P., Ovejera, A. A. (eds) : Proc Symp on the Use of Athymic Nude Mice in Cancer Research.

Gustav Fischer, New York, pp 231-250

Borman, S. (1991) :

Scientists mobilize to increase supply of anticancer drug taxol.

Chemical and Engineering News 69, 11-18

Brown, T., Havlin, K., Weiss, G., Cabral, F., Wible, L. (1991) :

A phase I trial of taxol given by a 6-hour intravenous infusion.

J Cell Biol 97, 30-39

Caldas, C., McGuire III W. P. (1993) :

Paclitaxel (Taxol) therapy in ovarian carcinoma.

Semin Oncol 20, 4 Suppl. 3, 50-55

Chapman, G. D., Lim, G. S., Gammon, R. S., Culp, S. C., Desper, J., Bauman, R. P., Swain, J. L., Stack, R. S. (1992) :

Gene transfer into coronary arteries of intact animals with a percutaneous balloon catheter.

Circ Res 71, 27-33

Clowes, W. A., Clowes, M. M., Reidy, M. A. (1986) :

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: III. endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels.

Lab Invest 54, 295-303

Clowes, W. A., Reidy, M. A., Clowes, M. M. (1983) :

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. smooth muscle growth in the absence of endothelium.

Lab Invest 49, 327-333

Corcos, T., David, P. R., Guiteras Val, P., Renkin, J., Dangoisse, V., Rapold, H. G., Bourassa, M. G. (1985) :

Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous coronary angioplasty.

Am Heart J 109, 926-931

Cournand, A. (1975) :

Cardiac catheterization. Development of the technique, its contributions to experimental medicine, and its initial application in man.

Acta Med Scand 579, Suppl. 1

Data on File (1992) :

Bristol-Myers Squibb Company 23, Suppl. 1

De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Caldas, C., McGuire III WP. (1982) :

Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, taxol and pH.

Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 46, 227-240

Denis, J. N., Greene, A. E. (1988) :

A highly efficient approach to natural taxol.

J Am Chem Soc 110, 5917-5919

De Smet, J., van der Zande, Y., van der Helm, R., Singh, C., Tepper, M. (1998):  
The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling.

Cardiovascular research 39, 224-232

Deutsch, H. M., Glinski, J. A., Hernandez, M., Kim, K., Glick, J. (1989) :

Synthesis of congeners and prodrugs. 3 Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity.

J Med Chem 32, 788-792

Donehower, R. C., Rowinsky, E. K., Grochow, L. B., Anderson, WF., Killos, L., Kretschmer, P.J., Diacurnakos, EG. (1987) :

Phase 1 trial of taxol in patients with advanced cancer.

Cancer treat Rep 71, 1171-1177

Douros, J., Suffness, M. (1978) :

New natural products under development at the National Cancer Institute.

Cancer Chemother Pharmacol 1, 91-100

Douros, J., Suffness, M. (1981) :

New natural products under development at the National Cancer Institute.

Recent Res Cancer Res 76, 153-175

Dustin, P. (1980) :

Microtubules.

Sci Am 243, 66-76

Einzig, A. I., Wiernik, P., Sasloff, J., Camenzid, E., Reys, A., Ligthart, J.,

Bakker, W. (1990) :

Phase II study of taxol in patients with advanced ovarian cancer.

Proc Am Soc Clin Onc 31, 1114

Faxon, D. P., Sanborn, T. A., Weber, V. J., Haudenschild, C. C., Gottsman, S.,

B., McGovern, W. A., Ryan, T. J. (1984) :

Restenosis following transluminal angioplasty in experimental atherosclerosis.

Arteriosclerosis 4, 189-195

Fishman, D., Leon, M., Baim, D. (1994) :

A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty  
in the treatment of coronary artery disease.

N Engl J Med 331, 496-501

Forssmann, W. (1929) :

Die Sondierung des rechten Herzens.

Klin Wochenschr 8, 2085

Fram, D. B., Aretz, T., Azrin, M. A., Mitchel, J. F., Samady, H., Gillam, L. D.,

Sahatjian, R., Waters, D., McKay, R. G. (1994) :

Localized intramural drug delivery during balloon angioplasty using  
hydrogelcoated balloons and pressure-augmented diffusion.

J Am Coll Cardiol 23, 1570-1577

Gal, D., Weir, L., Leclerc, G., Pickering, J. G., Hogan, J., Isner, J. M. (1993) :  
Direct myocardial transfection in two animal models. Evaluation of parameters  
affecting gene expression and percutaneous gene delivery.

Lab Invest 68, 18-25

Gershlick, A. H., Spriggins, D., Davies, S. W., Syndercombe-Court, Y. D.,  
Timmins, J., Timmins, A. D., Rothman, M. T., Layton, C., Balcon, R. (1994):  
Failure of epoprostenol (prostacyclin, PGI<sub>2</sub>) to inhibit platelet aggregation and to  
prevent restenosis after coronary angioplasty: results of a randomised  
placebocontrolled trial.

Br Heart J 71, 7-15

Gianni, L., Munzone, E., Capri, G., Cumberland, D. C., Gunn J., Tsikaderis D.,  
Arafa, S. (1994) :

Paclitaxel (P) by 3 h schedule in relapsed breast cancer (BC) resistant to  
anthracyclines.

Europ Soc Med Oncol, Abstract 212

Gibson, Cc. M., Kuntz, R. E., Nobuyoshi, M., Rosner, B., Baim, D. S. (1993) :  
Lesion-to-lesion independence of restenosis after treatment by conventional  
angioplasty, stenting, or directional atherectomy. Validation of lesion-based  
restenosis analysis.

Circulation 17, 1123-1129

Gimple, L. W., Gertz, S. D., Haber, H. L., Ragosta, M., Powers, E. R., Roberts,  
W. C., Sarembrock, I. J. (1992) :

Effect of chronic subcutaneous or intramural administration of heparin on  
femoral artery restenosis after balloon angioplasty in hypercholesterolemic  
rabbits.

Circulation 86, 1536-1546

Giraldo, A. A., Esponso, O. M., Meis, J. M. (1985):  
Intimal hyperplasia as a cause of restenosis after percutaneous transluminal  
coronary angioplasty.

Arch Path Lab Med 109, 173-175

Grem, J. L., Tutsch, K. D., Simon, K. J. (1992) :

Phase I study of taxol administered as a short iv infusion daily for 5 days.

Cancer Treat Rep 71, 1179-1184

Griffith, T. M., Edwards, D.H., Lewis, M. J., Newby, A. C., Henderson, A. H.  
(1984) :

The nature of endothelium derived vascular relaxant factor.

Nature 308, 645-647

Grüntzig, A. R. (1978) :

Transluminal dilatation of coronary artery stenosis.

Lancet 1 (letter), 236

Grüntzig, A. R. (1979) :

Nonoperative dilatation of coronary artery stenosis.

N Engl J Med 306, 61-68

Hanke, H., Karsch, K. R. (1992) :

Rolle der Proliferation glatter Muskelzellen nach Ballonangioplastie.

Herz 17, 300-308

Haudenschild, C. C. (1993) :

Pathobiology of restenosis after angioplasty.

Am J Med 94, 40S-44S

Herdeg, C., Oberhoff, M., Baumbach, A., Haase, K. K., Horch, B., Kranzhoefer, A., Karsch, K. R. (1997 a) :

Local drug delivery with porous balloons in the rabbit: assessment of vascular injury for an improvement of application parameters.

Cathet Cardiovasc Diagn 41, Suppl.3, 308-14

Herdeg, C., Oberhoff, M., Baumbach, A., Kunert, A., Karsch, K. R. (1997 b) :

Lokale Applikation von niedermolekularem Heparin zur Restenoseprophylaxe nach experimenteller Ballondilatation.

University of Tübingen, Germany.

Abstract 9: 419A

Herdeg, C., Oberhoff, M., Baumbach, A., Blattner, A., Kuttner, A., Schroder, S., Haase, K. K., Karsch, K. R. (1999) :

Visualization and comparison of drug effects after local paclitaxel delivery with different catheter types.

Basic Res Cardiol 94 (6), 454-63

Hong, M. K., Bhatti, T., Matthews, B. J., Stark, K. S., Cathapermal, S.S., Foegh, M. L., Ramwell, P. W., Kent, K. M. (1993) :

The effect of porous infusion balloon-delivered angiopeptin on myointimal hyperplasia aft

er balloon injury in the rabbit.

Circulation 28, 638-648

Horwitz, S. B., Lothstein, L., Manfredi, J. J. (1992) :

Taxol: Mechanisms of action and resistance.

Ann NY Acad Sci 466, 733-744

Karsch, K. R. (1992) :

Atherosclerosis - where are we heading?

Herz 17, 309-319

Karsch, K. R., Haase, K. K., Wehrmann, M., Hassenstein, S., Hanke, H. (1991):  
Smooth muscle cell proliferation and restenosis after stand alone coronary  
excimer laser angioplasty.

J Am Coll Cardiol 17, 991-994

Kingston, D. G. I., Samaranayake, G., Ivey, C. A. (1990) :  
The chemistry of taxol, a clinically useful anticancer agent.

J Nat Prod 53, 1-12

Kohn, E. C., Sarosy, G., Bicher, A. (1994) :

Dose-intense taxol: high response rate in patients with platinum-resistant  
recurrent ovarian cancer.

J Nat Cancer Inst 86, 18-24

Kris, M. G., O'Connell, J. P., Gralla, R. J. (1986) :

Phase I trial of taxol given as a 3-hour infusion every 21 days.

Cancer treat Rep 70, 605-607

Legha, S. S., Tenney, D. M., Krakoff, I. R. (1986) :

Phase I study of taxol using a 5-day intermittent schedule.

J Clin Oncol 4, 762-766

Lesser, G. J., Grossmann, S. A., Eller, S. (1993) :

Distribution of 3H-taxol in the nervous system (NS) and organs of rats.

Proc Am Soc Clin Oncol 12, Abstract 441

Libby, P., Schwartz, D., Brogi, E., Tanaka, H., Clinton, S. K. (1992) :

A cascade model for restenosis, a special case of atherosclerosis progression.

Circulation 86, 47-52

Lincoff, A. M., Topol, E. J., Ellis, S. G. (1994) :

Local drug delivery for the prevention of restenosis. Fact, fancy and future.

Circulation 90, 2070-2084

Liu, M. W., Roubin, G. S., King III, S. B. (1989) :

Restenosis after coronary angioplasty: potential biological determinants and role of intimal hyperplasia.

Circulation 29, 1374-1387

Lundgeren, C., Sawa, H., Fujii, S., (1995) :

Inhibition of neointimal hyperplasia after balloon injury by local delivery of a cyclic arginin-glycine-aspartic acid peptide targeting vitronectin receptor.

J Am coll cardiol 25, 38-43

McGuire, W. P., Rowinsky, E. K., Rosenshein, N. B. (1989) :

Taxol: A unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms.

Ann Intern Med 111, 273-279

Mitsuka, M., Nagae, M., Berk, B. C. (1993) :

Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitors decrease neointimal formation after rat carotid injury. Effects on smooth muscle cell migration and proliferation.

Proc Natl Acad Sci USA 90, 8474-8478

Monsarrat, B., Alvinerie, P., Dubois, J. (1992 a) :

Hepatic metabolism and biliary clearance of taxol in rats and humans.

Ann Oncol 4, Suppl. 2, 128

Monsarrat, B., Wright, M., Dubois, J. (1992 b) :

Taxol metabolism in rat and human bile.

Ann Oncol 3, Suppl. 1, 123

Morishita, R., Gibbons, G. H., Ellison, K. E., Nakajima, M., Zhang, L., Kaneda, Y., Ogihara, T., Dzau, V. J. (1993) :

Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia.

Proc Natl Acad Sci USA 90, 8474-8478

Nabel, E. G., Plautz, G., Nabel, G. J. (1990) :

Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall.

Science 249, 1285-1288

National Cancer Institute (1990) :

Clinical brochure (revised): Taxol IND 22850 NSC 125973.

Clinical brochure (revised): Division of Cancer Treatment, NCI, Bethesda, MD, August 221, 10-17

Noboyoshi, M., Kimura, T., Ohishi, H., Horiuchi, H., Nosaka, H., Hamasaki, N., Yokoi, H., Kim, K. (1991) :

Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients.

J Am Coll Cardio 17, 58B-70B

Nunes, G. L., Thomas, C. N., Hanson, S. R., Barry, J.J., King III, S. B., Scott, N. A. (1995) :

Inhibition of platelet-dependent thrombosis by local delivery of heparin with a hydrogel-coated balloon.

Circulation 92, 1697-1700

Ohnuma, T., Zimet, A. S., Coffey, V. A., Smull, M., Foudi, K., Bucknell, E.,  
Lincoff, M. (1985) :

Phase I study of taxol in a 24-hr infusion schedule.

Proc Am Assoc Cancer Res 26, Abstract 662, 123-126

Popma, J. J., Califf, R. M., Topol, E. J. (1991) :

Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty.

Circulation 84, 1426-1436

Powell, J. S., Muller, R. K. M., Baumgartner, H. R. (1991) :

Suppression of the vascular response to injury: the role of angiotensin-  
converting-enzyme inhibitors.

J Am Coll Cardiol 17, 137B-142B

Rensing, B. J., Hermans W.R., Beatt, K. J. (1990) :

Quantitative angiographic assessment of elastic recoil after percutaneous  
transluminal coronary angiography.

Am J Cardiol 66, 1039-1044.

Roberts, J. R., Rowinsky, E. K., Donehower, R. C. (1989) :

Demonstration of the cellcycle positions for taxol-induced „asters“ and „bundles“  
by measurement of fluorescence, Geulgen-DANN content and autoradiographic  
labeling of the same cells.

J Histochem Cytochem 37, 1659-1665

Ross, R. (1986) :

The pathogenesis of atherosclerosis - an update.

N Engl J Med 314, 488-500

Ross, R. (1993) :

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.

Nature 362, 801-809

Ross, R., Glomset, J. A. (1976) :

The pathogenesis of atherosclerosis.

N Engl J Med 295, 369-377

Rowinsky, E.K., Cazenave, L. A., Donehower, R. C. (1990) :

Taxol: A novel investigational antineoplastic agent.

J Natl Cancer Inst 82, 1247-1259

Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M. (1992) :

Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents.

Semin Oncol 19, 646-662

Rowinsky, E. K., Eisenhauer, E.A., Cazenave, L. A., Chaundhry, V. (1993) :

Clinical toxicities encountered with Paclitaxel.

Semin Oncol 20, Suppl. 3, 1-15

Schiff, P. B., Fant, J., Horwitz, S. B. (1979) :

Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol.

Nature 227, 665-667

Schiff, P. B., Horwitz, S. B. (1981) :

Tubulin: a target for chemotherapeutic agents.

In: Sartorelli, A. (ed): Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents.

Academic Press, New York NY, 483-507

Schiff, P. B., Horwitz, S. B. (1980) :

Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells.

Proc Natl Acad Sci USA 77, 1561-1565

Schwartz, R. S., Joseph, G. Murphy, William, D., Edwards, Allan, R. Camrud, Ronald, E. Vliestra, David, R. Holmes. (1990) :

Restenosis after ballon angioplasty: A practical proliferative model in porcine coronary arteries.

Circulation 82, 2190-2200

Schwartz, R. S., Holmes, D. R., Topol, E. J. (1992) :

The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms.

J Am Coll Cardiol 20, 1284-1293

Shah, P. K., Amin, J. (1992) :

Low high density lipoprotein level is associated with increased restenosis rate after coronary angioplasty.

Circulation 85, 1279-1285

Serruys, P., Dejegere, P., Kiemeneij, F. (1994) :

A comparison of balloon expendable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease.

N Engl J Med 331, 489-495.

Serruys, P. W., Rutsch, W., Heyndricks, G. R., Danchin, N., Mast, E. G., Wijns, W., Rensing, B. J., Vos, J., Stibbe, J. (1991) :

Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty with thromboxane A<sub>2</sub>-receptor blockade. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial. Coronary Artery Restenosis Prevention On Repeated Thromboxane-antagonism study (CARPORT).

Circulation 84, 1568-1580

Simons, M., Leclerc, G., Safian, R. D., Isner, J. M., Weir, L., Baim, D. S. (1993):  
Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and  
restenosis after atherectomy.

N Engl J Med 328, 608-613

Spears, J. R., Yellayi, S. S., Makkar, R., Nallamothu, N., Rizvi, M. A., Sheriff, M.  
U., Khetpal, V., Zhan, H., Jang, J., Kundu, S. K., Zaidan, J. T., McMath, L. P.,  
Wang, T., Mammen, E. F., Khan, M. A., Sathavorn, C. S., Fromm, B. (1994) :  
Effects of thermal exposure on binding of heparin in vitro to the arterial wall and  
to clot and on the chronic angiographic luminal response to local application of  
a heparin film during angioplasty in an in vivo rabbit model.

Lasers Surg Med 14, 329-46

Suzuki, Y., Tanigaki, T., Heimer, D., Wang, W., Ross, W. G., Murphy, G. A.,  
Sakai, A., Sussman, H. H., Vu, T. H., Raffin, T. A. (1994) :

TGF-beta 1 causes increased endothelial ICAM-I expression and lung injury.

J Appl Physiol 77, 1281-1287

Vallbracht, C., Klepzig, H. Jr., Giesecke, A., Kaltenbach, M., Kober, G. (1987) :  
Transluminale koronare Angioplastik: Parameter eines erhöhten Rezidivrisikos.

Z Kardiol 26, 727-732

Waller, B. F., Pinkerton, C. A., Orr, C. M., Slack, J. D., Van Tassel, J. W.,  
Peters, T. (1991) :

Restenosis 1 to 24 months after clinically successful coronary balloon  
angioplasty: a necropsy study of 20 patients.

J Am Coll Cardiol 17, 58B-70B

Wang, X., Feuerstein, G. Z., Gu, J. L., Lysko, P. G., Yue, T. L. (1995) :  
Interleukin-I beta induces expression of adhesion molecules in human vascular  
smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle  
cells.

Arteriosclerosis 115, 89-98

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Braun, M., Thomson, R., Gery, T., Pier,  
F. (1971) :

Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel  
antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.

J Am Chem Soc 93, 2325-2327

Weintraub, W. S., Bocuzzi, S. J., Klein, J. L., Kosinski, A. S., King III, S. B.,  
Ivanhoe, R., Cedarholm, J. C., Stillabower, M. E., Talley, J. D., DeMaio, S. J.,  
O'Neill, W. W., Frazier II, J. E., Cohen-Bernstein, C. L., Robbins, D. C., Brown  
III, C. L., Alexander, R. W. & the lovastatin restenosis trial study group. (1994) :  
Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin  
restenosis trial study group.

N Engl J Med 331, 1331-1337

Wilensky, R. L., March, K., L., Gradus-Pizlo, 1., Sandusky, G., Fineberg, N.,  
Hathaway, D. R. (1995) :

Vascular injury, repair and restenosis after percutaneous transluminal  
angioplasty in the atherosclerotic rabbit.

Circulation 92, 2995-3005

Wilensky, R. L., March, K. L., Hathaway, D. R. (1991) :

Direct intraarterial wall injection of microparticles via a catheter: A potential drug  
delivery strategy following angioplasty.

Am Heart J 122, 1136-1140

Wolinsky, H., Thung, S. N. (1990):

Use of a perforated balloon catheter to deliver concentrated heparin into the wall of the normal canine artery.

J Am Coll Cardiol 15, 475-481

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte Übersicht über die „Reaktion auf Verletzung“ .....	11
Abb. 2: Strukturformel des Paclitaxel .....	18
Abb. 3: Schematisches Diagramm eines Mikrotubulus .....	20
Abb. 4: Schematische Darstellung der Polymerisation eines Mikrotubulus....	21
Abb. 5: Wirkungsmechanismus von Paclitaxel.....	23
Abb. 7: Doppelballon-Katheter. ....	36
Abb. 8: Doppelballon-Katheter. ....	38
Abb. 9: Schematische Zeichnung des Schnittverfahrens .....	45
Abb. 10: Schematische Zeichnung eines Gefäßquerschnittes mit den notwendigen Strukturen zur Gewinnung morphometrischer Daten....	48
Abb. 11: Schematisierte Wiedergabe der Morphometrieeinrichtung .....	49
Abb. 12 : Schematische Zeichnung über die Messung im Gefäßquerschnitt ....	50
Abb. 13: Gefäßquerschnitt 28 Tage nach Stentimplantation bei einem Tier der Kontrollgruppe .....	56
Abb. 14: Gefäßquerschnitt bei einem Tier der Paclitaxelgruppe 28 Tage nach lokaler Applikation von 10 ml Paclitaxel mit 1 bar Injektionsdruck. ....	58
Abb. 15: Vergrößerung eines Gefäßquerschnitts bei einem Tier der Paclitaxelgruppe 28 Tage nach lokaler Applikation von 10 ml Paclitaxel mit 1 bar Injektionsdruck.....	59
Abb. 16: Vergrößerung eines Gefäßquerschnittes bei einem Tier der Paclitaxelgruppe 28 Tage nach lokaler Applikation von Paclitaxel ....	60
Abb. 17: Beziehung zwischen Neointimadicke und Verletzungsindex .....	62
Abb. 18: Beziehung zwischen Stenosegrad und Verletzungsindex .....	63
Abb. 19: Beziehung zwischen Neointimafläche und Verletzungsindex .....	64
Abb. 20: Beziehung zwischen Mediafläche und Verletzungsindex .....	65

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Im Text verwendete Abkürzungen. ....	8
Tab. 2: Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	29
Tab. 3: Bewertung des Verletzungsgrades des Gefäßes.....	51
Tab. 4: Beispiel für die Berechnung des mittleren Verletzungsgrades. ....	52
Tab. 5: Im Tabellenanhang verwendete Abkürzungen.....	80
Tab. 6: Histologie Paclitaxelgruppe.....	81
Tab. 7: Histologie Kontrollgruppe.....	82
Tab. 8: Morphometrie Paclitaxelgruppe Teil 1.....	83
Tab. 8: Morphometrie Paclitaxelgruppe Teil 2.....	84
Tab. 9: Morphometrie Kontrollgruppe Teil 1.....	85
Tab. 9: Morphometrie Kontrollgruppe Teil 2.....	86