

**Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Radiologische Diagnostik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. D. Claussen**

**Einfluss des Anthranilsäurederivats  
Glafeninhydrochlorid auf die Proliferation,  
klonogene Aktivität, den Zellzyklus,  
das Migrationsvermögen und die extrazelluläre  
Matrixsynthese von humanen aortalen glatten  
Muskelzellen und Endothelzellen in vitro**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Quoc Bao Tran  
aus Saigon (Vietnam)**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. H. Duda  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Bitzer

Für meine liebe Diem.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung	1
1.2	Mechanismen der Restenosierung	1
1.3	Pharmakologische Therapieansätze	4
1.4	Fragestellung	4
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Bestandteile des Zellkultursystems</b>	<b>6</b>
2.1.1	Zellen	6
2.1.1.1	HaSMC	6
2.1.1.2	Endothelzellen	6
2.1.2	Kulturmedium	6
2.1.2.1	HaSMC	6
2.1.2.2	Endothelzellen	7
2.1.3	Fetales Kälberserum (FCS)	7
2.1.4	Antibiotika	7
2.1.5	L-Glutamin	7
2.1.6	Trypsin	8
2.1.7	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	8
2.1.8	Salzsäure	8
2.1.9	Glafenin-Hydrochlorid	8
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Zellkultur</b>	<b>9</b>
2.2.1	Keimfreiheit	9
2.2.2	Kultivierung der Zellen	9
2.2.3	Brutschrank	10
2.2.4	Subkultivierung	10
2.2.5	Kryokonservierung	11

2.2.6	Auftauen	11
2.2.7	DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)-Test	11
2.2.7.1	Versuchsablauf	11
2.2.7.2	Funktion des Tests	12
<b>2.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>12</b>
2.3.1	Proliferationskinetik	12
2.3.1.1	HaSMC	12
2.3.1.2	Endothelzellen	13
2.3.2	Koloniebildungsassay (Kobi)	13
2.3.2.1	HaSMC	13
2.3.2.2	Endothelzellen	13
2.3.3	Zellzyklusanalyse und DNA-Gehalt	14
2.3.3.1	Prinzip der flusszytometrischen Messung (FACS)	14
2.3.3.2	Lösungen und Antikörper	14
2.3.3.3	Methodik der Durchflusszytometrie	16
2.3.3.4	Auswertung	17
2.3.4	Migrationstest	17
2.3.5	LDH-Test	18
2.3.6	$\alpha$ -Actin Färbung	18
2.3.7	Tenascin Immunofloreszenzfärbung	19
<b>2.4</b>	<b>Statistik</b>	<b>19</b>
2.4.1	Proliferationskinetik	19
2.4.2	Koloniebildungsassays (Kobi)	20
2.4.3	Zellzyklusanalyse (FACS)	20
2.4.4	Migrationstest	20
2.4.5	LDH-Test	21
2.4.6	$\alpha$ -Actin-Färbung	21
2.4.7	Tenascin Immunofloreszenzfärbung	21
2.4.8	Statistische Analysen	21

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der Proliferationskinetik</b>	<b>22</b>
3.1.1	Einfachkinetik	22
3.1.2	Dauerkinetik	24
3.1.3	Vergleich der Kinetiken an Tag 20 (glatte Muskelzellen)	26
3.1.4	Endothelzellen	27
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Koloniebildungsassays</b>	<b>28</b>
3.2.1	Einfachkinetik	28
3.2.2	Dauerkinetik	29
3.2.3	Vergleich der Koloniezahlen (glatte Muskelzellen)	31
3.2.4	Endothelzellen	32
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse der Zellzyklusanalyse</b>	<b>33</b>
3.3.1	Einfachkinetik	33
3.3.2	Dauerkinetik	35
3.3.3	Endothelzellen	37
<b>3.4</b>	<b>Ergebnisse der Migrationstests</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Ergebnisse der LDH-Messungen</b>	<b>39</b>
<b>3.6</b>	<b>Ergebnisse der Zellfärbungen</b>	<b>40</b>
3.6.1	$\alpha$ -Actin-Färbung	40
3.6.2	Tenascin Immunfluoreszenzfärbung	41
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Das Problem der Restenose</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Stents und In-Stent-Restenosen</b>	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>Brachytherapie</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Drug eluting stents</b>	<b>45</b>
4.4.1	Sirolimus-Stents	46

4.4.2	Paclitaxel-Stents	47
4.4.3	Sirolimus- versus Paclitaxel-Stents	47
4.4.4	Das Potential von Glafeninhydrochlorid	48
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>51</b>
<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>5.4</b>	<b>Schlussbetrachtung</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Struktur von Glafenin	5
Abb. 3-1:	Zellzahlmittelwerte der glatten Muskelzellen bei Kurzzeitbehandlung (Einfachkinetiken)	22
Abb. 3-2:	Zellzahlmittelwerte der glatten Muskelzellen bei Langzeitbehandlung (Dauerkinetiken)	24
Abb. 3-3:	Vergleich der Zellzahlen in Abhängigkeit von der Kinetikart	26
Abb. 3-4:	Mittelwerte der Endothelzellzahlen bei Kurzzeitbehandlung	27
Abb. 3-5:	Gemittelte Koloniezahlen der glatten Muskelzellen bei Kurzzeitbehandlung	28
Abb. 3-6:	Gemittelte Koloniezahlen der glatten Muskelzellen bei Dauerbehandlung	29
Abb. 3-7:	Gesamtübersicht und Vergleich der Koloniezahlen an allen Messtagen in Abhängigkeit von der Kinetikart (Dauer- oder Einfachkinetik), glatte Muskelzellen.	31
Abb. 3-8:	Mittelwerte der Koloniezahlen der Endothelzellen bei Kurzzeitbehandlung über 4 Tage	32
Abb. 3-9:	Verteilung der glatten Muskelzellen in den einzelnen Zellzyklusphasen in Prozent; Kurzzeitbehandlung	34
Abb. 3-10:	Verteilung der glatten Muskelzellen in den einzelnen Zellzyklusphasen in Prozent; Langzeitbehandlung	36

Abb. 3-11:	Verteilung der Zellzyklusphasen an d4 bei Endothelzellen nach Kurzzeitbehandlung	37
Abb. 3-12:	Der Effekt von Glafenin-HCl auf das Migrationsvermögen von glatten Muskelzellen mit und ohne PDGF-Stimulation	38
Abb. 3-13:	Analog zum freigesetzten LDH im Kulturmedium dargestellte zytotoxische Wirkung von Glafenin-HCl auf glatte Muskelzellen	39
Abb. 3-14:	$\alpha$ -Actin-Färbungen von glatten Muskelzellen	40
Abb. 3-15:	Immunfluoreszenzfärbungen mit DAPI für die Zellkernfärbung und speziellen Fluoreszenzantikörpern gegen Tenascin	41

## Tabellenverzeichnis

Tab. 6-1:	Zellzahlen der Einfachkinetiken E1-E6, glatte Muskelzellen	54
Tab. 6-2:	Zellzahlen der Dauerkinetiken D1-D6, glatte Muskelzellen	55
Tab. 6-3:	Endothelzellzahlen an Tag 4	57
Tab. 6-3:	Koloniezahlen in den „wells“, Einfachkinetiken, glatte Muskelzellen	57
Tab. 6-4:	Koloniezahlen in den „wells“ (1-6), Dauerkinetiken, glatte Muskelzellen	60
Tab. 6-5:	Koloniezahlen in den einzelnen „wells“ 1-6 bei den Endothelzellen	63
Tab. 6-6:	Prozentuale Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen; Einfachkinetiken; glatte Muskelzellen	64
Tab. 6-7:	Prozentuale Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen; Dauerkinetiken; glatte Muskelzellen	65
Tab. 6-8:	Prozentuale Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen an Tag 4; Endothelkinetiken	66
Tab. 6-9:	Zahlen migrierter Muskelzellen pro Membraneinsatz an d4	66
Tab. 6-10:	LDH-Aktivitäten der Einfachkinetiken E1-3 an Tag 4.	67

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
EC	Endothelzellen
FACS	Durchflusszytometrie
Glafenin-HCl	Glafeninhydrochlorid
haSMC	Humane aortale glatte Muskelzellen
Kobi	Koloniebildungsassay
LDH	Lactatdehydrogenase
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
well	Plattenvertiefung beim Koloniebildungsassay

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Einführung**

Die Entwicklung einer Restenose nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) arterieller Obstruktionen ist ein bisher unzureichend gelöstes Problem. Obwohl zahlreiche stenosierende Gefäßkrankheiten durch Neuentwicklungen alternativer Kathedertechniken wie Stent, Laser- und Rotationsangioplastie primär besser behandelbar geworden sind, bleibt dennoch der Therapieerfolg entscheidend limitiert durch die Entwicklung lokaler Gefäßwandrezidive in 30-50% aller Eingriffe (1-6). Diese Restenosierungsrate wird sowohl bei den neueren interventionellen Maßnahmen als auch bei der klassischen Ballonangioplastie beobachtet (3, 6-10). Schon alleine in Hinblick auf die Ballondilatationen von Koronarstenosen (PTCA), von denen weltweit jährlich mehr als 500.000 Eingriffe durchgeführt werden (11), wird ersichtlich, dass die Thematik der Restenose nicht nur für Ärzte und Patienten, sondern auch für das Gesundheitssystem von großer Bedeutung ist: allein in den Vereinigten Staaten entstehen durch Restenose-bedingte Rezidive zusätzliche Behandlungskosten von rund 1,5 Milliarden US\$ pro Jahr (12).

Die Restenose ist ein komplexer pathophysiologisch ablaufender Prozess, der im folgenden Abschnitt kurz zusammengefasst wird.

## **1.2 Mechanismen der Restenosierung**

Die Restenosierung nach Angioplastie kann zellbiologisch und histologisch als segmental begrenzte Wundheilungsantwort auf eine Traumatisierung der Gefäßwand aufgefasst werden. Sie kündigt sich klinisch durch das Wiederauftreten typischer Beschwerden an. In der Angiographie kann im allgemeinen innerhalb von 6-12 Monaten ein dem klinischen Bild entsprechender Befund gesehen werden. Die Restenosemanifestation ist ein zeitbezogenes Phänomen mit einer maximalen Inzidenz 2-3 Monate nach initialer Behandlung. Eine weitere Zunahme der Restenoserate ist 4 bis 6 Monate nach einer Angioplastie in der Regel nicht mehr zu erwarten (13, 14). Dieser zeitliche Rahmen scheint auch für primär erfolgreiche Stentimplantationen nach Akutverschluss Gültigkeit zu

haben (15). Die Pathomechanismen der Restenoseformierung lassen sich in verschiedene Phasen untergliedern:

### **1) Elastic Recoil**

Lange Zeit wurde die Restenoseentwicklung nach Ballonangioplastie lediglich auf eine vermehrte Neointimaentwicklung zurückgeführt. In tierexperimentellen und Untersuchungen am Menschen konnte jedoch gezeigt werden, dass dem geometrischen Remodelling eine wesentliche Rolle bei der Restenoseentwicklung zukommt (29). Im Rahmen des geometrischen Remodelling spielt die Gefäßrückstellkraft (Elastic Recoil) eine entscheidende Rolle. Diese ist definiert als Differenz zwischen Gefäßdurchmesser bei inflatiertem Ballon und dem postinterventionellen Gefäßdurchmesser. Dabei ist das Ausmaß des Elastic Recoil abhängig von den plastischen Eigenschaften der Plaque und der Gefäßwand. Der Großteil des Elastic Recoil tritt innerhalb von 30 Minuten nach der PTA auf und kann mit einer Lumenreduktion bis zu 50% einhergehen (44).

### **2) Entzündung**

In dieser Phase kommt es zu einer Abfolge unterschiedlicher Ereignisse. Endotheliale und subendotheliale Strukturen, die wachstumshemmende Substanzen wie Heparine, EDGF, PGI<sub>2</sub> u.a. beinhalten, werden schwer traumatisiert. Dadurch fällt auch die natürliche Barrierenfunktion gegenüber den Plasmatitogenen weg (16-18). Das Aufbrechen der Gefäßplaques führt zu Exposition verschiedener thrombogener Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. von Kollagen und tissue factor (Thromboplastin). Besonders dem tissue factor scheint eine besondere Rolle bei der Initiierung von Gerinnungs- und Wachstumsvorgängen zuzukommen (19-21). Sind auch die Lamina elastica interna und insbesondere auch mediale Gefäßwandanteile von den Angioplastiemaßnahmen betroffen, resultiert eine umso ausgeprägtere proliferative Antwort mit späterer Stenosebildung (22, 23). Vor allem glatte Muskelzellen und Makrophagen sind dann mitogenen Faktoren und Proteasen aus dem Blut ausgesetzt. Wesentlich mitbeteiligt an der Thrombusbildung ist Thrombin als potentester Stimulator der Thrombozytenaggregation. Zusätzlich wirkt es mitogen auf glatte

Muskelzellen und stimuliert u.a. die endotheliale Produktion von PDGF (24). Letzteres wird auch von aktivierten Makrophagen gebildet, die unter anderem wachstumregulatorische Substanzen wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  produzieren (18, 25, 26).

### **3) Granulation**

Etwa 3 Tage nach Angioplastie setzt überlappend mit der Entzündungsphase die Phase der Granulation ein. Proteasen, wie Plasmin und Kollagenasen, bewirken eine Desintegration extrazellulärer Matrixstrukturen und fördern dadurch erste Migrationsvorgänge, vorwiegend von glatten Muskelzellen (16). In dieser Phase kommt es auch zu einer phänotypischen Modulation der glatten Muskelzellen, die als Grundvoraussetzung für deren mitogene und migratorische Stimulierbarkeit betrachtet wird (18, 30, 32). Bereits nach 24-72h setzt eine DNA-Synthese in den glatten Muskelzellen der Media ein. Diese wandern in den sub-endothelialen Raum und formieren fokale Zellanhäufungen unter Ausbildung einer verdickten Neointima (8, 17, 18, 23, 33-35).

Diese proliferativen und migratorischen Vorgänge sind entscheidend initiiert und stimuliert durch Wachstumsfaktoren und vasoaktive Peptide wie z.B. PDGF, bFGF, IGF, Angiotensin II (16, 18, 41).

### **4) Matrixbildung**

Überlappend mit der Phase der Granulation kommt es 1-2 Wochen nach Angioplastie zu einer beginnenden Induktion verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix, vermutlich TGF- $\beta$  vermittelt (8). Glatte Muskelzellen synthetisieren und sezernieren Matrixproteine wie Tenascin, Fibronectin, Kollagene und Proteoglykane, deren perizelluläre Anhäufung zu einer enormen Volumenzunahme der neu formierten Gefäßwandläsion führt (8, 27).

Somit ist die Bildung extrazellulärer Matrixproteine ein wesentlicher Faktor des Restenoseprozesses.

### **1.3 Pharmakologische Therapieansätze**

Bislang wurden im Rahmen der Restenoseforschung viele Untersuchungen mit unterschiedlichsten Substanzen durchgeführt. LEFKOVITS und TOPOL (38) veröffentlichten 1997 eine Übersichtsarbeit über verschiedene pharmakologische Therapieansätze. Zu den Substanzen mit zweifelhafter oder gar keiner Wirkung gehören demnach beispielsweise Aspirin, Antikoagulantien, ACE-Hemmer und HMG-CoA-Reduktasehemmer. Auf der anderen Seite wurden aussichtsreiche Substanzen vorgestellt, die möglicherweise das Potential haben, den Restenoseprozess günstig zu beeinflussen. Zu den antiproliferativen Substanzen zählen die Autoren Trapidil, Angiopeptin und Tranilast. Dabei zeigte das Antiallergikum Tranilast in einer Fallkontrollstudie eine signifikante Senkung der Restenoserate bei Patienten nach PTCA (39). Auch MIYAZAWA ET AL. (42) berichten über experimentelle Erfolge mit den Substanzen Pemirolast und Tranilast, die abhängig von ihrer Konzentration die Proliferation und Migration von SMCs hemmen. Ferner konnte auch die multizentrische TREAT-Studie (43) den präventiven Effekt von Tranilast nach PTCA zeigen: Die Restenoserate der behandelten Gruppe lag bei 14,7% versus 46,5% in der Placebogruppe. Doch leider haben neueste Ergebnisse im Rahmen der PRESTO-Studie (Prevention of Restenosis with Tranilast and ist Outcome) zu einem Abbruch des Multicenter Trials geführt (48).

### **1.4 Fragestellung**

Das Anthranilsäurederivat Tranilast konnte seine beachtliche Wirkung auf den Restenoseprozess sowohl in vitro als auch in vivo zeigen. Es stellt sich die Frage, ob weitere Vertreter der Anthranilsäurederivate nach dem Muster von Tranilast ebenfalls ähnliche Wirkungen auf das Proliferationsverhalten von glatten Muskelzellen aufweisen.

Für die nachfolgenden Experimente wird als ein weiterer Vertreter der Anthranilsäurederivate die Substanz Glafenin-Hydrochlorid (Glafenin-HCl) verwendet. Glafenin als auch Glafenin-HCl werden als systemische Analgetika im klinischen Bereich eingesetzt; die pharmakokinetischen Eigenschaften beider Stoffe sind gut bekannt.



Glafenin-HCl (Sigma, Deisenhofen, BRD) erscheint für Untersuchungen in vitro zweckmäßiger zu sein, da es durch die Hydrochloridgruppe ein besseres Löslichkeitsverhalten in Wasser zeigt.

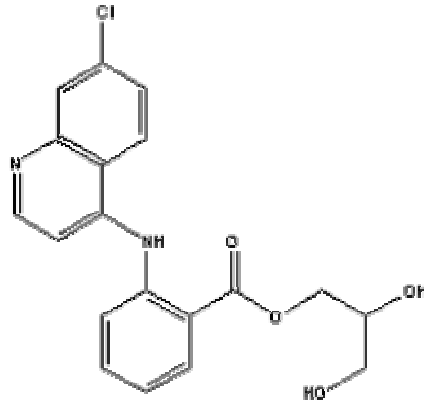


Abb. 1-1: Struktur von Glafenin

Im Laufe dieser Arbeit sind folgende Fragen zu klären:

- Wie ist das Proliferationsverhalten der SMCs in Abhängigkeit von der verabreichten Substanzkonzentration? Ist eine dauerhafte Wachstums-  
hemmung möglich?
- Wie beeinflusst Glafenin-HCl die klonogene Aktivität und den Zellzyklus  
der glatten Muskelzellen?
- Wie verhalten sich die Zellen unter den oben genannten Aspekten bei  
einer Kurzzeitapplikation (4 Tage) bzw. einer Langzeitapplikation (20  
Tage) der Substanz?
- Verändert sich der Aufbau des Zytoskeletts der SMCs? Wie verhält es  
sich mit der Synthese extrazellulärer Matrixproteine?
- Zeigt Glafenin-HCl auch Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und  
den Zellzyklus von Endothelzellen?
- Wie wirkt sich Glafenin-HCl auf das Migrationsvermögen glatter Muskel-  
zellen aus?
- Ist ein zytotoxischer Effekt der Substanz auf die Zellen zu beobachten?

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Bestandteile des Zellkultursystems**

#### **2.1.1 Zellen**

Für die Experimente werden humane aortale glatte Muskelzellen (haSMC) sowie Endothelzellen (EC) verwendet.

##### *2.1.1.1 HaSMC*

Die humanen aortalen glatten Muskelzellen (haSMC, CRL-1999, T/G HA VSMC) werden in der 20. Passage kommerziell erworben (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff bei -192°C gelagert und für jede Versuchsreihe neu aufgetaut, ausgesät und subkultiviert, so dass für jeden Versuchsansatz eine entsprechende Zellanzahl zur Verfügung steht.

##### *2.1.1.2 Endothelzellen*

Humane Endothelzellen (endothelial cells = EC) werden in der Passage 8 von PromoCell (Heidelberg bezogen). Diese werden ebenfalls bei -192°C aufbewahrt und analog den glatten Muskelzellen für die jeweiligen Versuchsreihen neu aufgetaut.

#### **2.1.2 Kulturmedium**

Das Kulturmedium dient einerseits der Ernährung der Zellen, zum anderen der Neutralisierung von Abfallprodukten über Puffersysteme.

##### *2.1.2.1 HaSMC*

Die Zusammensetzung des Kulturmediums für die haSMCs ist wie folgt:

- 40% Waymouth-Medium (Gibco BRL)
- 40% Nutrient Mixture F-12 Medium (Gibco BRL)
- 20% Fetales Kälberserum (FCS) (→ 2.1.3)
- je 5% Penicillin/Streptomycin- und L-Glutamin-Lösung (→ 2.1.4, 2.1.5)

In Vorversuchen zeigt sich, dass die haSMCs bei diesem Mischungsverhältnis ihr homogenstes Wachstumsverhalten haben.

### 2.1.2.2 Endothelzellen

Das Kulturmedium für die Endothelzellen besteht aus:

- 64% Waymouth-Medium (Gibco BRL)
- 16% Dulbecco's Mod Eagle Medium (Gibco BRL)
- 20% Fetales Kälberserum (FCS) (→ 2.1.3)
- je 1% Penicillin/Streptomycin- und L-Glutamin-Lösung (→ 2.1.4, 2.1.5)
- 1% ECGS (Becton Dickinson, Heidelberg)
- 50 µg Heparin pro ml Medium

### 2.1.3 Fetales Kälberserum (FCS)

Das FCS (Boehringer Mannheim, BR Deutschland) enthält wachstums- und proliferationsstimulierende Substanzen (u.a. PDGF, Insulin, Schilddrüsenhormone, Cortisol) und Vitamine. Es wird bei -20°C aufbewahrt und für jeden neuen Medienansatz aufgetaut.

### 2.1.4 Antibiotika

Um das Risiko der Keimvermehrung nach einer möglichen Kontamination der Zellkultur gering zu halten, wird dem Kulturmedium eine Antibiotika-Kombination (Biochrom KG seromed®, Berlin, BR Deutschland) hinzugegeben. Diese besteht aus 10.000 µg Streptomycin/ml und 10.000 I.E. Penicillin G/ml, das bei -20°C gelagert und kurz vor dem Ansatz eines neuen Kulturmediums aufgetaut wird.

### 2.1.5 L-Glutamin

Glutamin, eine essentielle Aminosäure, wird im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C schneller abgebaut als die übrigen Aminosäuren. Daher wird dem Kulturmedium zusätzlich 1%iges L-Glutamin (Gibco BRL) hinzugefügt. Die Aufbewahrung des L-Glutamin erfolgt bei -20°C und es wird erst bei der Aufbereitung eines neuen Kulturmediums aufgetaut.

### **2.1.6 Trypsin**

Um die Zellen der Kultur für weitere Versuchsschritte verarbeiten zu können, müssen diese vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Hierzu dient das Enzym Trypsin, das die Bindungskräfte der Adhäsionsmoleküle schwächt. Die Zellen können sich somit von der Kulturflasche lösen und anschließend im Kultur-Medium-Gemisch durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt werden. Die Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco-BRL) besteht aus 0,5 g/l Trypsin sowie 0,2 g/l EDTA in Pucks Salzlösung A. Die Lösung wird bei -20°C gelagert und kurz vor der Verwendung aufgetaut.

### **2.1.7 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

Um vor weiteren Versuchsschritten unerwünschte Reste des Kulturmediums oder sonstiger Lösungen zu entfernen, dabei aber gleichzeitig das Wachstumsmilieu der Zellen so wenig wie möglich zu beeinträchtigen, wird eine phosphatgepufferte Salzlösung verwendet (Gibco-BRL).

### **2.1.8 Salzsäure**

Bei Nichtverwendung des Kulturmediums über einige Tage reagiert dieses mit dem Sauerstoff der Luft und wird alkalisch. Um pH-Wert-bedingte Veränderungen der Wachstumsbedingungen in der Zellkultur zu vermeiden, wird bei einer eingetretenen Alkalisierung des Kulturmediums dieses mit steril filtrierter 1N Salzsäure titriert. Dabei verfärbt sich der pH-Indikator im Kulturmedium von rot (alkalisch) hin zu orange (Normbereich, pH 7-7,5).

### **2.1.9 Glafenin-Hydrochlorid**

Über 4-tägige Vorversuche mit haSMCs (analog 2.3.1) werden 3 verschiedene Konzentrationen von Glafenin-HCl bestimmt, die das Wachstumsverhalten der Zellen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen sollen. Dabei ergeben sich folgende Konzentrationen:

- 10 µmol/L (geringe wachstumshemmende Wirkung)
- 50 µmol/L (mittlere wachstumshemmende Wirkung)
- 100 µmol/L (hohe wachstumshemmende Wirkung)

Die Substanz wird in Aqua dest. aufgelöst, steril gefiltert und unter sterilen Bedingungen zu den jeweiligen Konzentrationen in Eppendorf-Gefäße (je 1000 µl) überführt. Die Gefäße werden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

## **2.2 Methoden der Zellkultur**

### **2.2.1 Keimfreiheit**

Arbeitsschritte, die eine keimfreie Versuchsumgebung voraussetzen, werden unter einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt. Der Arbeitsplatz sowie die benötigten Hilfsgegenstände werden vor Versuchsbeginn 30 Min. lang mit UV-Licht bestrahlt. Nachträglich in das Arbeitsfeld eingebrachte Utensilien werden mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Für die jeweiligen Arbeitsschritte stehen sterile Einwegbehälter/-pipetten zur Verfügung.

### **2.2.2 Kultivierung der Zellen**

Nach dem Auftauen der haSMCs werden jeweils 100.000 Zellen mit 5 ml Kulturmedium in 25 cm<sup>2</sup> große Kulturflaschen ausgesät (Falcon, Heidelberg, BR Deutschland). An den Tagen 1 und 4 nach der Aussaat werden Medienwechsel durchgeführt, um zelltoxische Abfallprodukte, wie beispielsweise Ammoniak, zu entfernen und mit dem frischen Medium wieder optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu schaffen. Dabei wird mit sterilen Einweg-Pasteurpipetten das alte Medium abgesaugt und 5 ml von frisch hergestelltem, 37°C warmen Kulturmedium mit einer neuen Pipette hinzugegeben. Bevor der Medienwechsel stattfindet, wird unter dem Durchlichtmikroskop die Anwachsrate der Zellen beurteilt. Sollte diese unter 80% liegen, werden die Zellen aus Qualitätsgründen verworfen. Ebenso wird bei etwaigen Kontaminationen oder degenerativen Veränderungen der haSMCs verfahren.

Die Kultivierung der humanen Endothelzellen erfolgt in speziell mit Kollagen I beschichteten Kulturflaschen (Biocoat, Falcon). Der Medienwechsel und die Qualitätskriterien unterm Lichtmikroskop erfolgen ähnlich wie bei den glatten Muskelzellen.

### **2.2.3 Brutschrank**

Die verwendeten Brutschränke (Heraeus, Osterode, BR Deutschland) zur Aufbewahrung der Zellkulturen gewähren eine optimale Wachstums Umgebung für die Zellen. In diesen herrscht fortlaufend eine Temperatur von 37°C, eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% und der Feuchtigkeitsgrad liegt über 95%. Die Brutschränke werden nur zur zügigen Entnahme der für das jeweilige Experiment benötigten Zellen bzw. zur Lagerung, Inkubation und Weiterbebrütung geöffnet.

### **2.2.4 Subkultivierung**

An Tag 7 nach Aussaat der Zellen wird eine Subkultivierung (Passage) durchgeführt, um Zellkonfluenz zu vermeiden. Bei einer zu hohen Zelldichte würde das weitere Zellwachstum durch Kontaktinhibition der Zellen untereinander gehemmt werden. Außerdem ist die Mediummenge von 5 ml pro Kulturflasche nicht mehr ausreichend für die Ernährung der Zellen.

Bei der Subkultivierung wird in der Kulturflasche zunächst das alte Medium mit einer Einwegpipette abgesaugt. Es folgt das vorsichtige zweimalige waschen der Kulturflasche sowie des Zellrasens mit je 5 ml PBS und jeweils anschließendem Absaugen, um im Medium enthaltene Reste von FCS zu entfernen, welche die Wirkung von Trypsin hemmen würden. Dann folgt die Gabe von 1 ml Trypsin, das den gesamten Zellrasen benetzen muss. Während der Inkubationszeit von 2-3 min. werden die Zellen in den Brutschrank gestellt, um optimale Wirkbedingungen zu ermöglichen. Die Einwirkdauer ist unbedingt einzuhalten, da bei einer längeren Zeitspanne das Trypsin intrazelluläre Schäden verursachen kann. Unter dem Mikroskop wird anschließend geprüft, ob sich die Zellen ausreichend vom Flaschenboden gelöst haben. Ist dies der Fall, erfolgt die Zugabe von 5 ml Medium, welches durch das darin enthaltene FCS die Wirkung des Trypsins aufhebt. Durch mehrmaliges Resuspendieren wird eine einheitliche Zellanzahl pro Volumeneinheit sicher gestellt. Die anschließende Zellzahlbestimmung erfolgt mit einer elektronischen Zählhilfe (Casy, Schärfe Systems, Reutlingen, BR Deutschland), welches die absolute Zellanzahl pro ml bestimmt. Beim letzten Schritt der Subkultivierung werden 10.000 Zellen in 5 ml Medium in eine neue Kulturflasche überführt.

### **2.2.5 Kryokonservierung**

Die Zellen werden analog einer Passage abtrypsiniert und die Zellzahl mit Hilfe der elektronischen Zählhilfe (Casy, Schärfe Systems, Reutlingen, BR Deutschland) bestimmt. Anschließend werden 100.000 Zellen der Suspension in 1ml Einfriermedium in ein zuvor auf Eis gestelltes Cryo-vial transferiert und mit einer Einfrierhilfe (Handy-Freeze, Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA) innerhalb einer Stunde auf -196°C fraktioniert abgekühlt.

### **2.2.6 Auftauen**

Die tiefgefrorene Zellsuspension wird in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und unter langsamer Zugabe von 37°C warmem, sterilen Medium in eine 25cm<sup>2</sup>-Falcon-Flasche befördert. Die langsame Zugabe des Mediums ist notwendig, um einer osmotischen Schädigung durch das Kryoprotektivum vorzubeugen. Anschließend werden die Zellen über 5-6 h im Brutschrank kultiviert. Danach wird die Anwachsrate lichtmikroskopisch bestimmt und der erste Medienwechsel vorgenommen.

### **2.2.7 DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)-Test**

Mit der DAPI-Routinefärbung werden die haSMCs und Endothelzellen auf Mykoplasmen untersucht. Bei Verdacht auf eine Verunreinigung wird die Probe verworfen.

#### *2.2.7.1 Versuchsablauf*

Etwa 40.000 Zellen werden in einer 6-Loch-Makroplatte (Falcon) unter Verwendung steriler Deckgläser mit 2 ml Medium zwei Tage lang im Brutschrank kultiviert. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit DAPI-Methanol-Lösung (Konzentration 0,05 µg/ml, Serva, Heidelberg, BR Deutschland) für 15-20 min. im Brutschrank inkubiert, dann je einmal mit Methanol und PBS gewaschen und danach in Medium eingebettet.

### 2.2.7.2 Funktion des Tests

DAPI bildet einen Komplex mit doppelsträngiger DNA. Unter UV-Licht-Anregung stellen sich die im Zytoplasma befindlichen Mykoplasmen im Fluoreszenzmikroskop als blau leuchtende Punkte dar.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Proliferationskinetik

#### 2.3.1.1 HaSMC

##### a) Einfachkinetik

Bei der Einfachkinetik werden je 30.000 humane aortale glatte Muskelzellen der Passage 21 oder 22 an Tag -2 in die Kulturflaschen ausgesät. Hinzu kommt jeweils 5 ml steriles Kulturmedium. Anschließend werden die Kulturflaschen im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C aufbewahrt. Zwei Tage später, am Tag 0, wird ein Medienwechsel durchgeführt und analog der Methode der Subkultivierung die Zellzahl bestimmt. Während bei der Kontrollzelllinie ein erneuter Medienwechsel durchgeführt wird, erhalten die Behandlungszelllinien zusätzlich zum frischen Kulturmedium die für den jeweiligen Konzentrationsansatz erforderliche Menge an Glafenin-HCl. Nach einer weiteren Zeit im Brutschrank werden am Tag 4 nochmals die Zellzahlen bestimmt und ein Medienwechsel bei allen Kulturflaschen durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass Glafenin-HCl nun nicht mehr zum Einsatz kommt und alle Kulturflaschen ausschließlich normales Kulturmedium erhalten. An den Tagen 8, 12, 16 und 20 erfolgen analog dem Tag 4 Medienwechsel und es werden die Zellzahlen bei allen Zelllinien bestimmt.

##### b) Dauerkinetik

Die Dauerkinetik erfolgt analog der Einfachkinetik, mit dem Unterschied, dass die Behandlungszelllinien an den Tagen 4, 8, 16 beim Medienwechsel weiterhin die für den jeweiligen Konzentrationsansatz benötigte Menge an Glafenin-HCl erhalten. Glafenin-HCl kann somit über einen Zeitraum von 20 Tagen auf die Zellen einwirken.



### 2.3.1.2 *Endothelzellen*

Die Aussaat der Endothelzellen der Passage 8 erfolgt ebenfalls an Tag -2 mit initial 30.000 Zellen pro Kulturflasche. Die weitere Vorgehensweise entspricht dem Ablauf der Einfachkinetik (→ 2.3.1.1 a)). Am Tag 4 wird die Zellkultur beendet.

## 2.3.2 **Koloniebildungsassay (Kobi)**

### 2.3.2.1 *HaSMC*

Die klonogene Aktivität der Zellen wird mit Koloniebildungsassays bestimmt. An den Tagen 4, 8 und 20 werden sowohl bei den Einfach- als auch Dauerkinetiken pro Behandlungskonzentration 2 Platten mit jeweils 6 Vertiefungen für Kobis verwendet (6-well-Platte, Multiwell™ 6 Well, Falcon, Becton Dickinson). Die Zellen werden in einer Dichte von 500/well in 2 ml Medium ausgesät und 10 Tage lang im Brutschrank aufbewahrt. Nach 10 Tagen werden die Kobis mittels Absaugen des Kulturmediums und Abwaschen der Zellen mit PBS gestoppt. Anschließend wird der Zellrasen mit 3,7%iger Formaldehydlösung und 70%igem Ethanol fixiert. Nach eintägigem Trocknen der Platten werden die Zellen mit Coomassie-Blau gefärbt.

Die Auswertung der Kobis erfolgt lichtmikroskopisch. Zellformationen, die mehr als 50 Zellen beinhalten, gelten als eine Kolonie. Sie repräsentieren Zellen, die überlebensfähig sind. Zellansammlungen von unter 50 Zellen oder einzelstehende Zellen sind subletal bzw. letal geschädigt (37).

### 2.3.2.2 *Endothelzellen*

Die Methodik entspricht derjenigen für die haSMCs (→ 2.3.2.1). Es werden jedoch nur Kobis für den Tag 4 angefertigt. Ein weiterer Unterschied ist, dass pro Behandlungskonzentration nur eine 6-well-Platte behandelt wird.

### 2.3.3 Zellzyklusanalyse und DNA-Gehalt

#### 2.3.3.1 Prinzip der flusszytometrischen Messung (FACS)

CRISSMAN ET AL. (28) entwickelten 1975 eine Methode zur Analyse von Säugerzellen. Dabei macht man sich die Eigenschaft chemischer Verbindungen zu Nutze, die, nachdem sie auf ein höheres Energieniveau gehoben wurden, wieder in den Grundzustand übergehen und den Energieunterschied in Form von Licht aussenden. Diesen Effekt bezeichnet man als Fluoreszenz. Dieses Prinzip wird bei der flusszytometrischen Messung angewendet. Die markierten Zellkerne können sowohl quantitativ als auch qualitativ erfasst werden, wobei die Zellkerne in einer Kapillare einzeln an einem Laser vorbeigeführt werden. Das emittierte Licht wird über einen Bandenfilter getrennt und von verschiedenen Photodetektoren gemessen.

#### 2.3.3.2 Lösungen und Antikörper

- *Stop-Medium*

Das unsterile Stop-Medium dient zur Inaktivierung des Trypsins bei der Aufarbeitung der Zellen für die Zellzyklusanalyse. Es besteht aus jeweils 45% Waymouth- und Nutrient Mixture F-12 Medium und zu 10% aus fetalem Kälberserum (FCS).

- *Bromdesoxyuridin (BrdU) –Lösung*

Durch Zugabe von DMEM zur 40 mmolaren BrdU-Lösung wird eine 10 mmolare Lösung hergestellt. Um eine Endkonzentration von 10 µMol in den Kulturflaschen zu erhalten, werden 10 µl der Verdünnung zu 5 ml Medium hinzupipetiert.

- *PBS/BSA*

Der phosphatgepufferten Salzlösung („phosphat buffered saline“; PBS) wird 1%iges BSA (Albumin-Fraktion V, Serva) hinzugefügt.

- *Pepsinlösung*

Intrazelluläre Bestandteile wie z.B. Proteine können zu unspezifischen Antikörperbindungen und somit zu falschen Messergebnissen führen. Deshalb müssen sie durch das Enzym Trypsin aus der Probe entfernt werden (31). Für die Pepsinlösung werden 0,5 g Pepsin (Merck, Darmstadt, BR Deutschland) mit einer Konzentration von 70 FIP-U/g in 1 N HCl und 95 ml Aqua dest. gelöst.

- *Salzsäure (HCl)*

Der Anti-BrdU-AK kann an das in die DNA eingebaute BrdU nur dann binden, wenn die DNA in denaturierter Form vorliegt. Dazu wird eine 2 N HCl verwendet.

- *Antikörper (AK)*

Die indirekte Nachweismethode des BrdU-Einbaus (36) erfordert zwei verschiedene AK:

- Der Anti-BrdU-AK, ein monoklonaler Maus-IgG-AK (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) markiert das in die DNA eingebaute BrdU
- Der zweite AK, ein monoklonaler Kaninchen-IgG-AK (Dako, Hamburg, BR Deutschland), ist mit Fluoreszein Iso Thio Cyanat (FITC) versehen und kann den ersten AK markieren. Beide AK werden mit PBS/BSA verdünnt.

- *Propidiumiodid-Lösung*

Die Propidiumiodid-Stammlösung wird durch die Zugabe von PBS auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt.

- *RNAse*

Propidiumiodid wird in doppelsträngige RNA und DNA gleichermaßen eingebaut und kann dadurch den DNA-Messwert verfälschen. Aus diesem Grund wird die RNA durch das Enzym RNAse entfernt. Die Stammlösung (1 mg/ml, Sigma) wird mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt.

- *Propidiumiodid-RNase*

Der 1 mg/ml konzentrierten Stammlösung wird 2%ige RNase zugesetzt.

### 2.3.3.3 *Methodik der Durchflusszytometrie*

Bei den *haSMCs* werden Zellzyklusanalysen an den Tagen 4, 8, und 20 durchgeführt. Die *Endothelzellen* werden bezüglich des Zellzyklus an Tag 4 beurteilt. Die zu untersuchenden Zellkulturen werden eine Stunde lang mit jeweils 10 µl 10 mmolarer BrdU-AK-Lösung im Brutschrank inkubiert. Nach 60 min. wird das alte Medium zusammen mit der BrdU-Lösung abgesaugt und anschließend 1 ml 1%iger Trypsinlösung hinzugegeben. Nach 2-3 Minuten Inkubationszeit haben sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Etwa 5 ml Stop-Medium kommen hinzu, und die *haSMCs* werden vereinzelt, suspendiert und in ein Sarsted®-Röhrchen überführt. Nach dreiminütigem Zentrifugieren bei 200 G wird der Überstand dekantiert, der Bodensatz mit 3 ml PBS resuspendiert und danach erneut 3 Minuten bei 200 G zentrifugiert. Anschließend wird wieder der Überstand dekantiert und der verbliebene Bodensatz mit 200 µl 70%igem Alkohol gründlich resuspendiert. Die Proben werden bei -20°C für die Aufbereitung aufbewahrt.

Vor der Durchführung der durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen zuerst mit 3 ml PBS resuspendiert und gewaschen, dann mit 275 G für sechs Minuten zentrifugiert; der Überstand wird verworfen. Bei der weiteren Aufarbeitung werden die Zellen nach jeder Zugabe von Lösungen oder Antikörpern durch vortexen (Reax 2000, Heidolph, Kehlheim, BR Deutschland) vereinzelt.

Zunächst werden die Zellen mit 1 ml RNase für 10 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, mit PBS gewaschen und für 6 min. zentrifugiert. Im Anschluss daran stellt man die *haSMCs* mit 1 ml Pepsin für 10 min. ins zuvor auf 37°C erwärmte Wasserbad und danach zum Stoppen der enzymatischen Verdauung für 5 min. auf Eis (0°C). Anschließend erfolgt erneut ein Waschschrift mit PBS mit Zentrifugation, dann werden die Zellen mit 1 ml 2 N HCl für 10 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Diesem Procedere schließen sich 2 Waschschriffe mit jeweils folgender Zentrifugation an, bevor die Zellen dann mit PBS/BSA gewaschen und zentrifugiert werden. Anschließend werden 200µl des ersten AK auf die Proben pipettiert und diese bei Raumtemperatur sowie Lichtabschluss für

30 min. gelagert. Als Negativkontrolle wird bei einer Probe kein ‚erster AK‘ verwendet. Später wird wieder ein Waschschriff und eine Zentrifugation durchgeführt. Daraufhin werden 200µl des zweiten AK unter gleichen Bedingungen (30 min. Inkubation bei RT, Lichtabschluss) auf die Proben pipettiert. Es erfolgt ein erneuter Waschschriff mit 500µl Propidiumionid-Lösung und anschließender Zentrifugation. Abhängig von der Anzahl der Zellkerne wird daraufhin mit 200-500 µl Propidiumionid-RNase unter Lichtabschluss bei 4°C für 15 min. inkubiert. Durch diese Schritte werden die Zellkerne isoliert, das in die DNA eingebaute BrdU indirekt mit FITC (Fluorescein) Kaninchen-Antimaus-Antikörpern (DAKO, Hamburg, BR Deutschland) markiert und die DNA durch Propidiumiodid angefärbt. Die abschließende Messung erfolgt an einem FACSort-Gerät (Becton Dickinson) mit dem Zellanalyseprogramm ‚Cell-Quest 1.1.1™‘, wobei  $10^4$  Kerne mit einer Flussgeschwindigkeit von 150 Kerne/sec. gemessen werden.

#### 2.3.3.4 Auswertung

Das FACS-Gerät verwendet einen 488nm Argonlaser. Die im roten Spektrumbereich liegende Lichtemission des angeregten Propidiumiodid wird über einen 578/28 nm-Bandenfilter gebündelt und als relativer DNA-Gehalt auf der Abszisse des Schaubilds aufgetragen, wohingegen die grüne Fluoreszenz vom FITC über einen 530/30 nm-Bandenfilter gesammelt und auf der Ordinate abgebildet wird. Die einzelnen Zellzyklusfraktionen (G1-, S-, G2/M-Phase) werden umrandet und als prozentuale Anteile angegeben.

#### 2.3.4 Migrationstest

Das Migrationsvermögen der glatten Muskelzellen wird in einer „24-well compound-Platte“ (Falcon Becton Dickinson) mit Membraneinsätzen (8 µm Porengröße, 0.31 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Falcon) untersucht. Die abtrypsinierten Zellen werden nach eintägiger Behandlung mit Glafenin-HCl (Konzentrationen K, A, B, C) mit einer Zelldichte von 310.000 Zellen/ml in die Membraneinsätze mit insgesamt 0,5 ml Zellkulturmedium ausgesät. 0,8 ml Medium wird in die untere Kammer eingebracht. Eine Gruppe erhält 25 ng/ml PDGF-BB (R&D Systems, Wiesbaden, BRD) in die untere Kammer, um die Stimulation der Zellen nach PTA zu imitieren, während die andere Gruppe kein PDGF erhält. Die Platten

werden anschließend für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Membraneinsätze mit den Zellen nach mechanischer Säuberung der Membranoberseite mit PBS gewaschen, dann 10 Minuten lang in 3,5%igem Formaldehyd und 10 Minuten in 70%iger Ethanollösung fixiert. Die Zellen an der Membranunterseite werden lichtmikroskopisch unter 100-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl eines Membraneinsatzes wird berechnet anhand der gezählten Zellen auf 2 Diagonalen à 16 Quadrate, also insgesamt 32 Quadrate (1 Quadrat = 0,0625 mm<sup>2</sup>, 32 Quadrate = 2 mm<sup>2</sup>).

### **2.3.5 LDH-Test**

Der LDH-Test zur Quantifizierung von Zellysevorgängen basiert auf einem Standardprotokoll der Fa. Roche (Mannheim, BRD). Es wird in einem maschinell automatisierten Verfahren die Aktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) ausgewertet, das vom Zytosol geschädigter Zellen ins Medium freigesetzt wird. Die LDH-Konzentrationen im Medium der behandelten Zellen werden mit den LDH-Konzentrationen der Kontrollgruppen verglichen.

### **2.3.6 $\alpha$ -Actin Färbung**

Es werden 20.000-150.000 Zellen pro well in 6-well-Platten mit steril eingebrachtem Deckglas ausgesät und 2 bis 4 Tage kultiviert. Danach wird das verbrauchte Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und dann bei -20°C 10 min. mit Methylalkohol fixiert. Nun wird erneut zweimal mit PBS gewaschen und 8  $\mu$ l des ersten Antikörpers (Maus anti- $\alpha$ -Actin Antikörper) in 150  $\mu$ l PBS hinzugegeben und 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wiederum zweimaliges Waschen mit PBS und Zugabe von 1  $\mu$ l des zweiten Antikörpers (anti-Maus-Alexa 488) in 150  $\mu$ l PBS, dann 30-minütige Inkubation bei 37°C. Abschließend werden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und lichtmikroskopisch ausgewertet.

### **2.3.7 Tenascin Immunofloreszenzfärbung**

Die Synthese extrazellulärer Matrixproteine ist einer der Hauptgründe der pathologischen Restenose nach PTA.

Zum Nachweis dieser Proteine werden zunächst humane glatte Muskelzellen auf Deckgläsern in 6-well-Platten kultiviert und mit Glafeninhydrochlorid über 4 Tage behandelt. Die Zellproben werden mit Methanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min. lang fixiert und permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Primärantikörper gegen Tenascin (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) über 30 min. inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit einem sekundären Fluorochrom-markierten Anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Eugene, USA) über nochmals 30 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Dann wird 4',6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI, Sigma) (ein fluoreszierender Farbstoff, der reversibel an DNA bindet), verdünnt in Methanol, für 15 min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  hinzugegeben. Abschließend wurden die Proben in Mounting-Medium eingebettet und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

## **2.4 Statistik**

### **2.4.1 Proliferationskinetik**

Bei den glatten Muskelzellen (SMC) erstreckt sich jede Kinetikreihe über 20 Tage. An allen Messtagen werden sowohl für die Kontroll- als auch Konzentrationsgruppen jeweils die Zellzahl aus einer entsprechenden Kulturflasche bestimmt. Insgesamt ergeben sich Daten aus 6 Einfachkinetiken (E1-E6) und 6 Dauerkinetiken (D1-D6). Jede Kinetik wird in 4 Untergruppen aufgeteilt:

- K (Kontrollgruppe)
- A ( $10\text{ }\mu\text{M}$ , minimale Hemmkonzentration)
- B ( $50\text{ }\mu\text{M}$ , mittlere Hemmkonzentration)
- C ( $100\text{ }\mu\text{M}$ , hohe Hemmkonzentration)

Die Versuche mit den Endothelzellen (ENDO) dauern 4 Tage. Es werden 3 Kinetiken mit den Bezeichnungen EN1 - EN3 durchgeführt. Auch hier wird wie bei den glatten Muskelzellen jede Kinetik in 4 Untergruppen (K, A, B, C) unterteilt.

Zellart	Kinetik	Kinetiknummer	Konzentration	Tag
haSMC	E	1, 2, 3, 4, 5, 6	K, A, B, C	0, 4, 8, 12, 16, 20
haSMC	D	1, 2, 3, 4, 5, 6	K, A, B, C	0, 4, 8, 12, 16, 20
EC	EN	1,2,3	K, A, B, C	0, 4

*Tabelle 2-1: Übersicht der Proliferationskinetiken*

#### **2.4.2 Koloniebildungsassays (Kobi)**

Bei den glatten Muskelzellen werden von allen Einfach- und Dauerkinetiken an den Tagen 4, 8 und 20 Koloniebildungsassays angefertigt. Für jede Kinetik ergeben sich pro Kontrolle und Konzentration die Koloniezahl aus dem Mittelwert von jeweils einer Platte mit 6 Vertiefungen.

Die Kobis bei den Endothelzellen beschränken sich auf den Tag 4. Hier werden pro Kontrolle und Konzentration ebenfalls 6 Vertiefungen unter dem Mikroskop ausgezählt.

#### **2.4.3 Zellzyklusanalyse (FACS)**

An den Tagen 4, 8 und 20 werden aus 3 Einfachkinetiken (E1, E2, E3) sowie 3 Dauerkinetiken (D1, D2, D3) glatte Muskelzellen aus den Kulturflaschen entnommen. Nach entsprechender Aufbereitung der Zellen werden von den Kontroll- sowie Konzentrationsfraktionen eine definierte Anzahl an Zellkernen maschinell auf ihre Zellzyklusphase (G1-, S-, G2/M-Phase) hin untersucht und das Ergebnis als Prozentanteil der jeweiligen Kinetik angegeben.

Bei den Endothelzellen werden an Tag 4 aus zwei Endothelkinetiken die Zellzyklusphasen bestimmt.

#### **2.4.4 Migrationstest**

Es wird die Migration der glatten Muskelzellen untersucht. Bei allen Einfachkinetiken wird an Tag 4 jeweils ein Membraneinsatz pro Kinetik und Konzentration lichtmikroskopisch ausgewertet.



#### **2.4.5 LDH-Test**

An Tag 4 wird die LDH-Aktivität der glatten Muskelzellen untersucht. Bei drei Einfachkinetiken werden pro Kinetik und Konzentration in einem automatisierten Verfahren 3 Werte gemessen. Die arithmetischen Mittelwerte sind dabei proportional zur Zytotoxizität. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wird gleich 0 % Zytotoxizität gleichgesetzt.

#### **2.4.6 $\alpha$ -Actin-Färbung**

Um den Einfluss von Glafenin-HCl auf das Zytoskelett zu untersuchen, werden von den verschiedenen Konzentrationsgruppen  $\alpha$ -Actin-Färbungen durchgeführt, die unter dem Lichtmikroskop morphologisch untersucht werden.

#### **2.4.7 Tenascin Immunofloreszenzfärbung**

Die extrazellulären Matrixproteine, deren Synthese ein wesentlicher Restenosefaktor darstellt, können unter dem Immunfluoreszenzmikroskop veranschaulicht werden.

#### **2.4.8 Statistische Analysen**

Die erhobenen Daten sind in den Schaubildern größtenteils als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  zugehörige Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet. Unterschiede werden als statistisch signifikant gewertet bei  $P < 0,05$ .

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse der Proliferationskinetik

##### 3.1.1 Einfachkinetik

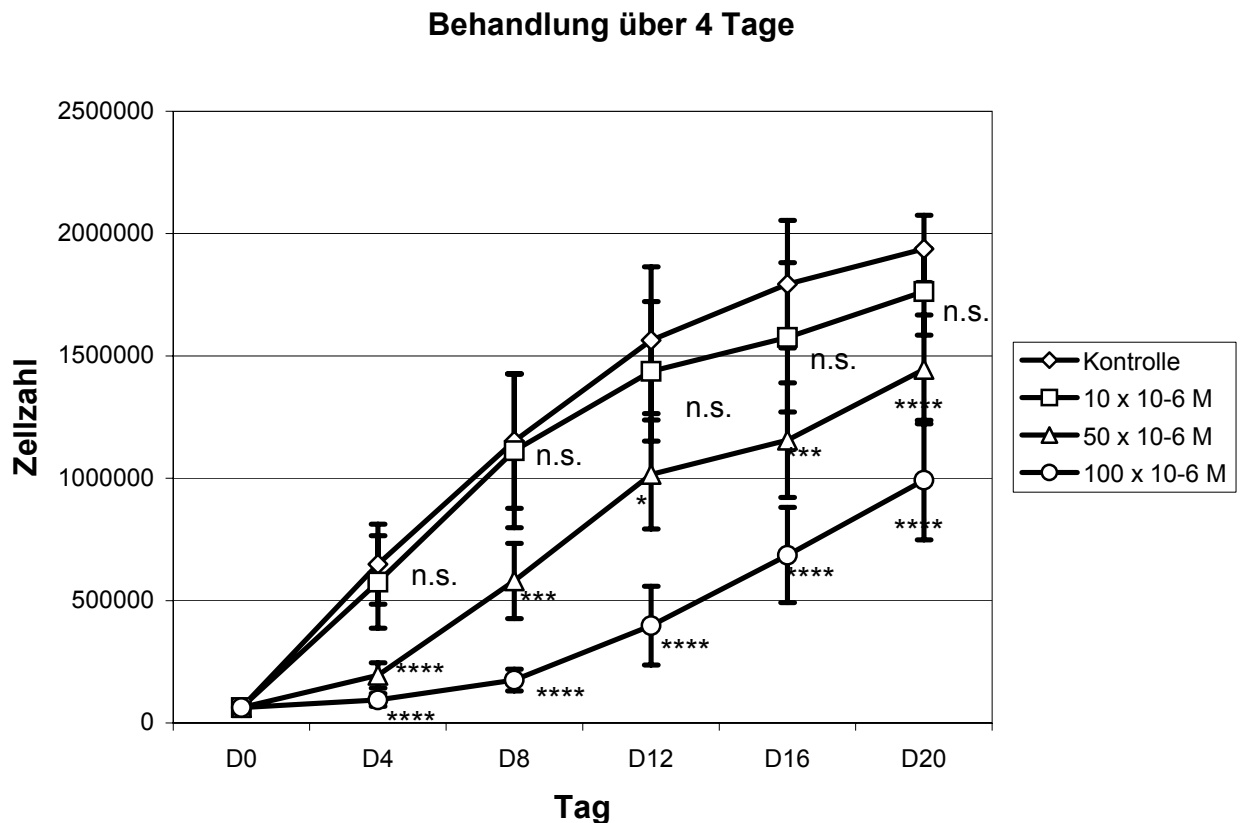


Abb. 3-1: Zellzahlmittelwerte der glatten Muskelzellen bei Kurzzeitbehandlung (Einfachkinetiken E1-E6) über 4 Tage. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

##### Kontrollgruppe:

Die unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe zeigen in den ersten 8 Tagen ein nahezu lineares Wachstumsverhalten ( $\rightarrow$  Abb. 3.1). In dieser Zeit können sich die Zellen fast ungehemmt vermehren, da die Kulturflasche noch genügend Wachstumsfläche bietet. An den folgenden Messtagen strebt die Wachstumskurve asymptotisch einem Grenzwert zu, der bei etwa 2 Mio. Zellen liegt. Die-

ses Verhalten ist auf die zunehmende Kontaktinhibition der Zellen in der räumlich begrenzten Kulturflasche zurückzuführen.

Insgesamt zeigen die glatten Muskelzellen der Kontrollgruppe einen charakteristisch sigmoiden Wachstumsverlauf.

#### Konzentrationsgruppe A (10 $\mu$ M):

Als Gruppe mit der minimalen Hemmkonzentration fallen die Zellzahlen ähnlich denen bei der Kontrollgruppe aus. In der graphischen Darstellung ( $\rightarrow$  Abb. 3-1) erkennt man durchgehend eine etwas niedrigere mittlere Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch liegen die Messdaten sehr nahe denen der Kontrollgruppe und sind nicht signifikant verschieden.

#### Konzentrationsgruppe B (50 $\mu$ M):

Wie bereits durch die Vorversuche zur Testung der verschiedenen Hemmkonzentrationen untersucht, ist erwartungsgemäß die Zellzahl an Tag 4 nach Applikation der mittleren Konzentration kaum höher als zum Startzeitpunkt d0 ( $\rightarrow$  Abb. 3-1). Doch bereits an Tag 8 zeichnet sich ein deutlicher Erholungseffekt der Zellen ab, die Zellzahl nimmt um mehr als das Doppelte zu. Dieser Trend setzt sich auch an Tag 12 fort. An den Folgemessstagen 16 und 20 nimmt die Zellzahl nicht mehr so sprunghaft zu, es ist mit einer beginnenden Kontaktinhibition der Zellen zu rechnen. Die Messdaten sind im Vergleich zur Kontrollgruppe durchweg signifikant erniedrigt.

#### Konzentrationsgruppe C (100 $\mu$ M):

Während an Tag 4 und Tag 8 die Proliferationskurve sehr flach verläuft ( $\rightarrow$  Abb. 3-1) und die Zellzahl sich nur wenig von der an Tag 0 unterscheidet, beobachtet man an Tag 12 erneut den sprunghaften Anstieg der Zellzahl auf etwa das Doppelte des vorherigen Messtages. Auch hier ist an den Folgetagen ein deutlicher Erholungseffekt der Zellen sichtbar, die Wachstumskurve nimmt einen nahezu linearen Verlauf an.

Zeichen einer Kontaktinhibition der Zellen im Sinne eines asymptotischen Verlaufes konnten an Tag 20 noch nicht beobachtet werden. In dieser Konzentra-

tionsgruppe waren alle Werte - verglichen mit der Kontrollgruppe - hoch signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.2 Dauerkinetik

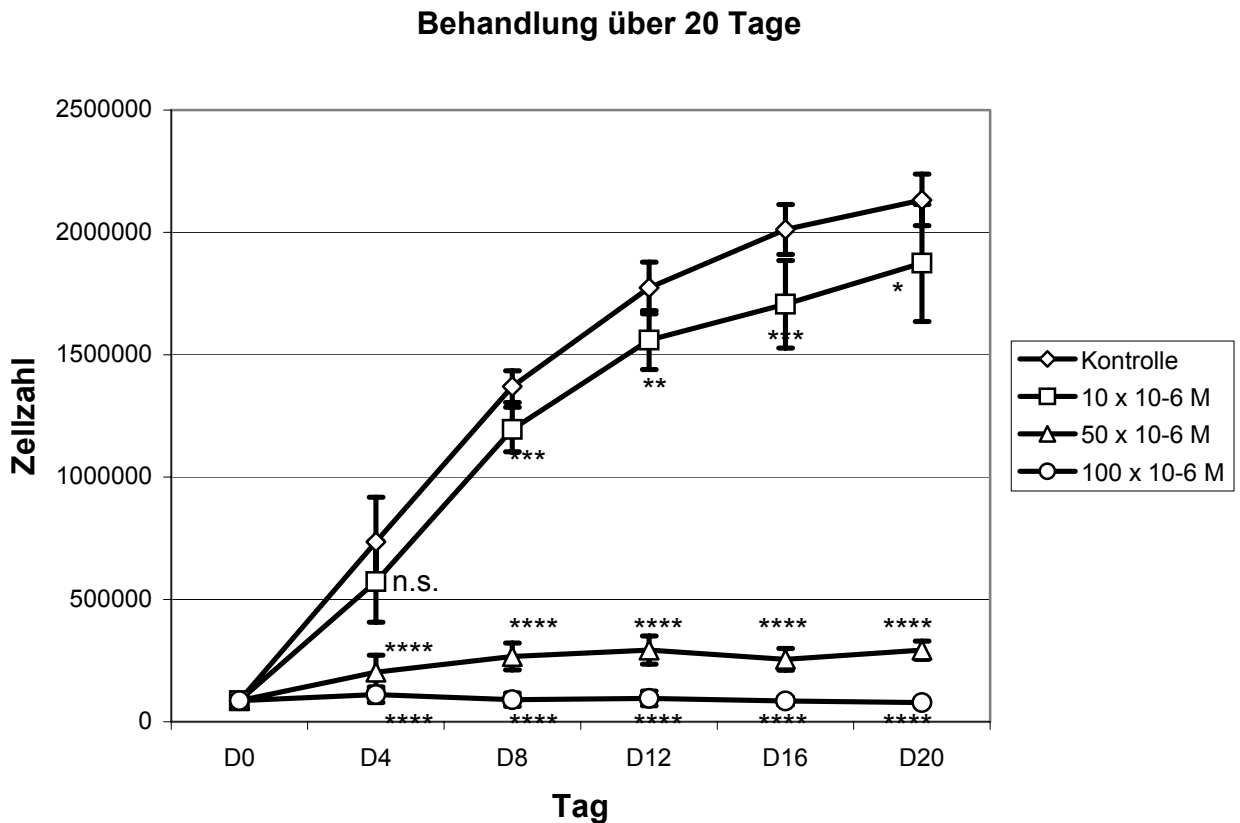


Abb. 3-2: Zellzahlmittelwerte der glatten Muskelzellen bei Langzeitbehandlung (Dauerkinetiken D1-D6) über 20 Tage. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

#### Kontrollgruppe und Konzentrationsgruppe A (10 $\mu$ M)::

Es ergibt im Vergleich zu der Einfachbehandlung keine Änderung des Wachstumsverhaltens der glatten Muskelzellen in der Kontrollgruppe.

Obwohl die Kurven der Kontrollgruppe und der Gruppe A etwas weiter auseinander liegen, zeigt sich hier ein fast gleicher Verlauf wie bei der Einfachbehandlung. Auch die Dauerbehandlung kann also unter dieser niedrigen Hemmdosis keine ernsthafte Wachstumshemmung erzielen. Jedoch sind die Signifikanzen

der Gruppe A im Gegensatz zur Einfachbehandlung etwas deutlicher ausgeprägt.

Konzentrationsgruppen B (50  $\mu$ M) und C (100  $\mu$ M):

Bei beiden Gruppen ist eine signifikante Wachstumshemmung zu beobachten. Die Zellzahlen der Gruppe B steigen verlangsamt bis zum Tag 8 auf etwa das Doppelte vom Ausgangswert, um dann mehr oder weniger bis zum Tag 20 auf dem ungefähr selben Niveau zu bleiben. Bei der Gruppe C erkennt man einen minimalen Anstieg der Zellzahl an Tag 4, an Tag 8 fällt die Zellzahl jedoch wieder auf das Ausgangsniveau herab. In den folgenden Messtagen bis einschließlich Tag 20 ergeben sich keine wesentlichen Änderungen der Zellzahl.

Die Werte sind für beide Gruppen durchweg hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.3 Vergleich der Kinetiken an Tag 20 (glatte Muskelzellen)

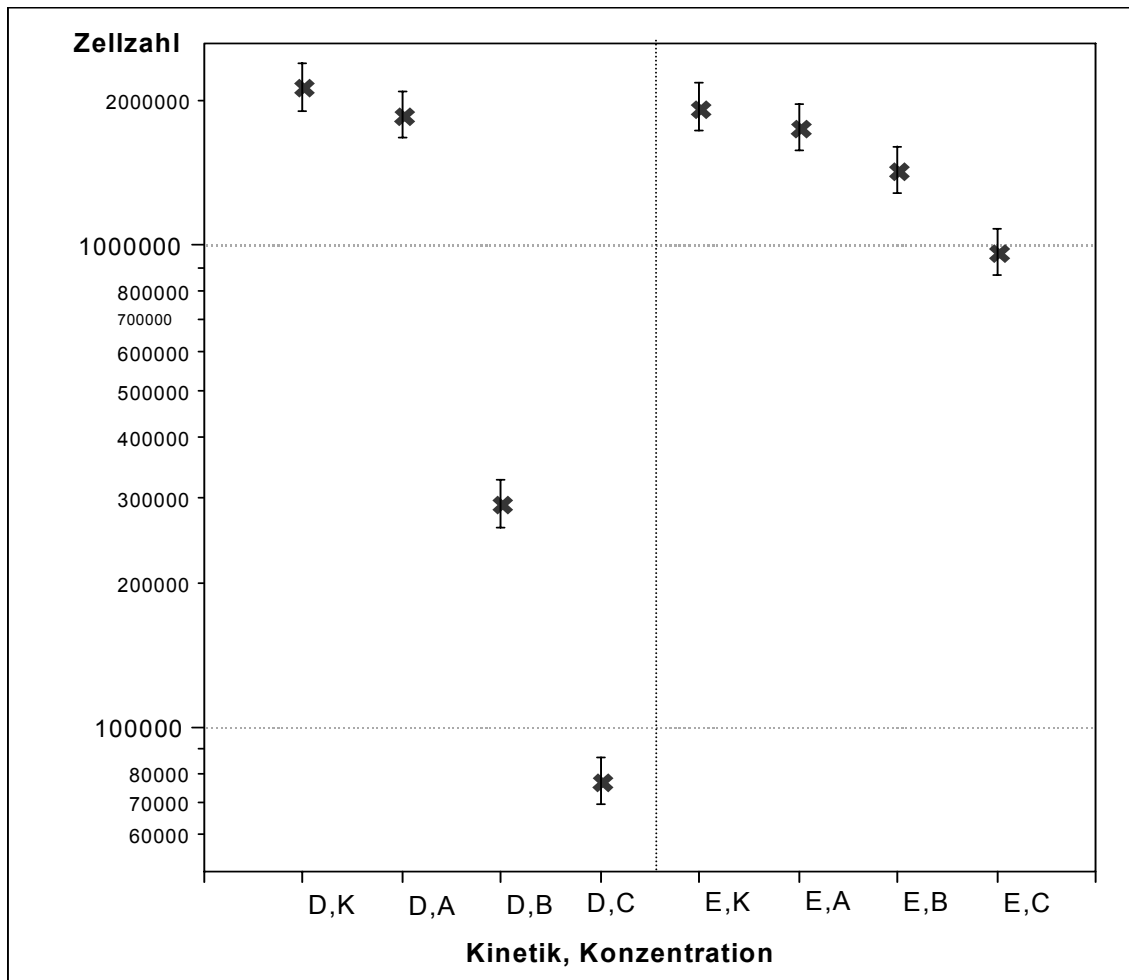
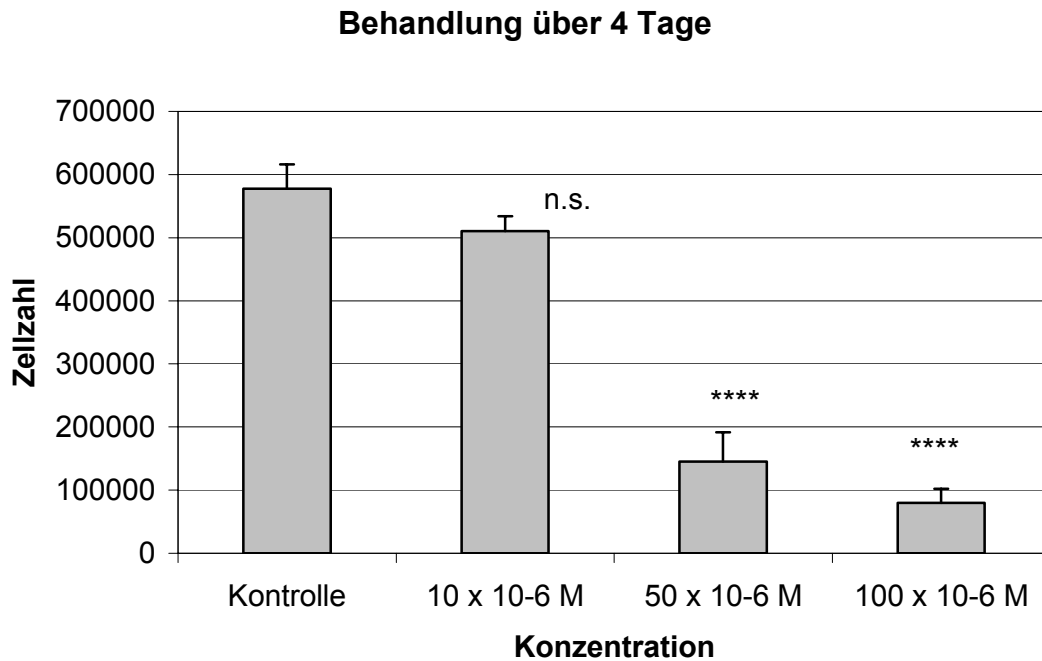


Abb. 3-3: Vergleich der Zellzahlen (glatte Muskelzellen) in Abhängigkeit von der Kinetikart (geometrische Mittelwerte (X) der Dauer- und Einfachkinetiken an Tag 20 im 95%-Konfidenzintervall).

Zum direkten Vergleich des Endergebnisses an Tag 20 der Einfach- und Dauerbehandlungen sind die Mittelwerte der einzelnen Kinetiken hier nochmals im halblogarithmischen Schaubild kurz zusammengefasst. Der deutliche Hemmeffekt der Zellproliferation bei unterschiedlicher Kinetikart ist in der direkten Gegenüberstellung besonders anschaulich: Bei der höchsten Konzentration C (100  $\mu$ M) ergibt sich bei der Dauerbehandlung eine über 10-fach niedrigere Zellzahl als bei der Einfachbehandlung.

### 3.1.4 Endothelzellen



*Abb. 3-4: Mittelwerte der Endothelzellzahlen bei Kurzzeitbehandlung (Endothelkinetiken EN1-EN3) über 4 Tage. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*\*\*\*  $P < 0,001$ .*

In Kurzversuchen über 4 Tage soll ein erster Eindruck über die Wirkung von Glafenin-HCl auf humane Endothelzellen gewonnen werden. Hierbei zeigen sich in den höheren Konzentrationsgruppen ebenfalls ein signifikanter konzentrationsabhängiger proliferationshemmender Effekt. Somit zeigt sich, dass auch Endothelzellen nicht resistent gegen die wachstumshemmende Wirkung von Glafenin-HCl sind.

## 3.2 Ergebnisse der Koloniebildungsassays

### 3.2.1 Einfachkinetik

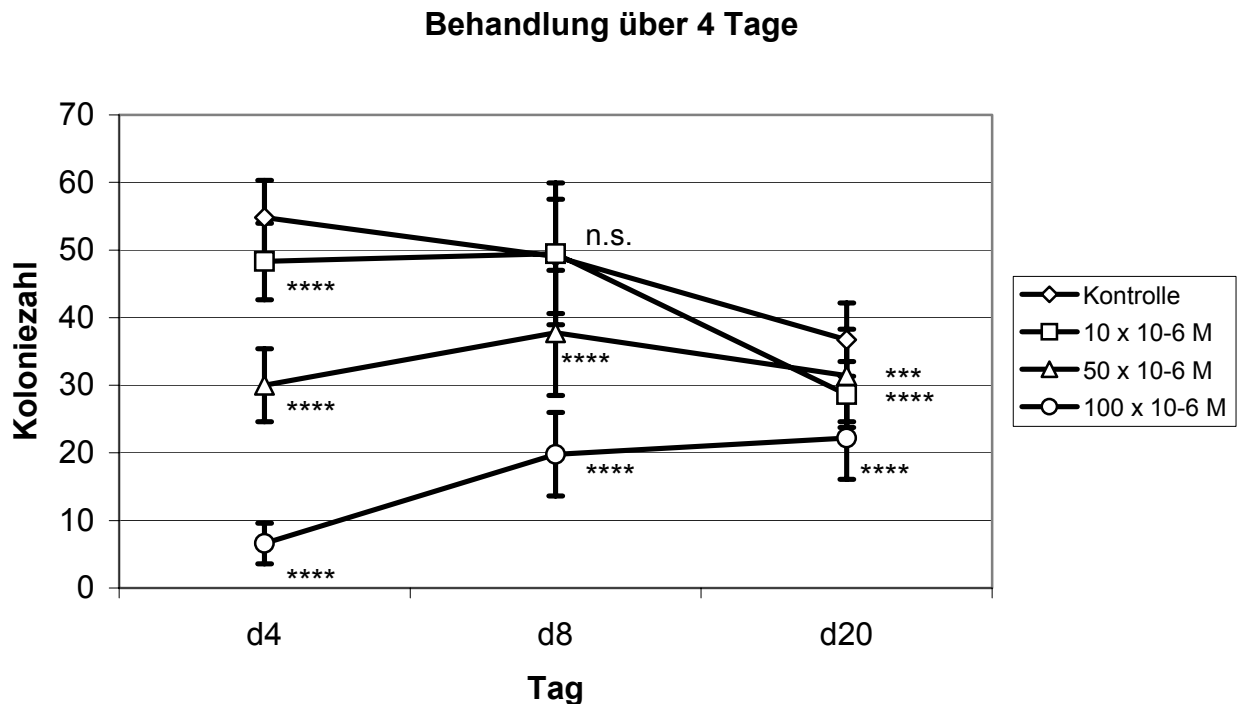


Abb. 3-5: Gemittelte Koloniezahlen der glatten Muskelzellen bei Kurzzeitbehandlung (Einfachkinetiken E1-E6) über 4 Tage. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

In der Kontrollgruppe konnten die in der Kurzzeitbehandlung am Versuchstag d4 ausgesäten glatten Muskelzellen in Durchschnitt etwa 55 Kolonien bilden. Erwartungsgemäß lässt die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen mit zunehmendem Alter ab: die an d8 und d20 ausgesäten Zellen können gerade noch 50 bzw. 40 Kolonien bilden.

Die Konzentrationsgruppe A (10  $\mu\text{M}$ ) weist einen ähnlich abfallenden Verlauf der Koloniezahlen auf, wobei diese geringfügig unter denen der Kontrollgruppe liegen.

Eine deutlichere Hemmwirkung auf die Bildung von Zellkolonien erkennt man in der Konzentrationsgruppe B (50  $\mu\text{M}$ ), wo die Zellen vom Versuchstag d4 nur noch ca. 30 Kolonien bilden können. An d8 beobachtet man einen Erholungseffekt.



fekt der Zellen, die Koloniezahl beträgt hier knapp unter 40 Zellen. Die glatten Muskelzellen des Versuchstages d20 sind alterungsbedingt nicht mehr so teilungsfreudig und bilden im Schnitt etwas mehr als 30 Kolonien.

Noch deutlicher wird die Hemmwirkung von Glafenin-HCl auf die Koloniebildung in der Konzentrationsgruppe C (100  $\mu$ M): die glatten Muskelzellen des Versuchstages d4 können hier nur noch etwas weniger als 10 Kolonien bilden. An den Tagen d8 und d20 zeichnet sich ein ähnlicher Erholungseffekt wie bei den vorangegangenen Konzentrationsgruppen ab; die Koloniezahl beträgt an d20 knapp über 20.

Die gemessenen Ergebnisse waren insgesamt hoch signifikant.

### 3.2.2 Dauerkinetik

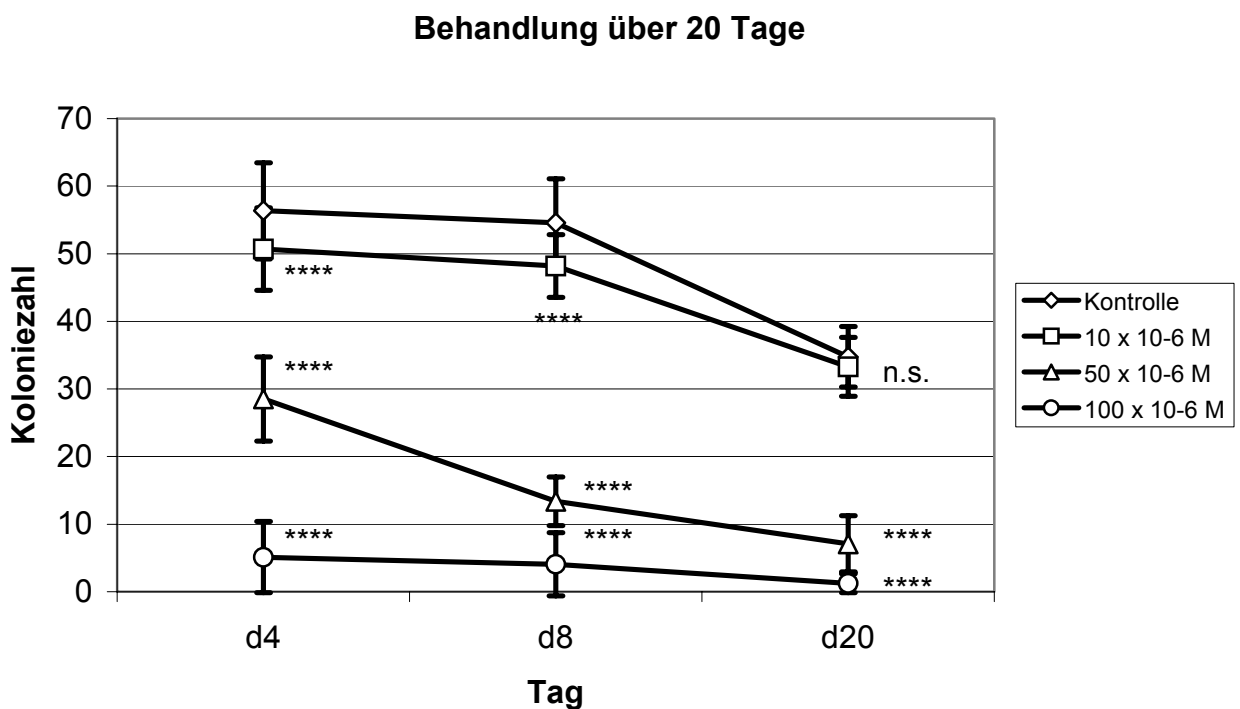


Abb. 3-6: Gemittelte Koloniezahlen der glatten Muskelzellen bei Dauerbehandlung (Dauerkinetiken D1-D6) über 20 Tage. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

Auch bei den dauerbehandelten glatten Muskelzellen sind die Koloniezahlen der Kontrollgruppe und der Konzentrationsgruppe A (10  $\mu$ M) ähnlich denen der

einfachbehandelten Zellen: mit zunehmenden Alter der Zellen werden weniger Kolonien gebildet, wobei die Koloniezahlen bei einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Glafenin-HCl um ca. 10 % geringer ausfallen.

Deutlicher ist der Unterschied der Konzentrationsgruppe B (50  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe: hier bilden die Zellen des Versuchstages d4 nur ca. 30 Kolonien. Im Gegensatz zu den einfachbehandelten Zellen (Kurzzeitbehandlung) tritt bei der Dauerbehandlung am Kinetiktag d8 kein Erholungseffekt der Zellen auf, die Koloniezahl fällt sogar weiter auf ca. 15. Am letzten Versuchstag (d20) sind im Durchschnitt nur noch ca. 8 Kolonien nachweisbar.

Sehr stark ausgeprägt ist die Hemmwirkung bei der Konzentrationsgruppe C (100  $\mu\text{M}$ ): am Kinetiktag d4 lassen sich im Durchschnitt lediglich 5 Kolonien nachweisen. An den nachfolgenden Messtagen reduzieren sich die mittleren Koloniezahlen nochmals, an Tag d20 sind in den Messvertiefungen nur noch ca. 1-2 Kolonien zu finden.

Die Messwerte sind auch in diesen Versuchsreihen nahezu alle hoch signifikant.

### 3.2.3 Vergleich der Koloniezahlen (glatte Muskelzellen)

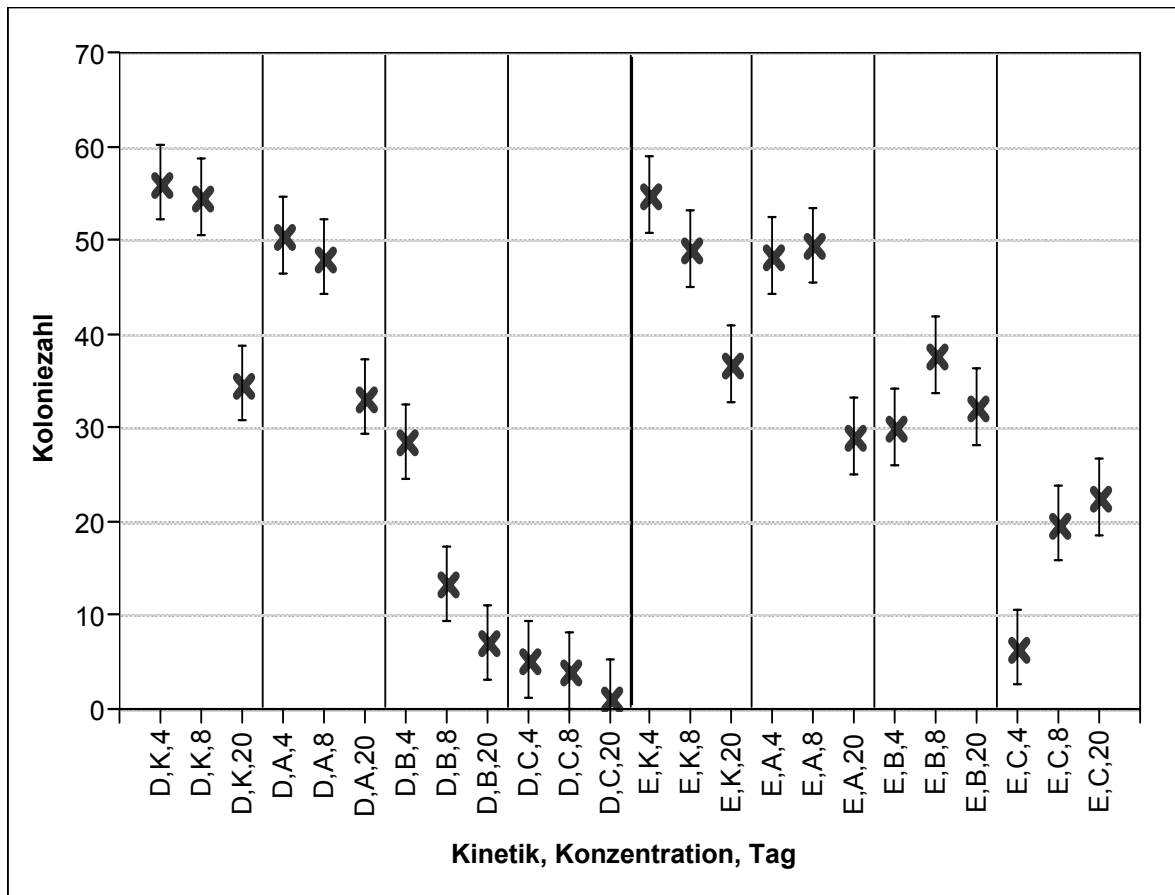


Abb. 3-7: Gesamtübersicht und Vergleich der Koloniezahlen an allen Messtagen (4, 8, 20) in Abhängigkeit von der Kinetikart (Dauer- oder Einfachkinetik), glatte Muskelzellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte (X) der Koloniezahlen (Kinetik, Konzentration, Tag an einem Datenpunkt) im 95%-Konfidenzintervall.

Wie schon bei den Proliferationskinetiken angewandt, sind hier die arithmetischen Mittelwerte der Koloniebildungszahlen von Dauer- und Einfachbehandlungen in direktem Vergleich gegenübergestellt. Abgesehen von der vielfach stärkeren Hemmung der Koloniebildung unter konstanter Glafenin-HCl-Gabe lässt sich auch in dieser Graphik vergleichend erkennen, dass ein unter Einfachbehandlung am Tag 8 auftretender partieller Erholungseffekt bei Dauerbehandlungen nicht auftritt.

### 3.2.4 Endothelzellen

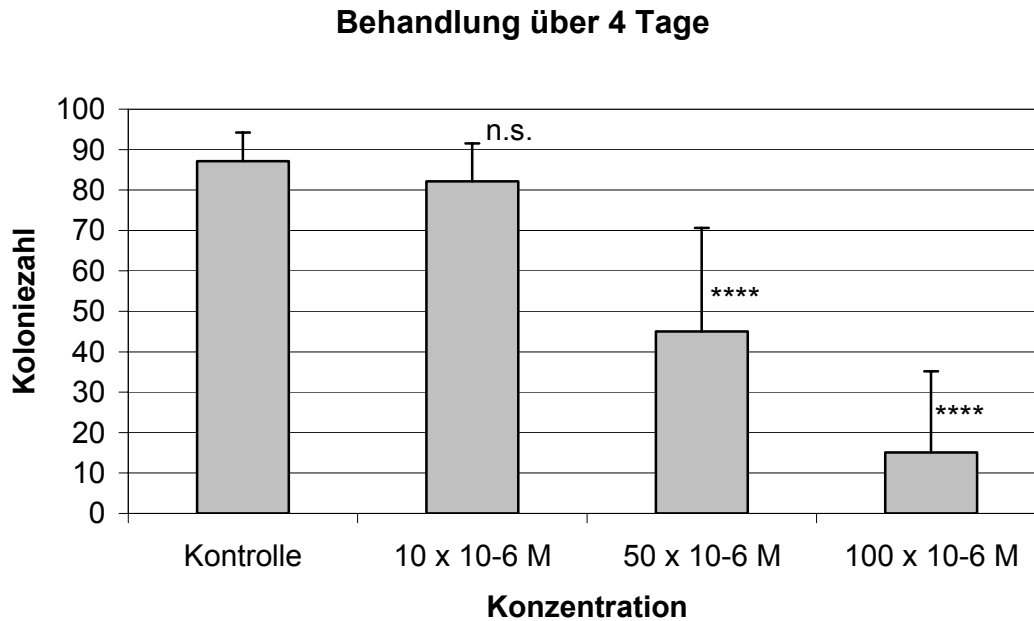


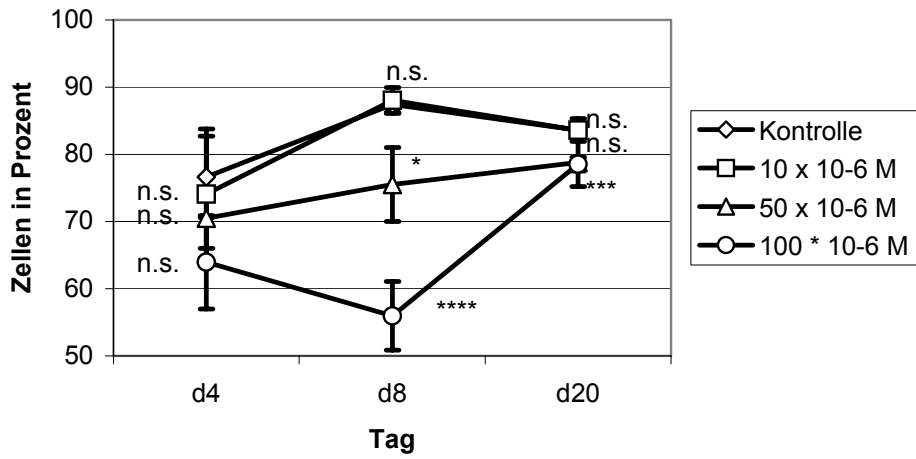
Abb. 3-8: Mittelwerte der Koloniezahlen der Endothelzellen bei Kurzzeitbehandlung über 4 Tage (Endothelkinetiken EN1-EN3). N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

Auch bei den Endothelzellen lassen sich über Kurzversuche von jeweils 4 Tagen nachweisen, dass Glafenin-HCl auch hier eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung auf die Koloniebildung zeigt. Dabei gleichen die Wirkungsabstufungen stark den Ergebnissen der glatten Muskelzellen.

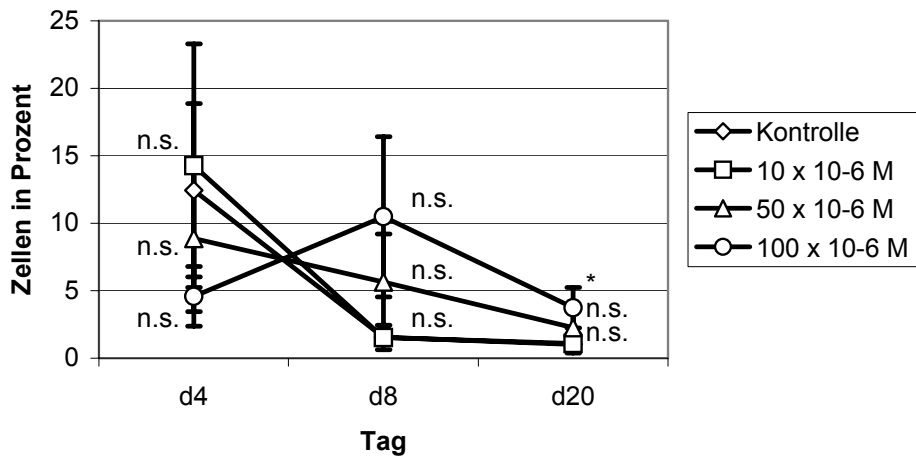
### 3.3 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse

#### 3.3.1 Einfachkinetik

##### G1-Phase



##### S-Phase



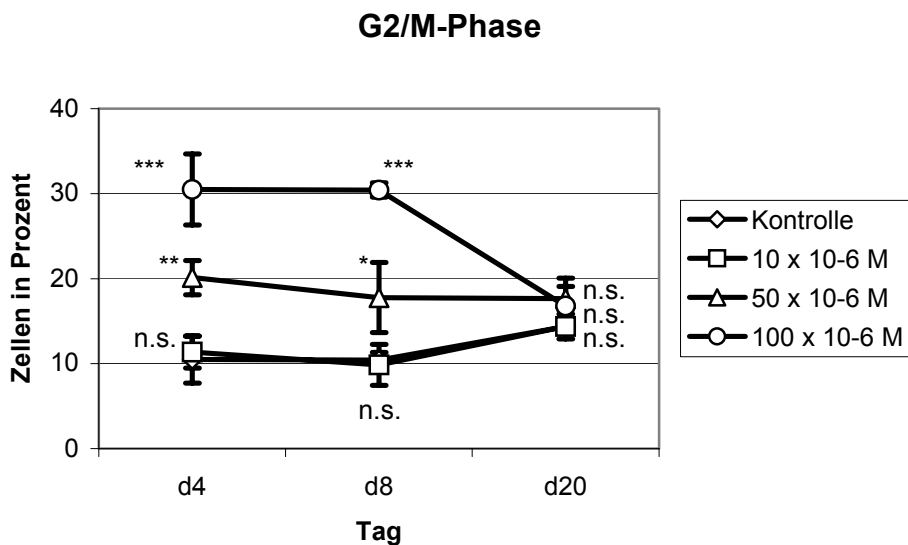


Abb. 3-9: Verteilung der glatten Muskelzellen in den einzelnen Zellzyklusphasen in Prozent. Kurzzeitbehandlung über 4 Tage (Einfachkinetiken E1-E3). N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

Analog zu den vorherigen Versuchsreihen weichen die gemessenen Daten der Konzentrationsgruppe A kaum von denen der Kontrollgruppe ab, so dass an allen Messtagen die Werte beider Gruppen nahe beieinander liegen.

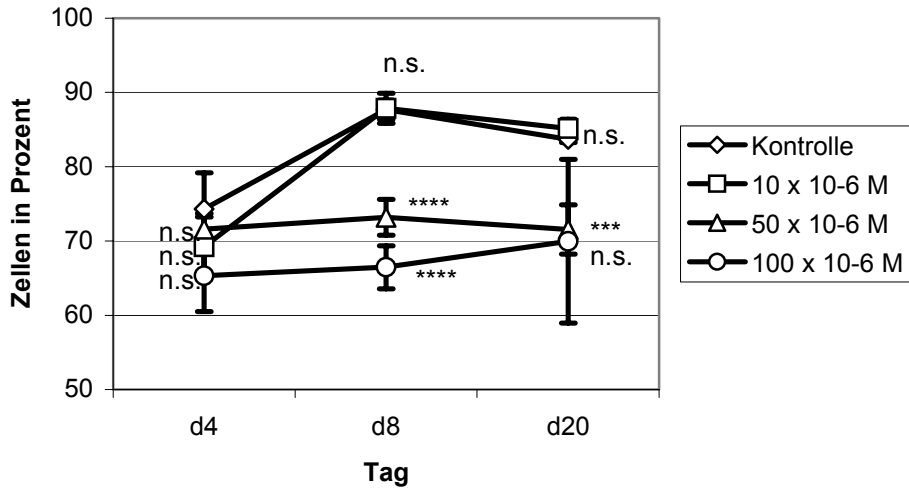
Bei der mittleren und hohen Konzentrationsgruppe wird am Messtag d4 ersichtlich, dass der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase signifikant steigt (von etwa 10% in der Kontrollgruppe auf 20% bzw. 30% in den Konzentrationsgruppen B und C;  $P < 0,01$  bzw.  $P < 0,005$ ).

Auch an d8 ist bei den hohen Konzentrationsgruppen noch ein signifikanter G2/M-Phasenblock nachzuweisen. Gleichzeitig verringert sich an d8 abhängig von der Hemmkonzentration der Anteil der glatten Muskelzellen in der G1-Phase.

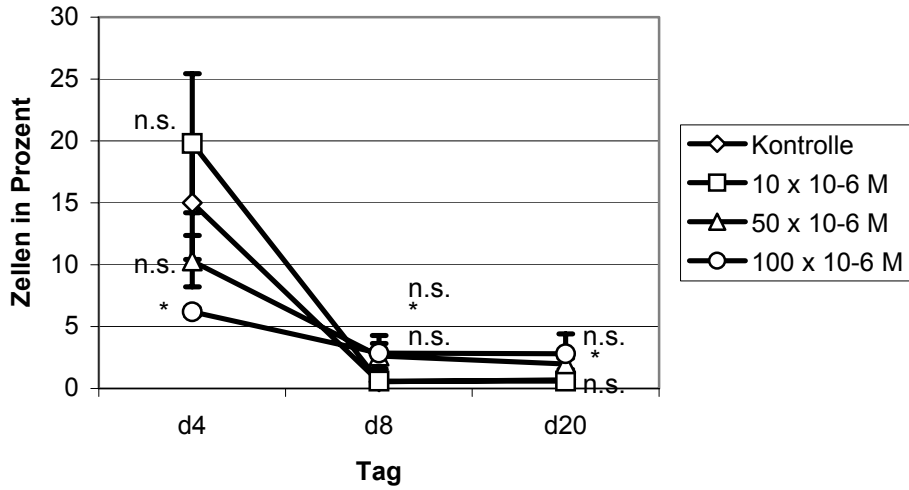
Am letzten Messtag d20 ist die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen sowohl in der Kontroll- als auch in den Konzentrationsgruppen wieder relativ ausgeglichen, die Messwerte liegen für alle Gruppen eng beisammen.

### 3.3.2 Dauerkinetik

#### G1-Phase



#### S-Phase



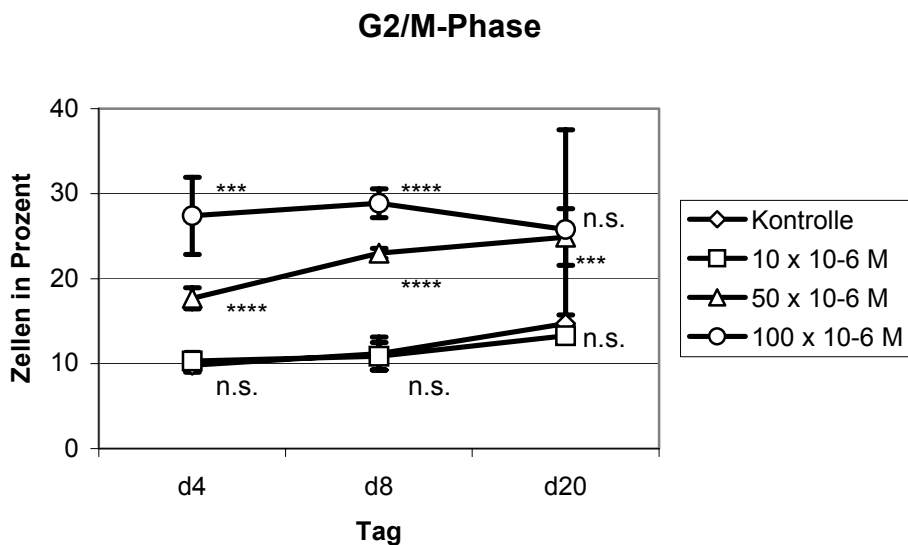


Abb. 3-10: Verteilung der glatten Muskelzellen in den einzelnen Zellzyklusphasen in Prozent. Langzeitbehandlung über 20 Tage (Dauerkinetiken D1-D3).

N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

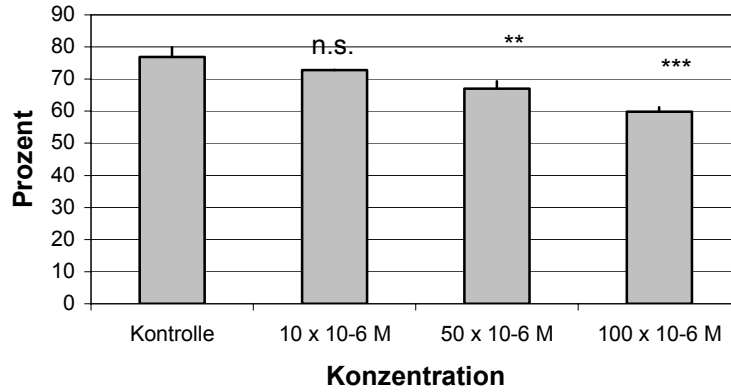
Auch unter Dauerbehandlung können bei der Konzentrationsgruppe A keine relevanten Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Unterschied zur Einfachbehandlung sind jedoch unter 20-tägiger konstanter Applikation von Glafenin-HCl sowohl bei 50  $\mu\text{M}$  als auch 100  $\mu\text{M}$  deutlich signifikantere Messwerte in der Zellzyklusphasenverteilung entstanden.

Wiederum zeichnet sich bereits an Tag 4 ab, dass in den Konzentrationsgruppen B (50  $\mu\text{M}$ ) und C (100  $\mu\text{M}$ ) eine deutliche Erhöhung des Zellanteils in der G2/M-Phase auftritt ( $P < 0,001$  bzw.  $P < 0,005$ ). Dieser G2/M-Phasenanteil nimmt bei der Gruppe B bis zum Messtag d20 stetig zu und erreicht am Schluss etwa 25 %. In der Gruppe C liegt die G2/M-Fraktion etwas höher bei knapp unter 30 %. Parallel zum beobachteten G2/M-Phasenblock tritt eine signifikante Reduktion des G1-Phasenanteils an den Messtagen d8 und d20 bei den Gruppen mit mittlerer und hoher Hemmkonzentration auf.

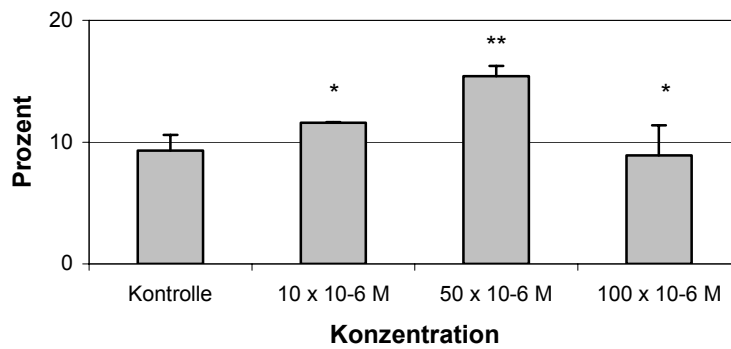


### 3.3.3 Endothelzellen

#### G1-Phase (Tag 4)



#### S-Phase (Tag 4)



#### G2/M-Phase (Tag 4)

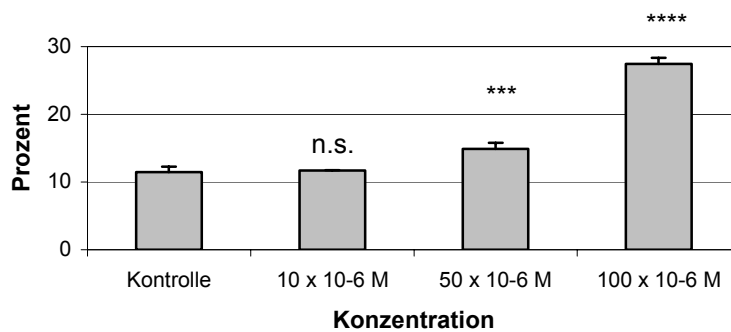
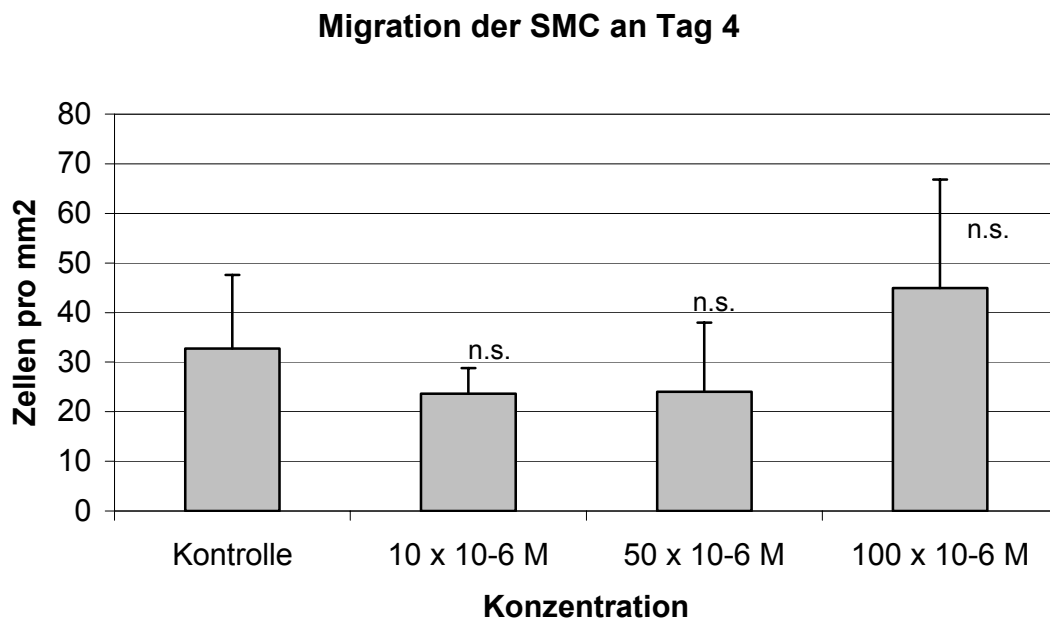


Abb. 3-11: Verteilung der Zellzyklusphasen an d4 bei Endothelzellen (EN1 und EN2) nach Kurzzeitbehandlung. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

In Kurzversuchen über 4 Tage wurde auch bei den Endothelzellen die Zellzyklusverteilung untersucht. Dabei ist erkennbar, dass analog zu den glatten Muskelzellen der Anteil der humanen Endothelzellen in der G1-Phase ebenfalls mit zunehmender Substanzkonzentration abnimmt, dafür der G2/M-Phasenanteil konzentrationsabhängig zunimmt. Bezüglich der S-Phase scheint dieser Anteil bis zur Substanzkonzentration 50  $\mu\text{M}$  um einige Prozentpunkte zuzunehmen, fällt bei 100  $\mu\text{M}$  jedoch wieder ab.

### 3.4 Ergebnisse der Migrationstests



*Abb. 3-12: Der Effekt von Glafenin-HCl (100  $\mu\text{M}$  über 1 Tag) auf das Migrationsvermögen von glatten Muskelzellen mit und ohne PDGF-Stimulation. N.s.: nicht signifikant.*

Nach Inkubation mit Glafenin-HCl wurde die Migrationsfähigkeit der glatten Muskelzellen untersucht. Bei insgesamt nicht-signifikanten Ergebnissen konnte man einen Trend zur Verminderung des Migrationsvermögens bei den Konzentrationsgruppen B und C beobachten, während unter der hohen Hemmkonzentration 100  $\mu\text{M}$  sich eine Migrationszunahme zeigte.

### 3.5 Ergebnisse der LDH-Messungen

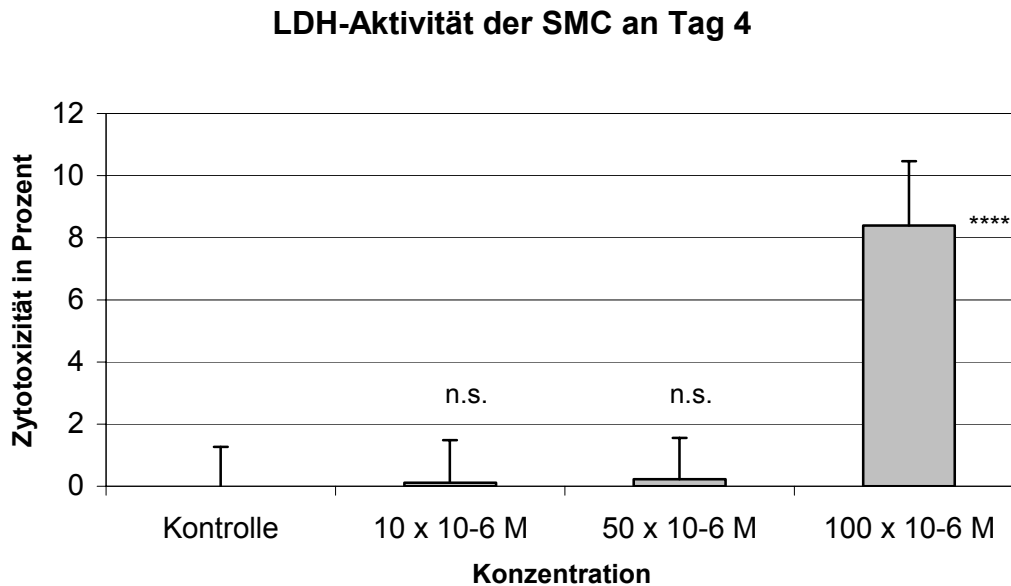
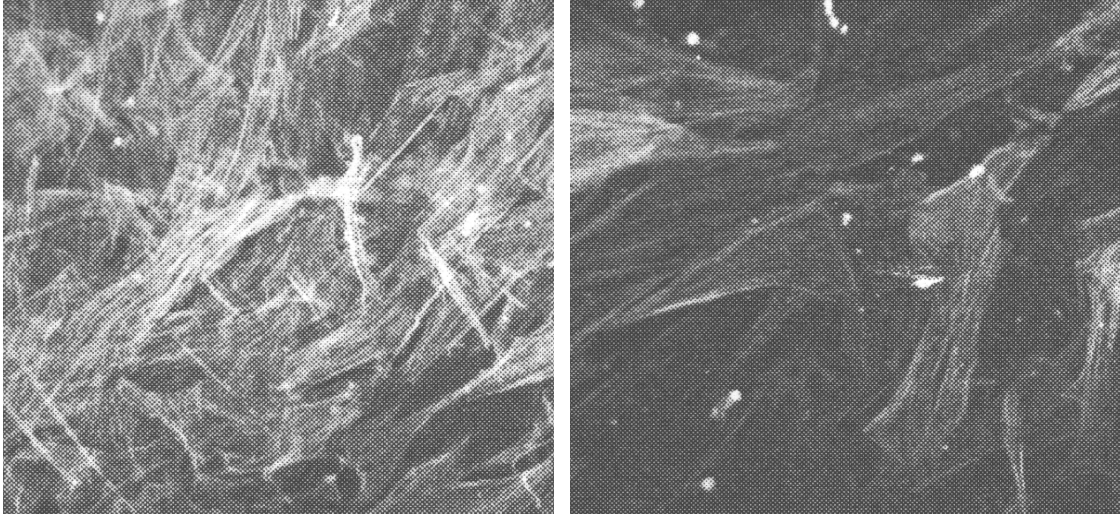


Abb. 3-13: Analog zum freigesetzten LDH im Kulturmedium dargestellte zytotoxische Wirkung von Glafenin-HCl auf glatte Muskelzellen in Prozent. N.s.: nicht signifikant. Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe: \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

Bei den Konzentrationsgruppen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  konnte kein signifikanter Anstieg in der LDH-Aktivität als Zeichen der Zelltoxizität beobachtet werden (lediglich 0,1 – 0,2 % Zytotoxizität). Eine Behandlung der glatten Muskelzellen mit 100  $\mu\text{M}$  führte hingegen zu einem sprunghaften LDH-Anstieg im Kulturmedium, das umgerechnet etwa 8 % Zelltoxizität entspricht.

## 3.6 Ergebnisse der Zellfärbungen

### 3.6.1 $\alpha$ -Actin-Färbung

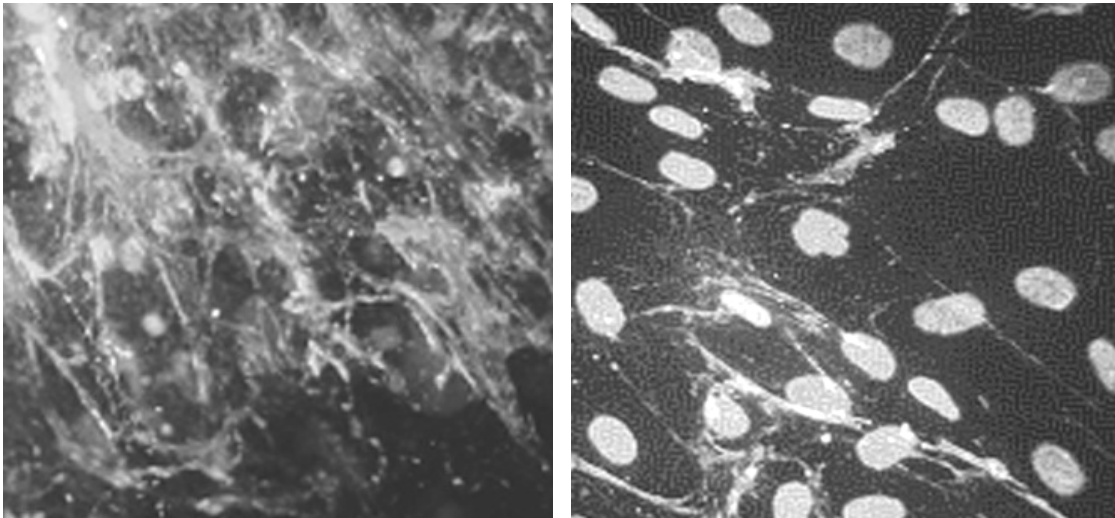


*Abb. 3-14:  $\alpha$ -Actin-Färbungen von glatten Muskelzellen der Kontrollgruppe (links) und der 100  $\mu$ M-Gruppe (rechts).*

In den  $\alpha$ -Actin-Färbungen wird der Aufbau des Zytoskeletts der glatten Muskelzellen bei Inkubation mit zunehmenden Glafenin-HCl-Konzentrationen untersucht. Es werden von den verschiedenen Konzentrationsgruppen  $\alpha$ -Actin-Färbungen angefertigt.

Die Kontrollgruppen zeigen ein harmonisch und strukturiert aufgebautes Zytoskelett. Mit steigender Substanzkonzentration wird jedoch ein strukturierter Aufbau inhibiert, in der Konzentrationsgruppe C (100  $\mu$ M) lassen sich nur noch ungeordnete Reste des Zytoskeletts darstellen. Durch die Unstrukturiertheit ist möglicherweise auch das „ausgefrante“ Aussehen der Zellen bei hoher Hemmkonzentration erklärt.

### 3.6.2 Tenascin Immunfluoreszenzfärbung



*Abb. 3-15: Immunfluoreszenzfärbungen mit DAPI für die Zellkernfärbung und speziellen Fluoreszenzantikörpern gegen Tenascin. Links dargestellt die Kontrollgruppe, rechts mit Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  Glafeninhydrochlorid.*

Tenascin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das von glatten Muskelzellen synthetisiert und ausgeschieden wird, besonders unter den Rahmenbedingungen einer Neointimabildung. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop werden Bezirke etwa gleicher Zellzahl der Kontrollgruppe und der 100  $\mu\text{M}$ -Gruppe miteinander verglichen. Tenascin stellt sich als grüne Fasern dar, während die Zellkerne der glatten Muskelzellen als ovale blaue Punkte zu Darstellung kommen.

Obwohl die Zellzahlen in den zwei Abbildungen leicht von einander abweichen, lässt sich doch eine klare Reduktion des Tenascins in der mit Glafenin-HCl behandelten Gruppe erkennen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Das Problem der Restenose

Die Restenose ist ein entscheidend limitierender Faktor des Therapieerfolges nach perkutaner transluminaler Angioplastie. Die PTA hat sich jedoch in den letzten 20 Jahren zu einem Standardverfahren bei arteriellen Gefäßstenosen und -verschlüssen entwickelt. Unbeeinflusst von allen technischen Verbesserungen liegt die Restenoserate in Abhängigkeit von der Gefäßregion und je nach Autorengruppe bei durchschnittlich 30-50% (1-6). Daher stellt die Restenose sowohl für die Patienten als auch für die Ärzte ein Ärgernis dar und führt zu einer hohen Zusatzbelastung der Krankenkassen.

Die drei wichtigsten pathologischen Prozesse der Restenose sind Proliferation der glatten Muskelzellen, Migration und extrazelluläre Matrixsynthese (55). Bei der Anwendung von systemischer pharmakologischer Therapie zur Reduzierung der Restenose wurden zahlreiche Substanzen getestet. Obwohl die Ergebnisse in den Tierversuchen zunächst hoffnungsvoll waren, überwiegt die Anzahl der negativen Ergebnisse in den klinischen Studien (38, 48, 49). Bei systemischer Applikation lagen bislang positive Berichte für GP-IIb/IIIa-Antagonisten, Verapamil, Probucol und Trapidil vor, wobei erstere Substanzgruppe vielversprechend zu sein scheint (51).

Auch wurden Therapieansätze zur Restenosebekämpfung mittels ionisierender Strahlung sowie Gentherapie angestrebt. Mit der Gentherapie werden – ähnlich wie bei den oben genannten Pharmaka – nur ein oder wenige Wege gehemmt, die in der Entstehung der Restenose eine wichtige Rolle spielen. Die Restenose ist jedoch eine Reaktion der Gefäßwand auf die Ballonangioplastie, bei der über 100 Faktoren letztlich zur Ausbildung einer Neointima führen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Blockierung einzelner Schritte nicht zum gewünschten klinischen Erfolg führt (50).

Bei der Verwendung von Radionukliden werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: die endovaskuläre Brachytherapie und die Implantation von radioaktiv dotierten Stents. Aufgrund natürlicher aber auch teilweise unerwünschter physi-

kalischer Eigenschaften hat dieses Therapieverfahren ebenfalls seine eigenen Vor- als auch Nachteile, die weiter unten beschrieben werden.

Dieses Kapitel fasst die aktuellen Erkenntnisse zur Restenoseprophylaxe zusammen, vergleichend und ergänzend mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen über das Anthranilsäurederivat Glafeninhydrochlorid

## **4.2 Stents und In-Stent-Restenosen**

Das mechanische Konzept zur Verhinderung einer Restenose hat seit 1994 allgemeine Anerkennung gefunden: so konnte in der BENESTENT-1 Studie die Restenose von 32% auf 22% und in der STRESS-Studie von 42% auf 32% gesenkt werden (52, 53). Die günstige Wirkung von Stents auf Restenosen ist allerdings eine mechanische: Stents können zwar eine frühe elastische Rückstellung (recoil) und ein späteres „negatives Remodelling“ (Schrumpfung) des dilatierten Gefäßsegmentes verhindern, beeinflussen allerdings nicht in positiver Weise die Neointimaprolieration (49). Mittlerweile sind sogar eine Reihe von Variablen bekannt, die das Risiko einer sog. „In-Stent-Restenose“, also einer Restenose in einem Abschnitt des implantierten Stents, erhöhen (bei Patienten mit Diabetes, genetische Faktoren, allergische Reaktionen auf die Stentkomponenten Nickel und Molybdän, Stentlänge, Einbringen mehrerer Stents, u.a.). Die Häufigkeit einer In-Stent-Restenose, der praktisch ausschließlich eine Intimaprolieration zugrunde liegt, kann daher in der täglichen Praxis bei ca. 30% liegen (54).

Die einfachste Möglichkeit einer Behandlung der In-Stent-Restenose ist die erneute Erweiterung des betroffenen Abschnittes mittels PTA. Dabei kann jedoch üblicherweise das Ausgangslumen trotz größerem Ballon und hohem Druck nicht erreicht werden. Die schnell wirksame Therapieoption Atherektomie, bei der Neointimagewebe innerhalb des Stents mechanisch entfernt wird, resultiert in unbefriedigenden Langzeitergebnissen. Andere neuere Methoden wie Laserangioplastie oder „cutting balloon“ brachten ebenfalls keinen durchgreifenden Erfolg (63).

### 4.3 Brachytherapie

Die Brachytherapie richtet sich im Vergleich zur Genterapie oder medikamentöser Therapie nicht spezifisch gegen einen bestimmten pathophysiologischen Weg der Restenose. Vielmehr wirkt sie eher unspezifisch durch Induktion eines Proliferationsstops. Das eigentliche Wirkprinzip wird noch kontrovers diskutiert. Teirstein et al. führten 1995 die erste randomisierte klinische Studie durch, welche die Restenoserate nach endovaskulär applizierter Strahlentherapie mit derjenigen unter Placebothherapie verglichen hat (56). Dabei wurde das Radioisotop  $^{192}\text{Ir}$  verwendet. Die nach 6 Monaten ultraschallkontrolliert erhobenen Resultate zeigten eine signifikante Reduzierung der Restenoserate (8,3% vs. 35,8%). Es folgten daraufhin zahlreiche klinischen Studien, wobei zusammenfassend gezeigt werden konnte, dass sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Strahlung gegen den Restenoseprozess wirksam sind. Breite Datenlagen bieten die VIENNA-Studien (59, 62); insbesondere in der VIENNA II – Studie zeigte sich eine signifikante Reduktion der Restenoserate nach PTA und anschließender  $^{192}\text{Ir}$ -Afterloadingtherapie in der A. femoralis superficialis im Vergleich zur Placebogruppe (28,3% vs. 53,7%).

Aktuell werden zwei Arten der Bestrahlung untersucht: die hochenergetische intravaskuläre Brachytherapie in Afterloading-Technik (radioaktiver Draht oder radionuklidgefüllter Ballon) sowie die Implantation radionukliddotierter Stents. Verwendet werden Radionuklide wie  $^{192}\text{Ir}$ , Y-90, Sr-90, P-32, Co-55 oder Vn-48 (11). In Erprobung ist derzeit auch  $^{188}\text{Rhenium}$ , das in vitro bereits sehenswerte Erfolge zeigte (57).

Jedoch hat die Brachytherapie auch Nachteile. Zeitaufwendig müssen die notwendigen logistischen Vorbereitungen getroffen werden, um den Sicherheitsvorschriften für die Strahlentherapie zu genügen. Da außerdem mehrere medizinische Disziplinen zusammen arbeiten (Interventionalist, Strahlentherapeut, Strahlenphysik, Sicherheitspersonal), kann diese Therapie nur an wenigen ausgewählten Tagen durchgeführt werden.

Ein weiterer Nachteil betrifft die radioaktiv beschichteten Stents: bei den einzigen bisher klinisch erprobten Stents, die mit P-32 dotiert waren, kommt es zum unerwünschten sog. „candy-wrapper-Effekt“. Dabei entsteht eine strahlenindu-



zierte Restenose an den Enden des Bestrahlungsfeldes. Restenoseraten von bis zu 50% werden beschrieben (64). Versuche, die Strahlungs-dosis an den Stentenden zu erhöhen oder zu verringern, erzielten bislang keinen nennenswerten Erfolg.

Verzögert treten auch Probleme mit „später Thrombose und Restenose“ auf. Neben der Inhibierung des Wachstums der glatten Muskelzellen wird auch eine Reendothelialisierung des Gefäßes verzögert. Die Thrombogenität ist dadurch erhöht, und durch die gestörte Endothelialisierung ist das Gefäß für mindestens einige Wochen in seiner Vasoaktivität beeinträchtigt und neigt zur Vasokonstriktion (50).

#### **4.4 Drug eluting stents**

Die Idee der „drug-eluting stents“ (DES) ist entstanden aus früheren Vorhaben, mit Ballonkathetern lokal zellproliferationshemmende Medikamente im Rahmen eines PTA-Eingriffes an die entsprechende Läsionsstelle zu bringen. Diese Eingriffe sind jedoch daran gescheitert, dass durch die Applikation des Medikaments über perforierte Ballonkatheter ein solcher Läsionsreiz auf die Zellproliferation induziert wurde, so dass der mögliche positive Effekt des Medikaments wieder aufgehoben war. Außerdem wurden die Medikamente durch den Blutfluss wieder schnell ausgewaschen (50).

Durch die DES kann das Medikament nun über einen längeren Zeitraum und schonender an die Gefäßwand abgegeben werden. DES bestehen aus einem Metallstent mit einer speziellen Polymerbeschichtung, die ein Medikament konstant und zeitverzögert über einen Zeitraum von etwa 14 bis 30 Tagen nach Implantation freigibt.

Aufgrund der rasanten Verbesserungen und Ergebnisse dieser Stentform sind zwischenzeitlich Meinungen entstanden, wonach Bypassoperationen bei Koronararterien durch die Verwendung dieser Stentformen um 46% verringert werden könnten (58).

Zwei wichtige Vertreter der drug-eluting stents sind zur Zeit die Sirolimus- und Paclitaxel-Stents. Auch scheinen neu entwickelte beta-Estradiol-Stents bei ersten Auswertungen der EASTER-Studie (75) vielversprechend zu sein.

#### 4.4.1 Sirolimus-Stents

Sirolimus ist ein Immunsuppressivum v.a. für die Nierentransplantation zur Prävention von Abstoßungsreaktionen. Gleichzeitig hat es auch antiproliferative als auch antimigratorische Eigenschaften auf glatte Muskelzellen. Über eine Bindung an den Rezeptor FKBP-12 inhibiert Sirolimus die „mamillian target of rapamycin“ (mTOR) Signaltransduktionen, wodurch es letztendlich zu einem Proliferationsstop in der G1/S-Phase kommt (60).

In der RAVEL-Studie wurden bei 238 Koronarpatienten randomisiert ein normaler Metallstent bzw. ein Sirolimusstent im Rahmen einer PTA eingesetzt (61, 65). Nach einem Jahr wurden bei den sonographischen Kontrollen eine Restenoserate (definiert als Stenose  $\leq 50\%$ ) von 0% vs. 23% in der Kontrollgruppe festgestellt.

Die größeren SIRIUS-Studien (66, 67, 68) mit insgesamt 1510 Patienten in nordamerikanischen und europäischen Zentren belegten, dass Sirolimusstents auch bei der Therapie komplexer Läsionen (langstreckige Stenosen, kleine Gefäßlumina) und bei Patienten mit Diabetes nach 9 Monaten gute Ergebnisse erbrachten (Restenoserate 3% vs. 35%).

Den Studien sich anschließende Recherchen vermuten, dass das Auftreten einer Restenose unter Verwendung eines Sirolimusstents oft Folge lokaler Gefäßverletzungen während des Eingriffes, lückenhaftem Anliegen des Stents an der Gefäßwand oder ungenügender Stentexpansion sind (71-73).

Alle bisherigen Studien bezogen sich auf die Koronararterien. Die SIROCCO-Studie, welche die Wirksamkeit der mit und ohne Sirolimus beschichteten, selbstexpandierbaren Nitinolstents bei Stenosen in der A. fem. superficialis untersucht, kam zu einem erstaunlichen Ergebnis: Überraschend gut waren die Ergebnisse mit dem unbeschichteten Nitinolstent. Die bisher veröffentlichten Studien gaben die Ergebnisse zwar nicht als Restenoseraten, sondern nur als Offenheitsraten an. Dennoch lagen diese nach 6 Monaten bei den unbeschichteten Nitinolstents bei 94% (60).

#### **4.4.2 Paclitaxel-Stents**

Paclitaxel interferiert mit der Funktion der Mikrotubuli, welche für die Chromosomensegregation während der Zellteilung verantwortlich sind. Es ist ein bekanntes Zytostatikum, das z.B. bei Ovarialkarzinomen in Verbindung mit Cyclosporin gegeben wird (69). In Zellkulturversuchen wurde nachgewiesen, dass Paclitaxel wichtige Prozesse der Restenoseentwicklung (Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen, Synthese und Sekretion extrazellulärer Matrixproteine) inhibiert (70).

Der Einsatz paclitaxelbeschichteter Stents erfolgte zunächst im Rahmen zahlreicher Studien. Die umfangreichsten sind die TAXUS-Studien, wobei in der TAXUS IV-Studie (74) bei 1314 Patienten gezeigt werden konnte, dass in der mit Paclitaxelstents behandelten Gruppe nach 9 Monaten eine Restenoserate von 8% zu verzeichnen war, im Vergleich zur mit konventionellen Metallstents behandelten Kontrollgruppe mit dort 27%iger Restenoserate.

Versuche, der Restenose mit höheren Paclitaxel-Dosen als in den bisherigen Studien zu begegnen, zeigten z.B. in der ASPECT- und ELUTES-Studie die dann anschließende Notwendigkeit einer ausreichenden antithrombozytären Therapie mit Plavix (Clopidogrel). Auch mit dem sog. Quanam-Stent, der über 180 Tage lang eine deutlich höhere Dosis eines Paclitaxelderivates (800 µg pro 2,4 mm Stentlänge) freisetzte, wurden ähnliche Erfahrungen gemacht. Diese Studie wurde wegen einer hohen periinterventionellen Komplikationsrate von 10,2% - hauptsächlich Thrombosen - frühzeitig abgebrochen (76).

#### **4.4.3 Sirolimus- versus Paclitaxel-Stents**

Zwei randomisierte Studien haben Sirolimus- und Paclitaxel-Stents einander gegenüber gestellt. In der TAXi-Studie wurden 202 Patienten nach PTA einer Koronararterie einer von beiden Stents implantiert. Nach 7 Monaten betrug die Notwendigkeit einer erneuten Gefäßbehandlung bei Patienten mit Sirolimusstent 3% im Vergleich zu 1 % mit Paclitaxelstents (78).

In einer anderen Studie wurden 300 Patienten mit In-Stent-Restose entweder randomisiert einer alleinigen PTA oder einer Behandlung mit einem Sirolimus- bzw. einem Paclitaxelstent zugewiesen. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass

das Auftreten einer Restenose nach Behandlung mit einem DES deutlich geringer war als mit alleiniger PTA. Außerdem lagen die Sirolimusstents in dieser Studie bei der Restenoserate leicht vorne (14,3% vs. 21,7% mit Paclitaxelstent) (77).

Somit können die ersten Studien in der klinischen Praxis zeigen, dass Sirolimus- als auch Paclitaxelstents von ihrer Wirksamkeit her in etwa gleichauf liegen. Diese Stents wurden bisher hauptsächlich bei Krankheiten der Koronarterien eingesetzt und gewinnen daher in der interventionellen Kardiologie eine zunehmende Bedeutung. Verständlicherweise kam auch die Frage auf, ob DES auch in anderen Gefäßen bei der Prophylaxe der Intimahyperplasie wirksam sind. In der SIROCCO-Studie wurden daher selbstexpandierende Nitinolstents mit Sirolimus beschichtet und diese mit unbeschichteten Nitinolstents verglichen. Nach 6 Monaten zeigten erstaunlicherweise die unbeschichteten Nitinolstents ebenfalls gute Ergebnisse. Zwar wurden nur die Offenheitsraten bestimmt, diese lagen bei den unbeschichteten Stents jedoch bei guten 94%. Lediglich ein Stent war verschlossen (60). Diese Ergebnisse führten dazu, dass das Therapiekonzept mit drug-eluting stents derzeit nochmals überdacht wird.

#### **4.4.4 Das Potential von Glafeninhydrochlorid**

Glafeninhydrochlorid ist eine nichtsteroidale, antiinflammatorische Substanz, das zur Linderung von Schmerzen jeglicher Ursache eingesetzt wird. Die üblichen oralen Dosierungen variieren von 600 bis 1200 mg pro Tag. Mögliche Nebenwirkungen beinhalten Anaphylaxie, Hepato- und Nephrotoxizität sowie gastrointestinale Störungen (79). Die in dieser in vitro – Studie verwendeten Konzentrationen reichen von 10 bis 100  $\mu\text{M}$ . Die klinisch erreichten Plasmalevel liegen üblicherweise bei 10  $\mu\text{M}$ , also 10-mal geringer als die höchste Versuchskonzentration.

In den Versuchen wurde eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation der glatten Muskelzellen nachgewiesen, die Koloniebildungszahlen waren analog dazu ebenfalls deutlich verringert. Bezüglich der Migrationsfähigkeit der haSMC wurde bei 10 und 50  $\mu\text{M}$  eine nicht-signifikante Verminderung beobachtet, wohingegen sich bei 100  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontroll-

gruppe eine leichte Migrationszunahme abzuzeichnen scheint. Die Messung der LDH-Aktivität konnte zeigen, dass bei 100  $\mu\text{M}$  zytotoxische Effekte die Ergebnis überlagern, während bei 10 und 50  $\mu\text{M}$  kaum Zytotoxizität zu verzeichnen war. Tenascin, ein wichtiges extrazelluläres Matrixprotein, wurde unter Einfluss mit Glafenin-HCl deutlich reduziert. Die Proliferation und Koloniebildungsfähigkeit der Endothelzellen wurden ebenfalls konzentrationsabhängig beeinflusst. Diese Ergebnisse korrespondieren mit zwei Studien, die ebenfalls das anti-proliferative Potential der Anthranilsäurederivate Meclofenamin und Flufenamin nachweisen konnten (55, 80).

In Bezug auf den Prozess der Re-Endothelisierung wäre eine Substanz wünschenswert, die zwar die Proliferation der glatten Muskelzellen verhindert, aber dennoch das Wachstum der Endothelzellen nicht berührt. In dieser Studie beeinflusst Glafenin-HCl die Proliferation beider Zellarten, so dass die Re-Endothelialisierung während des Heilungsvorganges nach PTA wahrscheinlich gestört wäre (81, 82).

Einer der Mechanismen des anti-proliferativen Potentials von Glafeninhydrochlorid ist die Reduktion der G1-Zellzyklusphase sowie die Induktion eines G2/M-Phasenblocks. Diese Blockade erfolgt in der prämitotischen Phase. Bei 100  $\mu\text{M}$  scheinen die abweichenden Ergebnisse eine Folge der zytotoxischen Effekte zu sein.

Tenascin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das von glatten Muskelzellen insbesondere im Rahmen einer Neointimabildung sezerniert wird (83). Die klare Reduktion von Tenascin nach Behandlung der glatten Muskelzellen mit Glafenin-HCl ist daher besonders wichtig im Rahmen der hauptpathologischen Prozesse einer Restenose.

Wie schon anfangs erwähnt, erschien Tranilast, eine antiallergische Substanz in der Gruppe der Anthranilsäurederivate, bezüglich der Reduktion der Neointimabildung nach PTA eine vielversprechende Substanz zu sein (39, 42). Später wurde jedoch die damals laufende PRESTO-Studie, die sich ausgiebig mit dieser Substanz beschäftigte, bei fehlender signifikanter Wirksamkeit der Substanz im Vergleich zur Kontrollgruppe, abgebrochen (48).

Glafeninhydrochlorid als Vertreter der Antranilsäurederivatgruppe konnte in in vitro – Versuchen sein deutliches antiproliferatives Potential bei humanen glatten Muskelzellen zeigen. Bezüglich der Anwendungsmöglichkeiten erscheint eine systemische Applikation nach PTA nicht machbar, da klinisch übliche Plasmakonzentrationen bei  $10\mu\text{M}$  liegen. In den Zellversuchen zeigten sich langfristige Effekte jedoch erst bei  $50\ \mu\text{M}$ . Eine Applikation des Medikamentes im Rahmen eines PTA-Eingriffes an die entsprechende Läsionsstelle würde, wie in 4.4 erwähnt wurde, mit den heute machbaren Techniken eher zur Induktion eines zusätzlichen Proliferationsreizes an der verletzten Intima führen.

Denkbar wäre die Stentbeschichtung, hierfür müssten jedoch weitere Versuche erfolgen, ob Glafenin-HCl - nicht zuletzt auch in chemischer Hinsicht - hierfür geeignet wäre. Ziel von medikamentenbeschichteten Stents sollte es auch sein, einerseits die Intimahyperplasie zu unterdrücken, andererseits mittelfristig jedoch eine Reendothelialisierung zuzulassen. Somit müssten auch längerfristige und weiterführende Versuche mit Endothelzellen unter Einfluss mit Glafenin-HCl stattfinden.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

### **5.1 Zielsetzung**

Das Problem der Restenose nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) beschäftigt interventionelle Radiologen seit der Einführung dieser Methode. Zahlreiche Ansätze, diesen Restenoseprozess nach PTA zu verhindern, schlugen entweder komplett fehl oder führten zu keinem nennenswerten Erfolg (45, 46, 38, 47). In verschiedenen Studien konnte bislang das Anthranilsäurederivat Tranilast seine beachtliche Wirkung auf den Restenoseprozeß sowohl in vitro als auch in vivo zeigen (39, 42, 43). Es kommt die Frage auf, ob weitere Vertreter der Anthranilsäurederivate nach dem Muster von Tranilast ebenfalls ähnliche Wirkungen auf das Proliferationsverhalten von glatten Muskelzellen aufweisen. Das Ziel dieser Arbeit war es, das antiproliferative Potential von Glafeninhydrochlorid, einem Antiphlogistikum aus der Gruppe der Anthranilsäurederivate, in einem in vitro – Modell mit humanen glatten Muskelzellen und humanen Endothelzellen aufzuzeigen. Desweiteren sollten dessen Wirkungen auf die klonogene Aktivität und Zellzyklusphasenverteilung, das Migrationsvermögen, den Aufbau des Zytoskeletts und die Bildung extrazellulärer Matrixproteine untersucht werden.

### **5.2 Material und Methoden**

Humane glatte Muskelzellen sowie humane Endothelzellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden über 4 Tage mit Glafeninhydrochlorid (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) behandelt. Die Hälfte der behandelten Gruppen wurde alle 4 Tage erneut mit Glafenin-HCl inkubiert, während die andere Hälfte in demselben Rhythmus Glafenin-HCl-freies Medium bis Tag 20 erhielt. Es wurden Proliferationskinetiken, Koloniebildungsassays als auch Migrationstests durchgeführt. Mittels FACS konnte die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen untersucht werden, und Effekte auf den Aufbau des Zytoskeletts sowie der Bildung extrazellulärer Matrixproteine der glatten Muskelzellen wurden lichtmikroskopisch bzw. über Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

## 5.3 Ergebnisse

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden:

- Glafeninhydrochlorid hemmt in konzentrationsabhängiger Weise effektiv das Zellwachstum sowohl der humanen glatten Muskelzellen als auch der humanen Endothelzellen. Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  waren dabei weitaus wirkungsvoller als 10  $\mu\text{M}$ .
- Auch die klonogene Aktivität beider Zellgruppen wird bei den hohen Konzentrationsgruppen in deutlicher Weise supprimiert.
- Bei 20-tägiger Dauerinkubation der glatten Muskelzellen kann bei den Konzentrationen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  in den Proliferationskinetiken als auch Koloniebildungsassays kein Erholungseffekt beobachtet werden.
- Insbesondere bei den Dauerbehandlungsgruppen tritt bei den Konzentrationen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ein konzentrationsabhängiger G2/M-Phasenblock auf, der G1-Phasenanteil ist gleichzeitig erniedrigt.
- Die Migrationsfähigkeit verringert sich tendentiell bei 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ , während bei 100  $\mu\text{M}$  sich eine Migrationszunahme abzuzeichnen scheint.
- Bei 100  $\mu\text{M}$  beträgt der Anteil der unter Glafenin-HCl zytotoxisch gewordenen Zellen etwa 8 %.
- Bei den glatten Muskelzellen wird der Aufbau eines strukturierten Zytoskeletts unter Inkubation mit Glafenin-HCl deutlich beeinträchtigt. Zudem ist die Bildung von Tenascin, einem wichtigen extrazellulären Matrixprotein, deutlich eingeschränkt.



## 5.4 Schlussbetrachtung

Viele Substanzen wurden im letzten Jahrzehnt in Labor- und Tierexperimenten auf ihre Fähigkeit einer möglichen Restenoseverhinderung nach PTA hin untersucht. Die meisten von ihnen konnten in klinischen Studien keine signifikante Wirkung auf den Restenoseprozess zeigen. Nur wenige Substanzen scheinen, insbesondere nun nach Einführung der „drug eluting stents“, das Potential zu haben, sich auch im klinischen Ablauf zu bewähren.

Glafeninhydrochlorid ist eine interessante Substanz, die klinisch als Antiphlogistikum eingesetzt wird und nun in den durchgeführten in vitro-Versuchen eine ausgeprägte antiproliferative Wirkung auf humane glatte Muskelzellen zeigt. Leider wurde diese Substanz wegen ihrer anaphylaktischen Nebenwirkungen aus den meisten europäischen Ländern verdrängt. Es ist daher eher fraglich, ob Glafenin-HCl zur Restenoseinhibierung sich in der Klinik durchsetzen kann. Zudem sind weitere Nachteile der Substanz die ebenfalls antiproliferativen Effekte auf humane Endothelzellen sowie die in hohen Dosen auftretende hohe Zelltoxizität.

Dennoch sind weitere in vitro- und in vivo-Versuche mit dieser Substanz durchaus sinnvoll, und das Ziel sollte es sein, einen umfassenden Überblick über die Gruppe der Anthranilsäurederivate und deren Wirkung auf den Restenoseprozess zu erlangen.

## 6 ANHANG

### 6.1 Proliferationskinetiken

a) Zellzahlbestimmungen der Einfachkinetiken (glatte Muskelzellen)

<b>E1</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	66000	789600	1316400	1621800	1793400	2037600
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	66000	693000	1393500	1545000	∅	1734000
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	66000	208500	576000	924000	927000	1529400
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	66000	85500	159000	474000	678600	945000

<b>E2</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	64500	871000	1162500	∅	1793400	1917000
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	64500	855000	1154000	∅	∅	1719000
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	64500	247800	545000	∅	928000	1187400
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	64500	119100	164000	∅	720000	799800

<b>E3</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	51900	437600	840000	1197000	1550400	1803000
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	51900	333200	661800	1176600	1281000	1638000
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	51900	120000	468600	828000	1095000	1308000
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	51900	57600	138600	208200	445800	837000

<b>E4</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	48600	530800	795000	1314000	1470000	1746000
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	48600	417200	789600	1098000	1348800	1542000
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	48600	140800	378000	817000	1108800	1275000
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	48600	78800	130200	241800	481800	778800

Tab. 6-1: Zellzahlen der Einfachkinetiken E1-E6, glatte Muskelzellen

<b>E5</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	75300	689400	1360200	1871400	2165400	2069000
<b>10 µM</b>	75300	621000	1287000	1609800	1882200	1932000
<b>50 µM</b>	75300	228600	755400	1255200	1489800	1606800
<b>100 µM</b>	75300	127200	219000	558000	901800	1261800

<b>E6</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	72300	578400	1434600	1816800	1988200	2048400
<b>10 µM</b>	72300	538200	1390800	1756800	1792200	2011800
<b>50 µM</b>	72300	222000	760800	1256400	1384800	1761000
<b>100 µM</b>	72300	97200	240000	508200	890400	1333800

*Fortsetzung Tab. 6-1: Zellzahlen der Einfachkinetiken E1-E6,  
glatte Muskelzellen*

b) Zellzahlbestimmungen der Dauerkinetiken (glatte Muskelzellen)

<b>D1</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	61500	523200	1350000	1658400	2142000	2343000
<b>10 µM</b>	61500	426600	1189800	1657200	1980000	2253600
<b>50 µM</b>	61500	135600	247800	267600	213400	334800
<b>100 µM</b>	61500	84000	115800	72000	54600	74400

<b>D2</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	57500	591600	1285200	1788600	1882200	2080200
<b>10 µM</b>	57500	460200	1252800	1725000	1878000	1974600
<b>50 µM</b>	57500	160800	214200	234600	258000	275400
<b>100 µM</b>	57500	89400	70800	84000	94200	60600

*Tab. 6-2: Zellzahlen der Dauerkinetiken D1-D6, glatte Muskelzellen*

<b>D3</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	129000	979800	1470600	1864800	2127000	2130000
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	129000	811200	1188000	1433400	1633200	1603200
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	129000	301800	321000	372000	306600	337800
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	129000	157200	117000	153600	93000	85800

<b>D4</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	101400	924600	1349400	1920000	1985400	2082000
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	101400	756000	1027200	1608600	1536000	1637400
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	101400	276000	349200	334800	308400	295800
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	101400	147000	112200	99000	100800	93600

<b>D5</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	81000	672600	1347000	1740000	1957200	2095200
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	81000	493800	1217400	1473000	1626000	1910400
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	81000	187800	238200	319200	234600	260400
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	81000	95400	62400	91800	87000	82800

<b>D6</b>	<b>d0</b>	<b>d4</b>	<b>d8</b>	<b>d12</b>	<b>d16</b>	<b>d20</b>
<b>Kontrolle</b>	84600	724800	1416600	1668600	1975800	2064600
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	84600	491400	1291800	1464000	1585800	1868400
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	84600	156000	229800	229800	208200	252000
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	84600	91200	64200	72000	78600	72600

*Fortsetzung Tab. 6-2: Zellzahlen der Dauerkinetiken D1-D6,  
glatte Muskelzellen*

c) Endothelzellen

Tag 4	Kontrolle	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
EN1	612000	522600	195600	103800
EN2	585000	525000	136200	76200
EN3	536400	483600	103800	59400

Tab. 6-3: Endothelzellzahlen an Tag 4

## 6.2 Koloniebildungsassays

a) KoBis der Einfachkinetiken (glatte Muskelzellen)

<u>Einfachkinetik 1</u>							<u>Einfachkinetik 2</u>						
<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	56	49	51	53	58	54	<b>Kontrolle</b>	61	56	50	52	57	56
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	43	49	40	51	52	46	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	48	49	45	53	51	46
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	37	34	33	23	40	21	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	25	41	34	37	35	31
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	5	11	9	5	12	9	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	8	7	1	6	8	4
<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	45	46	36	39	45	41	<b>Kontrolle</b>	37	35	38	42	37	38
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	40	31	37	43	32	32	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	46	44	40	45	36	42
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	33	25	31	22	34	25	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	33	28	29	19	24	26
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	18	19	16	18	18	25	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	20	19	16	24	22	20
<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	35	41	28	32	33	32	<b>Kontrolle</b>	38	35	36	29	26	27
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	27	31	25	24	19	23	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	23	18	29	23	32	28
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	23	26	21	30	23	22	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	29	25	26	34	22	20
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	11	20	19	12	11	13	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	16	19	18	16	18	13

Tab. 6-3: Koloniezahlen in d. „wells“ (1-6), Einfachkinetiken, glatte Muskelzellen

<u>Einfachkinetik 3</u>							<u>Einfachkinetik 4</u>						
<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	52	59	65	62	64	55	<b>Kontrolle</b>	54	61	60	58	50	48
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	59	45	61	59	48	49	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	54	60	52	38	45	52
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	27	20	23	29	30	25	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	25	31	35	26	28	23
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	6	5	2	6	5	0	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	3	9	5	6	4	4
<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	49	53	44	46	48	58	<b>Kontrolle</b>	62	48	44	48	45	54
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	52	50	62	42	50	56	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	52	40	48	41	46	44
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	40	41	42	42	38	34	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	35	34	36	38	53	40
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	12	12	16	17	15	12	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	12	12	10	10	13	17
<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	42	45	40	39	37	44	<b>Kontrolle</b>	39	39	38	46	41	37
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	31	25	33	27	26	29	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	35	28	34	26	27	25
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	34	35	37	31	34	36	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	34	38	32	22	33	31
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	27	29	30	23	22	29	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	25	30	23	30	22	25

*Fortsetzung Tab. 6-3: Koloniezahlen in den „wells“ (1-6), Einfachkinetiken, glatte Muskelzellen*

<u>Einfachkinetik 5</u>							<u>Einfachkinetik 6</u>						
<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	43	52	56	48	44	50	<b>Kontrolle</b>	49	57	64	54	54	61
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	47	46	49	50	45	45	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	42	49	47	42	44	38
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	32	27	26	30	29	25	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	36	30	38	34	29	31
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	9	4	7	7	9	9	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	8	7	4	12	11	11
<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	57	58	53	61	55	53	<b>Kontrolle</b>	52	62	58	59	63	57
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	64	62	60	64	61	52	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	61	66	56	68	57	58
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	48	38	42	45	45	46	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	46	42	54	49	53	49
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	31	26	25	31	28	26	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	24	27	27	25	21	29
<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	∅	37	42	∅	35	31	<b>Kontrolle</b>	∅	30	35	∅	44	43
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	38	33	∅	31	34	∅	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	∅	30	31	∅	35	36
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	43	37	∅	35	32	∅	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	∅	45	40	∅	42	34
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	∅	21	22	20	27	28	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	∅	28	27	∅	29	30

*Fortsetzung Tab. 6-3: Koloniezahlen in den „wells“ (1-6), Einfachkinetiken, glatte Muskelzellen*

b) KoBis der Dauerkinetiken (glatte Muskelzellen)

<u>Dauerkinetik 1</u>							<u>Dauerkinetik 2</u>						
<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	51	66	53	54	56	47	<b>Kontrolle</b>	47	52	55	50	53	44
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	45	49	47	51	46	51	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	45	45	40	49	47	51
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	24	25	21	22	27	26	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	15	28	22	32	26	35
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	0	1	0	2	0	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	0	1	0	4	0
<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	57	64	60	60	59	55	<b>Kontrolle</b>	61	63	54	58	56	51
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	51	46	48	52	49	55	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	43	45	50	52	49	46
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	10	15	11	14	15	9	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	15	19	10	18	17	17
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	0	0	0	0	0	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	29	28	34	36	35	26	<b>Kontrolle</b>	32	29	34	38	30	28
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	35	41	30	38	39	34	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	33	40	30	30	33	31
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	7	3	7	2	3	2	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	0	1	4	3	2	6
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	0	0	0	0	0	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	0	0	0	0	0

Tab. 6-4: Koloniezahlen in den „wells“ (1-6), Dauerkinetiken, glatte Muskelzellen



<u>Dauerkinetik 3</u>							<u>Dauerkinetik 4</u>						
<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	47	54	53	56	56	∅	<b>Kontrolle</b>	50	55	52	58	49	∅
<b>10 µM</b>	54	50	38	43	44	∅	<b>10 µM</b>		51	46	51	55	∅
<b>50 µM</b>	33	30	∅	∅	∅	∅	<b>50 µM</b>	28	27	19	∅	∅	∅
<b>100 µM</b>	9	6	0	2	∅	∅	<b>100 µM</b>	24	10	8	12	7	∅
<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	48	45	41	51	58	51	<b>Kontrolle</b>	62	48	46	50	52	48
<b>10 µM</b>	47	47	45	43	52	48	<b>10 µM</b>	50	43	53	40	53	42
<b>50 µM</b>	16	16	15	16	19	17	<b>50 µM</b>	20	16	15	14	16	11
<b>100 µM</b>	7	10	2	5	7	6	<b>100 µM</b>	16	14	10	13	12	11
<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	35	38	38	39	40	36	<b>Kontrolle</b>	39	41	36	37	32	41
<b>10 µM</b>	36	35	29	38	36	32	<b>10 µM</b>	28	29	32	29	32	31
<b>50 µM</b>	14	13	8	7	9	8	<b>50 µM</b>	14	8	17	7	13	15
<b>100 µM</b>	1	3	1	2	4	4	<b>100 µM</b>	2	4	2	1	4	1

*Fortsetzung Tab. 6-4: Koloniezahlen in den „wells“ (1-6), Dauerkinetiken, glatte Muskelzellen*

<u>Dauerkinetik 5</u>							<u>Dauerkinetik 6</u>						
<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	62	61	67	63	70	72	<b>Kontrolle</b>	52	55	61	65	64	66
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	56	52	65	61	49	55	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	59	60	52	53	59	54
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	30	34	25	26	34	24	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	35	43	35	34	39	28
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	9	11	4	12	10	7	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	3	8	6	3	4	6
<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	67	61	57	59	49	54	<b>Kontrolle</b>	47	63	49	61	56	44
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	54	45	50	51	42	43	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	45	40	53	59	49	55
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	10	12	9	13	7	8	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	12	10	12	7	9	12
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	4	1	1	2	1	3	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	2	4	3	3	5	4
<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Tag 20</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	35	30	41	27	38	39	<b>Kontrolle</b>	35	42	29	32	36	36
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	40	36	41	35	39	34	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	29	31	28	23	28	33
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	9	5	5	7	8	5	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	12	7	7	8	5	5
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	1	3	1	1	0	1	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	1	3	1	0	3	1

*Fortsetzung Tab. 6-4: Koloniezahlen in den „wells“ (1-6), Dauerkinetiken, glatte Muskelzellen*

c) KoBis der Endothelzellen an Tag 4

<b>EN1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	93	92	82	90	97	92
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	88	81	76	95	98	80
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	76	72	84	81	88	67
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	52	34	47	35	45	40

<b>EN2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	94	87	∅	83	76	70
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	85	75	∅	74	86	60
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	20	31	13	45	48	22
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	1	2	4	4	0

<b>EN3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Kontrolle</b>	84	87	86	82	95	91
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	76	97	77	84	80	84
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	28	26	28	24	30	27
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	0	1	3	1	1	1

*Tab. 6-5: Koloniezahlen in den einzelnen „wells“ 1-6 bei den Endothelzellen*

## 6.3 Zellzyklusanalyse (FACS)

a) FACS-Analysen der Einfachkinetiken (glatte Muskelzellen)

G1-Phase				S-Phase				G2/M-Phase			
E1	d4	d8	d20	E1	d4	d8	d20	E1	d4	d8	d20
<b>Kontr.</b>	80,96	88,31	83,23	<b>Kontr.</b>	5,96	1,88	1,25	<b>Kontr.</b>	13,13	9,39	14,4
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	82,36	90,14	82,33	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	5,34	1,35	1,04	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	12,38	7,9	16,05
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	74,16	75,13	75,08	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	3,4	2,34	3,31	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	22,44	21,16	20,42
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	71,76	61,85	77,37	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	2,73	4,12	3,81	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	25,66	30,2	18,08
E2	d4	d8	d20	E2	d4	d8	d20	E2	d4	d8	d20
<b>Kontr.</b>	69,72	86,14	83,6	<b>Kontr.</b>	18,82	1,83	1,3	<b>Kontr.</b>	10,69	10,94	13,85
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	63,42	87,57	82,95	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	23,4	2,52	1,83	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	12,53	9,11	13,55
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	65,47	70,21	79,02	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	14,25	9,42	2,64	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	19,13	18,98	16,55
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	58,4	52,72	79,18	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	7,02	11,42	5,21	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	32,55	31,34	14,14
E3	d4	d8	d20	E3	d4	d8	d20	E3	d4	d8	d20
<b>Kontr.</b>	79,25	87,84	83,98	<b>Kontr.</b>	12,54	0,93	0,47	<b>Kontr.</b>	7,62	10,95	14,91
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	76,52	86,37	85,58	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	14,06	0,73	0,4	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	9,21	12,57	13,48
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	71,84	81,18	82,26	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	8,96	5,16	0,82	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	18,8	13,19	15,98
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	61,65	53,32	79,04	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	3,99	15,89	2,2	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	33,19	29,7	18,14

Tab. 6-6: Prozentuale Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen an den Tagen 4, 8 und 20; Einfachkinetiken E1-3, glatte Muskelzellen

b) FACS-Analysen der Dauerkinetiken (glatte Muskelzellen)

G1-Phase				S-Phase				G2/M-Phase			
D1	d4	d8	d20	D1	d4	d8	d20	D1	d4	d8	d20
<b>Kontr.</b>	73,78	89,09	83,58	<b>Kontr.</b>	16,54	1,04	0,22	<b>Kontr.</b>	8,9	9,08	15,48
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	67,49	86,9	86,54	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	22,5	0,73	0,29	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	9,65	11,21	12,54
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	69,27	70,69	69,58	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	11,85	3,63	1,59	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	18,5	23,29	27,24
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	61,47	63,13	57,28	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	5,91	4,47	0,97	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	31,44	30,73	39,32
D2	d4	d8	d20	D2	d4	d8	d20	D2	d4	d8	d20
<b>Kontr.</b>	79,39	87,52	83,32	<b>Kontr.</b>	9,86	0,37	0,73	<b>Kontr.</b>	10,13	11,57	15,07
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	73,81	90,21	84,74	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	13,35	0,39	0,68	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	11,48	9,1	13,46
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	73,25	75,48	75,39	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	7,92	1,64	2,5	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	18,33	22,28	21,09
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	70,67	68,25	75,47	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	6,09	1,78	3,8	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	22,5	28,42	19,69
D3	d4	d8	d20	D3	d4	d8	d20	D3	d4	d8	d20
<b>Kontr.</b>	69,72	86,53	84,19	<b>Kontr.</b>	18,63	0,18	1,17	<b>Kontr.</b>	10,44	12,93	13,56
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	66,43	86,52	84,2	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	23,58	0,66	0,79	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	9,76	12,28	13,84
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	72,34	73,45	69,73	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	11,1	2,63	1,91	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	16,26	23,35	26,34
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	63,78	68,01	77,13	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	6,55	2,38	3,66	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	28,21	27,42	18,37

Tab. 6-7: Prozentuale Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen an den Tagen 4, 8 und 20; Dauerkinetiken D1-3, glatte Muskelzellen

b) FACS-Analysen der Endothelzellkinetiken

G1-Phase		S-Phase		G2/M-Phase	
EN1	d4	EN1	d4	EN1	d4
Kontrolle	79,04	Kontrolle	8,4	Kontrolle	10,95
10 $\mu\text{M}$	72,69	10 $\mu\text{M}$	11,62	10 $\mu\text{M}$	11,66
50 $\mu\text{M}$	68,68	50 $\mu\text{M}$	14,83	50 $\mu\text{M}$	14,29
100 $\mu\text{M}$	58,93	100 $\mu\text{M}$	10,65	100 $\mu\text{M}$	28,1
EN2	d4	EN2	d4	EN2	d4
Kontrolle	74,79	Kontrolle	10,22	Kontrolle	12,02
10 $\mu\text{M}$	72,89	10 $\mu\text{M}$	11,57	10 $\mu\text{M}$	11,72
50 $\mu\text{M}$	65,44	50 $\mu\text{M}$	16	50 $\mu\text{M}$	15,53
100 $\mu\text{M}$	60,8	100 $\mu\text{M}$	7,15	100 $\mu\text{M}$	26,83

Tab. 6-8: Prozentuale Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen an Tag 4; Endothelkinetiken ENDO1 und ENDO2

## 6.4 Migrationstests

d4	K	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
E1	13	42	1	69
E2	44	33	31	13
E3	78	61	65	95
E4	98	∅	69	106
E5	48	49	48	122
E6	68	51	74	134

Tab. 6-9: Zahlen migrierter Muskelzellen pro Membraneinsatz an Tag 4. Zahlen entsprechen migrierter Zellzahl auf 2 Diagonalen à 16 Quadrate, also insg. 32 Quadrate (1 Quadrat = 0,0625 mm<sup>2</sup>, 32 Quadrate = 2 mm<sup>2</sup>), Einfachkinetiken E1-E6

## 6.5 LDH-Test

	Kontrolle	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>E1,</b>	0,19	0,25	0,26	0,56
<b>d4</b>	0,237	0,237	0,24	0,63
	0,229	0,229	0,271	0,594

	Kontrolle	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>E2,</b>	0,29	0,233	0,206	0,535
<b>d4</b>	0,278	0,317	0,246	0,475
	0,212	0,164	0,18	0,433

	Kontrolle	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>E3,</b>	0,181	0,215	0,295	0,462
<b>d4</b>	0,16	0,199	0,193	0,437
	0,192	0,159	0,156	0,466

LDH-AKTIVITÄT UNTER TRITON  ( = HIGH CONTROL = 100 % ZYTOTOXIZITÄT )		
3,634	3,692	3,732

*Tab. 6-10: LDH-Aktivitäten der Einfachkinetiken E1-3 an Tag 4. Die LDH-Aktivität der glatten Muskelzellen unter Tritongabe wird gleich 100 % Zytotoxizität gleichgesetzt.*

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1. COOK S, EIGLER N, SHEFTER A, HESTRIN L, GOLDENBERG T, FORESTER JS, LITVACK F**  
Percutaneous excimer laser coronary angioplasty of lesions not favorable for balloon angioplasty.  
*Circulation* 1991; 84: 632-643
- 2. FOURRIER JL, BERTRAND ME, AUTH DC, LABLANCHE JM, GOMMEAUX A, BRUNETAUD JM**  
Percutaneous coronary rotational angioplasty in humans: preliminary report.  
*J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 1278-1282
- 3. HINOHARA T, SELMON MR, ROBERTSON GC, BRADEN L, SIMPSON JB**  
Directional atherectomy. New approaches for treatment of obstructive coronary and peripheral vascular disease.  
*Circulation* 1990; 81 (suppl IV): IV-79 – IV-91
- 4. SAFIAN RD, GELBFISH JS, RAYMOND EE, SCHNITT SJ, SCHMIDT DA, BAIM DS**  
Coronary atherectomy. Clinical, angiographic, and histological findings and observations regarding potential mechanisms.  
*Circulation* 1990; 82: 69-79
- 5. SIGWART U, PUEL J, MIRKOVITCH V, JOFFRE F, KAPPENBERGER L**  
Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty.  
*N Engl J Med* 1987; 316: 701-706
- 6. TOPOL EJ**  
Promises and pitfalls of new devices for coronary artery disease.  
*Circulation* 1991; 83: 689-694
- 7. ADELMAN AG, COHEN EA, KIMBALL BP, BONAN R, RICCI DR, WEBB JG, LARAMEE L, BARBEAU G, TRABOULSI M, CORBETT BN, SCHWARTZ L, LOGAN AG**  
A comparison of directional atherectomy with balloon angioplasty for lesions of the left anterior descending coronary artery.  
*N Engl J Med* 1993; 329: 228-233



- 8. FORRESTER JS, FISHBEIN M, HELFANT R, FAGIN J**  
A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies.  
*J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 758-769
- 9. MCBRIDE W, LANGE RA, HILLIS LD**  
Restenosis after successful coronary angioplasty.  
*N Engl J Med* 1988; 319: 1734-1737
- 10. TOPOL EJ, LEYA F, PINKERTON CA, WHITLOW PL, HÖFLING B, SIMONTON CA, MASDEN RR, SERRUYS PW, LEON MB, WILLIAMS DO, KING SB III, MARK DB, ISNER JM, HOLMES DR, ELLIS SG, LEE KL, KEELER GP, BERDAN LG, HINOHARA T, CALIFF RM, FOR THE CAVEAT STUDY GROUP**  
A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary disease.  
*N Engl J Med* 1993; 329: 221-227
- 11. SILBER S**  
Restenose und intrakoronare Bestrahlung.  
*R. Bach und Spitzer AKA Verlag, München* 1998; 101-110
- 12. HILLEGASS WB, OHMAN EM, CALIFF RM**  
Restenosis: The clinical issues, in Topol EJ Ed.  
*Textbook of Interventional Cardiology, Philadelphia, Saunders* 1994; ed 2 (vol 1): 415-435
- 13. NOBUYOSHI M, KIMURA T, NOSAKA H, MIOKA S, UENO K, YOKOI H, HAMASAKI N, HORIUCHI H, OHISHI H**  
Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients.  
*J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 616-622
- 14. SERRUYS PW, LUIJTEN HE, BEATT KJ, GEUSKENS R, DE FEYTER PJ, V D BRAND M, REIBER JHC, KATEN HJ, V ES GA, HUGENHOLTZ PG**  
Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon.  
*Circulation* 1988; 77: 361-371

15. **KASTRATI A, SCHÖMIG A, DIETZ R, NEUMANN FJ, RICHARDT G**  
Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting.  
*Circulation* 1993; 87: 1498-1505
  
16. **CASSCELLS W**  
Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis.  
*Circulation* 1992; 86: 723-729
  
17. **ROSS R**  
The pathogenesis of atherosclerosis – an update.  
*N engl J Med* 1986; 314: 488-500
  
18. **ROSS R**  
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.  
*Nature* 1993; 362: 801-809
  
19. **NEMERSON Y**  
Tissue factor and hemostasis.  
*Blood* 1988; 71: 1-8
  
20. **WILCOX JN, SMITH KM, SCHWARTZ SM, GORDON D**  
Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2839-2843
  
21. **MARMUR JD, ROSSIKHINA M, GUHA A, FYFE B, FRIEDRICH V, MENDLOWITZ M, NEMERSON Y, TAUBMAN MB**  
Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury.  
*J Clin Invest* 1993; 91: 2253-2259
  
22. **MULLER DWM, ELLIS SG, TOPOL EJ**  
Experimental models of coronary artery stenosis.  
*J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 418-432
  
23. **SCHWARTZ RS, MURPHY JG, EDWARDS WD, CAMRUD AR, VLIETSTRA RE, HOLMES DR**  
Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries.  
*Circulation* 1990; 82: 2190-2200

24. **COUGHLIN SR, VU TKH, HUNG DT, WHEATON VI**  
Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities.  
*J Clin Invest* 1992; 89: 351-355
  
25. **LIBBY P, SCHWARTZ D, BROGI E, TANAKA H, CLINTON SK**  
A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression.  
*Circulation* 1992; 88: III-47–III-52
  
26. **RAPPOLEE DA, MARK D, BANDA MJ, WERB Z**  
Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping.  
*Science* 1988; 241: 708-712
  
27. **HEDIN U, HOLM J, HANSSON GK**  
Induction of tenascin in rat arterial injury.  
*Am J Pathol* 1991; 139: 649-656
  
28. **CRISSMAN HA, MULLANEY PF, STEINKAMP JA**  
Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells.  
In: Prescott DM (Hrsg.): *Methods in cell biology*.  
9. Auflage, Academic Press, New York 1975
  
29. **DE SMET J, VAN DER ZANDE Y, VAN DER HELM R, SINGH C, TEPPER M**  
The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling.  
*Cardiovascular research* 1998; 39: 224-232
  
30. **CAMPBELL GR, CAMPBELL JH**  
Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis – implications for the pathogenesis of atherosclerosis.  
*Exp Mol Pathol* 1985; 42: 139-162
  
31. **ORMEROD MD**  
Analysis of DNA.  
In: Ormerod MG (Hrsg.): *Flow cytometrie*.  
2. Auflage, IRL Press, Oxford 1994, 119-156

32. **THYBERG J, HEDIN U, SJÖLUND M, PALMBERG L, BOTTGER BA**  
Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells.  
*Atherosclerosis* 1990; 10: 966-990
33. **CLOWES AW, SCHWARTZ SM**  
Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery.  
*Circ Res* 1985; 56: 139-145
34. **SCHWARTZ RS, HOLMES D, TOPOL E**  
The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms.  
*J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 1284-1293
35. **SCHWARTZ SM, CAMPBELL GR, CAMPBELL JH**  
Replication of smooth muscle cells in vascular disease.  
*Circ Res* 1986; 58: 427-444
36. **SAKAKI S, MURAKAMI T, OGINO T, TAKAHASHI M, KAWASAKI S**  
Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromdesoxyuridine.  
*Cytometrie* 1986; 7: 391-395
37. **STEEL GG**  
Basic clinical radiobiology.  
*Steel GG, Edward Arnold* 1993; 28-39
38. **LEFKOVITS J, TOPOL EJ**  
Pharmacological Approaches for the Prevention of Restenosis After Percutaneous Coronary Intervention.  
*Progress in Cardiovascular Diseases* 1997; Vol. 40 No. 2: 141-158
39. **UEDA K, TAMAI H, HSU Y-S, ET AL**  
Efficacy of tranilast on restenosis after coronary angioplasty: Is there any rebound phenomenon after ceasing tranilast at 3 months?  
*J Am Coll Cardiol* 1995; 25:225A
40. **BJORNSON TD, DRYJSKI M, TLUCZEK J, MENNIE R, RONAN J, MELLIN TN, THOMAS KA**  
Acidic fibroblast growth factor promotes vascular repair.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8651-8655

41. **CASSELLS W**  
Smooth muscle cell growth factors.  
*Prog Growth Factor Res* 1991; 3: 177-206
  
42. **MIYAZAWA N, UMEMURA K, KONDO K, NAKASHIMA M**  
Effects of Pemirolast and Tranilast on Intimal Thickening After Arterial Injury in the Rat.  
*Journal of Cardiovascular Pharmacologie* 1997; 30: 157-162
  
43. **THE TREAT STUDY INVESTIGATORS**  
The impact of Tranilast on restenosis following coronary angioplasty: the Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT).  
*Circulation* 1994; 90: 1-652
  
44. **FISHMAN D, LEON M, BAIM D**  
A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease.  
*N Engl J Med* 1994; 331: 496-501
  
45. **CAIRNS JA, GILL JB, MORTON B**  
Enoxaparine and Maxepa for the prevention of angioplasty restenosis (EMPAR).  
*Circulation* 1994; 90: 1-651
  
46. **EPILOG INVESTIGATORS**  
Effect of the platelet glycoprotein Iib/IIIa receptor inhibitor abciximab with lower heparin dosages on ischemic complications of percutaneous coronary revascularization.  
*N Engl J Med* 1997; 336: 1689-96
  
47. **TOPOL EJ, CALIFF RM, WEISMAN HF**  
Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet Iib/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months.  
*Lancet* 1994; 343: 881-6
  
48. **HOLMES D, FITZGERALD P, GOLDBERG S ET AL.**  
The PRESTO (Prevention of restenosis with tranilast and ist outcomes) protocol: a double-blind, placebo-controlled trial.  
*Am Heart J* 2000; 139: 23-31

- 49. KARSCH KR, PREISACK MB, BILDON R ET AL.**  
Low molecular weight heparin (reviparin) in percutaneous transluminal coronary angioplasty.  
*J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1437-1443
- 50. G. TEPE**  
Brachytherapie und „drug-eluting stents“. Neue Hoffnungen zur Prävention der Intima-hyperplasie nach interventioneller Revaskularisierung.  
*Gefässchirurgie* 2004; 9: 96-104
- 51. TOPOL EJ, CALIFF RM, WEISMAN HF ET AL.**  
Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. The EPIC Investigators.  
*Lancet* 1994; 343: 881-886
- 52. FISCHMAN DL, LEON MB, BAIM DS ET AL.**  
A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon-angioplasty in the treatment of coronary artery disease.  
*N Engl J Med* 1994; 331: 496-501
- 53. SERRUYS PW, DE JAEGERE P, KIEMENEIJ F ET AL.**  
A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary disease.  
*N Engl J Med* 1994; 331: 489-495
- 54. KEARNEY M, PIECZEK A, HALEY L, LOSORDO DW, ANDRES V, SCHAINFELD R, ROSENFELD K, ISNER JM**  
Histopathology of In-Stent-Restenosis in patients with Peripheral Artery Disease.  
*Circulation* 1997; 95: 1998-2002
- 55. SCHÖBER W, KEHLBACH R, GEBERT R, WISKIRCHEN J, RODEGERDTS E, CLAUSSEN CD ET AL.**  
Meclofenamic acid for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation and migration – an in vitro study.  
*CVIR* 2002a; 25: 57-63
- 56. TEIRSTEIN PS, MASSULO V, JANI S ET AL.**  
Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting.  
*N Engl J Med* 1997; 336: 1697-1703

- 57. HENNING E, DITTMANN H, WISKIRCHEN J, BANTLEON R, KEHLBACH R, CLAUSSEN CD, DUDA SH**  
Dosisabhängige Auswirkungen des kombinierten  $\beta$ -Emitters  $^{188}\text{Rhenium}$  auf humane Endothelzellen und humane vaskuläre glatte Muskelzellen.  
*Fortschr Röntgenstr* 2004; 176: 404-408
- 58. POWELL BD, RIHAL CS, BELL MT ET AL.**  
Anticipated impact of drug-eluting stents on referral patterns for coronary bypass graft surgery: a population-based angiographic analysis.  
*Mayo Clin Proc* 2004; 79: 769
- 59. MINAR E, POKRAJAC B, AHMADI R ET AL.**  
Brachytherapy for prophylaxis of restenosis after long-segment femoro-popliteal angioplasty.  
*Radiology* 1998; 208: 173-179
- 60. DUDA SH, POERNER TC, WIESINGER B ET AL.**  
Drug-eluting stents: potential applications for peripheral arterial occlusive disease.  
*J Vasc Interv Radiol* 2003; 14: 291-301
- 61. MORICE MC, SERRUYS PW, SOUSA JE ET AL.**  
A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization.  
*N Engl J Med* 2002; 346: 1773
- 62. MINAR E, POKRAJAC B, BUDINSKY A, POTTER R**  
Endovascular brachytherapy in peripheral arteries.  
*Vasa* 2003; 32: 3-9
- 63. DUDA SH, HUPPERT PE, KREIS A, KARSCH KR, CLAUSSEN CD**  
Ultrasound-monitored laser angioplasty: preliminary clinical results.  
*Cardiovasc Intervent Radiol* 1993; 16: 89-92
- 64. ALBIERO R, NISHIDA T, ADAMIAN M ET AL.**  
Edge restenosis after implantation of high activity  $(^{32}\text{P})$  radioactive beta-emitting stents.  
*Circulation* 2000; 101: 2454-2457

- 65. SERRUYS PW, DEGERTEKIN M, TANABE K ET AL.**  
Intravascular ultrasound findings in the multicenter, randomized, double blind RAVEL (Randomized study with the sirolimus-eluting Velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery Lesions) trial.  
*Circulation* 2002; 106: 798
- 66. MOSES JW, LEON MB, POPMA JJ ET AL.**  
Sirolimus-eluting stents versus standard stent in patients with stenosis in a native coronary artery.  
*N Engl J Med* 2003; 349: 1315
- 67. SCHOFER J, SCHLUTER M, GERSHLICK AH ET AL.**  
Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS).  
*Lancet* 2003; 362: 1093
- 68. SCHAMPAERT E, COHEN EA, SCHLUTER M ET AL.**  
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* 2004; 43: 1110
- 69. AXEL DI, KUNERT W, GOGGELMANN C ET AL.**  
Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery.  
*Circulation* 1997; 96: 636-645
- 70. WISKIRCHEN J, SCHÖBER W, SCHAT N, KEHLBACH R, WERSEBE A, TEPE G, CLAUSSEN CD, DUDA SH**  
The effects of paclitaxel on three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study.  
*Invest Radiol* 2004; 39: 565-571
- 71. CAROZZA JP JR.**  
Sirolimus-eluting stents: does a great stent still need a good interventionalist?  
*J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1116
- 72. LEMOS PA, SAIA F, LIGTHART JM ET AL.**  
Coronary restenosis after sirolimus-eluting stent implantation: morphological description and mechanistic analysis from a consecutive series of cases.  
*Circulation* 2003; 108: 257



- 73. FUJII K, MINTZ GS, KOBAYASHI Y ET AL.**  
Contribution of stent underexpansion to recurrence after sirolimus-eluting stent implantation for in-stent restenosis.  
*Circulation* 2004; 109: 1085
- 74. STONE GW, ELLIS SG, COX DA ET AL.**  
One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial.  
*Circulation* 2004; 109: 1942
- 75. ABIZAID A, ALBERTAL M, COSTA MA ET AL.**  
First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting-stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial.  
*J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1118
- 76. GRUBE E, BULLESFELD L**  
Initial experience with paclitaxel-coated stents.  
*J Interv Cardiol* 2002; 15: 471-475
- 77. KASTRATI A, MEHILI J, VON BECKERATH N ET AL.**  
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* 2005; 293: 165
- 78. GOY JJ, STAUFFER JC, SIEGENTHALER M ET AL.**  
A prospective randomized comparison between paclitaxel an sirolimus stents in the real world of interventional cardiology. The TAXi trial.  
*J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 308
- 79. MARTINDALE**  
The Extra Pharmacopoeia  
*Roy. Pharm. Soc. G.B.* 982-1999; Vol. 99: Exp. 31/03/99
- 80. SCHÖBER W, WISKIRCHEN J, KEHLBACH R, GEBERT R, RODEGERDTS E, BETSCH A ET AL.**  
Flufenamic Acid: Growth modulating effects on human aortic smooth muscle cells in vitro.  
*J Vasc Interv Radiol* 2002b; 13: 89-96

- 81. FISHELL TA, KHARMA BK, FISHELL DR**  
Low-dose,  $\beta$ -particle emission from stent wire results in complete, localized inhibition of smooth muscle cell proliferation.  
*Circulation* 1994; 98: 2956-2963
- 82. HEHRLEIN C, STINTZ M, KINSCHERF R**  
Pure beta-particle-emitting-stents inhibit neointimal formation in rabbits.  
*Circulation* 1996; 93: 641-645
- 83. MAJESKY MW**  
Neointima formation after acute vascular injury. Role of counteradhesive extracellular matrix proteins.  
*Tex Heart Inst J* 1994; 21: 78-85

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. S. H. Duda und seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. W. Schöber, Herrn R. Kehlbach und Frau R. Gebert, die jederzeit Ansprechpartner waren und mich auf eine nette, kompetente und zuverlässige Weise durch die Dissertation geführt haben. Vielen Dank auch Herrn Prof. K. Dietz für die Statistikberatung.

Diese Arbeit ist vor allem auch der Verdienst meiner lieben Frau Thanh-Diem und meiner Eltern, die mir immer wieder aufs neue Kraft und Zuversicht gegeben haben.

## Curriculum Vitae

26.04.1976	geboren in Saigon/Vietnam
1981-1982	Grundschule in Saigon/Vietnam
1983-1985	Schillerschule in Reutlingen
1986-1995	Albert-Einstein-Gymnasium in Reutlingen
06/1995	Abitur
04/1996	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1998-2000	Klinikfamulaturen in Chirurgie, Radiologie und Innere Medizin. Zudem Famulaturen in einer Radiologischen & Nuklearmedizinischen Praxis und einer Allgemeinärztlichen Praxis
02-04/2002	PJ-Aufenthalt am Sunnybrooks & Women's College Health Sciences Centre, Orthopaedic & Arthritic Hospital, University of Toronto (Kanada)
11/2001-10/2002	PJ-Tertiale in Innerer Medizin, Chirurgie, Radiologie im Klinikum am Steinenberg (Reutlingen)
20.11.2002	Abschluss des Medizinstudiums mit dem 3. Staatsexamen
03/2003-05/2004	Arzt im Praktikum in der Radioonkologischen & Nuklearmedizinischen Klinik im Klinikum Ludwigsburg
seit 07/2004	Assistenzarzt im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie im Klinikum Ludwigsburg