

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen  
Deutsches Herzzentrum München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Systemische proliferative Serumkapazität und Restenose nach  
humaner koronarer Stentimplantation**

Frank Alexander Schütze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. Wessely
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 21.06.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2012 angenommen.



Meinen Eltern gewidmet.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	S. 9
1.1. Entwicklung des koronaren Stentings	S. 10
1.2. Problem der In-Stent Restenose	S. 12
1.3. Molekularbiologische Grundlagen der neointimalen Hyperplasie	S. 14
1.3.1. Zellzyklus	S. 14
1.3.1.1. Regulation durch Cycline, CDK's und CDKI's	S. 15
1.3.1.2. G <sub>1</sub> - und S-Phase	S. 15
1.3.1.3. G <sub>2</sub> -Phase und Mitose	S. 17
1.3.1.4. Regulation durch Protoonkogene	S. 17
1.3.2. Intra- und interzelluläre Vorgänge nach Gefäßverletzung	S. 17
1.3.2.1. Zelluläre Reaktion	S. 18
1.3.2.1.1. Thrombozyten	S. 18
1.3.2.1.2. Entzündungszellen	S. 18
1.3.2.1.3. Glatte Gefäßmuskelzellen	S. 19
1.3.2.1.4. Endothel	S. 20
1.3.2.2. Interzelluläre Signale: Wachstumsfaktoren und Zytokine	S. 20
1.3.2.2.1. PDGF	S. 20
1.3.2.2.2. bFGF	S. 21
1.3.2.2.3. TGFβ	S. 21
1.3.2.2.4. IGF-1	S. 21
1.3.2.2.5. IL-1, TNFα und IRF-1	S. 21
1.3.2.3. Zeitlicher Rahmen der ablaufenden vaskuloproliferativen Reaktion	S. 22
1.4. Daten zur Stent-Therapie	S. 24
1.4.1. Koronares Stenting im Vergleich zur alleinigen Ballondilatation	S. 24
1.4.2. Koronares Stenting bei Mehrgefäß-KHK	S. 24
1.5. Prädiktoren einer In-Stent Restenose	S. 25
1.5.1. Koronares Stenting kleiner Gefäße bzw. langstreckiger Stenosen	S. 26
1.5.2. Therapie In-Stent Restenose: PTCA versus konventionelles Stenting	S. 28
1.6. "Drug-eluting"-Stents	S. 29
1.6.1. Sirolimus	S. 29
1.6.2. Paclitaxel	S. 30
1.6.3. Weitere Substanzen	S. 31
1.7. Therapie der In-Stent Restenose: neue Ansätze	S. 32
<b>2. Problemstellung</b>	S. 33
<b>3. Materialien und Methoden</b>	S. 35
3.1. Probengewinnung und -verarbeitung	S. 35
3.2. Verwendete Zellen	S. 36
3.3. Zelllagerung	S. 36
3.4. Zellkultivierung	S. 37
3.5. Zellpassagierung	S. 37
3.6. Messung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA	S. 38
3.6.1. Prinzip BrdU-ELISA	S. 38
3.6.2. Vorbereitung der Patientenproben	S. 38
3.6.3. Versuchsansatz	S. 39
3.6.4. Bestimmung Proliferationsindizes als Maß der Serumkapazität	S. 39
3.7. Weitere erhobene Daten	S. 40

3.8.	Patienteneinschluß	S. 42
3.9.	Statistische Auswertung	S. 43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse - Patienten mit de novo-Stenosen</b>	<b>S. 45</b>
4.1.	Grundcharakteristika und primäre Endpunkte	S. 45
4.2.	Auswertung Proliferationsindizes	S. 47
4.2.1.	Auswertung Parameter PI_PRAE	S. 48
4.2.2.	Auswertung Parameter PI_POST	S. 48
4.2.3.	Auswertung Parameter PI_3D	S. 49
4.3.	Analyse des Einflusses weiterer Parameter	S. 50
4.3.1.	Auswertung prä- und postinterventioneller minimaler Lumen-Diameter	S. 51
4.3.2.	Auswertung prä- und postinterventioneller Referenzdurchmesser	S. 52
4.3.3.	Auswertung Parameter „Stentlänge“	S. 53
4.3.4.	Auswertung Parameter „ACC/AHA-Klassifikation“ und „Okklusion“	S. 53
4.4.	Auftreten klinischer Ereignisse in Abhängigkeit des PI < 1,0 oder ≥ 1,0	S. 57
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse - Patienten mit In-Stent Restenosen</b>	<b>S. 59</b>
5.1.	Grundcharakteristika und primäre Endpunkte	S. 59
5.2.	Auswertung Proliferationsindizes	S. 62
5.2.1.	Auswertung Parameter PI_PRAE	S. 62
5.2.2.	Auswertung Parameter PI_POST	S. 63
5.2.3.	Auswertung Parameter PI_3D	S. 64
5.2.4.	Auswertung Zielgröße TLR adjustiert mit Parameter „Stenoselänge“	S. 65
5.2.5.	Auswertung Parameter „Late Lumen Loss“	S. 65
5.3.	Analyse des Einflusses weiterer Parameter	S. 67
5.3.1.	Auswertung prä- und postinterventioneller minimaler Lumen-Diameter	S. 67
5.3.2.	Auswertung prä- und postinterventioneller Referenzdurchmesser	S. 68
5.3.3.	Auswertung Parameter „Stenoselänge“ und „Stentlänge“	S. 69
5.3.4.	Auswertung Parameter „ACC/AHA-Klassifikation“ und „Okklusion“	S. 70
5.4.	Auftreten klinischer Ereignisse in Abhängigkeit des PI < 1,0 oder ≥ 1,0	S. 71
5.4.1.	Auswertung hinsichtlich des Eintretens des Ereignisses TLR	S. 71
5.4.2.	Auswertung hinsichtlich des Eintretens des Ereignisses MACE	S. 72
5.4.3.	Ereigniszeitanalyse nach Kaplan-Meier	S. 73
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>S. 75</b>
6.1.	Patientenkollektiv mit de novo-Stenosen	S. 75
6.2.	Patientenkollektiv mit In-Stent Restenosen	S. 75
<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>S. 77</b>
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S. 91</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>S. 93</b>
9.1	Literaturverzeichnis	S. 93
9.2.	Abbildungsverzeichnis	S. 100
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>S. 101</b>

## Verwendete Abkürzungen:

ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMS	Bare Metal Stent
CABG	Coronary Artery Bypass Graft
CAK	CDK-Activating Kinase
CASMC	Coronary Artery Smooth Muscle Cell
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
IGF	Insulin-like Growth Factor
iNOS	inducible NO-Synthase
IRF	Interferon Regulatory Factor
IVUS	IntraVascular UltraSound
MACE	Major Adverse Cardiac Event
MLD	Minimal Lumen Diameter
MPF	Mitosis Promoting Factor
PAF	Platelet Activating Factor
PCI	Percutaneous Coronary Intervention
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty
RD	Reference Diameter
TLR	Target Lesion Revascularization
TNF	Tumor Necrosis Factor

Weitere Abkürzungen werden im direkten Kontext mit deren Verwendung erläutert.





## 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupterkrankungs- und Todesursache der industrialisierten Welt dar. Gemäß dem "Heart Disease and Stroke Statistics"-Bericht der American Heart Association (AHA) beläuft sich die Zahl derjenigen Menschen in den Vereinigten Staaten von Amerika, die im Jahr 2010 von einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems (inklusive der arteriellen Hypertonie) betroffen waren, auf über 81 Millionen, die Prävalenz steigt mit dem Alter an, in der Literatur werden Zahlen von beginnend mit 5% in der Altersgruppe der 20-Jährigen bis hin zu 75% bei den über 75-Jährigen angegeben <sup>78</sup>. Trotz aller Fortschritte in der Prävention und Therapie kardiovaskulärer Krankheiten nimmt deren Zahl weiterhin zu. Betrachtet man den Rückgang ernährungs- und infektionsbedingter Todesursachen in Regionen, die heute allgemein zu Schwellenländern bzw. Ländern der 3. Welt gezählt werden, so werden gemäß Schätzungen Herzkreislauf-Erkrankungen im Jahr 2020 nicht nur die Haupttodesursache in der industrialisierten, sondern der gesamten Welt sein <sup>16</sup>.

Eine Hauptgruppe der als "kardiovaskuläre Erkrankungen" zusammengefassten Krankheitsbilder bildet die koronare Herzkrankheit (KHK), die sich klinisch als stabile bzw. instabile Angina pectoris oder akutes Koronarsyndrom manifestieren kann. Im "Heart Disease and Stroke Statistics"-Bericht des Jahres 2010 beziffert die AHA die Anzahl der in den USA an KHK leidenden Patienten auf insgesamt 17,6 Millionen; die Prävalenz von Patienten mit stattgefundenem Myokardinfarkt wird mit 8,5 Millionen angegeben, die derjenigen mit Angina pectoris-Beschwerden mit 10,2 Millionen. In der Altersgruppe der unter 75-Jährigen ist die koronare Herzkrankheit für 50% der kardiovaskulären Ereignisse verantwortlich. Pro Jahr erleiden in den USA ca. 935.000 Menschen einen Herzinfarkt (klinisch manifest oder auch "stumm"), knapp 600.000 Menschen sterben pro Jahr an den Folgen der KHK. Die Kosten, die laut AHA durch kardiovaskuläre Erkrankungen direkt (z.B. durch Krankenhausaufenthalte, medizinische Maßnahmen und Medikamente) und indirekt (z.B. Arbeitszeitausfälle und andere Folgekosten) in den USA entstehen, werden für das Jahr 2010 mit \$503 Milliarden angegeben, darunter \$177 Milliarden zu Lasten der koronaren Herzkrankheit <sup>78</sup>.

## 1.1. Entwicklung des koronaren Stentings

Lange Zeit galt die Wiedereröffnung verschlossener Koronargefäße mittels Bypass-Chirurgie als Goldstandard bei Patienten mit Angina pectoris und Herzinfarkt. Bereits 1956 wurden Werner Forssmann, André Frédéric Cournand und Dickinson W. Richards "für ihre Entdeckungen zur Herzkatheterisierung und zu den pathologischen Veränderungen im Kreislaufsystems" <sup>100</sup> mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Basierend auf der von Mason Sones in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts weiterentwickelten Methode mit Darstellung der Herzkranzgefäße durch Kontrastmittelinjektion direkt in die Koronararterien mittels eines in Judkins-Technik (Punktion der A. femoralis im Inguinalbereich) eingebrachten Herzkatheters <sup>116</sup>, stellte dann der in Dresden geborene Andreas Roland Grüntzig im Jahr 1976 eine neue Methode zur Reperfusion verengter bzw. verschlossener Koronarien vor. Bei der als "perkutane transluminale Koronarangioplastie" (percutaneous transluminal coronary angioplasty, kurz PTCA) bezeichneten Technik, die als Grundstein zur Schaffung eines neuen Bereichs innerhalb der Kardiologie - der interventionellen Kardiologie - gilt, wird der analog zur diagnostischen Koronarangiographie ins koronare Gefäßbett eingebrachte flexible steuerbare Führungsdraht genutzt, um darüber hinweg einen Ballon in den Bereich der Gefäßengstelle vorzuschieben. Durch Insufflation des Ballons erfolgt schließlich die Aufdehnung der Stenose und somit die Verbesserung bzw. Wiederherstellung der Koronarperfusion <sup>43</sup>.

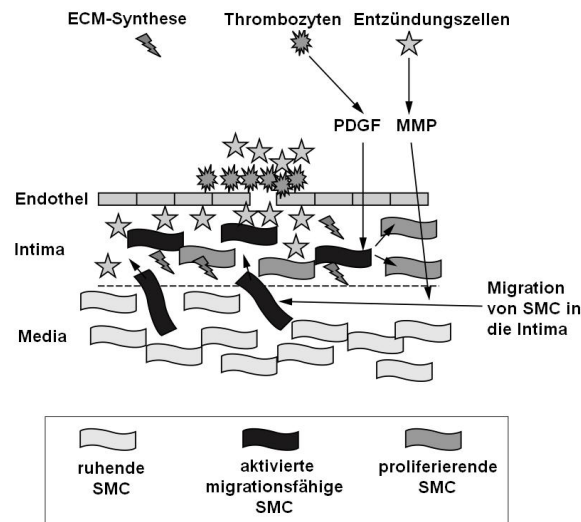
Anfangs bestand eine enge Indikationsstellung bezüglich der Anwendung der PTCA, sie kam vornehmlich bei Patienten mit koronarer Eingefäßerkrankung und stammnaher Lokalisation der Stenose zum Einsatz bzw. dann, wenn beim Patienten eine der medikamentösen Therapie refraktäre Angina pectoris vorlag; eine weitere Voraussetzung stellte eine nicht wesentlich eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion dar <sup>11</sup>. Im Verlauf der Jahre nahm die Anzahl der durchgeführten katheterbasierten Koronarinterventionen stetig zu, einerseits wegen der im Vergleich zur Bypasschirurgie geringeren Invasivität und des verminderten Zeit- bzw. Personalaufwandes, andererseits wurde es durch Verbesserung von Technik und verwendeten Materialien möglich, auch komplexe Läsionstypen therapeutisch anzugehen <sup>120</sup>. Als problematisch erwies sich von Anfang an, daß es bei etwa 30% bis knapp über 50% der Patienten nach PTCA zur Ausbildung einer sogenannten Restenose kommt <sup>42, 101</sup>. Als Restenose bezeichnet man eine erneute Verengung am Ort der Dilatation der Gefäßengstelle, die sich meist innerhalb 6 Monaten postinterventionell entwickelt <sup>42</sup>

und mit rekurrenten Symptomen einhergehen kann. Als Antwort auf dieses fundamentale Problem der konventionellen PTCA wurde im Jahr 1986 durch die Arbeitsgruppe um Ulrich Sigwart erstmalig eine koronare Stentimplantation an einem Patienten durchgeführt <sup>130, 137</sup>. Unter koronarem Stenting versteht man die Einbringung einer auf einen speziellen Ballon angebrachten metallischen Endoprothese an den Ort der Gefäßengstelle, dort erfolgt dann die Entfaltung des Stents; diese Technik per se wurde bereits 1985 vom Radiologen Julio Palmaz vorgestellt <sup>130</sup>. Heute, knapp 25 Jahre ihrem erstmaligem Einsatz, hat sich zur Wiederherstellung der koronaren und somit myokardialen Perfusion die Methode des koronaren Stentings alleine oder komplementär zur PTCA zur dominierenden unter den perkutanen koronaren Interventionsformen entwickelt <sup>57</sup>. Im Vergleich zur alleinigen PTCA ermöglicht koronares Stenting stabile und vorhersagbare initiale angiographische Ergebnisse auch in komplexen Läsionen <sup>51</sup> bei gleichzeitiger Verminderung des periprozeduralen Risikos (z.B. wird die Notwendigkeit zur operativen Myokardrevaskularisation als Folge eines periinterventionellen Gefäßverschlusses reduziert) <sup>36</sup>. Die Methode des koronaren Stentings ermöglichte eine deutliche Erweiterung des Indikationsspektrums für perkutane Katheterinterventionen, sie besteht heute nicht mehr nur für Patienten mit den oben genannten Kriterien, heute ist die sichere Durchführung einer perkutanen koronaren Katheterintervention unter anderem auch bei Patienten mit (komplexer) koronarer Mehrgefäßerkrankung <sup>50</sup> und im akutem Myokardinfarkt möglich <sup>40</sup>. Zwar gab es alternativ zum koronaren Stenting neben der konventionellen PTCA auch weitere neuentwickelte Interventionsmöglichkeiten wie etwa der Atherektomie oder Laser-Verfahren, diese konnten sich jedoch nicht dauerhaft durchsetzen. Eine wesentliche Weiterentwicklung stellte jedoch die Entwicklung medikamentenbeschichteter Stents und PTCA-Ballone in den letzten Jahren dar. So wurden gemäß "Heart Disease and Stroke Statistics"-Bericht im Jahr 2006 in den USA in 75% der Stentimplantationen medikamentenbeschichtete, sogenannte "Drug-eluting"-Stents verwendet <sup>78</sup>. In 80 - 90% aller interventionellen kardiologischen Eingriffe werden heutzutage Stents verwendet <sup>51</sup>. Trotz der anspruchsvolleren Technik des koronaren Stentings im Vergleich zur alleinigen PTCA liegt die Erfolgsrate des Primäreingriffs bei ca. 94 - 97% <sup>122, 129</sup>. Pro Jahr werden in den USA ca. 1,3 Millionen perkutane Katheterinterventionen vorgenommen, im Gegensatz dazu steht eine Zahl von aktuell ca. 253.000 Patienten, bei denen ein bypasschirurgischer Eingriff notwendig war <sup>78</sup>, während diese Zahl im Jahr 2004 noch bei 350.000 lag <sup>38</sup>.

## 1.2. Problem der In-Stent Restenose

Wie oben beschrieben wurde der langfristige Therapieerfolg der PTCA von Anfang an durch Restenoseausbildung in 30-50% der Fälle innerhalb 6 Monaten nach dem Eingriff beeinträchtigt. Lange als alleinige Konsequenz überschießender Heilungsprozesse durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in der Tunica media betrachtet <sup>75</sup>, wurde mit der Zeit durch tierexperimentelle oder auch Studien am Patienten klar, daß die Entstehung einer Restenose nach PTCA vor allem auf elastische Rückstellkräfte des Gefäßes, dem sogenannten "elastic recoil", sowie auf adaptiven Umbauvorgängen der arteriellen Wand, dem sogenannten "remodeling" zurückzuführen ist <sup>120</sup>. Da Stents den Rückstellkräften durch "elastic recoil" und Remodeling entgegenwirken, ging man anfangs davon aus, daß so das Problem der Restenoseausbildung nach PTCA gelöst sei. Große randomisierte Studien wie die STRESS- (STent REStenosis Study) und BENESTENT- (BElgium NEtherland STENT) Studie bestätigten zwar eine signifikante Reduktion der Restenoserate nach koronarem Stenting im Vergleich zur PTCA alleine <sup>35, 129</sup>, trotzdem lässt sich auch nach Implantation eines unbeschichteten, sogenannten "Bare metal"-Stents weiterhin je nach Studienlage in bis zu 30-50% der Patienten angiographisch eine relevante Restenose nachweisen <sup>89</sup>. Diese sogenannte In-Stent Restenose unterscheidet sich histologisch von der Restenose nach konventioneller Ballonangioplastie. Mehr als 90% des Lumenverlustes nach koronarem Stenting werden der Bildung einer sogenannten neointimalen Hyperplasie zugeschrieben <sup>88, 153</sup>.

In Reaktion auf die stentinduzierte Verletzung migrieren glatte Muskelzellen der koronaren arteriellen Gefäßwand (coronary artery smooth muscle cells, kurz CASMC) aus der Tunica media in die Tunica intima, proliferieren dort und stellen letzten Endes einen Großteil des zellulären Anteils der auf diesem Weg neu gebildeten "Neointima" dar <sup>39, 67, 90</sup>.



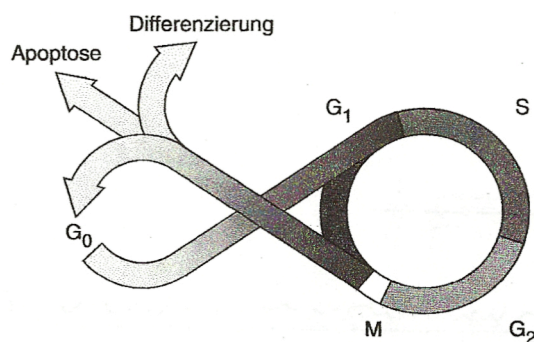
**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der Ausbildung der neointimalen Hyperplasie, modifiziert nach Mitra und Agrawal<sup>90</sup>: glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) liegen in der Tunica media in einem sogenannten "ruhenden" Phänotyp vor; nach stentinduzierter Verletzung der Endothelzellen werden SMC aktiviert, migrieren von der Tunica media in die Tunica intima und proliferieren dort. Desweiteren kommt es zur Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM); weitere Zelltypen wie Thrombozyten oder Entzündungszellen tragen durch Freisetzung von z.B. PDGF oder Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zu diesen Vorgängen bei.

Zum genaueren Verständnis der Hintergründe des nach wie vor aktuellen Problems der In-Stent Restenose durch neointimale Hyperplasie sollen nun, anhand von Erkenntnissen aus der Grundlagen- und klinischen Forschung, die grundsätzlichen zugrundeliegenden Pathomechanismen der neointimalen Hyperplasie erörtert werden; in Bezug auf diese Modelle wird dann im weiteren Verlauf das als Reaktion auf die In-Stent Restenose entwickelte Therapieverfahren mit medikamentenbeschichteten bzw. "Drug-eluting"-Stents erläutert. Da sich die weitere Arbeit (vgl. Punkt 2 - Problemstellung) mit Prädiktoren für die Entwicklung einer In-Stent Restenose beschäftigt, erfolgt zudem eine Abhandlung über die wesentlichen, in der aktuellen Literatur aufgeführten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Restenose.

## 1.3. Molekularbiologische Grundlagen der neointimalen Hyperplasie

### 1.3.1. Zellzyklus

Voraussetzung zur Proliferation von Zellen ist die Fähigkeit zur Mitose, d.h. zur Zellteilung. Dazu durchlaufen die Zellen einen sogenannten Teilungszyklus, auch Zellzyklus genannt. Bei diesem Zellzyklus werden grundsätzlich fünf verschiedene Entitäten unterschieden: die  $G_0$ - ("gap"),  $G_1$ - und  $G_2$ -Phase, die S- ("Synthese") Phase sowie die M- (Mitose) Phase, wobei die Sequenz von  $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase auch als Interphase bezeichnet wird <sup>26</sup>. Ruhende, das heißt nicht proliferierende Zellen, befinden sich in der  $G_0$ -Phase, in der sie auch über längere Zeiträume verbleiben können. Durch bestimmte Mitose-auslösende Signale (z.B. Wachstumsfaktoren) können diese Zellen in die  $G_1$ -Phase übertreten, hier wächst die Zelle durch Synthese von RNA, Proteinen und weiteren Zellbestandteilen. Die anschließende S-Phase dient neben der DNA-Replikation auch der Synthese weiterer für die Zelle zur Mitose notwendiger Bestandteile wie etwa Histonen oder Zentrosomen. Die  $G_2$ -Phase stellt die unmittelbare Vorbereitung der Zelle zur Teilung dar. In der M-Phase erfolgt die Teilung der Zelle mit Chromosomentrennung, es entstehen zwei identische Tochterzellen <sup>68</sup>. Nach abgeschlossener Teilung kann die Zelle erneut in die  $G_1$ - und somit in eine neue Teilungsphase eintreten, alternativ verlässt die Zelle die  $G_1$ -Phase und verbleibt in der  $G_0$ -Phase <sup>26</sup>.



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen, nach Denk und Zatloukal <sup>26</sup>: "ruhende" Zellen befinden sich in der  $G_0$ -Phase, nach Eintritt in den Zellzyklus werden die  $G_1$ -, S-,  $G_2$ - und zuletzt die M-Phase durchschritten; nach Abschluß der Mitose tritt die Zelle erneut in den Zellzyklus ein oder kehrt in die  $G_0$ -Phase zurück, durch spezielle Kontrollmechanismen kann aber für den Fall irregulär bzw. fehlerhaft ablaufender Zellteilungsvorgänge auch die Apoptose induziert werden.

Da die Teilung der Zelle eine besonders kritische Phase darstellt, in der Störungen schwerwiegende Folgen wie z.B. das Auftreten von Mutationen oder den Zelltod nach sich ziehen können, müssen diese einzelnen Phasen exakt kontrolliert und

reguliert werden. Gewährleistet wird dies unter anderem durch zwei R- (Restriktions) Punkte, diese befinden sich jeweils zwischen der G<sub>1</sub>- und S- bzw. der G<sub>2</sub>- und M-Phase, hier wird durch bestimmte biochemische Signale über den Stop bzw. die Weiterführung des Zellzyklus entschieden <sup>86</sup> .

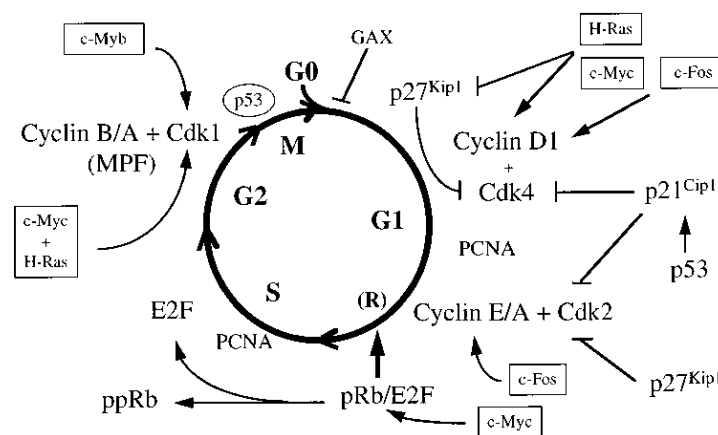
### **1.3.1.1. Regulation durch Cycline, CDK's und CDKI's**

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt über die Synthese, Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Moleküle <sup>66</sup> . Cycline und ihre Co-Enzyme, die Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin dependent kinase, kurz CDK), bilden in ihrer aktivierten Form stabile Komplexe und fördern die weitere Progression durch den Zellzyklus. Die Aktivität dieser Holoenzyme ist abhängig von ihrer Menge sowie vom Phosphorylierungsstatus der als Katalysator dienenden CDK's <sup>26</sup> . Durch phasenspezifische Cyclin/CDK-Komplexe wird der regelrechte Fortlauf von der G<sub>1</sub>-Phase bis hin zur Mitose garantiert <sup>139</sup> . Den Zellzyklus-fördernden Cyclin/CDK-Komplexen stehen die CDK-Inhibitoren (cyclin dependent kinase inhibitor, kurz CDKI) als negative Regulatoren gegenüber <sup>135</sup> . Aktiviert und reguliert durch verschiedenste antimitogene Signale, bewirken z.B. CDKI's der KIP/CIP-Familie (z.B. p27, p21 oder p57) direkt oder indirekt eine Inhibition des Zellzyklus durch Hemmung der Cyclin/CDK-Komplexe <sup>139</sup> .

### **1.3.1.2. G<sub>1</sub>- und S-Phase**

Das Fortschreiten durch die G<sub>1</sub>-Phase wird reguliert durch diverse Cycline in Kooperation mit den entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen; die frühe G<sub>1</sub>-Phase wird bestimmt durch Cycline des Typs D, für die späte Phase stellen sich Cycline des Typs E und A als entscheidend dar. Die durch eine Akkumulation der Cycline des Typs D mit ihren komplementären CDK's (CDK<sub>4</sub>, CDK<sub>6</sub>) entstehenden Komplexe bewirken eine Erhöhung des Proteins PCNA (proliferating cell nuclear antigen), die freien Cyclin D/CDK/PCNA-Komplexe bewirken eine Absenkung der biologisch wirksamen Menge von p27 <sup>15</sup> . In ruhenden, d.h. in der G<sub>0</sub>-Phase befindlichen Zellen, liegt p27 normalerweise in hohen Spiegeln vor <sup>136</sup> und hemmt in seiner Funktion als CDKI die jeweilige katalytische Untereinheit der für die Passage durch die G<sub>1</sub>-Phase notwendigen Proteinkinase (CDK<sub>4</sub>, CDK<sub>2</sub>) <sup>144</sup> , es wird so das Fortschreiten durch die

G<sub>1</sub>-Phase und konsekutiv die Proliferation der Zelle inhibiert. Am Ende der G<sub>1</sub>-Phase erfolgt durch die aktivierten Cyclin-/CDK-Komplexe eine Phosphorylierung des Retinoblastoma-Genprodukts Rb, einer Art Synchronisator der Transkriptionsvorgänge innerhalb der Zelle und zugleich Bestandteil des Mechanismus des Restriktionspunktes zwischen der G<sub>1</sub>- und S-Phase <sup>147</sup>. Unter Ruhebedingungen liegt Rb zusammen mit dem Transkriptionsfaktor E2F in stabilen und gleichzeitig inaktiven Komplexen vor; erfolgt nun der mitogen-induzierte Eintritt der Zelle in die G<sub>1</sub>-Phase, wird Rb durch das Cyclin D/CDK<sub>4</sub>-Holoenzym hyperphosphoryliert und der Komplex aus E2F und Rb dissoziiert <sup>139</sup>. In der Folge wird durch die aktive Form des E2F die Expression von Genen hochreguliert, die für die Progression durch die S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase benötigt werden, die Zelle kann nun in die S-Phase eintreten. Eine weitere Regulation des Zellzyklus erfolgt durch p21, welches zu Beginn der G<sub>1</sub>-Phase in niedrigen Pegeln vorliegt, dessen Spiegel dann aber ansteigen, durch die Bindung mehrerer p21-Untereinheiten kommt es zu einer Inaktivierung der Cyclin/CDK-Komplexe <sup>15, 136</sup>. Als wichtiger Regulator des Zellzyklus gilt p53, welches über die Induktion verschiedener Zielgene den programmierten Zelltod - die Apoptose - oder DNA-Reperaturmechanismen einzuleiten vermag, aber auch z.B. über eine Aktivierung der p21-Expression die Arretierung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase bewirken kann <sup>14, 72</sup>.



**Abbildung 3.** Vereinfachtes Schema der Zellzyklusregulation nach Braun-Dullaues et al. <sup>15</sup>: es zeigt sich der im Text beschriebene Einfluß von Cyclinen, CDK's und CDKI's auf die Regulation der einzelnen Phasen des Zellzyklus. Während Cyclin/CDK-Komplexe das Fortschreiten durch den Zellzyklus fördern, hemmen CDKI's wie z.B. p21 oder p27 diese Prozesse; Protoonkogene wie c-fos oder c-myc modulieren die Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe.



### **1.3.1.3. G<sub>2</sub>-Phase und Mitose**

Nach vollständiger DNA-Replikation und Fortschreiten der Zelle durch die G<sub>2</sub>-Phase tritt die Zelle schließlich in die M-Phase ein. Eine Schlüsselrolle hierfür nimmt eine spezifische Serin/Threonin-Kinase ein, die als MPF (mitosis promoting factor) bezeichnet wird <sup>68</sup>. MPF besteht aus einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin B, dessen Konzentration in der Interphase ansteigt und in der M-Phase ihren maximalen Wert erreicht, und aus einer katalytischen Untereinheit, der CDK<sub>1</sub>, auch bekannt als cdc2 (cell division cycle 2) <sup>15</sup>. Aktives MPF phosphoryliert verschiedene an der Mitose beteiligte Proteine und Enzyme und leitet somit die Prophase ein <sup>68</sup>. Auch diese Prozesse unterliegen einem Regulationsmechanismus dadurch, daß der aktivierte MPF-Komplex neben den oben genannten Elementen auch Enzyme aktiviert, die einen proteolytischen Abbau des Cyclin B über Proteasomen bewirken <sup>63</sup>.

### **1.3.1.4. Regulation durch Protoonkogene**

Protoonkogene sind genetische Elemente, deren Genprodukt als Bestandteil von Signaltransduktionsprozessen an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt sind <sup>68</sup>; es wird ihnen Rolle als Mediatoren bei der Stimulation des Zellzyklus-Eintritts durch Wachstumsfaktoren zugeschrieben. So bewirkt z.B. c-fos eine Erhöhung der mRNA-Expression von Cyclin D, Cyclin E und CDK<sub>4</sub> <sup>107</sup>. Ähnlich wie c-Fos bewirkt auch c-myc eine Verstärkung der für die G<sub>1</sub>-Phase typischen Cyclin D und -E assoziierten Kinasenaktivität <sup>141</sup>. Verschiedene mitogene Signale leiten über ras diverse Phosphorylierungsprozesse ein, welche Zellteilung und -differenzierung induzieren können <sup>7</sup>, so wird z.B. die Cyclin D-Aktivität erhöht und konsekutiv die Progression durch die G<sub>1</sub>-Phase gefördert <sup>76</sup>. Aus den erhöhten mRNA-Pegeln von B-myb in der späten G<sub>1</sub>/S-Phase kann ebenfalls ein fördernder Effekt auf die Zellzyklus-Progression abgeleitet werden <sup>81</sup>, für c-myb wird eine stimulierende Wirkung auf die cdc2-Transkription vermutet <sup>69</sup>.

### **1.3.2. Intra- und interzelluläre Vorgänge nach Gefäßverletzung**

Ein Vorgang wie Ballonangioplastie bzw. Stentimplantation führt aufgrund von Balloninsufflationsdrücken bis über 10 atm unweigerlich zu einer Verletzung des ent-

sprechenden Gefäßes. Aus der Abschilferung des Gefäßendothels und der damit verbundenen Freilegung von prokoagulatorischen Bestandteilen der Gefäßwand wird die Bildung von Thromben und Vasospasmen begünstigt <sup>46</sup> ; eine entscheidende Rolle in den im Folgenden geschilderten Prozessen spielt dabei jedoch vor allem der Untergang von glatten Gefäßmuskelzellen der Tunica media. Grundsätzlich löst eine ballon- bzw. stentinduzierte Verletzung den Beginn einer sich vornehmlich in drei Schritte untergliedernde Reaktion aus: 1. frühe Phase mit Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung, 2. Intermediärphase mit Rekrutierung von glatten Gefäßmuskelzellen und 3. späte Phase mit Proliferation <sup>19</sup> .

### **1.3.2.1. Zelluläre Reaktion**

#### **1.3.2.1.1. Thrombozyten**

In der frühen Phase führen freigelegte subendotheliale Strukturen zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, diese setzen innerhalb weniger Minuten den Inhalt ihrer Granula wie z.B. PDGF <sup>34</sup> , aber auch andere mitogene (TGF, bFGF) und chemotaktische Substanzen (z.B. PAF = platelet activating factor) in die verletzte Gefäßwand frei <sup>13, 77</sup> . Durch die Ausschüttung thrombozyteneigener, aggregationsfördernder Substanzen wie z.B. Adenosindiphosphat unterliegt dieser Prozeß einer gewissen Selbstaufrechterhaltung <sup>30</sup> , bis dann nach etwa 24 Stunden die Thrombogenität der arteriellen Gefäßoberfläche signifikant nachlässt <sup>65</sup> und sich der Thrombozytenumsatz verringert <sup>150</sup> .

#### **1.3.2.1.2. Entzündungszellen**

Eine weitere an dieser frühen Phase beteiligte Zelllinie stellen Entzündungszellen dar. Angezogen von verschiedenen Mediatoren bilden Leukozyten und Makrophagen einen kleinen aber signifikanten Anteil der Zellen der Neointima, von Leukozyten ist bekannt, daß diese zwischen 1% und 11% der Gesamtzellpopulation darstellen <sup>77</sup> , bei T-Lymphozyten wird von einem Anteil von ca. 0,3% an der neointimalen Zellpopulation ausgegangen <sup>54</sup> . Die Bedeutung dieser Zelltypen für die Ausbildung der neointimalen Hyperplasie konnte z.B. von Rogers et al. aufgezeigt werden, welche mittels Blockade eines auf Leukozyten exprimierten Zelladhäsionsmoleküls durch einen monoklonalen Antikörpers in vitro eine reduzierte neointimale Verdickung nach vorausgegangener balloninduzierter Endothelverletzung nachweisen konnten <sup>115</sup> .

### 1.3.2.1.3. Glatte Gefäßmuskelzellen

Kennzeichnendes histologisches Merkmal einer Restenose nach Angioplastie im Menschen und in Tiermodellen ist die Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen innerhalb der Neointima. Im Rahmen der Angioplastie kommt es unweigerlich zum Untergang von glatten Gefäßmuskelzellen der Tunica media. Etwa 30 Minuten nach Angioplastie scheinen nach Studien von Perlman et al. ca. 70% der in der Tunica media befindlichen glatten Gefäßmuskelzellen apoptotisch zu sein <sup>106</sup>. In der Folge werden durch die von Thrombozyten, Leukozyten und im Rahmen des Zelluntergangs freigesetzten Stoffe Prozesse initiiert, die zur Aktivierung der glatten Muskelzellen führen. Als früheste Zeichen dafür gilt die Nachweisbarkeit von Protoonkogenen wie c-fos, c-jun und c-myc schon etwa 30 Minuten nach Verletzung. Durch Wachstumsfaktoren stimuliert, stellt die erhöhte Expression dieser Gene eine vorübergehende, wenige Stunden anhaltende mitogene Stimulation v.a. der glatten Gefäßmuskelzellen dar <sup>9, 84</sup>. Unter normalen Bedingungen befindet sich die Mehrzahl der glatten Gefäßmuskelzellen in der Tunica media, und liegen dort in einem ruhenden, sogenannten "kontraktilen" Phänotyp vor <sup>23</sup>, gekennzeichnet durch die reichhaltige Ausprägung von aktin- und myosinhaltigen Filamenten <sup>109</sup>. Nach Stimulation bilden glatte Gefäßmuskelzellen einen "synthetischen" Phänotyp aus, charakterisiert durch einen Rückgang der Myofilamentdichte und konsekutiv der Kontraktionsfähigkeit <sup>80</sup>, und fördern durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteasen und Extrazellulärmatrix die weitere Neointimabildung <sup>23, 105</sup>. Durch Stimulation mittels von Thrombozyten und Zellyse freigesetzter Wachstumsfaktoren beginnen ca. 20-40% der in der Tunica media befindlichen glatten Gefäßmuskelzellen im Zeitraum von etwa 24 Stunden bis 3 Tagen nach balloninduzierter Verletzung zu proliferieren <sup>19</sup>. Danach migriert diese Subpopulation der medialen glatten Gefäßmuskelzellen, angezogen von Chemotaxinen wie PDGF, von der Tunica media in die Tunica intima <sup>33</sup>. Dies geschieht etwa am Tag 4, die Proliferation setzt sich dabei für einen Zeitraum von etwa 2 Wochen fort <sup>20</sup>. Im Schnitt durchlaufen die Zellen 3 Zellzyklen, etwa 10-20% der glatten Gefäßmuskelzellen migrieren, ohne in den Zellzyklus einzutreten <sup>19</sup>. Nach spätestens 3 Monaten erreicht die Dicke der neu gebildeten Neointima ihr Maximum <sup>22</sup>, somit kann das zusätzliche Volumen, welches sich nach Ende der Proliferation zwei Wochen nach Ballondenudation ansammelt, der Synthese von extrazellulärer Matrix durch neointimale glatte Gefäßmuskelzellen im synthetischen Phänotyp zugeschrieben werden <sup>30</sup>. Wie von

Schwarz et al. berichtet stellen zellulären Bestandteile nur etwa 11% des Neointima-Volumens <sup>125</sup>, 90% hiervon glatte Gefäßmuskelzellen <sup>67</sup>, der Rest besteht aus extrazellulärer Matrix. Nach 2-3 Monaten kehren die glatten Gefäßmuskelzellen in den kontraktilen Phänotyp zurück <sup>21</sup>, im Rahmen des Remodeling kommt es dann auch zur Entfernung eines Teils der überschießend gebildeten Extrazellulärmatrix durch Matrix-Metalloproteinasen <sup>30</sup>.

#### **1.3.2.1.4. Endothel**

Über verschiedene Mechanismen nimmt das Endothel Einfluß auf die Entwicklung der neointimalen Hyperplasie. So wird z.B. durch Stickoxid (NO), welches normalerweise von intakten Endothelzellen freigesetzt wird, die Thrombozytenadhäsion sowie -aggregation inhibiert <sup>112</sup>, zusätzlich wirkt sich NO hemmend auf die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen aus <sup>126</sup>. Dies verdeutlicht, daß der Verlust von Endothel durch den interventionellen Eingriff unter anderem einen Mangel an NO nach sich zieht, welcher indirekt die Entwicklung der Neointima begünstigt.

#### **1.3.2.2. Interzelluläre Signale: Wachstumsfaktoren und Zytokine**

Vermittelt werden die jeweiligen Mechanismen der darauffolgenden vaskuloproliferativen Reaktion über von verschiedenen Zellen wie z.B. Thrombozyten, verletzten Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen sezernierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die über diverse Mechanismen und Wirkstoffe regulierend auf Gefäßzellen wirken <sup>139</sup>. Die verschiedenen Moleküle stellen sich unterschiedlich in ihrer Wirkung auf den Zellzyklus dar:

##### **1.3.2.2.1. PDGF**

Thrombozyten sind eine wichtige Quelle des platelet derived growth factor <sup>71</sup>, jedoch kann dieser Wachstumsfaktor auch von anderen Zellen wie z.B. Makrophagen <sup>149</sup> oder glatten Gefäßmuskelzellen <sup>145</sup> gebildet werden. Trotz des bekannten mitogenen Einfluß auf mesenchymale Zellen <sup>32</sup>, wie z.B. der PDGF-induzierten Degradierung von p27 <sup>142</sup> oder einer PDGF-assoziierten verstärkten Expression von c-myc <sup>18</sup>, zeigten mehrere tierexperimentelle Studien mit PDGF-spezifischen Inhibitoren, daß PDGF vor allem chemotaktisch auf glatte Muskelzellen wirkt <sup>30</sup>. Ferns et al. konnten mittels eines Antikörpers gegen PDGF zwar die Akkumulation glatter Muskelzellen in

der Neointima nach experimenteller Angioplastie reduzieren, ein signifikanter Effekt auf die Proliferationsfähigkeit blieb dabei allerdings aus <sup>32</sup> .

#### **1.3.2.2.2. bFGF**

bFGF, ein von verletzten glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen sowie von aktivierten Makrophagen freigesetzter Wachstumsfaktor <sup>46</sup> , werden sowohl proliferative Auswirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen <sup>74</sup> und Endothelzellen <sup>73</sup> als auch ein fördernder Einfluß auf Migration der glatten Gefäßmuskelzellen zugeschrieben <sup>53</sup> .

#### **1.3.2.2.3. TGF $\beta$**

Als weiterer potentiell für die Ausbildung einer Restenose nach balloninduzierter Gefäßverletzung wichtiger Wachstumsfaktor gilt TGF $\beta$ , gebildet z.B. in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen <sup>3</sup> oder Thrombozyten <sup>5</sup> . In tierexperimentellen Studien konnten nach Angioplastie-induzierter Verletzung signifikant erhöhte TGF $\beta$ -Spiegel in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden <sup>99</sup> , die höchsten Pegel werden dabei in der zeitlichen Phase der Synthese extrazellulärer Matrix erreicht <sup>8</sup> .

#### **1.3.2.2.4. IGF-1**

Für das Somatomedin IGF-1, welches im Rahmen der reaktiven Vorgänge nach balloninduzierter Gefäßverletzung z.B. in glatten Gefäßmuskelzellen gebildet wird und dessen mRNA-Pegel in der Woche nach der erfolgten Endothelverletzung um den Faktor 10 ansteigen <sup>17</sup> , konnten rezeptorvermittelte mitogene Eigenschaften auf glatte Gefäßmuskelzellen aufgezeigt werden <sup>31</sup> .

#### **1.3.2.2.5. IL-1, TNF $\alpha$ und IRF-1**

Nach Verletzung des Gefäßes infolge Angioplastie kommt es durch die konsekutiv auftretende entzündliche Reaktion mit Leukozyten-Aktivierung zur Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin 1 (kurz IL-1) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (kurz TNF $\alpha$ ). IL-1 wirkt indirekt durch eine Induktion PDGF-kodierender Gene proliferationsstimulierend auf glatte Gefäßmuskelzellen <sup>113</sup> und fördert im Rahmen der lokalen Entzündungsreaktion die Induktion von IGF-1 in Endothelzellen <sup>37</sup> . Tanaka et al. beschrieben 1996 durch im Rahmen von tierexperimentellen Studien gewonnener Ergebnisse, daß in durch eine balloninduzierte Verletzung alterierten glatten Gefäßmuskelzellen

vermehrt  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA nachweisbar ist; für  $\text{TNF}\alpha$  selbst wurde gezeigt, daß dieser glatte Gefäßmuskelzellen zur Teilung anregen kann <sup>119</sup>. Desweiteren wurde nachgewiesen, daß durch Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  Endothelzellen PDGF freisetzen <sup>45</sup>. Einen weiteren Transkriptionsfaktor stellt IRF-1 (interferon regulatory factor-1) dar, von dem bekannt ist, daß es durch Bindung an die Interferon  $\beta$ -Familie kodierender Gene zu deren vermehrten Transkription führt <sup>91</sup>. Eine in vivo-Studie an IRF-1 knock out-Mäusen zeigte, daß IRF-1 zu einer verstärkten Expression des CDKI's p21 führt und hierüber durch Inhibition oben beschriebener Cyclin/CDK-Komplexe arretierend auf den Zellzyklus wirkt; ein entsprechender Effekt resultiert auch aus der IRF-1 induzierten und durch iNOS vermittelten Freisetzung von NO <sup>148</sup>; im Rahmen dieser Studie konnte auch bewiesen werden, daß IRF-1 neben dieser antiproliferativen Wirkung einen hemmenden Einfluß auf die Migrationsfähigkeit von glatten Gefäßmuskelzellen ausübt.

In der Folge bewirkt die Ligandenbindung an Rezeptoren der Zelloberfläche eine sekundäre Signalreaktion, die zur Stimulation der betroffenen Zelle führt. So wird z.B. ein Signal wie etwa die Bindung von PDGF oder IGF-1 über unterschiedliche Signalübertragungsmoleküle (zumeist Proteinkinasen) kaskadenartig von extrazellulär über ein komplexes intrazelluläres Signalverarbeitungsnetzwerk an den Zellkern weitergeleitet, in diesem Rahmen kommt es unter anderem durch Protoonkogene wie ras und raf zu einer Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und konsekutiv zur Expression unterschiedlicher den Zellzyklus beeinflussender Gene <sup>26, 143</sup>.

### **1.3.2.3. Zeitlicher Rahmen der ablaufenden vaskuloproliferativen Reaktion**

Verschiedene Studien haben die Aktivierung des Zellzyklus im Rahmen der Ausbildung neointimaler Hyperplasie als Reaktion auf Gefäßverletzung demonstriert, zum einen durch Nachweis erhöhter Pegel und Aktivität zellzyklusspezifischer Proteine, zum anderen konnte durch Zellzyklusinhibition mit z.B. spezifischen Antikörpern gegen gewisse Botenstoffe bzw. deren korrelierende Rezeptoren die Entwicklung einer neointimalen Verdickung effektiv verhindert werden <sup>15</sup>. Fasst man die an verschiedenen Modellen gewonnenen Erkenntnisse zusammen, ergibt sich folgendes Bild für den Ablauf zellulärer Prozesse, die letzten Endes zur Aktivierung des Zellzyklus und zur Zellteilung von glatten Gefäßmuskelzellen führen: Als früheste

Marker für eine erhöhte zelluläre Aktivität nach balloninduzierter Verletzung gilt die Erhöhung der mRNA von Protoonkogenen z.B. der fos-Familie (innerhalb 15 Minuten) <sup>84</sup> und c-myc (innerhalb 2 Stunden) <sup>85</sup>, diese ist für wenige Stunden nachweisbar und bewirkt wie oben beschrieben eine vermehrte DNA-Synthese. p27, welches im unverletzten Gefäß in erhöhten Wirkspiegeln vorliegt, fällt nach Verletzung ebenfalls rasch ab <sup>127</sup>. In den ersten 24 bis 48 Stunden steigt dann die Aktivität der Cycline E und A sowie der dazugehörigen CDK<sub>2</sub> und PCNA an als Ausdruck einer verstärkten Proliferation, ein Prozeß, der nach einiger Zeit innerhalb der Tunica media rückläufig ist, sich über diesen Zeitpunkt hinaus aber noch in der Intima nachweisen läßt <sup>146</sup>. Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf gilt auch für cdc2 <sup>95</sup>. Im Gegensatz dazu steigen sonst niedrigen Pegel von p53 und p21 innerhalb 7 Stunden für einen Zeitraum von 4 Wochen rapide an <sup>4, 152</sup>, es wird diskutiert, daß so eine überschießende Hyperplasieausbildung verhindert werden soll um gleichzeitig weitere Abheilungsprozesse zuzulassen <sup>15</sup>. Ein zweiter kurzzeitiger Anstieg der mRNA-Pegel von c-myc am Tag 7 nach Gefäßverletzung wird im Zusammenhang mit der hier stattfindenden ausgeprägten Proliferationsaktivität gesehen, eine autokrine Stimulation durch die beteiligten Zellen wird diskutiert <sup>85</sup>.

## **1.4. Daten zur Stent-Therapie**

### **1.4.1. Koronares Stenting im Vergleich zur alleinigen Ballondilatation**

Einen Durchbruch für die rasche Etablierung des koronaren Stentings stellten Studien wie z.B. die BENESTENT- bzw. die STRESS-Studie dar. Beide Studien demonstrierten, dass die koronare Stentimplantation im Vergleich zur alleinigen PTCA in ausgewählten Läsionen in nativen Koronargefäßen mit einem Durchmesser  $\geq 3\text{mm}$  eine signifikante Reduktion der angiographischen und klinischen Restenoserate bei ähnlichen Langzeitergebnissen ermöglicht, bzgl. der Rate an periinterventionellen Komplikationen konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Therapieformen nachgewiesen werden <sup>35, 129</sup> .

### **1.4.2. Koronares Stenting bei Mehrgefäß-KHK**

Die "Arterial Revascularization Therapies Study" (ARTS) zeigte in ihren initialen Ergebnissen sowie in der Langzeitbeobachtung über 5 Jahre, daß im Vergleich zur operativen Myokardrevaskularisation der Einsatz von Stents bei koronarer Mehrgefäßkrankung keine Verschlechterung hinsichtlich des Auftretens von schwerwiegenden Komplikationen wie z.B. Tod, Re-Infarkt oder zerebralen Ereignissen nach sich zieht, jedoch war für mittels Stent behandelte Patienten häufiger erneute Reperfusionmaßnahmen notwendig (in etwa 30% der Fälle) <sup>132, 134</sup> ; dies stellt dennoch eine Verbesserung im Vergleich zur alleinigen PTCA dar (hier gemäß Literatur bis zu 60% der Patienten betroffen) <sup>64</sup> .



## 1.5. Prädiktoren einer In-Stent Restenose

Weiterhin im Mittelpunkt bis zum heutigen Tag stehend ist das Problem der Entwicklung einer In-Stent Restenose. Wie oben erwähnt sicherten die BENESTENT- sowie die STRESS-Studie der koronaren Stentimplantation signifikant bessere Ergebnisse für Gefäße  $\geq 3\text{mm}$  gegenüber der konventionellen PTCA zu, das Hauptproblem der alleinigen Ballonangioplastie, die hohe Restenoserate, konnte damit jedoch nicht bewältigt werden. Bei einer zwar verminderten, aber dennoch hohen Restenoserate (je nach Studie 15-35%) stellte sich von Anfang an die Frage nach Ursachen und Risikofaktoren für die Entwicklung einer Restenose nach koronarem Stenting, mehrere Studien versuchten in der Folge das Risiko zur Entwicklung einer In-Stent Restenose mit klinischen, angiographischen sowie prozeduralen Parametern zu korrelieren. Für die Entwicklung einer Restenose nach Intervention einer de novo-Läsion beschrieben z.B. Kastrati et al. das Vorhandensein eines Diabetes mellitus, die Verwendung mehrerer Stents pro Läsion und den postinterventionellen minimalen Lumen-Diameter ("minimal lumen diameter", MLD, minimaler Durchmesser innerhalb des stenosierten Areals) im Bereich der dilatierten Stenose als unabhängige Prädiktoren für die Entwicklung einer binären sowie klinisch manifesten Restenose bzw. eines hohen "Late Lumen Loss" (Differenz aus dem MLD unmittelbar nach Intervention und dem im Rahmen einer Kontrolluntersuchung z.B. nach 6 Monaten ermittelten Verlaufs-MLD), als weitere Risikofaktoren konnten eine Lokalisation der Läsion im Ramus interventricularis anterior bzw. ein geringer Referenzdurchmesser ("reference diameter", RD, Gefäßdurchmesser unmittelbar vor dem stenosierten Areal) identifiziert werden <sup>62</sup>; Mercado et al. konnten nur den RD und den postinterventionellen MLD als von relevantem Einfluß auf das Ergebnis ausmachen <sup>83</sup>; Bauters et al. verwiesen auf vornehmlich prozedurale Faktoren wie die Anzahl platzierter Stents, die Stenoselänge und den RD als entscheidend für die Ausbildung einer angiographischen Restenose, initialer Lumengewinn (Differenz aus prä- und postinterventionellem MLD) und wiederum die Anzahl der verwendeten Stents wirkten sich direkt proportional auf das Ausmaß des Late Lumen Loss aus; Diabetes mellitus bzw. andere kardiovaskuläre Risikofaktoren waren nicht bedeutsam <sup>10</sup>; Kasaoka et al., die angiographisch bzw. mittels intravaskulärem Ultraschall (IVUS) gewonnene Daten im Hinblick auf die Restenose-Ausbildung auswerteten, nannten als prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer angiographischen In-Stent Restenose die Länge des gestenteten Stenoseareals, den RD, den postinterventionellen MLD, eine vorausgegangene By-

pass-OP, das Patientenalter und die mittels IVUS ermittelte Querschnittsfläche innerhalb des gestenteten Lumens ("cross sectional area", CSA), diese verhält sich invers zum ausgebildeten Late Lumen Loss <sup>55</sup>. Für die Entwicklung einer rekurrenten Stenose nach Intervention einer In-Stent Restenose nannten Elezi et al. den RD als Risikofaktor <sup>27</sup>, Reimers et al. eine Lokalisation der Läsion in einem Venenbypass, das Vorliegen einer Mehrgefäßerkrankung, eine verminderte linksventrikuläre Pumpfunktion sowie das zeitliche Intervall bis zum Auftreten erneuter Angina pectoris <sup>114</sup>, Quigley et al. ebenfalls ein kurzes zeitliches Intervall bis zum Auftreten erneuter Angina pectoris und das Vorliegen eines Diabetes mellitus bzw. arteriellen Hypertonus <sup>110</sup>.

### **1.5.1. Koronares Stenting kleiner Gefäße bzw. langstreckiger Stenosen**

Im Rahmen vieler wie z.B. der STRESS- und BENESTENT-Studien wurde gezeigt, daß sich die klinischen Ergebnisse für Patienten mit Läsionen in Gefäßen mit einem Lumen < 3mm bzw. einer Stenosenlänge > 15mm verschlechterten, besonders in Fällen, in denen eine Kombination aus geringer Gefäßgröße und gleichzeitig längerer Stenosestrecke vorlag <sup>35, 129</sup>. In der ISAR-SMART-Studie ("Intracoronary Stenting or Angioplasty for Restenosis Reduction in Small Arteries") konnte kein Vorteil des koronaren Stentings gegenüber der alleinigen Ballonangioplastie für die angiographische Restenoserate nach 6 Monaten bzw. des Auftretens klinischer Ereignisse (wie z.B. Tod, Re-Infarkt, klinische Restenose) innerhalb des gesamten Patientenkollektivs aufgezeigt werden <sup>60</sup>. In einer Subgruppenanalyse, die speziell diejenigen Patienten der Studie mit einer Stenosenlänge  $\geq 15$ mm betrachtet, ließ sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Behandlungsformen verifizieren: in einer Kontroll-Koronarangiographie nach 6 Monaten wurde bei 36% der mit Stent intervenierten Patienten eine angiographische Restenose nachgewiesen werden, nach alleiniger PTCA trat diese bei 61% der Patienten auf; bzgl. klinischer Ereignisse konnte auch hier kein relevanter Unterschied gesichert werden <sup>47</sup>. Eine Metaanalyse durch Moreno et al., die 11 Studien über das Stenting in kleineren Gefäßen, darunter unter anderem eine Subgruppenanalyse des STRESS-Patientenkollektivs, auswertete, kam zum Schluß, daß koronares Stenting der alleinigen Ballondilatation in kleinen Gefäßen überlegen ist und eine geringere angiographische Restenoserate sowie weniger schwerwiegende klinische Ereignisse nach sich zieht <sup>92, 118</sup>. Eine im gemeinsamen Namen von ACC (American College of Cardiology) und AHA (American Heart Association) veröffentlichte Leitlinie, welche diverse morphologische

Läsionscharakteristika einbezieht, korreliert gemäß Kastrati et al. gut mit dem Risiko für angiographische Restenose bzw. relevante klinische Ereignisse <sup>61</sup>. Die Details dieser Klassifikation nach ACC/AHA finden sich in der folgenden Abbildung erläutert:

Typ A	Typ B	Typ C
umschrieben (weniger als 1 cm)	tubuläre Stenose (1-2cm)	diffuse Stenosierung (>2cm)
konzentrisch	exzentrische Stenose	stark geschlängeltes Gefäß
glatt konturiert	irreguläre Kontur	starke Angulierung (>90°)
leicht erreichbar	geschlängeltes Gefäß	Einbeziehung großer Seitenäste
wenig anguliert (<45°)	stark anguliert (>45° bzw. <90°)	degenerativ veränderter Bypass
kein oder nur wenig Kalk	geringe bis ausgedehnte Verkalkung	Gefäßverschluss
entfernt vom Ostium	Ostiumsstenose	
nicht am Abgang von Seitenästen	Bifurkationsstenose	
kein Thrombus	sichtbarer Thrombus	

**Abbildung 4.** ACC/AHA-Klassifikation von Ryan et al. <sup>117</sup>, nach Ellis et al. zudem Unterscheidung in Läsionen Typ B1 (Vorliegen eines Kriteriums von B) und B2 (Vorliegen mehrerer Kriterien von B) <sup>28</sup>. Das Risiko für binäre Restenose oder auch klinische Ereignisse korreliert mit dieser Einteilung, gemäß Kastrati et al. entwickeln z.B. Typ A-Läsionen in 21,7%, Typ C-Läsionen in 32,6% eine angiographische Restenose <sup>64</sup>.

### 1.5.2. Therapie In-Stent Restenose: PTCA versus konventionelles Stenting

Die Problematik der In-Stent Restenose als Ausdruck einer neointimalen Hyperplasie nach stentinduzierter Alteration von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen führte zu der Frage, ob bei deren Vorliegen primär mittels alleiniger Ballondilatation oder wiederum Stenting ("stent in stent"), also einer erneuten mechanischen Beeinflussung der beteiligten Strukturen, interveniert werden sollte. Mehrere Studien zeigten, daß alleinige Ballonangioplastie und konventionelles Stenting im Wesentlichen ähnliche Therapieerfolge im jeweiligen Gesamt-Patientenkollektiv bewirken. Hinsichtlich der Gefäßgröße zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede: in Gefäßen > 3mm konnte gemäß Alfonso et al. eine signifikant niedrigere Restenoserate nach Einsatz eines Stents nachgewiesen werden (27% im Vergleich zu 49%), es kam in der 1-Jahres-Nachbeobachtung weniger häufig zu relevanten klinischen Ereignissen (84% gegenüber 62%) <sup>2</sup>; gemäß Elezi et al. zeigte sich nach Stenting in Gefäßen < 2,7mm eine deutlich erhöhte Restenoserate von 66% (38% in Gefäßen > 2,7mm), für die Anwendung einer alleinigen PTCA konnte hier kein signifikanter Unterschied in Gefäßen kleiner oder größer 2,7mm nachgewiesen werden <sup>27</sup>. Prädiktive Aussagen über den zu erwartenden klinischen Verlauf nach erneuter Intervention einer In-Stent Restenose ermöglicht eine von Mehran et al. entwickelte und auf angiographischen Parametern basierende Klassifizierung: wie in Abbildung 5 aufgeführt

wird anhand der Länge der Rezidivstenose, der Einbeziehung des proximalen und/oder distalen Stentendes in die gebildete Neointima bzw. des Vorliegens eines kompletten Gefäßverschlusses eine Einteilung in "fokale" (Klasse I) bzw. "diffuse" (Klasse II-IV) Verteilungsmuster der In-Stent Restenose vorgenommen, aus welcher sich dann das Risiko für die Entwicklung des klinischen Ereignisses TLR ("target lesion revascularization", Notwendigkeit zur erneuten Intervention im Bereich der Zielläsion) ableiten läßt <sup>82</sup> .

Verteilungsmuster der In-Stent Restenose, nach Mehran et al.	Beschreibung	TLR-Rate
Klasse I – "focal"	In-Stent Restenose über eine Länge von < 10mm, kein kompletter Gefäßverschluß	19,1%
Klasse II – "diffuse intrastent"	In-Stent Restenose über eine Länge von > 10mm, das proximale bzw. distale Stentende wird nicht überschritten	34,5%
Klasse III – "diffuse proliferative"	In-Stent Restenose über eine Länge von > 10mm, diese reicht über das proximale und/oder distale Stentende hinaus	50,0%
Klasse IV – "total occlusion"	kompletter Gefäßverschluß innerhalb des gestenteten Gefäßabschnittes	83,4%

**Abbildung 5.** Überblick über die von Mehran et al. <sup>82</sup> entwickelte Klassifizierung der Verteilungsmuster einer In-Stent Restenose (eigene Darstellung): die Zuordnung einer Läsion in eine höhere Klasse steigert auch das Risiko für die Entwicklung eines relevanten klinischen Ereignisses (TLR) nach Intervention dieser Rezidivstenose.

## 1.6. "Drug-eluting"-Stents

Wie oben beschrieben resultiert die In-Stent Restenose aus der Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie mittels Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Als Reaktion hierauf fokussierte sich die weitere Forschung auf die Entwicklung entsprechender Substanzen, welche z.B. die Migrationsfähigkeit glatter Gefäßmuskelzellen einschränken bzw. deren Proliferation hemmen; neben der lokalen Applikation, wie etwa der Beschichtung eines koronaren Stentsystems mit der entsprechenden Substanz, wurde dabei auch die Effekte einer systemischen Gabe evaluiert. Es soll an dieser Stelle auf einige der entsprechenden Substanzen eingegangen werden.

### 1.6.1. Sirolimus

Sirolimus, auch Rapamycin genannt, ist ein Makrolidantibiotikum, welches 1964 erstmals aus einem *Streptomyces hygroscopicus* genannten Bakterium isoliert und initial als Fungizid eingesetzt wurde, dessen immunsuppressive Eigenschaften dann aber immer mehr in den Vordergrund traten<sup>128</sup>. Durch eine Bindung von Sirolimus an einen FKBP12 (für "FK506 binding protein") genannten zytosolischen Rezeptor wird die Kinase mTOR ("mammalian Target Of Rapamycin") gehemmt. In proliferierenden Zellen kommt es nach mitogeninduzierter Aktivierung von mTOR zu verminderten p27-Pegeln, daraus resultiert, wie im vorangegangenen Text beschrieben, eine Aktivierung entsprechender Cyclin/CDK-Komplexe mit konsekutiv einer Hyperphosphorylierung des Retinoblastoma-Genprodukts, das weitere Fortschreiten von der G<sub>1</sub> in die S-Phase wird ermöglicht; auf diesem Weg inhibiert Sirolimus die Zellzyklusprogression<sup>103</sup>.

Im Jahr 1995 wurde mit der Entwicklung eines Sirolimus-beschichteten Stentsystems begonnen, welches über einen Zeitraum von 90 Tagen seinen Wirkstoff in das umgebende Gewebe abgibt. Nach einer zweijährigen Erprobung im Rahmen klinischer Studien wie RAVEL erfolgte 2002 die Einführung auf dem europäischen Markt<sup>24</sup>. Gemäß den Daten der RAVEL ("Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx VELOCITY Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions")-Gruppe bewirkt der sogenannte Cypher-Stent eine deutliche Reduktion des Late Lumen Loss im Vergleich zu konventionellen

unbeschichteten "Bare metal"-Stents (BMS); während 26% der mit einem BMS versorgten Patienten eine angiographische Restenose > 50% aufwiesen, so traf dies für keinen der mittels Cypher-Stent behandelten Patienten zu <sup>94</sup>. Die Überlegenheit der Rapamycin-freisetzenden Stentsysteme gegenüber unbeschichteten Stents konnte in weiteren Studien unter anderem auch für den Einsatz in Patienten mit komplexen Koronarläsionen (SIRIUS) <sup>96</sup> oder für Läsionen mit einer Länge > 15mm bei gleichzeitigem Vorliegen eines Gefäßdurchmessers < 3mm bestätigt werden <sup>121</sup>; auch Diabetiker profitieren gemäß einer Substudie des SIRIUS-Patientenkollektivs <sup>97</sup>, dasselbe gilt für die Intervention chronischer Koronargefäßverschlüsse <sup>52</sup> bzw. dem Einsatz im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms <sup>102, 138</sup>. Als Risikofaktoren für das Auftreten einer In-Stent Restenose nach Koronarintervention mit einem Rapamycin-freisetzenden Stent konnten wiederum verschiedene (klinische, prozedurale oder angiographische) Parameter wie z.B. Diabetes mellitus, Stenting einer restenotischen Läsion bzw. in kleinen Gefäßen, ein mit Stent versorgter Gefäßabschnitt von > 26mm, eine ostiumsnahe Lokalisation bzw. auch die Lage der Läsion selbst innerhalb des Koronarsystems ausgemacht werden <sup>70</sup>. In einer Studie betreffend den Einsatz Sirolimus-beschichteter Stents in koronaren Bypassgefäßen konnten den der Intervention in Nativgefäßen gleichwertige Ergebnisse erhoben werden <sup>25</sup>. Ähnliche Effekte konnten anhand der SPIRIT-Studien für Everolimus, einem Strukturverwandten des Sirolimus gesichert werden <sup>131</sup>.

### **1.6.2. Paclitaxel**

Eine weitere für den Einsatz in medikamentenfreisetzenden Stentsystemen relevante Substanz stellt Paclitaxel dar, gewonnen aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) <sup>124</sup>. Paclitaxel stabilisiert zum einen die für die Mitose wichtigen Mikrotubuli <sup>87</sup>, zum anderen kann über verschiedene Mechanismen auch Apoptose induziert werden <sup>151</sup>. Gegenüber konventionellen unbeschichteten Stents konnte z.B. infolge der TAXUS-Studie samt ihren Folgeuntersuchungen verbesserte Ergebnisse der mit Paclitaxel beschichteten Stentsysteme belegt werden, neben einer verbesserten angiographischen Restenoserate (in der Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten ließ sich bei 10% der mit "Bare metal"-Stent behandelten Patienten ein solcher Befund nachweisen, jedoch bei keinem der Paclitaxel-Gruppe) konnte dies auch für den Parameter Late Lumen Loss sowie das Auftreten schwerwiegender klinischer

Ereignisse aufgezeigt werden <sup>41</sup>. Obwohl in einigen Vergleichstudien gleichwertige Ergebnisse beim Einsatz von Rapamycin- und Paclitaxel-beschichteten Stentsystemen in de novo-, d.h. nicht vorbehandelten koronaren Gefäßläsionen beschrieben werden <sup>93</sup>, so wird doch in der Mehrzahl der Untersuchungen (z.B. anhand Metaanalysen) bessere Resultate für Sirolimus verzeichnet <sup>56, 123</sup>.

### **1.6.3. Weitere Substanzen**

Angesichts der Therapieerfolge Sirolimus-, Everolimus- und Paclitaxel-beschichteter Stentsysteme kam es auch zum Einsatz diverser anderer Substanzen entweder in Form einer lokalen Applikation (z.B. medikamentenfreisetzender Stent) oder einer systemischen Gabe. Im Folgenden finden sich Beispiele für verwendete Stoffe, welche sich jedoch in der klinischen Praxis nicht bewähren konnten. Durch Imatinib, einem selektiven Inhibitor der PDGF-zugehörigen Rezeptortyrosinkinase <sup>108</sup>, konnte in vitro die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen gehemmt werden; eine an Schweinen durchgeführte in vivo-Untersuchung mit Imatinib-beschichteten Stents konnte jedoch keine Hemmung der Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie nachweisen <sup>44</sup>, ein die orale Applikation beinhaltender Studienansatz wird weiter unten beschrieben. Eine Beschichtung von Stents mit Phosphorylcholin, einem synthetischen Phospholipidpolymer, welches die Oberflächeneigenschaften des natürlichen Endothels imitieren und so z.B. die Adhäsion von Thrombozyten vermindern sollte, erbrachte ebenfalls keine signifikante Reduktion der angiographischen Restenoserate nach koronarer Stentimplantation <sup>48</sup>. Auf dem Boden der nachgewiesenen Inhibition der Zellproliferation durch Bindung von Actinomycin an DNA-Bestandteile <sup>98</sup> wurden Experimente mit entsprechend beschichteten Stents durchgeführt; hier konnte sogar ein vermehrter Late Lumen Loss und eine erhöhte Rate an schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen innerhalb der Follow-Up-Zeitraumes von einem Jahr nachgewiesen werden <sup>133</sup>.

## 1.7. Therapie der In-Stent Restenose: neue Ansätze

Für die Behandlung in nativen Koronargefäßen befindlicher Stenosen konnte eine deutliche Verbesserung des weiteren klinischen Verlaufs bzw. eine Reduktion der angiographischen Restenoserate durch mit Sirolimus bzw. Paclitaxel beschichtete Stents aufgezeigt werden. Daß dies auch für die Intervention einer In-Stent Restenose zutrifft, wurde z.B. anhand der Ergebnisse der ISAR-DESIRE-Studie demonstriert. Im Vergleich zur alleinigen Ballonangioplastie betrug die angiographische Restenoserate nach Implantation eines Sirolimus-beschichteten Stents 14%, mit Paclitaxel 22%, die in Punkt 1.5.3. beschriebenen Daten zeigen hier deutlich höhere Restenoseraten nach Implantation von unbeschichteten Stents; mit 8% in der Sirolimus- und 19% in der Paclitaxel-Gruppe stellt sich auch die Häufigkeit einer erneuten Notwendigkeit zur "target lesion revascularization" (TLR), der Notwendigkeit für erneute Reperforationsmaßnahmen im Bereich der intervenierten Läsion, als bedeutend reduziert dar (33% nach alleiniger PTCA) <sup>59</sup>. Auch für eine systemische Sirolimus- bzw. Everolimusgabe konnte ein entsprechender Benefit nachgewiesen werden. Farb et al. konnten an tierexperimentellen Studien (Kaninchen) beweisen, daß die orale Applikation von Everolimus zu einer signifikanten Reduktion der Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie nach Stentimplantation bewirkt <sup>29</sup>. Im "Oral Sirolimus to Inhibit Recurrent In-stent Stenosis (OSIRIS) Trial" von Hausleiter et al. wurde bei Patienten mit In-Stent Restenose über einen periinterventionellen Zeitraum von 9 Tagen Sirolimus peroral verabreicht, dabei wurden zwei unterschiedliche Dosierungsschemata (Nieder- u. Hochdosis) verwendet. In der Kontroll-Koronarangiographie nach 6 Monaten fand sich bei 42% der Kontroll-Gruppe (mit Placebo behandelt) eine erneute relevante angiographische Stenose, dagegen nur bei 39% in der Niederdosis- bzw. 22% der Hochdosis-Sirolimus-Gruppe. Ein ähnlicher Trend konnte für das Auftreten des Ereignisses "TLR" gezeigt werden <sup>49</sup>.

Im Vergleich hierzu konnte ein ähnlicher Studienansatz mit einer systemischen Imatinib-Gabe keinen signifikanten Einfluß auf die Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie nach koronarer Stentimplantation nachweisen <sup>154</sup>.



## 2. Problemstellung

Wie oben verdeutlicht resultiert die Ausbildung der neointimalen Hyperplasie nach koronarem Stenting nicht aus der Proliferation und Migration von koronararteriellen glatten Gefäßmuskelzellen alleine. Es findet eine komplexe Interaktion diverser Zelllinien und -typen statt, zentrale Mechanismen der dabei ablaufenden intra- und interzellulären Prozesse werden mediatorvermittelt über eine Vielzahl partiell redundanter Signaltransduktionswege gesteuert. Die Grundlage dieser Dissertation ist die Hypothese, daß infolge einer perkutanen Katheterintervention und der konsekutiv auftretenden Gefäßverletzung diverse Mediatoren in das Serum freigesetzt werden, dort in vermehrtem Ausmaß zirkulieren, und letzten Endes eine Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen auslösen. Die potentiell proliferationsfördernde Eigenschaft von humanem Serum aufgrund der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren titulieren wir als "Serumkapazität". Im Rahmen dieser Arbeit soll der Parameter Serumkapazität anhand von im zeitlichen Zusammenhang mit einer Koronarintervention entnommenen Serumproben und eines geeigneten Testverfahrens *in vitro* quantifiziert werden. Hierfür wird unmittelbar nach koronarer Stentimplantation eine Serumprobe entnommen, diese sollte gemäß obigem Denkansatz in vermehrtem Maße migrations- und proliferationsfördernde Botenstoffe sowie aktivierte Zellen enthalten und dementsprechend eine differente Fähigkeit z.B. zur Induktion der Proliferation quieszenter Zellen besitzen als zu einem anderen (prä- oder postinterventionellen) Zeitpunkt entnommenes Patientenblut. Desweiteren ist angesichts des Faktums, daß manche Individuen mehr zur Entwicklung einer In-Stent Restenose bzw. eines relevanten klinischen Ereignisses nach einer katheterbasierten Koronarintervention neigen als andere, die Vermutung zu äußern, daß die Basis hierfür ein interindividueller Aktivitätszustand der beteiligten Signaltransduktionswege und -mechanismen ist, sich Patienten also auch unabhängig von einer zuvor erfolgten Koronarintervention im Ausmaß der Serumkapazität unterscheiden. Das *in vitro* abgebildete und quantifizierte Ausmaß der Serumkapazität soll im Rahmen dieser Arbeit darüber hinaus dazu verwendet werden, um mit anderen patienten- bzw. läsionsbezogenen Charakteristika und dem Auftreten von klinisch relevanten Ereignissen korreliert zu werden; untersucht werden sollen dabei nicht nur *de novo*-Läsionen, d.h. Koronarstenosen welche erstmalig mittels alleiniger PTCA und/oder Stenting interveniert werden, es sollen auch solche Fälle begutachtet werden, in denen es zur erneuten Intervention einer In-Stent Restenose kommt.

Anhand der so gewonnenen Ergebnisse sollen folgende Fragen erörtert werden:

Läßt sich anhand der in vitro ermittelten individuellen Serumkapazität die Entwicklung bzw. das Ausmaß einer In-Stent Restenose oder das Eintreten eines anderen relevanten klinischen Ereignisses in vivo vorhersagen?

Zeigen sich bzgl. der Serumkapazität signifikante Unterschiede bei Patienten mit de novo- bzw. mit In-Stent Restenose?

Ermöglichen die gewonnenen Erkenntnisse z.B. die Beurteilung der Wirksamkeit einer speziellen Therapieform?

### **3. Materialien und Methoden**

Teil dieser Arbeit ist die Quantifizierung des Parameters "Serumkapazität" in vitro; inwiefern Patientenserum proliferationsfördernde Eigenschaften aufweist soll anhand des folgenden Versuchsansatzes ermittelt werden: entsprechende Zellen, in diesem Falle Kulturen humaner koronararterieller glatter Gefäßmuskelzellen (CASMC), werden mit den jeweiligen Serumproben inkubiert; die in der Folge ablaufende Zellproliferation soll dann anhand eines geeigneten Verfahrens, hier ein BrdU-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), quantifiziert werden.

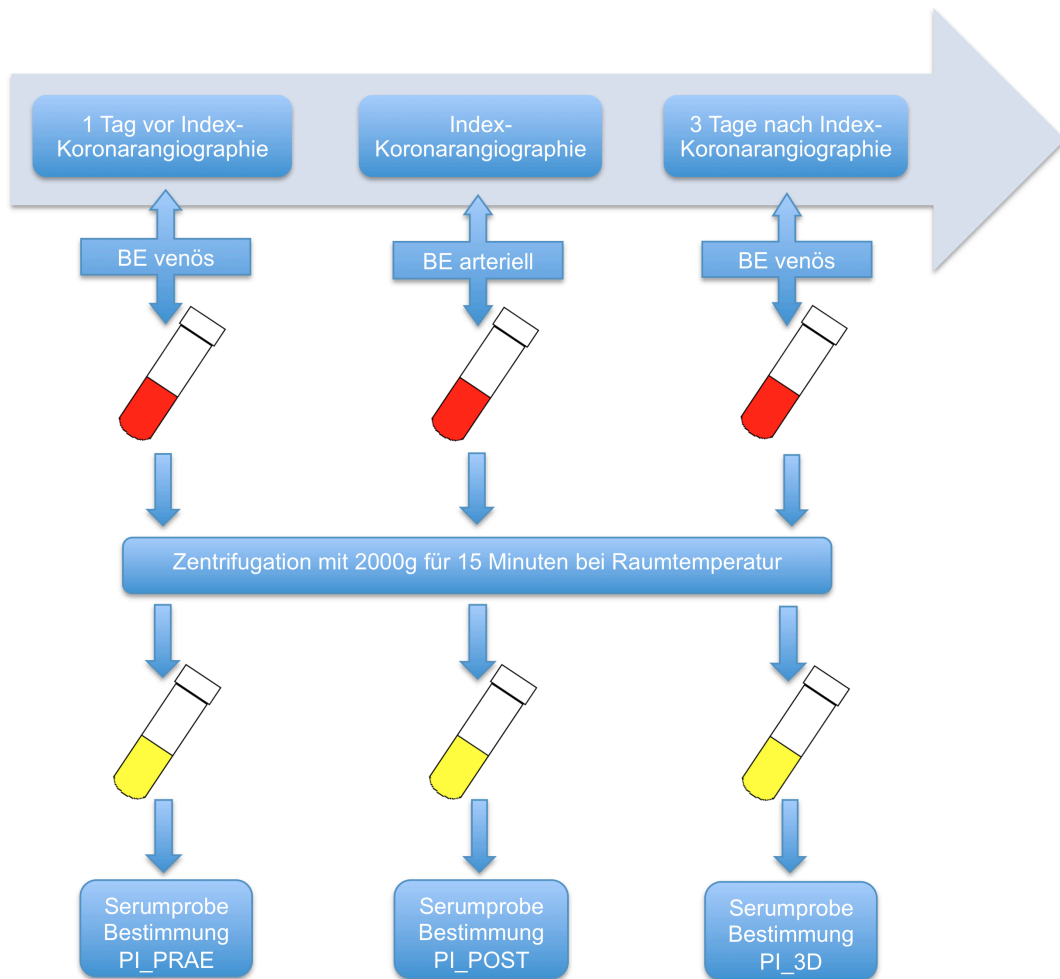
Verwendet wurden Materialien folgender Firmen (in alphabetischer Reihenfolge):

Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge/UK  
BioWhittaker Inc., Walkersville/USA  
Cambrex, East Rutherford/USA  
Clonetics Cooperation, San Diego/USA  
Eppendorf AG, Hamburg  
NALGENE/NUNC International, Rochester/USA  
Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim  
Sarstedt, Nümbrecht  
Sigma-Aldrich, St. Louis/USA

Die jeweiligen Eigennamen und Produktbezeichnungen unterliegen dem Markenrechtsschutz.

#### **3.1. Probengewinnung und -verarbeitung**

Serumproben wurden jeweils einen Tag vor bzw. 3 Tage nach Koronarintervention mittels venöser Blutabnahme in üblicher Technik sowie unmittelbar postinterventionell aus dem im Rahmen der Koronarangiographie verwendeten intraarteriellen Schleusensystem entnommen. Als Entnahmegefäß diente eine Serum-Monovette der Firma Sarstedt, nach Zentrifugation mit 2000g über 15 Minuten bei Raumtemperatur und hierdurch Auftrennung in zelluläre Bestandteile und Serum wurden diese bis zur weiteren Verarbeitung in einem handelsüblichen Gefrierschrank bei -18°C tiefgefroren.



**Abbildung 6.** Flowchart betreffend Probengewinnung und -verarbeitung (eigene Darstellung). An drei verschiedenen Zeitpunkten werden Blutproben entnommen, aus welchen die Serumproben zur Bestimmung der Proliferationsindizes als Maß der Serumkapazität gewonnen werden. BE: Blutentnahme.

### 3.2. Verwendete Zellen

Verwendet wurden ausschließlich Kulturen humaner koronararterieller glatter Gefäßmuskelzellen (Cambrex, # CC-2583). Die Lieferung der Zellkulturen erfolgte standardisiert in Passage 3, im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen bis maximal Passage 10 verwendet.

### 3.3. Zelllagerung

Die längerfristige Lagerung der CASMC erfolgte bei  $-190^{\circ}\text{C}$  in einem Stickstofftank; in der Vorbereitung hierfür wurden die Zellen, nach Zugabe von 10% Dimethylsulfoxid (kurz DMSO, Sigma-Aldrich, # D-8418) zur Kryokonservierung, in sterilen "Cryogenic Vials" der Firma NALGENE/NUNC verteilt (# 5000-0020). Zur Schonung

der Zellen erfolgte die endgültige Lagerung im Stickstofftank erst nach einem vorbereitenden 24-stündigen Verbleib bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Zum Auftauen wurden die Zellen wiederum rasch bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erwärmt, danach im auf ebenfalls  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Kulturmedium (siehe Punkt 3.4.) resuspendiert.

### **3.4. Zellkultivierung**

Als Kulturmedium diente Smooth Muscle Cell Basal Medium (kurz SmBM, # CC-3181) der Firma Clonetics, hiervon wurden jeweils 500ml supplementiert mit einer Einheit Smooth Muscle Cell Growth Medium (SmGM, # CC-4149) des selben Herstellers; SmGM beinhaltet gemäß Herstellerangaben neben 25ml FCS (fetal calf serum) zudem 0,5ml hEGF (human epidermal growth factor), 1,0ml hFGF-B (human fibroblast growth factor-basic), 0,5ml Insulin und 0,5ml GA-1000 (Gentamicin/Amphotericin B). In Zellkulturflaschen der Firma Sarstedt (# 83.1813.002) wurden die CASMC dann im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert, alle 48-72 Stunden erfolgte routinemäßig eine Erneuerung des Kulturmediums, bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurde ein Splitting der Zellen im Verhältnis 1:3 durchgeführt (vgl. gemäß Angaben des Herstellers beläuft sich die Zellzyklusdauer der verwendeten CASMC auf 15-48 Stunden).

### **3.5. Zellpassagierung**

Verwendet wurde das sogenannte "ReagentPack" (# CC-5034) der Firma Clonetics, dieses bestehend aus 100ml HBSS (HEPES-buffered Saline Solution), 100ml Trypsin/EDTA-Lösung sowie 100ml TNS (Trypsin Neutralizing Solution). Nach gründlichem Waschen des Zellrasens mit HBSS zur Entfernung sämtlicher Bestandteile des Kulturmediums wurde die enzymatische Ablösung der am Boden der Zellkulturflasche adhärenen CASMC durch Trypsin/EDTA eingeleitet; nach Inkubation im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$  für 2 Minuten wurde die Enzymreaktion durch Zugabe einer der verwendeten Trypsin/EDTA-Lösung äquivalenten Menge an TNS gestoppt. Nach Zentrifugation der so erhaltenen Suspension mit 1000 Umdrehungen/Minute bei Raumtemperatur für eine Dauer von 5 Minuten dann vorsichtiges Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes und Resuspension der Zellen in zunächst 3ml Kulturmedium, je 1ml davon wird mit weiteren 9 ml Kulturmedium erneut in Zellkulturflaschen ausgebracht.

## **3.6. Messung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA**

### **3.6.1. Prinzip BrdU-ELISA**

Der BrdU-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ermöglicht in exakter Art und Weise eine indirekte Quantifizierung von Zellproliferationsvorgängen. Prinzip dieses kolorimetrischen Immunoassays ist die Messung der Inkorporation von 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU), welches als Thymidin-Analogon in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Nach Fixierung und Denaturierung der Zellen wird BrdU durch einen monoklonalen Antikörper (Klon BMG 6H8, aus Maus-Maus-Hybridzellen) gebunden, das an diesen Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase ermöglicht durch Umsetzung der chromogenen Substanz TMB (Tetramethylbenzidin) und anschließender photospektrometrischer Messung der Extinktion die indirekte Quantifizierung der synthetisierten DNA und somit der Zellproliferation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Cell Proliferation ELISA-Kit der Firma Roche verwendet (#11647229001), obige Angaben zur Methode des BrdU-ELISA entstammen ebenfalls Angaben des Herstellers. Ein Cell Proliferation ELISA-Kit enthält eine jeweils eine Einheit "BrdU labeling reagent" (BrdU zur Inkorporation in den proliferierenden Zellen), "Anti-BrdU-POD Fab Fragments" (Konzentrat mit Peroxidase-gebundenen Anti-BrdU-Antikörpern), "Antibody Dilution Solution" (Lösung zur Verdünnung des Antikörperkonzentrats), "Washing Buffer" (Pufferlösung zum Abwaschen der Antikörperfragmente), FixDenat-Lösung (zur Denaturierung und Fixierung) sowie "TMB Substrate Solution" (Substrat für die Peroxidase-vermittelte Farbreaktion).

### **3.6.2. Vorbereitung der Patientenproben**

Die Inkubation von CASMC mit den jeweiligen Serumproben erfolgte in 96Well-Zellkulturplatten (Sarstedt, # 83.1835.300). Pro Well wurden für den Versuchsansatz je 100µl einer Probe bestehend zu 80% aus SmBM und 20% aus Patientenserum ausgebracht, pro Probe wurde - zur Minimierung potentiell auftretender untersucherbedingter Messungenauigkeiten - eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Zur Vorbereitung der Testlösung wurden in einer 1,5ml-Küvette (Eppendorf, # 0030.120.086) zu 100µl der zu analysierenden Serumprobe (nach Auftauen der tiefgefrorenen Patientenproben im Wasserbad bei 37°C) je 400µl SmBM ohne Supplementierung und 50µl "BrdU labeling reagent" gegeben und mittels eines Vortex gut vermischt. Als Positivkontrolle diente 100µl fötales Kälberserum ("fetal calf serum", kurz FCS

von BioWhittaker, # DE14-801F) verdünnt mit 400µl SmBM plus 50µl BrdU-Labeling-Solution, als Negativkontrolle reines SmBM ohne jegliches Supplement.

### **3.6.3. Versuchsansatz**

Zunächst wurden 2000 CASMC pro Well in den 96Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden mit supplementiertem Kulturmedium bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen mit HBSS, danach Aufbringen von jeweils 100µl der zu untersuchenden Proben je Well (pro 96Well-Platte wurde eine jeweils eine Positiv- bzw. Negativkontrolle ebenfalls in Vierfachbestimmung angelegt), im Anschluß wurden die Platten erneut für 16 Stunden bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur quantitativen Bestimmung der neusynthetisierten DNA als Ausdruck der jeweiligen Serumkapazität erfolgte nach 16 Stunden die Denaturierung und Fixierung mittels Zugabe von 150µl "FixDenat" pro Well, die Dauer bis zum Abschluß der Denaturierungs- und Fixierungsprozesse bei Raumtemperatur betrug gemäß Empfehlung des Herstellers 30 Minuten. Zur Markierung des inkorporierten BrdU wurden die Platten danach pro Well mit jeweils 100µl Anti-BrdU-POD-Antikörperlösung für weitere 90 Minuten inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit pro Well 300µl PBS im Biotrak Plate Washer der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Camebridge (# 80211262) entfernt. Durch Zugabe von 100µl TMB-Substratlösung pro Well erfolgte danach die Initiierung der Farbreaktion, diese wurde nach 5-10 Minuten mittels Zugabe von pro Well 25µl einer einmolaren Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bzw. Extinktion im Biotrak II Visible Plate Reader (Version 1.3, Amersham Pharmacia Biotech, Camebridge, #80211580) bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 690nm) bestimmt.

### **3.6.4. Bestimmung Proliferationsindizes als Maß der Serumkapazität**

Zur Quantifizierung der jeweiligen Serumkapazität wurde die Proliferation von CASMC gemäß obiger Beschreibung gemessen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten (vgl. es wurden in verschiedenen Passagen befindliche Zellen verwendet), wurde der Mittelwert der in Vierfachbestimmung gemessenen Extinktionswerte einer Patientenprobe ( $E_{\text{Patient}}$ ) mit dem der auf der entsprechenden 96Well-Platte untersuchten FCS-Positivkontrolle ( $E_{\text{FCS}}$ )

standardisiert, die hieraus resultierende Ratio wird als Proliferationsindex (PI) bezeichnet:

$$PI = E_{\text{Patient}} / E_{\text{FCS}}$$

Wie oben beschrieben wurden pro Patient drei Serumproben angelegt, somit liefert die Auswertung mittels BrdU-ELISA für jeden in die Arbeit eingeschlossenen Patienten drei Proliferationsindizes. Analog zum Zeitpunkt der erfolgten Probenentnahme erfolgte eine weitere Unterteilung und Benennung des Parameters PI wie in der folgenden Tabelle verdeutlicht:

PI-Wert	Zeitpunkt der Blutentnahme
PI_PRAE	präinterventionell
PI_POST	unmittelbar postinterventionell
PI_3D	3 Tage nach Intervention

**Abbildung 7.** Klassifizierung der PI-Werte in Abhängigkeit des Zeitpunkts der jeweiligen Blutentnahme.

### 3.7. Weitere erhobene Daten

Im Rahmen der Index-Koronarangiographie zum Zeitpunkt 0, der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen sowie der klinischen Follow up-Beobachtung für einen Zeitraum von 360 Tagen nach Einschluß in die Studie wurden weitere läsions- bzw. interventionsbezogene Parameter sowie das Auftreten klinisch relevanter Ereignisse dokumentiert.

Als Zielgröße bzw. Endpunkte, welche in erster Linie mit den ermittelten Proliferationsindizes korreliert werden sollen, wurden hierfür die in der folgenden Tabelle aufgeführten Parameter registriert:

Zielgröße	Beschreibung
binäre Restenose	Vorliegen einer binären bzw. angiographischen Restenose, d.h. einem Stenosegrad $\geq 50\%$ zum Zeitpunkt der Re-Koronarangiographie
Late Lumen Loss	Ausmaß des ermittelten Late Lumen Loss (in mm) zum Zeitpunkt der Re-Koronarangiographie
TLR	Auftreten des Ereignisses TLR ("target lesion revascularization") innerhalb 360 Tagen nach Index-Koronarangiographie
MACE	Auftreten des Ereignisses MACE ("major adverse cardiac event") innerhalb 360 Tagen nach Index-Koronarangiographie

**Abbildung 8.** Beschreibung der Zielgrößen, die im Zusammenhang mit den Proliferationsindizes untersucht werden.



Die Parameter binäre Restenose, TLR und MACE stellen kategorielle Merkmale dar, für welche jeweils eine binäre Unterteilung in 0 = "Abwesenheit des Merkmals" und 1 = "Vorhandensein des Merkmals" unternommen wird; der Parameter Late Lumen Loss weist einen stetigen Merkmalscharakter auf und wird, wie in der Tabelle beschrieben, in Millimeter (mm) angegeben. Die Definition des Parameters Late Lumen Loss wurde bereits in Punkt 1.5. erläutert, die des Ereignisses TLR in Punkt 1.5.3.; MACE stellt einen kombinierten Endpunkt dar beinhaltend das Auftreten von TLR, Re-Infarkt und Tod.

Im Hinblick auf die unter Punkt 1.5. aufgeführten Daten wurden zudem die in der folgenden Tabelle aufgeführten Parameter als mögliche Störgrößen bzw. "Confounder" mit in die statistische Analyse einbezogen:

Parameter	Beschreibung
präinterventioneller MLD	präinterventionell bemessener minimaler Lumen-Diameter, in mm
postinterventioneller MLD	postinterventionell bemessener minimaler Lumen-Diameter, in mm
präinterventioneller RD	präinterventionell bemessener Referenzdurchmesser, in mm
postinterventioneller RD	postinterventionell bemessener Referenzdurchmesser, in mm
Stenosenlänge	Stenosenlänge, in mm
Stentlänge	Länge des mit Stent versorgten Gefäßabschnittes, in mm
ACC/AHA	Einteilung der Koronarstenose nach ACC/AHA-Klassifikation
Okklusion	Art des Koronarverschlusses: keiner, akut oder chronisch

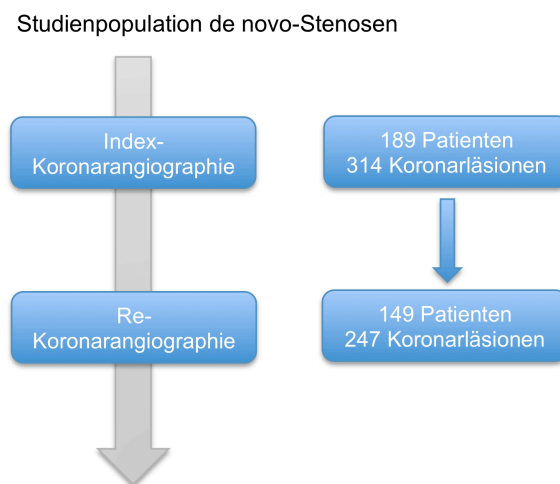
**Abbildung 9.** Weitere für die Auswertung erfasste Parameter sowie deren Erläuterung; jeder dieser Parameter wurde zum Zeitpunkt der Index-Koronarangiographie erhoben.

Die Parameter prä- und postinterventioneller MLD, prä- und postinterventioneller RD, "Stenosenlänge" und "Stentlänge" stellen stetige Merkmale dar, welche in Millimeter (mm) angegeben werden; die Definition des prä- und postinterventionellen MLD bzw. prä- und postinterventionellen RD finden sich in Punkt 1.5. aufgeführt. Die übrigen in dieser Tabelle aufgeführten Parameter weisen kategoriellen Charakter auf: das Merkmal "ACC/AHA-Klassifikation" kann die Ausprägung "A", "B<sub>1</sub>", "B<sub>2</sub>" oder "C" (gemäß Einteilung nach Ryan<sup>117</sup> bzw. Ellis et al.<sup>28</sup>), das Merkmal "Okklusion" die Ausprägung "akut", "chronisch" oder "keine" aufweisen. Sämtliche in dieser Tabelle aufgeführten Parameter wurden zum Zeitpunkt der Index-Koronarangiographie erhoben.

### 3.8. Patienteneinschluß

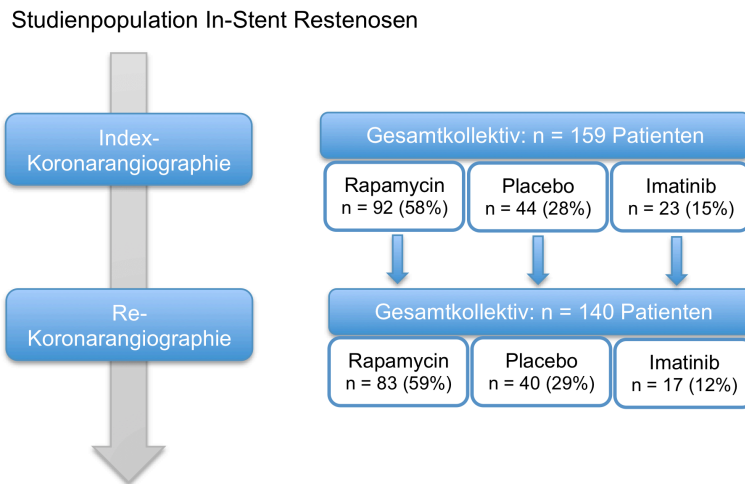
Sämtliche eingeschlossene Patienten unterzogen sich zuvor einer Katheterintervention im Deutschen Herzzentrum München.

Für die Patienten mit de novo-Läsionen, bei welchen wie im Punkt 4.1.1. erläutert im Zeitraum von April bis August 2002 die Index-Koronarangiographie durchgeführt wurde und konsekutiv der Einschluß in diese Arbeit erfolgte, konnten pro Person zum Teil mehrere Koronarläsionen erfasst werden.



**Abbildung 10.** Studienpopulation de novo-Stenosen zum Zeitpunkt der Index-Koronarangiographie bzw. der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen (eigene Darstellung).

Das Patientenkollektiv mit In-Stent Restenose wurde im Zeitraum November 2001 bis Februar 2003 im Rahmen zweier weiterer Studien rekrutiert <sup>49, 154</sup>, welche den Einfluß einer periinterventionellen p.o.-Applikation eines Antiproliferativums auf die Entwicklung klinischer Endpunkte wie TLR und MACE untersuchten; bzgl. der weiteren Details sei auf die jeweilige Publikation verwiesen. Die Bezeichnung der Patientengruppen in dieser Arbeit erfolgte analog zur Einteilung der jeweiligen Studienarme in den originären Publikationen (Gabe von "Rapamycin", "Placebo" oder "Imatinib"). Für die Patienten mit In-Stent Restenose wurden pro Person nur eine Koronarläsion erfasst.



**Abbildung 11.** Studienpopulation In-Stent Restenosen zum Zeitpunkt der Index-Koronarangiographie bzw. der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen (eigene Darstellung). n beziffert jeweils die Patientenzahl in der Gesamt- bzw. Subgruppe als Absolutwert, in Klammern ist ergänzend der prozentuale Anteil der jeweiligen Subgruppe am Gesamtkollektiv aufgeführt; es zeigt sich, daß zu beiden Zeitpunkten eine äquivalente Verteilung der Patienten auf die einzelnen Therapieformen besteht.

### 3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe "Medizinische Biometrie" (Leiter: Herr Prof. Dr. K. Ulm, mit dieser Arbeit betrauter wissenschaftlicher Mitarbeiter: Herr Dr. rer. nat. T. Schuster) des Instituts für medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München.

Für die statistische Auswertung wurde die Methode der logistischen Regression angewandt; um die Erfassung mehrerer Läsionen pro Person in der Gruppe der Patienten mit de novo-Stenosen bei der statistischen Analyse adäquat zu berücksichtigen, wurden in diesen Fällen verallgemeinerte Schätzgleichungsmodelle ("Generalized Estimation Equation (GEE) models" nach Liang und Zeger, siehe unten) verwendet; die GEE-Modelle ermöglichen dabei laut Herrn Dr. Schuster eine konservative Berechnung der Standardfehler, welche bei Nicht-Berücksichtigung zu überoptimistischen Effektschätzungen (kleinere Standardfehler und p-Werte) führen würde.

Sämtliche statistischen Berechnungen und Graphiken wurden erstellt mit "IBM SPSS Statistics 19", IBM Corporation/USA, "GraphPad Prism 5", GraphPad Software Inc./USA und "Microsoft Excel", Microsoft Corporation/USA.

Die Theorie zu den angewandten GEE-Modellen entstammt: Zeger, S.L., Liang, K.Y., Albert, P.S. "Models for Longitudinal Data: A Generalized Estimating Equation Approach", Biometrics, 44 (1988), 1049-60.



## 4. Ergebnisse - Patienten mit de novo-Stenosen

### 4.1. Grundcharakteristika und primäre Endpunkte

Im Zeitraum vom 02.04.2002 - 22.08.2002 wurden 189 Patienten mit insgesamt 314 erfolgreich im Rahmen der Index-Koronarangiographie intervenierten de novo-Läsionen in die Studie eingeschlossen. Die zum Zeitpunkt der Index-Koronarangiographie erhobenen Grundcharakteristika finden sich in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

**patientenbezogene Merkmale**  
n = 189 Patienten

	n	%
Geschlecht = m	148	78,3
mittleres Alter Männer	65 ± 11	--
mittleres Alter Frauen	69 ± 10	--
koronare Mehrgefäßkrankung	154	81,5
Raucher	33	17,5
Hypercholesterinämie	99	52,4
arterielle Hypertonie	119	63
Diabetes	42	22,2
- Insulintherapie	12	28,6
- orale Antidiabetika	21	50

**Tabelle 1.** Grundcharakteristika patientenbezogene Merkmale

**läsionsbezogene Merkmale**  
n = 314 de novo-Läsionen

	n	%
ACC/AHA-Klass.	A	14 4,5
	B1	80 25,5
	B2	156 49,7
	C	64 20,4
Okklusion	akut	18 5,7
	chronisch	13 4,1
	keine	283 90,1
Stentimplantation (übrige: plain-PTCA)	301	95,9
mittlerer präinterventioneller MLD (in mm)	1,06 ± 0,54	
mittlerer präinterventioneller RD (in mm)	2,68 ± 0,54	

**Tabelle 2.** Grundcharakteristika läsionsbezogene Merkmale

(Anmerkung: prozentuale Angaben hinsichtlich der einzelnen Diabetes-Therapieregimen beziehen sich nicht auf das Gesamtkollektiv, sondern ausschließlich auf die Gruppe der Diabetespatienten).

Bezug nehmend auf diese Werte kann für die Gruppe der Patienten mit de novo-Läsionen somit von einem repräsentativem Kollektiv im Vergleich zu anderen Publikationen ausgegangen werden; beispielsweise werden in der ISAR-REACT-Studie von Kastrati et al. für das dort erfasste Gesamtkollektiv folgende Zahlen genannt: Anteil der Männer 76%, Altersdurchschnitt 65 Jahre, Vorliegen einer arteriellen Hypertonie bei 55%, eines Diabetes mellitus bei 21%, einer Hypercholesterinämie bei 54% und eines Nikotinabusus bei 17% der Patienten; betreffend die angiographisch erhobenen Größen wurde das Vorliegen einer Mehrgefäßkrankung in 75%, ein Anteil komplexer Läsionen gemäß ACC/AHA-Klassifikation (kumulative Gruppe beinhaltend Läsionen vom Typ B2 und C) in 66% bzw. eine totale Okklusion in 5% der Fälle diagnostiziert <sup>58</sup>.

Von den initial eingeschlossenen 189 Patienten nahmen 149 an der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen teil (entspricht einem Anteil von 78,8%); bei 30,0% der

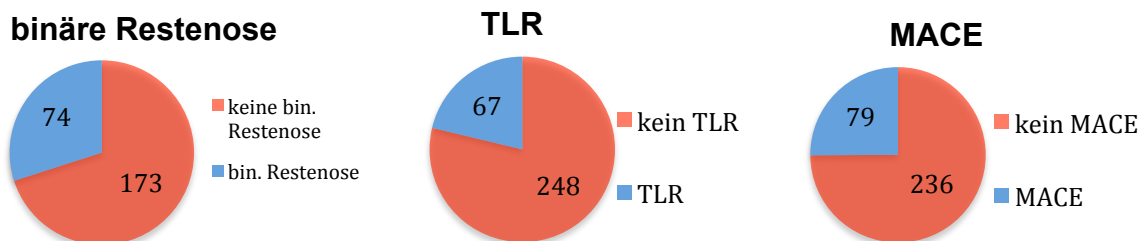
hierbei kontrollierten 247 de novo-Läsionen zeigte sich eine binäre Restenose, bei 21,3% der Patienten kam es innerhalb der Follow up-Beobachtung über 360 Tage zu einem Ereignis TLR, bei 25,1% zu einem MACE.

In Tabelle 3 (im Anschluß) werden die Absolutwerte n für das Auftreten der Ereignisse binäre Restenose, TLR und MACE in den möglichen Merkmalsausprägungen 0 (Ereignis tritt nicht ein) bzw. 1 (Ereignis tritt ein) aufgeführt, ebenso ist der zugehörige prozentuale Anteil des Merkmals am Gesamtkollektiv angegeben (Anmerkung: da im Rahmen der Follow up-Beobachtung im Zeitraum von 360 Tagen nach Index-Koronarangiographie die Ereignisse TLR und MACE auch für diejenigen Patienten registriert wurden, die nicht an der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen teilnahmen, kommt es zu einer Differenz in der jeweiligen Gesamtsumme).

	binäre Restenose		TLR		MACE	
	0	1	0	1	0	1
n	173	74	248	67	236	79
in %	70,0	30,0	78,7	21,3	74,9	25,1

**Tabelle 3:** Für jeden der Endpunkte binäre Restenose, TLR und MACE wird der absolute sowie relative Anteil von Patienten mit (binäre Restenose/TLR/MACE = 1) bzw. ohne Eintreten des entsprechenden Ereignisses (binäre Restenose/TLR/MACE = 0) am Gesamtpatientenkollektiv aufgeführt.

Die Abbildungen 12-14 visualisieren diese Daten für jedes Ereignis in Form eines Tortendiagramms:



**Abbildung 12 - 14.** Tortendiagramme - Auftreten binäre Restenose, TLR bzw. MACE: es werden jeweils die Anteile der Patienten ohne Eintreten des Ereignisses (roter Sektor) denen derjenigen Patienten mit nachgewiesenem Eintritt des Ereignisses (blauer Sektor) gegenübergestellt.

## 4.2. Auswertung Proliferationsindizes

Wie in der Problemstellung aufgeführt ist ein Ziel dieser Arbeit die Klärung der Frage, ob sich aus den neu eingeführten und in vitro ermittelten patientenindividuellen Proliferationsindizes (als Äquivalent des Konstrukts der "Serumkapazität") die Entwicklung bzw. das Ausmaß einer In-Stent Restenose oder das Eintreten eines anderen relevanten klinischen Ereignisses in vivo vorhersagen läßt. Hierfür wurde, wie in Punkt 3.9. beschrieben, eine logistische Regression mit dem jeweiligen Proliferationsindex als unabhängiger sowie den Zielgrößen "binäre Restenose", "Late Lumen Loss" und "TLR" als abhängigen Variablen durchgeführt.

Tabelle 4 zeigt, daß sich die Zahl der eingetretenen Ereignisse TLR und MACE nur geringfügig unterscheidet (Anmerkung: TLR geht neben den Ereignissen Re-Infarkt und Tod mit in den kombinierten Endpunkt MACE ein); unter der Annahme, daß aufgrund der in etwa korrespondierenden Zahlen für TLR und MACE kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Auswertungen der Proliferationsindizes mit diesen Zielgrößen zu erwarten ist, wurde im Vorfeld der Auswertung eine Kontingenztafel beinhaltend die Parameter TLR und MACE inklusive der Randhäufigkeiten erstellt (Tabelle 4); die im Weiteren durchgeführte statistische Analyse (Chi-Quadrat-Test nach Pearson, Exakter Test nach Fisher) zeigte, daß die Ereignisse TLR und MACE mit hoher Signifikanz miteinander korrelieren (Tabelle 5, jeweils  $p < 0,001$ ), konsekutiv läßt sich in puncto einer Auswertung der Proliferationsindizes mit der Zielgröße MACE kein Unterschied zu der mit der Zielgröße TLR erwarten, auf eine Einzelanalyse dieser Größe wurde daher verzichtet.

	MACE = 0	MACE = 1	Gesamt
TLR = 0	235	12	247
TLR = 1	0	67	67
Gesamt	235	79	314

**Tabelle 4.** Kontingenztafel beinhaltend das Auftreten der Merkmale TLR sowie MACE = 0 (Ereignis tritt nicht ein) bzw. TLR sowie MACE = 1 (Ereignis tritt ein) samt Randhäufigkeiten.

	Wert	Asymptotische Signifikanz	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	253,366	< 0,001		
Exakter Test nach Fisher			< 0,001	< 0,001
Anzahl der gültigen Fälle	314			

**Tabelle 5.** Auswertung der in Tabelle 4 abgebildeten Kontingenztafel mittels Chi-Quadrat bzw. Fisher's Exact-Test: das Auftreten oder Nicht-Auftreten des Ereignisses TLR und MACE korreliert miteinander in statistischer Signifikanz (jeweils  $p < 0,001$ ), relevante Unterschiede einer Auswertung der Proliferationsindizes mit diesen Zielgrößen sind daher nicht zu erwarten.

#### 4.2.1. Auswertung Parameter PI\_PRAE

Der Parameter PI\_PRAE stellt einen patientenindividuellen Ausgangswert für die folgende Begutachtung und Interpretation aller Proliferationsindizes dar. Zudem soll durch die Korrelation des Parameters PI\_PRAE mit den Zielgrößen eine Überprüfung des Theorems erfolgen, ob ein interindividueller Aktivitätszustand der an der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen beteiligten Signaltransduktionswege und -mechanismen für das Eintreten eines relevanten klinischen oder angiographischen Endpunktes verantwortlich ist.

Auswertung PI_PRAE	Regressionskoeffizient	Standardfehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
Zielgröße			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi-Quadrat	p	
binäre Restenose	-0,066	0,5194	-1,084	0,951	0,016	0,898	0,936
Late Lumen Loss	-0,111	0,1557	-0,416	0,195	0,504	0,478	0,895
TLR	0,034	0,5759	-1,095	1,163	0,003	0,953	1,035

**Tabelle 6.** Log. Regression mit bin. Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger, PI\_PRAE als unabhängiger Variable.

Zwischen dem Parameter PI\_PRAE und den Zielgrößen binäre Restenose ( $p = 0,898$ ), Late Lumen Loss ( $p = 0,478$ ) und TLR ( $p = 0,953$ ) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

#### 4.2.2. Auswertung Parameter PI\_POST

PI\_POST wurde anhand der unmittelbar postinterventionell abgenommenen Serumprobe ermittelt. Jede ballon- oder stentinduzierte Endothelverletzung führt unweigerlich zu einer Freisetzung diverser intrazellulärer Strukturen und Mediatoren, welche direkt oder indirekt die Migration und Proliferation von CASMC beeinflussen können; diese Faktoren sollten daher in höherem Maße vorliegen als in der präinterventionell abgenommenen Probe. Diese Auswertung soll klären, ob der Parameter PI\_POST einen zuverlässigen Prädiktor für das Eintreten von binärer Restenose und TLR bzw. das Ausmaß des Late Lumen Loss darstellt.



Auswertung PI_POST	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
Zielgröße			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	-0,087	0,2529	-0,582	0,409	0,118	0,732	0,917
Late Lumen Loss	-0,097	0,0762	-0,246	0,052	1,618	0,203	0,908
TLR	-,0231	0,3084	-0,836	0,373	0,562	0,453	0,794

Tabelle 7. Log. Regression mit bin. Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger, PI\_POST als unabhängiger Variable.

Zwischen dem Parameter PI\_POST und den Zielgrößen binäre Restenose ( $p = 0,732$ ), Late Lumen Loss ( $p = 0,203$ ) und TLR ( $p = 0,453$ ) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

#### 4.2.3. Auswertung Parameter PI\_3D

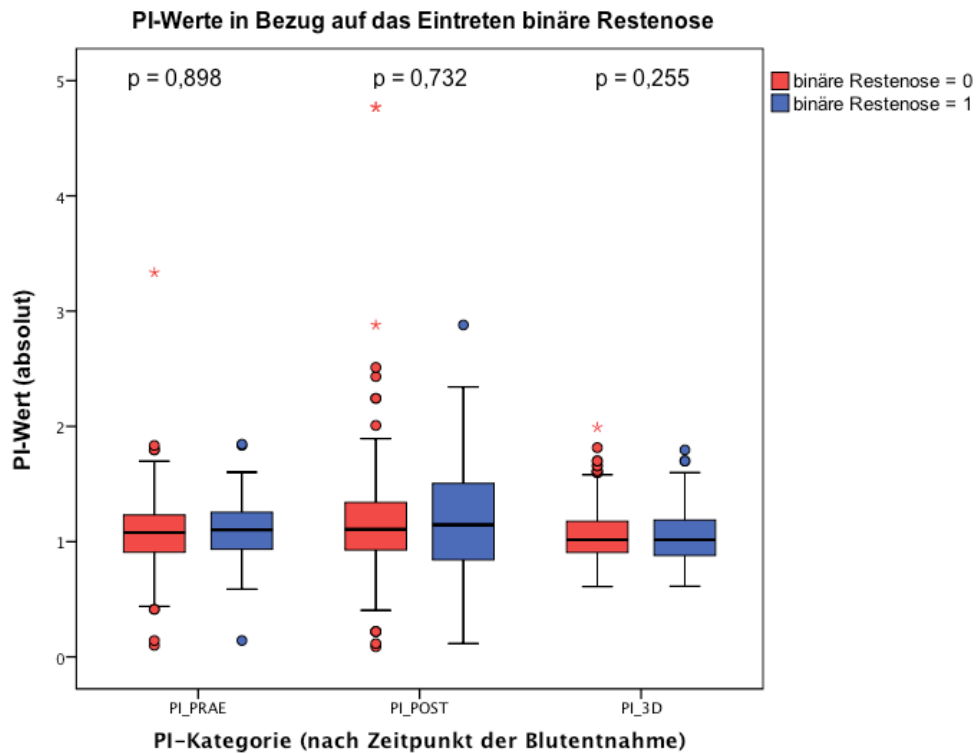
Wie auf Seite 22 beschrieben sind die zur Migration und Proliferation von CASMC führenden molekularbiologischen Prozesse nicht nur auf den Zeitpunkt unmittelbar nach ballon- bzw. stentinduzierter Endothelverletzung beschränkt, sondern lassen sich für einen Zeitraum von Tagen bis hin zu Wochen nachweisen, diese zeitliche Phase wird durch den Proliferationsindex PI\_3D charakterisiert. Diese Auswertung soll klären, ob der Parameter PI\_3D einen zuverlässigen Prädiktor für das Eintreten von binärer Restenose und TLR bzw. das Ausmaß des Late Lumen Loss darstellt.

Auswertung PI_3D	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
Zielgröße			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	-0,776	0,6813	-2,111	0,560	1,296	0,255	0,460
Late Lumen Loss	-0,331	0,2329	-0,788	0,125	2,021	0,155	0,718
TLR	-0,456	0,8354	-2,093	1,182	0,297	0,586	0,634

Tabelle 8. Log. Regression mit bin. Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger, PI\_3D als unabhängiger Variable.

Zwischen dem Parameter PI\_3D und den Zielgrößen binäre Restenose ( $p = 0,255$ ), Late Lumen Loss ( $p = 0,155$ ) und TLR ( $p = 0,586$ ) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Zum Abschluß der Auswertung der Proliferationsindizes soll anhand von Box-Plot-Diagrammen die Verteilung bzw. Streuung der für PI\_PRAE, PI\_POST und PI\_3D ermittelten Werte in Bezug auf das Eintreten einer binären Restenose demonstriert werden.



**Abbildung 15.** Die Box-Plot-Diagramme zeigen den Median bzw. die Streuung der jeweiligen PI-Werte im Gesamtkollektiv der Patienten mit bzw. ohne binärer Restenose. Die PI\_POST-Werte der Patienten mit binärer Restenose liegen insgesamt auf höherem Niveau als in der Gruppe ohne Nachweis einer binären Restenose, was sich auch in einem höheren Median äußert. Wie in Punkt 4.2.2. aufgezeigt stellt dieser Fakt nur einen statistisch nicht signifikanten Trend dar, stützt jedoch die Theorie dafür, daß im Rahmen der ballon- oder stentinduzierten Endothelverletzung in vivo Mediatoren freigesetzt werden, welche in vitro glatte Gefäßmuskelzellen zur Proliferaton stimulieren könne. Für PI\_PRAE und PI\_3D ist dieser Trend zu erhöhten Werten in der Gruppe mit nachgewiesener binärer Restenose schwächer ausgeprägt bzw. nicht nachweisbar.

### 4.3. Analyse des Einflusses weiterer Parameter

In der Einleitung wurden mehrere anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer In-Stent Restenose vorgestellt. Auch für diese Arbeit wurde im Vorfeld eine Untersuchung des Einflusses der unter Punkt 3.7. aufgeführten potentiellen Risikofaktoren auf die Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss und TLR festgelegt: hiermit soll einerseits ermittelt werden, ob es sich beim eingeschlossenen Patientenkollektiv um ein repräsentatives in Bezug auf andere etablierte Studien handelt, andererseits sollten solche Parameter - im Falle eines nachgewiesenen statistisch

signifikanten Zusammenhangs der Proliferationsindizes mit den Zielgrößen - als potentielle Störgrößen bzw "Confounder" in das statistische Analysemodell mit einbezogen werden.

#### 4.3.1. Auswertung prä- und postinterventioneller minimaler Lumen-Diameter

Sowohl prä- als auch postinterventioneller minimaler Lumen-Diameter (MLD) stellen wesentliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer In-Stent Restenose dar; Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Auswertung des Einflusses des präinterventionellen MLD, Tabelle 10 die des postinterventionellen MLD auf die Entwicklung von binärer Restenose, Late Lumen Loss und TLR.

Auswertung "präinterventioneller MLD"	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	-0,955	0,2550	-1,455	-0,456	14,040	<b>&lt; 0,001</b>	0,385
Late Lumen Loss	-0,208	0,0959	-0,396	-0,020	4,713	<b>0,030</b>	0,812
TLR	-0,722	0,2487	-1,210	-0,235	8,434	<b>0,004</b>	0,486

**Tabelle 9.** Log. Regression mit binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger sowie dem präinterventionellen MLD als unabhängiger Variable.

Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang des präinterventionellen MLD mit jeder der Zielgrößen binäre Restenose ( $p < 0,001$ ), Late Lumen Loss ( $p = 0,030$ ) und TLR ( $p = 0,004$ ) aufgezeigt werden: der negative Regressionskoeffizient bzw.  $< 1$  gelegene Effektkoeffizient  $\text{Exp}(\beta)$  zeigen an, daß für den präinterventionellen MLD eine inverse Relation zu den Zielgrößen besteht, d.h. je kleiner der Parameter ausgeprägt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten von binärer Restenose und TLR bzw. das Ausmaß des Late Lumen Loss.

Auswertung "postinterventioneller MLD"	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	-1,685	0,3722	-2,414	-0,955	20,489	<b>&lt; 0,001</b>	0,186
Late Lumen Loss	-0,013	0,0876	-0,185	0,159	0,022	0,882	0,987
TLR	-1,002	0,2889	-1,569	-0,436	12,036	<b>0,001</b>	0,367

**Tabelle 10.** Log. Regression mit binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger sowie dem postinterventionellen MLD als unabhängiger Variable.

Für den postinterventionellen MLD zeigt sich eine statistisch signifikante inverse Relation mit den Zielgrößen binäre Restenose ( $p < 0,001$ ) und TLR ( $p = 0,001$ ), nicht aber dem Late Lumen Loss ( $p = 0,882$ ). Analog zum präinterventionellen MLD ist die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten von binärer Restenose und TLR umso höher, je geringer der postinterventionelle MLD ausgeprägt ist.

#### 4.3.2. Auswertung prä- und postinterventioneller Referenzdurchmesser

Wie z.B. in der ISAR-SMART-Studie behandelt geht die Intervention von Koronarläsionen in Gefäßen  $< 3\text{mm}$  mit einem erhöhten Restenoserrisiko einher; bemessen wird die Gefäßgröße anhand des Referenzdurchmessers (RD). Tabelle 11 zeigt die statistische Auswertung des präinterventionell erhobenen RD im Hinblick auf die Entwicklung der Zielgrößen, Tabelle 12 die des postinterventionell erhobenen RD.

Auswertung "präinterventioneller RD"	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	-1,853	0,3870	-2,612	-1,095	22,928	<b>&lt; 0,001</b>	0,157
Late Lumen Loss	-0,172	0,0936	-0,355	0,012	3,373	0,066	0,842
TLR	-0,647	0,2740	-1,184	-0,110	5,576	<b>0,018</b>	0,524

Tabelle 11. Log. Regression mit binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger sowie dem präinterventionellen RD als unabhängiger Variable.

Zwischen dem präinterventionellem RD und den Zielgrößen binäre Restenose ( $p < 0,001$ ) und TLR ( $p = 0,018$ ) besteht eine statistisch signifikante inverse Relation: mit steigendem Ausmaß des präinterventionellem RD nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten von binärer Restenose und TLR ab; ein relevanter Zusammenhang mit dem Ausmaß des Late Lumen Loss ist nicht nachweisbar ( $p = 0,066$ ).

Auswertung "postinterventioneller RD"	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	-1,512	0,3436	-2,185	-0,839	19,371	<b>&lt; 0,001</b>	0,220
Late Lumen Loss	-0,134	0,0933	-0,317	0,049	2,062	0,151	0,875
TLR	-0,838	0,3001	-1,426	-0,250	7,800	<b>0,005</b>	0,432

Tabelle 12. Log. Regression mit binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR als abhängiger sowie dem postinterventionellen RD als unabhängiger Variable.

Analog zum präinterventionellen RD läßt sich auch für den postinterventionellen RD ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit den Zielgrößen binäre Restenose ( $p < 0,001$ ) und TLR ( $p = 0,005$ ), nicht aber dem Late Lumen Loss nachweisen ( $p = 0,151$ ): mit steigendem Ausmaß des postinterventionellen RD nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von binärer Restenose und TLR ab.

#### 4.3.3. Auswertung Parameter "Stentlänge"

Wie z.B. durch Kasaoka et al. demonstriert wurde, ist das Risiko zur Entwicklung einer In-Stent Restenose direkt proportional zur Länge des gestenteten Stenoseareals<sup>55</sup>. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung des Parameters "Stentlänge" mit den Zielgrößen.

Auswertung "Stentlänge"		Regressionskoeffizient	Standardfehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
Zielgröße	Unterer Wert			Oberer Wert	Wald-Chi-Quadrat	p		
binäre Restenose	0,036	0,0127	0,011	0,061	8,194	<b>0,004</b>	1,037	
Late Lumen Loss	0,015	0,0051	0,005	0,025	8,366	<b>0,004</b>	1,015	
TLR	-0,001	0,0152	-0,030	0,029	0,001	0,972	0,999	

**Tabelle 13.** Logistische Regression mit binärer Restenose, Late Lumen Loss und TLR als abhängiger sowie der Stentlänge als unabhängiger Variable.

Statistisch signifikant ist die direkte Korrelation zwischen der Länge des gestenteten Gefäßabschnittes mit den Zielgrößen binäre Restenose ( $p = 0,004$ ) und Late Lumen Loss ( $p = 0,004$ ), nicht aber TLR ( $p = 0,972$ ); je länger der mit Stent versorgte Gefäßabschnitt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer binären Restenose bzw. das Ausmaß des Late Lumen Loss.

#### 4.3.4. Auswertung Parameter "ACC/AHA-Klassifikation" und "Okklusion"

Wie von Kastrati et al. belegt wurde, ermöglicht die Zuordnung einer Läsion in die jeweilige Gruppe der ACC/AHA-Klassifikation prognostische Aussagen über das Eintreten einer binären Restenose bzw. anderer klinischer Ereignisse wie TLR und MACE; es werden dabei einfache (Typ A und B1) von komplexen Läsionen (Typ B2

und C) unterschieden  $p_{61}$ . Gemäß der Einteilung von Ryan et al. werden Läsionen mit nachgewiesener Okklusion der Gruppe C zugeteilt  $p_{117}$ .

Auswertung "ACC/AHA-Klassifikation"		Regressionskoeffizient	Standardfehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
Zielgröße	Läsionstyp			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi-Quadrat	p	
binäre Restenose	A	0	.	.	.	.	.	1
	B1	-1,222	0,9342	-3,053	0,609	1,711	0,191	0,295
	B2	-0,713	0,4138	-1,524	0,098	2,969	0,085	0,490
	C	-0,101	0,3178	-0,724	0,522	0,101	0,751	0,904
Late Lumen Loss	A	0	.	.	.	.	.	1
	B1	0,156	0,1952	-0,226	0,539	0,640	0,424	1,169
	B2	0,451	0,1777	0,103	0,800	6,449	<b>0,011</b>	1,570
	C	0,517	0,2121	0,102	0,933	5,953	<b>0,015</b>	1,678
TLR	A	0	.	.	.	.	.	1
	B1	-0,019	0,7636	-1,516	1,477	0,001	0,980	0,981
	B2	0,286	0,7746	-1,232	1,804	0,136	0,712	1,331
	C	0,136	0,7773	-1,387	1,659	0,031	0,861	1,146

**Tabelle 14.** Log. Regression mit binäre Restenose, Late Lumen Loss und TLR als abhängiger, der jeweiligen ACC/AHA-Subgruppe als unabhängiger Variable.

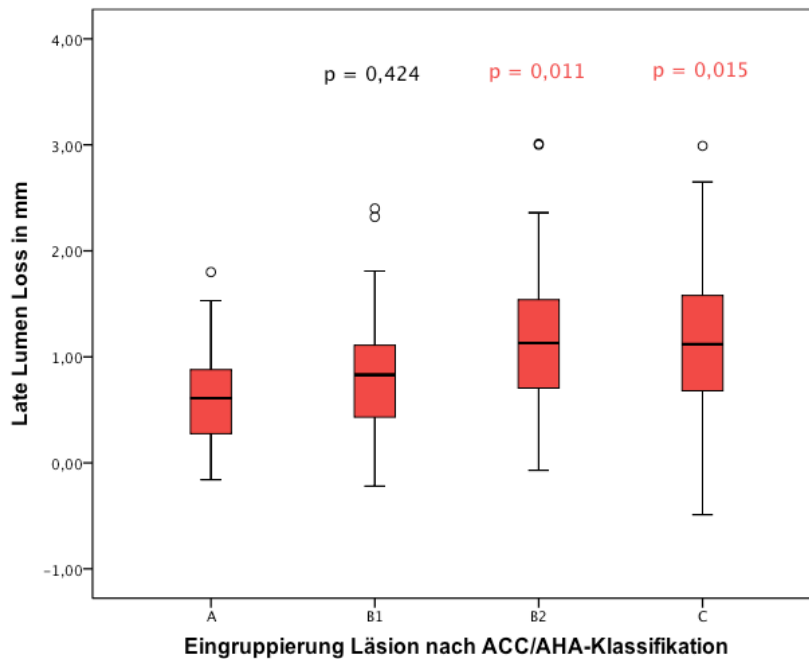
Als ACC/AHA Typ B2 ( $p = 0,011$ ) oder Typ C ( $p = 0,015$ ) klassifizierte Läsionen weisen einen signifikant höheren Late Lumen Loss auf wie die als Referenz dienende Gruppe vom Typ A. Ähnliche Effekte bzgl. der Zielgrößen binäre Restenose und TLR sind nicht nachweisbar.

Der Mittelwert des Late Lumen Loss (inkl. Standardabweichung) für die jeweiligen Gruppen der modifizierten ACC/AHA-Klassifikation ist in Tabelle 15 aufgeführt:

	ACC/AHA A	ACC/AHA B1	ACC/AHA B2	ACC/AHA C
Late Lumen Loss (in mm)	0,67 ± 0,60	0,84 ± 0,54	1,15 ± 0,63	1,22 ± 0,76

**Tabelle 15.** Mittlerer Late Lumen Loss ( $\pm$  Standardabweichung) in den ACC/AHA-Einzelklassen. Die entsprechenden p-Werte betreffend den Unterschied der Subgruppe zur Referenzgruppe A sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Zur besseren Visualisierung wird die Verteilung der Werte nochmals anhand eines Box-Plot-Diagramms aufgezeigt:



**Abbildung 16.** Vorhergesagtes Ausmaß des Late Lumen Loss in Abhängigkeit der Gruppierung nach ACC/AHA-Klassifikation: Läsionen vom Typ B2 oder C weisen einen signifikant höheren Late Lumen Loss auf als Läsionen vom Typ A.

In der oben erwähnten Publikation von Kastrati et al. <sup>61</sup> wurde für Läsionen vom "komplexen" Typ (B2 und C) ein erhöhtes Restenoserisiko aufgezeigt. Auch wenn sich in dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang dieser Klassifikation mit der Entwicklung einer binären Restenose nachweisen ließ, soll dennoch kurz auf die entsprechenden Werte eingegangen werden. Tabelle 16 zeigt hierfür die mittlere Restenoserate in den jeweiligen Subgruppen analog zur ACC/AHA-Klassifikation:

	ACC/AHA A	ACC/AHA B1	ACC/AHA B2	ACC/AHA C
mittlere binäre Restenoserate	30,9%	33,7%	43,0%	44,7%

**Tabelle 16.** Mittlere binäre Restenoserate in den Subgruppen analog zur ACC/AHA-Klassifikation. Die entsprechenden p-Werte betreffend den Unterschied der jeweiligen Gruppe zur Referenzgruppe A sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Auch im für diese Arbeit eingeschlossenen Patientenkollektiv kommt es für Läsionen vom Typ B2 oder C häufiger zum Auftreten einer binären Restenose als für Läsionen des Typs A oder B1. Zwar ist dieser Trend nicht statistisch signifikant, demonstriert aber, daß sich die Kastrati et al. und in dieser Arbeit eingeschlossenen Patientenkollektive in ihrer Struktur ähneln.

Auswertung "Okklusion"		Regressions- koeffizient	Standard- fehler	95% - Konfidenzintervall		Hypothesentest		Exp( $\beta$ )
Zielgröße	Art Okklusion			Unterer Wert	Oberer Wert	Wald-Chi- Quadrat	p	
binäre Restenose	keine	0	.	.	.	.	.	1
	akut	1,189	1,1118	-0,990	3,368	1,144	0,285	3,284
	chronisch	0,637	0,6178	-0,574	1,848	1,064	0,302	1,891
Late Lumen Loss	keine	0	.	.	.	.	.	1
	akut	0,067	0,4436	-0,803	0,936	0,023	0,880	1,069
	chronisch	-0,171	0,2003	-0,563	0,222	0,727	0,394	0,843
TLR	keine	0	.	.	.	.	.	1
	akut	-0,940	1,1118	-3,119	1,239	0,715	0,398	0,391
	chronisch	-0,643	0,5342	-1,691	0,404	1,450	0,228	0,525

**Tabelle 17.** Log. Regression mit binärer Restenose, Late Lumen Loss und TLR als abhängiger sowie dem Parameter "Okklusion" als unabhängiger Variable.

Aus einer Unterteilung des Patientenkollektivs in Gruppen je nach Merkmalsausprägungen des Parameters "Okklusion" (keine, akut bzw. chronisch) lassen sich keine statistisch signifikanten Aussagen über das Risiko des Eintretens von binärer Restenose und TLR bzw. das Ausmaß des Late Lumen Loss ableiten.



#### 4.4. Auftreten klinischer Ereignisse in Abhängigkeit des PI < 1,0 oder ≥ 1,0

In den unter 4.2.1. - 4.2.3. durchgeführten Auswertungen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Absolutwerten der Proliferationsindizes und den Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss und TLR nachgewiesen werden, jedoch zeigten Patienten mit nachgewiesener binärer Restenose insgesamt einen Trend zu höheren PI\_POST-Werten. Es soll daher eine erneute Auswertung vorgenommen werden, in welcher die Proliferationsindizes nicht quantitativ, sondern qualitativ in Kategorien < 1,0 oder ≥ 1,0 mit einbezogen werden (die Grenze von 1,0 erscheint angesichts der unter 3.6.4. aufgeführten Formel zur Ermittlung der Proliferationsindizes als sinnvoll, da so eine Unterteilung erfolgt in Patientenproben, welche in vitro eine geringere bzw. höhere Proliferationsrate von glatten Gefäßmuskelzellen bewirken wie die als Positivkontrolle eingesetzte FCS-Probe). Die so ermittelten PI-Kategorien werden in Bezug mit dem Auftreten klinischer Endpunkte (TLR und MACE) gesetzt.

Zielgröße	PI-Kategorie	Log-rank (Mantel-Cox) Test		Gehan-Breslow-Wilcoxon Test		Überlebensrate		Hazard-Ratio	
		Chi-Quadrat	p	Chi-Quadrat	p	PI < 1,0	PI ≥ 1,0	Ratio	95%-Konfidenzintervall
TLR	PI_PRAE	0,400	0,527	0,296	0,586	74,7	69,9	0,835	0,4762 - 1,462
	PI_POST	0,212	0,645	0,196	0,658	68,5	72,3	1,157	0,6212 - 2,156
	PI_3D	0,008	0,927	0,008	0,928	72,0	72,6	1,026	0,5929 - 1,775
MACE	PI_PRAE	0,089	0,766	0,058	0,810	69,3	67,0	0,923	0,5459 - 1,562
	PI_POST	0,259	0,611	0,161	0,688	62,3	68,1	1,161	0,6529 - 2,065
	PI_3D	0	0,996	0,006	0,937	68,3	68,9	0,999	0,5973 - 1,670

Tabelle 18. Ereigniszeitanalyse (Ereignis TLR oder MACE) in Abhängigkeit des jeweiligen PI < 1,0 oder ≥ 1,0.

Die Ereigniszeitanalyse konnte für die PI-Kategorien < 1,0 oder ≥ 1,0 keinen signifikanten Unterschied im Auftreten klinischer Ereignisse wie TLR und MACE nachweisen, sämtliche p-Werte liegen oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,05.



## 5. Ergebnisse - Patienten mit In-Stent Restenosen

### 5.1. Grundcharakteristika und primäre Endpunkte

Im Zeitraum vom 12.11.2001 - 19.02.2003 wurden insgesamt 159 Patienten mit der entsprechenden Anzahl an koronarangiographisch gesicherten Läsionen in diese Arbeit eingeschlossen, die Patientenrekrutierung erfolgte im Rahmen von zwei weiteren im Deutschen Herzzentrum München durchgeführter Studien <sup>49</sup> , <sup>154</sup> . Die zum Zeitpunkt der Index-Koronarangiographie erhobenen Grundcharakteristika finden sich in Tabelle 19 und 20 aufgeführt.

patientenbezogene Merkmale n=159 Patienten			läsionsbezogene Merkmale n=159 Läsionen			
	n	%		n	%	
Geschlecht = m	121	76,1	ACC/AHA-Klass.	A	7	4,4
mittleres Alter Männer	64 ± 8	--		B1	67	42,1
mittleres Alter Frauen	68 ± 8	--		B2	61	38,4
koronare Mehrgefäßerkrankung	130	81,8		C	24	15,1
Raucher	13	8,2	Okklusion	akut	0	0
Hypercholesterinämie	104	65,4		chronisch	7	4,4
arterielle Hypertonie	106	66,7		keine	152	95,6
Diabetes	42	26,4	Stentimplantation (übrige: plain-PTCA)		21	13,2
- Insulintherapie	17	40,5	mittlerer präinterventioneller MLD (in mm)	0,94 ± 0,41		
- orale Antidiabetika	18	42,9	mittlerer postinterventioneller MLD (in mm)	2,16 ± 0,53		

**Tabelle 19 und 20.** Grundcharakteristika Patienten mit In-Stent Restenose, Gesamtpatientenkollektiv (Anmerkung: prozentuale Angaben hinsichtlich der einzelnen Diabetes-Therapieregimen beziehen sich nicht auf das Gesamtkollektiv, sondern ausschließlich auf die Diabetespatienten).

In den folgenden Tabellen 21 und 22 erfolgt ergänzend eine erneute Auflistung der Grundcharakteristika, diesmal unterteilt in die jeweiligen Einzelgruppen "Rapamycin", "Placebo" und "Imatinib". Anhand dieser Daten kann festgestellt werden, daß per se Homogenität in den jeweiligen Einzelgruppen besteht, signifikante Unterschiede bzgl. eines klinischen oder angiographischen Merkmals bestehen nicht, es fällt lediglich eine geringere Teilnahme der "Imatinib"-Patienten an der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen auf.

patientenbezogene Merkmale			
n (Rapamycin) = 92   n (Placebo) = 44   n (Imatinib) = 23			

		n	%	p
Geschlecht = m	Rapamycin	67	72,8	0,356
	Placebo	34	77,3	
	Imatinib	20	87,0	
mittleres Alter Männer	Rapamycin	65 ± 8	--	0,058
	Placebo	65 ± 9	--	
	Imatinib	63 ± 8	--	
mittleres Alter Frauen	Rapamycin	68 ± 8	--	0,737
	Placebo	67 ± 8	--	
	Imatinib	64 ± 5	--	
koronare Mehr- gefäßkrankung	Rapamycin	75	81,5	0,993
	Placebo	36	81,8	
	Imatinib	19	82,6	
Raucher	Rapamycin	9	9,8	0,578
	Placebo	2	4,5	
	Imatinib	2	8,7	
Hypercholesterin- ämie	Rapamycin	57	62,0	0,169
	Placebo	28	63,6	
	Imatinib	19	82,6	
art. Hypertonie	Rapamycin	60	65,2	0,268
	Placebo	31	70,5	
	Imatinib	15	65,2	
Wiedervorstellung Re-Koronar- Angiographie	Rapamycin	83	90,2	< 0,001
	Placebo	40	90,9	
	Imatinib	17	73,9	

läsionsbezogene Merkmale			
n (Rapamycin) = 92   n (Placebo) = 44   n (Imatinib) = 23			

		n	%	p
Gruppe Rapamycin: ACC/AHA-Klass.	A	4	4,3	0,869
	B1/B2	75	81,5	
	C	13	14,1	
Gruppe Placebo: ACC/AHA-Klass.	A	3	6,8	
	B1/B2	35	79,5	
	C	6	13,6	
Gruppe Imatinib: ACC/AHA-Klass.	A	0	0	
	B1/B2	18	78,3	
	C	5	21,7	
Gruppe Rapamycin: Okklusion	akut	0	0	0,702
	chronisch	5	5,4	
	keine	87	94,6	
Gruppe Placebo: Okklusion	akut	0	0	
	chronisch	1	2,3	
	keine	43	97,7	
Gruppe Imatinib: Okklusion	akut	0	0	
	chronisch	1	4,3	
	keine	22	95,7	
Gruppe Rapamycin: Intervention	plain-PTCA	75	81,5	0,068
	Stent	17	18,5	
Gruppe Placebo: Intervention	plain-PTCA	41	93,2	
	Stent	3	6,8	
Gruppe Imatinib: Intervention	plain-PTCA	22	95,7	
	Stent	1	4,3	

Tabelle 21 und 22. Grundcharakteristika Patienten mit In-Stent Restenose, aufgliedert in die einzelnen Therapiegruppen.

Von den 159 initial eingeschlossenen Patienten nahmen 140 an der Kontroll-Koronarangiographie nach 180 Tagen teil (88,1%); bezogen auf das Gesamt-Patientenkollektiv wiesen 29,3% der intervenierten Läsionen eine binäre Restenose auf, im Rahmen der klinischen Follow up-Beobachtung über 360 Tage nach Index-Koronarangiographie konnte zudem in 20,1% aller Fälle der Eintritt eines Ereignisses TLR, in 22,6% das Auftreten eines MACE dokumentiert werden. Im Hinblick auf diese Endpunkte läßt sich, wie in den Tabellen 23 bis 25 aufgeführt, jedoch eine deutliche Differenz zwischen den einzelnen Therapiegruppen aufweisen:

#### Häufigkeit des Auftretens einer binären Restenose im Gesamtkollektiv bzw. in den Subgruppen

	ohne binäre Restenose	mit binärer Restenose	%	p
Gesamt-Patientenkollektiv	99	41	29,3	
Gruppe "Rapamycin"	62	21	25,3	0,369
Gruppe "Placebo"	27	13	32,5	
Gruppe "Imatinib"	10	7	41,2	

**Tabelle 23.** Im Gesamt-Patientenkollektiv lässt sich für 29,3% der Patienten die Entwicklung einer binären Restenose nachweisen. In der Subgruppenanalyse findet sich für Patienten der "Rapamycin"-Gruppe die niedrigste binäre Restenoserate (25,3%), die höchste für Patienten der "Imatinib"-Gruppe (41,2%).

#### Häufigkeit des Auftretens des Ereignisses TLR im Gesamtkollektiv bzw. in den Subgruppen

	ohne TLR	mit TLR	%	p
Gesamt-Patientenkollektiv	127	32	20,1	
Gruppe "Rapamycin"	77	15	16,3	0,281
Gruppe "Placebo"	34	10	22,7	
Gruppe "Imatinib"	16	7	30,4	

**Tabelle 24.** Im Gesamt-Patientenkollektiv lässt sich für 20,1% der Patienten das Auftreten eines Ereignisses TLR innerhalb 360 Tagen nach Index-Koronarangiographie nachweisen, in der Subgruppenanalyse findet sich für Patienten der "Rapamycin"-Gruppe die niedrigste TLR-Rate (16,3%), die höchste für Patienten der "Imatinib"-Gruppe (30,4%).

#### Häufigkeit des Auftretens des Ereignisses MACE im Gesamtkollektiv bzw. in den Subgruppen

	ohne MACE	mit MACE	%	p
Gesamt-Patientenkollektiv	123	36	22,6	
Gruppe "Rapamycin"	75	17	18,5	0,225
Gruppe "Placebo"	33	11	25,0	
Gruppe "Imatinib"	15	8	34,8	

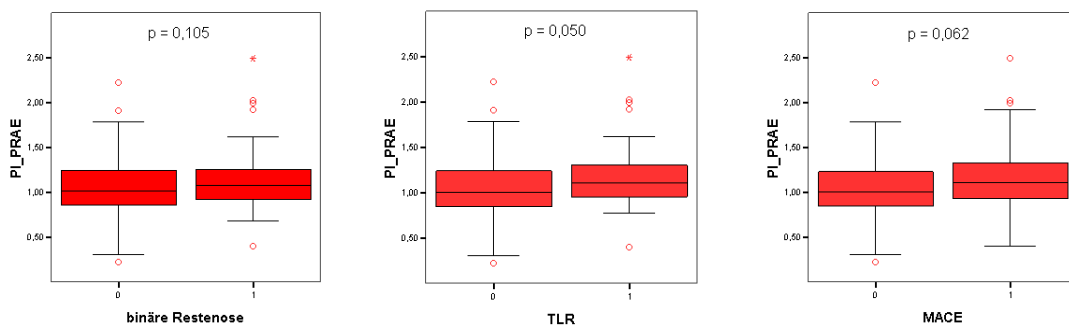
**Tabelle 25.** Im Gesamt-Patientenkollektiv lässt sich für 22,6% der Patienten das Auftreten eines MACE innerhalb 360 Tagen nach Index-Koronarangiographie nachweisen, in der Subgruppenanalyse findet sich für Patienten der "Rapamycin"-Gruppe die niedrigste MACE-Rate (18,5%), die höchste für Patienten der "Imatinib"-Gruppe (34,8%).

Die Betrachtung der Subgruppen zeigt, daß im Vergleich zur Placebogabe eine peri-interventionelle Applikation von Rapamycin eine deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante Reduktion der Häufigkeit des Auftretens aller Endpunkte bewirkt, wohingegen Patienten mit Imatinib-Therapie keinen Vorteil gegenüber Placebo aufweisen; diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Veröffentlichungen von Hausleiter<sup>49</sup> bzw. Zohlhöfer et al.<sup>154</sup> und demonstrieren, daß für diese Arbeit ein repräsentativer Anteil aus den für diese Studien rekrutierten Patienten eingeschlossen wurde.

## 5.2. Auswertung Proliferationsindizes

Analog zu der für die Patienten mit de novo-Stenosen erfolgten Auswertung soll an dieser Stelle für das Studienkollektiv mit In-Stent Restenosen eine Analyse darüber erfolgen, ob sich aus den in vitro ermittelten patientenindividuellen Proliferationsindizes in vivo-Ereignisse wie das Auftreten von rekurrenter In-Stent Restenose, TLR oder MACE vorhersagen lassen. In jeder der folgenden Auswertungen wird dabei initial das Ergebnis betreffend das Gesamtkollektiv in Form von Box-Plot-Diagrammen aufgeführt, danach in tabellarischer Form das Resultat der Subgruppenanalyse.

### 5.2.1. Auswertung Parameter PI\_PRAE



**Abbildung 17 - 19.** Box-Plot-Diagramme Ausmaß PI\_PRAE je Zielgröße. Patienten mit Vorliegen von binärer Restenose, TLR oder MACE (bin. Restenose/TLR/MACE = 1) weisen allsamt im Mittel erhöhte PI\_PRAE-Werte auf, dabei wird das Signifikanzniveau von 0,05 betreffend die Zielgrößen TLR und MACE nur knapp nicht erreicht.

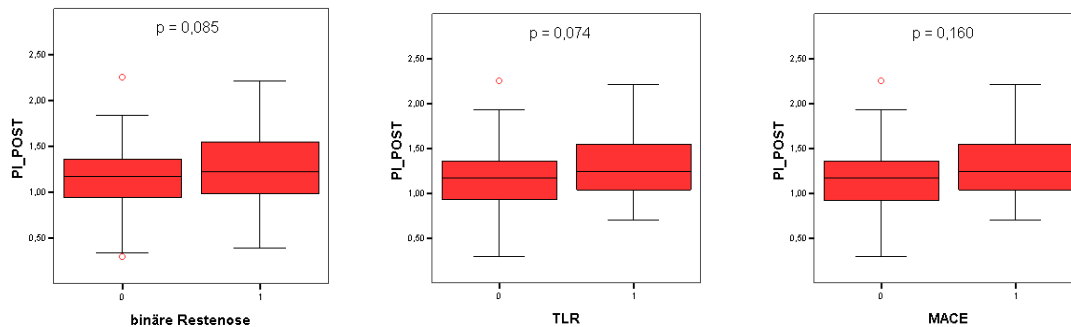
Es lässt sich im Gesamtkollektiv kein statistisch signifikanter Zusammenhang des Parameters PI\_PRAE mit den Zielgrößen binäre Restenose, TLR und MACE verifizieren, jedoch wird das Signifikanzniveau von  $< 0,05$  in den Auswertungen betreffend die Zielgrößen TLR und MACE nur knapp nicht erreicht ( $p=0,050$  bzw.  $p=0,062$ ).

Zielgröße	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
binäre Restenose	Rapamycin	0,575	0,698	0,678	0,410	1,777
	Placebo	0,868	1,133	0,587	0,444	2,382
	Imatinib	2,019	1,702	1,408	0,235	7,534
TLR	Rapamycin	1,260	0,753	2,796	0,095	3,525
	Placebo	0,582	0,997	0,340	0,560	1,789
	Imatinib	0,567	1,390	0,166	0,684	1,763
MACE	Rapamycin	0,862	0,730	1,396	0,237	2,369
	Placebo	0,395	0,978	0,163	0,686	1,485
	Imatinib	1,689	1,415	1,426	0,232	5,416

**Tabelle 26.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, PI\_PRAE als unabhängiger Variable.

In der Analyse der Subgruppen kann jeweils kein relevanter Effekt des Parameters PI\_PRAE auf die Zielgrößen binäre Restenose, TLR und MACE nachgewiesen werden.

### 5.2.2. Auswertung Parameter PI\_POST



**Abbildung 20 - 22.** Box-Plot-Diagramme Ausmaß PI\_POST je Zielgröße. Patienten mit Vorliegen von binären Restenose, TLR oder MACE (bin. Restenose/TLR/MACE = 1) weisen allsamt im Mittel erhöhte PI\_POST-Werte auf, dabei wird das Signifikanzniveau von 0.05 betreffend die Zielgrößen binäre Restenose und TLR nur knapp nicht erreicht.

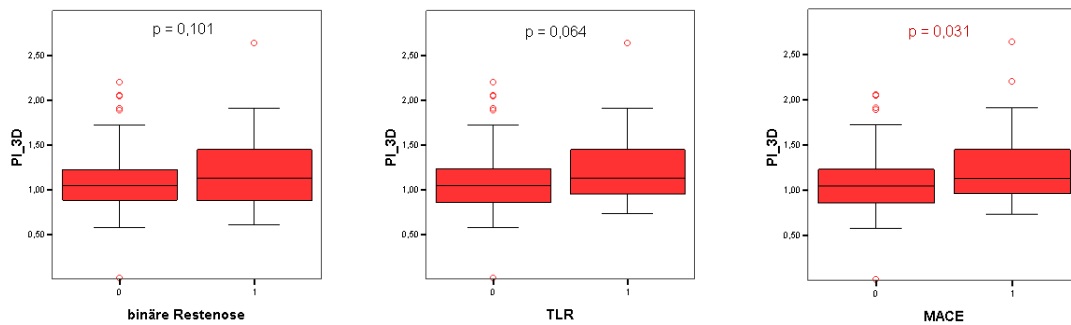
Ein statistisch signifikanter Zusammenhang des PI\_POST mit den Zielgrößen ist im Gesamtkollektiv wiederum nicht nachweisbar, es zeigt sich erneut ein entsprechender Trend von höheren PI-Werten für Patienten mit dokumentiertem Eintreten von rekurrenter In-Stent Restenose ( $p = 0,085$ ) bzw. TLR ( $p = 0,074$ ).

Zielgröße	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
binäre Restenose	Rapamycin	1,029	0,823	1,564	0,211	2,798
	Placebo	0,070	0,956	0,005	0,942	1,073
	Imatinib	1,474	1,375	1,149	0,284	4,367
TLR	Rapamycin	0,494	0,869	0,323	0,570	1,638
	Placebo	2,185	1,229	3,160	0,075	8,891
	Imatinib	0,159	1,146	0,019	0,889	1,173
MACE	Rapamycin	0,166	0,834	0,039	0,843	1,180
	Placebo	1,715	1,130	2,302	0,129	5,554
	Imatinib	0,065	1,103	0,004	0,953	1,068

**Tabelle 27.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, PI\_POST als unabhängiger Variable

In der Subgruppen-Analyse kann kein relevanter Effekt des Parameters PI\_POST auf die Zielgrößen binäre Restenose, TLR und MACE nachgewiesen werden.

### 5.2.3. Auswertung Parameter PI\_3D



**Abbildung 23 - 25.** Box-Plot-Diagramme Ausmaß PI\_3D je Zielgröße. Es zeigt sich eine statistisch signifikante direkte Relation zwischen dem Ausmaß des PI\_3D und dem Risiko für das Auftreten von MACE ( $p = 0,031$ ), für die Zielgröße TLR besteht ein ähnlicher Trend ( $p = 0,064$ ).

Im Gesamtkollektiv besteht eine statistisch signifikante Relation des Parameters PI\_3D mit der Zielgröße MACE: **mit steigenden PI\_3D-Werten erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten von MACE.** Für die Zielgröße TLR besteht im Gesamtkollektiv ein ähnlicher Trend ( $p = 0,064$ ).

Zielgröße	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
binäre Restenose	Rapamycin	0,399	0,721	0,306	0,580	1,490
	Placebo	1,046	1,196	0,764	0,382	2,846
	Imatinib	1,926	1,581	1,485	0,223	6,865
TLR	Rapamycin	0,891	0,764	1,362	0,243	2,438
	Placebo	1,618	1,273	1,616	0,204	5,042
	Imatinib	0,273	1,159	0,055	0,814	1,313
MACE	Rapamycin	0,714	0,744	0,920	0,337	2,041
	Placebo	1,391	1,223	1,294	0,255	4,020
	Imatinib	1,662	1,427	1,357	0,244	5,270

**Tabelle 28.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, PI\_3D als unabhängiger Variable.

Der für das Gesamtkollektiv nachgewiesene statistische Zusammenhang zwischen dem PI\_3D und dem Risiko für das Eintreten des Ereignisses MACE kann in der Subgruppenanalyse nicht auf eine der einzelnen Therapiegruppen projiziert werden.



#### 5.2.4. Auswertung Zielgröße TLR adjustiert mit Parameter "Stenosenlänge"

In der später unter Punkt 5.3.3. folgenden Auswertung betreffend den Einfluß des Parameters "Stenosenlänge" auf die Zielgrößen kann ein gewisser, wenn auch statistisch nicht signifikanter Trend zwischen dem Ausmaß des Parameters "Stenosenlänge" und dem Risiko für das Eintreten des Ereignisses TLR nachgewiesen werden. Die obige Auswertung des Einflusses der Proliferationsindizes auf die Zielgrößen konnte ebenfalls einen statistisch nicht signifikanten Trend für die Entwicklung von TLR aufzeigen. Es soll daher an dieser Stelle eine erneute Analyse der Relation zwischen den Proliferationsindizes und der Zielgröße TLR unter Adjustierung mit dem Parameter "Stenosenlänge" erfolgen.

Auswertung TLR	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
PI_PRAE	1,126	0,549	4,204	<b>0,040</b>	3,083
"Stenosenlänge"	0,050	0,028	3,298	0,069	1,052
PI_POST	1,072	0,564	3,609	0,057	2,921
"Stenosenlänge"	0,054	0,029	3,616	0,057	1,056
PI_3D	1,060	0,568	3,477	0,062	2,887
"Stenosenlänge"	0,055	0,029	3,469	0,063	1,056

Tabelle 29. Log. Regression mit TLR als abhängiger Variable, Adjustierung mit dem Parameter "Stenosenlänge"

Adjustiert mit der Co-Variable "Stenosenlänge" zeigt sich ein statistisch signifikanter Einfluß des PI\_PRAE auf die Entwicklung eines TLR sowie ein entsprechender Trend für die Parameter PI\_POST und PI\_3D. Für dieses Modell gilt: **mit steigenden PI\_PRAE-Werten nimmt auch das Risiko für die Entwicklung eines Ereignisses TLR zu.**

#### 5.2.5. Auswertung Parameter "Late Lumen Loss"

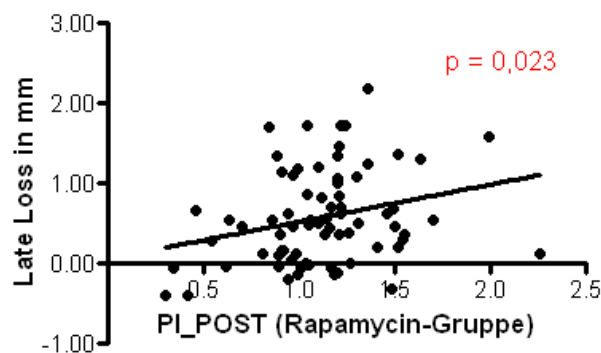
Die Zielgröße Late Lumen Loss beschreibt die Differenz aus minimalem Lumen-Diameter im Bereich der Stenose postinterventionell und minimalem Lumen-Diameter ebenfalls im Bereich der Stenose zum Zeitpunkt der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen; sie ist somit ein Maß für die Ausprägung der neointimalen Hyperplasie. In dieser Auswertung (vgl. Tabelle 30) soll der Zusammenhang

zwischen den Proliferationsindizes und dem Ausmaß des Late Lumen Loss als Äquivalent der neointimalen Hyperplasie analysiert werden.

Zielgröße "Late Lumen Loss"	Gruppe	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	p	95%-Konfidenzintervall	
					untere Grenze	obere Grenze
PI_PRAE	Gesamt	0,047	0,153	0,436	0,252	0,346
	Rapamycin	-0,058	0,216	0,789	-0,488	0,372
	Placebo	0,121	0,267	0,654	-0,421	0,662
	Imatinib	0,578	0,334	0,104	-0,135	1,291
PI_POST	Gesamt	0,306	0,128	0,566	0,055	0,558
	Rapamycin	0,462	0,198	<b>0,023</b>	0,067	0,858
	Placebo	0,276	0,215	0,207	-0,161	0,713
	Imatinib	0,080	0,295	0,789	-0,548	0,709
PI_3D	Gesamt	0,035	0,152	0,816	-0,263	0,334
	Rapamycin	-0,091	0,225	0,686	-0,540	0,358
	Placebo	0,322	0,278	0,255	-0,242	0,886
	Imatinib	0,151	0,278	0,596	-0,445	0,747

**Tabelle 30.** "Late Lumen Loss" als abhängige Variable, PI\_PRAE, PI\_POST und PI\_3D als unabhängige Variablen.

Es kann für die Subgruppe "Rapamycin" ein statistisch signifikanter Zusammenhang des PI\_POST mit dem Late Lumen Loss nachgewiesen werden: **je höher PI\_POST ist, desto höher wird auch der Late Lumen Loss ausfallen**, der adjustierter Anstieg des Late Lumen Loss je PI\_POST-Einheit beträgt  $0,462 \pm 0,198$  mm. Diese Relation wird in der folgenden Abbildung visualisiert:



**Abbildung 26.** Der Parameter "Late Lumen Loss" in Abhängigkeit des PI\_POST (Rapamycin-Gruppe). Die Regressionsgerade wird durch die Formel  $y = 0,061 + 0,462 \times x$  beschrieben,  $R^2 = 0,269$ ,  $p = 0,023$ .

### 5.3. Analyse des Einflusses weiterer Parameter

Auch für die Gruppe der Patienten mit In-Stent Restenosen soll eine Begutachtung des Einflusses weiterer Parameter auf die Entwicklung der Zielgrößen erfolgen. Jede Tabelle zeigt das Ergebnis der logistischen Regression für Gesamtkollektiv ("Gesamt") sowie Subgruppen ("Rapamycin", "Placebo" bzw. "Imatinib").

#### 5.3.1. Auswertung prä- und postinterventioneller minimaler Lumen-Diameter

Auswertung "prä-interventioneller MLD"	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
Zielgröße						
binäre Restenose	Gesamt	-0,943	0,525	3,229	0,072	0,389
	Rapamycin	-0,710	0,662	1,148	0,284	0,492
	Placebo	-1,304	1,101	1,403	0,236	0,272
	Imatinib	-1,670	1,548	1,164	0,281	0,188
TLR	Gesamt	-0,533	0,507	1,105	0,293	0,587
	Rapamycin	-0,177	0,648	0,075	0,784	0,837
	Placebo	-0,844	1,142	0,547	0,460	0,430
	Imatinib	-1,534	1,267	1,465	0,226	0,216
MACE	Gesamt	-0,413	0,480	0,741	0,389	0,661
	Rapamycin	-0,069	0,608	0,013	0,909	0,933
	Placebo	-0,820	1,110	0,546	0,460	0,440
	Imatinib	-1,299	1,187	1,198	0,274	0,273

Tabelle 31. Log. Regression mit bin. Restenose, TLR und MACE als abhängigen, dem präinterventionellen MLD als unabhängiger Variable.

Kein Nachweis eines statistisch signifikanten Zusammenhangs des präinterventionellen MLD mit den Zielgrößen.

Auswertung "post-interventioneller MLD"	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
Zielgröße						
binäre Restenose	Gesamt	-0,936	0,401	5,447	<b>0,020</b>	0,392
	Rapamycin	-0,602	0,502	1,440	0,230	0,547
	Placebo	-1,904	0,863	4,868	<b>0,027</b>	0,149
	Imatinib	-0,236	1,167	0,041	0,839	0,789
TLR	Gesamt	-0,190	0,380	0,251	0,617	0,827
	Rapamycin	0,034	0,495	0,005	0,945	1,035
	Placebo	-0,665	0,742	0,805	0,370	0,514
	Imatinib	0,159	1,045	0,023	0,879	1,172
MACE	Gesamt	-0,314	0,370	0,722	0,396	0,731
	Rapamycin	-0,019	0,476	0,002	0,968	0,981
	Placebo	-0,767	0,725	1,119	0,290	0,464
	Imatinib	-0,344	1,012	,116	0,734	0,709

Tabelle 32. Log. Regression mit bin. Restenose, TLR und MACE als abhängigen sowie dem postinterventionellen MLD als unabhängiger Variable.

Für das Auftreten einer binären Restenose, nicht aber TLR und MACE, besteht eine signifikante Korrelation mit dem postinterventionellen MLD, welche sich auch in der Subgruppe "Placebo" nachweisen lässt.

### 5.3.2. Auswertung prä- und postinterventioneller Referenzdurchmesser

Auswertung "prä-interventioneller RD"	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
Zielgröße						
binäre Restenose	Gesamt	-0,487	0,370	1,739	0,187	0,614
	Rapamycin	-0,680	0,509	1,789	0,181	0,507
	Placebo	-0,582	0,687	0,718	0,397	0,559
	Imatinib	0,694	1,084	0,410	0,522	2,001
TLR	Gesamt	0,147	0,372	0,156	0,693	1,158
	Rapamycin	0,054	0,518	0,011	0,917	1,055
	Placebo	0,063	0,680	0,009	0,926	1,065
	Imatinib	0,839	1,013	0,687	0,407	2,315
MACE	Gesamt	0,091	0,358	0,065	0,799	1,096
	Rapamycin	0,143	0,488	0,086	0,770	1,154
	Placebo	-0,119	0,665	0,032	0,859	0,888
	Imatinib	0,498	0,974	0,261	0,609	1,645

**Tabelle 33.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, dem präinterventionellen RD als unabhängiger Variable

Auswertung "post-interventioneller RD"	Gruppe	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
Zielgröße						
binäre Restenose	Gesamt	-0,373	0,391	0,911	0,340	0,689
	Rapamycin	-0,536	0,538	0,995	0,319	0,585
	Placebo	-0,487	0,731	0,443	0,505	0,615
	Imatinib	0,911	1,179	0,596	0,440	2,486
TLR	Gesamt	0,365	0,389	0,882	0,348	1,441
	Rapamycin	0,375	0,523	0,514	0,473	1,455
	Placebo	0,061	0,739	0,007	0,934	1,063
	Imatinib	1,355	1,113	1,484	0,223	3,878
MACE	Gesamt	0,319	0,375	0,721	0,396	1,375
	Rapamycin	0,488	0,498	0,961	0,327	1,629
	Placebo	-0,179	0,724	0,061	0,805	0,836
	Imatinib	1,020	1,050	0,944	0,331	2,774

**Tabelle 34.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen sowie dem postinterventionellen RD als unabhängiger Variable.

Kein Nachweis eines statistisch signifikanten Zusammenhangs der Parameter prä- und postinterventioneller RD mit den jeweiligen Zielgrößen sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Einzelgruppen.

### 5.3.3. Auswertung Parameter "Stenosenlänge" und "Stentlänge"

Auswertung "Stenosenlänge"	Gruppe	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
Zielgröße						
binäre Restenose	Gesamt	0,024	0,026	0,838	0,360	1,024
	Rapamycin	-0,006	0,038	0,026	0,872	0,994
	Placebo	0,059	0,057	1,085	0,298	1,061
	Imatinib	0,053	0,058	0,843	0,358	1,054
TLR	Gesamt	0,046	0,027	2,878	0,090	1,048
	Rapamycin	0,033	0,041	0,642	0,423	1,034
	Placebo	0,051	0,060	0,711	0,399	1,052
	Imatinib	0,067	0,054	1,503	0,220	1,069
MACE	Gesamt	0,036	0,026	1,815	0,178	1,036
	Rapamycin	0,025	0,039	0,401	0,527	1,025
	Placebo	0,039	0,059	0,432	0,511	1,039
	Imatinib	0,052	0,051	1,027	0,311	1,053

**Tabelle 35.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, dem Parameter "Stenosenlänge" als unabhängiger Variable

Es zeigt sich ein nicht-signifikanter Trend ( $p=0,090$ ) zwischen dem Parameter "Stenosenlänge" und dem Risiko für das Eintreten des Ereignisses TLR im Gesamtpatientenkollektiv.

Auswertung "Stentlänge"	Gruppe	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Wald	p	Exp( $\beta$ )
Zielgröße						
binäre Restenose	Gesamt	0,076	0,087	0,769	0,381	1,079
	Rapamycin	0,032	0,122	0,067	0,795	1,032
	Placebo	9,190	3466,220	0,000	0,998	9795,733
	Imatinib	--	--	--	--	--
TLR	Gesamt	0,114	0,090	1,608	0,205	1,121
	Rapamycin	0,113	0,135	0,692	0,405	1,119
	Placebo	9,190	3466,220	0,000	0,998	9795,733
	Imatinib	--	--	--	--	--
MACE	Gesamt	0,114	0,090	1,608	0,205	1,121
	Rapamycin	0,113	0,135	0,692	0,405	1,119
	Placebo	9,190	3466,220	0,000	0,998	9795,733
	Imatinib	--	--	--	--	--

**Tabelle 36.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, dem Parameter "Stentlänge" als unabhängiger Variable.

Es lässt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang des Parameters "Stentlänge" mit Zielgrößen nachweisen.

### 5.3.4. Auswertung Parameter "ACC/AHA-Klassifikation" und "Okklusion"

Auswertung "ACC/AHA-Klassifikation"	Gruppe	Wald	p
Zielgröße			
<b>binäre Restenose</b>	Gesamt	3,169	0,366
	Rapamycin	0,202	0,977
	Placebo	4,629	0,201
	Imatinib	0,343	0,842
<b>TLR</b>	Gesamt	2,468	0,481
	Rapamycin	1,209	0,751
	Placebo	2,894	0,408
	Imatinib	2,293	0,318
<b>MACE</b>	Gesamt	2,002	0,572
	Rapamycin	1,019	0,797
	Placebo	2,081	0,556
	Imatinib	1,023	0,6

Auswertung "Okklusion"	Gruppe	Wald	p
Zielgröße			
<b>binäre Restenose</b>	Gesamt	0,461	0,497
	Rapamycin	0	0,999
	Placebo	0	1
	Imatinib	0	1
<b>TLR</b>	Gesamt	0,153	0,696
	Rapamycin	0	0,999
	Placebo	0	1
	Imatinib	0	1
<b>MACE</b>	Gesamt	0,284	0,594
	Rapamycin	0	0,999
	Placebo	0	1
	Imatinib	0	1

**Tabelle 37 und 38.** Log. Regression mit bin. Restenose, TLR, MACE als abhängigen, der Einteilung der Läsion nach ACC/AHA-Klassifikation bzw. Okklusion als unabhängiger Variable.

Aus der Untergliederung der Koronarläsionen nach ACC/AHA-Klassifikation bzw. nach Art der Okklusion läßt sich kein Rückschluß auf die Entwicklung einer binären Restenose bzw. das Eintreten von TLR und MACE ableiten.

## 5.4. Auftreten klinischer Ereignisse in Abhängigkeit des $PI < 1,0$ oder $\geq 1,0$

Auch für Patienten mit In-Stent Restenosen soll eine Auswertung vorgenommen werden, in welcher die Proliferationsindizes nicht quantitativ, sondern qualitativ in Kategorien  $< 1,0$  oder  $\geq 1,0$  mit einbezogen werden. Die so ermittelten PI-Kategorien sollen in Bezug mit dem Auftreten klinischer Endpunkte (TLR und MACE) gesetzt werden, praktischerweise auch in Form einer Ereigniszeitanalyse nach Kaplan-Meier.

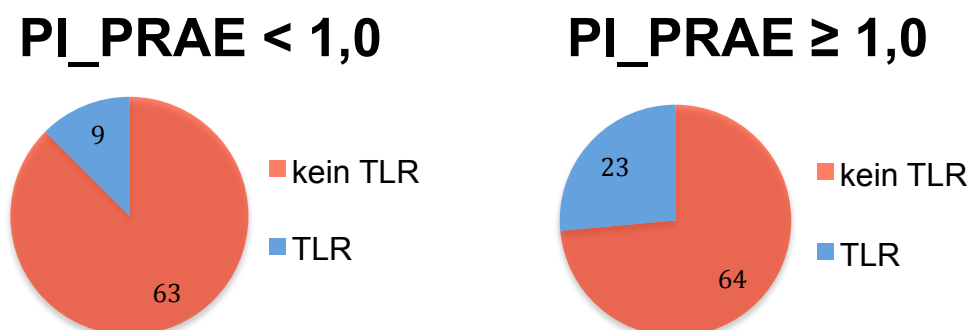
### 5.4.1. Auswertung hinsichtlich des Eintretens des Ereignisses TLR

Zunächst wurde eine Auswertung der Daten bezogen auf das Gesamtkollektiv vorgenommen:

PI-Klasse	Merkmal	PI < 1,0	PI $\geq$ 1,0	Total	Fisher's Exact Test
PI_PRAE	TLR=0	63	64	127	<b>p = 0,031</b>
	TLR=1	9	23	32	
	Total	72	87	159	
PI_POST	TLR=0	34	77	111	p = 0,503
	TLR=1	7	24	31	
	Total	41	101	142	
PI_3D	TLR=0	50	67	117	p = 0,393
	TLR=1	9	19	28	
	Total	59	86	145	

**Tabelle 39.** Für jede PI-Klasse wird eine Kontingenztafel beinhaltend die Merkmale PI-Kategorie (PI < 1,0 bzw.  $\geq$  1,0) sowie Nicht-Auftreten bzw. Auftreten des Ereignisses TLR (TLR = 0 bzw. 1) inkl. p-Wert gemäß Fisher's Exact-Test aufgezeigt.

Im Gesamtkollektiv zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des PI\_PRAE und dem Eintreten des Ereignisses TLR: bei Patienten, welche PI\_PRAE-Werte  $\geq 1,0$  aufweisen, trat TLR häufiger auf (p = 0,031).



**Abbildung 27 und 28.** Die Tortendiagramme zeigen jeweils für die Patienten mit einem PI\_PRAE < 1,0 oder  $\geq 1,0$  den Anteil derjenigen, bei denen es zum Eintritt des Ereignisses TLR kam; dies trifft für Patienten mit einem PI\_PRAE  $\geq 1,0$  (23 Patienten = 36,0%) signifikant häufiger zu als bei Patienten mit einem PI\_PRAE < 1,0 (9 Patienten = 14,3%).

Angesichts des obigen Ergebnisses der Analyse des Gesamtkollektivs wurde eine Auswertung bzgl. des Parameters PI\_PRAE vorgenommen, in welcher die Studien-Subgruppen jeweils separat begutachtet werden:

Gruppe	Merkmal	PI < 1,0	PI ≥ 1,0	Total	Fisher's Exact Test
Rapamycin	TLR = 0	41	36	77	p = 0,406
	TLR = 1	6	9	15	
	Total	47	45	92	
Placebo	TLR = 0	19	15	34	p = 0,281
	TLR = 1	3	7	10	
	Total	22	22	44	
Imatinib	TLR = 0	3	13	16	p = 0,526
	TLR = 1	0	7	7	
	Total	3	20	23	

**Tabelle 40.** Für jede Subgruppe wird eine Kontingenztafel beinhaltend die Merkmale PI\_PRAE-Kategorie (< 1,0 bzw. ≥ 1,0) sowie Nicht-Auftreten bzw. Auftreten des Ereignisses TLR (TLR = 0 bzw. 1) inkl. p-Wert gemäß Fisher's Exact-Test aufgezeigt.

Der im Gesamtkollektiv nachgewiesene signifikante Zusammenhang zwischen PI\_PRAE und dem Risiko für TLR lässt sich in keiner der Subgruppen nachweisen.

#### 5.4.2. Auswertung hinsichtlich des Eintretens des Ereignisses MACE

Analog zu 5.4.1. wird primär das Gesamtkollektiv begutachtet:

PI-Kategorie	Merkmal	PI < 1,0	PI ≥ 1,0	Total	Fisher's exact test
PI_PRAE	MACE=0	60	63	123	p = 0,128
	MACE=1	12	24	36	
	Total	72	87	159	
PI_POST	MACE=0	32	75	107	p = 0,675
	MACE=1	9	26	35	
	Total	41	101	142	
PI_3D	MACE=0	49	64	113	p = 0,308
	MACE=1	10	22	32	
	Total	59	86	145	

**Tabelle 41.** Für jede PI-Klasse wird eine Kontingenztafel beinhaltend die Merkmale PI-Kategorie (PI < 1,0 bzw. ≥ 1,0) sowie Nicht-Auftreten bzw. Auftreten des Ereignisses MACE (MACE = 0 bzw. 1) inkl. p-Wert gemäß Fisher's Exact-Test aufgezeigt.

Es kann keine statistisch signifikante Relation des Auftretens eines MACE mit den jeweiligen PI-Kategorien < 1,0 oder ≥ 1,0 nachgewiesen werden, konsequent wird auf eine separate Auswertung der Subgruppen verzichtet.



### 5.4.3. Ereigniszeitanalyse nach Kaplan-Meier

Aufgrund des in 5.4.1. ermittelten Ergebnisses wurde ergänzend eine Ereigniszeitanalyse nach Kaplan-Meier sowohl für das Ereignis TLR als auch das Ereignis MACE vorgenommen, zunächst bezogen auf das Gesamtkollektiv:

Zielgröße	PI-Kategorie	Log-rank (Mantel-Cox)		Gehan-Breslow-Wilcoxon		Überlebensrate		Hazard-Ratio	
		Chi square	p	Chi square	p	PI < 1,0	PI ≥ 1,0	Ratio	95%-Konfidenzintervall
TLR	PI_PRAE	4,788	<b>0,029</b>	4,790	<b>0,029</b>	87,5	73,6	0,461	0,2300 to 0,9224
	PI_POST	0,796	0,372	0,839	0,360	82,9	76,2	0,705	0,3266 to 1,520
	PI_3D	1,048	0,306	1,061	0,303	84,7	77,9	0,675	0,3186 to 1,432
MACE	PI_PRAE	2,511	0,113	2,305	0,129	83,3	72,4	0,589	0,3056 to 1,134
	PI_POST	0,212	0,645	0,195	0,659	78,0	74,3	0,843	0,4068 to 1,746
	PI_3D	1,538	0,215	1,583	0,208	83,1	74,4	0,641	0,3179 to 1,294

Tabelle 42. Ereigniszeitanalyse (Ereignis TLR oder MACE) in Abhängigkeit PI < oder ≥ 1,0 (Gesamtkollektiv).

Es kann gezeigt werden, daß bzgl. des Auftretens von TLR die Patientengruppe mit einem PI\_PRAE ≥ 1,0 eine signifikant schlechtere Prognose aufweist als die Gruppe mit einem PI\_PRAE < 1,0; nur 73,6% der Patienten mit einem PI\_PRAE ≥ 1,0 schließen die klinische Follow up-Beobachtungphase von 360 Tagen ohne Eintreten von TLR ab, bei den Patienten mit einem PI\_PRAE < 1,0 trifft dies für 87,5% zu.

Abbildung 29 visualisiert in einem Kaplan-Meier-Diagramm das häufigere Auftreten eines TLR-Ereignisses für Patienten mit einem PI\_PRAE ≥ 1,0:

Gesamtkollektiv: TLR in Abhängigkeit PI\_PRAE-Gruppe

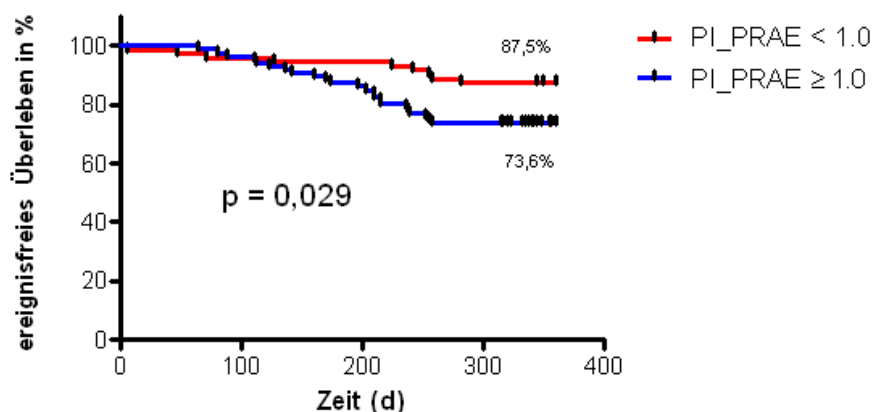


Abbildung 29. Kaplan-Meier-Kurven Ereignis TLR in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit bzw. des PI < oder ≥ 1,0. Es zeigt sich, daß Patienten mit einem PI\_PRAE-Wert ≥ 1,0 eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen als die übrigen Patienten.

Für PI\_POST und PI\_3D kann kein statistisch signifikanter Unterschied für das Eintreten des Ereignisses TLR nachgewiesen werden, bzgl. des Ereignisses MACE kann für keinen der Proliferationsindizes ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden; auffallend ist jedoch, daß in all diesen Analysen die Patienten mit Proliferationsindizes  $\geq 1,0$  weniger häufig den Studienendpunkt nach 360 Tagen erreichen als diejenigen mit Proliferationsindizes  $< 1,0$  (vgl. Tabelle 43).

Ergänzend wurde zudem eine Ereigniszeitanalyse durchgeführt, in welcher das Auftreten von TLR und MACE in den Subgruppen bewertet wurde:

Zielgröße	Log-rank (Mantel-Cox)		Logrank test for trend		Überlebensrate innerhalb Subgruppen		
	Chi square	p	Chi square	p	Rapamycin %	Placebo %	Imatinib %
TLR	3,006	0,223	2,940	0,086	83,7	77,3	69,6
MACE	3,591	0,166	3,429	0,064	81,5	75,0	65,2

**Tabelle 43.** Ereigniszeitanalyse (Ereignis TLR oder MACE) in Abhängigkeit der Einzelgruppenzugehörigkeit.

Innerhalb des Gesamtpatientenkollektivs zeigen Patienten der "Imatinib"-Gruppe eine Tendenz für das häufigere Auftreten eines TLR- oder MACE-Ereignisses auf, die beste Prognose kann jeweils für Patienten der "Rapamycin"-Gruppe nachgewiesen werden; diese Ergebnisse stellen jedoch nur einen statistisch nicht signifikanten Trend dar ( $p = 0,086$  bzw.  $p = 0,064$ ), korrelieren aber wiederum gut mit den Veröffentlichungen von Hausleiter et al. (reduzierte binäre Restenose- und TLR-Rate im Vergleich zur Placebogruppe) <sup>49</sup> bzw. Zohlhöfer et al. (keine Reduktion von binärer Restenose- bzw. TLR-Rate im Vergleich zur Placebogruppe) <sup>154</sup> .

## 6. Zusammenfassung der Ergebnisse

An dieser Stelle erfolgt eine Zusammenfassung der in puncto der Proliferationsindizes ermittelten relevanten Ergebnisse.

### 6.1. Patientenkollektiv mit de novo-Stenosen

Abbildung 30 zeigt für das Patientenkollektiv mit de novo-Stenosen die Ergebnisse der statistischen Auswertung des Zusammenhangs der ermittelten Proliferationsindizes (als Absolutwerte bzw. in Kategorien  $<$  oder  $\geq 1.0$ ) mit den Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss und TLR auf:

Parameter	Ergebnis der statistischen Analyse
PI_PRAE (Absolutwert)	kein signifikanter Zusammenhang mit den Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR
PI_POST (Absolutwert)	kein signifikanter Zusammenhang mit den Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR
PI_3D (Absolutwert)	kein signifikanter Zusammenhang mit den Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR
PI-Kategorien ( $<$ oder $\geq 1.0$ )	kein signifikanter Zusammenhang mit TLR und MACE für PI_PRAE, PI_POST und PI_3D

Abbildung 30. Zusammenfassung der Ergebnisse der Auswertung des Patientenkollektivs mit de novo-Stenosen.

### 6.2. Patientenkollektiv mit In-Stent Restenosen

Abbildung 31 zeigt für das Patientenkollektiv mit In-Stent Restenosen die Ergebnisse der statistischen Auswertung des Zusammenhangs der ermittelten Proliferationsindizes (als Absolutwerte bzw. in Kategorien  $<$  oder  $\geq 1.0$ ) mit den Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss, TLR und MACE auf:

Parameter	Ergebnis der statistischen Analyse
PI_PRAE (Absolutwert)	signifikant: im Gesamtkollektiv direkt proportional zum Risiko für das Auftreten einer binären Restenose wenn adjustiert mit dem Parameter "Stenosenlänge"
PI_POST (Absolutwert)	signifikant: in der Subgruppe "Rapamycin" direkt proportional zum Ausmaß des Late Lumen Loss
PI_3D (Absolutwert)	signifikant: im Gesamtkollektiv direkt proportional zum Risiko für das Auftreten eines MACE
PI-Kategorie ( $<$ od. $\geq 1,0$ )	signifikant: im Gesamtkollektiv vermehrtes Auftreten von TLR wenn PI_PRAE $\geq 1,0$

Abbildung 31. Zusammenfassung der Ergebnisse der Auswertung des Patientenkollektivs mit In-Stent Restenosen.



## 7. Diskussion

"Die Erkenntnisse in der Medizin unterliegen einem ständigen Wandel durch wissenschaftliche Forschung und klinische Erfahrungen." <sup>12</sup> Dieser oder ein ihm inhaltlich äquivalenter Leitsatz findet sich in nahezu jedem gängigen medizinischen Lehr- oder Fachbuch. Als Beispiel hierfür bietet sich die interventionelle Kardiologie an:

Basierend auf zahlreichen Vorarbeiten wurden durch die Arbeitsgruppen um Andreas Roland Grüntzig und Ulrich Sigwart die Techniken der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (1976) bzw. des koronaren Stentings (1986) initiiert und etabliert; bis zum heutigen Tage unterlagen diese - im Vergleich zur bis dahin gängigen offenen operativen Myokardrevaskularisation - minimalinvasiven Strategien der myokardialen Reperfusionstherapie einem ständigen Prozeß von zahlreichen Modifikationen und Optimierungen.

Ein fundamentales Problem stand von Anfang an im Blickpunkt von Wissenschaft und Forschung: die Entwicklung einer Restenose nach primär erfolgreicher Koronarintervention. Als potentiellen Lösungsansatz für die mit bis zu 60% bemessene Restenoserate nach alleiniger PTCA (siehe auch Punkt 1.4.2.) bewertete man zunächst die Methode des koronaren Stentings, hier wird nach PTCA auftretenden erneuten Lumenverlusten infolge "elastic recoil" und "negatives Remodeling" zunächst prinzipiell rein mechanisch entgegengewirkt. Daß es auch weiterhin zu einer im mittleren zweistelligen Prozentzahlenbereich gelegenen Rate an Restenosen, sogenannten In-Stent Restenosen kam, findet seine Ursache in der Ausbildung der neointimalen Hyperplasie als Ausdruck einer vaskuloproliferativen Erkrankung. Die Erforschung der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen der neointimalen Hyperplasie befand sich seither zunehmend im Fokus vieler Arbeitsgruppen und stellt, samt hieraus abgeleiteter diverser Therapieansätze, auch weiterhin ein sehr aktuelles und breites Forschungsgebiet dar.

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen betreffend die der neointimalen Hyperplasie zugrundeliegenden molekularbiologischen Pathomechanismen wurde für diese Arbeit die Hypothese postuliert, daß aus der vorausgegangenen stentinduzierten Gefäßverletzung eine vermehrte Freisetzung bzw. Aktivierung diverser zellulärer und non-zellulärer Mediatoren im involvierten Gewebe und Blut resultiert; diese führen über diverse, partiell redundante Signaltransduktionswege, welche sich potentiell auch patientenindividuell im Grad ihres Aktivierungszustandes zu unter-

scheiden vermögen, zu einer vermehrten Migration und Proliferation koronararterieller glatter Gefäßmuskelzellen und somit zur Bildung der neointimalen Hyperplasie.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist zum einen die in vitro-Quantifizierung dieser promotogenen Prozesse mittels entnommener Serumproben und eines geeigneten Testverfahrens, zum anderen die Klärung der Frage, ob sich aus den in Korrelation mit weiteren klinischen Fakten und Befunden gewonnenen Erkenntnissen weitere für den klinischen Alltag relevante Aussagen hinsichtlich Diagnostik und Therapie implizieren und etablieren lassen.

### **Patientenkollektiv mit de novo-Läsionen**

Der erste Teil der Quantifizierung der Serumkapazität in vitro befasst sich mit Patienten, welchen im Rahmen der Intervention von ausschließlich de novo-Koronarläsionen ein Stent implantiert wurde. Hier zeigt sich, daß die Ausbildung einer binären bzw. relevanten angiographischen Restenose (d.h. mit  $\geq 50\%$  Lumeneinengung bemessen) in 30% der Fälle als primärer Endpunkt zum Zeitpunkt der Kontroll-Koronarangiographie nach 180 Tagen nachweisbar war, weitere Endpunkte (TLR und MACE) traten in 21% bzw. 25% der Fälle ein. Im Hinblick auf der in diesem Kollektiv vorliegenden "small vessel disease" mit einem mittleren Referenzdurchmesser von 2,68mm entsprechen diese Ergebnisse prinzipiell denjenigen anderer Publikationen wie z.B. von Kastrati et al. (Referenzdurchmesser  $< 2,80\text{mm}$ , binäre Restenose in 36%, TLR in 20%, MACE in 23% der Fälle) <sup>60</sup> bzw. einer Metaanalyse von Al Suwaidi et al. (Referenzdurchmesser  $< 3,00\text{mm}$ , binäre Restenoseraten von 16-38%, für TLR und MACE finden sich Zahlen von 8-39% bzw. 6-28%) <sup>1</sup>.

In der Analyse der Risikofaktoren, welche einen relevanten Einfluß auf die Entwicklung einer binären Restenose bzw. von TLR-/MACE-Ereignissen und des Late Lumen Loss ausüben, war keine entsprechende Beteiligung der ermittelten Proliferationsindizes nachweisbar; zwar wiesen Patienten, welche zum Zeitpunkt der Kontroll-Koronarangiographie eine binäre Restenose ausgebildet hatten, im Mittel höhere Werte für PI\_PRAE, PI\_POST oder auch PI\_3D auf (vgl. Abbildung 15), jedoch basierte keine dieser Tendenzen auf dem Boden einer statistischen Signifikanz; es ist in diesem Fall somit nicht möglich, aus einem biologischen Vorgang in vitro (Zellproliferation nach Exposition gegenüber einem potentiellen Stimulans) relevante Aus-

sagen über eine klinische Entwicklung bzw. angiographische Messgrößen abzuleiten.

Als statistisch signifikante Prädiktoren für die Zielgrößen binäre Restenose, Late Lumen Loss oder TLR zeigen sich in dieser Arbeit vornehmlich angiographische Merkmale wie z.B. prä- und postinterventioneller minimaler Lumen-Diameter, prä- und postinterventioneller Referenzdurchmesser, die Länge des gestenteten Gefäßabschnittes oder die Zugehörigkeit einer Läsion zu den ACC/AHA-Klassen B2 und C; diese Ergebnisse korrelieren somit gut mit der unter 1.5. aufgeführten Datenlage in der gängigen Literatur.

Zusammenfassend läßt sich für die Auswertung der im Rahmen der Intervention von de novo-Koronarläsionen gewonnenen Daten postulieren, daß hierin im Wesentlichen die für die Entwicklung einer Restenose bekannten Risikofaktoren, soweit im Rohdatensatz erfasst, reproduziert und bestätigt werden können. Eine statistisch signifikante Relation der in dieser Arbeit eingeführten Proliferationsindizes als Ausdruck einer veränderten Serumkapazität nach einer Koronarintervention läßt sich jedoch nicht verifizieren, dementsprechend kann aus diesem Teil der Dissertation auch keine weitere Aussage bzgl. der Wertigkeit der Proliferationsindizes für Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit de novo-Koronarläsionen und der Entwicklung einer In-Stent Restenose abgeleitet werden.

### **Patientenkollektiv mit In-Stent Restenosen**

Das zweite Patientenkollektiv, welches im Hinblick auf den Parameter Serumkapazität untersucht wurde, umfasst ausschließlich Patienten mit Läsionen, für die als sogenannte "culprit lesion" eine In-Stent Restenose nachgewiesen wurde. Als problematisch an der Therapie einer In-Stent Restenose erweist sich die hohe Rate an erneuter Restenosierung bzw. des Auftretens klinisch relevanter Ereignisse trotz weiterentwickelter Interventionsverfahren; so wird z.B. die binäre Restenoserate nach Dilatation einer In-Stent Restenose mit einem Sirolimus-beschichteten Stent mit 14% beziffert <sup>59</sup>, ähnliche Studienansätze in de novo-Koronarläsionen zeigten für Sirolimus-beschichtete Stents wesentlich geringere Restenoserraten <sup>93, 70</sup>, diese Analogie lässt sich auch für klinische Ereignisse (TLR, MACE) oder den Late Lumen Loss fortsetzen.

Rekrutiert wurden die in dieser Dissertation registrierten Patienten im Rahmen weiterer Studien, es sei an dieser Stelle auf die entsprechenden Veröffentlichungen verwiesen <sup>49, 154</sup> ; beide Publikationen basieren auf demselben theoretischen Ansatz wie die vorliegende Dissertation: nach ballon- oder stentinduzierter Gefäßverletzung werden koronararterielle glatte Gefäßmuskelzellen über eine Vielzahl partiell redundanter Signaltransduktionswege zur Migration und Proliferation stimuliert, es resultiert die Ausbildung der neointimalen Hyperplasie; aufgrund des systemischen Charakters der zugrundeliegenden vaskuloproliferativen Erkrankung erfolgt im Gegensatz zu einem lokal beschränkten Behandlungsverfahren (wie z.B. der lokalen Freisetzung einer antiproliferativ wirkenden Substanz über das "delivery system" Stent) ein systemischer Therapieansatz. Wie Hausleiter et al. demonstrierten, läßt sich durch die systemische Gabe eines Antiproliferativums ein biologischer Prozess wie die Neointima-Ausbildung insofern beeinflussen, als daß es zur Verbesserung angiographischer Parameter (z.B. Late Lumen Loss oder binäre Restenoserate) oder einem verminderten Auftreten klinischer Endpunkte (wie z.B. TLR) kommt <sup>49</sup> .

Betreffend die Endpunkte binäre Restenose zum Zeitpunkt der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen sowie das Auftreten klinisch relevanter Ereignisse (TLR, MACE) in der klinischen Follow up-Beobachtung über 360 Tage nach Primärintervention ergaben sich keine wesentlichen Differenzen zwischen den in dieser Dissertation eingeschlossenen Patienten (welche Teilgruppen der in den oben genannten Publikationen registrierten Personen darstellen) und dem Gesamtkollektiv der jeweils originären Studie. Untergliedert in die jeweilige Therapieform findet sich in dieser Arbeit eine binäre Restenoserate von 25% unter Rapamycin, 33% unter Placebo und 41% unter Imatinib (analog hierzu TLR 16%, 23% bzw. 30% und MACE 19%, 25% bzw. 35%), demgegenüber stehen die von Hausleiter et al. angegebenen 30% für die binäre Restenose im Rapamycin- (TLR 20%, MACE 24%) und 42% im mit Placebo behandelten Kollektiv (hier TLR 26%, MACE 28%), für die Imatinib-Gruppe nennen Zohlhöfer et al. 39% für die binäre Restenose sowie 28 bzw. 29% für TLR- und MACE-Ereignisse. Angesichts dieser Zahlen kann somit davon ausgegangen werden, daß in dieser Dissertation jeweils ein repräsentativer Ausschnitt des jeweiligen ursprünglichen Patientenkollektiv integriert wurde.



Im Gegensatz zur Auswertung der de novo-Koronarläsionen, in der mehrere, ausschließlich angiographische/prozedurale Parameter als prädiktiv für die Entwicklung einer binären Restenose, des Late Lumen Loss oder von TLR-/MACE-Ereignissen gesichert werden konnten, zeigen sich für die In-Stent Restenosen entsprechende Korrelationen in wesentlich vermindertem Umfang und hier nur den postinterventionellen minimalen Lumen-Diameter als Prädiktor für das Risiko des Eintretens einer binären Restenose. Eine Analyse der für binäre Restenose, Late Lumen Loss sowie TLR/MACE-Ereignissen relevanten Risikofaktoren im Speziellen ist in den Arbeiten von Hausleiter et al. und Zohlhöfer et al. nicht gesondert aufgeführt und steht somit zum Vergleich mit den in dieser Dissertation erhobenen Werten nicht zur Verfügung. Anders als bei de novo-Läsionen findet sich in der gängigen Literatur ein eher diffuses Bild bzgl. relevanter Risikofaktoren für die Entwicklung einer relevanten Restenose bzw. eines klinischen Ereignisses nach primär erfolgreicher Intervention einer In-Stent Restenose (vgl. Punkt 1.5.), darüber hinaus lassen sich diese Daten nicht direkt mit denen dieser Arbeit korrelieren, in der ein Teil der Patienten systemisch mit einem antiproliferativ wirksamen Medikament behandelt wurde. Es sei daher an dieser Stelle auf eine von Radke et al. durchgeführte Metaanalyse (beinhaltend 28 Studien mit 6 verschiedenen Therapiemodalitäten) verwiesen, hier stellte sich in der multivariaten Auswertung unter Einbeziehung mehrerer in den jeweiligen Einzelstudien benannter Risikofaktoren lediglich der postinterventionelle Stenosegrad einer Läsion als prädiktiv für die Entwicklung eines klinischen Ereignisses (MACE) dar <sup>111</sup>, dies korreliert gut mit dem in dieser Arbeit als signifikant befundenen Einfluß des postinterventionellen minimalen Lumen-Diameter (per definitionem leitet sich der von Radke et al. angeführte postinterventionelle Stenosegrad aus dem Quotienten von jeweils postinterventionellem minimalem Lumendiameter und Referenzdurchmesser ab).

Zusammenfassend kann für die im Anschluß folgende Begutachtung der im Rahmen dieser Dissertation bestimmten Proliferationsindizes samt hieraus abgeleiteter Aussagen postuliert werden, daß sich diese Schlußfolgerungen auf ein repräsentatives Patientenkollektiv stützen und sich somit für Verallgemeinerungen zulässig sind.

Die wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, daß zwischen den in vitro ermittelten Proliferationsindizes und nach Intervention einer Restenose ermittelten angiographischen bzw. klinischen Zielgrößen ein statistisch signifikanter Zusammenhang belegt werden konnte; das Ausmaß eines prinzipiell lokal beschränkten aber teils über systemisch verfügbare Mediatoren gesteuerten (molekular-)biologischen Prozesses (hier die Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie) konnte somit in vitro quantifiziert werden. Das angewandte Verfahren der logistischen Regression beweist, daß bezogen auf das Gesamtpatientenkollektiv mit steigenden PI\_3D-Werten auch das Risiko für das Eintreten eines MACE im Zeitraum von 360 Tagen nach Primärintervention zunimmt, genauso besteht, in einem mit dem Parameter "Stenoselänge" adjustierten statistischem Model, eine eindeutige, direkt proportionale Relation des PI\_PRAE mit dem klinischen Endpunkt TLR (vgl. Tabelle 29); für die Zielgröße binäre Restenose scheint kein direkter relevanter Einfluß der Proliferationsindizes zu bestehen, jedoch kann, in der Subgruppe der mit Rapamycin behandelten Patienten, eine signifikante Zunahme des Late Lumen Loss proportional zum Ausmaß des PI\_POST verifiziert werden. Neben diesen linearen Zusammenhängen zeigt die Auswertung zudem auf, daß sich, ebenfalls bezogen auf das Gesamtkollektiv, aus einer Einteilung der Proliferationsindizes in Kategorien  $< 1,0$  und  $\geq 1,0$  weitere statistisch validierte Aussagen ableiten lassen: Patienten mit einem  $\geq 1,0$  bemessenem PI\_PRAE, d.h. deren präinterventionell abgenommene Serumprobe in vitro mehr Proliferation in Kulturen glatter Gefäßmuskelzellen induzieren konnte wie die zur Positivkontrolle eingesetzten FCS-Probe, entwickeln vermehrt ein klinisch relevantes Ereignis TLR (vgl. Tabelle 42), dies spiegelt sich auch in der Ereigniszeitanalyse wieder (Differenz von 14% hinsichtlich des Erreichens des Studienendpunktes TLR innerhalb der 360 Tage der klinischen Follow up-Beobachtung). Auffallend ist zudem daß Patienten, welche eine binäre Restenose oder ein adverses klinisches Ereignis wie TLR oder MACE entwickeln, generell höhere Proliferationsindizes (sowohl PI\_PRAE, PI\_POST und PI\_3D) aufweisen als diejenigen ohne das Auftreten des entsprechenden Ereignisses, dieser deutliche Trend spiegelt sich auch im wiederholt nur geringfügigen Überschreitens des Signifikanzniveaus von 0,050 wieder (vgl. Abbildungen 17-25).

Welche weiteren Schlußfolgerungen lassen sich aus diesen Daten sowohl für das Konzept der Serumkapazität als auch für die klinische Praxis ableiten?

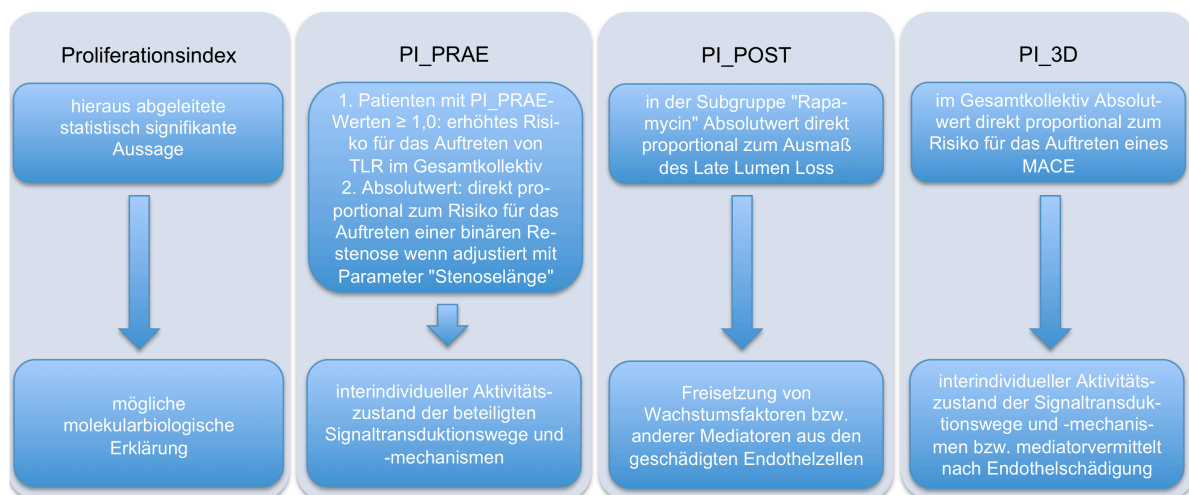
Wie bereits in den Grundlagen dargelegt werden sämtliche Prozesse, die in ihrer Summe in der Migration und Proliferation von koronararteriellen glatten Gefäßmuskelzellen und der Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie münden, über ein komplexes System von partiell redundanten Signaltransduktionswegen vermittelt; dabei kommt es nicht nur zur lokalen Signalübertragung z.B. zwischen Gewebezellen wie - im Falle der neointimalen Hyperplasie - glatten Gefäßmuskelzellen, Endothel und auch Fibroblasten, auch systemisch agierende Zelllinien wie Thrombo-, Leuko- und Lymphozyten nehmen an diesen Vorgängen teil, es werden diverse Wachstumsfaktoren, Zytokine und auch andere Substanzen wie z.B. NO nicht nur ins Gewebe, sondern auch ins Blut freigesetzt. Das Konzept dieser letzten Endes systemisch verfügbaren migrations- und proliferationsauslösenden Stimuli wurde in der Problemstellung dieser Dissertation als Serumkapazität tituliert. Hausleiter et al. gelang es, den biologischen Prozeß der Neointima-Ausbildung mittels eines systemisch verabreichten Antiproliferativums in vivo so zu beeinflussen, daß es zu einer nachweisbaren Verminderung von binärer Restenoserate bzw. klinisch relevanter Ereignisse und insofern der neointimalen Hyperplasie kam <sup>49</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt daß es zudem möglich ist, dieselben biologischen Vorgänge, welche in das Konzept der Serumkapazität mit einfließen und so zur Ausbildung der neointimalen Hyperplasie beitragen, in einem entsprechenden Testverfahren in vitro abzubilden und in einem Maß zu quantifizieren, welches dann zuverlässige Rückschlüsse auf das Ausmaß bzw. die Qualität sowohl angiographischer bzw. klinischer Parameter zuläßt. Das Konzept der Serumkapazität kann, aufgrund des Nachweises des statistisch signifikanten Zusammenhangs der in vitro bemessenen Proliferationsindizes (als Äquivalent für die freigesetzten und in der Folge im Patientenserum befindlichen Mediatoren) mit klinischen und angiographischen Befunden (als Ausdruck der vaskuloproliferativen Wirkung der promitogenen Stimulantien in vivo) als valide bestätigt werden; es ist somit möglich, einen vaskuloproliferativen Prozess in seiner Summe messbar zu machen. Koronararterielle glatte Gefäßmuskelzellen werden durch diverse, auf molekularbiologischer und zellulärer Ebene ablaufende Prozesse, zur Migration und Proliferation stimuliert; die Serumkapazität und die damit assoziierten Proliferationsindizes bilden einen Teil dieser biologischen Reaktion messbar

ab. Entscheidend für die Bedeutung dieser Arbeit ist dabei auch, daß nicht nur das Ausmaß angiographischer Größen vorhergesagt werden kann (sprich es wird ein Wert wie der Late Lumen Loss in Millimeter angegeben bzw. der Grad der erneuten Stenosierung in Prozent), ganz im Gegenteil werden auch Aussagen über klinische Ereignisse wie TLR und MACE möglich, also Parameter, deren Relevanz sich per se nicht alleine aus rein messtechnischen Verfahren ableiten läßt sondern patientenindividuellen Variationen unterliegen. Aus dem Konzept der Serumkapazität, vertreten durch die Proliferationsindizes, lassen sich somit nicht nur quantitative Aussagen über den biologischen Prozess der neointimalen Hyperplasie ableiten, auch eine qualitative Beschreibung der aus ihr resultierenden Folgen sind möglich.

Besonders bedeutsam für die Entwicklung klinisch relevanter Ereignisse scheinen die Proliferationsindizes PI\_PRAE und PI\_3D zu sein, also Werte, die nicht im unmittelbaren zeitlichen Zusammenhang mit der eigentlichen Koronarintervention stehen. Für PI\_PRAE kann zur Diskussion gestellt werden, daß dieser Wert unter Umständen Ausdruck einer vorbestehend erhöhten Serumkapazität mancher Patienten ist, nicht als Ausdruck einer unmittelbaren Reaktion auf einen entsprechenden Stimulus wie eine Koronarintervention, sondern im Sinne eines grundsätzlich erhöhten "Aktivierungszustandes" der beteiligten Systeme z.B. analog einem erhöhten Sympathiko- oder Vagotonus; inwiefern dieser "Aktivierungszustand" Folge weiterer Einflüsse wie z.B. Begleiterkrankungen oder einer medikamentösen Therapie ist, läßt sich anhand der in dieser Arbeit akquirierten Daten nicht weiter klären. Für die Bedeutung von PI\_3D kann möglicherweise derselbe Erklärungsansatz dienen, jedoch muss in diesem Falle dann zu Bedenken gegeben werden, daß sich - auf molekularbiologischer Ebene - entsprechende Prozesse nicht nur im unmittelbaren zeitlichen Umfeld einer PCI-induzierten Gefäßverletzung manifestieren, sondern auch über Tage und Wochen nachweisbar sein können (vgl. Punkt 1.3.2.3.). Als Einschränkung muß jedoch erwähnt werden, daß die in diesen Studien genannten Ergebnisse ausschließlich anhand immunhistochemischer in vitro-Untersuchungen z.B. eines Zelllysates von Ratten-Karotiden<sup>146</sup> bzw. in toto resezierten Kaninchen-Karotiden<sup>4</sup> akquiriert wurden und nicht gleichbedeutend dem Nachweis bzw. Quantifizierung solcher Mediatoren in humanem Serum nach erfolgter ballon- bzw. stentinduzierter Gefäßverletzung sind; dennoch sollte, z.B. aufgrund der an der Entwicklung

der neointimalen Hyperplasie beteiligten und systemisch agierenden Thrombozyten bzw. Entzündungszellen, ein solcher theoretischer Ansatz nicht verworfen werden.

Betreffs des Nachweises eines statistisch signifikanten Zusammenhangs der biologischen Größe PI\_POST (als Ausdruck in vitro bemessener Zellproliferation) mit ausschließlich der anhand morphologischer Kriterien abgeleiteten Zielgröße Late Lumen Loss in der "Rapamycin"-Subgruppe muss gemutmaßt werden, daß hier unter Umständen eine iatrogene bzw. interventionsassoziierte Verzerrung der gesamten Auswertung hinsichtlich des Parameters PI\_POST vorliegt. Im Rahmen des Vorbringens der verschiedenen Kathetersysteme zunächst von distal her über die Aorta descendens bzw. ascendens und des Platzierens der Interventionssysteme im entsprechenden Koronargefäß kommt es nicht nur zur Endothelverletzung im Bereich der diagnostizierten Stenose, sondern auch zu zahlreichen weiteren Mikroläsionen, die wiederum eine potentielle Quelle sich auf PI\_POST auswirkender promotogener Botenstoffe darstellen könnten; daß sich dennoch ein plausibel wirkender Zusammenhang des PI\_POST mit dem Late Lumen Loss darstellen läßt legt die Vermutung nahe, daß infolge der nachgewiesenen antiproliferativen Wirkung einer systemischen Rapamycin-Applikation <sup>49</sup> ein Teil der oben beschriebenen, das Ergebnis verzerrend wirkenden Faktoren minimiert bzw. egalisiert wird.



**Abbildung 32.** Es werden für jeden Proliferationsindex die entscheidenden signifikanten Zusammenhänge in puncto der Zielgrößen sowie der jeweilige potentielle molekularbiologische Erklärungsansatz aufgeführt.

Die Tatsache, daß sich ein signifikanter Zusammenhang der Serumkapazität mit den mehreren Zielgrößen ausschließlich für die Auswertung von In-Stent Restenosen,

nicht aber de novo-Koronarläsionen verifizieren läßt, gibt Anlaß zur Vermutung, daß es sich bei der Serumkapazität nicht nur um eine in vitro bemessene unspezifische Quantifizierung der Summe sich proliferationsfördernd auswirkender Stoffwechselprozesse handelt, sondern zudem als eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung einer erneuten Restenose nach Intervention einer In Stent-Restenose bewertet werden kann. Die erneute Intervention im Bereich einer In-Stent Restenose ist, im Vergleich zur de novo-Läsion, mit wesentlich schlechteren Erfolgsaussichten behaftet, und das obwohl per se optimale therapeutische Verfahren inklusive Anti-proliferativa eingesetzt werden, welche für den Bereich der de novo-Läsionen das Restenoserisiko auf Werte  $< 10\%$  zu senken vermögen<sup>93</sup>. Postuliert man, daß eine erhöhte Serumkapazität als Substrat für erneute kardiovaskuläre Ereignisse speziell in einer, im Vergleich zur Gesamtzahl der Patienten mit interventionspflichtiger KHK in ihrer Zahl zunächst als klein zu bemessenden Patientengruppe vorliegt, welche bislang nicht prospektiv als solche zu erkennen war, aber dann durch die Ausbildung einer rekurrenten In-Stent Restenose weiter aus dem Gesamtkollektiv selektiert wurde, so erscheint es als logisch, daß der Parameter Serumkapazität bezogen auf alle Patienten mit interventionspflichtiger KHK in seiner Bedeutsamkeit womöglich verzerrt bzw. verschleiert wurde; nach entsprechender Selektion des Patientenkollektivs und somit Ausbildung einer Hochrisikogruppe für eine rekurrente In-Stent Restenose kommt es zur Demaskierung und Manifestation des Parameters Serumkapazität als einen entscheidenden und in seinem Ausmaß in vitro quantifizierbaren Risikofaktors.

### **Potentielle Applikation von Proliferationsindizes im klinischen Alltag**

Auch wenn diese Dissertation noch kein endgültiges und bis ins letzte Detail ausgereiftes Konzept des Parameters Serumkapazität zu produzieren vermag, so lassen sich aus den gewonnenen Ergebnissen durchaus Erkenntnisse für die medizinische Praxis vor allem in Bezug auf die Therapie von In-Stent Restenosen ableiten:

Das Konzept des (BrdU-)ELISA stellt ein etabliertes und - z.B. infolge der bundesweiten Abdeckung durch medizinisch-diagnostische Dienstleistungsunternehmen - jederzeit zugängliches zuverlässiges diagnostisches Verfahren dar, welches die Bestimmung der Proliferationsindizes im Alltag ermöglichen kann. Der Aufwand zur Ermittlung eines Proliferationsindex (venöse Blutabnahme, Messung Zellproliferation mittels BrdU-ELISA) gestaltet sich als im Wesentlichen unproblematisch und nicht

belastend bzw. risikobehaftet für den Patienten; bezogen auf die Proliferationsindizes PI\_PRAE bzw. PI\_3D konnte nachgewiesen werden, daß sich aus diesen Werten zuverlässige Aussagen darüber ableiten lassen, ob der Patient einem Risikokollektiv für die Entwicklung eines schwerwiegenden klinischen Ereignisses nach Intervention einer In-Stent Restenose angehört oder nicht, die Risikostratifizierung wird somit um einen wesentlichen Parameter ergänzt.

Anhand als erhöht bemessener PI\_PRAE- oder PI\_3D-Werte (es bietet sich die erfolgte Einteilung in Kategorien  $< 1,0$  oder  $\geq 1,0$  an), welche mit dem erhöhten Risiko für das Eintreten relevanter klinischer Ereignisse assoziiert sind, ließe sich beispielsweise die Indikation für eine besonders strenge Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren ableiten; in Anbetracht des PI\_PRAE könnte bereits präinterventionell über die Notwendigkeit des Einsatzes eines "Drug-eluting"-Stent oder einer periinterventionellen systemischen Behandlung mit einem Antiproliferativum in Analogie zur Studie von Hausleiter et al <sup>49</sup> . entschieden bzw. die Entscheidungsfindung erleichtert werden. Oftmals stellt sich im klinischen Alltag die Frage nach der Empfehlung zur Kontroll-Koronarangiographie bzw. deren Zeitpunkt (z.B. wenn es durch den erneuten Einsatz eines jodhaltigen Röntgenkontrastmittels zur Verschlechterung einer eingeschränkten Nierenfunktion kommen könnte) oder auch die Dauer der nach Stentimplantation zu verabreichenden dualen Thrombozytenaggregationshemmung (speziell dann, wenn hierdurch ein anstehender operativer Eingriff verzögert werden würde); in Anbetracht ermittelter Proliferationsindizes könnte dann, je nach Ausmaß des entsprechenden Wertes, die Entscheidungsfindung pro oder contra einer erneuten Koronarangiographie bzw. Intervention einer Läsion mittels unbeschichtetem oder medikamentenfreisetzendem Stent unterstützt werden. Am Beispiel der in der Subgruppe der mit Rapamycin behandelten Patienten diagnostizierten Relation zwischen PI\_POST und Late Lumen Loss zeigt sich zudem eine Möglichkeit, die Wirksamkeit einer antiproliferativen Substanz zu testen bzw. den Behandlungserfolg einer Therapie mit einem solchen Antiproliferativum zu kontrollieren: bezogen auf das oben genannte Kollektiv bedürfen beispielsweise Patienten mit niedrigen PI\_POST-Werten und hierdurch erwartungsgemäß geringfügigem Late Lumen Loss keinerlei Änderung des Therapieregimens, dagegen erscheint es für diejenigen mit hohen PI\_POST-Werten als sinnvoll, die Umstellung auf bzw. die Ergänzung um ein anderes Therapieverfahren zu diskutieren.

Diese Beispiele zeigen, daß sich für das Konzept "Serumkapazität" bzw. für eine Verwendung der hier etablierten Proliferationsindizes vielfältige denkbare Ansatzpunkte im klinischen Alltag der interventionellen Kardiologie bieten, und dies bei relativ geringem und vor allem für den Patienten risikoarmen Aufwand; es kann somit abschließend festgestellt werden, daß aus dem Konzept der Proliferationsindizes heraus ein sinnvoller und brauchbarer Biomarker etabliert werden kann.

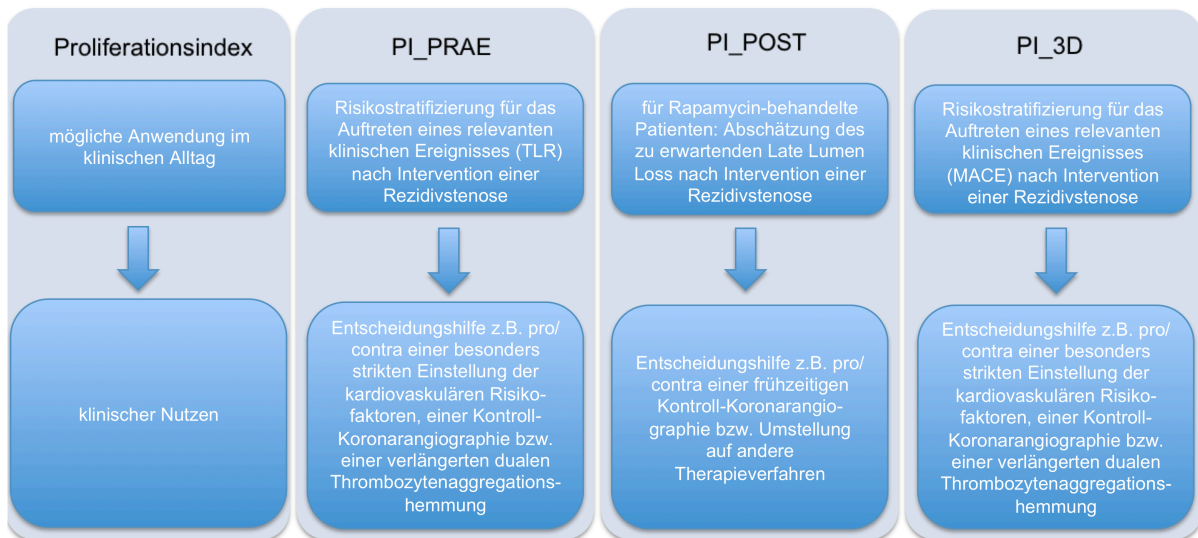


Abbildung 33. Potentielle Anwendungsgebiete des Proliferationsindex.

Es könnten zudem auch andere, nicht nur auf das Problem der In-Stent Restenose bezogene Denkansätze abgeleitet werden. So konnten weitere Studien zum einen die Beteiligung glatter Gefäßmuskelzellen bzw. die Bedeutung der neointimalen Hyperplasie im Prozeß der Transplantatvaskulopathie an Tier<sup>104</sup> und Mensch<sup>6</sup> belegen, zum anderen aber auch eine Rapamycin-assoziierte Abschwächung bzw. Verlangsamung der Transplantatvaskulopathie nach Herz-<sup>79</sup> oder Nierentransplantation<sup>140</sup> aufzeigen; es soll daher an dieser Stelle die Diskussion darüber angeregt werden, ob sich die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ggf. auch auf weitere Entitäten der vaskuloproliferativen Erkrankungen übertragen lassen.

## Schlußfolgerungen

In Bezug auf die in der Problemstellung genannten Fragen können aus dieser Arbeit folgende Erkenntnisse abgeleitet werden:

Im Rahmen dieser Dissertation ist es erstmals gelungen, einen in vivo ablaufenden vaskuloproliferativen Prozeß anhand eines geeigneten Testverfahrens in vitro abzu-



bilden. Für Patienten mit erfolgter Intervention einer In-Stent Restenose ermöglichen die anlässlich dieser Arbeit eingeführten Proliferationsindizes prospektive Aussagen sowohl über angiographische als auch klinische Entwicklungen, betreffend das Kollektiv der Patienten mit de novo-Stenosen konnten keine entsprechenden Zusammenhänge verifiziert werden. Als relevant für den klinischen Alltag erscheint, daß hinsichtlich der Therapie von In-Stent Restenosen z.B. durch die Marker PI\_PRAE und PI\_3D eine zusätzliche Risikostratifizierung für das Eintreten schwerwiegender klinischer Ereignisse erfolgen kann, zudem ermöglicht z.B. der Marker PI\_POST auch Vorhersagen über den zu erwartenden Erfolg einer speziellen Therapieform. Da sich die Proliferationsindizes in verhältnismäßig unkomplizierter und vor allem für den Patienten risikoarmer Art und Weise ermitteln lassen kann somit postuliert werden, daß im Rahmen dieser Arbeit ein für den klinischen Alltag sinnvoller Biomarker etabliert werden konnte. Es muss betont werden, daß dieses neu etablierte Konzept der Serumkapazität bzw. Proliferationsindizes sein Anwendungsgebiet ausschließlich in der Evaluation des Risikos der Entwicklung einer In-Stent Restenose oder anderweitiger klinischer Ereignisse nach koronarem Stenting findet; die vorgestellte Methode vermag es nicht, den definitiven Nachweis oder Ausschluß einer relevanten Koronarstenose zu generieren, wie es z.B. im Rahmen einer Koronarangiographie möglich ist. Es erscheint in Anbetracht der zugrundeliegenden molekularbiologischen Prozesse als plausibel, daß die Bestimmung von Proliferationsindizes prinzipiell Aussagen über den Verlauf anderer auf der Ausbildung einer Neointima basierender Vaskulopathien ermöglichen könnte; konkrete Aussagen z.B. über den Eintritt einer Transplantatvaskulopathie lassen sich aus den gewonnenen Daten jedoch nicht treffen.

### **Limitationen und Zukunftsperspektiven**

Sicherlich unterliegt diese Arbeit einer Limitierung dadurch, daß sich die ermittelten relevanten Ergebnisse nur auf die Patientengruppe mit In-Stent Restenosen projizieren lassen und für diese anhand eines relativ kleinen Kollektivs von nur 159 eingeschlossenen Patienten erhoben wurden. Dennoch ist die in dieser Dissertation vorgestellte Methodik zur Quantifizierung der Serumkapazität und den daraus abgeleiteten Kernaussagen als ein erster Schritt in die richtige Richtung zu verstehen, welcher Potential für die Zukunft von Diagnostik und Therapie nicht nur für das Problem der In-Stent Restenose, sondern nach entsprechender Modifikation womöglich auch für de novo-Läsionen oder weitere vaskuloproliferative Erkrankungen beinhaltet.



## 8. Zusammenfassung

Die Ausbildung der neointimalen Hyperplasie und somit einer Restenose nach humaner koronarer Stentimplantation basiert auf einer mediatorvermittelten Migration und Proliferation koronararterieller glatter Gefäßmuskelzellen, die entsprechenden Signaltransduktionswege laufen dabei zum Teil systemisch durch Freisetzung diverser Wachstumsfaktoren ins Blut bzw. unter Beteiligung von z.B. Thrombozyten oder Entzündungszellen ab.

Die potentiell proliferationsfördernde Eigenschaft von humanem Serum aufgrund der darin enthaltenen Mediatoren wurde als "Serumkapazität" tituliert. In dieser Arbeit erfolgte anhand von Serumproben, welche den in die Arbeit eingeschlossenen Patienten präinterventionell, unmittelbar postinterventionell bzw. 3 Tage nach Intervention einer Koronarstenose im Rahmen der Index-Koronarangiographie abgenommen wurden, eine in vitro-Quantifizierung der Serumkapazität durch einen BrdU-ELISA, die so gewonnenen "Proliferationsindizes" wurden hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit für das Eintreten einer binären Restenose bzw. des Ausmaß des Late Lumen Loss zum Zeitpunkt der Kontroll-Koronarangiographie nach 180 Tagen bzw. dem Auftreten klinischer Endpunkte wie TLR und MACE in der Follow up-Beobachtung von insgesamt 360 Tagen untersucht. Rekrutiert für diese Arbeit wurden sowohl Patienten mit de novo-Stenosen als auch solche mit In-Stent Restenosen.

Von den 189 Patienten mit insgesamt 314 erfolgreich im Rahmen der Index-Koronarangiographie intervenierten de novo-Stenosen nahmen 149 an der Re-Koronarangiographie nach 180 Tagen teil (entspricht einem Anteil von 79%), bei 30% der hierbei kontrollierten 247 de novo-Läsionen zeigte sich eine binäre Restenose, bei 21% der Patienten kam es innerhalb der Follow up-Beobachtung über 360 Tage zu einem Ereignis TLR, bei 25% zu einem MACE. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang der ermittelten Proliferationsindizes mit den Endpunkten binäre Restenose, TLR, MACE bzw. dem Ausmaß des Late Lumen Loss konnte nicht nachgewiesen werden. Im Kollektiv der Patienten mit In-Stent Restenosen waren 159 Patienten mit ebenso vielen in der Index-Koronarangiographie intervenierten Läsionen erfasst, es unterzogen sich 140 Personen der Kontroll-Koronarangiographie nach 180 Tagen (88%); bezogen auf das Gesamt-Patientenkollektiv wiesen 29% der intervenierten Läsionen eine binäre Restenose auf, im Rahmen der klinischen Follow up-Beobachtung von insgesamt 360 Tagen konnte in 20% aller Fälle der Eintritt eines Ereignisses TLR, in 23% eines MACE dokumentiert werden. Für jede Kategorie der ermittelten Prolifera-

tionsindizes konnte ein statistisch signifikanter Einfluß auf die Zielgrößen nachgewiesen werden: der anhand der präinterventionell entnommenen Serumprobe ermittelte Proliferationsindex ermöglicht sowohl als Absolutwert (unter Adjustierung mit dem Parameter "Stenosenlänge") als auch qualitativ nach Unterteilung in Gruppen mit einem Wert von  $< 1,0$  oder  $\geq 1,0$  Aussagen über das Risiko des Eintretens von TLR ( $p=0,040$  bzw.  $0,029$ ); der die unmittelbar postinterventionelle Phase repräsentierende Proliferationsindex stellt in einer Subgruppe von systemisch mit Rapamycin behandelten Patienten einen Prädiktor für das Ausmaß des Late Lumen Loss dar ( $p=0.023$ ); die 3 Tage nach Intervention entnommene Serumprobe liefert einen Proliferationsindex, welcher als Absolutwert mit der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines MACE korreliert ( $p=0,031$ ).

Es konnte somit auf dem Boden des Konzepts der systemischen proliferativen Serumkapazität ein neuer Biomarker in Form der Proliferationsindizes etabliert werden, welcher für Patienten mit erfolgter Intervention einer In-Stent Restenose eine Risikostratifizierung für das Eintreten klinischer Ereignisse wie TLR oder MACE ermöglicht, darüber hinaus kann für eine Gruppe von systemisch mit Rapamycin behandelten Patienten eine Abschätzung des zu erwartenden Late Lumen Loss erfolgen. Potentielle Anwendungsgebiete der Proliferationsindizes im klinischen Alltag finden sich viele, so z.B. als Entscheidungshilfe pro oder contra einer besonders strengen Einstellung kardiovaskulärer Risikofaktoren, einer Kontroll-Koronarangiographie bzw. auch der Umstellung auf ein alternatives Therapieverfahren.

## 9. Anhang

### 9.1. Literaturverzeichnis

1. **Al Suwaidi, J., Holmes, D.R., Jr., Salam, A.M., Lennon, R., Berger, P.B.** "Impact of coronary artery stents on mortality and nonfatal myocardial infarction: meta-analysis of randomized trials comparing a strategy of routine stenting with that of balloon angioplasty", *Am Heart J*, 147 (2004), 815-22
2. **Alfonso, F., Zueco, J., Cequier, A., Mantilla, R., Bethencourt, A., Lopez-Minguez, J.R., Angel, J., Auge, J.M., Gomez-Recio, M., Moris, C., Seabra-Gomes, R., Perez-Vizcayno, M.J., Macaya, C.** "A randomized comparison of repeat stenting with balloon angioplasty in patients with in-stent restenosis", *J Am Coll Cardiol*, 42 (2003), 796-805
3. **Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K.B., Smith, S.R., D'Amore, P.A.** "An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989), 4544-8
4. **Aoyagi, M., Yamamoto, M., Azuma, H., Nagashima, G., Niimi, Y., Hirakawa, K., Yamamoto, K.** "Expression of p53 protein and p53 gene transcripts in rabbit carotid arteries after balloon denudation", *Histochem Cell Biol*, 107 (1997), 365-70
5. **Assoian, R.K., Grotendorst, G.R., Miller, D.M., Sporn, M.B.** "Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets", *Nature*, 309 (1984), 804-6
6. **Atkinson, C., Horsley, J., Rhind-Tutt, S., Charman, S., Phillipotts, C.J., Wallwork, J., Goddard, M.J.** "Neointimal smooth muscle cells in human cardiac allograft coronary artery vasculopathy are of donor origin", *J Heart Lung Transplant*, 23 (2004), 427-35
7. **Avruch, J., Zhang, X.F., Kyriakis, J.M.** "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway", *Trends Biochem Sci*, 19 (1994), 279-83
8. **Bassols, A., Massague, J.** "Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans", *J Biol Chem*, 263 (1988), 3039-45
9. **Bauters, C., de Groote, P., Adamantidis, M., Delcayre, C., Hamon, M., Lablanche, J.M., Bertrand, M.E., Dupuis, B., Swynghedauw, B.** "Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury. First marker of the cellular process leading to restenosis after angioplasty?" *Eur Heart J*, 13 (1992), 556-9
10. **Bauters, C., Hubert, E., Prat, A., Bougrimi, K., Van Belle, E., McFadden, E.P., Amouyel, P., Lablanche, J.M., Bertrand, M.** "Predictors of restenosis after coronary stent implantation", *J Am Coll Cardiol*, 31 (1998), 1291-8
11. **Bauters, C., Meurice, T., Hamon, M., McFadden, E., Lablanche, J.M., Bertrand, M.E.** "Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice", *Cardiovasc Res*, 31 (1996), 835-46
12. **Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U.** In: "Pathologie", Urban & Fischer Verlag, München, 2001
13. **Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U.** "Entzündung", In: "Pathologie", Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Urban & Fischer Verlag, München 2001, 69-99
14. **Böcker, W., Höfler, H.K., Kleihues, P., Denk, H., Heitz, P.U.** "Allgemeine Tumorphathologie", In: "Pathologie", Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Urban & Fischer Verlag, München 2001, 163-211
15. **Braun-Dullaues, R.C., Mann, M.J., Dzau, V.J.** "Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease", *Circulation*, 98 (1998), 82-9
16. **Braunwald, E.** "Part VIII Section 1 - Diagnosis of Cardiovascular Disorders" in Harrison's Principles of Internal Medicine, Editors: Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., The McGraw-Hill Companies, New York 2005, 1301-1353
17. **Cercek, B., Fishbein, M.C., Forrester, J.S., Helfant, R.H., Fagin, J.A.** "Induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation", *Circ Res*, 66(1990), 1755-60
18. **Chiariello, M., Marinissen, M.J., Gutkind, J.S.** "Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases", *Nat Cell Biol*, 3 (2001), 580-6
19. **Clowes, A.W., Clowes, M.M.** "Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. II. Inhibition of smooth muscle growth by heparin", *Lab Invest*, 52 (1985), 611-6
20. **Clowes, A.W., Clowes, M.M., Fingerle, J., Reidy, M.A.** "Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery", *J Cardiovasc Pharmacol*, 14 Suppl 6 (1989), 12-15
21. **Clowes, A.W., Clowes, M.M., Kocher, O., Ropraz, P., Chaponnier, C., Gabbiani, G.** "Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin", *J Cell Biol*, 107 (1988), 1939-45
22. **Clowes, A.W., Reidy, M.A., Clowes, M.M.** "Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium", *Lab Invest*, 49 (1983), 327-33

23. **Clowes, A.W., Schwartz, S.M.** "Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery", *Circ Res*, 56 (1985), 139-45
24. **Cordis** (2008), "History of the CYPHER Stent " (<http://www.cypherstent.com/cypher-stent/history/pages/index.aspx>), Stand: 06.01.2011
25. **Costa, M., Angiolillo, D.J., Teirstein, P., Gilmore, P., Leon, M., Moses, J., Yakubov, S., Carter, A., Fischell, T., Zenni, M., Bass, T.** "Sirolimus-eluting stents for treatment of complex bypass graft disease: insights from the SECURE registry", *J Invasive Cardiol*, 17 (2005), 396-8
26. **Denk, H., Zatloukal, K.** "Zell- und Gewebsreaktionen", In: "Pathologie", Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Urban & Fischer Verlag, München, 2001, 35-68
27. **Elezi, S., Kastrati, A., Hadamitzky, M., Dirschinger, J., Neumann, F.J., Schömig, A.** "Clinical and angiographic follow-up after balloon angioplasty with provisional stenting for coronary in-stent restenosis", *Catheter Cardiovasc Interv*, 48 (1999), 151-6
28. **Ellis, S.G., Vandormael, M.G., Cowley, M.J., DiSciascio, G., Deligonul, U., Topol, E.J., Bulle, T.M.** "Coronary morphologic and clinical determinants of procedural outcome with angioplasty for multivessel coronary disease. Implications for patient selection. Multivessel Angioplasty Prognosis Study Group", *Circulation*, 82 (1990), 1193-202
29. **Farb, A., John, M., Acampado, E., Kolodgie, F.D., Prescott, M.F., Virmani, R.** "Oral evero-limus inhibits in-stent neointimal growth", *Circulation*, 106 (2002), 2379-84
30. **Ferns, G.A., Avades, T.Y.** "The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models", *Int J Exp Pathol*, 81 (2000), 63-88
31. **Ferns, G.A., Motani, A.S., Anggard, E.E.** "The insulin-like growth factors: their putative role in atherogenesis", *Artery*, 18 (1991), 197-225
32. **Ferns, G.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidy, M.A., Ross, R.** "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF", *Science*, 253 (1991), 1129-32
33. **Ferns, G.A., Reidy, M.A., Ross, R.** "Balloon catheter de-endothelialization of the nude rat carotid. Response to injury in the absence of functional T lymphocytes", *Am J Pathol*, 138 (1991), 1045-57
34. **Fingerle, J., Johnson, R., Clowes, A.W., Majesky, M.W., Reidy, M.A.** "Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989), 8412-6
35. **Fischman, D.L., Leon, M.B., Baim, D.S., Schatz, R.A., Savage, M.P., Penn, I., Detre, K., Veltri, L., Ricci, D., Nobuyoshi, M.** "A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators", *N Engl J Med*, 331 (1994), 496-501
36. **George, B.S., Voorhees, W.D., 3rd, Roubin, G.S., Farnot, N.E., Pinkerton, C.A., Raizner, A.E., King, S.B., Holmes, D.R., Topol, E.J., Kereiakes, D.J.** "Multicenter investigation of coronary stenting to treat acute or threatened closure after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical and angiographic outcomes", *J Am Coll Cardiol*, 22 (1993), 135-43
37. **Glazebrook, H., Hatch, T., Brindle, N.P.** "Regulation of insulin-like growth factor-1 expression in vascular endothelial cells by the inflammatory cytokine interleukin-1", *J Vasc Res*, 35 (1998), 143-9
38. **Goldman, S., Zadina, K., Moritz, T., Ovitt, T., Sethi, G., Copeland, J.G., Thottapurathu, L., Krasnicka, B., Ellis, N., Anderson, R.J., Henderson, W.** "Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study", *J Am Coll Cardiol*, 44 (2004), 2149-56
39. **Grewe, P.H., Deneke, T., Machraoui, A., Barmeyer, J., Muller, K.M.** "Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen", *J Am Coll Cardiol*, 35 (2000), 157-63
40. **Grines, C.L., Browne, K.F., Marco, J., Rothbaum, D., Stone, G.W., O'Keefe, J., Overlie, P., Donohue, B., Chelliah, N., Timmis, G.C.** "A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group", *N Engl J Med*, 328 (1993), 673-9
41. **Grube, E., Silber, S., Hauptmann, K.E., Mueller, R., Buellfeld, L., Gerckens, U., Russell, M.E.** "TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions", *Circulation*, 107 (2003), 38-42
42. **Gruentzig, A.R., King, S.B., 3rd, Schlumpf, M., Siegenthaler, W.** "Long-term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The early Zurich experience", *N Engl J Med*, 316 (1987), 1127-32
43. **Gruntzig, A.R., Senning, A., Siegenthaler, W.E.** "Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty", *N Engl J Med*, 301 (1979), 61-8
44. **Hacker, T.A., Griffin, M.O., Guttormsen, B., Stoker, S., Wolff, M.R.** "Platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 (imatinib mesylate) inhibits human vascular smooth muscle proliferation and migration in vitro but not in vivo", *J Invasive Cardiol*, 19 (2007), 269-74

45. **Hajjar, K.A., Hajjar, D.P., Silverstein, R.L., Nachman, R.L.** "Tumor necrosis factor-mediated release of platelet-derived growth factor from cultured endothelial cells", *J Exp Med*, 166 (1987), 235-45
46. **Hamon, M., Bauters, C., McFadden, E.P., Wernert, N., Lablanche, J.M., Dupuis, B., Bertrand, M.E.** "Restenosis after coronary angioplasty", *Eur Heart J*, 16 Suppl I (1995), 33-48
47. **Hausleiter, J., Kastrati, A., Mehilli, J., Dotzer, F., Schühlen, H., Dirschinger, J., Schömig, A.** "Comparative analysis of stent placement versus balloon angioplasty in small coronary arteries with long narrowings (the Intracoronary Stenting or Angioplasty for Restenosis Reduction in Small Arteries [ISAR-SMART] Trial)", *Am J Cardiol*, 89 (2002), 58-60
48. **Hausleiter, J., Kastrati, A., Mehilli, J., Schühlen, H., Pache, J., Dotzer, F., Glatthor, C., Siebert, S., Dirschinger, J., Schömig, A.** "A randomized trial comparing phosphorylcholine-coated stenting with balloon angioplasty as well as abciximab with placebo for restenosis reduction in small coronary arteries", *J Intern Med*, 256 (2004), 388-97
49. **Hausleiter, J., Kastrati, A., Mehilli, J., Vogeser, M., Zohlnhofer, D., Schühlen, H., Goos, C., Pache, J., Dotzer, F., Pogatsa-Murray, G., Dirschinger, J., Heemann, U., Schömig, A.** "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral sirolimus for restenosis prevention in patients with in-stent restenosis: the Oral Sirolimus to Inhibit Recurrent In-stent Stenosis (OSIRIS) trial", *Circulation*, 110 (2004), 790-5
50. **Holmes, D.R., Berger, P.B.** "Complex and Multivessel Intervention", In: "Textbook of Interventional Cardiology", Topol, E., W.B. Saunders, Philadelphia 1994, 231-250
51. **Holmes, D.R., Jr.** "In-stent restenosis", *Rev Cardiovasc Med*, 2 (2001), 115-9
52. **Hoye, A., Tanabe, K., Lemos, P.A., Aoki, J., Saia, F., Arampatzis, C., Degertekin, M., Hofma, S.H., Sianos, G., McFadden, E., van der Giessen, W.J., Smits, P.C., de Feyter, P.J., van Domburg, R.T., Serruys, P.W.** "Significant reduction in restenosis after the use of sirolimus-eluting stents in the treatment of chronic total occlusions", *J Am Coll Cardiol*, 43 (2004), 1954-8
53. **Jackson, C.L., Reidy, M.A.** "Basic fibroblast growth factor: its role in the control of smooth muscle cell migration", *Am J Pathol*, 143 (1993), 1024-31
54. **Jonasson, L., Holm, J., Hansson, G.K.** "Cyclosporin A inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1988), 2303-6
55. **Kasaoka, S., Tobis, J.M., Akiyama, T., Reimers, B., Di Mario, C., Wong, N.D., Colombo, A.** "Angiographic and intravascular ultrasound predictors of in-stent restenosis", *J Am Coll Cardiol*, 32 (1998), 1630-5
56. **Kastrati, A., Dibra, A., Eberle, S., Mehilli, J., Suarez de Lezo, J., Goy, J.J., Ulm, K., Schömig, A.** "Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease: meta-analysis of randomized trials", *Jama*, 294 (2005), 819-25
57. **Kastrati, A., Hall, D., Schömig, A.** "Long-term outcome after coronary stenting", *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, 1 (2000), 48-54
58. **Kastrati, A., Mehilli, J., Schühlen, H., Dirschinger, J., Dotzer, F., ten Berg, J.M., Neumann, F.J., Bollwein, H., Volmer, C., Gawaz, M., Berger, P.B., Schömig, A.** "A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel", *N Engl J Med*, 350 (2004), 232-8
59. **Kastrati, A., Mehilli, J., von Beckerath, N., Dibra, A., Hausleiter, J., Pache, J., Schühlen, H., Schmitt, C., Dirschinger, J., Schömig, A.** "Sirolimus-eluting stent or paclitaxel-eluting stent vs balloon angioplasty for prevention of recurrences in patients with coronary in-stent restenosis: a randomized controlled trial", *Jama*, 293 (2005), 165-71
60. **Kastrati, A., Schömig, A., Dirschinger, J., Mehilli, J., Dotzer, F., von Welsch, N., Neumann, F.J.** "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*, 102 (2000), 2593-8
61. **Kastrati, A., Schömig, A., Elezi, S., Dirschinger, J., Mehilli, J., Schühlen, H., Blasini, R., Neumann, F.J.** "Prognostic value of the modified american college of Cardiology/American heart association stenosis morphology classification for long-term angiographic and clinical outcome after coronary stent placement", *Circulation*, 100 (1999), 1285-90
62. **Kastrati, A., Schömig, A., Elezi, S., Schühlen, H., Dirschinger, J., Hadamitzky, M., Wehinger, A., Hausleiter, J., Walter, H., Neumann, F.J.** "Predictive factors of restenosis after coronary stent placement", *J Am Coll Cardiol*, 30 (1997), 1428-36
63. **King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., Kirschner, M.W.** "How Proteolysis Drives the Cell Cycle", *Science*, 274 (1996), 1652-59
64. **King, S.B., 3rd, Lembo, N.J., Weintraub, W.S., Kosinski, A.S., Barnhart, H.X., Kutner, M.H., Alazraki, N.P., Guyton, R.A., Zhao, X.Q.** "A randomized trial comparing coronary angioplasty with coronary bypass surgery. Emory Angioplasty versus Surgery Trial (EAST)", *N Engl J Med*, 331 (1994), 1044-50

65. **Kinlough-Rathbone, R.L., Packham, M.A., Mustard, J.F.** "Vessel injury, platelet adherence, and platelet survival", *Arteriosclerosis*, 3 (1983), 529-46
66. **Koepf, D.M., Harper, J.W., Elledge, S.J.** "How the Cyclin Became a Cyclin: Regulated Proteolysis in the Cell Cycle", *Cell*, 97 (1999), 431-4
67. **Komatsu, R., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Becker, A.E.** "Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses", *Circulation*, 98 (1998), 224-33
68. **Koolman, J., Röhm, K.H.** "Taschenatlas der Biochemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997, 372-384
69. **Ku, D.H., Wen, S.C., Engelhard, A., Nicolaidis, N.C., Lipson, K.E., Marino, T.A., Calabretta, B.** "c-myc transactivates cdc2 expression via Myb binding sites in the 5'-flanking region of the human cdc2 gene", *J Biol Chem*, 268 (1993), 2255-9
70. **Lemos, P.A., Hoye, A., Goedhart, D., Arampatzis, C.A., Saia, F., van der Giessen, W.J., McFadden, E., Sianos, G., Smits, P.C., Hofma, S.H., de Feyter, P.J., van Domburg, R.T., Serruys, P.W.** "Clinical, angiographic, and procedural predictors of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in complex patients: an evaluation from the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) study", *Circulation*, 109 (2004), 1366-70
71. **Leppanen, O., Janjic, N., Carlsson, M.A., Pietras, K., Levin, M., Vargeese, C., Green, L.S., Bergqvist, D., Ostman, A., Heldin, C.H.** "Intimal hyperplasia recurs after removal of PDGF-AB and -BB inhibition in the rat carotid artery injury model", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (2000), E89-95
72. **Levine, A.J.** "p53, the cellular gatekeeper for growth and division", *Cell*, 88 (1997), 323-31
73. **Lindner, V., Majack, R.A., Reidy, M.A.** "Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries", *J Clin Invest*, 85 (1990), 2004-8
74. **Lindner, V., Olson, N.E., Clowes, A.W., Reidy, M.A.** "Inhibition of smooth muscle cell proliferation in injured rat arteries. Interaction of heparin with basic fibroblast growth factor", *J Clin Invest*, 90 (1992), 2044-9
75. **Lindner, V., Reidy, M.A.** "Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (1991), 3739-43
76. **Liu, J.J., Chao, J.R., Jiang, M.C., Ng, S.Y., Yen, J.J., Yang-Yen, H.F.** "Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells", *Mol Cell Biol*, 15 (1995), 3654-63
77. **Liu, M.W., Roubin, G.S., King, S.B., 3rd** "Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia", *Circulation*, 79 (1989), 1374-87
78. **Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T.B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P.M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M.M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V.L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Roger, V.L., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N.D., Wylie-Rosett, J.** "Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association", *Circulation*, 121 (2010), e46-e215
79. **Mancini, D., Pinney, S., Burkhoff, D., LaManca, J., Itescu, S., Burke, E., Edwards, N., Oz, M., Marks, A.R.** "Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy", *Circulation*, 108 (2003), 48-53
80. **Manderson, J.A., Mosse, P.R., Safstrom, J.A., Young, S.B., Campbell, G.R.** "Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype", *Arteriosclerosis*, 9 (1989), 289-98
81. **Marhamati, D.J., Sonenshein, G.E.** "B-Myb expression in vascular smooth muscle cells occurs in a cell cycle-dependent fashion and down-regulates promoter activity of type I collagen genes", *J Biol Chem*, 271 (1996), 3359-65
82. **Mehran, R., Dangas, G., Abizaid, A.S., Mintz, G.S., Lansky, A.J., Satler, L.F., Pichard, A.D., Kent, K.M., Stone, G.W., Leon, M.B.** "Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome", *Circulation*, 100 (1999), 1872-8
83. **Mercado, N., Boersma, E., Wijns, W., Gersh, B.J., Morillo, C.A., de Valk, V., van Es, G.A., Grobbee, D.E., Serruys, P.W.** "Clinical and quantitative coronary angiographic predictors of coronary restenosis: a comparative analysis from the balloon-to-stent era", *J Am Coll Cardiol*, 38 (2001), 645-52
84. **Miano, J.M., Vlastic, N., Tota, R.R., Stemerman, M.B.** "Localization of Fos and Jun proteins in rat aortic smooth muscle cells after vascular injury", *Am J Pathol*, 142 (1993), 715-24
85. **Miano, J.M., Vlastic, N., Tota, R.R., Stemerman, M.B.** "Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth", *Arterioscler Thromb*, 13 (1993), 211-9
86. **Mihu, M.** "Zellzyklus" (<http://www.zytologie-online.net/zellzyklus.php>), Stand: 05.01.2011



87. **Milross, C.G., Mason, K.A., Hunter, N.R., Chung, W.K., Peters, L.J., Milas, L.** "Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel", *J Natl Cancer Inst*, 88 (1996), 1308-14
88. **Mintz, G.S., Popma, J.J., Hong, M.K., Pichard, A.D., Kent, K.M., Satler, L.F., Leon, M.B.** "Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis", *Am J Cardiol*, 78 (1996), 18-22
89. **Mintz, G.S., Popma, J.J., Pichard, A.D., Kent, K.M., Satler, L.F., Wong, C., Hong, M.K., Ko-vach, J.A., Leon, M.B.** "Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study", *Circulation*, 94 (1996), 35-43
90. **Mitra, A.K., Agrawal, D.K.** "In stent restenosis: bane of the stent era", *J Clin Pathol*, 59 (2006), 232-9
91. **Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., Taniguchi, T.** "Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements", *Cell*, 54 (1988), 903-13
92. **Moreno, R., Fernandez, C., Alfonso, F., Hernandez, R., Perez-Vizcayno, M.J., Escaned, J., Sabate, M., Banuelos, C., Angiolillo, D.J., Azcona, L., Macaya, C.** "Coronary stenting versus balloon angioplasty in small vessels: a meta-analysis from 11 randomized studies", *J Am Coll Cardiol*, 43 (2004), 1964-72
93. **Morice, M.C., Colombo, A., Meier, B., Serruys, P., Tamburino, C., Guagliumi, G., Sousa, E., Stoll, H.P.** "Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial", *Jama*, 295 (2006), 895-904
94. **Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., Falotico, R.** "A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization", *N Engl J Med*, 346 (2002), 1773-80
95. **Morishita, R., Gibbons, G.H., Ellison, K.E., Nakajima, M., Zhang, L., Kaneda, Y., Ogihara, T., Dzau, V.J.** "Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993), 8474-8
96. **Moses, J.W., Leon, M.B., Popma, J.J., Fitzgerald, P.J., Holmes, D.R., O'Shaughnessy, C., Caputo, R.P., Kereiakes, D.J., Williams, D.O., Teirstein, P.S., Jaeger, J.L., Kuntz, R.E.** "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery", *N Engl J Med*, 349 (2003), 1315-23
97. **Moussa, I., Leon, M.B., Baim, D.S., O'Neill, W.W., Popma, J.J., Buchbinder, M., Midwall, J., Simonton, C.A., Keim, E., Wang, P., Kuntz, R.E., Moses, J.W.** "Impact of sirolimus-eluting stents on outcome in diabetic patients: a SIRIUS (Sirolimus-coated Bx Velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo coronary artery lesions) substudy", *Circulation*, 109 (2004), 2273-8
98. **Muller, W., Crothers, D.M.** "Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA", *J Mol Biol*, 35 (1968), 251-90
99. **Nikol, S., Isner, J.M., Pickering, J.G., Kearney, M., Leclerc, G., Weir, L.** "Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions", *J Clin Invest*, 90 (1992), 1582-92
100. **Nobelprize.org** (2011), "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1956" ([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1956/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1956/)), Stand: 12.03.2011
101. **Nobuyoshi, M., Kimura, T., Nosaka, H., Mioka, S., Ueno, K., Yokoi, H., Hamasaki, N., Hori-uchi, H., Ohishi, H.** "Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients", *J Am Coll Cardiol*, 12 (1988), 616-23
102. **Nomoto, K., Watanabe, I., Oba, T., Nagao, K., Kushiro, T., Hirayama, A.** "Safety and efficacy of sirolimus-eluting stent in patients with acute coronary syndrome undergoing emergency procedure", *Circ J*, 72 (2008), 1054-8
103. **Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R., Roberts, J.M.** "Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin", *Nature*, 372 (1994), 570-3
104. **Onuta, G., van Ark, J., Rienstra, H., Boer, M.W., Klatter, F.A., Bruggeman, C.A., Zeebregts, C.J., Rozing, J., Hillebrands, J.L.** "Development of transplant vasculopathy in aortic allografts correlates with neointimal smooth muscle cell proliferative capacity and fibrocyte frequency", *Atherosclerosis*, 209 (2009), 393-402
105. **Pauly, R.R., Passaniti, A., Bilato, C., Monticone, R., Cheng, L., Papadopoulos, N., Gluzband, Y.A., Smith, L., Weinstein, C., Lakatta, E.G.** "Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation", *Circ Res*, 75 (1994), 41-54

106. **Perlman, H., Maillard, L., Krasinski, K., Walsh, K.** "Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury", *Circulation*, 95 (1997), 981-7
107. **Phuchareon, J., Tokuhsa, T.** "Deregulated c-Fos/AP-1 modulates expression of the cyclin and the cdk gene in splenic B cells stimulated with lipopolysaccharide", *Cancer Lett*, 92 (1995), 203-8
108. **Pietras, K., Ostman, A., Sjoquist, M., Buchdunger, E., Reed, R.K., Heldin, C.H., Rubin, K.** "Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors", *Cancer Res*, 61 (2001), 2929-34
109. **Poon, M., Marx, S.O., Gallo, R., Badimon, J.J., Taubman, M.B., Marks, A.R.** "Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration", *J Clin Invest*, 98 (1996), 2277-83
110. **Quigley, P.J., Hlatky, M.A., Hinohara, T., Rendall, D.S., Perez, J.A., Phillips, H.R., Califf, R.M., Stack, R.S.** "Repeat percutaneous transluminal coronary angioplasty and predictors of recurrent restenosis", *Am J Cardiol*, 63 (1989), 409-13
111. **Radke, P.W., Kaiser, A., Frost, C., Sigwart, U.** "Outcome after treatment of coronary in-stent restenosis; results from a systematic review using meta-analysis techniques", *Eur Heart J*, 24 (2003), 266-73
112. **Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S.** "Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium", *Lancet*, 2 (1987), 1057-8
113. **Raines, E.W., Dower, S.K., Ross, R.** "Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA", *Science*, 243 (1989), 393-6
114. **Reimers, B., Moussa, I., Akiyama, T., Tucci, G., Ferraro, M., Martini, G., Blengino, S., Di Mario, C., Colombo, A.** "Long-term clinical follow-up after successful repeat percutaneous intervention for stent restenosis", *J Am Coll Cardiol*, 30 (1997), 186-92
115. **Rogers, C., Edelman, E.R., Simon, D.I.** "A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998), 10134-9
116. **Ryan, T.J.** "The coronary angiogram and its seminal contributions to cardiovascular medicine over five decades", *Circulation*, 106 (2002), 752-6
117. **Ryan, T.J., Faxon, D.P., Gunnar, R.M., Kennedy, J.W., King, S.B., 3rd, Loop, F.D., Peterson, K.L., Reeves, T.J., Williams, D.O., Winters, W.L., Jr.** "Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty)", *Circulation*, 78 (1988), 486-502
118. **Savage, M.P., Fischman, D.L., Rake, R., Leon, M.B., Schatz, R.A., Penn, I., Nobuyoshi, M., Moses, J., Hirshfeld, J., Heuser, R., Baim, D., Cleman, M., Brinker, J., Gebhardt, S., Goldberg, S.** "Efficacy of coronary stenting versus balloon angioplasty in small coronary arteries. Stent Restenosis Study (STRESS) Investigators", *J Am Coll Cardiol*, 31 (1998), 307-11
119. **Sawada, H., Kan, M., McKeenan, W.L.** "Opposite effects of monokines (interleukin-1 and tumor necrosis factor) on proliferation and heparin-binding (fibroblast) growth factor binding to human aortic endothelial and smooth muscle cells", *In Vitro Cell Dev Biol*, 26 (1990), 213-6
120. **Schalcher, C., Sutsch, G., Amann, F.W.** "To stent or not to stent", *Schweiz Med Wochenschr*, 129 (1999), 1679-96
121. **Schampaert, E., Cohen, E.A., Schluter, M., Reeves, F., Traboulsi, M., Title, L.M., Kuntz, R.E., Popma, J.J.** "The Canadian study of the sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (C-SIRIUS)", *J Am Coll Cardiol*, 43 (2004), 1110-5
122. **Schatz, R.A., Baim, D.S., Leon, M., Ellis, S.G., Goldberg, S., Hirshfeld, J.W., Cleman, M.W., Cabin, H.S., Walker, C., Stagg, J.** "Clinical experience with the Palmaz-Schatz coronary stent. Initial results of a multicenter study", *Circulation*, 83 (1991), 148-61
123. **Schömig, A., Dibra, A., Windecker, S., Mehilli, J., Suarez de Lezo, J., Kaiser, C., Park, S.J., Goy, J.J., Lee, J.H., Di Lorenzo, E., Wu, J., Juni, P., Pfisterer, M.E., Meier, B., Kastrati, A.** "A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents versus paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease", *J Am Coll Cardiol*, 50 (2007), 1373-80
124. **Schöpke, T.** (2000), "Taxol (Paclitaxel)" ([http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/6\\_droge/taxol.htm](http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/6_droge/taxol.htm)), Stand: 01.03.2011
125. **Schwartz, R.S., Holmes, D.R., Jr., Topol, E.J.** "The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms", *J Am Coll Cardiol*, 20 (1992), 1284-93
126. **Scott-Burden, T., Vanhoutte, P.M.** "Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors", *Tex Heart Inst J*, 21 (1994), 91-7
127. **Sedding, D.G., Seay, U., Fink, L., Heil, M., Kummer, W., Tillmanns, H., Braun-Dullaeus, R.C.** "Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells", *Circulation*, 108 (2003), 616-22
128. **Sehgal, S.N., Baker, H., Vezina, C.** "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization", *J Antibiot (Tokyo)*, 28 (1975), 727-32

129. **Serruys, P.W., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., Emanuelsson, H., Marco, J., Legrand, V., Materne, P.** "A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group", *N Engl J Med*, 331 (1994), 489-95
130. **Serruys, P.W., Kutryk, M.J., Ong, A.T.** "Coronary-artery stents", *N Engl J Med*, 354 (2006), 483-95
131. **Serruys, P.W., Ong, A.T., Piek, J.J., Neumann, F.J., van der Giessen, W.J., Wiemer, M., Zeiher, A., Grube, E., Haase, J., Thuesen, L., Hamm, C., Otto-Terlouw, P.C.** "A randomized comparison of a durable polymer Everolimus-eluting stent with a bare metal coronary stent: The SPIRIT first trial", *EuroIntervention*, 1 (2005), 58-65
132. **Serruys, P.W., Ong, A.T., van Herwerden, L.A., Sousa, J.E., Jatene, A., Bonnier, J.J., Schonberger, J.P., Buller, N., Bonser, R., Disco, C., Backx, B., Hugenholtz, P.G., Firth, B.G., Unger, F.** "Five-year outcomes after coronary stenting versus bypass surgery for the treatment of multivessel disease: the final analysis of the Arterial Revascularization Therapies Study (ARTS) randomized trial", *J Am Coll Cardiol*, 46 (2005), 575-81
133. **Serruys, P.W., Ormiston, J.A., Sianos, G., Sousa, J.E., Grube, E., den Heijer, P., de Feyter, P., Buszman, P., Schömig, A., Marco, J., Polonski, L., Thuesen, L., Zeiher, A.M., Bett, J.H., Suttorp, M.J., Glogar, H.D., Pitney, M., Wilkins, G.T., Whitbourn, R., Veldhof, S., Miquel, K., Johnson, R., Coleman, L., Virmani, R.** "Actinomycin-eluting stent for coronary revascularization: a randomized feasibility and safety study: the ACTION trial", *J Am Coll Cardiol*, 44 (2004), 1363-7
134. **Serruys, P.W., Unger, F., Sousa, J.E., Jatene, A., Bonnier, H.J., Schonberger, J.P., Buller, N., Bonser, R., van den Brand, M.J., van Herwerden, L.A., Morel, M.A., van Hout, B.A.** "Comparison of coronary-artery bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease", *N Engl J Med*, 344 (2001), 1117-24
135. **Sherr, C.J., Roberts, J.M.** "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression", *Genes Dev*, 13 (1999), 1501-12
136. **Sherr, C.J., Roberts, J.M.** "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases", *Genes Dev*, 9 (1995), 1149-63
137. **Sigwart, U., Puel, J., Mirkovitch, V., Joffre, F., Kappenberger, L.** "Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty", *N Engl J Med*, 316 (1987), 701-6
138. **Spaulding, C., Henry, P., Teiger, E., Beatt, K., Bramucci, E., Carrie, D., Slama, M.S., Merkely, B., Erglis, A., Margheri, M., Varenne, O., Cebrian, A., Stoll, H.P., Snead, D.B., Bode, C.** "Sirolimus-eluting versus uncoated stents in acute myocardial infarction", *N Engl J Med*, 355 (2006), 1093-104
139. **Sriram, V., Patterson, C.** "Cell cycle in vasculoproliferative diseases: potential interventions and routes of delivery", *Circulation*, 103 (2001), 2414-9
140. **Stallone, G., Infante, B., Schena, A., Battaglia, M., Ditunno, P., Loverre, A., Gesualdo, L., Schena, F.P., Grandaliano, G.** "Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients", *J Am Soc Nephrol*, 16 (2005), 3755-62
141. **Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J., Eilers, M.** "Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes", *Embo J*, 14 (1995), 4814-26
142. **Sun, J., Marx, S.O., Chen, H.J., Poon, M., Marks, A.R., Rabbani, L.E.** "Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration", *Circulation*, 103 (2001), 2967-72
143. **Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Kawata, M.** "Small GTP-binding proteins", *Int Rev Cytol*, 133 (1992), 187-230
144. **Tanner, F.C., Boehm, M., Akyurek, L.M., San, H., Yang, Z.Y., Tashiro, J., Nabel, G.J., Nabel, E.G.** "Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1), p21(Cip1), and p16(Ink4) on vascular smooth muscle cell proliferation", *Circulation*, 101 (2000), 2022-5
145. **Walker, L.N., Bowen-Pope, D.F., Ross, R., Reidy, M.A.** "Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (1986), 7311-5
146. **Wei, G.L., Krasinski, K., Kearney, M., Isner, J.M., Walsh, K., Andres, V.** "Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty", *Circ Res*, 80 (1997), 418-26
147. **Weinberg, R.A.** "The retinoblastoma protein and cell cycle control", *Cell*, 81 (1995), 323-30
148. **Wessely, R., Hengst, L., Jaschke, B., Wegener, F., Richter, T., Lupetti, R., Paschalidis, M., Schömig, A., Brandl, R., Neumann, F.J.** "A central role of interferon regulatory factor-1 for the limitation of neointimal hyperplasia", *Hum Mol Genet*, 12 (2003), 177-87
149. **Wilcox, J.N., Smith, K.M., Williams, L.T., Schwartz, S.M., Gordon, D.** "Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization", *J Clin Invest*, 82 (1988), 1134-43
150. **Winocour, P.D., Kinlough-Rathbone, R.L., Richardson, M., Mustard, J.F.** "Platelet accumulation and turnover on de-endothelialized aortae in rats", *Br J Exp Pathol*, 70 (1989), 337-48

151. **Woods, C.M., Zhu, J., McQueney, P.A., Bollag, D., Lazarides, E.** "Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway", *Mol Med*, 1 (1995), 506-26
152. **Yang, Z.Y., Simari, R.D., Perkins, N.D., San, H., Gordon, D., Nabel, G.J., Nabel, E.G.** "Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996), 7905-10
153. **Zohlnhöfer, D.** "Projekt 22: Neointimaproliferation nach Katheterbehandlung von Koronarstenosen: Bedeutung des mTOR-Kinase Signaltransduktionsweges für die Proliferation glatter Muskelzellen" (<http://grk438.web.med.uni-muenchen.de/forsch/22zohln.html>), Stand: 05.01.2011
154. **Zohlnhöfer, D., Hausleiter, J., Kastrati, A., Mehilli, J., Goos, C., Schühlen, H., Pache, J., Pogatsa-Murray, G., Heemann, U., Dirschinger, J., Schömig, A.** "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on restenosis prevention by the receptor tyrosine kinase inhibitor imatinib", *J Am Coll Cardiol*, 46 (2005), 1999-2003

## 9.2. Abbildungsverzeichnis

Von anderen Autoren entlehene Abbildungen sind im Text als solche mit einem Verweis auf die entsprechende Stelle im Literaturverzeichnis gekennzeichnet. Alle übrigen Darstellungen wurden selbst erstellt.

## 10. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Wessely, der nicht nur mit seiner Inspiration den Grundstein für das mir überlassene Thema zu Serumkapazität und Proliferationsindizes gelegt, sondern mich auch in herausragender Art und Weise bei der Umsetzung dieser Dissertation unterstützt und mir beim Erlernen von wissenschaftlichem Denken und Arbeiten sehr geholfen hat. Es war für mich eine äußerst positive Erfahrung, auf welcher freundlichen Art und Weise mich Herr Prof. Wessely in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat und an dieser teilnehmen ließ; darüber hinaus denke ich sehr gerne an die vielen guten Gespräche auch nicht-medizinischer Natur mit ihm zurück.

Herrn Prof. Dr. Albert Schömig danke ich dafür, daß ich Laboratorien und Materialien im Deutschen Herzzentrum München nutzen konnte, Herrn Prof. Dr. Adnan Kastrati, Herrn Prof. Dr. Jörg Hausleiter und Frau Dietlind Zohlhöfer für die Unterstützung bei der Datenakquisition für diese Arbeit.

Birgit Jaschke und Marc Vorpahl danke ich für die Hilfe bei Einarbeitung sowie Umsetzung des praktischen Teils der Arbeit; mit ihnen sowie den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wessely am Deutschen Herzzentrum München - Cornelia Michaelis, Sabine Merl und Christian Bradaric - verbinde ich eine tolle Zeit während meines Studiums.

Tibor Schuster gilt mein Dank dafür, daß er mich geduldig und in freundschaftlicher Art und Weise durch die Tücken der Statistik gelotst hat.

Yvonne Stadler danke ich für ihre fortwährende Unterstützung und das Verständnis dafür, wenn der Arztberuf mitunter wieder seinen Tribut fordert.

Bei meinen Eltern Günter und Sigrid Schütze bzw. meinen Großeltern Heinz und Maria Berger sowie Herbert und Marianne Schütze möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich in meinem ganzen bisherigen Leben so hingebungsvoll unterstützt und mir nicht nur meine Ausbildung an Schule und Universität, sondern auch so viel anderes Großartiges ermöglicht haben.