

**Einfluß der Photodynamischen Therapie auf die Neointimabildung  
vor und nach Stentimplantation  
in die Arteria femoralis des Hausschweines**

Grigorios Valassis

Aus der Medizinischen Klinik und  
Poliklinik I - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**Einfluß der Photodynamischen Therapie auf die Neointimabildung  
vor und nach Stentimplantation  
in die Arteria femoralis des Hausschweines**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Grigorios Valassis

aus  
München  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. N. Weiss

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. P. Gonschior

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2004

**Meiner Familie**

„Wenn du deine Reise nach Ithaka antrittst,  
so hoffe, daß der Weg lang sei,  
reich an Entdeckungen und Erlebnissen.

(...)

Bewahre stets Ithaka in deinen Gedanken.  
Dort anzukommen ist dein Ziel.  
Aber beeile dich auf der Reise nicht.  
Besser, daß sie lange Jahre dauert,  
daß du als alter Mann erst vor der Insel ankerst,  
reich an allem, was du auf diesem Weg erworben hast,  
ohne die Erwartung, daß Ithaka dir Reichtum schenkt.  
Ithaka hat dir eine schöne Reise beschert.  
Ohne Ithaka wärest du nicht aufgebrochen.  
Jetzt hat es dir nichts mehr zu geben.

Und auch wenn du es arm findest, hat Ithaka  
dich nicht enttäuscht. Weise geworden mit solcher Erfahrung  
begreifst du ja bereits, was Ithakas bedeuten.

*Konstantin Cavafis: Ithaka*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	<i>Überblick</i>	1
2.	<i>In-Stent Restenose</i>	8
3.	<i>Behandlung der In-Stent Restenose</i>	9
4.	<i>Ziel der Untersuchungen</i>	10
5.	<i>Historischer Überblick zum Stent</i>	12
6.	<i>Historischer Überblick zur Photodynamischen Therapie</i>	14
<b>B.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
1.	<i>Versuchsdurchführung</i>	17
1.1.	<b>Versuchstiere</b>	<b>17</b>
1.2.	<b>Der Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stent</b>	<b>17</b>
1.3.	<b>Die photosensible Substanz</b>	<b>19</b>
1.3.1.	Die photodynamische Wirkung	21
1.4.	<b>Der poröse Ballon</b>	<b>25</b>
1.5.	<b>Laserlichterzeugung und Lichtfaser</b>	<b>26</b>
1.6.	<b>Versuchsgruppen</b>	<b>27</b>
1.6.1.	Übersicht über die Kontrollgruppe	28
1.6.2.	Übersicht über die photodynamisch behandelten Gruppen	29

<b>1.7.</b>	<b>Versuchsablauf</b>	<b>29</b>
1.7.1.	Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose	29
1.7.2.	Präparation	31
1.7.3.	Implantation der Stents	32
1.7.4.	Lokale Medikamenten-Applikation (LDD)	32
1.7.5.	Laserlichtapplikation	33
1.7.6.	Abschluß der Präparation	34
1.7.7.	Postoperative Versorgung der Versuchstiere	34
<b>2.</b>	<b><i>Aufarbeitung des Gewebes</i></b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Explantation und Präparation</b>	<b>36</b>
<b>2.2</b>	<b>Aufbereiten und Schneiden</b>	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>Histologische Färbung</b>	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b><i>Auswertung der Gefäßschnitte</i></b>	<b>43</b>
<b>3.1.</b>	<b>Morphometrie</b>	<b>43</b>
<b>3.2.</b>	<b>Statistik</b>	<b>45</b>
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>1.</b>	<b><i>Allgemein</i></b>	<b>46</b>
<b>2.</b>	<b><i>Makroskopische Beurteilung</i></b>	<b>46</b>
<b>3.</b>	<b><i>Mikroskopische Beurteilung</i></b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b><i>Planimetrische Ergebnisse</i></b>	<b>48</b>

<b>D.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
1.	<i>Versuchsmodell</i>	59
2.	<i>Medikamentenapplikation</i>	61
3.	<i>Verfahren der lokalen Medikamentenapplikation</i>	62
4.	<i>Photosensible Substanz</i>	62
5.	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	67
<b>E.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>F.</b>	<b>Anhang</b>	<b>74</b>
1.	<i>Literaturverzeichnis</i>	74
2.	<i>Danksagung</i>	91
3.	<i>Lebenslauf</i>	92

## **A. Einleitung**

### **1. Überblick**

Die Differentialtherapie der koronaren Herzerkrankung umfaßt die medikamentöse Verbesserung der Sauerstoffbilanz des Myokards, die operative Myokardrevaskularisation und die interventionelle Angioplastie<sup>42</sup>.

Die Behandlung hämodynamisch relevanter arteriosklerotischer Stenosen im koronaren Gefäßgebiet wurde durch die von Charles Dotter initiierten Entwicklungen<sup>19</sup> und den später daraus entstandenen Kathetertechniken<sup>39,124</sup> bis zum heutigen Tage maßgeblich geprägt. Diese therapeutischen Optionen ermöglichen es heutzutage, auch ausgeprägte Gefäßläsionen erfolgreich zu behandeln.

Insbesondere hat sich das von Grüntzig eingeführte Verfahren der Ballondilatation (oder Ballonangioplastie = PTCA),<sup>39</sup> das anfänglich nur auf eine geringe Akzeptanz stieß, zunehmend als das Verfahren der Wahl für die interventionelle perkutane Behandlung von Koronarstenosen etabliert. Die Einführung des unabhängig fñhnbaren intrakoronaren Fñhrungsdrahtes (over-the-wire-Prinzip) ermoglichte eine breite Anwendung dieser Methode<sup>124</sup>. Es kam weltweit zu einer exponentiellen Zunahme der Durchfñhrung von Ballondilatationen<sup>82</sup>, so daÙ beispielsweise die Zahl der interventionellen Behandlungen weltweit von etwa 500 im Jahre 1980 auf mehr als 1,3 Millionen im Jahre 1999 angestiegen ist.<sup>99</sup> Im Vergleich dazu sind im Jahre 1999 700.000 aortokoronare Bypassoperationen durchgefñhrt worden.<sup>76</sup>

Aus der zunehmenden Anzahl von koronaren Bypassgefäßstenosen und durch die arteriosklerotische Veränderung von Koronarien transplanzierter Herzen ergibt sich auch die Notwendigkeit bei dem hier vorliegenden erhöhten Reoperationsrisiko verstärkt perkutane interventionelle Verfahren einzusetzen.<sup>54,82,148</sup>

Der Vorteil der interventionellen Therapie ist darin zu sehen, daß die Behandlung wenig invasiv, mehrfach wiederholbar und mit einer geringen Belastung des Patienten und seines gesamten sozialen Umfeldes verbunden ist.<sup>54,56,59,96</sup>

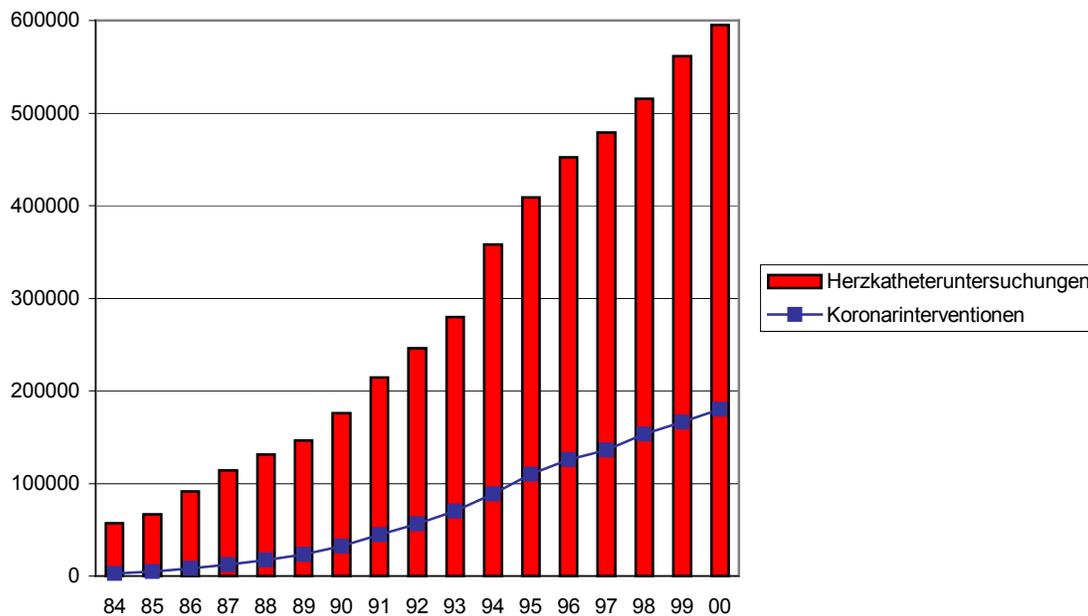
Ungünstigerweise bedingt der Wirkungsmechanismus der erfolgreichen Ballondilatation oft die Komplikationen.<sup>38,39</sup> Entgegen der ursprünglichen Annahme wirkt die Ballondilatation nicht über eine Kompression des Plaquemantels, sondern über einen Riß zwischen undehnbaren Plaqueschichten und dehnbaren äußeren Gefäßarealen. Dieser Mechanismus führt in über 90% der Fälle zum Akuterfolg, vereinzelt entsteht jedoch eine zirkuläre Ablösung von Plaquematerial bis hin zu einer akuten Gefäßverlegung. Die Grenze zur Komplikation ist fließend.

Die Limitationen der koronaren interventionellen Therapie wurden in den letzten Jahren durch technische Weiterentwicklungen weitgehend reduziert. Dies sind im einzelnen Akutkomplikationen, mangelhafter Angioplastieerfolg („recoil“) und die Entstehung der Rezidivstenose nach primär erfolgreicher Angioplastie (sogenannte Restenose). Die Akutkomplikationen wie Gefäßverschuß, Dissektion, Perforation und deren sekundären Folgen, die durch die Verlegung der koronaren Strombahn bedingt werden, sind durch die Entwicklung eines breiten Katheterspektrums und hier insbesondere durch die Einführung und Weiterentwicklung der Gefäßstützen weitgehend beherrschbar geworden.<sup>6,18,56,59</sup>

Mit internationalen prospektiv randomisierten Studien konnte gezeigt werden, daß die Gefäßstützenimplantation (Stentimplantation) ausgezeichnete Langzeitergebnisse hat und daß die akute Komplikationsrate drastisch reduziert werden konnte.<sup>21,117,118,121</sup>

Die Einführung von koronaren Stents war der wichtigste Fortschritt in der perkutanen Behandlung der koronaren Herzerkrankung seit der initialen Einführung der Ballonangioplastie. In der Graphik 1 sind die in Deutschland durchgeführten Herzkatheteruntersuchungen und Koronarinterventionen von 1984 bis 2000 dargestellt. Als Quelle diente der 17. Bericht der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland. Hervorzuheben ist, daß im

ersten Jahr des Berichtes (1984) die Koronarinterventionen in Deutschland einen Bruchteil der Herzkatheteruntersuchungen ausmachten (4,95%). Im Jahr 2000 machten die Koronarinterventionen 30,3% der Herzkatheteruntersuchungen aus.<sup>25</sup>



Graphik 1: Graphische Darstellung der Entwicklung durchgeführter Herzkatheteruntersuchungen und Koronarinterventionen in der BRD von 1984 bis 2000 (Erwachsenenkardiologie). Bis 1990 sind nur die Zahlen der alten Bundesländer erfasst.<sup>25</sup>

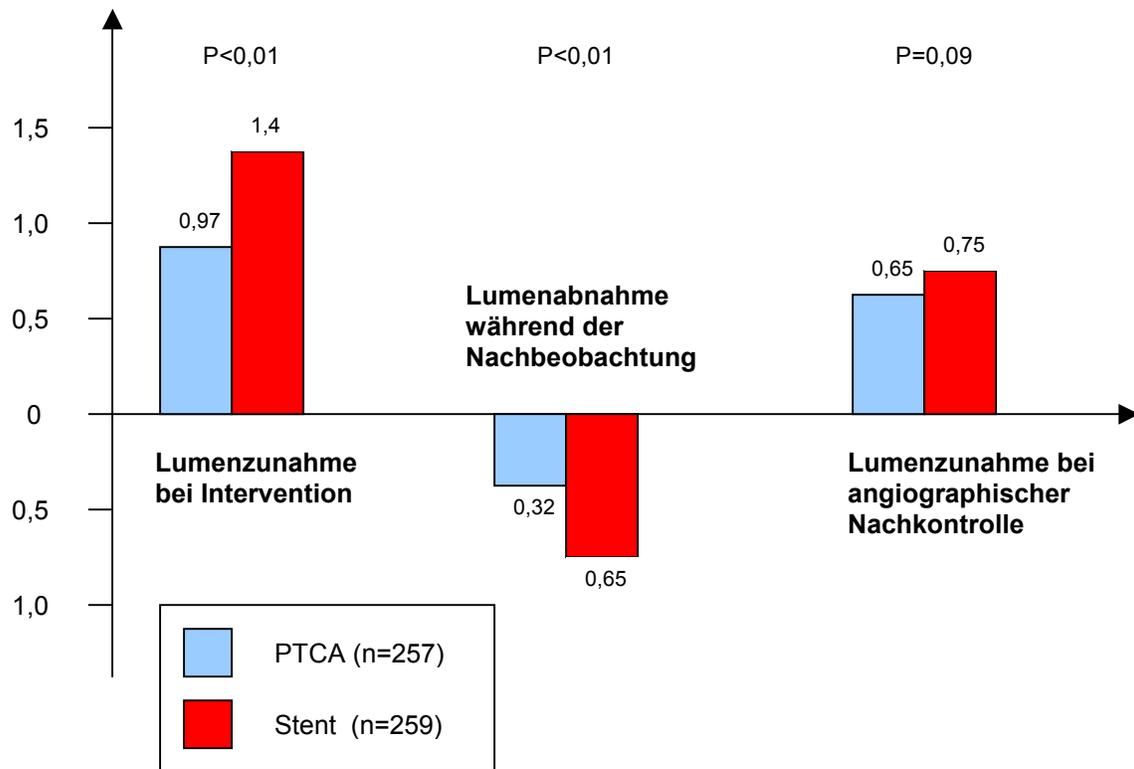
Natürlich sind hier unter dem Begriff Koronarinterventionen sowohl die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA oder Ballonangioplastie) als auch die koronare Stentimplantation zu verstehen. International entsprach im Jahr 1994 der Anteil der Stentimplantationen an den interventionell kardiologischen Verfahren 10 - 15%. Im Jahr 2000 waren ca. 80% aller kardiologischen Interventionen koronare Stentimplantationen. Es wird weiterhin eine Zunahme der Stentimplantationen verzeichnet.<sup>2</sup> Diese Tatsache ist dem mit der Zeit größer werdenden Indikationsspektrum der Stents zu verdanken.

Die Praxis der Stentimplantation mußte bis zum heutigen Zeitpunkt verschiedene Phasen der Entwicklung durchschreiten, von denen manche simultan abliefen: 1) Der initiale Einsatz von Stents war gekennzeichnet von der Suche nach Medikamenten zur Prävention der subakuten Thrombose. 2) Die ersten

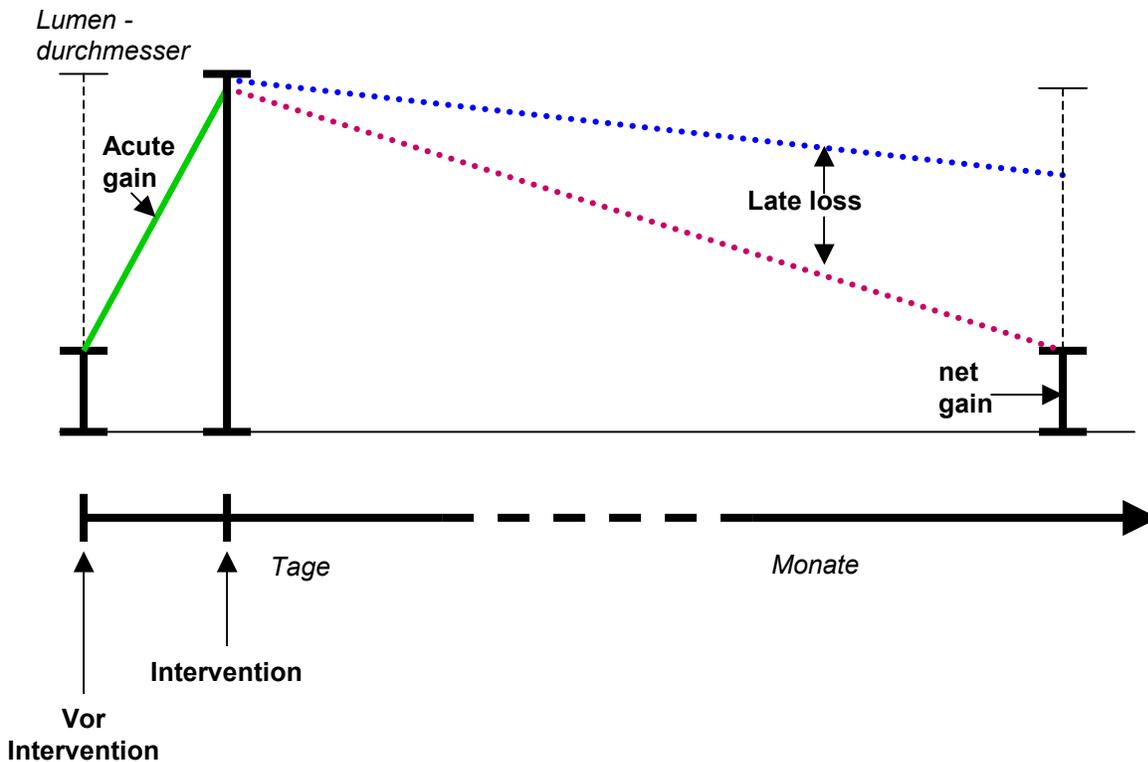
antithrombotischen Regimes verlängerten die Hospitalisation, erhöhten die Blutungskomplikationen und waren nicht in der Lage, akute oder subakute Arterienverschlüsse zu vermeiden. 3) Man erkannte, daß die Stentimplantation wichtig zur Behandlung eines akuten oder mit Ballonangioplastie behandelten Gefäßverschlusses ist. 4) Dokumentation einer sinkenden Häufigkeit der Restenose in eng definierten Populationen. 5) Wechsel von Antikoagulation zu antithrombozytären Therapieregimes. 6) Entwicklung von Gefäßstützen, welche die Behandlung einer großen Zahl von angiographisch-morphologisch unterschiedlichen Läsionen erlaubten.

Mehrere Studien ergaben, daß die Stentimplantation im Vergleich zur PTCA, durchgeführt in nativen Koronarien mit einem Durchmesser von mindestens 3 mm, die bedrohlichen kardialen Ereignisse innerhalb der ersten sechs Monate um ca. 30% vermindert hat und zwar aufgrund des geringeren Bedarfes an wiederholten Revaskularisationen. Stents vermindern also bewiesenermaßen die angiographische und klinische Restenose in Koronargefäßen mit einem Durchmesser von  $\geq 3$  mm, obwohl die Neointimahyperplasie nach Stentimplantation im Vergleich zur Ballonangioplastie zunimmt (Graphik 2). Dies wird durch ihren größeren initialen, postinterventionellen Lumenzuwachs erreicht. Durch die Einbringung der Gefäßstütze wird das „early recoil“, also das frühe postinterventionelle Schrumpfen des Gefäßlumens durch Plaquereste und Rückstellkräfte, und „late negative remodeling“ (Konstriktion) der behandelten Gefäße verhindert (Graphik 3). Zumindest in den ersten großen Stent-Studien war somit erkennbar, daß der durch den Einsatz von Stents bessere Akuterfolg durch einen höheren „late loss“, also einen im Verlauf eintretenden Verlust an Gefäßlumen, partiell aufgezehrt wurde. Damit kündigte sich an, daß die Rezidivstenosen auch nach Stentimplantation eine Rolle spielen würden.<sup>2,3,5,7,20,21,24,98,107,117,118,121,137,144</sup>

Mittelwerte (mm)



Graphik 2: **Summarische Darstellung der Akut- und Langzeitergebnisse der BENESTENT-Studie.**<sup>121</sup> Das erste Säulenpaar steht für die akute Lumenzunahme („acute gain“) durch Ballon- und Stentimplantation. Das zweite Säulenpaar repräsentiert die Abnahme des Lumens während der Nachbeobachtungszeit („late loss“) und das dritte Säulenpaar die verbliebene Differenz zwischen PTCA und Stent („net gain“). Der anfängliche deutliche Lumenzuwachs beim Stent (1,4 mm) wird teilweise ausgeglichen durch eine stärkere Abnahme (0,65 mm). Somit verbleibt für die Langzeitbeobachtung nur noch eine relativ geringe Differenz der definitiven Lumenzunahme; die statistische Relevanz sinkt dementsprechend.



Graphik 3: **„Acute gain“/„late loss“ Konzept zum Verständnis der Restenose nach PTCA.** Ausgehend vom eigentlichen Lumendurchmesser ist die Restenose mit (- - -) symbolisiert. Mit der Intervention kann dieser geringe Lumendurchmesser (Stenose) auf den eigentlichen Lumendurchmesser erweitert werden. In den ersten Stunden bis Tagen geht ein Teil des gewonnenen Lumens durch Plaquereste und Rückstellkräfte („early recoil“) verloren. In den darauffolgenden Wochen bis Monaten kommt es infolge der Infiltration der Gefäßwand mit Entzündungszellen, der konsekutiven Aktivierung der glatten Muskelzellen und der Matrixbildung zu weiteren Lumenverlusten. Alle genannten Faktoren werden als „late loss“ zusammengefaßt; hier mit (...) symbolisiert. Sie schmälern den „acute gain“ und es verbleibt zum Zeitpunkt der Kontrollangiographie ein bestimmter „net gain“. Bei relativ geringem „late loss“ (blau, oberer Linie) resultiert ein gutes Langzeitergebnis, bei relativ hohem „late loss“ (rot, untere Linie) resultiert eine Restenose. Durch die Stentimplantation wird ein maximales „acute gain“ erreicht und das „late loss“ verhindert. Die Lumeneinbuße, die im Langzeitverlauf nach Stentimplantation beobachtet wird, ist nicht durch das „late loss“ („negatives remodeling“ durch Konstriktion) bedingt, sondern durch Intimahyperplasie.

Nicht nur in Koronarstenosen, sondern auch in chronisch okkludierten Gefäßen stellte sich eine Reduktion der angiographischen und der klinischen Restenoserate heraus sowie eine Verringerung der Reokklusionsrate bei den Patienten, die einen Stent an Stelle einer PTCA erhielten. Dementsprechend wird heute bei okkludierten Koronargefäßen mit einer Größe von  $\geq 2,5$  mm die Stentimplantation empfohlen.<sup>9,55,77,103,110,122,125,136,138</sup>

Die Behandlung stenosierter venöser Bypassgrafts macht einen 10%igen Anteil bei den perkutanen interventionellen Verfahren aus. Beobachtungsstudien zeigten eine höhere Erfolgsrate der Stentimplantation in venösen „grafts“ als nach Ballonangioplastie.<sup>114</sup> Außerdem kam es nach dem Einsatz von Gefäßstützen sowohl zu einer niedrigeren Restenoserate als auch zu einer längerfristigen Durchgängigkeit der „grafts“, die von einer niedrigeren Rate an Revaskularisationen im Zielgefäß und an unerwünschten Ereignissen begleitet wurde. Bei der alleinigen Ballonangioplastie in venösen „grafts“ kommt es vermehrt zu akuten Komplikationen, wie zum Beispiel zur distalen Embolisation und „no reflow“ sowie höheren Restenoseraten. Bei der Stentgruppe zeigte sich ein Verlauf mit signifikant weniger Komplikationen.

Auch beim akuten Myokardinfarkt zeigt die Stentimplantation in mehreren Studien eine signifikante Reduktion des kombinierten Endpunktes von Tod, Reinfarkt, Schlaganfall oder Revaskularisation der Zielläsion. Der Unterschied wurde fast ausschließlich durch die unterschiedlichen Raten der Revaskularisationen im Zielgefäß ausgemacht.<sup>4,36,65,79,108,112,116,133,135</sup> Als Revaskularisation im Zielgefäß wird die erneute Eröffnung des Gefäßsegmentes bezeichnet, das schon eine Intervention erfahren hat.

Unklar ist die Rolle der Stentimplantation in kleinen Gefäßen (< 3 mm). Zur Zeit wird in drei großen Studien die PTCA mit der Stentimplantation in kleinkalibrigen Koronargefäßen verglichen.<sup>64,70</sup>

Zu erwähnen ist, daß neben der Entwicklung und der technischen Verbesserung sowohl der Katheter als auch der Stents, die Indikationen für die Stentimplantation

sukzessive überarbeitet wurden. Darüber hinaus hat sich ebenfalls die Begleitmedikation zur Koronarintervention weiterentwickelt,<sup>73,119</sup> so daß eine niedrigere Rate von Stentthrombosen, Gefäß- und Blutungskomplikationen durch die kombinierte Gabe von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel erreicht werden konnte. Dies ist der Durchbruch, der die Stentimplantation als komplikationsarmes Mittel der Wahl zur Myokardrevaskularisation etabliert hat.

## **2. In-Stent Restenose**

Obwohl Stents die Restenoserate bei Koronargefäßen reduzieren, ist die In-Stent Restenose ein signifikantes klinisches Problem.<sup>2,23,24,50,53,56,85,121</sup> Anhand konservativer Schätzungen wird eine Restenose-Rate von ca. 25% für die im Jahr 2000 schätzungsweise durchgeführten 1 Million Koronarinterventionen angenommen. Von diesen Patienten mit einer Restenose benötigen mehr als 150.000 Patienten weltweit eine Nachbehandlung aufgrund einer interventionspflichtigen In-stent Restenose.<sup>17,85</sup>

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß eine Inhibition bzw. Reduktion der Restenose von immenser Bedeutung ist, nicht zuletzt aus sozio-ökonomischer Sicht.

In einem theoretischen Modell zu den ökonomischen Konsequenzen der In-Stent Restenose ergaben sich bezüglich der Stentimplantation ca. 14% höhere medizinische Folgekosten als nach konventioneller Ballondilatation (6.237,00 € vs. 5.345,00 €). Berücksichtigt man auch die indirekten Kosten (Produktivitätsverlust), so ist die Stentimplantation (9.067,00 €) nur noch 5% teurer als die Ballonangioplastie (8.581,00 €). Diese Reduktion der Kostendifferenz ergibt sich durch die insgesamt niedrigere Revaskularisationsrate nach Stentimplantation und die damit zusammenhängende durchschnittlich geringere Anzahl der Krankheitstage der Patienten.<sup>99</sup>

Die Restenose nach Angioplastie ist im Gegensatz zur klassischen Atherosklerose durch eine rasche Progression charakterisiert, die mit einer intensiven proliferativen Aktivität einhergeht gefolgt von Stabilisation und klinischer Ruhe.<sup>93</sup> Im Langzeitverlauf wird der Lumengewinn, der durch die Katheterbehandlung entstanden ist, infolge der Gewebsvermehrung im Gefäß wieder reduziert (Graphik 2). Die wichtigsten zellulären Mechanismen, die die Restenose einleiten, sind die Leukozyten- und Thrombozyten-Adhäsion, die Migration glatter Gefäßmuskelzellen in die Subintima, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in die Subintima, die Deposition extrazellulärer Matrix und die daraus resultierende Intimahyperplasie (oder Neointima) einschließlich der adventitiellen Vernarbung.<sup>12,16,71</sup> Nicht nur arterielle intravaskuläre Ultraschallanalysen, sondern auch systematische experimentelle Langzeitbeobachtungen zeigten ein zirkumferentielles chronisches Wachstum der Intimahyperplasie.<sup>21,58,121,140,142</sup>

### **3. *Behandlung der In-Stent Restenose***

In-Stent Restenosen, also Verengungen des Gefäßlumens in jenen Gefäßsegmenten, welche vormals mit einer Gefäßstütze versehen wurden, werden mit einer erneuten PTCA (RePTCA) behandelt. Daneben sind eine Anzahl weiterer Techniken zur Behandlung der In-Stent Restenose untersucht worden, wie z.B. Excimer Laser, Rotations-Atherektomie sowie direkte Atherektomie und in jüngster Zeit intravaskuläre Bestrahlung (Brachytherapie). Keines dieser Verfahren zeigte eine höhere Reduktion der erneuten Restenose als nach RePTCA. Nach Behandlung der In-Stent Restenose kommt es in 19% - 83% der Fälle zur erneuten Revaskularisation der Zielläsion.<sup>13,17,47,85,139</sup>

Um die wiederholte Revaskularisation der Zielläsion nach Stentimplantation zu reduzieren, wird derzeit an verschiedenen Ansatzpunkten geforscht: Reduktion der Plättchenaggregation, Inhibition der koronaren Thrombose, Reduktion sowohl der Migration als auch der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und Verringerung bzw. Vermeidung der adventitiellen Vernarbung. Vielversprechende neue

Technologien beinhalten gezielte medikamentöse Therapien, neue Stentdesigns, neue Stentmaterialien und -beschichtungen, lokale Applikation von Radioaktivität, von Medikamenten und von genetischem Material.<sup>85</sup>

Da das Gefäßsegment nur während des Eingriffes zugänglich ist, ist die beste Strategie zur Reduktion der Restenose die Prävention.<sup>85</sup>

#### **4. Ziel der Untersuchungen**

Ziel dieser Arbeit war es, in einem Tiermodell am Hausschwein den präventiven Effekt der Photodynamischen Therapie (PDT) auf die durch Stentimplantation induzierte Neointimabildung in eine periphere Arterie mit lokal appliziertem Photophrin<sup>®</sup> zu untersuchen.

Die PDT ist ein therapeutischer Ansatz, der *in-vitro*, aber auch in tierexperimentellen Studien zu einer Reduktion bis hin zur Inhibition der Intimahyperplasie führte unter Verwendung von Substanzen, die mit Licht amplifizierbar sind.<sup>8,57,89</sup> In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die PDT zu einer Reduktion der stentinduzierten Neointimahyperplasie in der A. femoralis des Hausschweines führt. Die Frage ob die Reihenfolge der Therapien, also der Stentimplantation und der PDT, eine Rolle spielt, blieb jedoch offen.<sup>141</sup>

Das Grundprinzip der photodynamischen Wirkung beruht auf der selektiven Anreicherung von lichtempfindlichen Substanzen, den sogenannten Photosensibilisatoren oder Photosensitizer, in den Zielzellen nach intravenöser oder lokaler endoluminaler Verabreichung. Die Ursachen für diese bevorzugte Akkumulation sind durch die zielzellspezifische Morphologie und durch deren receptorspezifischen Eigenschaften bedingt.<sup>147</sup>

Auf zellulärer Ebene entfaltet sich die photodynamische Wirkung durch Absorption von Licht. Die Wellenlänge des benutzten Lichts muß dem Absorptionsspektrum des Photosensitizers angepaßt sein. Die Absorption der Photonen führt zu angeregten

Energiezuständen der photosensiblen Substanz. Die Relaxation in ein metastabiles Zwischenniveau ist Ausgangspunkt für einen Energietransfer auf molekularen Sauerstoff, der dadurch in Singulett-Sauerstoff überführt wird (Typ-2-Reaktion) und die Radikalbildung zur Folge hat. Diese Radikale sind in der Lage, die Zellen in die Apoptose zu überführen.<sup>132</sup>

Vorteile und hervorzuhebende Eigenschaften der Photodynamischen Therapie sind die lokale Aktivierbarkeit und unter anderem die Fähigkeit, an den mit der photosensiblen Substanz behandelten und mit Licht bestrahlten Gewebsarealen lokal Apoptose zu initiieren. Dies ist sowohl auf die kurze Diffusionsstrecke der hochreaktiven Oxidantien als auch auf die selektive Akkumulation der Photosensitizer im Zielgewebe zurückzuführen.<sup>89,90,128</sup> In artifiziell erzeugten Gefäßläsionen im Tiermodell zeigte sich nach PDT eine Inhibition der Neointima.<sup>35,45,61,71,90,94,147</sup> Darüber hinaus vermag die PDT nicht nur die Anzahl der glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu verringern, sondern auch deren Migrationsfähigkeit als Folge des apoptotischen Zelltodes dieser Zellen.<sup>11</sup> Ein Vorteil der Photodynamischen Therapie ist das Fehlen einer Inflammationsreaktion, da Wachstumsfaktoren und Chemoattraktanten inaktiviert werden.<sup>80,130,131,154</sup>

Eine inflammatorische Reaktion ist in Blutgefäßen natürlich unerwünscht, denn Intimaproliferation und Thrombusformation wären die Folgen. Darüber hinaus würde es zum Verlust der Gefäßwandintegrität mit konsekutiver Aneurysmabildung kommen.

In dieser Studie wurde die lokale Applikation der photosensiblen Substanz gewählt, um den Medikamentenspiegel im Bereich der Zielläsion zu maximieren und die systemischen Effekte, wie z.B. die kutane Phototoxizität bei der systemischen Gabe, zu minimieren.<sup>29,32,49,85,146</sup>

Die vorliegenden Untersuchungen sollten folgende Fragen beantworten:

- Reduziert die Photodynamische Therapie die Intimahyperplasie nach Stentimplantation in arteriellen Gefäßen ?

- Hat die Reihenfolge der Photodynamischen Therapie und der Stentimplantation einen Einfluß auf das Ausmaß der Intimahyperplasie ?
- Wie verändern sich die Gefäßwandschichten nach Photodynamischer Therapie und Stentimplantation in arteriellen Gefäßen ?
- Führt die lokale Medikamentenapplikation mit dem porösen Ballon zu Gefäßwandverletzungen, die ihrerseits proliferative und damit restenosefördernde Prozesse in Gang setzen ?

## **5. Historischer Überblick zum Stent**

Etymologisch betrachtet wurde das Wort „Stent“ mindestens seit dem 14. Jahrhundert benutzt. Im Norden von Großbritannien waren „Stents“ in Gebrauch, um Fischernetze über Flüsse auszuspannen. Mit „Stenting“ wird das Stärken von Kleidungsstücken beschrieben.<sup>87,123</sup>

Heute beschreibt man mit „Stent“ die Stütze eines tubulären Hohlorgans. So gibt es bis zu diesem Zeitpunkt Stents zur intraluminalen Abstützung von Hohlorganen in der Gastroenterologie (biliäre Stents, Ductus pancreaticus Stents), in der Urologie (urethrale Stents, Harnleiter-Stents), in der Angiologie und Gefäßchirurgie (Gefäßstützen für die Karotiden und die übrigen peripheren Arterien oder für Aneurysmata der Aorta), in der Pneumologie (tracheobronchiale Stents), in der Gynäkologie (Eileiter-Stents) und nicht zuletzt in der Kardiologie (koronare Gefäßstützen).

1912 machte der Chirurg Alexis Carrel einige präliminäre Ansätze, welche er als „permanente Intubation“ bezeichnete.<sup>87,111,123</sup> In seinen Experimenten implantierte er Glasröhren und paraffinbeschichtete Metallröhren in die Aorta thoracica von Hunden.<sup>10</sup> Trotz des nicht durchschlagenden Erfolges seiner Experimente war Carrel überzeugt, daß diese Gefäßstützen in Zukunft ihren Platz in der Medizin finden würden.

Das Konzept der Implantation von intraluminalen Stützen zur Erhaltung der luminalen Integrität erkrankter Gefäße wurde im Jahre 1964 von Charles Dotter wieder aufgegriffen. Dotter experimentierte mit intravaskulären Silikonschienen, jedoch ohne Erfolg. In späteren Experimenten implantierte er Metallspiralen in Hundearterien (Aa. femorales und popliteae). Obwohl diese frühen Stents gut zu positionieren waren, kam es sekundär zu Dislokationen und zu signifikanten Verengungen innerhalb der Stents. Diese Beobachtungen dämpften etwas die Hoffnungen, die man in die Stents gesetzt hatte. In den achtziger Jahren publizierte Dotter vielversprechende Ergebnisse über in peripheren Hundearterien plazierte Spiralen. Diese Spiralen waren aus Nitinol, ein sogenanntes „memory Metall“. Die thermosensiblen Prothesen erreichten bei Körpertemperatur ihre Zielgröße.

Weitere experimentelle Arbeiten wurden von der Gruppe um Kurt Amplatz und von Cesare Gianturco am Beginn der achtziger Jahre durchgeführt. Gleichzeitig kam Ake Senning auf die Idee, eine Doppelspirale durch Querbrücken zu verbinden und in Venen zu implantieren. Julio Palmaz begann in San Antonio mit der Evaluation von intraluminalen Gefäßstützen. Allen diesen Stents war gemeinsam, daß sie in kleinen Serien maßgefertigt wurden.

Am 12. Juni 1986 kam es während eines PTCA-Demonstrationskurses in Lausanne zum Einsatz des ersten koronaren Stents bei einem Menschen durch Ulrich Sigwart.

Nachdem die Stents etwas ausgereifter geworden waren, gab es anfänglich drei verschiedene Indikationen zu ihrer Implantation: Restenose nach vorangegangener Ballondilatation, Stenosen in Venenbypassen und Verschuß einer Koronararterie nach dem Versuch einer Ballondilatation.

Inzwischen haben die Indikationen zur Stentimplantation zugenommen (s.a. Paragraph B. 1.). Auf dem Markt gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Stents. Ballonexpandierbare Stents werden am häufigsten eingesetzt, daneben stehen eine kleine Anzahl von selbstexpandierbaren Stents zur Verfügung. Die Stentlängen betragen 8 bis 38 mm und haben einen Durchmesser von 2,5 bis 4 mm. Sie unterscheiden sich in den Verbindungsstücken zwischen den Untereinheiten, Flexibilität, Röntgendichte, Oberflächenbeschichtung, Metallgehalt und

Metallzusammensetzung (das Gros der Stents wird aus 316L rostfreiem Stahl produziert).<sup>111</sup>

## 6. Historischer Überblick zur Photodynamischen Therapie

Anthropologische Studien zeigten, daß im Ägypten des Altertums, in Indien und in China psoralenhaltige Pflanzenextrakte zur Behandlung von Hauterkrankungen, wie Vitiligo oder Psoriasis eingesetzt wurden.<sup>87,111</sup> Das Verblüffende daran war, daß der kurative Effekt dieser Pflanzenextrakte erst nach Sonnenlichtexposition einsetzte. Das heilende Potential war auch den Griechen in der Antike bekannt. Herodot, der griechische Historiker und Geograph, wird als Vater der Heliotherapie angesehen.<sup>97</sup>

Um die Jahrhundertwende (1899) legte der Medizinstudent Oscar Raab den Grundstein für die wissenschaftliche Untersuchung phototoxischer Erscheinungen. Am Pharmakologischen Institut der Königlichen Universität zu München waren Chinin und Akridin Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Untersucht wurde die Toxizität dieser Substanzen auf *Paramaecium caudatum*. Bei der Suche nach einem Wirkstoff gegen Malaria kam es „in Folge des damals herrschenden Witterungscharakters sehr wechselnden Lichtverhältnissen“ zu „unerklärlichen Versuchsergebnissen“. Dieser Zufall war Anlaß für weitere Untersuchungen an Chinin, Akridin, Phenylakridin und Eosin, welche zeigten, daß diese im Dunkeln wenig toxischen Stoffe erst unter dem Einfluß des Tageslichts eine äußerst schädliche Wirkung auf Paramaecien entfalteten.<sup>101</sup> Von Tappeiner führte den Begriff „photodynamisch“ zur Abgrenzung gegenüber photographischen Prozessen ein.<sup>149</sup>

In den Jahren 1911 und 1913 berichteten Hausmann und Meyer-Betz über die ausgeprägte Phototoxizität von Hämatoporphyrin.<sup>43,83</sup> 1924 konnte Policard unter Anwendung von Wood-Licht (UV-Licht) eine rötliche Fluoreszenz im nekrotischen Zentrum von experimentellen Rattensarkomen beobachten. Hier wurde Hämatoporphyrin durch hämolytische Bakterien gebildet. Erste Hinweise auf die

tumorlokalisierenden Eigenschaften der Porphyrine kamen im Jahre 1942. Da für diesen diagnostischen Einsatz zu große Mengen an Hämatoporphyrin benötigt wurden, die eine massive Photosensibilisierung des Individuums und eine verminderte Spezifität zur Folge hätten, war eine Weiterentwicklung der photosensiblen Substanzen notwendig.

Schwartz analysierte 1959 Hämatoporphyrin und fand, daß es sich dabei um ein unterschiedlich zusammengesetztes Gemisch aus Porphyrinen mit verschiedenen Eigenschaften handelte. Durch Acetylierung und Reduktion von Hämatoporphyrin gewann er das sogenannte Hämatoporphyrinderivat mit einem deutlich höheren Anteil an hydrophoben Porphyrinen, der eigentlich photodynamisch wirksamen Fraktion. Lipson und Gregorie demonstrierten in den sechziger Jahren die im Vergleich zu Hämatoporphyrin deutlich verbesserten photodynamischen Eigenschaften des Hämatoporphyrinderivats sowie dessen erhöhte Akkumulation im Gewebe. Es wurde bis dahin vereinzelt über klinische Anwendungen von Hämatoporphyrinderivaten in der Photodynamische Therapie auf dem Gebiet der Onkologie berichtet.

Die Einführung des Lasers in den siebziger Jahren gab der Photodynamischen Therapie einen neuen Impuls. Die ersten systematischen Studien am Menschen wurden im Jahre 1978 von Dougherty *et al.* durchgeführt. In den späten achtziger Jahren begann man in kontrollierten Studien der Phase III mit der Hämatoporphyrinderivat-medierten photodynamischen Behandlung von Karzinomen der Harnblase, der Lunge und des Ösophagus. Dies führte 1993 in Kanada zur Zulassung des Hämatoporphyrinderivats Photofrin<sup>®</sup> für die Behandlung oberflächlicher Blasenkarzinome. Es folgten Zulassungen in den Niederlanden (Lungen- und Ösophaguskarzinome), in Japan (Frühstadien des Lungen- und Magenkarzinoms, sowie zervikale Dysplasie) und in den USA (obstruktives Ösophaguskarzinom).

Der primäre Mechanismus der PDT-Wirkung ist mit der selektiven Akkumulation der photosensiblen Substanz im Tumorgewebe bzw. in schnell teilenden Zellen in Verbindung zu setzen.<sup>75</sup>

Die photodynamische Therapie zeigt auch gewisse vielversprechende Ansätze auf nicht-onkologischen Gebieten wie in der Behandlung der Psoriasis, der makulären Retinadegeneration und der Inaktivierung von Viren in Blut oder Blutprodukten. Außerdem wird PDT zur Therapie atherosklerotischer Plaques, der Restenose, aber auch an verschiedenen autoimmunen Erkrankungen untersucht einschließlich der rheumatoiden Arthritis.<sup>8,75,84</sup>

## **B. Material und Methoden**

### **1. Versuchsdurchführung**

In der Zeit von 1996 bis 1999 wurden die tierexperimentellen Untersuchungen am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor Prof. Dr. Dr. K. Meßmer) durchgeführt. Die Genehmigung für die Tierversuche war von der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern erteilt worden.

#### **1.1. Versuchstiere**

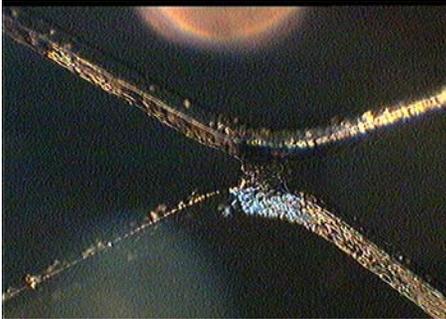
Die Untersuchungen wurden an 30 gesunden jungen, nicht vorbehandelten Hausschweinen mit einem Durchschnittsgewicht von  $30 \text{ kg} \pm 3 \text{ kg}$  durchgeführt. Die Tiere wurden aus der Zucht des Landesuntersuchungsamtes in Oberschleißheim bezogen. Die Haltung erfolgte in Stallungen mit Freilauf. Zwischen Transport und Versuchstermin lag eine Ruhezeit von mindestens 24 Stunden. Die Tiere wurden am Tag der Narkose nicht mehr gefüttert.

#### **1.2. Der Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stent**

Bei dem Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stent (Johnson & Johnson; Warren, New Jersey, U.S.A.) handelt es sich um einen Ballon-expandierbaren „Röhrchen“stent. Er ist aus Chrom-Nickel-Stahl (316L) und wird mittels Lasertechnologie aus einem Stück gefertigt. Dabei entstehen zwei gitterförmig ausgearbeitete Röhrchen, die mit einem einzelnen geraden Steg verbunden sind.<sup>63</sup>

Der Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stent weist makroskopisch eine glatte Oberfläche auf, mikroskopisch sind jedoch Gußblasen von  $1 - 10 \mu\text{m}$  Durchmesser sichtbar. Diese sind regelmäßig über die gesamte Stentoberfläche verteilt (Abbildungen 1 und 2).

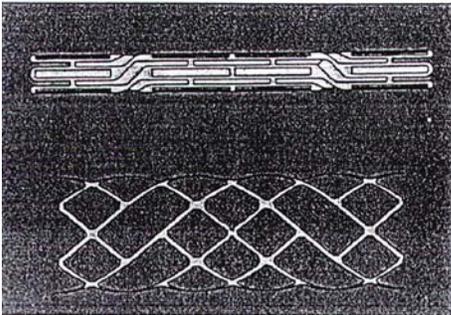
Die Kanten sind mit sehr kleinem Krümmungsradius abgerundet. Allerdings kommt es bei der Expansion des Stents zu scharfkantigen Endstücken die sich trompetenförmig nach außen aufwölben (Abbildungen 4, 5 und 6).



**Abbildung 1:** Unebene Oberfläche des Palmaz-Schatz® Stents; hier abgebildet ein Kreuzungspunkt der Metallstäbe (struts) [50fache Vergrößerung].



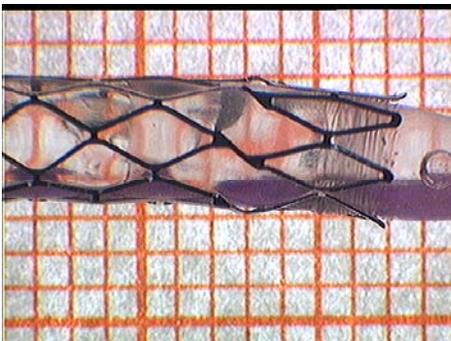
**Abbildung 2:** Palmaz-Schatz® Stent; hier abgebildet eine Metallstabschleife an den Enden des Stents [50fache Vergrößerung].



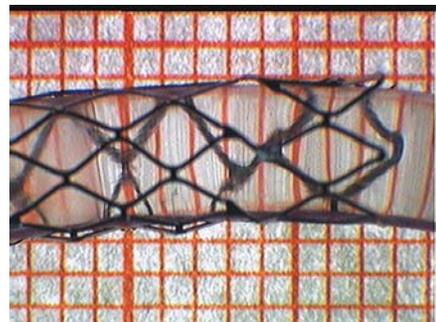
**Abbildung 3:** Der Palmaz-Schatz® Stent im deflatierten und inflatierten Zustand, bestehend aus zwei gitterförmigen Röhren verbunden durch einen Steg.



**Abbildung 4:** Ballonmontierter Palmaz-Schatz® Stent mit 1 atm inflatiert [10fache Vergrößerung].



**Abbildung 5:** Ballonmontierter Palmaz-Schatz® Stent mit 3 atm inflatiert [10fache Vergrößerung].



**Abbildung 6:** Ballonmontierter Palmaz-Schatz® Stent mit 16 atm inflatiert [10fache Vergrößerung].

Wie oben beschrieben besteht der Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stent aus Edelstahl (316L). Folgende Materialzusammensetzung zeigt die Materialanalyse mittels Energie-dispersiver Röntgenanalyse:

Element	Anteil (gew. %)
Silizium	0,29
Molybdän	1,42
Chrom	17,85
Eisen	66,76
Nickel	13,67

**Tabelle 3** : Materialzusammensetzung des Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stents.<sup>63</sup>

Der rostfreie Chrom-Nickel-Stahl (Chirurgenstahl) gilt als sehr korrosionsbeständig. Die Biokompatibilität und insbesondere die Hämokompatibilität werden als weniger gut angesehen, jedoch hat er exzellente mechanische Eigenschaften.<sup>103</sup> In unseren Untersuchungen kamen Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stents mit einem Durchmesser von 3,5 mm und einer Länge von 9 mm zur Anwendung.

### 1.3. Die photosensible Substanz

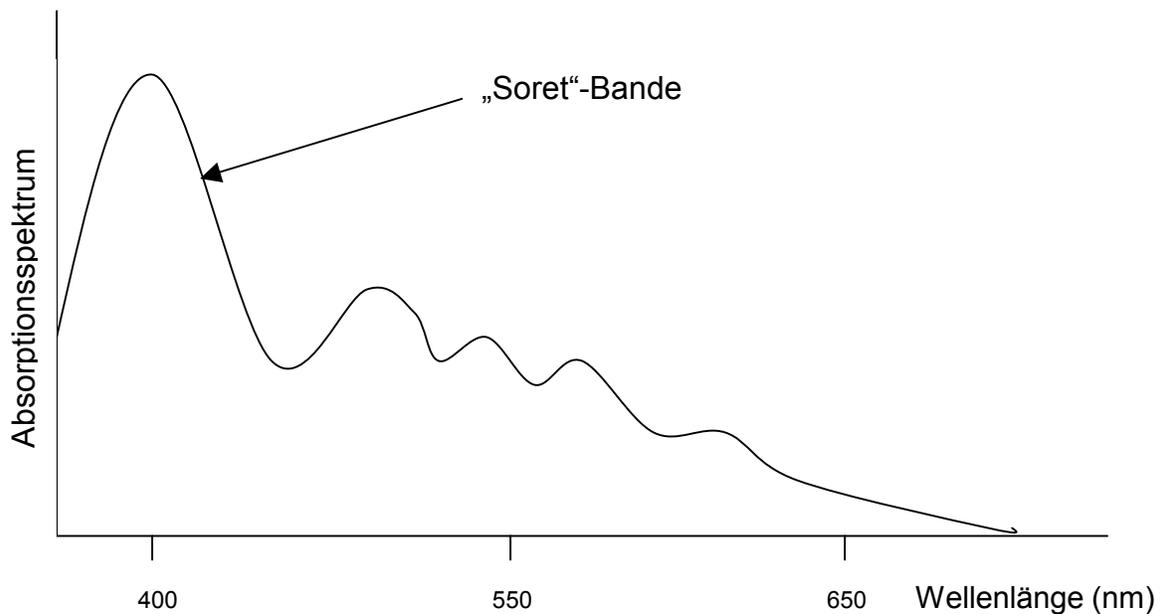
Die photosensible Substanz Photofrin<sup>®</sup> (Porfimer-Natrium; Quadra Logic Technologies, Inc.; Vancouver, British Columbia) gehört zu der Gruppe der Fluorochrome. Photofrin<sup>®</sup> ist die kommerziell erhältliche und die gereinigte Form des Hämatoporphyrinderivates. Porphyrine wie Photofrin<sup>®</sup> und Hämatoporphyrinderivat bestehen aus einem Gemisch von monomeren und oligomeren Porphyrinen, wobei das Photofrin<sup>®</sup> einen Gehalt von 70% Dihämatoporphyrinether oder -ester besitzt, die strukturell durch ein weitreichendes System von konjugierten Doppelbindungen charakterisiert sind, welchen sie ihre fluoreszierenden Eigenschaften verdanken.

Porphyrine besitzen eine intensive Lichtabsorption im ultra-violetten Bereich (200 – 400 nm), die Soret Bande genannt wird und sich bei ca. 370 nm befindet. Außerdem

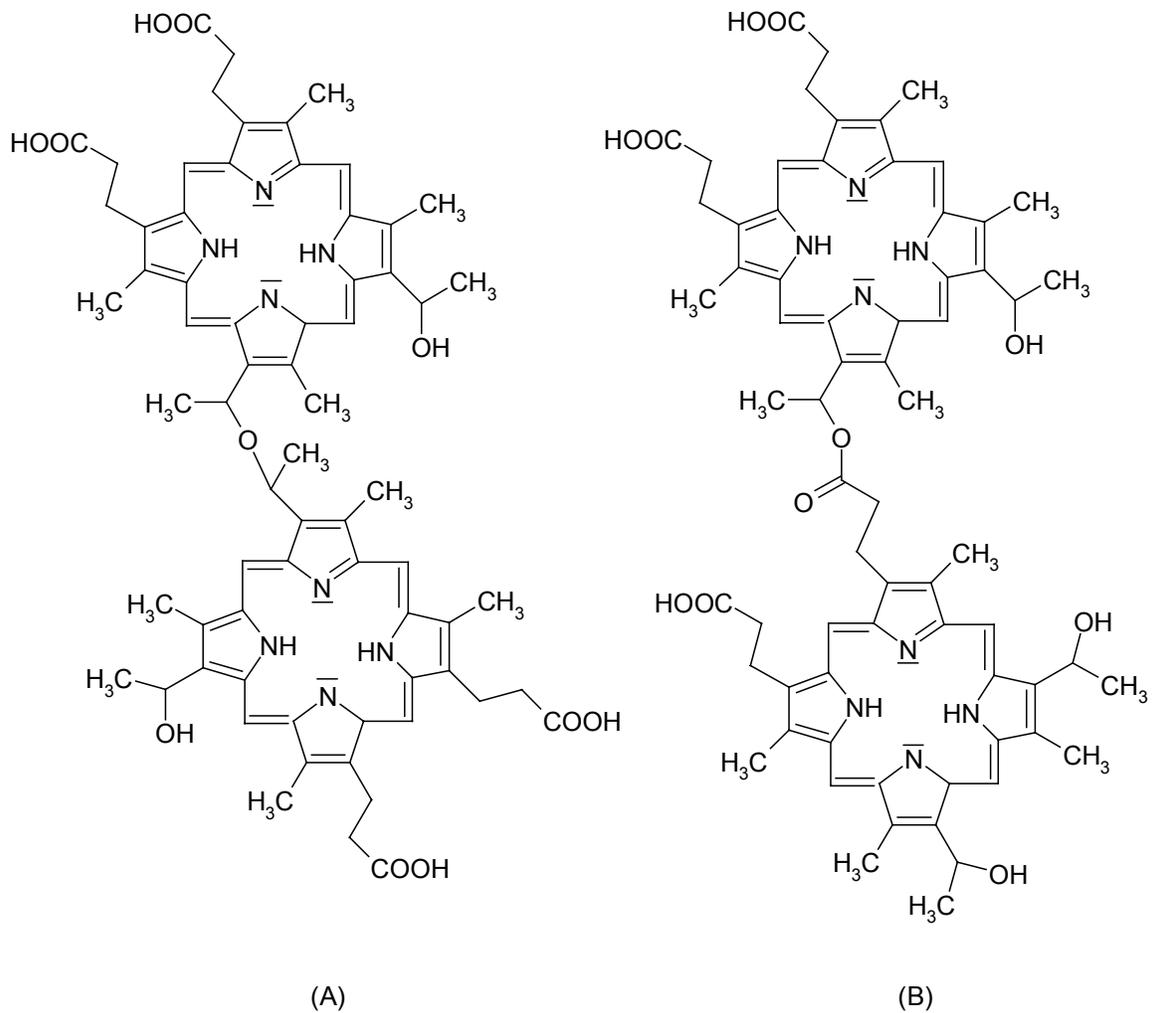
besitzt dieser Photosensitizer vier zusätzliche Absorptionsbanden absteigender Intensität zwischen 500 und 630 nm. Trotz der Tatsache, daß Photofrin® sein Absorptionsmaximum bei ca. 370 nm besitzt, wird klinisch das infrarote Spektrum (400 – 800 nm) verwendet. Gründe hierfür sind die längeren Wellenlängen des infraroten Lichts und die Eigenschaft von Säugetiergeweben, ihre maximale Lichteindringtiefe im höheren Wellenlängenbereich von 600 – 850 nm (infrarotes Licht) aufzuweisen.<sup>26,62</sup>

Photofrin® ist ein lipophiles Substanzgemisch, das innerhalb der Zelle in Mitochondrien, Zellkern, Zellmembran und Lipoproteinen akkumuliert.<sup>97</sup>

In früheren *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, daß Photofrin® eine lineare Korrelation zwischen Substanzgehalt und emittierter Fluoreszenz besitzt.<sup>32</sup>



**Graphik 4:** Absorptionsspektrum von Photofrin®. Zu erkennen sind die Soret-Bande bei ungefähr 370 nm und noch vier weitere Absorptionsmaxima absteigender Intensität zwischen 500 und 630 nm.

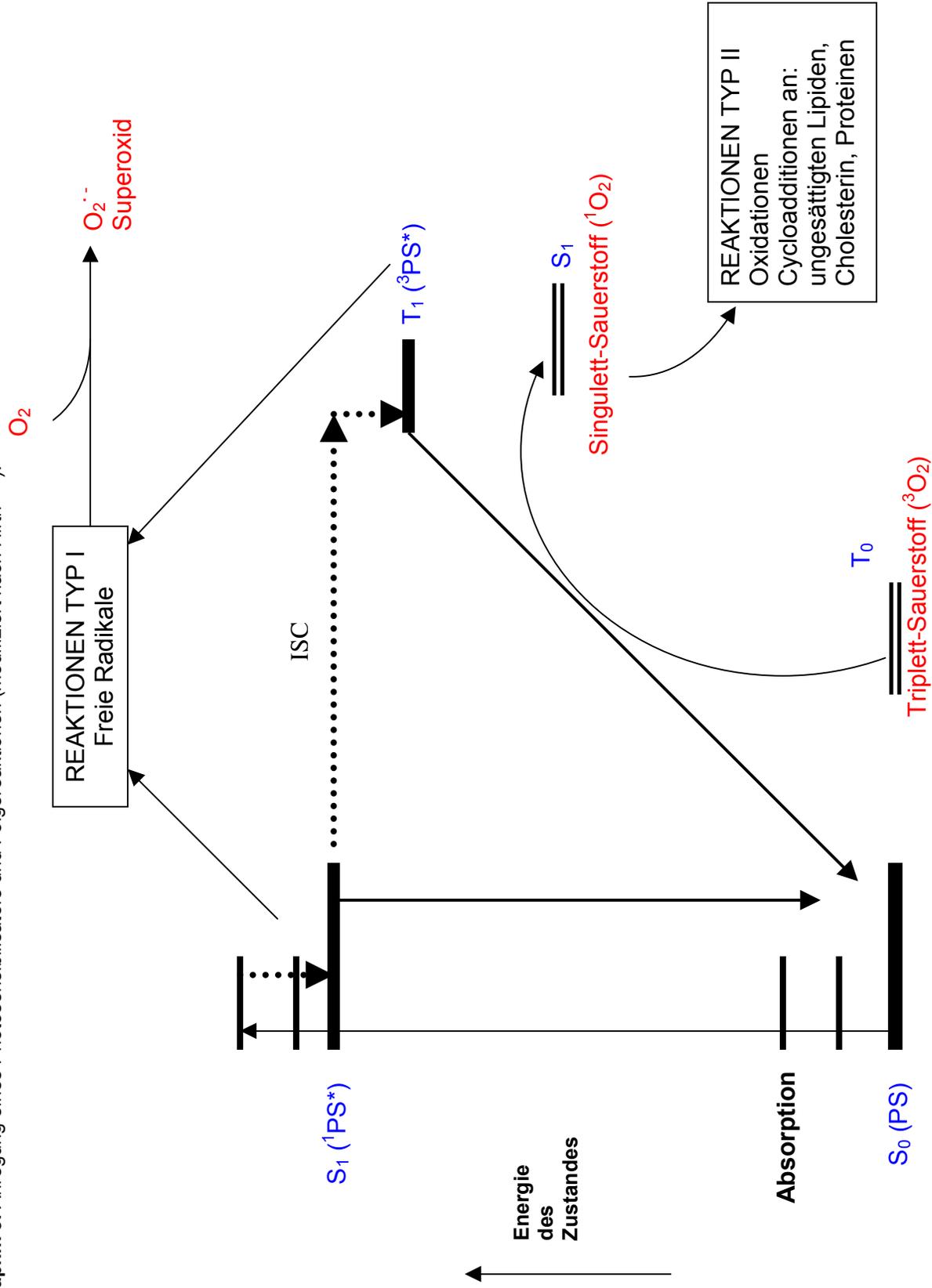


**Abbildung 7:** Chemische Strukturen der aktiven Komponenten des Photofrins II. Dihematoporphyrinether (A) und Dihematoporphyrinester (B). (modifiziert nach Ochsner M. *et al.*<sup>146</sup>)

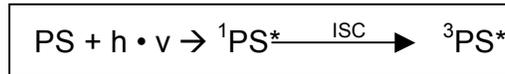
### 1.3.1. Die photodynamische Wirkung

Der Mechanismus der Gewebedestruktion (z.B. in Tumorgewebe) bzw. der Prozess des induzierten Zelltods werden bei allen heute bekannten photosensiblen Substanzen vermutlich von zwei Reaktionstypen vermittelt, Typ I und Typ II.<sup>92</sup>

**Graphik 5:** Anregung eines Photosensibilisators und Folgereaktionen (modifiziert nach Hirth<sup>132</sup>).

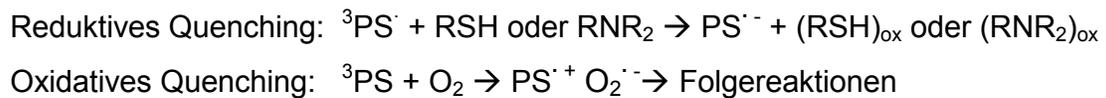


Durch Absorption von Photonen geht der Photosensibilisator aus dem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten und kurzlebigen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  s) Singulett-Zustand ( $^1PS^*$ ) über und anschließend via „Intersystem Crossing“ (ISC) in den angeregten Triplett-Zustand ( $^3PS^*$ ).



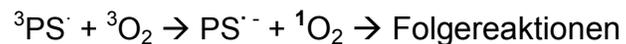
Die Reaktionen, die dem angeregten Triplett-Zustand ( $^3PS^*$ ) folgen unterteilt man in Typ-I und Typ-II-Reaktionen.

Typ I - Reaktion: Eine direkte Interaktion der durch Licht angeregten und sich im Triplett-Zustand befindenden Farbstoffmoleküle mit den Biomolekülen des Zielgewebes. Solch eine Interaktion vermag zu einem Elektronentransfer zwischen der photosensiblen Substanz und den Gewebemolekülen zu führen (reduktives Quenching) oder zur Freisetzung von Radikalen in Wasserstoffatomen (oxidatives Quenching). Die Mehrzahl dieser Radikale reagiert sofort mit Sauerstoff und verursacht eine Vielfalt von hochreaktiven Sauerstoff-Intermediärstufen wie  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  und  $\cdot OH$ , also Moleküle, die mit vielen und unterschiedlichen Biomolekülen oxidierend reagieren.<sup>10,26,83</sup>



Typ II - Reaktion: Aus dem angeregten Singulett-Zustand kann der Photosensitizer entweder auf seinen Grundzustand abfallen, was zur Lichtemission (Fluoreszenz) führt, oder er wird einem „Intersystem Crossing“ (ISC) zugeführt. Letzteres hat die Überführung des Photosensitizer-Moleküls vom Singulett-Zustand zum stabileren und länger lebigen ( $10^{-3}$  s) Triplett-Zustand zur Folge. In diesem angeregten Triplett-Zustand hat die photosensible Substanz eine höhere Wahrscheinlichkeit mit

Sauerstoff in Wechselwirkung zu treten. Der Energietransfer vom Triplett-Zustand des Farbstoffes auf den im energetischen Grundzustand befindlichen Sauerstoff (Triplett-Zustand) erzeugt hochreaktiven Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Singulett-Sauerstoff ist elektrophil und reagiert mit elektronenreichen Regionen von Biomolekülen. Hieraus entstehen oxidierte Formen dieser Moleküle.<sup>26,132</sup>



Angeregtes Triplett-Porphyrin kann auch direkt mit einem Biomolekül reagieren. Als Konsequenz kommt es zu einem Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen, wobei radikale Formen der photosensiblen Substanz entstehen (Reaktion Typ I). Diese Porphyrinradikale können mit Sauerstoff reagieren, wobei die Porphyrinmoleküle auf ihren Grundzustand zurückkehren und Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale oder Hydroxylperoxide gebildet werden.

Die Sauerstoffradikale oder die Radikale der photosensiblen Moleküle, die durch die Typ I – Reaktion gebildet werden, können eine direkte oder indirekte Zelledestruktion induzieren.<sup>107</sup> Photochemische Reaktionen dieses Typs sind bevorzugt unter anaeroben Bedingungen zu beobachten.<sup>92</sup>

Biomolekulare Struktureinheiten, die an solchen Reaktionen beteiligt sein können, sind z.B. die Aminosäuren Tryptophan, Histidin, Methionin.

Im Falle von hohen Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe kommt die Typ II – Reaktion zum Tragen.<sup>48</sup> Bei diesem Reaktionstyp entsteht, wie oben beschrieben, Singulett-Sauerstoff. Der hochreaktive Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) ist für jede ihn bildende Zelle tödlich. Reaktionspartner von  $^1\text{O}_2$  sind Lipide, Proteine, Cholesterin und Nucleinsäuren. Nucleinsäuren werden an Thymin und/oder Uracil enthaltenden Nucleotidyl-Einheiten durchtrennt (DNA-Bruch). Im Falle von Enzymen und

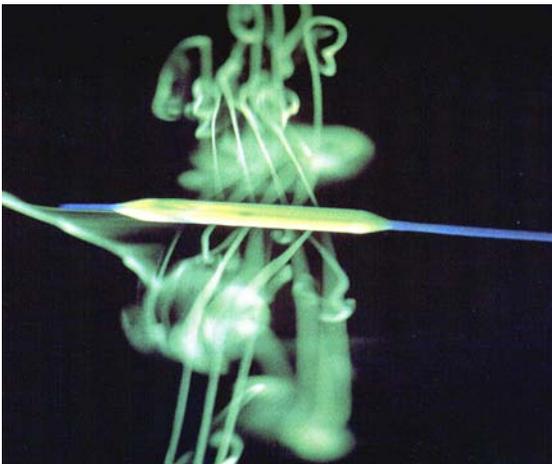
Proteinen treten durch die Reaktion schwerwiegende Schädigungen hauptsächlich an Strukturen auf, welche die Aminosäuren Cystein, Histidin-, Methionin, Tryptophan und/oder Tyrosin enthalten. Enzyme erfahren dadurch eine teilweise Einschränkung oder gar einen vollständigen Verlust ihrer biokatalytischen Aktivität. Darüber hinaus resultieren aus diesen photochemischen Reaktionen Defekte an transmembranen Ionenpumpen, an Zucker- und Aminosäuretransportsystemen. Als Konsequenz der Zellmembranzerstörung wird die Freisetzung von Phospholipiden initiiert, welche durch Phospholipasen (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C) attackiert werden. Insgesamt kommt es zur Freisetzung einer Fülle von pathophysiologisch hochreaktiven Produkten wie Prostaglandinen (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1a</sub>), Thromboxanen (A<sub>2</sub>, B), Leukotrienen (B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>), Hydroxycarbonsäuren und D-Myo-inositol-1,4,5-trisphosphat. Die Aktivierung des Komplementsystems und die Infiltration von immunologisch aktiven Blutzellen im Zielgewebe verstärken den Zerstörungseffekt dieser aggressiven Intermediärsubstanzen.

Zur Zeit werden neuere Generationen von photosensiblen Substanzen untersucht, die einen höheren chemischen Reinheitsgrad und ein Absorptionsmaximum in der roten Spektralregion besitzen. Außerdem muß nach der systemischen Gabe von Porphyrinen der Photosensibilisierung der Haut begegnet werden, die bis zu sechs Wochen anhalten kann. Doch Photofrin<sup>®</sup> ist gegenwärtig der einzige Photosensitizer, welcher von den verschiedenen Registrierungsbehörden für klinische Studien der Phase III und IV zugelassen ist. In den letzten 15 Jahren sollen - meist in unkontrollierten klinischen Studien - weltweit 10.000 Patienten mit dieser Substanz behandelt worden sein, wobei die Mehrzahl der Erkrankungen onkologischer Natur war.<sup>48,62,92,132</sup>

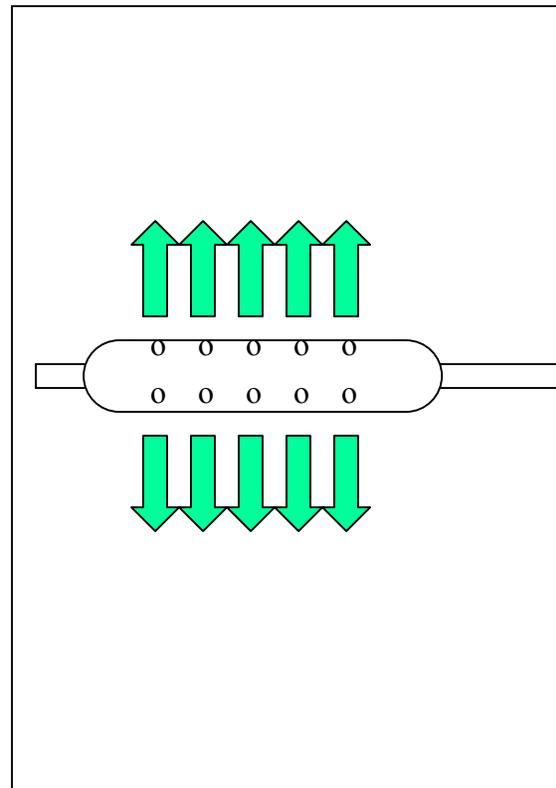
#### **1.4. Der poröse Ballon**

Zur lokalen Medikamentenapplikation (Local drug delivery, LDD) wurden poröse Ballons eingesetzt. Bei der Fertigung dieser porösen Ballons kamen herkömmliche Ballonkatheter mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Ballonlänge von 25 mm (Fabrikat Viva) zur Anwendung. Durch fokussierte CO<sub>2</sub>-Laserlichtapplikation wurden

die Ballons perforiert. Dabei entstanden 50 Poren mit einem Durchmesser von jeweils 25 µm. Die Poren waren symmetrisch über die ganze Ballonperipherie verteilt, so daß ein weitgehend gleichmäßiger Flüssigkeitsaustritt in die umgebende Gefäßwand möglich war. Der Abstand der Perforationen betrug 2 mm. Der Ballon ermöglichte einen Inflationsdruck bis zu 10 atm über mehr als 60 s aufzubauen.<sup>27</sup>



**Abbildung 11:** Poröser Ballon mit Austritt einer Indikatorflüssigkeit.



**Graphik 6:** Schemazeichnung eines porösen Ballonkatheters.

## 1.5. Laserlichterzeugung und Lichtfaser

Zur Erzeugung der Lichtenergie, die zur Anregung von Photofrin<sup>®</sup> nötig ist, wurde ein Argon-dye Laser (AOC PDT Lasercare 25, Applied Optronics Corporation; New Jersey, USA) eingesetzt (Abbildung 12). Verwendet wurde Laserlicht mit einer Leistung von 0,5 Watt und eine Wellenlänge von 630 nm.

Zur Leitung des Laserlichts an einer definierten intravaskulären Stelle wurde eine Lichtfaser verwendet (C.R. Barth). In umfangreichen *in vitro* Untersuchungen hatten Fasern mit einem Durchmesser von 300 µm sowie einer 20 mm langen zirkumferentiellen Lichtbeugungsschicht am distalen Ende und einem distalen Lichtabsorber, die beste Lichteinbringungscharakteristik (Abbildung 13).<sup>27</sup> Herkömmliche Optiken mit Reflektoren, Prismen und/oder Linsen waren in der Streucharakteristik limitiert und zeigten ungenügende Ergebnisse.<sup>129</sup>

Die Messung der insgesamt applizierten Lichtmenge erfolgte mit einer Ulbrichtkugel vor und nach jedem PDT Versuch.



Abbildung 12: Laserlichtquelle



Abbildung 13: Proximales und distales Ende der Lichtfaser.

## 1.6. Versuchsgruppen

Es wurden insgesamt drei Versuchsgruppen gebildet.

In der Kontrollgruppe (**Gruppe K**) wurden zehn Tiere eingeschlossen. Es erfolgte die Implantation von Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stents (Johnson & Johnson; Warren, New Jersey, USA) in die Arteria femoralis superficialis. Die angewandte Methode wird unter Paragraph 1.7.3. näher beschrieben.

Die übrigen zwei Gruppen bestanden aus weiteren 20 Tieren. Hier wurde die Möglichkeit der Restenoseprophylaxe nach Stentimplantation durch die Photodynamische Therapie untersucht. Ein wichtiger Punkt der Versuchsdurchführung innerhalb dieser Gruppen war die Untersuchung der

Effektivität unterschiedlicher zeitlicher Abfolgen der Photodynamischen Therapie und der Stentimplantation. Dazu wurden die Photodynamische Therapie und die Stentimplantation in unterschiedlicher Reihenfolge an den Femoralarterien der Versuchstiere angewandt, wodurch zwei Gruppen entstanden sind:

- **Gruppe A:** „1. Stent + 2. PDT“-Gruppe und
- **Gruppe B:** „1. PDT + 2. Stent“-Gruppe.

Pro Tier wurde in allen drei Gruppen jeweils nur ein Gefäß behandelt. Die Explantation der Gefäße fand jeweils 14 Tage nach Intervention statt.

### 1.6.1. Übersicht über die Kontrollgruppe

In der folgenden Tabelle sind die behandelten Tiere aufgeführt, die einer Stentimplantation zugeführt worden sind. Jedes Tier entspricht einem Femoralgefäß. Alle zehn Tiere wurden am 14. postoperativen Tag geopfert.

<b>Kontrollgruppe</b>	
Stentimplantation bis Gefäßexplantation	14 Tage
Tieranzahl = Gefäßanzahl	10

**Tabelle 1:** Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppe „Kontrollgruppe“.

## 1.6.2. Übersicht über die photodynamisch behandelten Gruppen

Anschließend sind diejenigen Versuchstiere tabellarisch aufgeführt, welche die Photodynamische Therapie erhielten (Gruppe A und Gruppe B). Nach 14 Tagen wurden die Versuchstiere geopfert. Ein Versuchstier, welches in der Gruppe A randomisiert wurde, ist perioperativ aufgrund maligner Hyperthermie verstorben.

<b>Photodynamische Behandlung</b>		
Behandlungsmodus	Gruppe A (1.Stent + 2.PDT)	Gruppe B (1.PDT + 2.Stent)
Behandlung bis Gefäßexplantation	14 Tage	14 Tage
Perioperativ verstorben	1	0
Gefäßanzahl	9	10

**Tabelle 2:** Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppe „Photodynamische Behandlung“.

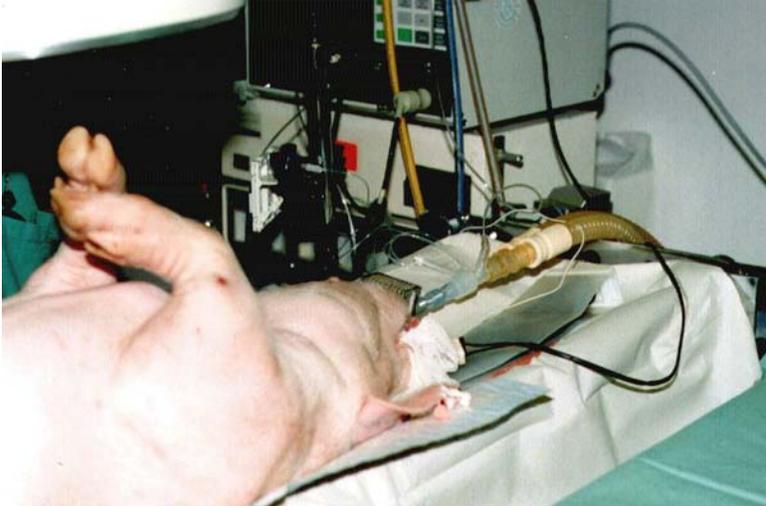
## 1.7. Versuchsablauf

### 1.7.1. Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch eine intramuskuläre Injektion in die Regio nuchae von 20 mg/kg Ketamin (Ketanest<sup>®</sup>, Parke Davies & Co; Berlin), 0,2 mg/kg Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Hofmann-LaRoche AG; Grenzach-Whylen) und 1 mg Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun<sup>®</sup>, Braun-Melsungen AG, Melsungen).

Durch Platzierung einer Venenverweilkanüle (Pfrimmer-Viggo GmbH & Co KG; Erlangen) in die Ohrvene wurde die Narkose intravenös mit Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup>, Byk Gulden; Konstanz) weitergeführt.

Darauf erfolgte die laryngoskopische orotracheale Intubation mit einem 6,0 mm starken Endotrachealtubus (ASID Bonz GmbH; Böblingen) und die kontrollierte maschinelle Beatmung mittels eines Respirators (Servo Ventilator 900 B, Siemens Elema; Elema Solna, Schweden) als intermittierende positive Überdruckbeatmung mit einer inspiratorischen Sauerstoff-Konzentration (FiO<sub>2</sub>) von 100 %.



**Abbildung 8:** Versuchsanordnung *in situ* mit Respirator.

Nach kurzer Beatmung von ca. einer halben Minute wurde die Narkose mit Isofluran als Inhalationsanästhetikum (Forene<sup>®</sup>, Deutsche Abbott GmbH; Wiesbaden) und einem N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>-Gemisch aufrecht erhalten. Die fraktionelle inspiratorische Sauerstoffkonzentration wurde während des gesamten Versuchs durch einen O<sub>2</sub>-Monitor (Oxydig, Drägerwerk AG; Lübeck) bei 50% gehalten. Zur Muskelrelaxation erfolgte die kontinuierliche Infusion von 1 mg/kg x h Pancuroniumbromid (Pancuronium Organon<sup>®</sup>, Organon; Freiburg). Die endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde während des Experiments mittels eines Ultraabsorptionsspektrometers (Ultramat M-CO<sub>2</sub>, Siemens AG; Erlangen) gemessen und durch Variation des Atemminutenvolumens (5 - 7 l/min) auf 4,5 Vol% konstant gehalten. Die Atemfrequenz wurde auf 12 – 15 min<sup>-1</sup> mit einem Zugvolumen von 400 – 500 mL eingestellt sowie das EKG fortlaufend abgeleitet durch vier subkutan an den Extremitäten platzierte Stichelektroden (Hellige Recomed, Hellige GmbH; Freiburg). Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Temperaturüberwachung über eine Rektalsonde.

Zur Unterstützung der Basisanalgesie wurde intermittierend Piritramid (Dipidolor<sup>®</sup>, 0,5 - 1,0 mg, Janssen GmbH; Neuss) gegeben. Die Volumensubstitution erfolgte mit Elektrolyt-Grundlösung (Fresenius AG; Bad Homburg) bzw. mit isotoner Kochsalzlösung (Braun Melsungen AG; Melsungen).

### 1.7.2. Präparation

Alle Versuche erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Vor Beginn der Präparation wurde in der Leistenregion die Behaarung durch Einmalrasierer entfernt. Nach der Desinfektion mit Alkohol und Polyvidonlösung (Braunol<sup>®</sup>, Braun Melsungen AG; Melsungen) erfolgte die sterile Abdeckung des Operationsfeldes. Die kutane Inzision wurde längs des Musculus adductor longus durchgeführt.

Die jeweils unter dem Musculus adductor longus und Musculus vastus medialis liegenden Gefäßstrukturen wurden längs der Vena femoralis stumpf durch Faszien durchtrennung freipräpariert. Darauf folgte das Anschlingen der Arteria femoralis superficialis mit zwei Haltefäden (2-0 Ethicat<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG; Norderstedt) proximal und distal der präparierten Strecke (Abbildung 9). Bei der Präparation der Arteria femoralis superficialis wurde darauf geachtet, daß diese für die Einbringung der Katheter nur auf kurzer Strecke vom umgebenden Bindegewebe abgelöst wurde (2 – 3 cm), um möglichst das gesamte Gefäßbindegewebe erhalten zu können.



**Abbildung 9:** Anschlingen der Arteria femoralis superficialis mit Haltefäden proximal und distal der präparierten Strecke.



**Abbildung 10:** Einbringung des stenttragenden Ballonkatheters in die A. femoralis superficialis.

### **1.7.3. Implantation der Stents**

Es wurden Palmaz-Schatz<sup>®</sup>-Stents (Länge: 9 mm; Johnson & Johnson; USA) verwendet, die auf herkömmliche PTCA-Ballonkatheter (3,5 mm nominaler Durchmesser; Viva, Boston Scientific; USA) montiert wurden.

Nachdem, wie in Paragraph B.1.7.2. beschrieben, die Arteria femoralis superficialis freipräpariert und proximal sowie distal durch Fäden angeschlungen worden war, fügte man dem Gefäß eine circa 5 mm große Inzision bei. Anschließend konnte man durch diese Inzision den mit einem Stent versehenen Ballonkatheter in die Arterie einführen. Die Eindringtiefe des Ballonkatheters betrug 10 bis 15 cm. Nach Positionierung des Ballons an der Zielstelle und Inflation mit einem Druck von 18 atm entfaltete sich auch der darauf montierte Stent.

### **1.7.4. Lokale Medikamenten-Applikation (LDD)**

In der Gruppe A wurde direkt nach der Präparation der Arteria femoralis superficialis die Stentimplantation durchgeführt. Im Gegensatz dazu applizierte man in der Gruppe B zuerst die photosensible Substanz Photofrin<sup>®</sup> danach folgte die Aktivierung des Photofrins<sup>®</sup> mit Licht sowie die Implantation des Stents in die Arterie.

Die Kontrollgruppe (Gruppe K) erhielt weder die lokale Medikamentenapplikation noch die Laserlichtapplikation.

Die Applikation von 2 mL Photofrin<sup>®</sup> (2,5 mg/mL) erfolgte analog einer herkömmlichen Angioplastie mit einem porösen Ballon bei 2 atm. Dabei ist eine Applikation direkt in die Gefäßwand möglich, da der Ballon nach seiner Inflation festen Kontakt mit der Gefäßwand hat. In früheren Untersuchungen zeigte man, daß das pro Zeiteinheit und konstantem Druck ausgetretene Flüssigkeitsvolumen einen linearen Zusammenhang mit der Austrittsfläche besitzt.<sup>48,129</sup>

### **1.7.5. Laserlichtapplikation**

Im infraroten Bereich hat Photofrin<sup>®</sup>, wie schon unter B.1.3. beschrieben, eines seiner Absorptionsmaxima (Graphik 4). Es wurden 100 mW/cm<sup>2</sup> und eine Gesamtenergie von 100 Joule für die Dauer von 1.000 Sekunden und zwar 5 min nach Applikation des Photofrins<sup>®</sup> gegeben. In Dosimetrieversuchen, die von der Arbeitsgruppe Gonschior *et al.*<sup>87,108</sup> durchgeführt wurden, zeigten sich bei Lichttreppen bis 1 Watt und 100 J keine akuten Komplikationen, keine Vasokonstriktion (angiographisch seriell dokumentiert) und keine makroskopischen oder histologischen Veränderungen. Außerdem wurde gezeigt, daß 5 min nach lokaler Applikation der photosensiblen Substanz per porösem Ballon ein Konzentrationsmaximum dieser Substanz in den intimanahen Gefäßwandschichten zu dokumentieren ist.<sup>66</sup>

Die Lichtenergie wurde dem Gewebe mittels einer Lichtfaser zugeführt. Die Lichtfaser wurde in die A. femoralis superficialis eingeführt und an der Stelle positioniert, an der die lokale Applikation von Photofrin<sup>®</sup> erfolgt war. Die exakte Positionierung der Lichtfaser an der mit Photofrin<sup>®</sup> vorbehandelten Gefäßstelle wurde durch Markierung der Eindringtiefe an den Ballonkathetern und der Lichtfaser garantiert. Nach 1.000 Sekunden und erfolgter Applikation der gewünschten Menge Lichtenergie wurde die Lichtfaser aus dem Gefäß entfernt.

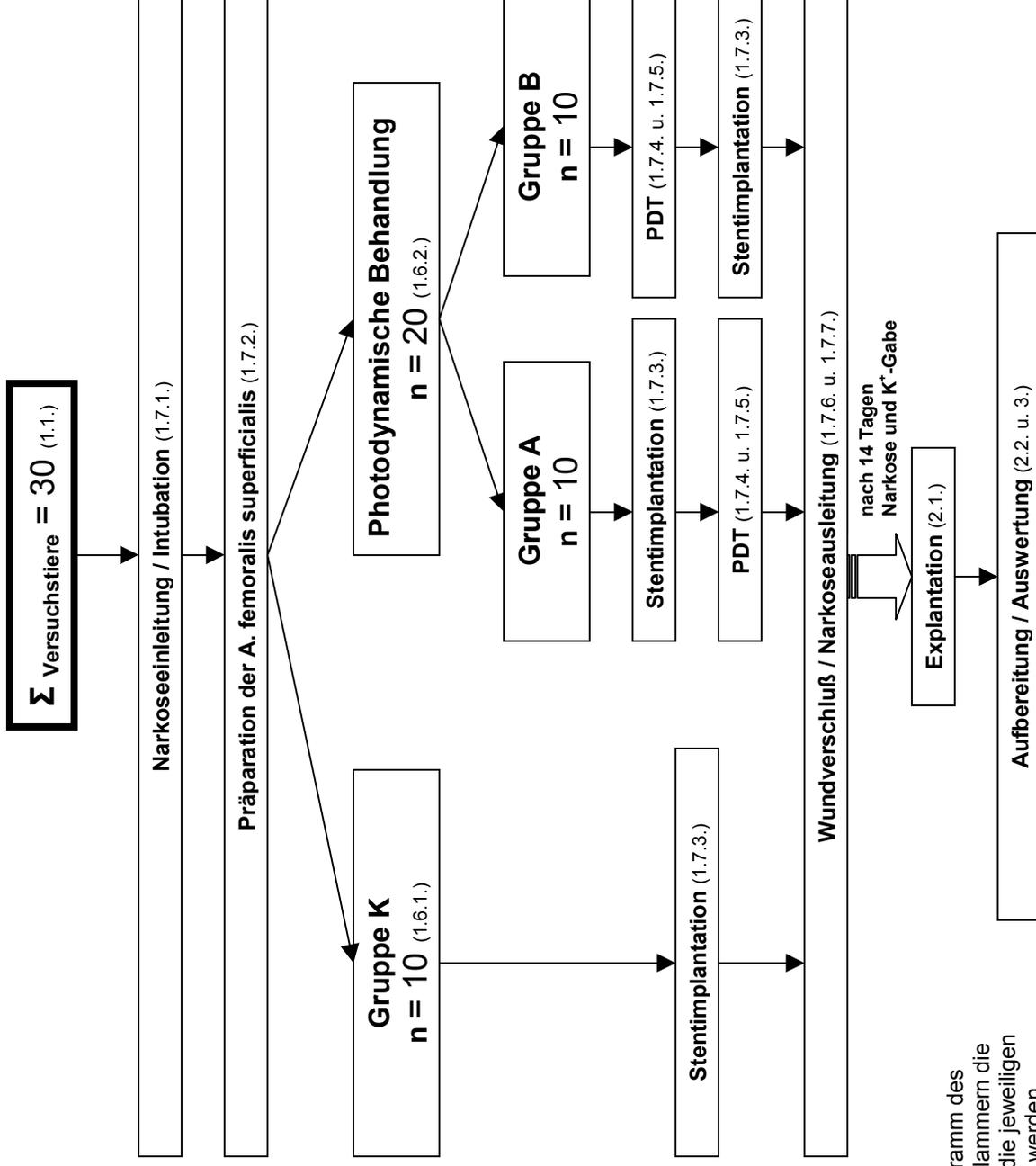
### **1.7.6. Abschluß der Präparation**

Nach Beendigung der Interventionen wurde die Wunde steril verschlossen.

Da die Tiere nach 14 Tagen erneut zur Explantation operiert werden sollten, erfolgte der Verschuß der inzidierten Arterie durch Einzelknopfnah mit nicht resorbierbarem monofilem Faden (6-0 Prolene, Ethicon GmbH & Co KG; Norderstedt). Es folgte ein schichtweiser Wundverschuß mit Adaptation der Muskeln und der Faszien durch Einzelknopfnah (3-0 Ethilon, Ethicon GmbH & Co KG; Norderstedt). Die Haut wurde mit fortlaufender Naht vernäht (2-0 Ethilon, Ethicon GmbH & Co KG; Norderstedt) und die so versorgte Wunde steril verbunden.

### **1.7.7. Postoperative Versorgung der Versuchstiere**

Die Narkose wurde nach Beendigung des Wundverschlusses durch Insufflation von 100% Sauerstoff und kontrollierter Hypoventilation ausgeleitet. Vor der Extubation wurde durch den Tubus intratracheal abgesaugt. Um eine ausreichende Analgesierung in der Aufwachphase und den ersten postoperativen Stunden zu gewährleisten, wurde sowohl Droperidol 0,2 mg/kg (Dehydrobenzperidol<sup>®</sup>, Janssen GmbH; Neuss) *per infusionem* als auch Piritramid 0,1 mg/kg (Dipidolor<sup>®</sup>, Janssen GmbH; Neuss) intravenös verabreicht. Nach dem Rücktransport der Versuchstiere in den Tierstall standen diese unter ständiger Überwachung um sicherzustellen, daß keine medikamentös induzierte Atemdepression auftrat. Die Wunde wurde täglich versorgt.



**Graphik 7:** Flußdiagramm des Versuchablaufs; in Klammern die Abschnitte in denen die jeweiligen Schritte beschrieben werden.

## **2.           Aufarbeitung des Gewebes**

### **2.1.         Explantation und Präparation**

Nach Ablauf des vorgesehenen Zeitintervalls von 14 Tagen wurden die behandelten arteriellen Segmente entnommen.

Die Durchführung der Explantation entsprach den Schritten des Ersteingriffes: Narkoseeinleitung, Narkoseaufrechterhaltung und Präparation.

Bei der erneuten Präparation der Gefäßstrukturen dienten die belassenen Nahtfäden, die bei der Gefäß- und Muskeladaptation benutzt wurden, als Leitstrukturen.

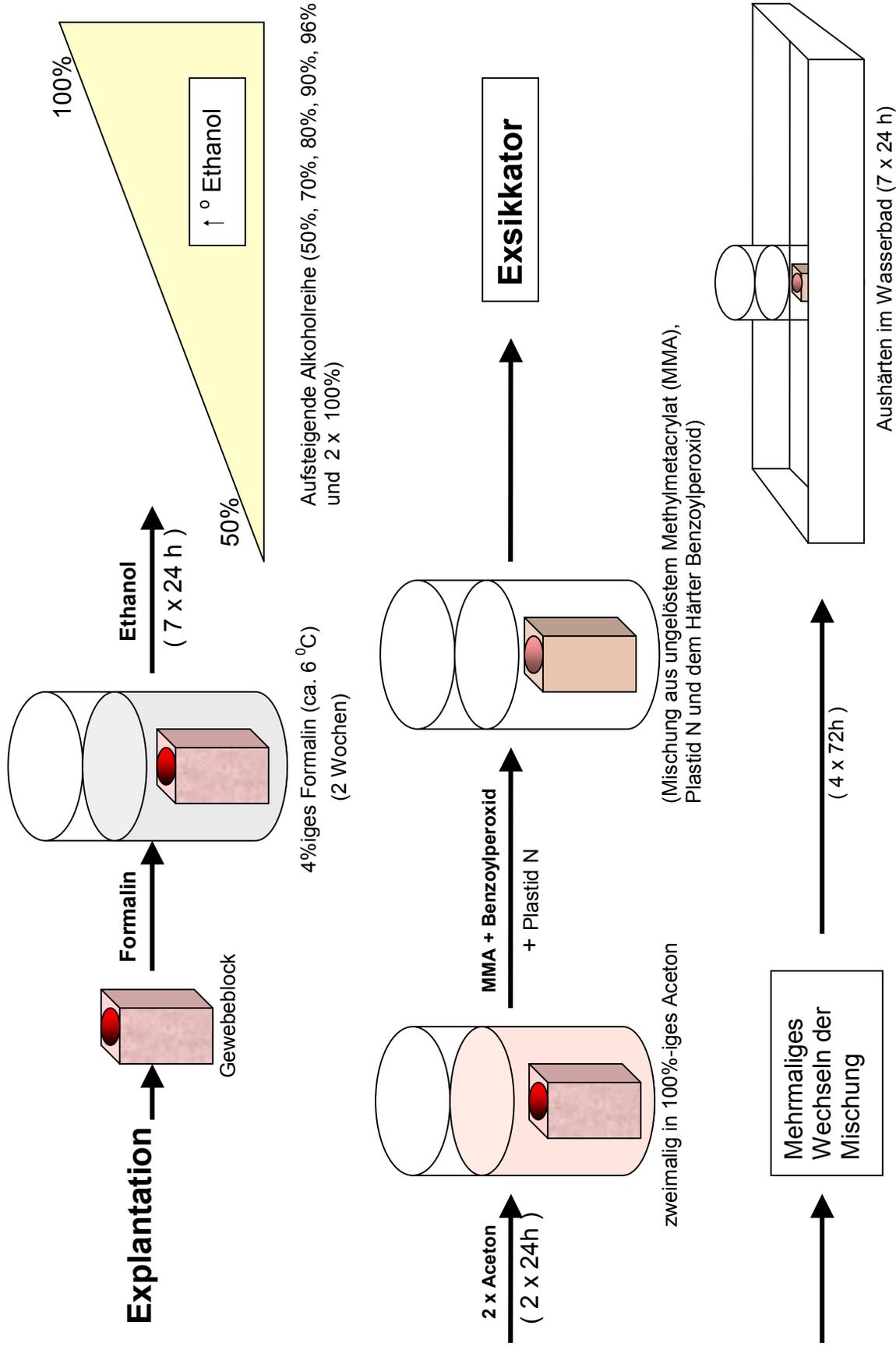
Nach intravenöser Gabe eines 40 mL KCl Bolus (Kaliumchlorid 7,45%, Braun Melsungen AG; Melsungen) und Sistieren der Herzaktion wurden sowohl die Hautnähte der Erstoperation als auch die adaptierten Muskel- und Faszienschichten durchtrennt. Das zu explantierende Gefäß wurde stumpf freipäpariert und mit einem Skalpel mit genügend Sicherheitsabstand proximal und distal des implantierten Stents entnommen. Bei der Explantation wurde größter Wert darauf gelegt, daß die gesamten Strukturen mit Vene, Arterie, Nerven und umgebendem Gewebe *in toto* entfernt werden konnten, um mechanische Artefakte auszuschliessen.

Nach Entnahme des Gewebes erfolgte die Aufbereitung und Auswertung der Präparate nach einem standardisierten Schema.

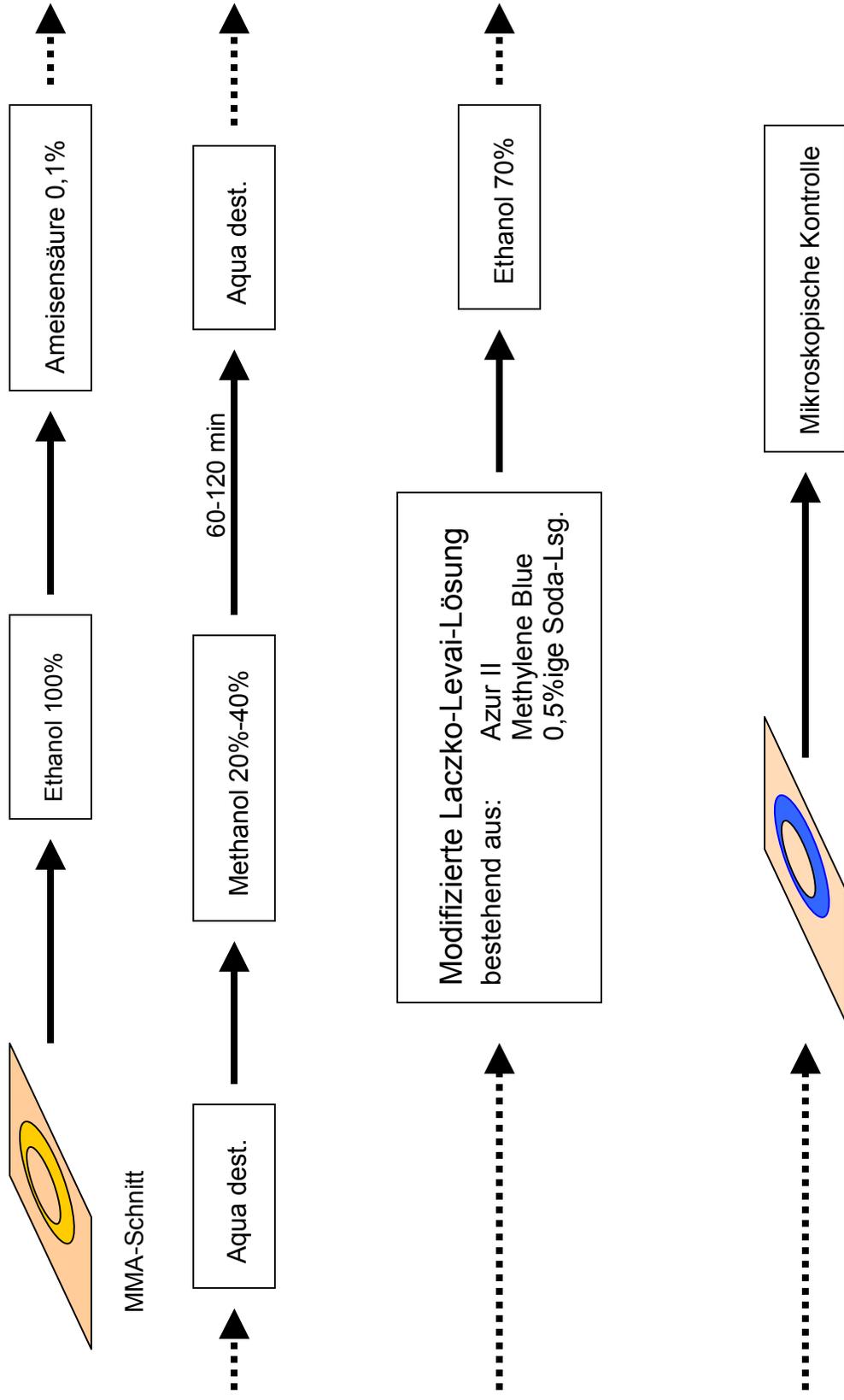
## **2.2. Aufbereiten und Schneiden**

Die explantierten Femoralarterien wurden als Gewebblock sofort in 4%-iges Formalin eingebracht und bei ca. 6°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Nach mindestens zwei Wochen Verweildauer in Formalin folgte die Entwässerung der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 50% - 100%). Für je 24 Stunden wurden die Präparate in immer höher konzentrierten Ethanol-Lösungen (50%, 70%, 80%, 90%, 96% und zwei Mal 100%) eingelegt und schließlich zweimalig in 100%-igem Aceton entfettet. Nachdem die Gewebblöcke in zylindrischen Glasbehältern positioniert waren, konnten sie in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet werden. Es wurde darauf geachtet, daß die Achse des im Gewebblock befindlichen Arteriensegmentes parallel zur Achse des Glasbehälters verlief, so daß bei der weiteren histologischen Aufarbeitung bzw. Schnittführung vollständige Querschnitte resultieren. Eine Mischung aus ungelöstem Methylmetacrylat (Merck, Schuchardt), Plastid N (Röhm und Haas, Röhm Pharma; Darmstadt) und dem Härter Benzoylperoxid (Merck; Schuchardt) wurde zu den einzubettenden Arterien in den Glasbehältern gegeben. Diese Mischung wurde während der Inkubation im Exsikkator jeden dritten Tag gewechselt (insgesamt viermal), nach Abschluß der Inkubation wurden die Methylmetacrylatblöcke im Wasserbad ausgehärtet (ca. eine Woche).

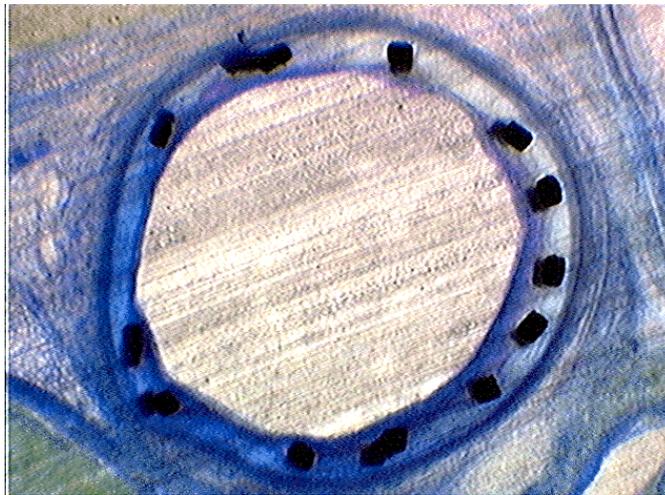


**Graphik 8:** Schematische Zeichnung der Aufbereitungsschritte.

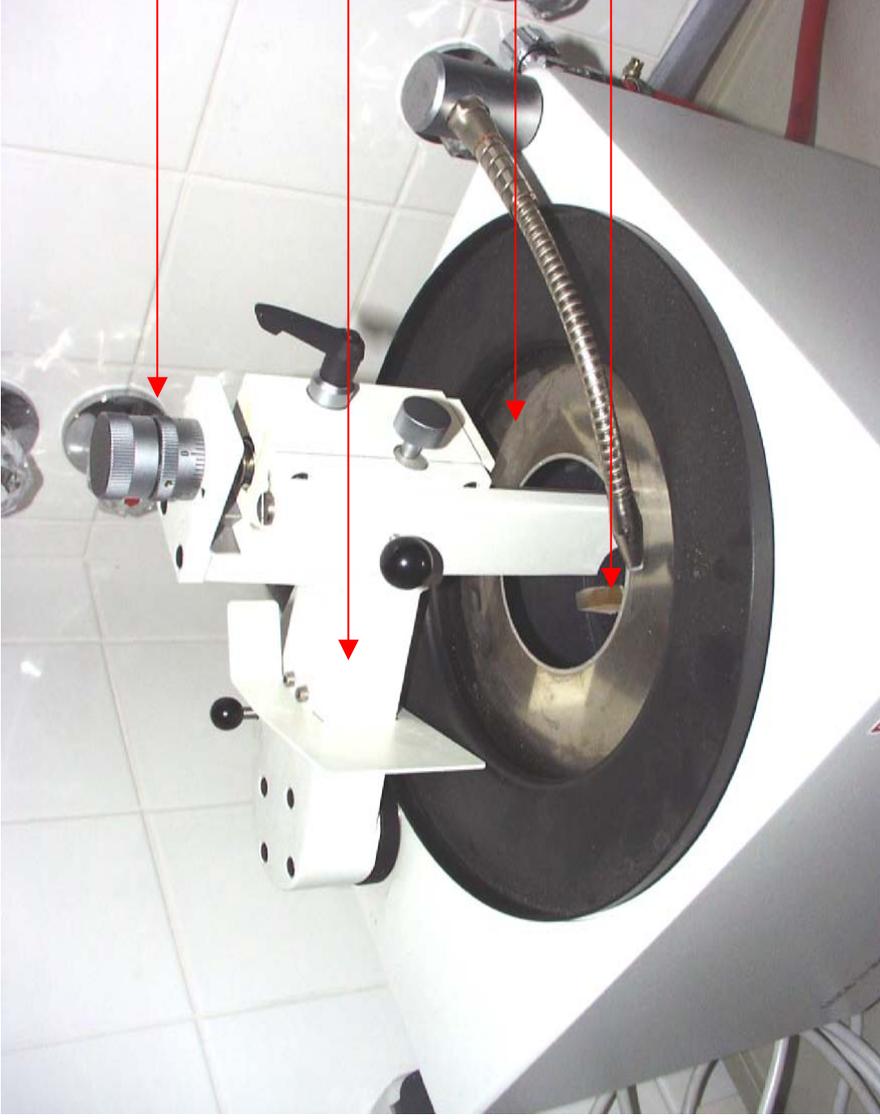


**Graphik 9:** Schematische Darstellung der Färbeschritte bei der modifizierten Laczko-Levai-Färbung.

Die so entstandenen Methylmetacrylatblöcke wurden mit einem Diamant-Sagemikrotom (Sagemikrotom 1600 - Innenlochsäge, Leitz; Wetzlar; Abb.: 15) seriell geschnitten. Die angefertigten Schnitte hatten eine Dicke von 120 – 200  $\mu\text{m}$ . Das Diamantmesserblatt hatte eine Dicke von 300  $\mu\text{m}$ . Aus der Dicke des Diamantenblattes und der speziellen Technik der Schnittführung des Diamant-Sagemikrotoms gingen 300  $\mu\text{m}$  zwischen zwei Schnitten verloren. Es wurde der gesamte Gefäßblock aufgeschnitten, wobei durchschnittlich 45 Schnitte pro Gefäß anfielen. In den mittleren 16 - 18 Schnitten pro Block war der Stent enthalten.



**Abbildung 14:** 120  $\mu\text{m}$  dicker Schnitt eines in Methylmethacrylat eingebetteten und mit modifizierter Laczko-Levai-Lösung gefärbten Gefäßes der Gruppe A; die Schnittführung ist beim unbehandelten Schnitt zu erkennen.



Bestimmung der  
Schnittdicke  
(hier 120 – 200  $\mu\text{m}$ )

Vorschub

Rotierendes Sägeblatt

In Methylmetacrylat  
eingebetteter  
Gewebeblock

Abbildung 15: Sägemikrotom 1600 (Leitz; Wetzlar) – sogenannte Innenlochsäge.

### **2.3. Histologische Färbung**

Die angefertigten Schnitte wurden mindestens 24 Stunden zwischen Glasplatten aufbewahrt, um eine ebene Beschaffenheit zu gewährleisten. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Versuchsgruppen A und B wurde jeder gewonnene Schnitt mit modifizierter Laczko-Levai-Lösung gefärbt. Dazu wurden die zu färbenden Schnitte erst mit 100%-igen Ethanol abgewischt und dann mit 0,1%-iger Ameisensäure für 2 - 5 min angeätzt. Der nächste Schritt war eine kurze Spülung der Schnitte in destilliertem Wasser und ein Eintauchen in 20 - 40%-iger Methanol-Lösung. Nach 60 - 120 min im Methanol-Bad wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser erneut gespült. Die so vorbehandelten Schnitte wurden 5 min lang in einer modifizierten Laczko-Levai-Lösung (bestehend aus: 0,25 g Azur II, 0,25 g Methylen Blau in 100 mL 0,5%-iger Sodalösung) gefärbt und anschließend mit 70%-igem Ethanol differenziert. Zum Schluß erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Färbequalität. Nach einer mehrtägigen Trocknungszeit wurde jeder einzelne gefärbte Schnitt auf einem Objektträger mittels Eukitt (Kindler GmbH; Freiburg) und Deckgläschen (Superior; Marienfeld) blasenfrei eingedeckt (Graphik 9).

Aufgrund der nötigen Fixierung der Gewebelöcke in Polymer (Methylmethacrylat), konnten keine seriellen immunhistologischen Färbungen durchgeführt werden.

### **3.           *Auswertung der Gefäßschnitte***

#### **3.1.       Morphometrie**

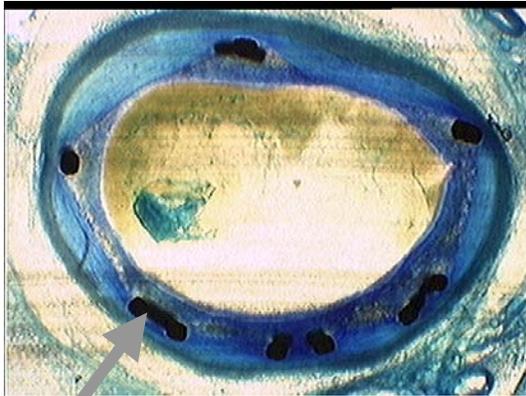
Die Schnitte wurden bei standardisierter 16-facher Vergrößerung eines Makroskopes (Leica M420, Leica; Wetzlar) von einer auf dem Makroskop montierten CCD-Kamera (Sony DXC-930P) einzeln aufgenommen und über ein RGB-Signal an einem Computer (Power PC 9500, Apple Computer; Cupertino; USA) übertragen.

Mittels digitaler Bildverarbeitung (Apple Video Player, Version D1-1.4; Image) wurden die Schnitte planimetrisch vermessen. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme eines geeichten Referenzmaßstabes.

Ein spezielles Datenbanksystem ermöglichte die digitale Speicherung der Daten sowie deren direkten Vergleich (Cumulus; Canto Software).

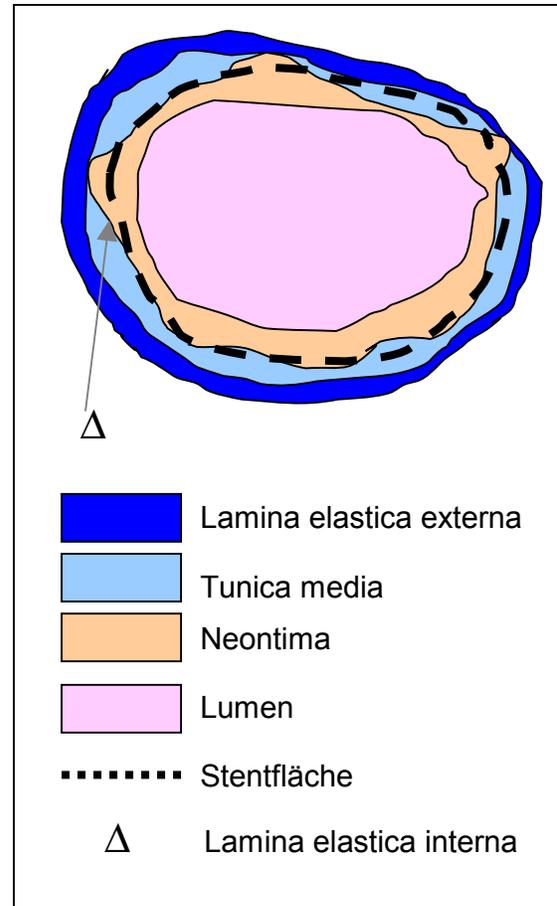
Nach Digitalisierung der Schnitte wurden folgende Parameter gemessen:

- Gefäßlumenfläche
- Intima- bzw. Neointimafläche
- Fläche innerhalb der Lamina elastica interna
- Fläche innerhalb der Lamina elastica externa
- Mediafläche
- Stentlumenfläche



Stentstrut

**Abbildung 16 a** (links) und **b** (rechts):  
 Planimetrisch gemessene  
 Wandschichtenflächen (**b**)  
 an einem Gefäßschnitt (**a**).



Als Gefäßlumen wurde die Querschnittsfläche des Gefäßes definiert, die für den Blutfluß zur Verfügung stand.

Wie in der Abbildung 16b skizziert, wurde als Fläche der Tunica intima bzw. der Intimahyperplasie die Fläche definiert, welche resultiert aus der Differenz der Fläche der Lamina elastica interna (LEI) abzüglich der Fläche des freien Gefäßlumens.

(Fläche der Intimahyperplasie = Fläche innerhalb LEI – Gefäßlumenfläche)

Die Fläche der Tunica media resultiert aus der Differenz der Fläche innerhalb der Lamina elastica externa und der Fläche innerhalb der Lamina elastica interna.

(Fläche der Tunica media = Fläche innerhalb der LEE und Fläche innerhalb der LEI)

Die Stentstruts, also die Metallstreben, die den Stent bilden, boten im Querschnitt ein kreisförmiges Muster. Als Stentfläche wurde diejenige Fläche definiert, die

innerhalb eines Kreises liegt, der durch den Mittelpunkt aller Stentstruts zieht (siehe Abbildung 16a und b).

### **3.2. Statistik**

Die Ergebnisse wurden, sofern nichts anderes angegeben wurde, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung berechnet und dargestellt. Die Mittelwerte der drei Gruppen (Kontrollgruppe, Gruppe A und Gruppe B) wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft. Die sich daraus ergebende Information der signifikanten Unterschiedlichkeit der Daten innerhalb der drei Gruppen legitimierte die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde überprüft, ob zwei beprobte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen. Auf diese Weise wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der drei Vergleichsexperimente (Gruppe A versus Gruppe B oder zwischen Gruppe A versus Kontrollgruppe oder Gruppe B versus Kontrollgruppe) herausgearbeitet. Die Nullhypothese wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 0,6\%$  ( $p < 0,00625$ ) verworfen, welche die geprüften Daten als signifikant bezeichnet.

## **C. Ergebnisse**

### **1. Allgemein**

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen verstarb ein Versuchstier perioperativ an einer narkoseinduzierten Hyperthermie (Tabelle 2). Das Tier war zuvor in der Gruppe A randomisiert worden. Die Gefäße des perioperativ verstorbenen Tieres sind nicht in der Auswertung mitberücksichtigt worden (Abbildung 17).

### **2. Makroskopische Beurteilung**

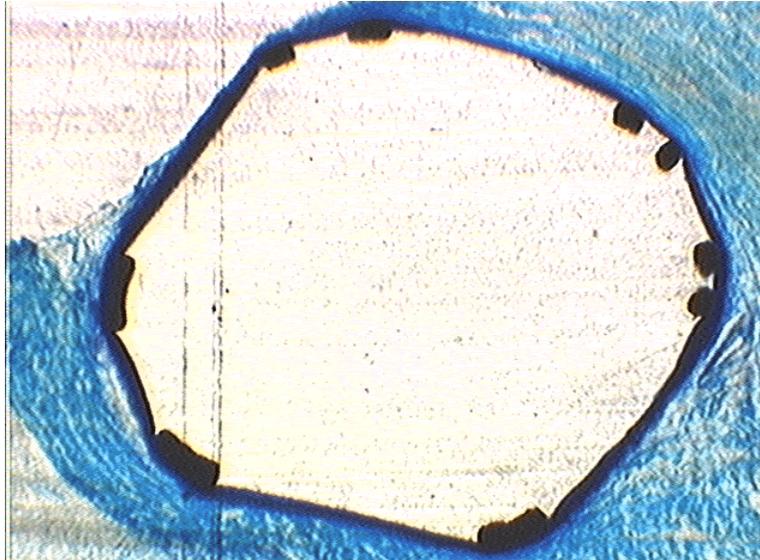
Die gewonnenen Präparate zeigten makroskopisch keine Hinweise auf Verletzungen der Arterien, wie z.B. perivaskuläre Hämatome oder Unterbrechung der Gefäßzirkumferenz, durch die Anwendung des Katheters.

### **3. Mikroskopische Beurteilung**

Die mikroskopische Untersuchung der Schnittpräparate ergab keine Hinweise auf Verletzungen des Gewebes, die von der operativen und perioperativen Behandlung herrühren könnten.

Auch Verletzungen der Gefäßarchitektur, der perivaskulären Struktur oder gar Beschädigungen der Stents (z.B. Anordnung der Struts ) waren nicht zu erkennen.

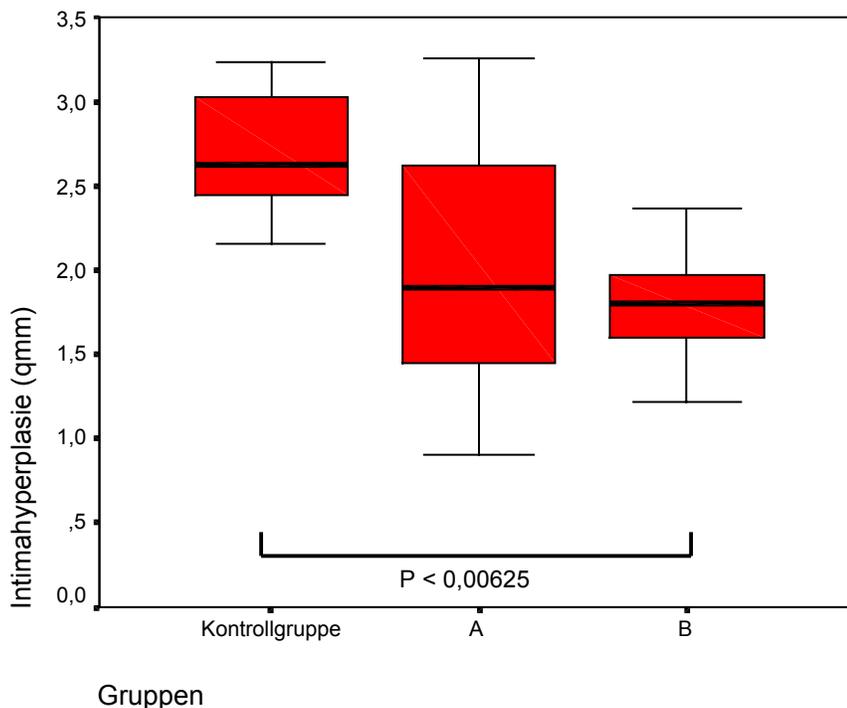
Die Lamina elastica interna, die den Stentstruts anlag, erfuhr aufgrund der Scherkräfte eine Deformation, im Sinne einer Streckung (Abbildung 17).



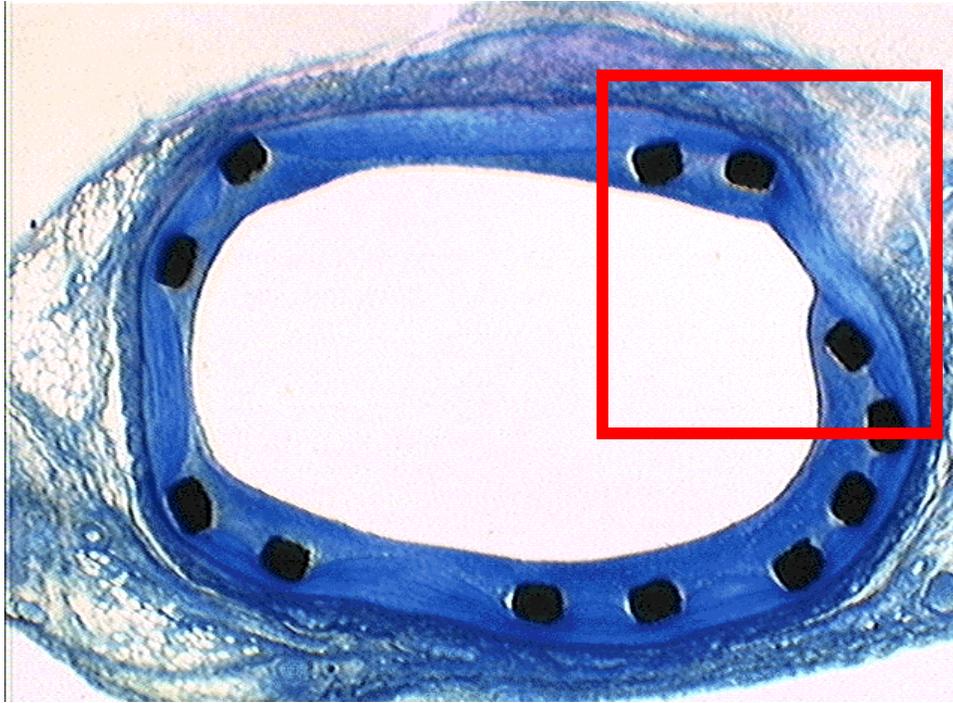
**Abbildung 17:** Repräsentativer Schnitt der A. femoralis superficialis nach Stentimplantation vom perioperativ verstorbenen Versuchstier. Durch die Stentstruts gestreckte Lamina elastica interna und Tunica media [40fache Vergrößerung].

## 4. *Planimetrische Ergebnisse*

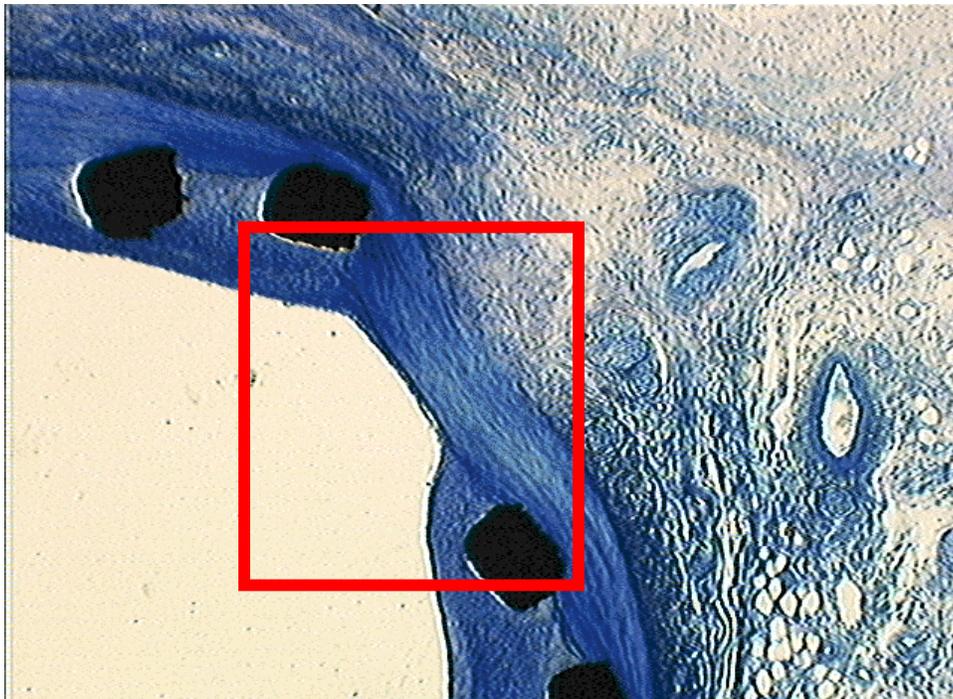
Bei den planimetrischen Untersuchungen der Neointimafläche ergab sich eine signifikant reduzierte Intimahyperplasie in der Gruppe B (entspricht „1.PDT+2.Stent“) im Vergleich zur Neointimafläche der Kontrollgruppe (mit  $p = 0,00004$ ) (Graphik 10). In der Kontrollgruppe maß die Neointimafläche  $2,68 \pm 0,35 \text{ mm}^2$  (Abbildung 23). In der Gruppe A ergab sich eine Intimahyperplasiefläche von  $2,20 \pm 1,12 \text{ mm}^2$ . In Gruppe B hatte die Intimahyperplasie eine Fläche von  $1,71 \pm 0,48 \text{ mm}^2$  (Abbildungen 18 – 21 und 22).



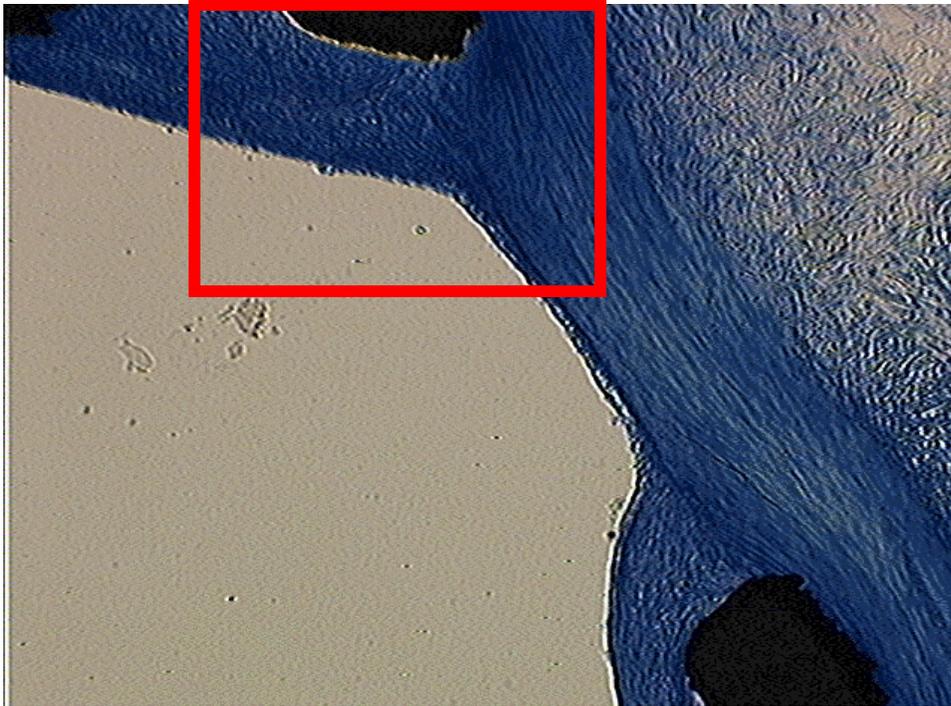
**Graphik 10:** Boxplot-Darstellung der gemessenen Intimahyperplasie aller drei Gruppen. Dargestellt sind die Mediane und die Standardabweichungen. Signifikanz besteht wenn  $p < 0,00625$ .



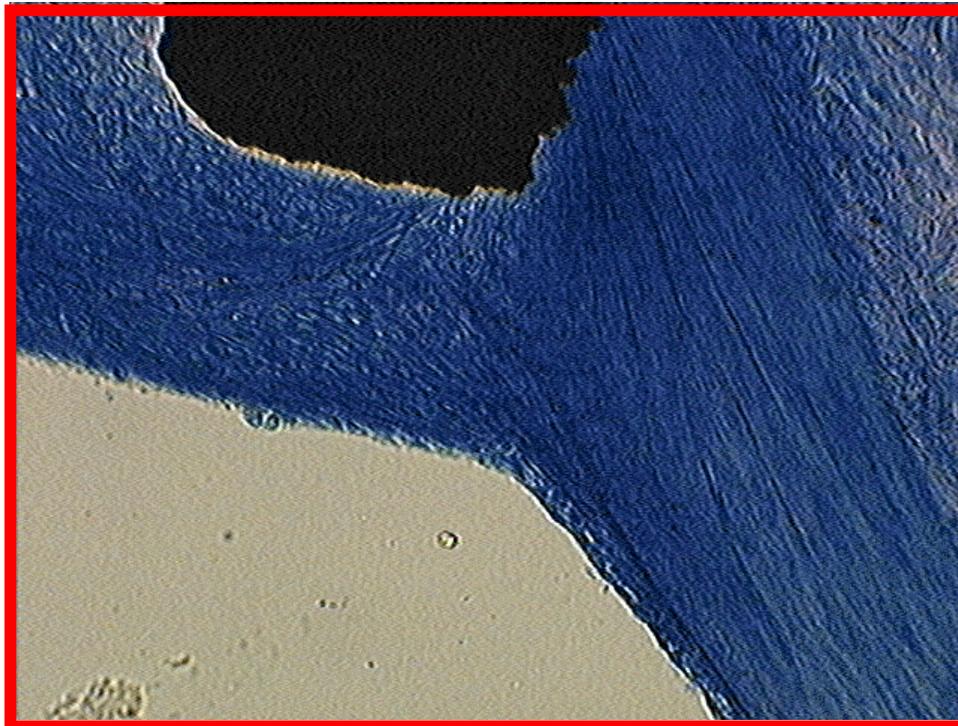
**Abbildung 18:** Repräsentativer Gefäßschnitt der Gruppe A. [40fache Vergrößerung; Dünnschliff]. Die Tunica intima ist über den Stentstruts proliferiert und engt das Gefäßlumen ein. Der rot markierte Bereich ist in Abbildung 19 vergrößert dargestellt.



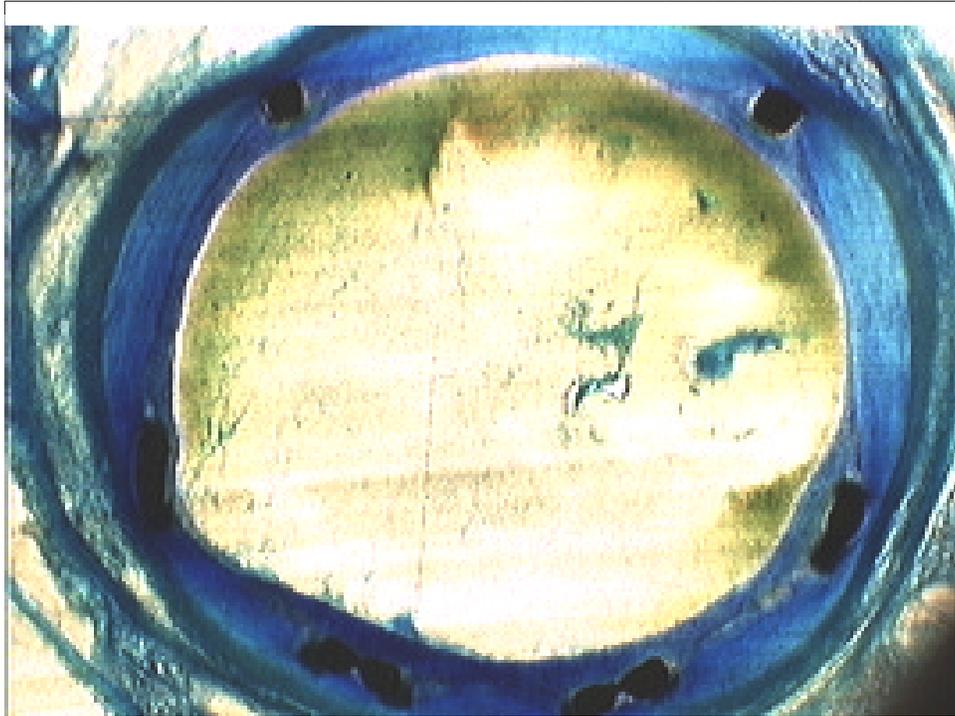
**Abbildung 19:** Die Tunica media wird von und zwischen den Stentstruts gespannt. Eine Intimahyperplasie fehlt am stentfreien Bereich [80fache Vergrößerung; Dünnschliff]. Der rot markierte Bereich ist in Abbildung 20 vergrößert dargestellt.



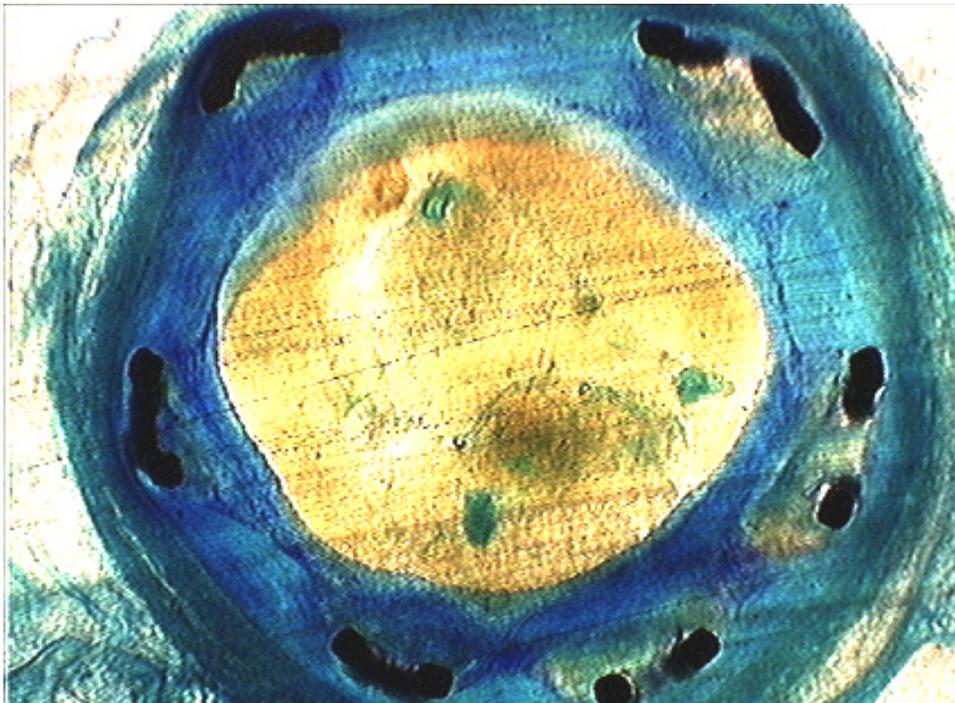
**Abbildung 20:** Intimahyperplasie ist eine zellreiche Formation [160fache Vergrößerung; Dünnschliff]. Der rot markierte Bereich ist in Abbildung 21 vergrößert dargestellt.



**Abbildung 21:** 320fache Vergrößerung der Tunica intima nahe dem Stent [Dünnschliff]. Übergang vom einschichtigen Endothel in vielschichtiges Intimahyperplasieareal.



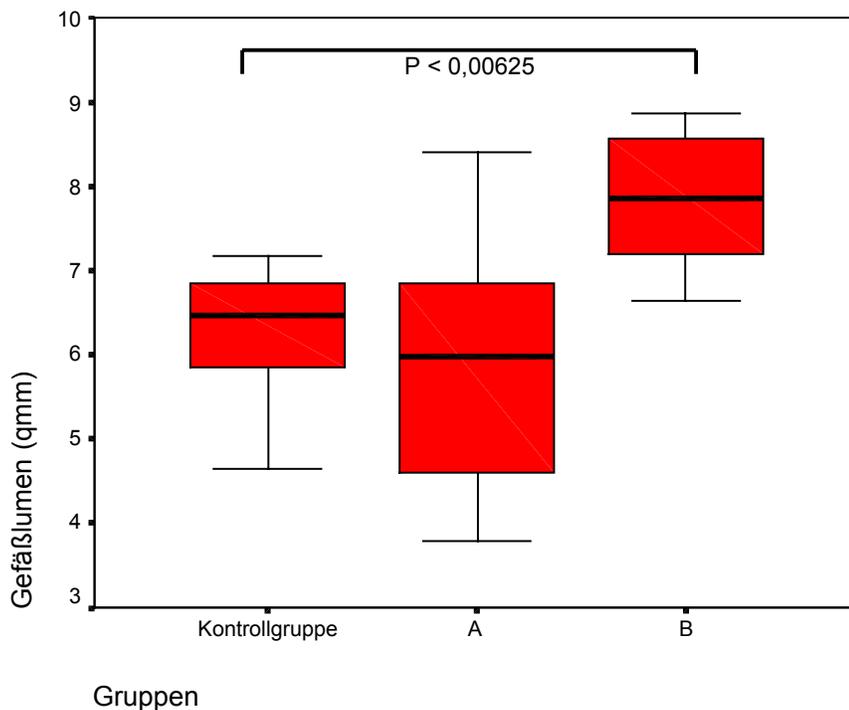
**Abbildung 22:** Repräsentativer Schnitt der Gruppe B [40fache Vergrößerung].



**Abbildung 23:** Repräsentativer Schnitt der Kontrollgruppe [40fache Vergrößerung].

Die Gefäßlumina der Behandlungsgruppe B hatten eine signifikant größere Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $p = 0,000008$  (Graphik 11). Zwischen den anderen Gruppenkombinationen ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen.

Die Kontrollgruppe hatte Gefäßlumina mit einer Fläche von  $6,29 \pm 0,76 \text{ mm}^2$ . In der Gruppe A hatte das Gefäßlumen eine Fläche von  $5,93 \pm 1,64 \text{ mm}^2$  und in der Gruppe B eine Fläche von  $7,31 \pm 2,24 \text{ mm}^2$ .

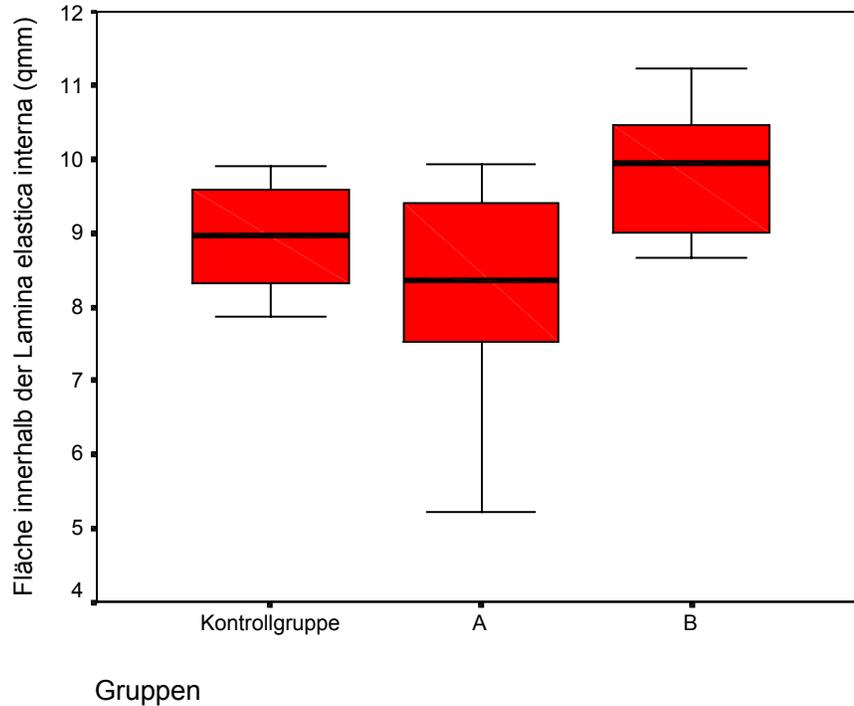


**Graphik 11:** Boxplot-Darstellung der gemessenen Lumina aller drei Gruppen. Dargestellt sind die Mediane und die Standardabweichungen. Ein signifikanter Unterschied besteht, wenn  $p < 0,00625$ .

Sowohl die Fläche, die von der Lamina elastica interna (LEI) eingeschlossen wird, als auch die Fläche innerhalb der Lamina elastica externa (LEE) waren zwischen den drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,103$  bzw.  $p = 0,023$ ; Graphik 11 und 12).

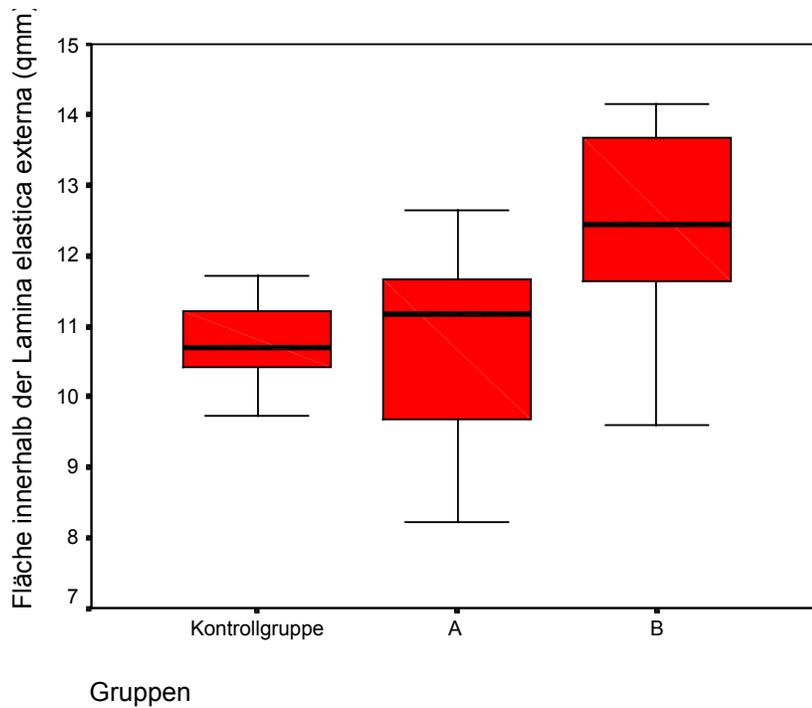
Die LEI-Fläche der Kontrollgruppe betrug im Mittel  $8,97 \pm 0,75 \text{ mm}^2$ , in der Gruppe A  $8,14 \pm 1,62 \text{ mm}^2$  und in der Gruppe B  $9,56 \pm 1,13 \text{ mm}^2$ .

Die Fläche der Lamina elastica externa hatte in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von  $10,78 \pm 0,88 \text{ mm}^2$  und in der Gruppe A eine Fläche  $10,76 \pm 1,60 \text{ mm}^2$  sowie in der Gruppe B eine Fläche von  $11,81 \pm 3,21 \text{ mm}^2$ .

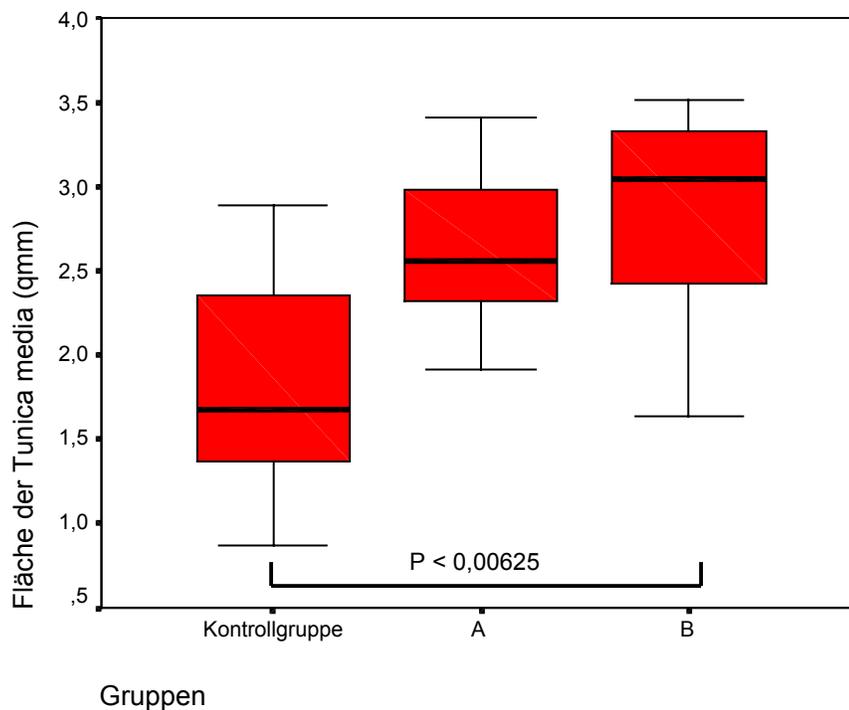


**Graphik 13:** Boxplot-Darstellung der Fläche innerhalb der Lamina elastica interna. Kein signifikanter Unterschied bei  $p = 0,103$ . Dargestellt sind die Medianwerte und die Standardabweichungen.

Es ergab sich kein Unterschied im Bezug auf die Flächen innerhalb der LEI und der LEE, jedoch war die Tunica media in der Gruppe, welche die Photodynamische Therapie vor der Stentimplantation erhielt (Gruppe B), signifikant breiter als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,0021$ ). (Tunica media in der Kontrollgruppe:  $1,81 \pm 0,65 \text{ mm}^2$ , in der Gruppe A:  $2,62 \pm 0,53 \text{ mm}^2$  und in der Gruppe B:  $2,79 \pm 0,77 \text{ mm}^2$ ).

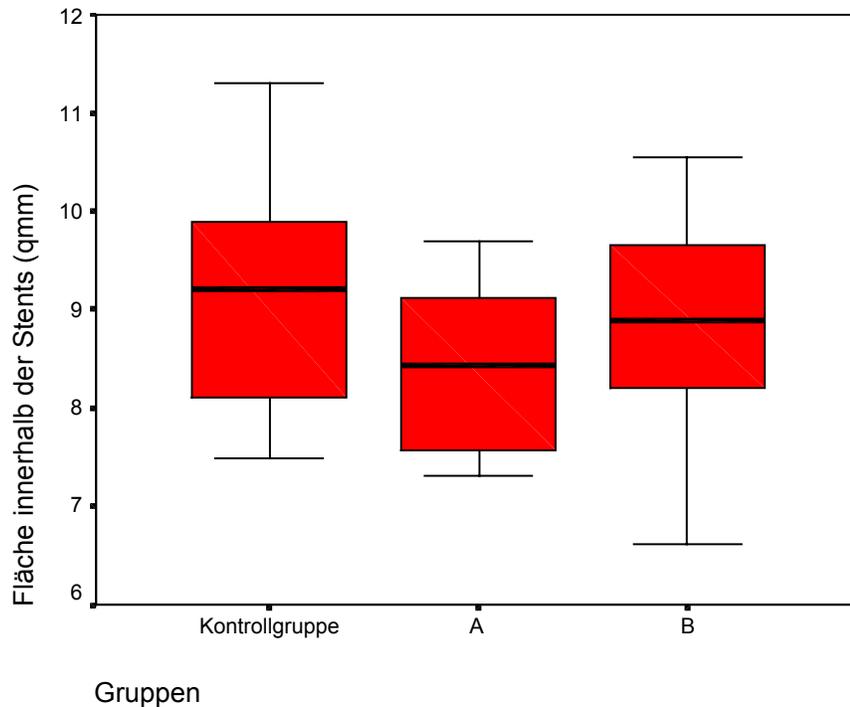


**Graphik 13:** Boxplot-Darstellung der Fläche, die von der Lamina elastica externa umschlossen wird; kein signifikanter Unterschied bei  $p = 0,023$ . Dargestellt sind die Mediane und die Standardabweichungen aller drei Gruppen.



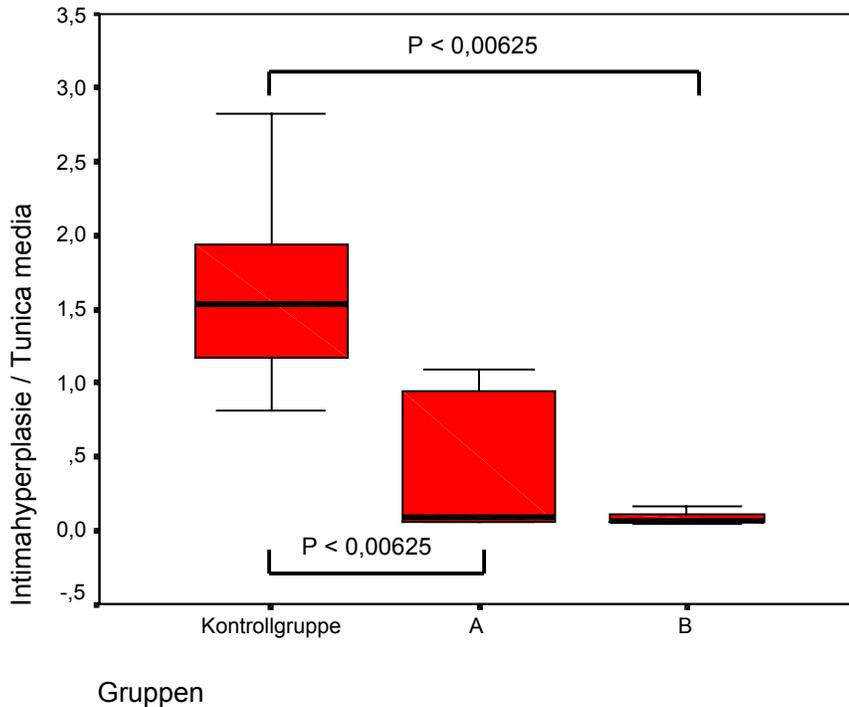
**Graphik 14:** Boxplot-Darstellung der Tunica media Fläche aller drei Gruppen. Dargestellt sind die Mediane und die Standardabweichungen. Ein signifikanter Unterschied ist dann anzunehmen, wenn  $p < 0,00625$ .

Der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Stentfläche lagen bei  $9,13 \pm 1,19 \text{ mm}^2$  in der Kontrollgruppe. Diese unterschieden sich weder von den Stentflächen der Gruppe A ( $8,43 \pm 0,90 \text{ mm}^2$ ) noch von der Gruppe B ( $8,91 \pm 1,16 \text{ mm}^2$ ). Bei all den Gruppen wurden Stents mit einem Durchmesser von 3,5 mm verwendet, wie im Abschnitt B.1.3 schon erwähnt. Der p-Wert war mit 0,579 nicht signifikant (Graphik 15).



**Graphik 15:** Darstellung der Fläche innerhalb der Stentstruts als Boxplots. Kein signifikanter Unterschied bei  $p = 0,579$ . Dargestellt sind die Medianwerte und die Standardabweichungen aller drei Gruppen.

Die Relation von Fläche der Intimahyperplasie zur Fläche der Tunica media zeigte nach Behandlung mit PDT eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Behandlung der Gefäße ohne photodynamische Therapie. Sowohl in der Gruppe B als auch in der Gruppe A war das Verhältnis Neointima zur Media signifikant kleiner als das der Kontrollgruppe ( $p = 0,0000011$  bzw.  $p = 0,001$ ). Untereinander unterschieden sich die zwei photodynamisch behandelten Gruppen in diesem Punkt nicht signifikant. (Kontrollgruppe:  $1,65 \pm 0,61$ ; Gruppe A:  $0,09 \pm 0,002$ ; Gruppe B:  $0,10 \pm 0,07$ ).

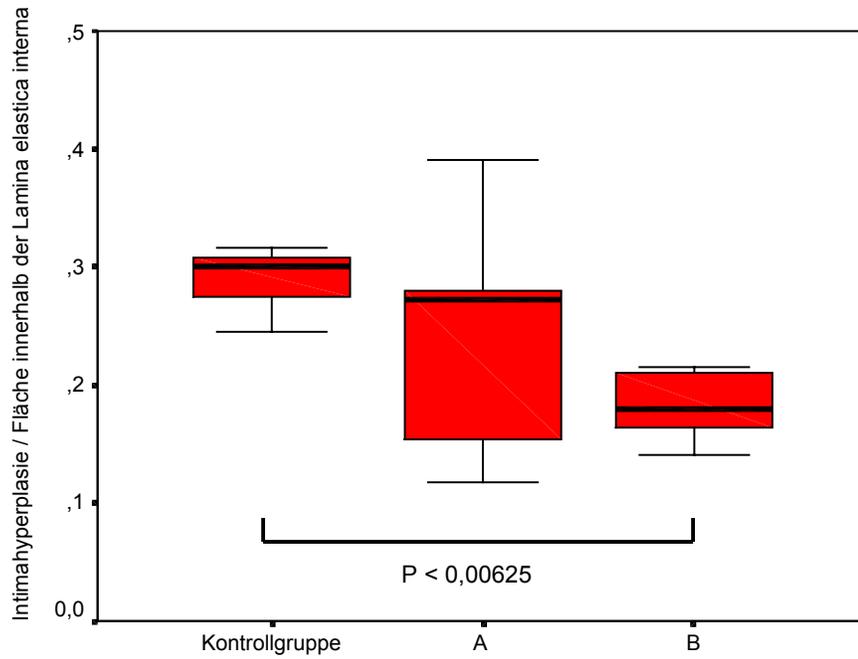


**Graphik 16:** Boxplot-Darstellung vom Verhältnis Intimahyperplasie zur Fläche der Tunica media. Dargestellt sind die Mediane und die Standardabweichungen.

Das Verhältnis von Intimafläche zur Fläche innerhalb der Lamina elastica interna entspricht dem Stenosierungsgrad, den das Gefäßlumen durch die Intimahyperplasie erfährt.

Der Stenosierungsgrad der Gefäße war in der Gruppe B signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,0011$ ). Man sah keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei PDT-Varianten oder zwischen „1.Stent+2.PDT“ und Kontrollgruppe. Der Mann-Whitney-Test ergab folgendes:

- Signifikanter Unterschied mit  $p = 0,00000011$  bei Gruppe B versus Kontrollgruppe.
- Kein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,181$  bei Gruppe B versus Gruppe A.
- Kein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,181$  bei Gruppe A versus Kontrollgruppe.



Gruppen

**Graphik 17:** Boxplot-Darstellung der Relation von Intimahyperplasie zur Fläche der Lamina elastica interna. Dargestellt sind die Medianwerte und die Standardabweichungen. Ein signifikanter Unterschied ist dann anzunehmen, wenn  $p < 0,00625$ .

## D. Diskussion

Die perkutanen transluminalen Revaskularisationsverfahren haben sich zu einem wesentlichen Verfahren in der klinischen Praxis zur Behandlung von symptomatischen Koronarstenosen entwickelt mit weltweit ca. 1,3 Millionen Eingriffen pro Jahr.<sup>99</sup> Diese Zahl ist weiterhin steigend. Die koronare Stentimplantation wurde im Jahr 2000 bei ca. 80% aller weltweit durchgeführten perkutanen transluminalen Koronarinterventionen eingesetzt.<sup>17</sup>

Limitiert wird die Stentimplantation durch die Zahl an Rezidivstenosen. Im Jahr 2000 haben ungefähr 150.000 von insgesamt 1 Million durchgeführten Stentimplantationen eine Behandlung ihrer In-Stent Restenose benötigt.<sup>17</sup> So stellt die In-Stent Restenose ein signifikantes klinisches Problem dar, deren Inhibition oder gar Prävention eine große Bedeutung zukommt.

Aus pathophysiologischer Sicht stellen In-Stent Restenosen koronarer und peripherer Arterien einen Folgezustand dar, der durch die Traumatisierung der Gefäßwand nach Stentimplantation bedingt wird. Die Gewebhyperplasie ist der wichtigste Mechanismus, der zur sekundären Lumeneinengung führt und bei peripheren und koronaren Restenoselokalisierungen vergleichbar ist.

Als ineffektiv erwiesen sich verschiedene systemisch applizierte Medikamente, die zur Prophylaxe der Restenose in Koronararterien und peripheren Arterien untersucht worden sind und unterschiedliche pathophysiologische Wirkungsmechanismen beeinflussen.<sup>47,49</sup>

Ein neuer Therapieansatz mit „Sirolimus“-beschichteten Stents ergab in ersten klinischen Studien eine minimale Intimahyperplasie nach zwölf Monaten.<sup>126,127</sup> Sirolimus (Rapamycin), ein Makrolid, scheint ein potenter Inhibitor der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen zu sein.<sup>127</sup> Es bedarf weiterer Untersuchungen um diese Ergebnisse zu validieren und um insbesondere die potentiellen Nebenwirkungen wie subakute Thrombose etc. zu analysieren.

An einem experimentellen Modell evaluierten wir die Möglichkeit der Inhibition der In-Stent Restenose der Arteria femoralis mittels Photodynamischer Therapie. Insbesondere war uns wichtig zu erkennen, zu welchem Zeitpunkt in Verbindung mit der Stentimplantation die Photodynamische Therapie (PDT) erfolgen sollte.

Dies alles wurde auf der Basis neuerer Untersuchungen konzipiert, welche die Fähigkeit der PDT zur Reduktion bis hin zur Inhibition der Intimahyperplasie im Tiermodell zeigten.<sup>35,45,61,71,90,94,141,147</sup>

## **1. Versuchsmodell**

Um interventionelle Techniken zu prüfen, sind experimentelle Ansätze unverzichtbar. Je mehr der Metabolismus, die Anatomie und die Histologie des Tiermodells der klinischen Situation entsprechen, desto aussagekräftiger sind die aus den Experimenten erhaltenen Informationen. Im Tiermodell werden weder die atherosklerotische Herzerkrankung noch Restenosen analog der klinischen Situation entwickelt. Aus diesem Grund muß der Restenosereiz artifiziell gesetzt werden, wie zum Beispiel in der vorliegenden Arbeit durch die Implantation von Stents.

Kleintiermodelle (Ratten, Hamster oder Kaninchen) sind leichter verfügbar. Jedoch erlaubt der Einsatz eines Großtiermodells den direkten Gebrauch von in der Klinik zum Einsatz kommenden Kathetern.

Die Arteria carotis communis der Ratte wird häufig als Modell für Restenose verwendet. Die Struktur der Rattengefäße unterscheidet sich jedoch deutlich vom Aufbau humaner Arterien. So finden sich bei der Ratte relativ wenig elastische Fasern in der Tunica media. Der subendotheliale Raum der Ratte ist im Gegensatz zum humanen frei von sowohl glatten Muskelzellen als auch kollagenen und elastischen Fasern.<sup>88</sup> Darüber hinaus besitzen Rattengefäße keine Vasa vasorum, die eine wesentliche Rolle bei der Substanzverteilung und Reaktion auf mechanische Verletzung spielen.<sup>152</sup>

Die Möglichkeit einer experimentell induzierbaren Atherosklerose macht das Kaninchen zum gut analysierten Modell der Restenose.<sup>120-123</sup> Jedoch weisen periphere Arterien des Kaninchens, deren Größe in etwa der humaner Koronararterien entsprechen, relativ zahlreiche Seitenäste auf und sind daher für die Anwendung der lokalen Medikamentenapplikation als ungünstig anzusehen. Erschwerend für die Anwendung von Kathetern wird weiterhin die hohe Vasoreaktivität der Gefäße angesehen.<sup>88</sup>

Das Koronarsystem ausgewachsener Hunde weist bezüglich des humanen nahezu identische Größenverhältnisse auf.<sup>120</sup> Jedoch unterscheiden sich proliferative Reaktionen nach Gefäßverletzungen deutlich von humanen Restenoseläsionen. Hierfür könnte unter anderem die relativ hohe fibrinolytische Aktivität des Blutserums bei Hunden verantwortlich sein.

Paviane<sup>41</sup> und Rhesusaffen<sup>145</sup> erlauben zwar den Einsatz von klinisch relevanten Kathetersystemen, es kommt jedoch zu uneinheitlichen Reaktionen der Gefäßwand nach standardisierten Verletzungen der Arterien innerhalb der gleichen Spezies. Die Ergebnisse therapeutischer Studien mit diesen Tieren sind daher schwer einzuschätzen. Außerdem sind diese Tiere sehr teuer, aufwendig zu halten und in Gefangenschaft relativ anfällig für vital bedrohliche Erkrankungen.<sup>88</sup>

Das kardiovaskuläre System des Schweines weist von den genannten Tieren die größte Ähnlichkeit mit dem des Menschen auf. So sind histologisches Erscheinungsbild der Arterien sowie Größe des Koronarsystems von Schwein und Mensch nahezu identisch.<sup>22</sup> Die peripheren Arterien sind operativ leicht zugänglich und bezüglich ihrer Durchmesser für Katheterinterventionen mit klinisch verwendetem Material geeignet. Wie immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen von humanem Atherektomiegewebe bisher gezeigt haben,<sup>15,30</sup> kann am Schweinmodell die Neointimabildung in humanen Gefäßen am genauesten demonstriert werden.<sup>52,91</sup> Im Gegensatz zu Kleintiermodellen beinhaltet die Verletzungsantwort nach Ballonläsion oder Stentimplantation beim Menschen und beim Schwein eine substantielle Thrombusformation. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu den Restenosemodellen von Ratte und Kaninchen ist die nach

einer experimentell gesetzten Verletzung im Schweinmodell beobachtete Neointimaverdickung, die ähnlich der des Menschen reich an glatten Muskelzellen ist.<sup>85</sup> Schweine entwickeln zudem im Laufe ihres Lebens spontan eine Atherosklerose mit Plaques, die entsprechend der des Menschen gleiche Prädispositionsstellen und Morphologie aufweisen.<sup>37,78,153</sup> Schweine entwickeln zudem analog zum Menschen Folgekrankheiten wie apoplektischer Insult und Myokardinfarkt.

Nachteilig für die praktische Durchführung der Versuche ist die relativ hohe Wahrscheinlichkeit, mit der Schweine bei einer Narkoseführung mit volatilen Anästhetika eine maligne Hyperthermie entwickeln.<sup>115</sup>

## **2. *Medikamentenapplikation***

Die lokale Medikamentenapplikation bietet den Vorteil, daß sie zu einem höheren Medikamentenspiegel im Zielgewebe führt, als er durch die systemische Applikation erreicht werden kann.<sup>95</sup> Dies hat auch den gewünschten Effekt, daß systemische Nebenwirkungen, wie zum Beispiel nach intravenöser Gabe eines Medikamentes, auf ein Minimum reduziert werden oder gar nicht auftreten.

In dieser Studie wurde die phototoxische Substanz Photofrin<sup>®</sup>, die nach systemischem Einsatz in verschiedenen tierexperimentellen Studien, aber auch im klinischen Gebrauch zu Photodermatosen führen kann, eingesetzt. Bei lokaler Applikation einer geringen Menge dieser photosensiblen Substanz zeigten die Versuchstiere in unseren Untersuchungen keinerlei kutane Irritationen.

### **3. Verfahren der lokalen Medikamentenapplikation**

Als Mittel zur lokalen intravaskulären Medikamentenapplikation wurden poröse Ballons eingesetzt, die, wie im Abschnitt B.1.4. beschrieben, 50 über die ganze Ballonperipherie symmetrisch verteilte Poren (Durchmesser von 25 µm) besitzen. Die Anwendung des porösen Ballons ist durch seine einfache Handhabung charakterisiert, die der eines normalen Angioplastieballons entspricht. Die Voraussetzungen für die hier durchgeführten lokalen PDT-Verfahren wurden in umfangreichen Vorarbeiten spezifiziert.<sup>51,95</sup>

### **4. Photosensible Substanz**

Die photodynamische Reaktion kommt zustande, wenn eine lichtensitive Komponente (Photosensitizer), Licht und molekularer Sauerstoff vorhanden sind. PDT ist letztendlich eine zytotoxische Behandlung, die Apoptosevorgänge in den Zellen induziert. Ziel dieser Behandlung war die Minimierung der Neointimahyperplasie am stentimplantierten Gefäß. Hsiang *et al.* zeigten, daß Photofrin<sup>®</sup> im Rattenmodell vor Induktion einer signifikanten Intimahyperplasie appliziert werden muß, um eine bedeutende Reduktion der Intimahyperplasie zu erzielen.<sup>57</sup> Zusätzlich zeigten Manyak *et al.* sowie Gonschior *et al.*, daß die höchsten Photofrinkonzentrationen in der Media zu erkennen waren, bevor die Intimahyperplasie evident wurde, so daß aus den oben genannten Gründen eine rasche Illumination der photosensiblen Substanz nach Applikation ins Zielgewebe erfolgen sollte.<sup>81</sup>

Das hydrophobe Fluorochrom Photofrin<sup>®</sup> ist die zu 70% gereinigte Form des Hämatoporphyrinderivates, bestehend aus monomeren und oligomeren Porphyrinen. Wegen seiner lipophilen Eigenschaften reichert sich diese photosensible Substanz intrazellulär und insbesondere intramitochondrial an (in

geringem Maße auch intranukleär, in der Zellmembran und an den Lipoproteinen).<sup>86,97</sup>

Die subzelluläre Lokalisation des Photosensitizers spielt eine Schlüsselrolle für das Resultat der PDT, denn der Aufenthaltsort der photosensiblen Substanz determiniert die Stelle des primären Wirkorts. Faktoren, die das subzelluläre Lokalisationsmuster beeinflussen, sind die physiko-chemischen Eigenschaften des Photosensitizers wie Lipophilie oder Ladung.

Im Gegensatz zu photosensiblen Wirkstoffen, die sich nur in Lysosomen oder der Plasmamembran anreichern, induzieren Photosensitizer, die wie Photofrin<sup>®</sup> hauptsächlich in der mitochondrialen Membran lokalisiert sind, sehr rapide die Apoptose.<sup>67,68</sup>

Ein sehr früher Schritt nach der Illumination mit Photofrin<sup>®</sup> behandelter Zellen ist die unmittelbare Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol.<sup>34</sup> Das kann verschiedene Konsequenzen haben. Varnes *et al.* beobachteten eine Inhibition der zellulären Respiration nach photodynamischer Behandlung mit der mitochondrial anreichernden photosensiblen Substanz Pc4, die durch exogene Gabe von Cytochrom C rückgängig gemacht werden konnte. Man kann daraus schließen, daß PDT nicht die „major complexes“ der respiratorischen Kette zerstört, sondern daß sie einen subtileren Effekt auf die mitochondriale Membran hat. Diese Effekte können als Resultat die Nekrose der Zelle aufgrund einer insuffizienten ATP-Produktion oder die Apoptose aufgrund der Aktivierung des Caspase-Signalweges haben.<sup>143</sup>

Die Aktivität von Caspase 3 erhöht sich exponentiell nach dem mitochondrialen Verlust von Cytochrom C. Das freigesetzte Cytochrom C bildet einen Komplex mit dATP, dem Apoptose-aktivierenden Faktor 1 (APAF-1) und Pro-Caspase 9, welche die Spaltung von Pro-Caspase 9 und damit die Aktivierung von Caspase 9 vorantreiben (Graphik 16). Die aktivierte Caspase 9 führt seinerseits Pro-Caspase 3 in Caspase 3 über. Caspase 3 ist der Schlüsselspieler in der „Exekutions“- Phase der Apoptose, denn sie ist für die Spaltung einer großen Anzahl von Proteinen verantwortlich, die für die Zellstruktur und für den Erhalt der Zellhomöostase

notwendig sind. So kommt es zur Spaltung des DNA-Fragmentierungsfaktors (DFF) und der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP). Letzteres findet in den finalen Schritten des apoptotischen Prozesses statt. PARP ist ein Enzym, das an der DNA-Reparatur teilnimmt, indem es ADP-Ribose-Polymere zu Histonen und anderen nukleären Proteinen transportiert. Die Spaltung von PARP unterbricht seine Funktion und treibt das Sterben der Zelle weiter voran. Es kommt außerdem zur Caspase-3-medierten Spaltung von DFF/ICAD (DNA-Fragmentierungsfaktor/Inhibitor der Caspase aktivierten Desoxyribonuclease). DFF/ICAD ist im Cytosol der nicht-apoptotischen Zelle an CAD (Caspase aktivierten Desoxyribonuclease) gebunden. Die Spaltung von DFF/ICAD resultiert in die Aktivierung und nukleäre Translokation von CAD. Dadurch kommt es zur Spaltung der DNA in 200 kb großen Fragmenten.

Nach Aktivierung der Caspase 3 kommt es zusätzlich zur Aktivierung von Caspase 8 als sekundären Weg der Apoptoseinitiierung. Der Signalweg von Caspase 8 wird durch den CD95/FAS-Rezeptor und seinen Liganden vermittelt.

Bcl-2 ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch des Endoplasmatischen Reticulums und der Kernhülle. Bcl-2 ist außerdem Mitglied einer großen Familie von pro- und antiapoptotischen Proteinen. In mit humanem Bcl-2-Gen transfizierten Hamster Ovarzellen war zu erkennen, daß Bcl-2 teilweise vor der Apoptoseinduktion durch die photodynamische Behandlung schützt.<sup>44</sup>

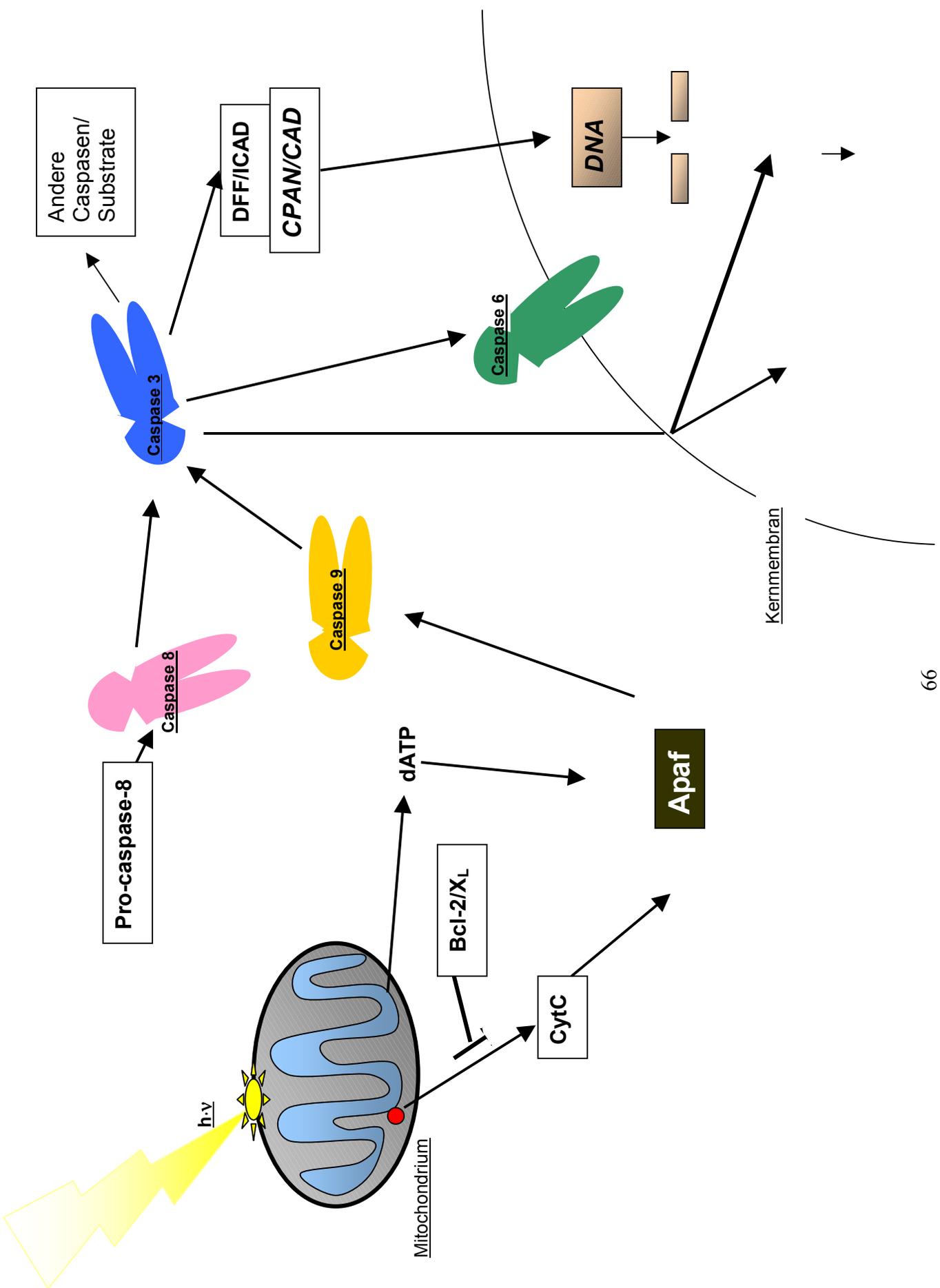
Vermutlich ähnlich dem Bcl-2 interferiert Bcl-X<sub>L</sub> mit der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C, wobei es die Induktion der Apoptose vorbeugt. Die Spaltung von Caspase 3 und DFF war in Zellen, die Bcl-X<sub>L</sub> überexprimieren, blockiert.<sup>1</sup>

In den von uns durchgeführten Experimenten verhinderte die notwendige Einbettung unserer Präparate in Methylmetacrylat eine eingehendere immunhistochemische Untersuchung und damit eine Charakterisierung der in der phototoxischen Reaktion und Apoptosekaskade teilnehmenden Zellen und Substanzen.

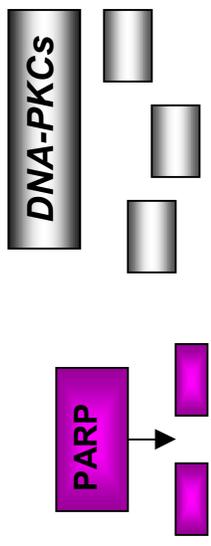
Photofrin<sup>®</sup> war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie der einzige Photosensitizer, der für klinische Studien der Phase III und IV zugelassen war. Mittlerweile sind ALA (5-Amino-Levulinsäure), ein biochemischer Vorgänger des

Protoporphyrins IX<sup>46,60</sup> und Antrin<sup>®</sup> (Motexafin Lutetium oder Lu-TeX), ein Photosensitizer, der sich in atheromatösen Plaques anreichert, für klinische Studien zur Minimierung der (nicht Stent-induzierten) Restenose zugelassen.<sup>106</sup>

Es sei erwähnt, daß sich die PDT vor allem durch das fehlende Auslösen jeglicher Inflammationsreaktion auszeichnet, deren Folge eine Aktivierung der Blutgerinnungskaskade und die Intimaproliferation wären. Bei der Photodynamischen Therapie werden Wachstumsfaktoren und Chemoattractanten inaktiviert.<sup>80,130,131,154</sup>



**Graphik 16:** Molekularer Signalweg der PDT; von der Lichtapplikation bis zur Apoptose.  
(modifiziert nach D. J. Granville *et al.* und A. C. E. Moor<sup>34,86</sup>)



## 5. ***Diskussion der Ergebnisse***

Als Antwort auf die Gefäßwandverletzung durch die Stentimplantation kommt es zur Inflammation, Plättchenaktivierung und Thrombusbildung im Gefäß. Es folgen die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima und eine extrazelluläre Matrixablagerung.<sup>140,142</sup> Die daraus resultierende Restenosierung galt es zu minimieren.

Die Vorbehandlung der Gefäße durch die Photodynamische Therapie und die erst nachfolgende Implantation von Stents führte zur signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie und des Restenosegrades im Vergleich zu den Gefäßen, die nicht photodynamisch behandelt wurden oder zuerst die Stentimplantation erhielten. Zwar fällt in der Gruppe A („1.Stent+2.PDT“) eine Tendenz zur schwächer ausgeprägten Neointima im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch besteht hier keine Signifikanz.

Als Konsequenz der schwächer ausgeprägten Stenose durch die Intimahyperplasie waren, bei gleich großen Gefäßen, die Lumina der photodynamisch vorbehandelten und dann mit Stents versehenen Gefäße signifikant größer als die der Kontrollgruppe und der Gruppe „1.Stent+2.PDT“.

*In vitro* Studien zeigten die verstärkte Aufnahme und rasche zytotoxische Wirkung von Hämatoporphyrinderivaten in humanem und tierexperimentell gewonnenem Plaquegewebe.<sup>28,106</sup>

Im nächsten Schritt, also der Anwendung der Photodynamischen Therapie in *in vivo* Modellen, zeigte man, daß die Photodynamische Therapie mit Photofrin<sup>®</sup>, aber auch mit anderen Photosensibilisatoren die Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie von peripheren Arterien sowie von Koronararterien reduziert.<sup>57,61,89,90,155</sup>

Erste klinische Erfahrungen mit der photodynamischen Behandlung von stenosierten peripheren Gefäßen aus einer Phase-1-Studie mit dem Photosensitizer Motexafin lutetium (n = 47) zeigten, daß die PDT einen sicheren und vom Patienten gut

verträglichen Therapiemodus darstellt. Bei der oben genannten Studie kam es zu keiner signifikanten systemischen Toxizität, lediglich zu transienten Parästhesien und Hauteffloreszenzen. Außerdem gab es Hinweise auf eine Reduktion der Stenosierung des behandelten peripheren Gefäßes. Jedoch wurde die photosensible Substanz intravenös-systemisch und nicht lokal appliziert.<sup>1,46</sup> In einer weiteren Phase-1-Studie, die sich mit der Medikamentendosis- und Lichtdosisfindung sowie der Sicherheit und Verträglichkeit der Photodynamischen Therapie in stenosierten Koronargefäßen beschäftigt, wurde gezeigt, daß die systemische Applikation von Motexafin lutetium und die am nächsten Tag durchgeführte Aktivierung der photosensiblen Substanz und koronare Stentimplantation zu keinen ernsten unerwünschten Ereignissen führten, allenfalls zu dosisabhängigen peripheren und perioralen Parästhesien (bis hin zu 14 % des Gruppenkollektivs).<sup>66</sup>

Eine erste von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung zur Praktikabilität der lokal applizierten PDT und der Stentimplantation in die A. femoralis des Hausschweines ergab, daß die initiale Photodynamische Therapie zur Reduktion der durch die Stentimplantation induzierten Neointima führt.<sup>141</sup>

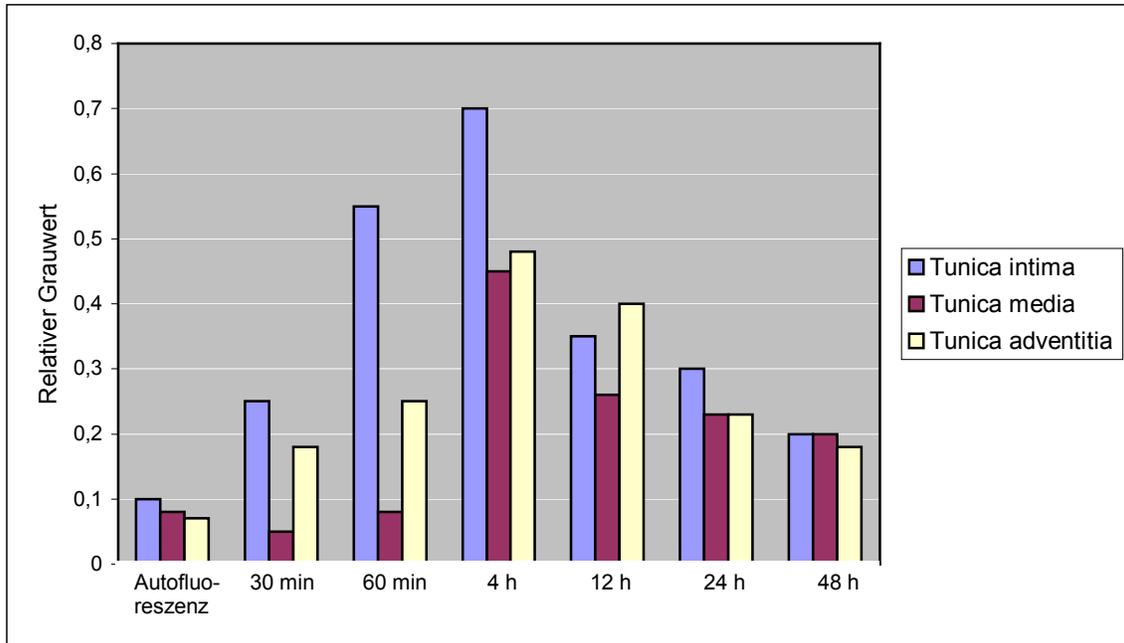
Daraus ergab sich die Frage, wann der beste Zeitpunkt ist, um eine effektive Restenoseprophylaxe bei Stentimplantation zu betreiben.

Die vorliegende Studie zeigt, daß die lokal applizierte PDT mit lokaler Aktivierung der photosensiblen Substanz, die vor der Implantation eines Stents durchgeführt wird, zur signifikanten Reduktion der In-Stent Restenose führt im Vergleich zur Kontrollgruppe (nur Stent) und im Vergleich zur zweiten Interventionsgruppe Gruppe (Gruppe A = „1.Stent+2.PDT“). Außerdem waren nach lokaler PDT und Tageslichtexposition keinerlei Photosensibilisationen an den Versuchstieren im Sinne von Hauteffloreszenzen zu erkennen.

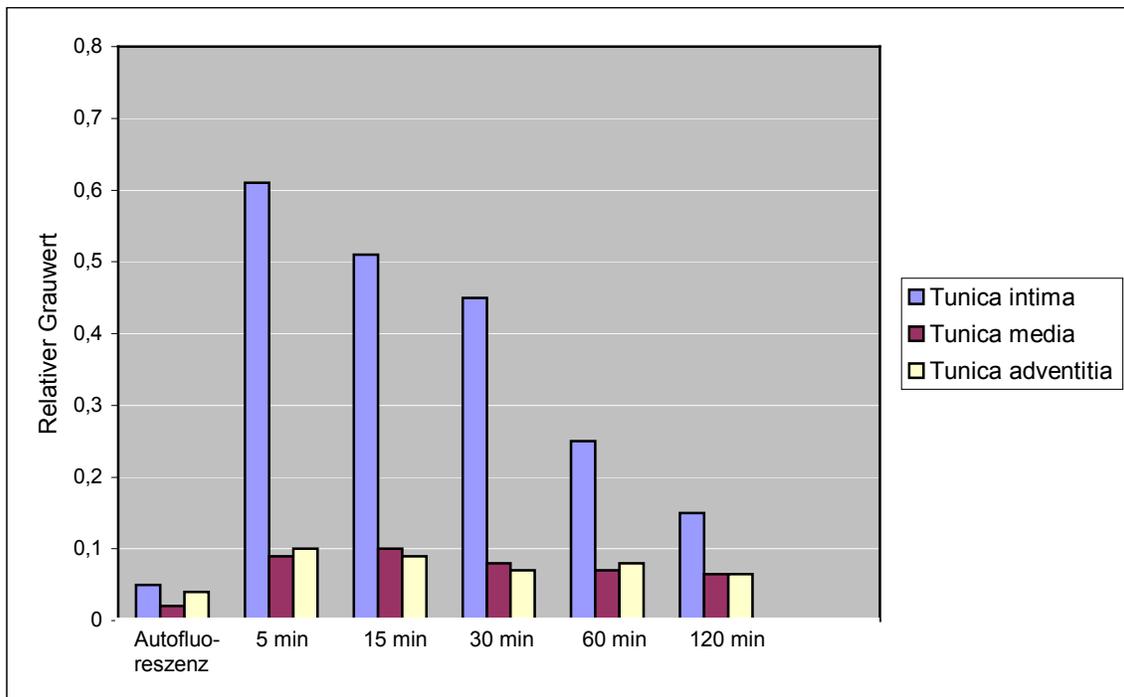
Die PDT bedingte hier keinerlei Veränderungen an den übrigen Gefäßwandschichten wie der Lamina elastica interna, der Tunica media, der Lamina elastica externa und der Adventitia.

Eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit der Ausbildung der In-Stent Restenose von der Reihenfolge von PDT und Setzen des Stents könnte in der Technik der lokalen Applikation der photosensiblen Substanz und der Lichtapplikation liegen, aber auch im Stentdesign. Bei einem schon implantierten Stent muß die Verabreichung des Photosensitizers durch die Stentstruts, also durch die Maschen des Drahtgeflechtes erfolgen, was die Anreicherung des Medikaments beeinflussen kann. Darüber hinaus kommt das Laserlicht, das von einem Glasfaserkatheter transportiert wird, nicht an den Stellen des gestenteten Gefäßsegmentes an, die von den Stentstruts bedeckt werden. Als Konsequenzen ergeben sich möglicherweise eine auf die Gesamtlänge des Stents bezogene unzureichende Medikamentenanreicherung im Gewebe als auch eine verminderte Aktivierung der Photosensitizervolumina, die durch die Gefäßstütze bedeckt werden.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß die Photodynamische Therapie nach Ballonangioplastie und nach systemischer Gabe des Photosensitizers sowohl in Koronarien transplantierter Herzen als auch in nativen Koronargefäßen und peripheren Arterien das Verhältnis „Tunica intima zu Tunica media“ erniedrigt hat.<sup>33,35,45,71,90,147,155</sup> Darüber hinaus konnte eine Reduktion der Fläche der Tunica media als Folge der Inhibition sowohl der Proliferation als auch der Migration der glatten Muskelzellen und Fibroblasten durch PDT (bei systemisch applizierten Photosensitizer) beobachtet werden. Interessanterweise ergab sich in der vorliegenden Arbeit keine Reduktion der Tunica media nach photodynamischer Therapie. Das Verhältnis der Fläche der Intimahyperplasie zu jener der Tunica media, zeigte jedoch nach Behandlung mit PDT eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung des unterschiedlich starken Effektes der PDT auf die Media nach systemischer und nach lokaler Gabe der photosensiblen Substanz könnte das unterschiedliche Konzentrationsgefälle der photosensiblen Substanz in den verschiedenen arteriellen Wandschichten sein, je nach Applikationsart. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß nach lokaler Applikation ein Konzentrationsgefälle der photosensiblen Substanz von luminal nach adventiell besteht (siehe auch Tabellen 5 und 6).<sup>31</sup>



**Tabelle 5:** Photofrin-assoziierte Fluoreszenz nach systemischer Medikamentenapplikation.<sup>66</sup>



**Tabelle 6:** Photofrin-assoziierte Fluoreszenz nach lokaler Medikamentenapplikation mit dem porösen Ballon.<sup>66</sup>

Die höheren Wirkstoffkonzentrationen in den intimanahen Schichten und die niedrigen Konzentrationen in der Tunica media und Tunica adventitia, wie sie nach lokaler Applikation des Photosensitizers beobachtet werden, führen nach Lichtgabe zur Intimainhibition ohne die Tunica media oder Adventitia zu alterieren.

Die endovaskuläre Photodynamische Therapie stellt im tierexperimentellen Modell eine effektive und nebenwirkungsarme Behandlungsform der In-Stent Restenose dar, für die die Neointimareduktion in peripheren Arterien untersucht worden ist. In weiterführenden Studien wäre es notwendig, die Restenose senkende Potenz der PDT im Koronarsystem eingehender zu untersuchen. Bei vergleichbarem Pathomechanismus und vergleichbarer Mikro- und Makroanatomie der Femoral- und Koronargefäße sind ähnliche Ergebnisse zu erwarten.

## E. Zusammenfassung

Die intrakoronare und peripherarterielle Stentimplantation stellt heute eine grundlegende Methode in der Behandlung der symptomatischen koronaren Herzerkrankung und der symptomatischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit dar.

Zentrales Problem dieses Verfahrens ist die Restenosierung der Arterien in ca. 25 bzw. 40% der Fälle, die auch einen erneuten Eingriff notwendig macht. Trotz weitreichender Einblicke, die man mittlerweile in die pathobiologischen Zusammenhänge gewonnen hat, ist es bisher nicht gelungen, den Restenosierungsprozeß durch eine systemisch oder lokal applizierte medikamentöse Therapie zu unterdrücken.

In der vorliegenden Studie sollte evaluiert werden, ob die Photodynamische Therapie durch lokal appliziertes Photofrin<sup>®</sup> mittels porösem Ballon kurz vor oder kurz nach Stentimplantation in der Lage ist, die Intimahyperplasie zu minimieren. Außerdem sollte in Zusammenhang mit der Stentimplantation beurteilt werden, zu welchem Zeitpunkt die Photodynamische Therapie erfolgen sollte, um einen möglichst günstigen Effekt auf die Neointimafläche zu erzielen.

Es wurden drei Gruppen untersucht: Die Kontrollgruppe (Gruppe K), bei der jeweils ein Stent in die Arteria femoralis implantiert wurde, eine „1.Stent+2.PDT“-Gruppe (Gruppe A), die zuerst einer Stentimplantation unterzogen wurde und im zweiten Schritt eine Photodynamische Therapie erhielt und zuletzt die „1.PDT+2.Stent“-Gruppe (Gruppe B), bei der die Stentimplantation der Photodynamischen Therapie folgte. Alle Tiere wurden mittels Randomisierung einer Gruppe zugeteilt. Es wurden zu keinem Zeitpunkt und bei keinem Tier Zeichen der Photodermatose diagnostiziert.

Die behandelten Gefäßsegmente wurden nach 14 Tagen *en bloc* explantiert und nach Einbettung in Methylmetacrylat in 120 - 200 µm Schnitten aufgearbeitet. Die Schnitte wurden mit modifizierter Laczko-Levai-Lösung gefärbt. Mit Hilfe eines

optikoelektronischen Systems ließen sich die Wandschichten der drei Gruppen ausmessen und vergleichen.

Makroskopisch und mikroskopisch zeigten die Präparate keinerlei Hinweise auf Verletzungen der Arterienarchitektur durch die Anwendung des Katheters.

Die Behandlung der peripheren Gefäße vor einer Stentimplantation mittels Photodynamischer Therapie führte zur signifikanten Reduktion der Neointimahyperplasie und des Stenosierungsgrades im Vergleich zu den Gefäßen, die nicht photodynamisch behandelt wurden oder zuerst die Stentimplantation erhielten. Ebenso waren auch die Gefäßlumina der Gruppe B, also in der Gruppe, die erst die PDT erhielt, größer als in den anderen Gruppen.

Die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse über die Reduktion der stentinduzierten Neointima mittels PDT könnten zur Restenoseprophylaxe im Zuge einer Intervention in der Peripherie, jedoch auch bei koronarer Stentimplantation angewandt werden. Doch ist es nötig diese Erkenntnisse und Ergebnisse an einem größeren Kollektiv zu untersuchen.

## **F. Anhang**

### **1. Literaturverzeichnis**

1. **Adams J. M., Cory S.**  
The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.  
*Science*. 1998;281: 1322-1326.
2. **Al Suwaidi J. BPB, Holmes Jr. D. R.**  
Coronary Artery Stents.  
*JAMA*. 2000;284(14):1828-1836.
3. **Ambrose J. A., Sharma S. K., Marmur J. D.**  
Balloon angioplasty vs. Stent Study (BOSS).  
*Circulation*. 1997;96 (suppl)(1): 592.
4. **Antoniucci D., Santoro G. M., Bolognese L.**  
A clinical trial comparing primary stenting of the infarct-related artery with optimal primary angioplasty for acute myocardial infarction.  
*J Am Coll Cardiol*. 1998;31: 1234-1239.
5. **Betriu A., Masotti M., Serra A.**  
Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon angioplasty in the treatment of de novo coronary artery lesions (START).  
*J Am Coll Cardiol*. 1999;34: 1498-1506.
6. **Bier J. D., Zalesky P., Sasken H., Williams D. O.**  
A new bioabsorbable intravascular stent: In vitro assessment of hemodynamic and morphometric characteristics.  
*Circulation*. 1991;82(4).
7. **Bilodeau L., Schreiber T., Hilaton D. J.**  
The Wallstent In Native coronary arteries (WIN) multicenter randomized trial.  
*Eur Heart J*. 1998;19 (suppl): 48.
8. **Bown S. G. et al.**  
New techniques in laser therapy.  
*BMJ*. 1998;316: 754-757.

9. **Buller C. E., Dzavik V., Carere R. G.**  
Primary stenting versus balloon angioplasty in occluded coronary arteries: the Total Occlusion Study of Canada (TOSCA).  
*Circulation*. 1999;100: 236-242.
10. **Carrel A.**  
Results of the permanent intubation of the thoracic aorta.  
*Surg Gyn Obstet*. 1912;16: 83-100.
11. **Chen Z., Woodburn W., Shi C., Adelman D. C., Rogers C., Simon D. I.**  
Photodynamic therapy with motexafin lutetium induces redox-sensitive apoptosis of vascular cells.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:759-764.
12. **Clowes A. W. et al.**  
Mechanism of stenosis after arterial injury.  
*Lab Invest*. 1983;49: 208-215.
13. **Cohen E. A., Sykora K., Kimball B. P. et al.**  
Clinical outcomes of patients more than one year following randomization in the Canadian Coronary Atherectomy Trial (CCAT).  
*Can J Cardiol*. 1997;13(9): 825-30.
14. **Cumberland D. C., Gunn J., Tsikaderis D., Arafa S., Ahsan A.**  
Initial clinical experience of local drug delivery via a porous balloon during percutaneous coronary angioplasty.  
*J Am Coll Cardiol*. 1994; Feb 186a.
15. **Dartsch P. C., Bauriedel G., Schinko I., Weiss H., Höfling B., Betz E.**  
Cell constitution and characteristics of human atherosclerotic plaques selectively removed by percutaneous atherectomy.  
*Atherosclerosis*. 1989;80: 149-157.
16. **Davies M. G.**  
Pathobiology of intimal hyperplasia.  
*Br J Surg*. 1994;81: 1254-1269.
17. **Di Mario C.**  
New recipes for in-stent restenosis: cut, grate, roast, or sandwich the neointima?  
*Heart*. 2000;84: 471-475.
18. **Dietz U., Erbel R., Rupprecht H. J., Ratz C., Meyer J.**  
Akut- und Langzeitergebnisse der percutanen transluminalen koronaren Rotationsangioplastie (PTCR).  
*Z Kardiol*. 1991;80 (suppl VI)(23).

19. **Dotter C. T.**  
Arterial catheterization for diagnosis and therapy.  
*Nippom-Igaku-Hoshasen-Gakki-Zashi*. 1965;25(6): 495-500.
20. **Ferguson J. J.**  
Highlights of the American College of Cardiology.  
*Circulation*. 1999;100: 570-575.
21. **Fishman D. L., Leon M. B., Baim D. S., Schatz R. A., Savage M. P., Penn I., Veltri L., Ricci D., Noboyoshi M., Cleman M., Heuser R., Almond D., Teirstein P. S., Fish R. D., Colombo A., Brinkner J., Moses J., Shaknovich A., Hirshfeld J., Bailey S., Ellis S., Rake R., Goldberg S., for the Stent Restenosis Study Investigators**  
A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease.  
*N Engl J Med*. 1994;331: 496-501.
22. **French J. E., Jennings M. A., Florey H. W.**  
Morphological studies on atherosclerosis in swine.  
*Ann NY Acad Sci*. 1965;127:780-794.
23. **Gellman J., Enger C. D., Sigal S. L. et al.**  
The successful application of a local infusion angioplasty catheter in a rabbit model of focal femoral atherosclerosis.  
*JACC*. 1990;15(2): 164A.
24. **George C. J., Baim D. S., Brinker J. A.**  
One-year follow-up of the Stent Restenosis (STRESS I) Study.  
*Am J Cardiol*. 1998;81: 860-865.
25. **Gleichmann U., Mannebach H., Lichtlen P.**  
17. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland.  
*Homepage der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung*. 2000: 879-881.
26. **Gomer C. J., Ferrario A., Hayashi N., Rucker N., Szirth B. C., Murphee A. L.**  
Molecular, Cellular and Tissue Responses Following Photodynamic Therapy.  
*Lasers in Surgery and Medicine*. 1988;8: 450-463.
27. **Gonschior P., Erdemci A., Gerheuser F. et al.**  
Selektive Hämatoporphyrinderivat-(HPD)-Applikation im arteriellen Gefäßsystem mittels eines porösen Ballonkatheters erreicht vergleichbare Konzentrationen hochdosierter systemischer Gabe.  
*Z Kardiol*. 1991;80(12): 738-745.

28. **Gonschior P., Fleuchaus M.**  
Vergleich der in-vitro Aufnahme und Verteilung von liposomal gekoppelten Porphycenen (HEPn), acetylierten Porphycenen (ATPPn) und Hematoporphyrinderivaten (HPD) in kultiviertem humanem Plaquegewebe.  
*Laser in Medicine.* 1993: 141-143.
29. **Gonschior P., Gerheuser F., Fleuchaus M. et al.**  
Local photodynamic therapy reduces tissue hyperplasia in an experimental restenosis model.  
*Photochem Photobiol.* 1996;64(5): 758-763.
30. **Gonschior P., Nerlich A., Mack B., Wiest I. R. M., Höfling B.**  
Immunocytological characteristics of primary and restenosis tissue obtained at atherectomy.  
*VASA.* 1994;1: 15-22.
31. **Gonschior P., Pahl C., Huehns T. Y. et al.**  
Comparison of local intravascular drug-delivery catheter systems.  
*Am Heart J.* 1995;130(6): 1174-1181.
32. **Gonschior P., Vogel-Wiens C., Goetz A. E. et al.**  
Endovascular Catheter-Delivered Photodynamic Therapy in an Experimental Response to Injury Model.  
*Basic Res Cardiol.* 1997;92: 310-319.
33. **Granville D. J., Carthy C. M., Hunt D. W. C., McManus B. M.**  
Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease.  
*Laboratory Investigation.* 1998;78(8): 893.
34. **Granville D. J., Carthy C. M., Jiang H., Shore G. C., McManus B. M., Hunt D. W.**  
Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy.  
*FEBS Lett.* 1998;437: 5-10.
35. **Granville D.J., Cassidy B. A., Ruehlmann D. O. et al.**  
Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis.  
*Am J Pathol.* 2001;159: 305-311.
36. **Grines C. L., Cox D. A., Stone G. W. et al., for the Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group.**  
Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction.  
*N Engl J Med.* 1999;341: 1949-1956.

37. **Gross D. R.**  
Animal models in cardiovascular research.  
*Boston: Martinus Nijhoff.* 1985: 6537-547.
38. **Grüntzig A. R.**  
Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis.  
*Lancet.* 1987;1: 263.
39. **Grüntzig A. R., Myler R. K., Hanna E. S., Turina M. I.**  
Coronary transluminal angioplasty.  
*Circulation.* 1977;55-56 (suppl III):III- 84.
40. **Hanke H., Strohschneider T., Oberhoff M., Betz., Karsch K. R.**  
Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty.  
*Circ Res.* 1990;67: 651-659.
41. **Hanson S. R., Powell J. S., Dodson T. et al.**  
Effects of angiotensin converting enzyme inhibition with cilazapril on intimal hyperplasia in injured arteries and vascular grafts in the baboon. *Hypertension.* 1991;18: 1170-76.
42. **Harrison's Principles of internal medicine.**  
*15th Edition.* 2001 (Mc Graw-Hill).
43. **Hausmann W.**  
Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins.  
*Biochem Z.* 1911;30: 276-316.
44. **He J., Agarwal M. L., Larkin H. E., Friedman L. R., Xue L. Y., Oleinick N. L.**  
The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2.  
*Photochem Photobiol.* 1996;64: 845-852.
45. **Heckenkamp J., Leszczynski D., Schiereck J., Kung J., La Muraglia G. M.**  
Different effects of photodynamic therapy and g-irradiation on vascular smooth muscle cells and matrix - Implications for inhibiting restenosis.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19: 2154-2161.
46. **Herman W.**  
Hemodynamic effects of 5-aminolevulinic acid in humans.  
*Photochem Photobiol B: Biology.* 1998;43: 61-65.
47. **Herrmann J. P. R., Hermans W. R., Vos J., Serruys P.W.**  
Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? (Part I).  
*Drugs.* 1993;46: 18-52.

48. **Hirth A., Michelsen U., Wöhrle D.**  
Photodynamische Tumortherapie.  
*Chemie in unserer Zeit.* 1999;33. Jahrgang(2): 84-94.
49. **Höfling B., Gonschior P., Esin S., Nikol S.**  
Das Problem der Restenose nach Angioplastie. Klinische Bedeutung, Pathobiologie, zukünftige Entwicklung zur Suppression der Rezidivstenose.  
*Der Internist.* 1997;38: 31-43.
50. **Höfling B., Gonschior P., Simpson L., Bauriedel G., Nerlich A.**  
Efficacy of directional coronary atherectomy in cases unsuitable for percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and after unsuccessful PTCA.  
*Am Heart J.* 1992;124(2): 341-348.
51. **Höfling B., Huehns T. Y.**  
Intravascular local drug delivery after angioplasty.  
*Eur Heart J.* 1995;16: 437-440.
52. **Höfling B., Huehns T. Y.**  
Restenosis after angioplasty - an update on relevant animal models.  
*J Invas Cardiol.* 1996;8: 388-395.
53. **Höfling B., Huehns T. Y., Gonschior P., Nikol S.**  
Medikamentöse und instrumentelle Therapieansätze zur Restenoseprophylaxe.  
*Z Kardiol.* 1995;84 (suppl)(4): 151-158.
54. **Höfling B., Reichart B., Simpson J.**  
Ballondilatation und Weiterentwicklungen.  
*R.S. Schulz-Verlag Kempfenhausen.* 1989.
55. **Hoher M., Wöhrle J., Grebe O. C.**  
A randomized trial of elective stenting after balloon recanalization of chronic total occlusions.  
*J Am Coll Cardiol.* 1999;34: 722-729.
56. **Holmes D. R. Vliestra R. E., Smith H. C. , Vetrovec G. W. , Kent K. M. , Cowley M. J. , Faxon D. P. , Gruentzig A. R. , Kelsey S. F., Detre K. M., VanRaden M. J., Mock M. B.**  
Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): A report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung and Blood Institute.  
*Am J Cardiol.* 1984;53: 77C-81C.

57. **Hsiang Y.N., Crespo M. T., Todd M. E.**  
Dosage and timing of photofrin for photodynamic therapy of intimal hyperplasia.  
*Cardiovascular Surgery*. 1995;3(5): 489-494.
58. **Huehns T. Y., Höfling B.**  
Current clinical uses of intracoronary ultrasound.  
*Eur J for Cardiac Investigations*. 1995;4: 12-17.
59. **Isner J. M., Clarke R. H.**  
Cardiovascular laser therapy.  
*Raven press, New York*. 1989.
60. **Jenkins M. P.**  
Clinical study of adjuvant photodynamic therapy to reduce restenosis following femoral angioplasty.  
*Br J Surg*. 1999;86: 1258-1263.
61. **Jenkins M. P., Buonaccorsi G. A., Mansfield R., Bishop C. C. R., Bown S. G., McEwan J. R.**  
Reduction in the response to coronary and iliac artery with photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid.  
*Cardiocascular research*. 2000;45: 478-485.
62. **Jori G.**  
Tumour Photosensitizers: Approaches to Enhance the Selectivity and Efficiency of Photodynamic Therapy.  
*J. Photochem. Photobiol., B: Biol*. 1996;36: 87-93.
63. **Jung F., Bach R., Franke R. P.**  
Topographische und Element-Analyse koronarer Stens: Palmaz-Schatz- und PURA-VARIO-Stent.  
*Biomed Tech*. 1996;6: 1-16.
64. **Kastrati A., Schömig A., Dirschinger J., et al.**  
A randomized trial comparing stenting with balloon angioplasty in small vessels in patients with symptomatic coronary artery disease. ISAR-SMART Study Investigators. Intracoronary Stenting or Angioplasty for Restenosis Reduction in Small Arteries.  
*Circulation*. 2000;102(21): 2593-2598.
65. **Kawashima A., Ueda K., Nishida Y.**  
Quantitative angiographic analysis of restenosis of primary stenting using Wiktor stent for acute myocardial infarction.  
*Circulation*. 1999;100 (suppl. 1)(1): 856.

66. **Kereiakes D. J., Szyniszewski A. M., Wahr D., Herrmann H. C., Simon D. I., Rogers C., Kramer P., Shear W., Yeung A. CC., Shunk K. S., Chou T. M., Popma J., Fitzgerald P., Carroll T. E., Forer D., Adelman D. C.**  
Phase I drug and light dose-escalation trial of motexafin lutetium and far red light activation (Phototherapy) in subjects with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention and stent deployment. Procedural and long-term results.  
*Circulation*. 2003;108: 1310-1315.
67. **Kessel D., Luo Y.**  
Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis.  
*Photochem Photobiol B: Biology*. 1998;42: 89-95.
68. **Kessel D., Luo Y., Deng Y., Chang C. K.**  
The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by Photodynamic Therapy.  
*Photochem Photobiol*. 1997;65(3): 422-426.
69. **Kick G., Messer G., Plewig G.**  
Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie.  
*Hautarzt*. 1996;47: 644-649.
70. **Koning R., Khalife K., Commeau P.**  
The BESMART (Bestent in Small ARteries) Study.  
*Circulation*. 1999;100 (suppl 1)(1): 503.
71. **La Muraglia G. M., Schiereck J., Heckenkamp J. et al.**  
Photodynamic Therapy induces apoptosis in intimal hyperplastic arteries.  
*Am J Pathol*. 2000;157: 867-875.
72. **Laham R. J., Carrozza J. P., Berger C., Cohen D. J., Kuntz R. E., Baim D. S.**  
Long-term, (4-6 years) outcome of Palmaz-Schatz stenting: paucity of late clinical stent-related problems.  
*JACC*. 1996;28: 820-826.
73. **Leon M. B., Baim D. S., Popma J. J.**  
A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting.  
*N Engl J Med*. 1998;339: 1665-1671.
74. **LeVeen R. F., Wolf G. L., Villanueva T. G.**  
New rabbit atherosclerosis model for the investigation of transluminal angioplasty.  
*Invest Radiol*. 1982;17: 470-475.

75. **Levy J. G.**  
Photosensitizers in photodynamic therapy.  
*Sem Oncol.* 1994;21(6, Suppl.15): 4-10.
76. **Lincoff A. M.**  
Stent Scrutiny.  
*JAMA.* 2000;284(14): 1839-1841.
77. **Lotan C., Krakover R., Turgeman Y.**  
The STOP study: a randomized multicenter Israeli study for stents in total occlusion and restenosis prevention.  
*J Am Coll Cardiol.* 1999;33: 28A.
78. **Luginbuhl H., Jones J. E. T.**  
The morphology and morphogenesis of atherosclerosis in aged swine.  
*Ann NY Acad Sci.* 1965;127: 763-79.
79. **Maillard L., Hamon M., Monassier J. P. et al., Stentim 2 Investigators.**  
STENTIM 2: elective Wiktor stent implantation in acute myocardial infarction compared with balloon angioplasty.  
*Circulation.* 1998;98 (suppl)(1): 21.
80. **Majno G., Joris I.**  
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.  
*Am J Pathol.* 1995;146(1): 3-15.
81. **Manyak M. J., Russo A.**  
Photodynamic therapy.  
*J Clin Oncol.* 1988;6:380-91.
82. **Meier B.**  
Coronary Angioplasty. *Grune & Stratton, Inc. Florida.* 1987.
83. **Meyer-Betz F.**  
Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs.  
*Dtsch Arch Klin Med.* 1913;112: 476-503.
84. **Moan J., Pettersen E. O., Christensen T.**  
The mechanism of photodynamic inactivation of human cells *in vitro* in the presence of haematoporphyrin.  
*Br J Cancer.* 1979;39: 398-407.
85. **Moliterno D. J., Topol E. J.**  
In: Textbook of cardiovascular medicine. *Chapter 75.* 1998.  
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia

86. **Moor A. C. E.**  
Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy.  
*Photochem Photobiol B: Biology.* 2000;57: 1-13.
87. **Morgan B. D., Osborn R. M.**  
What's in a word: the origin of the word 'stent'.  
*Ann R Coll Surg Engl.* 1996;78 (suppl)(3): 128.
88. **Muller D. W. M., Ellis S. G., Topol E. J.**  
Experimental models of coronary artery restenosis.  
*J Am Coll Cardiol.* 1992;19: 418-432.
89. **Naymekye I., Anglin S., McEwan J., MacRobert A., Bown S., Bishop C.**  
Photodynamic therapy of normal and balloon-injured rat-carotid arteries using 5-amino-levulinic acid.  
*Circulation.* 1995;91: 417-425.
90. **Nyamekye I.**  
Inhibition of intimal hyperplasia in balloon injured arteries with adjunctive phtalocyanine sensitised photodynamic therapy.  
*Eur J Vasc Endovas Surg.* 1996;11: 19-28.
91. **O'Brien E. R., Schwartz S. M.**  
Update on the biology and clinical study of restenosis.  
*Trends Cardiovasc Med.* 1995;4: 169-178.
92. **Ochsner M.**  
Photodynamic Therapy: The Clinical Perspective - Review on Applications for Control of Diverse Tumorous and Non-Tumorous diseases.  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1997;47(II): 1185-1194.
93. **Orford J.L. et al.**  
The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis.  
*Am J Cardiol.* 2000;86 (suppl): 6H-11H.
94. **Overhaus M., Heckenkamp J., Kossodo S., Leszczynski D., La Muraglia G. M.**  
Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration.  
*Circ Res.* 2000;86: 334-340.
95. **Pahl C.**  
Vergleich von Anwendbarkeit und Effektivität zweier Kathetersysteme zur lokalen Medikamentenapplikation in die arterielle Gefäßwand.  
*Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.* 1998.

96. **Parisi A. F., Folland E. D., Hartigan P.**  
A comparison of angioplasty with medical therapy in the treatment of single-vessel coronary artery disease. Veterans Affairs ACME Investigators.  
*N Engl J Med.* 1992;326(1): 10-16.
97. **Pass H.**  
Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use.  
*J Natl Cancer Inst.* 1993;85(6): 443-456.
98. **Penn I. M., Ricci D.R., Almond D. G. et al.**  
Coronary artery stenting reduces restenosis: final results from the Trial of Angioplasty and Stents in Canada (TASC) I.  
*Circulation.* 1995;92 (supplement I)(1): 279.
99. **Pfund A.**  
Die Stentimplantation als initiale koronarinterventionelle Therapie?  
*Herz.* 2000;25(5): 495-501.
100. **Pieczek A. M.**  
Successful percutaneous revascularization of 180/190 (95%) consecutive peripheral arterial total occlusions using hydrophilic ("Glide") wire.  
*Circulation.* 1992;86(1): 704.
101. **Raab O.**  
Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien.  
*Z Biol.* 1900;39: 524-546.
102. **Radke P. W., Hanrath P., vom Dahl J.**  
Treatment of stent restenosis using rotational atherectomy: mechanisms and results.  
*Z Kardiol.* 2001;90(3): 161-169.
103. **Ray S. G., Penn I. M., Ricci D. R.**  
The CORSICA trial: short and mid-term outcome.  
*Eur Heart J.* 1998;19 (suppl): 471.
104. **Richter G.M., Roeren T., Brado M.**  
Further update of the randomized trial: iliac stent placement versus PTA-morphology, clinical success rates, and failure analysis.  
*J Vasc Interv Radiol.* 1993;4: 30.
105. **Richter G.M., Roeren T., Noeldge G. et al.**  
Initial long-term results of a randomized 5-year study: iliac stent implantation versus PTA.  
*VASA Supp.* 1992;35: 192-3.

106. **Rockson S. G., Kremer P., Razavi M., Szuba A., Filardo S., Fitzgerald P., Cooke J. P., Yousouf S., DeVault A. R., Renschler M. F., Adelman D. C.**  
Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis - Results of a phase I trial of Photodynamic therapy with motexafin lutetium (Antrin). *Circulation*. 2000;102: 2322-2324.
107. **Rodriguez A., Ayala F., Bernardi V.**  
Optimal coronary balloon angioplasty with provisional stenting versus primary stent (OCBAS).  
*J Am Coll Cardiol*. 1998;32: 1351-1357.
108. **Rodriguez A., Bernardi V., Fernandez M.**  
In-hospital and late results of coronary stents versus conventional balloon angioplasty in acute myocardial infarction (GRAMI trial).  
*Am J Cardiol*. 1998;81: 1286-1291.
109. **Rosenfield K., Schainfeld R., Isner J. M.**  
Percutaneous revascularization in peripheral arterial disease. In: *Vascular medicine. A textbook of vascular biology and diseases*. 1996; Loscalzo J., Crager M. A., Dzau V. J., editors) New York, Toronto, Boston, London: Little, Brown and Company: 417-464.
110. **Rubartelli P., Niccoli L., Verna E. et al, for the Gruppo Italiano di Studio Sullo Stent Nelle Occlusioni Coronariche (GISSOC)**  
Stent implantation versus balloon angioplasty in chronic coronary occlusions.  
*J Am Coll Cardiol*. 1998;32: 90-96.
111. **Ruygrok P. N., Serruys P. W.**  
Intracoronary Stenting: From Concept to Custom.  
*Circulation*. 1996;94: 882-890.
112. **Saito S., Hosokawa G., Tanaka S., S. N, for the PASTA Trial Investigators.**  
Primary stent implantation is superior to balloon angioplasty in acute myocardial infarction.  
*Catheter Cardiovasc Interv*. 1999;48: 262-268.
113. **Sarembock I. J., La Veau P. J., Sigal S. L. et al.**  
Influence of inflation pressure and balloon size on the development of intimal hyperplasia after balloon angioplasty.  
*Circulation*. 1989;80: 1029-1040.
114. **Savage M. P., Douglas Jr. J. S., Fishman D. L. et al.**  
Stent placement compared with balloon angioplasty for obstructed coronary bypass grafts.  
*N Engl J Med*. 1997;337: 740-747.

115. **Schanus E. G., Schendel F., Lovrien R. E., Rempel W. E., McGrath C.**  
Malignant hyperthermia (MH): porcine erythrocyte damage from oxidation and glutathione peroxidase deficiency.  
*Prog Clin Biol Res.* 1981;55: 323-339.
116. **Scheller B. HB, Severin O.**  
Follow-up of the PSAAMI study population (Primary Stenting versus Angioplasty in Acute Myocardial Infarction).  
*J Am Coll Cardiol.* 1999;33 (suppl):29 A.
117. **Schömig A., Kastrati A., Dietz R. et al.**  
Emergency coronary stenting for dissection during percutaneous transluminal coronary angioplasty: angiographic follow-up after stenting and after repeat angioplasty of the stented segment.  
*J Am Coll Cardiol.* 1994;23(5): 1053-1060.
118. **Schömig A., Kastrati A., Mudra H. et al.**  
Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with treated or present vessel closure.  
*Circulation.* 1994;90(6): 2716-2724.
119. **Schömig A., Neumann F. J., Kastrati A.**  
A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents.  
*N Engl J Med.* 1996;334: 1084-1089.
120. **Schwartz R. S., Edwards W. D., Bailey K. R., Camrond A. R., Jorgenson M. A., Holmes D. R. Jr.**  
Differential neointimal response to coronary artery injury in pigs and dogs.  
*Arterioscler Thromb.* 1994;14: 395-400.
121. **Serruys P. W., De Jaegere P., Kiemeneij F., Macaya C., Rutsch W., Heyndrickx G., Emanuelson H., Marco J., Lengrand V., Materne P., Belardi J., Sigwart U., Colombo A., Goy J. J., Van den Heuvel P., Delcan J., Morel M. A., for the Benestent Group**  
A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease.  
*N Engl J Med.* 1994; 331: 489-495.
122. **Sievert H., Rohde S., Utech A.**  
Stent or angioplasty after recanalization of chronic coronary occlusions?  
*Am J Cardiol.* 1999;84: 386-390.

123. **Sigwart U.**  
Coronary stents.  
*Z Kardiol.* 1995;84 (suppl.)(2): 65-77.
124. **Simpson J. B., Baim D. S., Robert E. W., Harrison D. C.**  
A new catheter system for coronary angioplasty.  
*Am J Cardiol.* 1982;49: 1216-1222.
125. **Sirnes P. A., Golf S., Myreng Y.**  
Stenting in Chronic Coronary Occlusion (SICCO).  
*J Am Coll Cardiol.* 1996;28: 1444-1451.
126. **Sousa E. J. et al.**  
The RAVEL Study: A Randomized Study with the Sirolimus Coated BX Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with De Novo Native Coronary Artery Lesions.  
American Heart Association Congress, November 2001
127. **Sousa E. J., Costa M. A., Abizaid A. C. et al.**  
Sustained suppression of neointimal proliferation by Sirolimus-eluting stents. One-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up.  
*Circulation.* 2001;104: 2007-2011.
128. **Spears J.**  
Fluorescence of experimental atheromatous plaques with hematoporphyrin derivative.  
*J Clin Invest.* 1983;71: 395-399.
129. **Sroka R.**  
In vivo Untersuchung modifizierter Photosensibilisatoren und Entwicklung von Lichtapplikationssystemen für die photodynamische Therapie.  
*Akademischer Verlag München;* 1992.
130. **Stadius van Eps R. G.**  
Photodynamic therapy inhibits the injury-induced fibrotic response of vascular smooth muscle cells.  
*Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;18: 417-423.
131. **Stadius van Eps R. G., Adili F., LaMuraglia G. M.**  
Photodynamic therapy inactivates cell-associated basic fibroblast growth factor: a silent way of vascular smooth muscle cell eradication.  
*Cardiovasc Res.* 1997;35(2): 334-40.
132. **Sterenborg H. J. C. M., van Gemert M. J. C.**  
Photodynamic Therapy with Pulsed Light Sources: a Theoretical Analysis.  
*Phys Med Biol.* 1996;41: 835-849.

133. **Stone G. W.**  
Stenting and IIb/IIIa Receptor Blockade in Acute Myocardial Infarction: An Introduction to the CADILLAC Trial.  
*J Invasive Cardiol.* 1998;10 (suppl)(B): 36B-47B.
134. **Strauss B. H., Chisholm R. J., Keeley F. W., Gotlieb A., Lohan R. A., Armstrong P. W.**  
Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis.  
*Circ Res.* 1994;75: 650-658.
135. **Suryapranata H., van't Hof A. W., Hoorntje J. C.**  
Randomized comparison of coronary stenting with balloon angioplasty in selected patients with acute myocardial infarction.  
*Circulation.* 1998;97: 2502-2505.
136. **Tamai H., Tsuchikane E., Suzuki T. et al., for the MAJIC Investigators.**  
Mayo-Japan Investigation for Chronic total occlusions (MAJIC).  
*Circulation.* 1999;100(1): 436.
137. **The EPISTENT Investigators**  
Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade.  
*Lancet.* 1998;352: 87-92.
138. **Thomas M., Hancock J., Wainwright R., Jewitt D.**  
Coronary stenting following successful angioplasty for total occlusions.  
*J Am Coll Cardiol.* 1996;27: 153A.
139. **Topol E. J., Leya F., Pinkerton C. A. et al.**  
A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease.  
*N Engl J Med.* 1993;329: 221-227.
140. **Valassis G., Pragst I., Adolphs C., Paclik D., Gonschior P., Milz S.**  
Expression zellulärer Marker in Atherektomiebiopsien.  
*Z. Kardiol.* 2002;91 (suppl)(5): 275, Abstrakt.
- 141 **Valassis G., Pragst I., Adolphs C., Paclik D., Wiens D., Vogel-Wiens C., Milz C., Gonschior P.**  
Local photodynamic therapy reduces tissue hyperplasia after stenting in an experimental restenosis model.  
*Basic Res Cardiol.* 2002; 97: 132-136.

142. **Valassis G., Vogel-Wiens C., v. Degenfeld G., Milz S., Gonschior P.**  
 Histologische und transmissionselektronenmikroskopische Analyse von Autopsiegefäßen nach Stentimplantation.  
*Z. Kardiol.* 2000;89 (suppl)(5): 256, Abstrakt.
143. **Varnes M. E., Chiu S. M., Xue L. Y., Oleinick N. L.**  
 Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;255: 673-679.
144. **Versaci F., Caspardone A., Tomai F.**  
 A comparison of coronary-artery stenting with angioplasty for isolated stenosis of the proximal left anterior descending coronary artery.  
*N Engl J Med.* 1997;336: 817-822.
145. **Vesselinovitch D.**  
 Animal models and the study of atherosclerosis.  
*Arch Pathol Lab med.* 1988;112: 1011-1017.
146. **Vincent G. et al.**  
 Photodynamic therapy of atherosclerosis and restenosis: a potentially exciting new treatment method.  
*SPIE.* 1994;13:14-18.
147. **Visoná A., Angelini A., Gobbo S. et al.**  
 Local photodynamic therapy with Zn(II)-phtalocyanine in an experimental model of intimal hyperplasia.  
*J Photochem Photobiol B: Biology.* 2000;57: 94-101.
148. **von Scheidt W., Uberfuhr P., Reichart B., Steinbeck G.**  
 The role of PTCA in the management of focal critical lesions in transplant coronary artery disease.  
*Transplant Proc.* 1995;27(3): 1936-8.
149. **von Tappeiner H., Jodlbauer A.**  
 Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme.  
*Dtsch Arch Klin Med.* 1904;80: 427-287.
150. **Wilensky R. L., March K. L., Gardus-Pizlo I., Schauwecker D., Michaels D. R.**  
 Regional and arterial localization of radioactive microparticles after local drug delivery by unsupported or supported porous balloon catheters.  
*Am Heart J.* 1995;129(5): 852-859.

151. **Wilensky R. L., March K. L., Hathaway D.**  
Direct intraarterial wall injection of microparticles via a catheter: a potential drug delivery strategy following angioplasty.  
*Am Heart J.* 1991;122: 1136-1140.
152. **Wilgram R. L., Ingle D. J.**  
Spontaneous cardiovascular lesions in rats.  
*In: Roberts J. C. Jr., Strauss R., editors: Comparative atherosclerosis: the morphology of spontaneous and induced atherosclerotic lesions in animals and its relation to human disease.* 1965;  
New York: Harper & Row: 87-91.
153. **Wissler R. W., Vesselinovitch D.**  
Experimental models of human atherosclerosis.  
*Ann NY Acad Sci.* 1968;149: 907-922.
154. **Wyllie A. H.**  
Apoptosis: an overview.  
*Br Med Bull.* 1997;53(3): 451-465.
155. **Yamaguchi A., Woodburn K. W., Hayase M., Hoyt G., Robbins R.**  
Photodynamic therapy with motexafin lutetium (lu-tex) reduces experimental graft coronary artery disease.  
*Transplantation.* 2001;71(11): 1526-1532.

## 2. *Danksagung*

Herrn Professor Dr. med. Höfling danke ich für die Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Professor Dr. med. Steinbeck danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung.

Herrn Dr. med. Peter Gonschior danke ich für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und für die Gelegenheit, mich an wissenschaftlichen Publikationen zu beteiligen. Nicht zuletzt danke ich Ihnen für die im Lauf der Jahre entstandene Freundschaft.

An Herrn PD Dr. med. Milz vom Anatomischen Institut lag es ganz wesentlich, daß die histologische Aufbereitung überhaupt möglich wurde. Insbesondere will ich mich für seine unerschöpfliche Geduld und Hilfsbereitschaft bedanken, die ich immer trotz seines straffen Terminkalenders erfuhr.

Herrn Professor Meßmer möchte ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Chirurgische Forschung danken.

Frau Claudia Vogel-Wiens war wesentlich bei der Durchführung dieser Dissertation beteiligt. Ich danke ihr für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Schaffung von technischen und logistischen Voraussetzungen für diese Arbeit.

Großen Dank schulde ich Frau Mayer (Anatomische Lehranstalt), die mich bei der Erstellung und Färbung der histologischen Schnitte beriet und unterstützte.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Harald Werner Schmitt und Frau Dr. rer. nat. Sofia Papatoma bedanke ich mich für die fachliche Hilfe bei Fragen chemischer Natur.

Herrn Dr. med. Andreas Horban danke ich für das ausführliche Korrekturlesen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich, weil ohne deren liebevolle Unterstützung weder das Studium noch die Erstellung dieser Arbeit möglich gewesen wäre. Meiner Ehefrau Anastassia danke ich für ihre außergewöhnliche Unterstützung, ihren Enthusiasmus für meine Forschungsarbeit sowie für ihre Geduld und ihr Verständnis während der „langen Reise nach Ithaka“. Meiner Tochter Vassilia danke ich, daß sie da ist.

### **3. Lebenslauf**

Name:	Grigorios VALASSIS	
Geboren am:	03. November 1974 in München	
Eltern:	Dimitrios Valassis, Käserei-Meister Vassilia Valassis, geb. Gkogkori, Näherin	
Schulbildung:	1980-1986	Private Volksschule der Republik Griechenland in München
	1986- 1989	Privates Gymnasium der Republik Griechenland in München
	1989- 1992	Privates Lyzeum der Republik Griechenland in München
	1992	Griechisches Abitur
	1992- 1993	Studienkolleg bei den wissenschaftlichen Hochschulen des Freistaates Bayern, München - Schwerpunktkurs M (für Medizinische und Biologische Studien)
Hochschulausbildung	1993	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians- Universität München
	1995	Ärztliche Vorprüfung
	1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Wissenschaftliche Tätigkeit	1996- 1999	Experimentelle Promotionsarbeit auf dem Gebiet der Restenoseforschung bei Herrn Professor Dr. med. B. Höfling, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck)

	2000- 2003	Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Vaskuläre Biologie“ der Technischen Universität München
Berufliche Tätigkeit	2000- 2002	Arzt im Praktikum I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar (Direktor: Prof. Dr. med. A. Schömig)
	01.02.2002	Erteilung der Ärztlichen Approbation
	2002- 2003	Assistenzarzt I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar (Direktor: Prof. Dr. med. A. Schömig)
	Seit 01.02.2003	Assistenzarzt Hauptabteilung Kardiologie Isar-Klinik Betriebs GmbH, Betriebsstätte Privatklinik Dr. Riefler (Leiter: Dr. med. A. Horban)