

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Dosisabhängiger Einfluss von Combretastatin A-4 auf das
Wachstum humaner, aortaler, glatter Muskelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Andraos, Ibrahim

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wiskirchen

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 14.08.2017

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Zellen und Methoden der Zellkultur	7
2.2	Medien und Medienzusätze	8
2.2.1	Kulturmedium	8
2.2.2	Fetales Kälberserum (FCS)	8
2.2.3	L-Glutamin	8
2.2.4	Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	9
2.2.5	Trypsin	9
2.2.6	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung = PBS)	9
2.2.7	Einfriermedium (Cryomedium)	9
2.3	Methoden der Zellkultur	9
2.3.1	Routinekultur	9
2.3.2	Subkultivierung	10
2.3.3	Kryokonservierung	10
2.3.4	Auftauen	11
2.3.5	DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)-Test	11
2.4	Dosisfindung CA-4	12
2.4.1	Prinzip	12
2.4.2	Material	13
2.4.3	Prozedur	13
2.4.4	Bestimmung der zu untersuchenden Konzentrationen von CA-4	14
2.5	Proliferationskinetik (PK)	16
2.5.1	Ablauf der Proliferationskinetik	16
2.5.2	Statistische Auswertung der Proliferationskinetik	17
2.6	Koloniebildungs-Assay (KOB)	17
2.6.1	Fixierung	17
2.6.2	Färbung	18
2.6.3	Auswertung	18
2.7	Zellzyklusanalyse und DNA-Gehalt	19
2.7.1	Prinzip der flusszytometrischen Messung	19

	Seite
2.7.2 Lösungen und Antikörper	19
2.7.2.1 Bromdesoxyuridin (BrdU)-Lösung	19
2.7.2.2 PBS / BSA	19
2.7.2.3 Pepsinlösung	19
2.7.2.4 Salzsäure (HCl)	20
2.7.2.5 Antikörper (AK)	20
2.7.2.6 Propidiumiodid-Lösung (PI-Lösung)	20
2.7.2.7 RNase	20
2.7.2.8 Propidiumiodid-RNase-Lösung	20
2.8 Methodik der Durchflusszytometrie	21
2.8.1 Auswertung	22
2.8.2 Statistik der Durchflusszytometrie	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Proliferationskinetik (PK)	24
3.2 Koloniebildungs-Assay (KOBI)	27
3.3 Zellzyklusanalyse	31
4 Diskussion	35
4.1 Diskussion der Ergebnisse	35
4.2 Problematik der PTA	39
4.2.1 Der Restenosemechanismus	40
4.3 Combretastatin A-4	41
4.4 Alternative zytostatische Therapieansätze	45
4.4.1 Paclitaxel (Taxol)	45
4.4.2 Sirolimus (Rapamycin)	49
4.4.3 Sirolimus versus Paclitaxel	51
4.4.4 Dexamethason	53
4.4.5 Anthranilinsäure-Derivate	56
4.4.5.1 Flufenaminsäure	56
4.4.5.2 Glafeninhydrochlorid	57
4.4.5.3 Tranilast	58
4.5 Weitere medikamentöse Therapieansätze zur Restenoseprophylaxe	59

	Seite
4.5.1 Antithrombotika (Heparin, Hirudin)	59
4.5.2 Kalzium-Antagonisten	61
4.5.3 Thrombozytenaggregationshemmer	63
4.5.4 ACE-Hemmer	67
5 Zusammenfassung	69
6 Literaturverzeichnis	70

Abbildungen:	Seite
Nr. 1 Molekularstruktur des Thymidin und BrdU	12
Nr. 2 Graphische Darstellung der Dosisfeinbestimmung CA-4	16
Nr. 3 Graphische Darstellung der Proliferationskinetik CA-4 _{Einfach/Dauer-Behandlung}	25
Nr. 4 Graphische Darstellung der KOBIs CA-4 _{Einfach-Behandlung}	28
Nr. 5 Graphische Darstellung der KOBIs CA-4 _{Dauer-Behandlung}	29
Nr. 6 Schematische Darstellung des Zellzyklusses	32
Nr. 7 Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse CA-4 _{Einfach-Behandlung}	33
Nr. 8 Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse CA-4 _{Dauer-Behandlung}	33

Tabellen:	
Nr. 1 Ergebnisse des BrdU-ELISA Assays der 1. Versuchsreihe (V1)	14
Nr. 2 Ergebnisse des BrdU-ELISA Assays der 2. Versuchsreihe (V2)	14
Nr. 3 Ergebnisse Feinbestimmung des BrdU-ELISA Assays V1	15
Nr. 4 Ergebnisse Feinbestimmung des BrdU-ELISA Assays V2	15
Nr. 5 Geomtr. Mittelwerte der Zellzahlen aller 5 PKs für CA-4 _{Einfach-Behandlung}	24
Nr. 6 Geomtr. Mittelwerte der Zellzahlen aller 5 PKs für CA-4 _{Dauer-Behandlung}	24
Nr. 7 Arithmetische Mittelwerte der KOBIs CA-4 _{Einfach-Behandlung}	27
Nr. 8 Arithmetische Mittelwerte der KOBIs CA-4 _{Dauer-Behandlung}	27
Nr. 9 Arithmetische Mittelwerte der KOBIs CA-4 Langzeit _{Einfach-Behandlung}	28
Nr. 10 Phasenanteile (%) in Abhängigkeit der Behandlungsart und der Dosis	32

1 Einleitung

Thema der Dissertation ist der dosisabhängige Einfluss von Combretastatin A-4 (CA-4) auf das Wachstum humaner, aortaler, glatter Muskelzellen (HASMC). CA-4 gehört zur Stoffgruppe der Combretastatine, die den Tubulin-bindenden Stoffen zugerechnet werden. Der Stoff wurde ursprünglich aus dem südafrikanischen Baum *Combretum Caffrum* gewonnen (1).

Combretastatine zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit mit Colchizin, verfügen jedoch über eine höhere Affinität zu den Colchizinbindungsstellen auf dem Tubulin als Colchizin selbst (2,3). Sie inhibieren die Mikrotubulusaktivität und verhindern somit ein Zellwachstum sowie eine Zellvermehrung. Eine dosisabhängige Zytotoxizität des CA-4 gegenüber diversen humanen Tumoren konnte auch nachgewiesen werden (4).

Das Routineverfahren zur Behandlung verschiedenster Gefäßstenosen ist die sogenannte perkutane transluminale Angioplastie (PTA). Ziel dieses Verfahrens ist die Rekanalisierung von verschlossenen oder stenosierten Gefäßabschnitten (5-9). Das Problem dieses mechanisch rekanalisierenden Verfahrens, bei dem arteriosklerotische Plaques und die Gefäßwand mittels eines Ballons dilatiert werden ist, dass es eine Restenoserate von ca. 30-50 % nach 6 Monaten aufweist (10,11).

Als pathophysiologische Grundlage der Restenosierung wird neben den passiven elastischen Rückstellkräften der Gefäße (elastic recoil) auch eine Verletzung der Gefäßwand durch die Intervention diskutiert (12). Hierbei kommt es, insbesondere in den ersten 4 Wochen nach der PTA, zu einer verstärkten Proliferation der glatten Muskelzellen aus der Media und der Myofibroblasten aus der Adventitia (13).

Verantwortlich hierfür wird die Freilegung kollagener Fasern bei Disruption der Endothelschicht während einer PTA gemacht. In Folge dessen kommt es zur Thrombozytenanlagerung im betroffenen Bereich und im Zusammenspiel mit den Endothelzellen werden zusätzlich noch verschiedene Zyto- bzw. Chemokine freigesetzt. Eines dieser Zytokine, welches verantwortlich gemacht wird für die Muskelzellproliferation sowie Muskelzellmigration, ist der sogenannte **platelet derived growth factor (PDGF)**. Die Folge dessen ist eine Hyperplasie der Intima.

Histomorphologisch handelt es sich um die Proliferation glatter Muskelzellen und deren Migration aus der Tunica media in die Tunica intima der Arterienwand (13).

Leider konnten auch andere interventionelle Verfahren neben der PTA, wie z.B. die Laserangioplastie und die Atherektomie, die Restenosierungsrate nicht maßgeblich beeinflussen (14-16). Die Ausbildung einer Restenose nach Ballondilatation versucht man durch Implantation einer endoluminalen Gefäßprothese (Stent) zu verhindern. Doch auch durch Implantation herkömmlicher Stents ließ sich die Häufigkeit neuerlicher Gefäßstenosen nur bedingt reduzieren. Solche neu aufgetretenen Stenosen bezeichnet man auch als „In-Stent-Stenose“ (17,18). Zwar haben modifizierte Stents und deren Radialkraft einen Einfluss auf die Art und das Ausmaß der Stenose, entscheidend für das Auftreten einer Restenose per se sind sie jedoch nicht (19). Gerade die Ausbildung einer Restenose nach erfolgreicher PTA durch die myointimale Hyperplasie wird bis heute als Schwachpunkt dieses interventionellen Verfahrens angesehen. Verschiedene Strategien zur Prävention bzw. Minimierung der Ausbildung einer Restenose (systemische/lokale Pharmakotherapie) wurden in der Vergangenheit mit unterschiedlichem Erfolg untersucht.

In dieser Arbeit soll nun an humanen aortalen glatten Muskelzellen in Kultursystemen die Effekte des Colchizinanalogon Combretastatin A-4 (CA-4) in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit mittels der Proliferationskinetik (2.5), die klonogene Aktivität mittels des Koloniebildungsversuches (2.6) untersucht werden. Die noch zusätzlich angewandte Zellzyklusanalyse (2.7) soll einen genaueren Einblick vermitteln, in welcher Phase des Wachstums die Zellen arretiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen und Methoden der Zellkultur

Als Zellsystem wurden humane aortale glatten Muskelzellen (= human aortic smooth muscle cell = HASMC) ausgewählt, die von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) erworben wurden. Die Zellen wurden vermehrt und als Aliquote in Ampullen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren und für jeden Versuchsansatz neu aufgetaut. Um Einfrier- oder Auftauschäden auszuschließen, wurden nur Zellen mit einer Anwachsrate von mehr als 80% verwendet. Nach einer weiteren Kulturzeit von 10 Tagen, das entspricht einer weiteren Passage, wurden die Zellen in die Versuche eingesetzt. Kontaminationen der Zellen mit Mykoplasmen konnten durch den DAPI-Test (2.3.5) ausgeschlossen werden.

2.2 Medien und Medienzusätze

2.2.1 Kulturmedium

Das Kulturmedium dient dazu, dass den Zellen unter den in vitro-Bedingungen die lebenswichtigen Substanzen zugeführt werden, die sie selber nicht synthetisieren können. Zusätzlich werden die durch die Zellen entstandenen Abbauprodukte abgefangen und über die Puffersysteme neutralisiert.

Die einzelnen Medienbestandteile für die HASMCs sind wie folgt:

- Nutrient Mixture F-12 (HAM) with L-Glutamine von der Firma GIBCO-BRL life technologies (Kat. Nr.: 21765-029); Medienbestandteil in %: 39%
- Waymouth Medium MB 752/1 with L-Glutamine von der Firma GIBCO-BRL life technologies (Kat. Nr.: 31220-023); Medienbestandteil in %: 39%
- Fetales Kälberserum (FCS) von der Firma GIBCO-BRL life technologies (Kat. Nr.: 40F9764J); Medienbestandteil in %: 20% (2.2.2)
- L-Glutamin von der Firma GIBCO-BRL life technologies (Kat. Nr.: 25030); Medienbestandteil in %: 1% (2.2.3)
- Antibiotikakombination (Pen/Strep) von der Firma Biochrom KG seromed®, Berlin; Medienbestandteil in %: 1% (2.2.4)

2.2.2 Fetales Kälberserum (FCS)

Als Zusatz zum Kulturmedium liefert FCS eine Reihe von wachstumsfördernden Substanzen, wie z.B. Schilddrüsenhormone (T₃, T₄, TSH), Insulin, Cortisol, FSH, Vitamine A und E und essentielle Aminosäuren. Das FCS wurde in Aliquots bei -20°C eingefroren und für jedes neue Medium frisch aufgetaut.

2.2.3 L-Glutamin

Die essentielle Aminosäure L-Glutamin wird bei 37°C schneller abgebaut als andere Aminosäuren, was damit als limitierender Faktor bei der Zellproliferation fungieren kann. Des Weiteren entsteht als Abbauprodukt Ammoniak, was in höheren Dosen zelltoxisch wirkt. Daher muss dem Medium zum einen 1%iges L-Glutamin hinzugefügt werden und zum anderen das Ammoniak durch regelmäßigen Medienwechsel aus der Kultur entfernt werden.

2.2.4 Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)

Dem Kulturmedium wurden zur Vermeidung potentieller Kontaminationen 10000 I.E. Penicillin G/ml und 10000 µg Streptomycin/ml hinzugefügt. Die beiden Antibiotika wurden als Lösung in Aliquots bei -20°C eingefroren und für jedes neue Medium frisch aufgetaut.

2.2.5 Trypsin

Das proteolytische Enzym Trypsin wird verwendet, um adhärent wachsende Zellen, wie die HASMCs, vom Boden zu lösen und zu subkultivieren (umsetzen). Es werden bei diesem Vorgang Adhäsionsmoleküle angedaut, wodurch die Zellen in die Lösung übergehen und damit subkultiviert werden können.

Die Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO-BRL life technologies: Kat. Nr.: 45300) besteht aus 0.05 g/l Trypsin und 0.02 g/l EDTA in *Puck's Salzlösung A*. Die Lösung wurde ebenfalls in Aliquots bei -20°C gelagert und bei jeder Passage der Zellen frisch aufgetaut.

2.2.6 Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung = PBS)

Da schon geringe Mengen an Serum im Medium die Wirkungen des Trypsins beeinträchtigen können, muss vor der Passage der Zellen mit Trypsin, das Medium entfernt und Mediumreste mit PBS ausgewaschen werden. Zu diesem Zweck wurde Dulbecco's PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (GIBCO-BRL life technologies: Kat. Nr.: 14190) verwendet.

2.2.7 Einfriermedium (Cryomedium)

Als Einfriermedium wurde das Kulturmedium für HASMCs (2.2.1) verwendet, welches zusätzlich noch mit DMSO (Medienbestandteil: 5% des Cryomediums) versetzt wurde.

2.3 Methoden der Zellkultur

2.3.1 Routinekultur

Alle Arbeiten mit der Zellkultur erfolgten unter der Laminar-Flow-Sterilbank. Vor den Versuchen wurde das UV-Licht (Dauer ca. 30 Minuten) eingeschaltet, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Hinterher erfolgte die Reinigung der Sterilbank mit

80%igem Alkohol. Die Kultivierung der Zellen während der gesamten Versuchszeit erfolgte in 25 cm² Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Kat. Nr.: 35-3081) mit Filter, die somit einen besseren Gasaustausch ermöglichen. Die Lagerung der Kulturen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Osterode) bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einer mit Wasserdampf gesättigten 6%-CO₂-Atmosphäre.

2.3.2 Subkultivierung

Nach Aussaat der Zellen erfolgt an den Tagen 1 und 4 jeweils ein Medienwechsel. Vor jedem Medienwechsel wurde die Kultur zuvor mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Eine Passage der Zellen ist bei hoher Konfluenz des Monolayers angebracht, denn die hohe Zelldichte wirkt sich zum einen negativ auf das Zellwachstum durch Kontaktinhibition aus und zum anderen wird die Kapazität des Mediums überschritten. Um die Zellen zu passagieren, wird zunächst das Medium mittels steriler Pasteurpipetten (Einmalpipetten) abgesaugt, danach mit PBS gewaschen und anschließend die Böden der 25 cm² Kulturflaschen mit 1 ml Trypsin benetzt. Nach einer Einwirkzeit von 3-5 Minuten im Brutschrank lösen sich die als Monolayer wachsenden Zellen makroskopisch sichtbar vom Flaschenboden ab. Im Übrigen sollte eine längere Einwirkzeit mit Trypsin vermieden werden, da dadurch die Zellmembran geschädigt werden könnte. Durch Zugabe von 5 ml Medium pro Flasche wird nun die Wirkungsfähigkeit des Trypsins gehemmt. Nach mehrmaligem Resuspendieren, was dazu dient, die Zellen wieder zu vereinzeln, kann nun die Zellzahl mittels einer elektronischen Zählhilfe, dem CASY (= Cell Analyser System, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim), bestimmt werden. Dabei werden aus der Zellsuspension 100µl entnommen und mit einer für das Gerät speziellen Flüssigkeit (= CASY-ton) von 9.9 ml verdünnt. Die ermittelte Zellzahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert und somit erhielt man die Zellzahl pro Milliliter. In der Regel wurden dann für die neue Passage wiederum 200000 Zellen pro neue Flasche ausgesät.

2.3.3 Kryokonservierung

Analog einer Passage werden die Zellen abtrypsinisiert und die Zellzahl mit Hilfe des CASYs bestimmt. Die weiteren Schritte laufen wie folgt ab:

- Überführung der Zellsuspension in ein Sarsted®-Röhrchen

- Zentrifugation des Röhrchens bei 200 G für 5 Minuten
- Absaugung des Überstandes
- Aufnahme der Zellen in Einfriermedium
- Überführung von 1000000 Zellen / ml Einfriermedium (2.2.7) in ein zuvor auf Eis gestelltes Cryo-vial (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Mittels einer Einfrierhilfe (Handy-Freeze, Fa. Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA) fraktionierte Abkühlung auf -196°C innerhalb einer Stunde

2.3.4 Auftauen

Die Zellsuspension wird rasch in einem mit 37°C vorgewärmten Wasserbad aufgetaut und dann zügig in eine mit warmem Medium gefüllte Kulturflasche überführt, die dann im Brutschrank kultiviert wird. Nach frühestens 6-7 Stunden erfolgt der erste Medienwechsel sowie eine lichtmikroskopische Schätzung der Anwachsrate.

2.3.5 DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)-Test

Einen Ausschluss einer Kontamination durch Mykoplasmen wurde mit Hilfe der DAPI-Routinefärbung überprüft. Bei Verdacht oder Nachweis einer Kontamination wurden die Kulturen verworfen. Die einzelnen Schritte zur Durchführung des Testes laufen wie folgt ab:

- ca. 40000 Zellen in einer 6-Loch-Makroplatte (Falcon, Kat. Nr.:3046) auf entfetteten, sterilen Deckgläsern mit 2 ml Medium zwei Tage kultivieren
- Absaugung des Mediums und waschen der Zellen mit PBS
- Fixierung der Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei -20°C
- Inkubation der Zellen mit DAPI-Methanol-Lösung (Serva, Heidelberg, FRG)- 0.05µg/ml, für 15-20 Minuten bei 37°C
- Zellen jeweils einmal mit Methanol und PBS waschen, danach mit Eindeckmedium einbetten

DAPI bildet einen Komplex mit doppelsträngiger DNA. Unter UV-Anregung zeigen sich im Fluoreszenzmikroskop vorhandene Mykoplasmen als blau fluoreszierende Punkte innerhalb des Zytoplasmas.

2.4 Dosisfindung

2.4.1 Prinzip

Zur Bestimmung der zu untersuchenden Konzentrationen von CA-4 wurde der BrdU-cell-proliferation ELISA Assay verwendet. Diese Untersuchungsmethode stellt eine akkurate Möglichkeit zur Beurteilung der Zellproliferation und direkten Bestimmung der DNA-Neusynthese dar. Während der S-Phase (DNA-Synthese) wird das Thymidin-Analogon, 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU, s. Abb. 1), in die neusynthetisierte DNA kompetitiv eingebaut (51). Die Detektion des eingebauten BrdU erfolgt über eine Antikörper-BrdU-Reaktion, welche zusätzlich mit einer Peroxidase (Anti-BrdU-POD) konjugiert ist. Hierzu muss die DNA jedoch in einer Einzelstrangformation vorliegen, welche durch eine chemische Denaturierung erreicht wird (52). Nach Abschluss der Antikörper-BrdU-Reaktion wird der ungebundene Antikörperanteil ausgewaschen und durch Zugabe einer chromogenen Lösung (Tetramethylbenzidin = TMB) eine Indikator-Reaktion mit Hilfe der Peroxidase ausgelöst. Die hieraus resultierende Farbreaktion wird spektralphotometrisch als Extinktion mittels des ELISA-Readers gemessen. Die Höhe der Extinktion ist hierbei direkt proportional zur DNA-Neusynthese bzw. Zellproliferation (53).

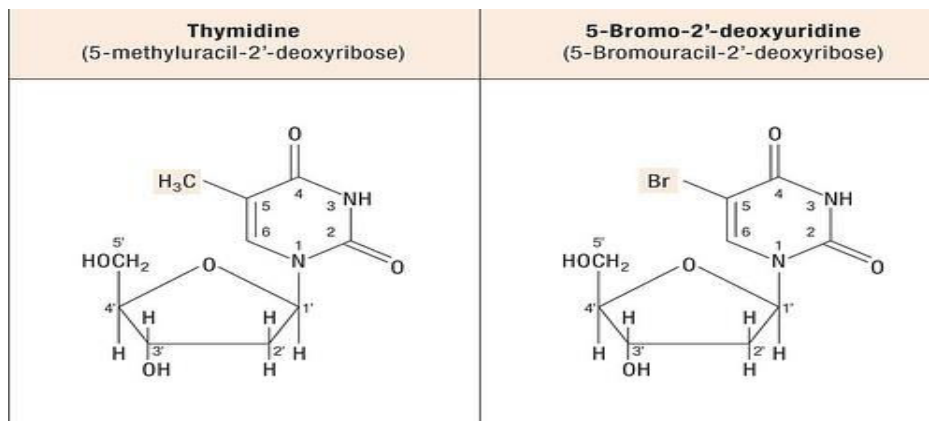


Abb. 1

Molekularstruktur des Thymidin und BrdU: An der C5-Stelle des Pyrimidins besitzt das BrdU ein Brom-Molekül anstelle einer Methyl-Gruppe (54).

2.4.2 Material

- 96-Well (Microtiterplatte, BD BioCoat™, flat bottom, Fa. BD Biosciences, Heidelberg Kat. Nr. 35-1172)
- Cell Proliferation ELISA (colorimetric), BrdU-Kit (Fa. Roche applied-science, Mannheim, Kat. Nr. 11647229001)
- ELISA-Reader (Milenia Kinetic Analyzer, DPC/Biermann, Deutschland)

2.4.3 Prozedur

Zunächst wurden jeweils 2000 HASMCs in 100 µl Medium/Well in einer 96-Well Microtiterplatte am *Tag -1* ausgesät. Am *Tag 0* erfolgte sowohl ein Mediumwechsel als auch die einmalige Behandlung mit CA-4 in absteigender Konzentration der Zehnerpotenz. Am *Tag 4* wurde die Versuchsreihe gestoppt. Gemäß der Anleitung des Kits wurden je 10 µl/Well der BrdU-markierten Lösung hinzu pipettiert und für weitere 2 Stunden (konstante Temperatur von 37°C und mit Wasserdampf gesättigten 6 %-CO₂-Atmosphäre) inkubiert. Danach Absaugen des Mediums und Fixierung sowie Denaturierung durch Gabe der vorgefertigten FixDenat-Lösung (je 200 µl/Well). Nun weitere Inkubation für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend Absaugen der Fix-Denat-Lösung und Gabe von 100 µl Anti-BrdU-POD Lösung sowie erneute Inkubation für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Danach erneutes Absaugen der Lösung und 3maliges Auswaschen der ungebundenen Antikörper mittels PBS-Lösung (jeweils 200-300 µl/Well, 1:10 verdünnt mit destilliertem H₂O). Nach Beendigung des Spülvorganges erfolgt die Gabe der Substrat-Lösung (TMB). Diese wurde erneut bei Raumtemperatur, in Abhängigkeit der Farbentwicklung der Indikatorreaktion, für mindestens 15-30 Minuten inkubiert.

Danach Gabe der Stopp-Lösung (25 µl/Well 1 Mol H₂SO₄) und 1 Minute schwenken auf dem Rüttler (300 U/Minute), anschließend Messung der Extinktion mittels des ELISA-Readers.

2.4.4 Bestimmung der zu untersuchenden Konzentrationen von CA-4

Es wurden zunächst 2 Versuchsreihen (V1 und V2) mit aufsteigender Konzentration (1×10^{-10} M – 1×10^{-4} M CA-4) zur groben Orientierung ausgetestet (s. Tab. 1 und 2). Die Extinktionswerte wurden entsprechend gemittelt und ausgehend von der Kontrollgruppe (entspricht 100%) in Prozentwerte umgerechnet.

Dosis CA-4	Extinktion	Extinktion2	Extinktion3	Mittelwert	Prozent (%)
Kontrolle V1	0.896	0.987	1.009	0.964	100.00
1×10^{-10} M	0.912	0.820	0.794	0.842	87.34
1×10^{-9} M	0.039	0.031	0.031	0.034	3.49
1×10^{-8} M	0.016	0.020	0.017	0.018	1.83
1×10^{-7} M	0.026	0.010	0.020	0.019	1.94
1×10^{-6} M	0.024	0.022	0.025	0.024	2.46
1×10^{-5} M	0.030	0.026	0.024	0.027	2.77
1×10^{-4} M	0.035	0.035	0.036	0.035	3.67

Tab. 1 Ergebnisse des BrdU-ELISA Assays der 1. Versuchsreihe (V1)

Dosis CA-4	Extinktion	Extinktion2	Extinktion3	Mittelwert	Prozent (%)
Kontrolle V2	1.175	1.042	1.193	1.137	100
1×10^{-10} M	1.226	0.991	0.864	1.027	90.35
1×10^{-9} M	0.111	0.105	0.079	0.098	8.65
1×10^{-8} M	0.050	0.053	0.047	0.050	4.40
1×10^{-7} M	0.064	0.062	0.074	0.067	5.87
1×10^{-6} M	0.092	0.055	0.047	0.065	5.69
1×10^{-5} M	0.068	0.059	0.043	0.057	4.99
1×10^{-4} M	0.043	0.073	0.077	0.064	5.66

Tab. 2 Ergebnisse des BrdU-ELISA Assays der 2. Versuchsreihe (V2)

Anschließend erfolgte die Feinbestimmung der Dosierung anhand der o.g. Ergebnisse. Da bereits zwischen 1×10^{-10} M und 1×10^{-9} M ein deutlicher Abfall der Extinktion und somit eine Verminderung der Zellproliferation zu verzeichnen war, erfolgte die Feinbestimmung zwischen diesem o.g. Konzentrationsbereich (s. Tab. 3 und 4).

Dosis CA-4	Extinktion	Extinktion2	Extinktion3	Mittelwert	Prozent (%)
Kontrolle V1	1.418	0.950	1.451	1.273	100
1x10 ⁻¹⁰ M	1.278	0.876	0.747	0.967	75.96
2x10 ⁻¹⁰ M	1.065	0.852	0.805	0.907	71.28
3x10 ⁻¹⁰ M	0.985	0.781	0.655	0.807	63.39
4x10 ⁻¹⁰ M	0.873	0.670	0.782	0.775	60.88
5x10 ⁻¹⁰ M	0.846	0.735	0.804	0.795	62.45
6x10 ⁻¹⁰ M	1.039	0.617	0.638	0.765	60.07
7x10 ⁻¹⁰ M	1.273	1.004	0.970	1.082	85.02
8x10 ⁻¹⁰ M	1.171	1.060	1.223	1.151	90.44
9x10 ⁻¹⁰ M	0.718	0.703	0.880	0.767	60.25
1x10 ⁻⁹ M	0.605	0.611	1.156	0.791	62.11
5x10 ⁻⁹ M	0.043	0.054	0.105	0.067	5.29

Tab. 3 Ergebnisse Feinbestimmung des BrdU-ELISA Assays der 1. Versuchsreihe (V1)

Dosis CA-4	Extinktion	Extinktion2	Extinktion3	Mittelwert	Prozent (%)
Kontrolle V2	1.039	1.630	1.370	1.346	100.00
1x10 ⁻¹⁰ M	1.290	0.922	0.849	1.020	75.79
2x10 ⁻¹⁰ M	1.177	0.953	0.949	1.026	76.23
3x10 ⁻¹⁰ M	1.085	0.857	0.817	0.920	68.31
4x10 ⁻¹⁰ M	0.878	0.961	0.794	0.878	65.19
5x10 ⁻¹⁰ M	0.884	0.728	1.017	0.876	65.09
6x10 ⁻¹⁰ M	1.022	0.673	0.964	0.886	65.83
7x10 ⁻¹⁰ M	1.326	1.307	1.318	1.317	97.82
8x10 ⁻¹⁰ M	1.294	1.507	1.596	1.466	108.86
9x10 ⁻¹⁰ M	0.851	0.876	1.082	0.936	69.55
1x10 ⁻⁹ M	0.838	0.855	1.153	0.949	70.46
5x10 ⁻⁹ M	0.063	0.087	0.119	0.090	6.66

Tab. 4 Ergebnisse Feinbestimmung des BrdU-ELISA Assays der 2. Versuchsreihe (V2)

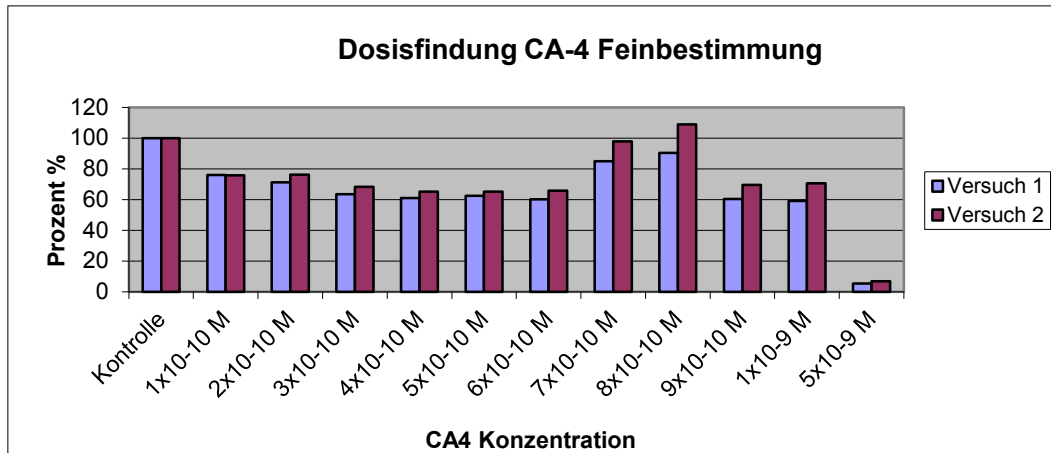


Abb. 2

Graphische Darstellung beider Versuchsreihen (V1 + V2) der Feinbestimmung der Dosis

In der graphischen Darstellung (s. Abb. 2) zeigte sich ein deutlicher Abfall der DNA-Synthese zwischen 1×10^{-9} M und 5×10^{-9} M. Anhand dieser Ergebnisse erfolgte die definierte Konzentrationsbestimmung (5×10^{-10} M, $2,5 \times 10^{-9}$ M und 5×10^{-9} M CA-4) zur weiteren Untersuchung der Proliferationsfähigkeit, Koloniebildung und Zellzyklus-Analyse unter entsprechender Behandlung der HASMCs.

2.5 Proliferationskinetik (PK)

2.5.1 Ablauf der Proliferationskinetik

Um den Effekt des Combretastatin A-4 (CA-4) auf das Wachstumsverhalten der HASMCs zu untersuchen, wurden 30000 Zellen in einem Volumen von 5 ml in die 25cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Da es insgesamt fünf Stopptage gab, mussten dementsprechend pro Konzentration fünf Flaschen vorbereitet werden. Hierbei gab es zwei Versuchsreihen. Eine mit einmaliger Behandlung mit CA-4 und eine weitere mit CA-4 Dauerbehandlungen. Der Tag der Aussaat entsprach *Tag -2*. *Tag 0* war demzufolge zwei Tage nach Aussaat, der 1. Tag der Behandlung mit CA-4. Weitere Stopptage wurden danach alle vier Tage eingelegt, bis *Tag 20* nach Erstbehandlung. Im Übrigen bedeutete ein Stopptag zum einen die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des CASYS sowie einen Medienwechsel (MW) der restlichen Flaschen und zum anderen bei der Dauerbehandlung eine erneute Zugabe des Zytostatikums in entsprechender Konzentration.

2.5.2 Statistische Auswertung der Proliferationskinetik

Zur statistischen Auswertung wurden an den jeweiligen Stopptagen der einzelnen Kinetiken die geometrischen Mittelwerte berechnet.

Mit Hilfe des JMP-Statistikpakets erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Die erstellte Formel für die Proliferationskinetik $y(D,t)$ der Kurven in Abb.3 lautet:

$$y(D,t) = b + [a(D) - b](1 - e^{-ct}),$$

$$a(D) = a(0) - dD.$$

Erläuterung:

b : Basiswert bzw. Ausgangswert der Zellzahl an Tag 0 der Kontrolle,

$a(0)$: Zellzahl bis zum Erreichen der Asymptote der Kontrolle,

d : Definierte, dosisabhängige Abnahme der asymptotischen Zellzahl pro 1×10^{-9} M,

c : Geschwindigkeit pro Tag bis zum Erreichen der Asymptote,

D : Entsprechende Dosis in Mol (M),

t : Beobachtungstag.

2.6 Koloniebildungs-Assay (KOB)

Der Koloniebildungs-Assay oder Koloniebildungstest diente der Untersuchung des Klonierungsverhaltens der HASMCs unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen. Es wurden insgesamt 500 Zellen in 2 ml Medium je Well einer 6-Well Platte (MultiwellTM-6-Well, Fa. Falcon, Heidelberg, Kat. Nr.: 35-3225) ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen im Brutschrank (Heraeus, Osterode) wurde der KOB abgestoppt, fixiert, gefärbt und ausgewertet. Die proliferierenden Zellen bildeten Zellklone, die bei idealer Verteilung jeweils einzeln lagen. Ein Zellklon ist eine Population von Zellen, die aus einer einzelnen Zelle durch mitotische Teilung entstanden ist. Als Klon wurde ein Zellhaufen ≥ 50 Zellen gewertet.

2.6.1 Fixierung

Nach dem Absaugen des Mediums aus den Wells wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend jeweils für 10 Minuten mit 3.7% Formaldehyd und 70% Ethanol fixiert. Der Alkohol wurde durch Spülen mit destilliertem H₂O abgewaschen.

2.6.2 Färbung

Zur Färbung des Zytoplasmas wurden die Zellen für 10 Minuten in 0.05% Coomassie-Blau-Lösung inkubiert und nach dem Auswaschen der Färbelösung mit Aqua dest. an der Raumluft getrocknet.

2.6.3 Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden an den jeweiligen Stopptagen der einzelnen KOBIs die arithmetischen Mittelwerte pro Well einer 6-Wellplate berechnet.

Mit Hilfe des JMP-Statistikpakets erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Die erstellte Formel für den Koloniebildungstest $y(D,t)$ der Kurven in Abb.4 & 5

lautet:

$$a_0 + \frac{\frac{b_0}{1 + \left(\frac{D}{D^*}\right)^{10}} - a_0}{1 + \left(\frac{t}{T^*}\right)^c}$$

Erläuterung:

b_0 : Basiswert bzw. Ausgangswert der KOBIs an Tag 0 der Kontrolle,

D : Entsprechende Dosis in Mol (M),

D^* : Dosiswert, bei der der Basiswert (b_0) um 50% reduziert wird,

t : Beobachtungstag,

T^* : Zeitpunkt, bei welchem die Anzahl der Kolonien gleich dem Mittelwert von Ausgangswert und der Asymptote erreicht wird,

c : Geschwindigkeit pro Tag bis zum Erreichen der Asymptote,

a_0 : asymptotische Koloniezahl.

2.7 Zellzyklusanalyse und DNA-Gehalt

2.7.1 Prinzip der flusszytometrischen Messung

Crissman et al (48) entwickelten 1975 eine Methode zur Analyse von Säugetierzellen. Dabei macht man sich die Eigenschaft chemischer Verbindungen zu Nutze, die nachdem sie durch Anregung 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 und 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.

2.7.2 Lösungen und Antikörper

2.7.2.1 Bromdesoxyuridin (BrdU)-Lösung

Die 40 mM BrdU-Stammlösung (Serva) wurde mit DMEM auf eine 10 mM BrdU-Lösung verdünnt. Durch Gabe von 10 µl dieser Verdünnung zu den 5 ml in den 25 cm² Kulturlaschen (Falcon, Heidelberg, Kat. Nr.:35-3081) resultierte eine BrdU-Endkonzentration von 20 µM.

2.7.2.2 PBS / BSA

Der phosphatgepufferten Salzlösung (2.2.6) wurde 1%iges BSA (Albumin-Fraktion 5, Serva) beigemischt.

2.7.2.3 Pepsinlösung

Intrazelluläre Bestandteile, wie z.B. Proteine können zu unspezifischen Antikörperbindungen und somit falschen Ergebnissen führen. Deshalb wird durch das Enzym Pepsin die Zellmembran verdaut wodurch der Zellkern isoliert werden kann. Für die Pepsinlösung wurden 0.5 g Pepsin (Merck, Darmstadt) mit einer Konzentration von 70 FIP-U/g in 5 ml 1 N HCl und 95 ml Aqua dest. gelöst.

2.7.2.4 Salzsäure (HCl)

Damit der Anti-BrdU-Antikörper an das in die DNA eingebaute BrdU (2.7.2.1) binden kann, muss die DNA durch HCl denaturiert werden. Hierfür wird eine 2 N HCl-Lösung verwendet.

2.7.2.5 Antikörper (AK)

Die indirekte Nachweismethode des BrdU-Einbaus (2.7.2.1) erfordert zwei verschiedene Antikörper:

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 Anti-Maus-IgG-AK (Fa. Dako, Hamburg) ist mit *Fluoreszein Iso Thio Cyanat (FITC)* versehen und kann den ersten AK markieren. Beide AK wurden mit PBS/BSA verdünnt, wobei der erste in einem Verhältnis 1:66 PBS/BSA und der zweite in einem Verhältnis von 1:100 PBS/BSA verdünnt wurde.

2.7.2.6 Propidiumiodid-Lösung (PI-Lösung)

Die 1 mg/ml konzentrierte Stammlösung (Sigma, Deisenhofen, FRG) wurde mit PBS (2.2.6) auf 10 µg/ml verdünnt.

2.7.2.7 RNase

PI wird sowohl gleichermaßen in die doppelsträngige RNA als auch doppelsträngige DNA eingebaut und kann dadurch die DNA-Messung verfälschen. Aus diesem Grund wird die RNase eingesetzt, um die RNA enzymatisch zu entfernen und somit eine verfälschte Messung zu vermeiden. Die Stammlösung (1mg/ml, Sigma) wurde mit PBS (2.2.6) auf eine Konzentration von 0.1 mg/ml verdünnt.

2.7.2.8 Propidiumiodid-RNase-Lösung

Der PI-Lösung (2.7.2.6) wurde 2% RNase (2.7.2.7) zugesetzt.

2.8 Methodik der Durchflusszytometrie

Die HASMCs für die Durchflusszytometrie wurden genauso behandelt wie die Zellen für die Proliferationskinetik (2.5.1) nur mit dem Unterschied, dass zum einen anstelle von 30000 Zellen, 100000 Zellen ausgesät wurden und zum anderen, dass anstelle von 5 Stopptagen nur drei (*Tag 3, Tag 6, Tag 14*) Stopptage, ohne MW (MW erfolgte immer zeitgleich mit den Zellen für die Proliferationskinetik) eingeplant wurden. An den jeweiligen Stopptagen, wurden die Zellen zunächst mit 20 μ M BrdU (2.7.2.1) behandelt und für eine Stunde in den Brutschrank (Heraeus, Osterode) gestellt. Nach dieser Behandlung erfolgte die eigentliche Aufarbeitung der Zellen für die Durchflusszytometrie. Als erstes wurde das Medium aus den 25 cm² Kulturflaschen abgesaugt, danach einmal mit PBS (2.2.6) gewaschen. Als nächstes kam in jede Flasche 1 ml Trypsin (2.2.5) hinzu. Die Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Kat. Nr.:35-3081) kamen dann für ca. 5 Minuten in den Brutschrank. Nach dieser Inkubation wurde das Trypsin mit 5 ml Medium inhibiert und die Zellen wieder resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in die 15 ml Blue-Cups (Fa. Greiner, Frickenhausen) überführt und dann für 3 Minuten bei 200 g abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das übrig gebliebene Pellet mit 3 ml PBS wieder resuspendiert und die Suspension wiederum für 3 Minuten bei 200 g abzentrifugiert. Im Anschluss dieses zweimal durchgeführten Vorganges, wurde das Pellet mit 250 μ l 70%igen Ethanol wieder resuspendiert und zur späteren Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die weiteren Schritte für die Aufarbeitung der Zellen laufen wie folgt ab:

- Resuspendierung und Überführung der Pellets in die Sarsted®-Röhrchen
- Waschen der Pellets mit 2 ml PBS, danach Zentrifugation für 6 Minuten bei 275 g
- Überstand dekantieren, vortexen und dann Zugabe von 0.5 ml kalter RNase (2.7.2.7)
- Inkubation der Sarsted®-Röhrchen im Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten
- Wiederum Zentrifugation für 6 Minuten bei 275 g, Überstand dekantieren, vortexen und dann Zugabe von 1 ml kaltem Pepsin (2.7.2.3)
- Inkubation der Sarsted®-Röhrchen im Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten
- Zur Stopfung der enzymatischen Verdauung, Lagerung der Sarsted®-Röhrchen für 5 Minuten bei 0°C auf Eis

- Waschen mit 3 ml kaltem PBS, zentrifugieren (s.o.), Überstand dekantieren und vortexen
- Zugabe von 1 ml 2N HCl (2.7.2.4) und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubieren
- Waschen mit 3 ml PBS, zentrifugieren (s.o.) und Überstand dekantieren; den Vorgang zweimal wiederholen
- Waschen mit 2 ml PBS / BSA(1%) (2.7.2.2), zentrifugieren, dekantieren
- Pipettierung des ersten AK: 200 µl PBS / BSA und 3 µl AK 1 (2.7.2.5)
- 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- Waschen mit 2 ml PBS / BSA (1%), zentrifugieren, dekantieren
- Pipettierung des zweiten AK: 200 µl PBS / BSA und 2 µl AK 2 (2.7.2.5)
- 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- Waschen mit 500 µl PI-Lösung (2.7.2.6) zentrifugieren, dekantieren, vortexen
- Zum Schluss: 200-500 µl PI-RNase (2.7.2.8) 15 Minuten im Dunkeln inkubieren

Durch diese Schritte wurden die Zellkerne isoliert, das in die DNA eingebaute BrdU (2.7.2.1) indirekt mit FITC markiert und die DNA durch das PI (2.7.2.6) gefärbt. Die anschließende Messung erfolgte an einem FACSsort-Gerät (Becton Dickenson) mit dem Zellanalyse-Programm Cell-Quest 1.1.1TM. Dazu wurden 10⁴ Kerne mit einer Flussgeschwindigkeit von 150 Kernen/Sekunde gemessen.

2.8.1 Auswertung

Das Durchflusszytometer arbeitet mit einem Argonlaser ($\lambda = 488\text{nm}$). Dabei wurde die rote Fluoreszenz vom angeregten PI über einen 578 ± 28 nm Bandenfilter gesammelt und als relativer DNA-Gehalt auf der Abszisse des Diagramms dargestellt. Die grüne Fluoreszenz vom FITC wurde über einen 530 ± 30 nm Bandenfilter gesammelt und auf der Ordinate des Diagramms aufgetragen. Die einzelnen Zellzyklusfraktionen (G1-, S-, G2/M-Phasen) der Schaubilder wurden umrandet (sog. „Gating“) und als Prozent der Gesamtpopulation dargestellt.

2.8.2 Statistik der Durchflusszytometrie

Die prozentual ermittelten Werte der einzelnen Phasen (G1, S, G2/M) jeder Kinetik wurden geometrisch gemittelt.

Mit Hilfe des JMP-Statistikpakets erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse und die Anpassung an ein einfaches Modell, das alle 72 Messwerte mit nur 8 Parametern beschreibt.

Zur Beschreibung der Kurven (y) in Abb. 7 wurde folgende Formel erstellt:

$$a (1 - e^{-cTag}) + b(D)e^{-cTag}$$

$$\text{für G1: } b_0 \frac{1}{1 + \left(\frac{D}{D50}\right)^5},$$

$$\text{für G2/M: } b_0 \left(1 + \left(\frac{D}{D200}\right)^5\right),$$

wobei die asymptotischen Anteile von a nur von der Phase abhängen und b_0 für G1 von der Behandlungsart abhängt, für G2/M jedoch nicht.

Erläuterungen:

b_0 : Ausgangswert für G1 bzw. G2/M der Kontrolle an Tag 0,

D : Dosisangabe in Mol,

$D50$: Entspricht der Dosis die zu einer Reduktion von 50% vom Ausgangswertes b_0 für G1 führt,

$D200$: Entspricht der Dosis die zu einer Verdoppelung des Ausgangswertes b_0 für G2/M führt,

a : Asymptote,

c : Geschwindigkeit pro Tag zum Erreichen der Asymptote.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationskinetik (PK)

Die geometrisch gemittelten Messungen der Zellzahlen nach einfacher und dauerhafter Behandlung mit CA-4 brachten folgende Ergebnisse:

CA-4 Einfach-Behandlung:

Stopptag Dosis	Tag 0	Tag 4	Tag 8	Tag 12	Tag 16	Tag 20
Kontrolle	94200	640000	1080000	1310000	1350000	1370000
5×10^{-10} M	92700	699000	1160000	1150000	1320000	1450000
2.5×10^{-9} M	92700	507000	875000	902000	1010000	1150000
5×10^{-9} M	92700	113000	196000	215000	237000	339000

Tabelle 5:

Geometrische Mittelwerte der Zellzahlen aller 5 PKs für die Einfach-Behandlung mit CA-4.

CA-4 Dauer-Behandlung:

Stopptag Dosis	Tag 0	Tag 4	Tag 8	Tag 12	Tag 16	Tag 20
Kontrolle	114000	638000	1100000	1210000	1330000	1380000
5×10^{-10} M	118000	629000	900000	1060000	1280000	1350000
2.5×10^{-9} M	118000	562000	740000	784000	1020000	1150000
5×10^{-9} M	118000	96600	110000	112000	129000	121000

Tabelle 6:

Geometrische Mittelwerte der Zellzahlen aller 5 PKs für die Dauer-Behandlung mit CA-4.

Graphische Darstellung der Proliferationskinetik mit Hilfe des Proliferationsmodells
(s. Formel 2.5.2)

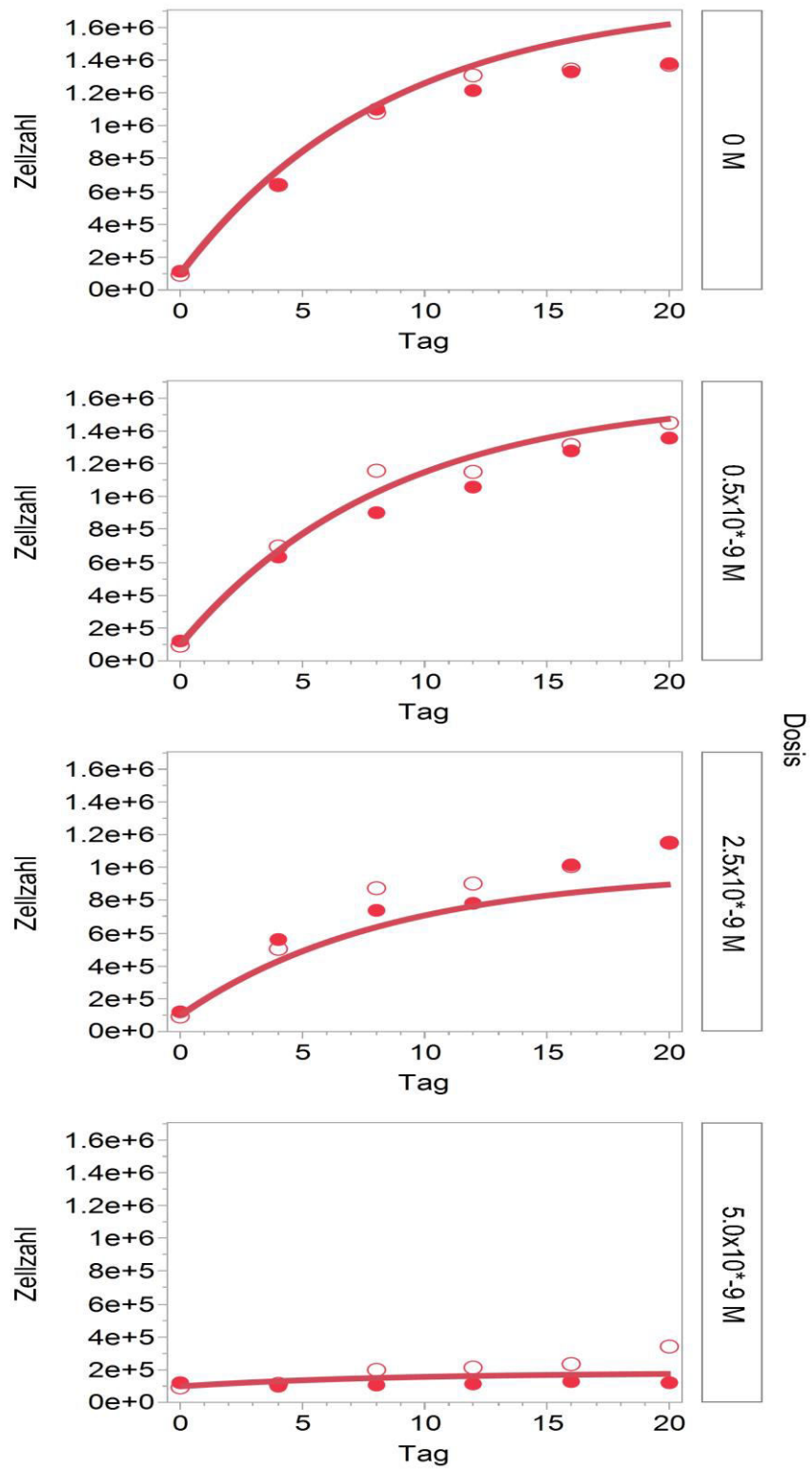


Abbildung 3

Erläuterungen zu Abbildung 3:

Einfach-Behandlung: offene rote Kreise

Dauer-Behandlung: gefüllte rote Kreise

Rote Kurven: Angepasstes Modell unabhängig von der Behandlung

Die beiden oben dargestellten Diagramme (Abb. 3) zeigen den Beobachtungsverlauf der Zellzahlen (Tab. 5 und 6) beider Versuchsreihen unter Verwendung des erstellten Proliferationsmodells (Formel 2.5.2) für die vier Dosiswerte. Zur Erstellung der Dosiskurven (Abb. 3) wurden für das Proliferationsmodell folgende Schätzwerte errechnet (in Klammern werden die 95% Konfidenz-Intervalle (KI) der Schätzwerte angegeben). Der Basiswert (***b***) für beide Behandlungen (Einfach- / Dauer-) liegt bei 102000 Zellen (95% KI: $8.78 \times 10^4 - 1.18 \times 10^5$ Zellen). Die Asymptote [***a(0)***] liegt bei 1780000 Zellen (95% KI: $1.47 \times 10^6 - 2.39 \times 10^6$ Zellen). Aus dem o.g. Proliferationsmodell (s. 2.5.2) lässt sich zudem eine dosisabhängige Reduktion (***d***) der Zellzahl ermitteln. Für beide Behandlungsarten findet pro 1×10^{-9} Mol CA-4 eine Abnahme der Zellzahl um 319000 (95% KI: $2.59 \times 10^5 - 4.0 \times 10^5$ Zellen/ 1×10^{-9} M) statt. Die Geschwindigkeit (***c***) der Kurven beträgt für beide Behandlungsarten 0.118 pro Tag (95% KI: 0.069 – 0.184/Tag).

In der Gruppe mit 0.5×10^{-9} M behandelten Zellen zeigt sich sowohl für die „Einfach- als auch Dauer-behandelte“ Zellgruppe ein nahezu unveränderter Kurvenverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese verläuft nur unwesentlich unterhalb der Kontrollgruppe der HASMCs. Diese Beobachtung spiegelt sich ebenso in den Zellzahlen (Tab. 5 und 6) wider.

Der Kurvenverlauf für die mit 2.5×10^{-9} M behandelten Zellen (s. Abb. 3) weist sowohl für die „Einfach- als auch Dauer-behandelten“ Zellen einen flacheren Kurvenverlauf auf mit einer merklich niedrigeren Zellzahl (Tab. 5 und 6) an allen Stopptagen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Was den Kurvenverlauf an sich sowie die gemittelten Zellzahlen angeht, so scheint es jedoch zwischen der Einfach- und Dauer-Behandlung der HASMCs keinen wesentlichen Unterschied zu geben.

Betrachtet man nun die behandelten Zellen mit der Höchstdosis 5×10^{-9} M CA-4 (s. Abb. 3), so zeigt sich bei den HASMCs eine erhebliche Abflachung der Kurve im Vergleich zu den restlichen Dosiskurven. Vergleicht man dazu die Zellzahlen (Tab. 5), so stellt man eine deutliche Reduktion der Proliferationsrate mit einem niedrigeren

Asymptotenverlauf fest und demzufolge einer erheblich niedrigeren Zellzahl am letzten Stopptag (Tag 20).

Die „Dauer-behandelten“ Zellen weisen praktisch einen geraden Kurvenverlauf (Abb. 3, gefüllte rote Kreise) im Sinne einer nicht vorhandenen Proliferation auf bei nahezu unveränderter Zellzahl an allen Stopptagen (s. Tab. 6).

3.2 Koloniebildungs-Assay (KOBİ)

Die arithmetisch gemittelten Messungen der KOBİs nach einfacher und dauerhafter Behandlung mit CA-4 ergaben folgende Ergebnisse:

CA-4 Einfach-Behandlung:

Stopptag \ Dosis	Tag 4	Tag 8	Tag 12	Tag 16	Tag 20
Kontrolle	56	49	40	23	17
5×10^{-10} M	53	46	37	20	19
2.5×10^{-9} M	50	45	35	20	20
5×10^{-9} M	0	1	8	13	16

Tabelle 7:

Arithmetische Mittelwerte der KOBİs pro Well einer 6-Wellplatte an den entsprechenden Stopptagen für die Einfach-Behandlung mit CA-4.

CA-4 Dauer-Behandlung:

Stopptag \ Dosis	Tag 4	Tag 8	Tag 12	Tag 16	Tag 20
Kontrolle	45	37	23	12	12
5×10^{-10} M	38	37	22	11	11
2.5×10^{-9} M	35	25	16	8	9
5×10^{-9} M	0	0	0	0	0

Tabelle 8:

Arithmetische Mittelwerte der KOBİs pro Well einer 6-Wellplatte an den entsprechenden Stopptagen für die Dauer-Behandlung mit CA-4.

CA-4 Langzeit Einfach-Behandlung:

Stopptag \ Dosis	Tag 24	Tag 28	Tag 32	Tag 36	Tag 40
Kontrolle	6	3	3	1	2
5×10^{-9} M	5	5	4	6	2

Tabelle 9:

Arithmetische Mittelwerte der KOBIs pro Well einer 6-Wellplatte an den entsprechenden Stopptagen für die Langzeit Einfach-Behandlung mit CA-4.

Graphische Darstellung der KOBIs mit Hilfe des erstellten KOBİ-Rechenmodells (s. Formel 2.6.3):

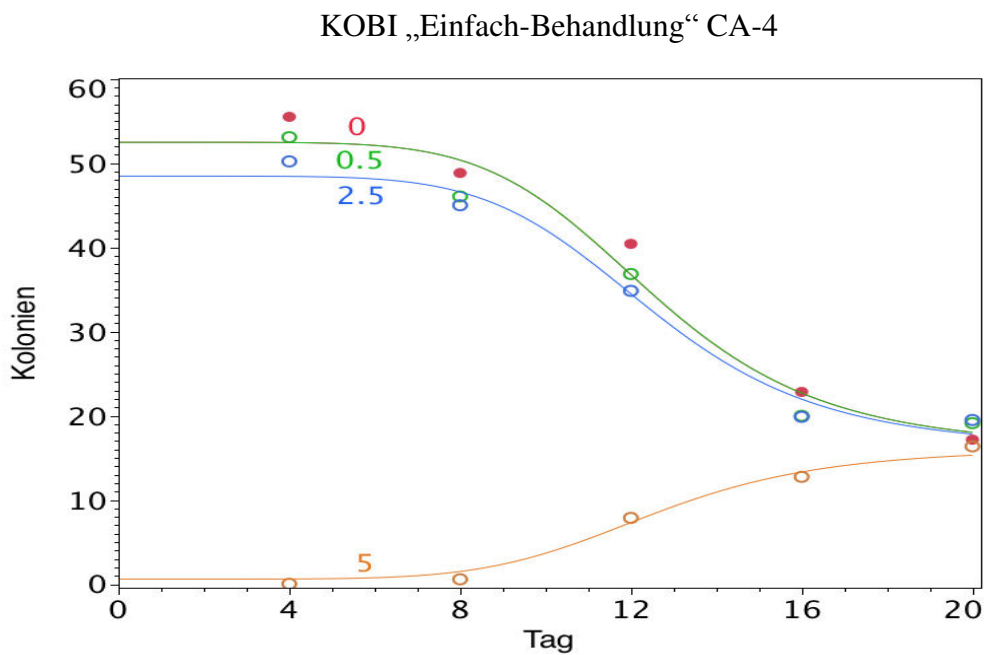


Abbildung 4:

- Rote Kurve 0: Kontroll-HASMCs ohne Behandlung
- Grüne Kurve 0.5: Behandlung mit 0.5×10^{-9} M bzw. 5×10^{-10} M CA-4
- Blaue Kurve 2.5: Behandlung mit 2.5×10^{-9} M CA-4
- Orangene Kurve 5: Behandlung mit 5×10^{-9} M CA-4

KOBI „Dauer-Behandlung“ CA-4

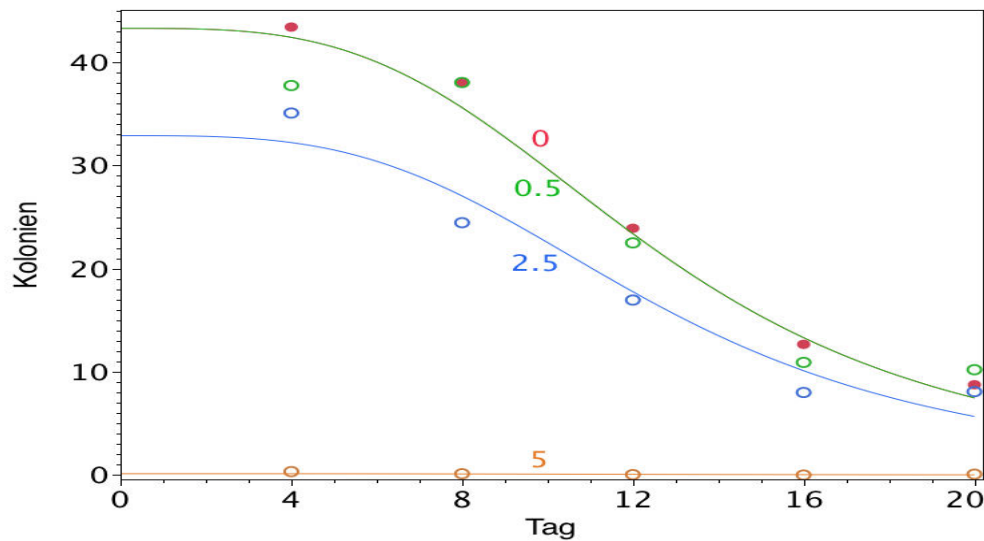


Abbildung 5:

- Rote Kurve 0: Kontroll-HASMCs ohne Behandlung
- Grüne Kurve 0.5: Behandlung mit 0.5×10^{-9} M bzw. 5×10^{-10} M CA-4
- Blaue Kurve 2.5: Behandlung mit 2.5×10^{-9} M CA-4
- Orangene Kurve 5: Behandlung mit 5×10^{-9} M CA-4

Die beiden o.g. dargestellten Diagramme (Abb. 4 und 5) zeigen den graphischen Beobachtungsverlauf der Koloniebildung über 20 Tage, wobei an den Stopptagen (4, 8, 12, 16 und 20) die Auswertung erfolgte. Für die Erstellung der graphischen KOBI-Modelle wurden folgende Schätzwerte (in Klammern werden die 95% Konfidenzintervalle (KI) der Schätzwerte angegeben) ermittelt. Der Ausgangswert (b_0) für die Einfach-Behandlung lag bei 52.5 Kolonien (95% KI: 49.8 – 55.6 Kolonien) und für die Dauerbehandlung bei 43.3 Kolonien (95% KI: 40.0 – 47.1 Kolonien).

Die asymptotische Koloniezahl liegt für die Einfach-Behandlung bei 16.1 (95% KI: 13.6 bis 18.4). Im Modell der Dauerbehandlung wurde a_0 gleich Null gesetzt.

Die Geschwindigkeit (c) bis zum Erreichen der Asymptote liegt für die Einfach-Behandlung bei 6.2 /Tag (95% KI: 4.4 – 9.6/Tag) und für die Dauer-Behandlung bei 3.4/Tag (95% KI: 2.7 – 4.3/Tag). Die Dosis (D^*) bei der der Basiswert (b_0) um 50% reduziert wird liegt für die Einfach-Behandlung bei 3.2 M (95% KI: 3.0 – 3.7 M) und für die Dauer-Behandlung bei 2.80 M (95% KI: 2.69 – 2.97 M). Der Zeitpunkt (T^*) bei dem der Mittelwert vom Ausgangswert (b_0) und der Asymptote (a_0) erreicht wird liegt

für die Einfach-Behandlung bei 12.5 Tage (95% KI: 11.8 – 13.2) und für die Dauer-Behandlung bei 12.6 Tage (95% KI: 11.5 – 13.6).

Hierbei zeigen sowohl die Kontrollgruppe (rote Kurve) der HASMCs sowie die mit 0.5×10^{-9} M (grüne Kurve) CA-4 behandelten Zellen einen praktisch identischen sigmoidförmigen Kurvenverlauf. Zwischen den Tagen 0 und 4 findet sich die höchste Koloniebildungsrate, welches dann insbesondere zwischen den Tagen 8 und 16 steil abfällt, um dann wieder in einen plateauartigen Verlauf überzugehen. Diese Beobachtung lässt sich ebenso in den Koloniezahlen (Tab. 7 und 8) widerspiegeln. Der einzige Unterschied hierbei ist, dass die Zellklone, welche für die Einfach-Behandlung verwendet wurden, ihren steilsten Abfall zwischen den Tagen 12 und 16 erfahren, während die Zellklone für die Dauer-Behandlung bereits zwischen den Tagen 8 und 12 eine Minderung der Koloniebildung um ca. die Hälfte aufweisen. Der Übergang in das Plateau findet in beiden Versuchsreihen ab dem 16. Tag statt.

Was die mit 2.5×10^{-9} M behandelten Zellgruppen (blaue Kurve) betrifft, so fällt bereits am ersten Stopptag (Tag 4) eine deutlich niedrigere Koloniezahl (s. Tab. 7 und 8) auf, als bei der Kontrollgruppe bzw. den HASMCs mit der 0.5×10^{-9} M Behandlung. Dieser Unterschied wird im weiteren Verlauf der Behandlung prägnanter, insbesondere bei den „Dauer-behandelten“ Zellen. Hierbei zeigt sich zwischen den Tagen 8 und 12 eine anhaltend niedrigere Koloniebildung (s. Tab. 7) als bei der Kontrollgruppe oder den behandelten Zellen mit 0.5×10^{-9} M. Erst ab Tag 16 der Dauer-Behandlung findet allmählich eine Annäherung an die Kontrollgruppe statt. Wohingegen bei den „Einfach-behandelten Zellen“ eine Annäherung bereits am 8. Beobachtungstag stattfindet und die Kurve (Abb. 4) sowie die Koloniezahlen (Tab. 7) im weiteren Verlauf sich eng an die der Kontrollgruppe angleichen. Am 20. Beobachtungstag haben sowohl die „Einfach- als auch Dauer-behandelten“ HASMCs mit der Kontrollgruppe praktisch gleichgezogen.

Betrachtet man nun den Kurvenverlauf (Abb. 4 und 5, orange Kurve) der HASMCs, welche eine Behandlung mit der Höchstdosis (5×10^{-9} M) erfahren haben, so fällt auf, dass insbesondere an den Beobachtungstagen 4 und 8 in beiden Behandlungsreihen keine nennenswerte Koloniebildung stattfand. Betrachtet man die Koloniezahl (Tab. 7 und 8) so konnte der Zellklon unter der Einfach-Behandlung lediglich im Durchschnitt eine Kolonie bilden, während bei den „Dauer-behandelten“ Zellen keine einzige

Koloniebildung stattfand. In dem Zeitraum zwischen den Tagen 8 bis 20 findet unter der Einfach-Behandlung ein langsamer Anstieg der Koloniezahl statt, während unter der Dauer-Behandlung weiterhin eine fehlende Koloniebildung festzustellen ist. Betrachtet man nun die gemittelten Koloniezahlen (Tab. 7), so kommt es zu einem Anstieg bis auf 16 Kolonien, was nahezu der Kontrollgruppe am Tag 20 entspricht. Um festzustellen, ob es unter weiterer Beobachtung der Einfach-Behandlung (5×10^{-9} M) zu einer nennenswerten Steigerung der Koloniezahl kommt, wurde ein weiterer Zellklon verwendet, wobei die Beobachtungsdauer ab dem 24. Tag bis zum 40. Tag beschränkt wurde (Tab. 9). Jedoch stellte sich heraus, dass die Koloniezahlen in beiden Versuchsgruppen nie über 6 Kolonien hinauskamen und sich beide mit geringer Schwankungsbreite angleichen. Diese Beobachtung entspricht praktisch dem asymptotischen Kurvenverlauf beider Behandlungsgruppen am Ende der Beobachtungsperiode am Tag 20 (Abb. 4).

3.3 Zellzyklusanalyse

Die Proliferation von Zellen erfolgt durch die Zellteilung (96, 97). Diese Proliferationsphase kann man nochmals unterteilen in eine Intermitosephase und eine Mitosephase (M-Phase). Für die Untersuchung des Zellzyklus ist hier insbesondere die Intermitosephase von Interesse, die man nochmals in eine G1-, S- und G2/M-Phase (s. Abb. 6) unterteilt wird. In der G1-Phase werden u.a. Enzyme (DNA-Polymerasen, Ligasen) für die S-Phase zur DNA-Vermehrung, Proteine (mRNA) für den Verteilungsapparat der Chromosomen und Histone produziert. Sie stellt aber auch den normalen Aktivitäts- bzw. Arbeitszustand der Zelle dar.

Ausgereifte bzw. ausdifferenzierte Zellen, die ihre Teilungsaktivität aufgeben und in einen Ruhestand übergehen, befinden sich in der G0-Phase. Ob eine Zelle entweder in die G1- oder G0-Phase übergeht entscheidet sich hierbei am Restriktionspunkt.

Die S-Phase stellt die Synthesephase dar, in der aus einem diploiden Ein-Chromatid- ein diploider Zwei-Chromatid-Chromosomensatz (Verdopplung der DNA) entsteht.

In der G2/M-Phase erfolgt u.a. die Kontrolle und eventuelle Reparatur der DNA sowie die Vorbereitung der Zellen (u.a. Lösung der Zellkontakte zu den Nachbarzellen, Abrundung und Vergrößerung der Zelle durch Flüssigkeitsaufnahme) auf die M-Phase. Die M-Phase stellt den eigentlichen Vorgang der Zellteilung dar.

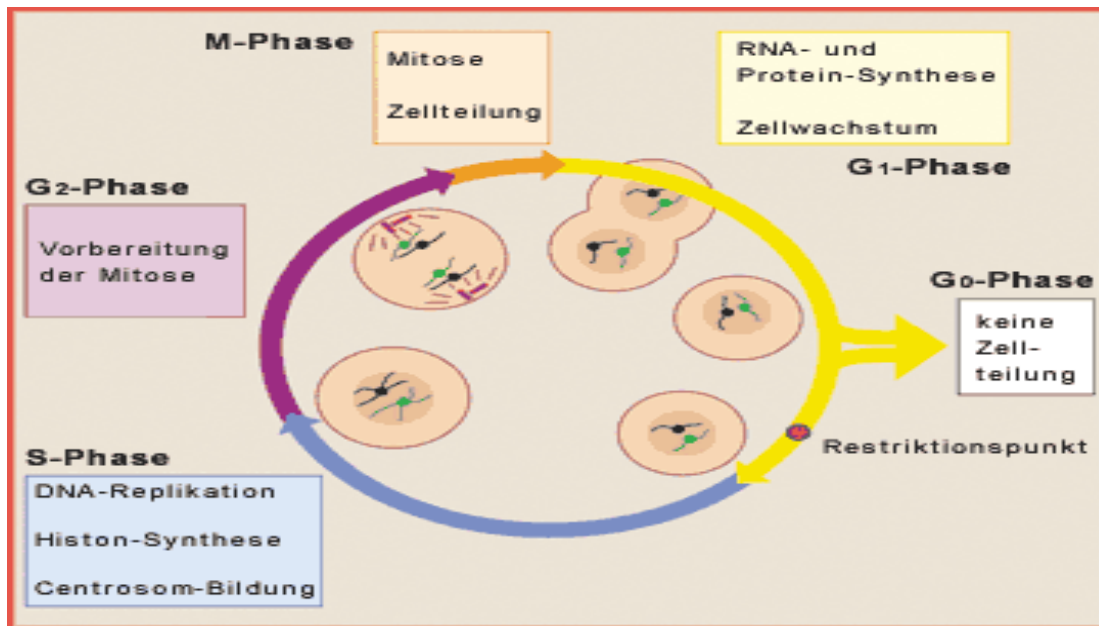


Abb. 6 Schematische Darstellung des Zellzyklus (49)

Die folgende Tabelle und Abbildung zeigen den prozentualen Anteil der Zellen pro Phase über einen Zeitraum von 14 Tagen, wobei jeweils an den Tagen 3, 6 und 14 eine prozentuale Messung erfolgte (s. auch 2.8.1).

Behandlungsart	Tag	Phase	Dosis $\times 10^{-9}$ Mol			
			0	0.5	2.5	5
Einfach	3	G1	85.0	81.4	83.2	47.7
		S	4.3	6.8	5.9	2.7
		G2/M	10.7	11.8	10.9	49.6
	6	G1	81.0	78.0	76.9	48.8
		S	7.5	8.0	8.1	3.5
		G2/M	11.5	14.0	15.0	47.7
	14	G1	71.0	71.0	74.2	58.1
		S	5.8	6.0	5.0	6.5
		G2/M	23.2	23.0	20.8	35.4
Dauer	3	G1	75.0	76.5	76.2	43.0
		S	11.7	11.7	10.9	2.9
		G2/M	13.3	11.8	12.9	54.1
	6	G1	76.1	76.2	74.1	46.7
		S	7.0	8.1	5.7	2.5
		G2/M	16.9	15.7	20.2	50.8
	14	G1	74.7	75.0	73.2	54.6
		S	3.5	3.6	4.2	2.8
		G2/M	21.8	21.4	22.3	42.6

Tabelle 10: Phasenanteile (in %) in Abhängigkeit der Behandlungsart und der Dosis

Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse für die Einfach- und Dauer-Behandlung
(s. Formel 2.8.2):

Einfach-Behandlung:

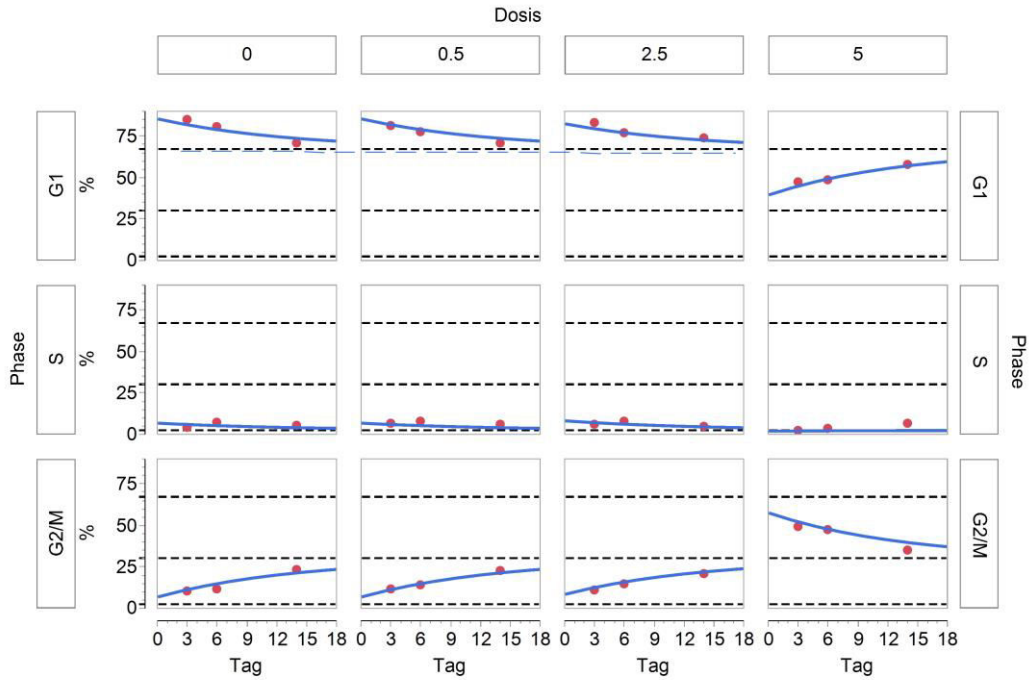


Abbildung 7

Dauer-Behandlung:

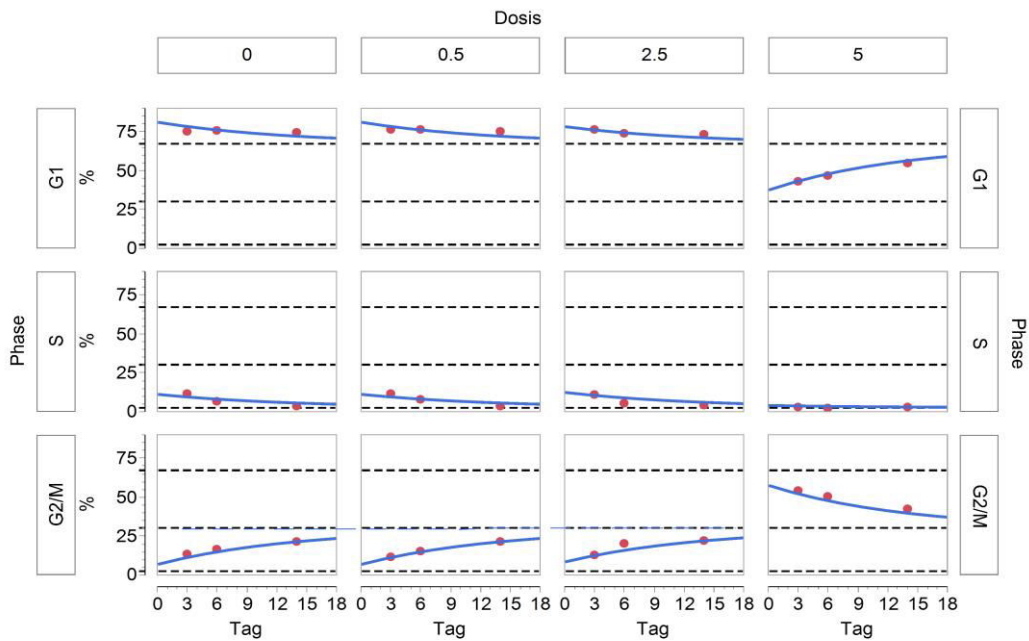


Abbildung 8

In Abbildung 7 und 8 sind die graphisch dargestellten Phasenverläufe (G1, S, G2/M) sowohl für die Einfach- als auch Dauer-Behandlung abgebildet. Bei genauerer Betrachtung fällt zum Einen auf, dass die Kurven sowohl für die Einfach-Behandlung als auch für die Dauer-Behandlung mit der Kurve der Kontrolle (Dosis 0) praktisch in allen Phasenabschnitten übereinstimmen. Lediglich für die HASMCs, welche mit 5×10^{-9} M CA-4 behandelt wurden, stellt sich ein konträrer Kurvenverlauf dar. Des Weiteren enthalten beide Abbildungen für alle drei Phasenverläufe als unterbrochene Linien die jeweiligen asymptotischen Werte (a) für die Einfach- und Dauer-Behandlung (in Klammern werden die 95% Konfidenzintervalle (KI) der Schätzwerte angegeben): 67.3% für G1 (95% KI: 66.1 - 68.5%), 2.7% für S und 29.9% für G2/M (95% KI: 28.7 - 31.1%). Diese hängen weder von der Behandlungsart noch von der Dosis ab. Die Dosis bestimmt jeweils nur die Anfangswerte (b_0). Der Anfangswert (b_0) für G1 in der Einfach-Behandlung liegt bei 85.7 % (95% KI: 84.7 - 86.6%) und der für die Dauerbehandlung bei 81.3% (95% KI: 80.4 - 82.3%). Die Anfangswerte (b_0) für die G2/M-Phase liegen für **beide** Behandlungsformen bei 7.2% (95% KI: 6.9 - 7.4%). Die Geschwindigkeit (c) der Annäherung an die Asymptoten hängt nicht von der Behandlungsart ab und ist für alle Dosen ebenso gleich: 0.073/Tag (95% KI: 0.068 - 0.078/Tag). Dies bedeutet, dass es 9.5 Tage dauert, bis sich die jeweilige Abweichung vom asymptotischen Wert für eine Phase halbiert. Nur für die G1-Phase beeinflusst die Behandlungsart den Anfangswert für die Kontrolle signifikant (85.7% b_0 -Einfach-Behandlung und 81.3% b_0 -Dauer-Behandlung).

Für G1 nimmt der Anfangswert nimmt mit der 5. Potenz der Dosis ab. Hätte man für die Einfach-Behandlung eine Dosis von 3.75×10^{-9} M eingesetzt, dann wäre der Anfangswert (b_0) gleich dem asymptotischen Anteil gewesen. Der entsprechende Dosiswert für die Dauer-Behandlung beträgt 3.55×10^{-9} M. Die Dosis die zu einer Reduktion von 50% vom Ausgangswertes b_0 für G1 führt liegt bei 4.86×10^{-9} M (95% KI: $4.78 - 4.95 \times 10^{-9}$ M). Für G2/M nimmt der Anfangswert mit der 5. Potenz der Dosis zu. Bei einer Dosis von 4.26×10^{-9} M wäre der Anfangswert gleich dem asymptotischen Wert für G2/M gewesen. Die Dosis die zu einer Verdoppelung des Ausgangswertes b_0 für G2/M führt liegt bei 3.383×10^{-9} M (95% KI: $3.379 - 3.387 \times 10^{-9}$ M). Die Kurven für die S-Phase sind durch die Differenz von 100% minus der Summe der beiden anderen Kurven bestimmt.

Zu Beginn der Beobachtungsreihe befinden sich die Zellen an Tag 3 (s. Tab. 10) der Kontrollgruppe der Einfach-Behandlung 85% bzw. 75% der Dauer-Behandlung in der G1-Phase. Den gleichen Effekt erkennt man für die Dosierungen 0.5×10^{-9} M und 2.5×10^{-9} M bei denen der prozentuale Anteil in der G1-Phase nur unwesentlich von denen der Kontroll-HASMCs abweicht.

Im Gegensatz dazu befinden sich bei denen mit 5×10^{-9} M CA-4 behandelten Zellen, sowohl in der Einfach-Behandlung als auch in der Dauer-Behandlung lediglich 47.7% bzw. 43.0% in der G1-Phase (s. Tab. 10). Der größte Anteil der Zellen lässt sich in der G2/M-Phase nachweisen. In den „Einfach-behandelten“ verharren 49.6% bzw. in den „Dauer-behandelten“ 54.1% der Zellen in der G2/M-Phase. Im weiteren Verlauf der Beobachtung kommt es zu einer Phasenverschiebung in Richtung G1-Phase. Die Phasenverschiebung für die „Einfach-behandelten“ Zellen findet hierbei früher statt als bei den „Dauer-behandelten“ Zellen. Bereits an *Tag 6* der Auswertung befinden sich 48.8% der „Einfach-behandelten“ Zellen in der G1-Phase (G2/M-Phase 47.7%), wohingegen in der Dauer-Behandlung erst an *Tag 14* die Phasenverschiebung (G1-Phase: 54.6%; G2/M-Phase: 42.6%) stattfindet.

4 Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse

Anhand der Proliferationskinetik wurde untersucht, ob das Spindelgift CA-4 eine dosisabhängige wachstumshemmende Wirkung auf die HASMCs besitzt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich für die geringste Dosis (s. Abb. 3, 0.5×10^{-9} M) sowohl in der Einfach-Behandlung als auch Dauer-Behandlung nahezu keine inhibierenden Effekte für das Proliferationsverhalten der HASMCs. Der Kurvenverlauf entspricht praktisch dem der Kontrolle. Auch in den gemittelten Zellzahlen an den jeweiligen Stopptagen (s. Tabelle 5 und 6) spiegelte sich diese Beobachtung wider.

Deutlicher erkennbar wirkt sich der inhibierende Effekt ab einer Dosis von 2.5×10^{-9} M (Abb. 3) aus. Hier zeigt sich bereits zwischen den Tagen 4 und 8 eine deutliche Abnahme des Proliferationsverhaltens der Zellen mit flacherem Wachstumsanstieg und demzufolge niedrigeren Zellzahlen (s. Tab. 5 und 6) im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden Behandlungsformen. Zwischen den Tagen 8 und 12 folgt nun der allmähliche Übergang in das Plateau, wobei auch hier wiederum, das „steady-state“

(Zellproliferation = Zelluntergang) auf einem niedrigerem Zellzahlenniveau (s. Tab. 5 und 6) sowohl in der Einfach-Behandlung als auch in der Dauer-Behandlung erreicht wird.

Die Zellen, die mit der Höchstdosis 5×10^{-9} M (s. Abb. 3) behandelt wurden, erfuhren eine erhebliche Hemmung der Proliferation. Die „Einfach-behandelten“ Zellen, zeigten nach den regelmäßigen Stopptagen mit MW, eine langsame Erholungstendenz, wenngleich auf deutlich niedrigerem Zellzahlenniveau (s. Tab. 5) als die Kontrollgruppe. In der Gruppe der „Dauer-behandelten“ Zellen trat ein kompletter Wachstumsstopp ein (s. Tab. 6) mit geradem Kurvenverlauf auf Höhe des Ausgangswert an Tag 0. Der Kurvenverlauf in der Einfach-Behandlung nimmt hingegen einen erheblich flacheren, exponentiellen Verlauf (s. Abb. 3, 5×10^{-9} M) an mit Übergang in eine Plateauphase.

Was sich des Weiteren aus den Ergebnissen sowie der Erstellung des Proliferationsmodells (s. Formel, Kap. 2.5.2) ableiten lässt, ist eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl pro 1 M des CA-4 Agens bei konstanter Steigung bis zum Erreichen der Plateauphase. Für beide Behandlungsarten bedeutet dies pro 1 M des CA-4 Agens, Abnahme der Zellzahl um 319.000 Zellen.

Der Koloniebildungstest ist eine sensitive Methode zum Nachweis der Vermehrungsfähigkeit der Zellen.

In den Abbildungen 4 und 5 (rote Kurve) ist der typische Kurvenverlauf der klonogenen Aktivität unbehauelter, glatter Muskelzellen dargestellt. Zu Beginn der Aussaat findet sich noch eine hohe klonogene Aktivität der Zellen. Begründet wird dies, durch das relative junge Alter der Zellen. Jedoch mit zunehmenden Alter sowie der zunehmenden Zelldichte, was wiederum zu einer zunehmenden Kontaktinhibition unter den Zellen führt, nimmt die klonogene Aktivität stetig ab. Die sigmoide Abnahme der klonogenen Aktivität geht dann in ein Plateau über, welches sich wiederum in den Zellen der PK widerspiegelt, die für das Gleichgewicht, also die Plateauphase, am Ende der PK verantwortlich sind.

Die mit 5×10^{-10} M CA-4 behandelte Zellgruppe (Abb. 4 und 5, grüne Kurve) zeigte einen nahezu identischen Kurvenverlauf zur Kontrollgruppe, welches sich auch in den gemittelten KOBİ-Zahlen (s. Tab. 7 und 8) beider Behandlungsgruppen (Einfach-

Behandlung und Dauer-Behandlung) widerspiegelte. Eine Behandlung in der entsprechenden Dosis wirkt sich demzufolge nicht wesentlich auf die klonogene Aktivität aus.

Die mit 2.5×10^{-9} M CA-4 „Einfach-behandelte“ Zellgruppe zeichnete sich zu Beginn durch einen leicht herabgesetzten Kurvenbeginn (s. Abb. 4, blaue Kurve 2.5) aus im Sinne einer reduzierten klonogenen Aktivität. Mit regelmäßigem Mediumwechsel näherte sich die Kurve der Kontrollgruppe allmählich an, wobei erst gegen Ende der Beobachtungsperiode das Niveau der klonogenen Fähigkeit der Kontrollgruppe erreicht wird. Dieser Effekt lässt sich auch an den absoluten KOBIs (s. Tab. 7) beobachten, so weichen ab Tag 16 und 20 die Koloniezahlen zur Kontrollgruppe nur geringfügig ab bzw. übersteigen sie ein wenig. Jedoch kommt es insgesamt zu keiner weiteren Zunahme der KOBIs (jeweils 20 Kolonien) an beiden Beobachtungstagen. Auch hier stellt sich der Effekt des „steady-states“, wie aus der PK bereits beobachtet, ein (s. Abb 3 und 4, blaue Kurve 2.5×10^{-9} M, Einfach-Behandlung). Es entsteht ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung bzw. Koloniebildung und kontaktinhibierten Zellen. Die Kontaktinhibierung führt zur Reduzierung der klonogenen Aktivität. Während es unter der Einfach-Behandlung mit 2.5×10^{-9} M CA-4 und dem Auswaschen der Substanz durch die regelmäßig durchgeführten Medienwechsel zu einer langsamen Erholung der klonogenen Aktivität kommt, setzt sich der supprimierende Effekt unter der Dauer-Behandlung mit 2.5×10^{-9} M CA-4 weiter fort. So liegt das KOBi-Niveau der „Dauer-behandelten“ Zellen stetig unter dem der Kontrolle bzw. der Behandlung mit 5×10^{-10} M CA-4 (s. Tab. 8 und Abb. 5).

Unter der Behandlung mit 5×10^{-9} M CA-4 fällt bereits nach dem ersten Behandlungstag (Tag 4) sowohl für die Einfach- als auch Dauer-Behandlung (s. Tab. 4 und 5) eine komplette Aufhebung der klonogenen Aktivität auf. Während bei der Einfach-Behandlung bereits nach einmaligem Medienwechsel ein Wiedereinsetzen der klonogenen Aktivität zu verzeichnen war, hielt unter der Dauer-Behandlung die vollständige Suppression der klonogenen Aktivität an. Bei genauerer Betrachtung der KOBi-Zahlen unter der Einfach-Behandlung (s. Tab. 7) sowie des Kurvenmodells (s. Abb. 4, orangene Kurve 5) hat man den Eindruck, dass die klonogene Aktivität stetig zunimmt. Daher wurde nochmals gesondert für die Höchstbehandlung eine Beobachtungsperiode von Tag 24 bis Tag 40 (s. Tab. 9) angesetzt. Hier zeigte sich

jedoch, dass es nicht zu einem weiteren Anstieg der klonogenen Aktivität kam, sondern sich ein plateauartiger Verlauf einstellte.

Um den Wirkmechanismus des Zytostatikums CA-4 in der Proliferationsphase genauer zu betrachten, erfolgte die Untersuchung des Zellzyklusses mit Hilfe der Durchflusszytometrie (s. 2.7 Zellzyklusanalyse).

Zu Beginn der 1. Messung (Tag 3) befinden sich die meisten Zellen der Kontroll-HASMCs (s. Tab. 10) in der G1-Phase ($G1_{\text{Einfach}}: 85.0\%$ / $G2_{\text{Dauer}}: 75.0\%$). Dies ändert sich jedoch im Verlauf der weiteren Auswertung, wodurch immer mehr Zellen anteilig in der G2/M-Phase verharren (Tag 14: $G2/M_{\text{Einfach}}: 23.2\%$ / Tag 14: $G2/M_{\text{Dauer}}: 21.8\%$). Dies ist durchaus nachvollziehbar, da zu Beginn der 1. Messung die Zellen noch jung sind und eine recht hohe Teilungspotenz besitzen. Begünstigend wirkt sich zudem noch das ausreichend vorhandene Substratangebot (Kulturmedium) sowie die geringe Zellzahl (keine Kontaktinhibition) am entsprechenden Tag der Zellernte aus.

Dementsprechend bereiten sich viele Zellen auf die M-Phase vor. Mit zunehmender Zellzahl, Alter und verhältnismäßig unzureichendem Substratangebot fällt der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, zunehmend (s. Tab. 10) ab zugunsten der G2/M-Phase. Somit bleiben also „ältere“ Zellen bzw. jene mit einer geringeren Teilungsrate vermehrt in der G2/M-Phase hängen. Mit dem Anstieg des prozentualen G2/M-Anteiles fällt gleichzeitig auch der Anteil der Zellen die sich in der S-Phase befinden ab. Den gleichen Effekt lässt sich bei den behandelten HASMCs mit 5×10^{-10} M (0.5×10^{-9} M) bzw. 2.5×10^{-9} M CA-4 beobachten. Hier differieren die Prozentzahlen nur unwesentlich von der Kontrollgruppe auseinander (s. Tab. 10). Im Gegensatz dazu befinden sich bereits zu Beginn der Beobachtungsphase, die mit 5×10^{-9} M CA-4 behandelten Zellen (s. Tab. 10), mehrheitlich in der G2/M-Phase (Tag 3: $G2/M_{\text{Einfach}}: 49.6\%$ / $G2/M_{\text{Dauer}}: 54.1\%$). In beiden Behandlungsgruppen kommt es zu einem verzögerten Shift der Phasenverschiebung in Richtung G1-Phase. So finden sich mehrheitlich am 6. Beobachtungstag der „Einfach-behandelten“ Zellen (s. Tab. 10) in der G1-Phase (48.8%), wohingegen die Phasenverschiebung in der „Dauer-behandelten“ Zellgruppe erst am 14. Tag ($G1\text{-Phase}_{\text{Dauer}}: 54.6\%$) zu verzeichnen ist. Während jedoch mit der Phasenverschiebung in der „Einfach-behandelten“ Zellgruppe auch mehr Zellen, im Zuge des Substratwechsels und der daraus resultierenden langsamen Erholung, in die S-Phase übergehen (Tag 6: $S\text{-Phase}_{\text{Einfach}}: 3.5\%$ / Tag14: S-

Phase_{Einfach}: 6.5%), verbleiben die „Dauer-behandelten“ Zellen (s. Tab. 10) in der G1- bzw. G2/M-Phase stecken (Tag 6: S-Phase_{Dauer}: 2.5% / Tag 14: S-Phase_{Dauer}: 2.8%). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der PK (s. Tab. 5 und 6) bzw. dem KOBIVersuch (s. Tab 7 und 8) wider.

Die gewonnenen Daten belegen einen konzentrationsabhängigen Einfluss des CA-4 auf den Wachstumsverlauf der HASMCs.

Unter der Behandlung der Zellen mit der niedrigsten Konzentration (5×10^{-10} M) war in allen verwendeten Versuchen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festzustellen. Dies ist wohl auf eine noch nicht ausreichende Absättigung der HASMCs mit dem Zytostatikum zurückzuführen, wodurch keine wesentliche Verlangsamung bzw. Suppression der Zellproliferation einsetzt.

Unter der mittleren Behandlungsdosis (2.5×10^{-9} M) mit CA-4 ist bereits eine relevante Reduktion der Proliferationskinetik sowie der klonogenen Aktivität zu erkennen, welche sich unter der Einfach-Behandlung langsam erholt, jedoch unter der Dauer-Behandlung stetig auf einem etwas niedrigerem Niveau einpegelt.

Unter der Höchstdosis (5×10^{-9} M) zeigt sich bei „einmaliger Behandlung“ nach anfänglicher kompletter Suppression und anschließend regelmäßig durchgeführten Medienwechseln eine stark verlangsamte Erholung, sowohl der Proliferationskinetik als auch der klonogenen Aktivität, wohingegen unter der Dauer-Behandlung ein vollständiger Stopp der Proliferationsfähigkeit und der Koloniebildung einsetzt.

Die Inhibierung der Zellen findet hierbei in der G2/M-Phase statt. Das CA-4 dockt dabei an der Colchizin-Bindungsstelle des Tubulins an, wodurch die Polymerisation der Microtubuli im Rahmen der Mitose beim Übergang von der Meta- in die Anaphase unterbunden wird. Dies wiederum führt zu einem Zellzyklus-Arrest. Am deutlichsten wird dieser Effekt unter der Höchstbehandlung mit 5×10^{-9} M CA-4 erkennbar.

4.2 Problematik der PTA

Die PTA (perkutane transluminale Angioplastie) avancierte in den letzten 40 Jahren zu einer der wichtigsten Therapieverfahren bei arteriellen Gefäßstenosen oder Gefäßverschlüssen (91). 1974 entwickelte und behandelte Andreas Grüntzig den ersten

Patienten mit einem Ballonkatheter (91). Noch heute gehören komplexe Gefäßstenosen, Gefäß- oder Bypassverschlüsse zum Indikationsspektrum der PTA.

Ein bedeutender Vorteil der PTA ist die minimale Invasivität, die im Vergleich zur offenen Operation oft langwierige Eingriffe vermeiden kann. Auch das Narkoserisiko bleibt dem Patienten in aller Regel erspart. Allerdings vermochte die Ballondilatation, das Problem der Restenosierung, nicht befriedigend in den Griff zu bekommen.

Versuche zur Prophylaxe einer Restenose nach PTA mittels systemisch medikamentöser Therapie (20) waren nicht zufriedenstellend, wie auch alternative instrumentelle Interventionen (21), die allesamt zu keiner wesentlichen Reduktion der Inzidenz der Restenose führten. Erklärbar ist dieser Zustand durch die noch nicht im Detail vollständig geklärte Pathophysiologie des Restenosemechanismus.

4.2.1 Der Restenosemechanismus

Infolge der Gefäßwandintervention, können Prozesse ausgelöst werden, die zu einer nachträglichen, partiellen Lumeneinengung führen. Die Ursachen hierfür sind multifaktoriell, wobei eine Verringerung des Gefäßgesamtdurchmessers, der zuvor dilatierten Arterie, kennzeichnend ist. Tritt dieses Phänomen kurz nach einer PTA auf, als Folge passiver, elastischer Rückstellkräfte der Gefäßwand, so bezeichnet man dies als „elastic recoil“ (92, 93). Findet jedoch eine Schrumpfung des Gesamtdurchmessers der Arterie erst nach Wochen oder Monaten statt, so wird dies als Folge von aktiven Umbauprozessen gedeutet und mit dem Begriff des sogenannten „Remodeling“ (94) bezeichnet. Aber auch eine Disruption der Endothelschicht, als Folge des Eingriffes, kann weitere kaskadenartige Reaktionen nach sich ziehen (94). So bedingt diese eine Freilegung der Extrazellulärmatrix, an welche sich wiederum Thrombozyten und Makrophagen anhaften können (94). Im Rahmen dieser komplexen Vorgänge von Zelladhäsion und Zellinfiltration werden eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt, die ihrerseits sowohl Myofibroblasten aus der Adventitia als auch glatte Muskelzellen (smooth muscle cells = SMCs) aus der Media aktivieren. Resultat der Aktivierung ist eine Umwandlung der Zellen von einem sogenannten kontraktilen zu einem synthetisierten Phänotyp (22, 94), was wiederum Proliferation und Migration von SMCs und Myofibroblasten als auch Synthese von Extrazellulärmatrix nach sich zieht. Letzteres ist für den Hauptteil der Restenose verantwortlich. Als Stimuli für die

Umwandlung der SMCs, werden insbesondere FGF und PDGF verantwortlich gemacht, welche vor allem aus den Makrophagen und den Thrombozyten freigesetzt werden (94). Frühe Marker, wie z.B. nukleäre Onkogene der SMC-Aktivierung, können schon nach circa 30 Minuten nach einer PTA detektiert werden (23). Die Proliferation der SMCs lässt sich aber noch mindestens zwei weitere Wochen nachweisen (24).

4.3 Combretastatin A-4

Die o.g. Untersuchungsergebnisse belegen eine potente Inhibition des Zellwachstums der glatten Muskelzellen durch CA-4, welche u.a. für den Restenoseprozess nach PTA verantwortlich gemacht werden, aufgrund einer vermehrten Synthese von extrazellulärer Matrix. Somit wäre z.B. ein möglicher Einsatz des CA-4 als Beschichtung von Stents oder Ballonkathetern denkbar, welche nach lokaler Applikation im Rahmen endovaskulärer Interventionen den Restenoseprozess im besten Fall vollständig unterbinden.

Da das Combretastatin A-4 (CA-4) ein noch relativ neues Präparat ist und sein primärer Anwendungsbereich bisher der Behandlung von Tumoren galt, ist die Studienlage bezüglich eines Einsatzes zur Prävention einer Restenose nach erfolgreicher PTA bzw. PTCA noch unzureichend. Jene Studien, die sich vornehmlich mit den antitumorösen bzw. antivaskulären Effekten auseinandersetzen, belegen jedoch das wachstumshemmende Potential des CA-4.

So untersuchten Galbraith et al (45) die antivaskulären Eigenschaften des CA-4 sowohl an 18 Tumorpatienten in der Phase 1 Stufe, als auch an Ratten mit einem Karzinosarkom. Mit Hilfe eines speziellen MRT-Systems, dem DCE-MRI (Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging) erfolgte die Auswertung des Blutflusses sowie der vaskulären Permeabilität in beiden Versuchsgruppen. Das Ergebnis der über 24 h andauernden Untersuchung ergab für die Ratten (injizierte Dosis: 30 mg/kg) eine schon nach 6 h gemessene 64%ige Reduktion der Durchblutung im Bereich des Tumors, wohingegen das Nierenparenchym oder das Muskelgewebe unverändert blieb. Ein ähnliches Ergebnis stellte sich auch bei den Tumorpatienten ein, denen in unterschiedlichen Dosen (5 – 114 mg/m²) CA-4 verabreicht wurde. Bei 16 von 18 Patienten, die mit einer Mindestdosis von 52 mg/m² oder höher behandelt wurden,

zeigte sich im DCE-MRI eine signifikante Reduktion der Durchblutung im Bereich des Tumors um 37% 4 h und 29% 24 h nach Behandlung. Auch hier wiederum blieb extratumorales Gewebe, wie Nierenparenchym oder Muskulatur, von einer Reduktion verschont. Dieses Ergebnis lässt zum einen die Schlussfolgerung zu, dass das CA-4 einen antivaskulären Effekt, insbesondere im Bereich des Tumorgewebes, besitzt und zum anderen, dass sich die Wirkung vornehmlich auf proliferierendes Gewebe bezieht.

In der Studie von Nambu et al (47) wurde der suppressive Effekt des Combretastatins A-4-Phosphat (CA-4P) auf die choroideale Neovaskularisation (CNV) der Retina untersucht. Hierfür wurden 2 „Testmodelle“ verwendet und zwar zum einen genetisch veränderte Mäuse, deren Retina eine Überexpression des sog. „vascular endothelial growth factor (VEGF)“ aufwies und zum anderen Mäuse, deren choroideale Neovaskularisation (CNV) durch eine Laser-induzierte Verletzung der Bruchschichten Membran der Retina erfolgte. Den VEGF-Mäusen wurden täglich 4.0 mg/kg CA-4-Phosphat (eine wasserlösliche Form des CA-4), beginnend ab dem 7. Tag postnatal (Beginn der transgenetischen Expression), injiziert. Der zweiten Testreihe (Laser-induzierte Verletzung der Bruchschichten Membran) wurden täglich 75 oder 100 mg/kg CA-4P intraperitoneal injiziert. Bezüglich der ersten Testreihe (VEGF-Mäusen) konnte unter der entsprechenden Gabe von CA-4P eine signifikante Reduktion neovaskulärer Läsionen im Bereich der Retina nach 21 Tagen festgestellt werden. Ebenso eine deutliche Reduktion der CNV im Bereich der Rissstelle fand sich unter der 2. Testreihe nach täglicher Behandlung mit Combretastatin. Bei Mäusen mit einer bereits bestehenden CNV der Retina zeigten sich nach täglicher Behandlung von CA-4P (100 mg/kg) über eine Woche eine signifikante Reduktion der choroidealen Neovaskularisation im Bereich der o.g. Bruchstelle. Schlussfolgernd deuten die o.g. Ergebnisse an, dass das CA-4, sowohl die Entstehung unterdrückt als auch die Rückbildung der okulären Neovaskularisation fördert.

In einer weiteren Studie (Phase 1) von Cooney et al (46) wurde der kardiovaskuläre Schutz des CA-4P(Phosphat) bei 25 Patienten mit einem fortgeschrittenem solidem Tumor untersucht. Den Patienten wurden hierbei in steigender Dosierung (beginnend mit 18 mg/ml bis max. 90 mg/ml) alle 21 Tage das CA-4 intravenös verabreicht. Als

Messwerte wurden neben Blutdruck und Puls auch im 12-Kanal-EKG die QT-Zeiten zur Verifizierung ausgewertet. Dabei wurden insbesondere die ersten 4 Stunden nach Verabreichung des Medikamentes zur Erlangung der Messwerte untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass es zu einer signifikanten Erhöhung der QT-Zeit (von 27.2 auf 30.8 ms), insbesondere zwischen der 3. und 4. Stunde, nach Verabreichung kam. Im gleichen Zeitfenster fand sich eine leichte Erhöhung der Herzfrequenz (von 13 auf 15 bpm). 3 der 25 Patienten hatten von Beginn an der Untersuchung nach Verabreichung des CA-4P eine verlängerte QT-Zeit, während 15 von 25 Patienten die o.g. Beobachtung aufwiesen. Zusätzlich ließ sich ein dosisabhängiger Effekt in Bezug auf die Steigung der Herzfrequenz sowie QT-Zeit nachweisen. Der Blutdruck zeigte sich jedoch weitestgehend unbeeindruckt bezüglich der CA-4P-Gabe. Bei 2 Patienten stellten sich, innerhalb der ersten 24 h nach Gabe, EKG-Veränderungen im Sinne eines akuten koronaren Syndroms ein. Schlussfolgernd führt die Gabe des CA-4P zu einer Verlängerung des QT-Intervalls und somit zu möglichen Veränderungen im EKG, welche im Rahmen eines akuten koronaren Syndroms einhergehen.

Die retinale Neovascularisation im Rahmen verschiedener Erkrankungen, wie z.B. der diabetischen Retinopathie, stellt ein großes Problem dar, welches in eine Erblindung des betroffenen Patienten führen kann.

Griggs J. et al (50) untersuchten daher in vivo den inhibierenden Effekt von CA-4 auf die retinale Neovascularisation. Hierzu wurden neonatale Mäuse (C57BL/6) zunächst zeitweise einer Hyperoxämie ausgesetzt, wodurch es zu einer Verminderung der retinalen Vaskularisation kam. Anschließend erfolgte die weitere Entwicklung der Mäuse in gewohnter atmosphärischer Umgebung. Diese relative Ischämie zur vorherigen Umgebungssituation induzierte eine extensive Neovaskularisation der Retina, wie sie der im Rahmen einer diabetischen Retinopathie ähnelt.

Im Versuchsablauf wurden sowohl die Muttertiere als auch die 7 Tage alten Jungmäuse (P7) in einer luftdichten Kammer mit 75%igem Sauerstoff (Flow-Rate 1 L/Minute) über 5 Tage ausgesetzt. Nach 1 Tag normaler Raumluftumgebung, erfolgte in unterschiedlicher Konzentration (0.78, 1.56, 3.125, 6.25 und 12.0 mg/kg CA-4P) die tägliche, intraperitoneale Gabe von CA-4P (CA-4P entspricht der wasserlöslichen Form von CA-4) über 17 Tage. Nach Einschläferung der Tiere erfolgte die ENUkleation und

Fixierung der Augen in Formalin für 24 Stunden zur weiteren histologischen Bearbeitung. Die histologische Analyse wies in der Retina der Mäuse ohne CA-4P-Behandlung eine extensive Neovaskularisation im Sinne einer Retinopathie nach. Wohingegen bei den behandelten Mäusen eine dosisabhängige Inhibierung der Neovaskularisation nachzuweisen war.

Ein weiterer Aspekt der anti-vaskulären Effekte des CA-4 findet sich in der Studie von Vincent et al (55). Hierbei wurde insbesondere ein Augenmerk auf den Einfluß des Zytostatikums auf Molekularebene gelegt. Die Mechanismen wodurch das CA-4 selektiv die Neogefäße im Rahmen der Tumorgenese anvisiert und destabilisiert sind noch unklar. Die These in dieser Studie basiert darauf, dass die Zytokin-stimulierten Endothelzellen sensitiver auf die Microtubuli destabilisierenden Effekte des CA-4 reagieren. Hierzu wurden *in vitro* humane, umbilicale, venöse Endothelzellen (HUVEC) mit Wachstumsfaktoren (FGF-2 und VEGF-A) stimuliert. Jeweils ein Teil dieser Zellen wurde mit CA-4P in unterschiedlicher Dosierung (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 nM) behandelt. Ab einer Dosis von 5 nM zeigte sich bereits eine signifikante Hemmung der Zellproliferation. Dosen über 10 nM hatten einen zytotoxischen Effekt und führten zu einer Zellablösung vom Boden und schließlich zum Zelltod. Bei unstimulierten HUVECs wies das CA-4P keine vergleichbaren Effekt auf. Zusätzlich wurden in dieser Studie die antiproliferativen Effekte des CA-4P in o.g. Dosierung auf die glatten Muskelzellen (smooth muscle cells = SMC) untersucht (sowohl alleine als auch in Co-Kultur mit den HUVECs). Hierbei zeigten sich jedoch im Vergleich zu den HUVECs, v.a. in Dosisbereichen bei denen es zum endothelialen Zelltod kam (ab 10 nM), keine nennenswerten Veränderungen in der Proliferationsrate. Vielmehr entwickelten die HUVECs unter einer Co-Kultur mit den SMCs und entsprechender Behandlung mit CA-4P eine Resistenz gegenüber dem Zytostatikums. Vermutlich beruht dieser Effekt auf einer Stabilisierung der endothelialen Zell-Zell-Interaktionen durch die SMCs. Nachdem sich in einem weiteren Versuch eine CA-4P induzierte Zellretraktion und Aktin-Depolimerisation der HUVECs nachweisen ließ, folgte nun die Untersuchung des Einflusses des Zytostatikums auf das vaskulär-endotheliale Cadherin (VE-Cadherin), welches u.a. für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, Signaltransduktion und die Anordnung der Endothelzellen in tubuläre Strukturen verantwortlich ist.

Hierzu wurden die HUVECs im Beisein von CA-4P (10 nM) mit FGF-2 stimuliert. Nach entsprechender Inkubationszeit von 3-6 Stunden zeigten die angefärbten VE-Cadherine, anstelle eines geordneten linearen Musters in der interjunktionalen Region der Zellgrenzen, ein zick-zack-geformtes Anordnungsmuster. Nach 12 bis 18 Stunden zeigten sich die Zellkontakte zwischen den benachbarten HUVECs aufgelöst im Sinne eines Verlustes der interzellulären Kontakte. Zusammenfassend zeigte sich neben einem antiproliferativen Effekt des CA-4Ps auf die HUVECs ebenso einen destabilisierenden Effekt der interzellulären Kontakte durch Unterbindung der Ausrichtung der Adhäsionsproteine (VE-Cadherine) in der Membranwand der Zellen. Einen wesentlichen antiproliferativen Effekt des CA-4Ps auf die SMCs, unter den o.g. Dosierungen, konnte in dieser Studie jedoch nicht nachgewiesen werden.

4.4 Alternative zytostatische Therapieansätze

4.4.1 Paclitaxel (Taxol)

Wall, Wani et al (56) konnten 1971 auf der Suche nach neuen Anti-Krebsstoffen, aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), die Substanz Paclitaxel (Taxol) extrahieren. Der Wirkmechanismus des Paclitaxel basiert darauf, dass es an das β -Tubulin der Microtubuli bindet und somit deren Abbau inhibiert. Hierdurch wird die Mitose gestört und die Zellteilung kann nicht mehr adäquat erfolgen. Im Gegensatz also zum CA-4A, welches direkt den Aufbau der Microtubuli inhibiert, hemmt das Paclitaxel den Abbau der Microtubuli.

Mit einer ähnlichen Fragestellung wurde daher in einer Arbeit von Axel DI et al (44) der inhibierende Effekt des Paclitaxels auf die Proliferation und Migration der HASMCs unter lokaler Applikation in vitro und in vivo an einem Hasenmodell untersucht. Hierzu wurden sowohl HASMCs als auch humane arterielle Endothelzellen (HaEC) jeweils mit Paclitaxel als Einmal-Behandlung und Dauer-Behandlung in unterschiedlicher Dosierung kultiviert. Das Zellwachstum wurde anschließend nach 4, 8 und 14 Tagen bestimmt. Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiges inhibiertes Zellwachstum der HASMCs unter Paclitaxel. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein

nennenswerter Effekt auf das Zellwachstum der HaECs. Zudem wurden in 20 männlichen New Zealand Weißhasen durch elektrische Stimulation intimale Plauebildungen induziert. Danach wurden 10 von den 20 Weißhasen mit Hilfe eines mikroporösen Ballons das Paclitaxel lokal appliziert. Bei der späteren histologischen Aufarbeitung der Intima zeigte sich unter den mit Paclitaxel behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der Gefäßwanddicke sowie Stenoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnte der Nachweis einer dosisabhängigen Inhibition des Paclitaxels auf die Proliferation und Migration der HASMCs erbracht werden.

In einer weiteren Studie von Wiskirchen, Schöber et al (57) wurde der Effekt des Paclitaxels auf 3 Ebenen des Restenosemechanismus (Zellproliferation der humanen arteriellen glatten Muskelzellen (HaSMC), Zellmigration, Matrix-Formation) in vitro untersucht. HaSMCs wurden über 5 oder 20 Tagen kultiviert und mit Paclitaxel in unterschiedlicher Dosierung behandelt. Beobachtet wurden die Zellproliferation, die klonogene Aktivität sowie der Zellzyklus der behandelten Zellen. Der Einfluß auf die Zellmigration wurde mittels eines 2-Kammer-Migrations-Systems ausgewertet. Mittels Immunofluoreszenz wurde die Synthese von Tenascin beurteilt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition des Paclitaxels auf die Proliferation der HaSMCs. Bei einer Behandlung mit Paclitaxel über 5 Tage und anschließender Inkubation für weitere 15 Tage zeigten die HaSMCs eine Regeneration, während bei fortgesetzter Behandlung über 20 Tage die Proliferation deutlich supprimiert war. Dies spiegelte sich ebenso in einer reduzierten klonogenen Aktivität sowie einem entsprechenden G2/M-Phasenblock in der Zellzyklusanalyse wider. Auch die Synthese der extrazellulär Matrix (Tenascin) wurde durch Paclitaxel supprimiert. Somit konnte ein inhibierender Effekt auf allen Ebenen (Proliferationskinetik, KOB, Zellzyklus, Synthese der extrazellulär Matrix), welche beim Restenoseprozess eine Rolle spielen nachgewiesen werden.

In der ELUTES (The European Evaluation Of Paclitaxel Eluting Stent) Studie von Gershlick A et al (67) wurde der inhibierende Effekt bezüglich der Restenose eines mit Paclitaxel-ummantelten polymerfreien coronaren Stents untersucht. 190 Patienten wurden eingeschlossen um die Sicherheit und Effektivität des Stents (V-Flex Plus, Fa. Cook) zu untersuchen. Hierfür wurden zum einen Stents mit aufsteigender beschichteter

Paclitaxel-Dosierung (0.2, 0.7, 1.4 und 2.7 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ Stentoberfläche) und zum anderen bare-metal Stents (unbeschichtete Stents) verwendet. Nach 6 Monaten erfolgte eine angiographische follow-up Kontrolluntersuchung. Hierbei zeigte sich in der Auswertung der sogenannten prozentualen Durchmesser-Restenose („**Percent-Diameter-Restenosis**“ entspricht dem minimalen luminalen Durchmesser minus dem Referenz-Gefäßdurchmesser im gesunden Gefäßsegment, wobei das Ergebnis durch den Referenz-Gefäßdurchmesser dividiert wird) im betroffenen Gefäßsegment eine Restenose in der Kontrollgruppe zwischen 26.7 - 33.9% (n = 34), wohingegen dieser Wert in der mit 2.7 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ behandelten Gruppe bei 14.2 - 16.6% (n = 31) lag. Bei der Auswertung des sogenannten späten luminalen Gefäßdurchmesserverlustes („**Late-Loss**“ entspricht dem Lumendurchmesser direkt nach der Gefäßintervention minus dem Lumendurchmesser in der Kontrolluntersuchung im behandelten Gefäßsegment) nach entsprechender Interventionsprozedur, zeigte sich in der Kontrollgruppe eine größere Abnahme des Gefäßdurchmessers im Durchschnitt von 0.73 mm, wohingegen dieser in der anbehandelten Gruppe lediglich zwischen 0.11 - 0.50 mm lag. Die binäre Restenose („**Binary Restenosis**“ entspricht der Abnahme des Gefäßdurchmessers in Prozent um $\geq 50\%$) beim Follow-up nahm von 20.6% auf 3.2% ab, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen o.g. Behandlungsdosen gab. Einen Spätverschluß der Stents auch nach 12 Monaten konnte in keiner der o.g. Behandlungsgruppen nachgewiesen werden, trotz einer lediglich 3-monatigen Zusatzbehandlung mit Clopidogrel. Unerwünschte cardiale Ereignisse (sog. „Major adverse cardiac events“, z.B. cardialer Tod, Myokardinfarkt) traten ebenso auch nach 12 Monaten nicht auf. Schlußfolgernd zeigt sich, das mit Paclitaxel-ummantelte coronare Stents, insbesondere bei einer Dosis von 2.7 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, eine Reduktion der Restenoserate aufweisen ohne Nachweis weiterer kurzfristiger oder mittelfristiger Nebenwirkungen.

Eine weitere einarmige ZILVER-PTX Studie von Zeller et al (68) befaßte sich mit dem Outcome nach Behandlungen von femoro-poplitealen In-Stent-Restenosen (ISR) durch Paclitaxel-beschichtete Stents („Drug-Eluting-Stents“ / DES). 108 Patienten mit 119 In-Stent-Restenosen Läsionen wurden eingeschlossen . Alle Patienten wurden mit einem Paclitaxel-beschichteten Nitinol-Stent versorgt. Die durchschnittliche Läsionslänge betrug 133 mm (± 91.7 mm). 33.6% der Gefäßläsionen waren > 150 mm lang und in

33.1% der Fälle waren die Gefäße okkludiert. In 98.2% der Fälle konnte ein interventioneller Erfolg erzielt werden, wobei im Durchschnitt 2.1 (\pm 1.2) Stents pro Läsion platziert wurden. Die primäre Offenheitsrate nach 6 Monaten lag bei 95.7% und nach einem Jahr bei 78.8%.

Die freie interventionalle Revaskularisationsrate der Zielläsionen („target lesion revascularization“) betrug nach 6 Monaten 96.2%, nach 1 Jahr 81.0% und nach 2 Jahren 60.8%. Die Frakturrate der eingebrachten DES im Bereich der ISR betrug 1.2%.

Schlußfolgernd zeigte sich ein positives akutes sowie mittelfristiges Outcome im Bezug auf die Offenheitsrate bei der Behandlung von ISR mit den Paclitaxel-beschichteten DES.

Im Valentines I Trial von Loh JP et al (69) wurde der Effekt von Paclitaxel-beschichteten Ballons (PCB) bei Patienten mit In-Stent-Restenosen (ISR) in Drug-Eluting-Stents (DES) untersucht.

250 Patienten mit einer In-Stent-Restenose wurden eingeschlossen. 76 Patienten (30.4%) hatten eine ISR, welche zuvor mittels eines Paclitaxel (P-DES)-Stent (n = 34; 41 Gefäßläsionen) oder Sirolimus- / Everolimus- / Zotarolimus-Stent (n = 42; 43 Gefäßläsionen) behandelt wurden. Der Rest (n = 174) wurde mit einem Bare-Metal-Stent (BMS) behandelt. Von den Patienten die zuvor mit einem P-DES behandelt wurden wiesen diese häufiger diffuse Gefäßläsionen (> 20 mm) auf als jene mit einem -lismus-DES (50% vs. 26.8%). Im Durchschnitt wurden pro Patient 1.08 (\pm 0.31) PCBs verwendet, wobei der Durchmesser des PCBs im Schnitt bei 2.99 mm (\pm 0.42 mm) und die PCB-Länge im Durchschnitt bei 24.4 mm (\pm 11.9 mm) lag. Das durchschnittliche follow-up-Fenster lag bei 231 (\pm 43) Tagen.

Das periprozedurale Bailout-Stenting (notfallmäßiges Stenting mittels BMS bei drohendem Gefäßverschluß) lag in beiden Gruppen ähnlich hoch (P-DES: 2.4% vs. DES: 4.7% / p = n.s.). Bei den sog. „Major Adverse Cardiac Events“, also den unerwünschten cardialen Ereignissen (z.B. Tod, Myocardinfarkt, wiederholte coronare Revaskularisationen, etc.) nach der Behandlung der ISR mit dem P-DEB, lag diese in der P-DES-Gruppe bei 0%, wohingegen in der -lismus-DES-Gruppe diese bei 23.8% (n = 10) lag.

Als Schlußfolgerung zeigt sich, dass die Behandlung mit P-DEB in ISR bei mit P-DES vorbehandelten Patienten ein besseres mittelfristiges Ergebnis liefert als bei Patienten, welche zuvor mit einem –lismus-DES behandelt wurden. Vermutlich ist dies auf einen anderen Mechanismus der ISR bei –lismus vorbehandelten Patienten zurückzuführen, welche entsprechend weniger sensitiv auf die lokale Paclitaxel-Applikation reagieren als bei Patienten die zuvor mit einem P-DES behandelt wurden.

4.4.2 Sirolimus (Rapamycin)

Das Sirolimus (61), auch bekannt unter dem Namen Rapamycin, wurde 1977 entdeckt. Der Wirkstoff wurde ursprünglich aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Hierbei handelt es sich um eine antifungales Makrolid Antibiotikum, welches u.a. ein sehr potentes immunsuppressives Spektrum aufweist. Aufgrund dessen erfolgte die spätere Zulassung als Immunsuppressivum zur Vermeidung einer Organabstoßung nach Organtransplantationen. Der Wirkmechanismus (62) des Rapamycins beruht u.a. darauf, dass es mit dem cytosolischen Bindungsprotein FK-Binding Protein 12 (FKBP 12) einen Komplex bildet. Dieser Bindungskomplex dockt anschließend an einen intrazellulären Regulator des Zellzykluses an, dem sog. Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR), wodurch dessen Funktion blockiert wird. Durch die Blockade des mTOR wird die Translationsinitiation der eukaryotischen Proteinbiosynthese unterbunden. Die Zellen verharren hierbei in der G1-Phase des Zellzykluses.

Bereits in einer frühen Arbeit von Marx SO et al (63) wurde der antiproliferative Effekt des Rapamycins im Vergleich mit dem Ascomycin (FK520), einem weiteren Immunsuppressor, an humanen (HSMC) sowie Ratten-SMCs (RSMC) untersucht. Hierbei zeigten sich in beiden Zellgruppen (HSMC und RSMC) relevante Inhibierungen der DNA-Synthese sowie des Zellwachstums durch das Rapamycins bei Dosierungen ab 1ng/ml. Das FK520, welches strukturell mit dem Rapamycin verwandt ist und ebenso an den FKBP 12-Rezeptor andockt, zeigte jedoch keine inhibierende Wirkung auf beide SMC Zellgruppen. In übermäßiger molarer Konzentration blockiert sogar das FK520, durch entsprechende kompetitive Bindung an den FKBP-Rezeptor, die antiproliferative Wirkung des Rapamycins. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden,

dass der Rapamycin-FKBP-Komplex die Protein-Phosphorylierung des Retinoblastoms am Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzykluses inhibiert. Die verminderte Protein-Phosphorylierung ging im Übrigen mit einer Verminderung der p33^{cdk2} Kinase-Aktivität einher. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, dass das Rapamycin durch die Reduktion der Kinase-Aktivität des Zellzykluses eine Verminderung der SMC Zellproliferation bewirkt.

In der Zwischenzeit finden sich zahlreiche weitere Arbeiten zum Rapamycin, insbesondere in Bezug auf die sogenannten Drug-Eluting-Stents (DES), also beschichtete Stents, welche zum Beispiel coronar oder peripher in den Gefäßen eingesetzt werden können.

Hierzu findet sich eine Arbeit von Moses JW et al (64) in der in einer randomisierten Doppel-Blind-Studie ein Sirolimus-beschichteter Stent (S-DES) mit einem unbeschichtetem Stent (BMS) verglichen wurde. Für die Studie wurden 1058 Patienten mit einer neu-diagnostizierten coronaren Herzerkrankung rekrutiert. Bei den Studienteilnehmer handelte es sich um Patienten mit komplexen Krankheitsbildern, z.B. unterschiedlichen Begleiterkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, im Mittel 26%), unterschiedlich lange Gefäßläsionen (im Durchschnitt 14.4 mm Länge) oder Beteiligung weitere kleiner Gefäße (small vessel disease, im Mittel 2.80 mm Durchmesser). Als Endpunkte wurde ein Therapieversagen (z.B. durch Tod als cardiale Genese, Myokardinfarkt, rezidivierende Gefäßinterventionen oder operative Revaskularisationen) des betroffenen Zielgefäßabschnittes innerhalb von 270 Tagen festgelegt.

Nach Abschluß der Untersuchung zeigte sich ein Therapieversagen des Zielgefäßes (target vessel) in o.g. Weise bei insgesamt 21% der Studienteilnehmer nach Gefäßinterventionen mittels BMS, wohingegen nur bei 8.6% ein Therapieversagen bei Patienten eintrat, welche mittels eines S-DES behandelt wurden ($p < 0.001$).

Die Reduktion des Therapieversagens wurde hauptsächlich auf eine verminderte Rate der erneut erforderlichen Revaskularisation der Zielgefäßläsionen (target lesion) zurückgeführt. In der BMS-Gruppe betrug diese 16,6%, in der S-DES-Gruppe waren dies lediglich 4.1% ($p < 0.001$).

Die neointimale Hyperplasie (evaluiert mittels Angiographie und intravaskulärem Ultraschall) stellte sich ebenso deutlich reduziert dar in der Gruppe mit einem S-DES. Schlußfolgernd zeigen die Daten, dass Patienten mit komplexen coronaren Gefäßläsionen von einer Behandlung mit einem S-DES profitieren im Sinne einer niedrigeren Restenoserate sowie unerwünschter cardialer Ereignisse.

4.4.3 Sirolimus versus Paclitaxel

Nachdem bereits sowohl für Sirolimus als auch Paclitaxel entsprechende beschichtete Stents auf den Markt kamen, beschäftigten sich einige Studien mit der möglichen Überlegenheit des einen Stents gegenüber dem anderen.

So untersuchten Goy JJ et al (76) in ihrer prospektiv vergleichenden randomisierten Studie die Resultate nach Einsatz von Sirolimus-Stents (S-DES) und Paclitaxel-Stents (P-DES) in der interventionellen Kardiologie. Für die Studie wurden 202 Patienten eingeschlossen. Ein klinisches follow-up erfolgte nach spätestens 6 Monaten. Während dieser Zeit erhielten 100 Patienten einen P-DES und 102 Patienten einen S-DES. In beiden Gruppen wurden pro Patient 1.5 Stents ($p = 0.6$) implantiert. Der prozedurale Erfolg lag in beiden Gruppen bei 99%.

Bei den „Major Adverse Cardiac Events“ (z.B. Tod, Myokardinfarkt, zusätzliche Interventionsangiographien (PCI), Stentthrombosen, aorto-coronare-Bypassoperationen) traten diese im Schnitt nach 7 Monaten (± 2 Monate) bis zum bzw. nach dem follow-up auf. Hiervon fielen 4% ($n = 4$) auf die Gruppe mit den P-DES und 6% ($n = 6$) auf die Gruppe mit den S-DES zurück ($p = 0.8$), wobei keiner dieser Patienten innerhalb des follow-up Fensters verstarb. Die erforderlichen Re-Interventionen oder operativen Revaskularisationen der sog. „target lesions revascularization“ (bezogen auf Stenosen innerhalb des Stents oder direkt oberhalb bzw. unterhalb des Stents) lagen bei 3 Patienten, wobei 1 in die Gruppe der P-DES fiel und 2 in die Gruppe der S-DES. Eine verspätete Stentthrombose wurde bei 1 Patienten der S-DES Gruppe dokumentiert. Die o.g. Ergebnisse zeigten, bei einschränkend kleiner Patientenzahl, dass es sich hierbei um gut anwendbare Verfahren handelte mit hoher prozeduraler Erfolgsrate ohne jedoch einen signifikanten Vorteil des einen Stents gegenüber dem anderen.

In einer weiteren randomisiert kontrollierten Studie von Kastrati A et al (77) wurde ein Vergleich bezüglich der Überlegenheit zwischen den Drug-Eluting-Stents (Sirolimus [S-DES] und Paclitaxel [P-DES]) sowie der konventionellen Ballonangioplastie (C-PTA) in Patienten mit In-Stent-Restenosen (ISR) gegenübergestellt. Zwischen Juni 2003 und Oktober 2003 wurden insgesamt 300 Patienten eingeschlossen. Nach einer Vorbehandlung mit Clopidogrel 600 mg (mindestens 2 h vor der Intervention) wurden die Patienten randomisiert in eine der 3 Gruppen eingeteilt. In jede Gruppe (P-DES, S-DES, C-PTA) wurden letztlich jeweils 100 Patienten randomisiert zugeteilt. Nach 6 Monaten erfolgte eine angiographische follow-up Kontrolle, wobei als primärer Endpunkt eine Restenose in der Angiographie $>$ oder $= 50\%$ gewertet wurde. In der Auswertung konnten in 92% der Patienten (n = 275) eine angiographische follow-up Kontrolle durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich in der Gruppe der C-PTA eine Restenose von 44.6% (n = 41 von 92). In der S-DES Gruppe lag die Restenoserate bei 14.3% (n = 13 von 91) und in der P-DES Gruppe bei 21.7% (n = 20 von 92). Das relative Stenoserisiko (RR) des S-DES im Vergleich zur C-PTA lag bei 0.32 (95% Konfidenzintervall: 0.18 – 0.56). Das RR des P-DES im Vergleich zur C-PTA lag bei 0.49 (95% Konfidenzintervall: 0.31 – 0.76). Die Inzidenz einer sog. „target vessel revascularization“ lag in der Gruppe der C-PTA bei 33% (n = 33 von 100), in der S-DES Gruppe bei 8% (n = 8 von 100) und in der P-DES Gruppe bei 19% (n = 19 von 100). Aus den o.g. Daten zeigt sich schlußfolgernd eine Überlegenheit der DES gegenüber der C-PTA in Bezug auf die Prävention bzw. das Wiederauftreten einer ISR. Bei weiterer Aufschlüsselung der o.g. Daten zeigt sich zudem wohl ein leichter Vorteil der S-DES gegenüber den P-DES in Bezug auf eine ISR.

In einer weiteren prospektiv, randomisiert, kontrollierten Vergleichsstudie (REALITY Trial) von Morice et al (78) wurden Sirolimus-Stents (S-DES) mit Paclitaxel-Stents (P-DES) in de-novo coronaren Arterienläsionen verglichen.

In einem Zeitraum von August 2003 bis Februar 2004 wurden insgesamt 1386 Patienten mit einer Angina pectoris sowie mindestens 1-2 de-novo coronaren Gefäßläsionen (2.25 – 3.00 mm Durchmesser) eingeschlossen. Das Durchschnittsalter lag bei 62.6 Jahren, 71.1% der Patienten waren Männer und 28% der Patienten hatten als Begleiterkrankung einen Diabetes mellitus. Angiographische Kontrolluntersuchungen (follow-ups)

erfolgten nach 8 Monaten sowie klinische follow-ups nach 12 Monaten. In der randomisierten Zuteilung erhielten 701 Patienten einen S-DES und 685 Patienten einen P-DES. Als primärer Endpunkt der Studie wurde eine binäre Restenose (BRS) von > 50% nach 8 Monaten festgelegt. Sekundäre Endpunkte beinhalteten u.a. sog. „target lesions/vessel revascularizations“, Myokardinfarkt, aorto-coronare Bypassoperationen oder Tod.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich nach 8 Monaten in den follow-ups eine BRS in 9.6% (n = 86) der Patienten mit einem S-DES. Bei den Patienten mit einem P-DES war eine BRS in 11.1% (n = 95) nachzuweisen. Das relative Risiko (RR) einer BRS im Vergleich beider Stenttypen lag bei 0.84 (95% Konfidenzintervall (CI): 0.61 – 1.17; p = 0.31). Der durchschnittliche In-Stent late loss (Lumenverlust in mm) für die S-DES lag bei 0.09 (0.43) mm, bei den P-DES betrug dieser 0.31 (0.44) mm. Die In-Stent Durchmesserstenose in Prozent (%) lag bei den S-DES bei 23.1% und bei den P-DES bei 26.7%. Die Zahl der sog. „Major adverse cardiac events (MACE)“ nach 12 Monaten lag bei den S-DES bei 10.7% (n = 73) und bei den P-DES bei 11.4% (n = 76).

Diesbezüglich lag das RR bei 0.94 (95% CI: 0.69 – 1.27; p = 0.73).

Aus den o.g. Daten zeigte sich prozentual gesehen ein minimaler Vorteil der S-DES gegenüber dem P-DES. Jedoch statistisch gesehen findet sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die binäre Restenoserate oder den MACEs zwischen beiden Stenttypen.

4.4.4 Dexamethason

Das Dexamethason (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) ist ein künstliches Glucokorticoide, welches u.a. antiinflammatorisch und immunsuppressiv wirkt (58).

In einer Studie von Bitzer M et al (59), mit ähnlichem Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit beschrieben, wurde der anti-proliferative Effekt des Dexamethasons auf die HASMCs in einem in-vitro-Modell untersucht. Die HASMCs wurden in unterschiedlicher Dexamethason Dosierung (10^{-6} – 10^{-10} mol/l) inkubiert. Nach 20 Tagen erfolgte die Auswertung mittels PK, KOBİ und Zellzyklus-Analyse. Zusätzlich wurde der Einfluß auf die Zellmigration mittels eines 2-Kammer-Migrations-Systems untersucht.

Hierbei konnte eine dosisabhängige Inhibierung der Zellproliferation nachgewiesen werden, insbesondere für die höchste Dosierung mit 10^{-6} mol/l. In der Zellzyklus-Analyse zeigte sich ein dosisabhängiger G1-Phasenblock, welcher sich insbesondere in der höchsten Dosierung mit 10^{-6} mol/l signifikant darstellte. Des Weiteren konnte eine dosisabhängige, reduzierte, klonogene Aktivität (KOBI) nachgewiesen werden. Eine signifikante Reduktion der Migrationsfähigkeit konnte insbesondere für die Dosen von 10^{-6} und 10^{-8} mol/l nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie von Todd et al (60) wurde sowohl der inhibierende Effekt des Dexamethasons auf die Zellproliferation als auch der supprimierende Effekt auf der Ebene des Zellzykluses untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss auf die Expression von Schlüsselgenen des Zellzykluses ausgewertet. Die aortalen Ratten-SMCs (RASMC) wurden in unterschiedlicher Dexamethason Dosierung anbehandelt und nach 72 Stunden die Zellzahl bestimmt. Zusätzlich erfolgte Ermittlung der DNA-Synthese durch Bestimmung des Thymidin-Einbaus nach zuvor erfolgter Behandlung mit und ohne Dexamethason sowie zeitlich unterschiedlicher Zellstimulation. Nach 24 Stunden erfolgte die Auswertung des Zellzykluses sowie die Anfertigung eines Western blots zur Beurteilung der Genexpression (c-fos, c-myc und Thymidin-Kinase{TK}) des Zellzykluses. Als Resultat zeigte sich eine dosisabhängige Inhibierung des Dexamethasons in Bezug auf die Zellproliferation als auch der DNA-Synthese. Bei der Auswertung des Zellzykluses ließ sich ein dosisabhängiger G1-Phasenblock nachweisen. Die TK Genexpression, ein Marker der späten G1-Phase, wurde durch Dexamethason ebenso supprimiert, wohingegen die Genexpression von c-fos und c-myc (Marker der frühen Zellzyklus-Phase) unbeeinflusst blieb.

Zwischenzeitlich erfolgten weitere Untersuchungen des Dexamethasons durch entsprechende Beschichtungen von Stents. So untersuchten Lincoff et al (65) die coronare Restenosebildung in einem in-vivo-Schweinemodell. Für den Versuchsaufbau wurde eine Matrix-Lösung bestehend aus einer Dexamethason (0,8mg)-Poly-L-Lactic-Acid (PLLA 0,4 mg) Suspension (low molecular 80 kD und high molecular 321 kD PLLA) mit derer sie die Stents beschichteten verwendet. Ein Teil der Schweine wurde mit einem unbeschichteten Stent behandelt, ein anderer Teil mit den beschichteten

Dexamethason-PLLA-Stents und eine weitere Untersuchungsgruppe mit beschichteten overexpanded (ca. 30% größer als der coronare Gefäßdurchmesser) Stents behandelt. Nach 28 Tagen wurden die Tiere eingeschläfert und es erfolgte eine Ausmessung der neointimalen Wanddicke. Bei den Untersuchungstieren mit dem high molecular beschichteten PLLA-Stents wurde zudem im arteriellen Gewebe sowie im Blutserum die Dexamethason-Konzentration nach 1 Stunde sowie nach 1, 2, 10 und 28 Tagen nach Stentimplantation gemessen. In den Untersuchungsergebnissen zeigte sich eine Dexamethason-Freisetzung in den ersten 6 Tagen. Die mit dem low-molecular-PLLA-beschichteten Stents zeigten eine intensive entzündliche neointimale Reaktion im Vergleich zu den high-molecular-PLLA-Stents, welche vom Gewebe besser vertragen wurden. Trotz allem bewirkte das freigesetzte Dexamethason keine wesentliche Verminderung der neointimalen Hyperplasie. Die Dexamethason-Konzentrationen waren im arteriellen Gewebe ca. 300000-fach höher als im Serum nach 24 Stunden. Nach 28 Tagen war das Dexamethason im Gewebe immer noch 3000-fach höher als im Serum.

Diese Untersuchungsergebnisse konnten in einer weiteren prospektiven **Dexamethasone-Eluting-Stent-Italian-Registry-Studie (DESIRE-Studie)** von Pesarini et al (66) unterstützt werden. In insgesamt 20 italienischen Studienzentren wurden 332 Patienten mit einem akuten coronaren Syndrom (ACS) eingeschlossen. Diese wurden im Rahmen der invasiven Frühbehandlung mit einem Dexamethason-beschichteten Stent (insgesamt 420 implantierte Stent bei 387 coronaren Läsionen) behandelt. Elektive angiographische follow-up Kontrollen (6-Monats-Kontrolle in 140 von 151 Pat.) wurden von 6 der 20 Studienzentren durchgeführt. Bei diesen 140 Patienten wurde eine **quantitative coronare Analyse (QCA)** durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich, dass 80% der 140 QCA-Patienten (entsprechend 156 coronare Läsionen) in der follow-up Gruppe eine instabile Angina pectoris aufwiesen, während bei den restlichen 20% ein NSTEMI (**Non-ST-Elevation-Myocardial Infarction**) nachweisbar war. Bei 70 Patienten (50%) waren ST/T-Veränderungen nachweisbar. 81 Patienten (58%) wiesen eine Troponin-Erhöhung auf, 31 Patienten (22.1%) waren Diabetiker. In 125 Patienten fanden sich coronare Einzel-Läsionen, hiervon erhielten 117 Patienten einen Monostent, während die restlichen 8 Patienten multiple Stents

erhielten. Die mediane coronare Läsion betrug 11.94 mm (\pm 6.30 mm), die mediane Stentlänge betrug 17.30 mm (\pm 6.08 mm). Die binäre In-Segment Restenoserate (Reduktion des Durchmesser in Prozent \geq 50%) lag bei 34.3% (48 von 140 Pat.) bzw. 33.3% pro Läsion (52 von 156 Läsionen). Der durchschnittliche Lumenverlust (late lumen loss) im Stent lag bei 0.95 mm (\pm 0.64 mm) und der durchschnittliche Lumenverlust im betroffenen Segment bei 1.02 mm (\pm 0.59 mm) .

Als Schlussfolgerung zeigt sich bei den oben genannten Ergebnissen kein zufriedenstellendes Resultat. Die Restenoserate bei Patienten mit einem ACS nach 6 Monaten, welche mit einem Dexamethason-beschichteten Stent versorgt wurden, lag bei ca. 34%, womit eine effektive antiproliferative Wirkung nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

4.4.5 Anthranilsäure-Derivate als Basis der nicht-steroidalen Antirheumatika bzw. nicht-opioiden Analgetika

Die Anthranilsäure (74) ist eine aromatische, blau fluoreszierende Carbonsäure, welche als Zwischenprodukt für Pharmazeutika, Kosmetika, photographischen Chemikalien bzw. Feinchemikalien oder Korrosionsschutzmittel verwendet wird. Die Verbindung wurde 1841 von Carl Julius Fritzsche beim alkalischen Abbau von Indigo entdeckt. Dieser Ausgangsstoff dient u.a. für die Synthese von Anthranilinsäure-Derivaten, welche wegen ihrer ähnlichen Molekülstrukturen zur Salicylsäure als nicht-opioide Analgetika verwendet werden können.

4.4.5.1 Flufenaminsäure

Die Flufenaminsäure ist ein Anthranilsäure-Derivat, welches heute als ein nicht-steroidales Antirheumatikum und nicht-opioides Analgetikum fungiert (72). Auf molekularbiologischer Ebene hemmt es hierbei die Cyclooxygenase (COX) sowie Hyaluronidase direkt. Des Weiteren supprimiert es u.a. die Expression der COX-II durch Bindung an den spezifischen Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor – kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells). Dieser Transkriptionsfaktor findet sich im Übrigen praktisch in allen Zellen und Geweben unseres Körpers, wodurch die Transkription bestimmter Genabschnitte moduliert werden können. So z.B. auch die

Interleukin-6-Transkription in den Endothelzellen, welches u.a. auch eine Rolle beim Restenoseprozess zugeschrieben wird.

In einer Studie von Schöber et al (73) wurde der Effekt der Flufenaminsäure auf die Proliferation (mittels Proliferationskinetik), der klonogenen Aktivität (mittels Koloniebildungs-Assay = KOBI) sowie die Migrationsfähigkeit (durch Stimulation der Zellen mittels PDGF-BB in 24-Well Platten mit 8 µm Membranporeneinsätzen) und die Zellzyklus-Verteilung (mittels Flow-Zytometrie) der in-vitro im Serum stimulierten humanen aortalen glatten Muskelzellen (HASMC) untersucht.

Des Weiteren wurde die Expression der p44/42 Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) durch Western-Blot-Technik detektiert.

Die HASMCs wurden hierbei in 3 unterschiedlichen Dosierungen (40 µmol/l, 200 µmol/l, 400 µmol/l Flufenaminsäure) über 4 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, welches wiederum alle 4 Tage bis zum Tag 20 gewechselt wurde. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich insbesondere für die höchste Dosierung (400 µmol/l Flufenaminsäure) nach 4 Tagen Behandlung ein inhibierender Effekt auf die Proliferation (179700 Zellen [± 49800] vs. Kontrolle: 747900 Zellen [± 144000]; $p < 0.001$). Die gleiche Beobachtung zeigte sich im KOBI mit deutlich verminderter klonogenen Aktivität in der höchsten Dosierung (1 Kolonie [± 0.3] vs. Kontrolle: 50 Kolonien [± 1.4]; $p < 0.001$). Auch beim Migrationstest zeigte sich eine Suppression unter der höchsten Dosierung (8 Zellen [± 2] vs. Kontrolle: 48 Zellen [± 15]). In der Auswertung der Zellzyklus-Analyse konnte ein G2/M-Phasenblock nachgewiesen werden (28.9% [± 1.5] vs. Kontrolle: 9.5% [± 3.2]; $p < 0.001$). Des Weiteren bewirkte die Behandlung der HASMCs mit Flufenaminsäure eine Reduktion der Expression des p44/42 MAPK (190 BLU [± 106] vs. Kontrolle: 427 BLU [± 0.305]; $p < 0.05$).

Aus den o.g. Ergebnissen läßt sich ein signifikante Inhibierung der Flufenaminsäure auf die Proliferation bzw. klonogene Aktivität der HASMCs auf der Ebene eines G2/M-Phasenblocks sowie eine Reduktion der Migrationsfähigkeit nachweisen.

4.4.5.2 Glafeninhydrochlorid (1-Glyceryl N-(7-chloro-4-quinoly)-Anthranilsäure)

Ein weiteres Anthranilsäure-Derivat ist das Glafeninhydrochlorid (G-HCl). Das G-HCl, welches zu den nicht-steriodalen Antirheumatika gezählt wird, weist im Vergleich zu

den anderen Anthranilinsäure-Derivaten eine Hydrochlorid-Gruppe auf, wodurch es wasserlöslicher wird und somit für in vitro Untersuchungen geeigneter erscheint (75).

Im Rahmen einer Studie von Schöber W, Tran QB et al (75), welche auch als Vorlage einer Dissertationsarbeit verwendet wurde, wurde der Einfluß des G-HCl auf humane aortale glatte Muskelzellen (HASMC) sowie humane Endothelzellen (HEC) in Bezug auf die Proliferations- (mittels Proliferationskinetik), Migrations- (mittels Migrationstest) und Matrixsynthesefähigkeit (Tenascin durch Immunofluoreszenz) untersucht. Des Weiteren wurde die Zellzyklus-Verteilung mittels Flowzytometrie sowie die klonogene Aktivität mittels des Koloniebildungs-Assay (KOBI) untersucht. Anzumerken ist, dass lediglich für die HASMCs alle o.g. Untersuchungsmethoden zum Tragen kamen, wohingegen für die HEC lediglich eine Auswertung der Proliferationskinetik sowie der KOBI erfolgte.

Die Zellen (HASMC und HEC) wurden hierfür jeweils mit 3 unterschiedlichen G-HCl Dosierungen (10 µmol, 50 µmol, 100 µmol) über 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden jeweils der Hälfte der behandelten Zellen nach dem Mediumwechsel einer Weiterbehandlung mit entsprechenden Dosierungen zugeführt, wohingegen die andere Hälfte nur mit dem Mediumwechsel weiter inkubiert wurde. Die entsprechenden Mediumwechsel (mit / ohne G-HCl-Gabe) wurden bis zum 20. Behandlungstag nach initialer G-HCl-Gabe fortgesetzt. In den Versuchsergebnissen konnte in der Proliferationskinetik sowie in den KOBIs eine dosisabhängige Inhibierung sowohl bei den HASMCs als auch den HECs nachgewiesen werden. Bezüglich der Migrationsfähigkeit der HASMCs zeigte sich eine partielle Inhibierung insbesondere bei den Dosierungen von 10 µmol und 50 µmol. Wohingegen in der höchsten Dosierung (100 µmol) eine leichte Migrationszunahme nachzuweisen war. Des Weiteren war unter der G-HCl Behandlung eine deutliche Reduktion der Tenascin-Synthese zu verzeichnen. Bezüglich der Zellzyklus-Verteilung war eine Reduktion der G1-Phase nachzuweisen sowie ein G2/M-Phasenblock feststellbar.

Als Schlußfolgerung läßt sich somit eine dosisabhängige Inhibierung der Proliferation bei Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase sowie partieller Inhibierung der Migrationsfähigkeit der HASMCs unter Behandlung mit dem G-HCl feststellen.

4.4.5.3 Tranilast (N-(3',4'-Dimethoxycinnamoyl)-Anthranilsäure)

Bei einem weiteren Anthranilsäure-Derivat, dem Tranilast (Rizaben®), handelt es sich um ein Antiallergikum, welches von der Firma Kissei Pharmaceuticals hergestellt wurde und 1982 die Zulassung in Japan und Südkorea u.a. für die Behandlung des Asthma bronchiale erhielt (70).

Das Tranilast wirkt hierbei auf mehreren Ebenen. So inhibiert (70, 71) es u.a. die Proliferation humaner dermaler microvaskulärer Endothelzellen sowie supprimiert den Effekt der Chemotaxis des Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF). Des Weiteren inhibiert es in vitro die Kollagensynthese in den Fibroblasten sowie die Interleukin-6 Produktion in den Endothelzellen.

In einer groß angelegten Studie, mit einer Patientenzahl von 11500, der sog. PRESTO (Prevention of Restenosis with Tranilast and ist Outcomes)-Studie (43), sollte der antiproliferative Effekt in Bezug auf die Restenose belegt werden. Doch das Ergebnis dieser Studie war eher ernüchternd, so zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des minimalen Lumendurchmessers (MLD) unter Behandlung mit Tranilast (1.72 - 1.78 mm) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1.76 [\pm 0.77] mm).

4.5 Weitere medikamentöse Therapieansätze zur Restenoseprophylaxe

Wie schon zuvor erwähnt, lieferten systemisch medikamentöse Therapien nur unbefriedigende Ergebnisse zur Restenoseprophylaxe nach PTA. So umfassen diese möglichen therapeutischen Strategien klassische Medikamente, wie Antithrombotika, Kalzium-Antagonisten, Thrombozytenaggregationshemmer und ACE-Hemmer.

4.5.1 Antithrombotika (Heparin, Hirudin)

Zu den klassischsten Vertretern der Antithrombotika, gehören v.a. die Heparine (79). Wie eingangs beschrieben, spielt die murale Formierung eines Thrombus an der Stelle der Gefäßwandverletzung eine Rolle in Pathogenese der Restenose. Durch die Anlagerung von Thrombozyten an der besagten Stelle und Aktivierung des Gerinnungssystems, wobei u.a. Thrombin gebildet wird kann eine Restenose vorangetrieben werden. Genau hier liegt der Ansatzpunkt der Heparine (79), die durch eine Komplexbildung mit Antithrombin III (AT III), die Inhibition von Thrombin,

Plasmin und den Faktoren IXa, Xa, XIa, XIIa bewirken kann. Da insbesondere Thrombin auch als ein potenter Stimulator der SMC-Proliferation angesehen wird (25, 26), liegt es nahe die Ausbildung der Restenose nach PTA, durch Gabe von Thrombinantagonisten zu behandeln. Trotz dieses Sachverhaltes konnte bisher in keiner klinischen Studie ein eindeutiger Nachweis der Prävention einer Restenose durch Heparin erbracht werden (27, 28).

So sollte in einer randomisierten Studie von Grassman ED et al (29), die Effektivität und Sicherheit des low-molecular-weight Heparins „Certoparin“, zur Verhinderung einer Restenose nach durchgeführter PTCA (perkutane transluminale coronare Angioplastie) evaluiert werden. Hierfür wurden 118 Patienten mit 158 Gefäßläsionen ausgewählt, die zuvor mit Hilfe einer Angioplastie behandelt wurden. Von diesen 118 Patienten beendeten 102 Patienten die Studie. Die Studie wurde auf drei Monate angesetzt, wobei ein Teil der Patienten in diesem Zeitraum das Certoparin und der andere Teil, die Kontrollgruppe, ein Placebo erhielt. Nach drei Monaten erfolgte die Auswertung der Untersuchung durch eine erneute Angiographie. Hierbei zeigte sich, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit Certoparin behandelten Gruppe ein Lumenverlust zu verzeichnen war. Der ermittelte relative Lumenverlust bei der Placebogruppe lag bei 0.19 (\pm 0.23) mm. Ein ähnliches Resultat ergab sich auch für die mit Certoparin behandelte Gruppe bei relativen Werten zwischen 0.14 (\pm 0.21) mm. Schlussfolgernd ergab die Untersuchung ein ernüchterndes Ergebnis, dass eine Behandlung mit einem Heparin, wie Certoparin, wohl ineffektiv ist als Prophylaxe einer Restenose nach stattgehabter PTCA.

Alternativ zum Heparin wird noch das Hirudin (80) dazu gezählt. Hirudine sind antikoagulatorisch wirkende Polypeptide, welche aus den Speicheldrüsen des Blutegels gewonnen werden. Durch direkte Hemmung des Thrombins, wodurch die Bildung von Fibrinpolymeren aus deren Vorstufen, dem Fibrinogen, verhindert wird, wirkt es antikoagulatorisch. Die bevorzugte Anwendung des Hirudins (81) findet, insbesondere bei der Heparin-induzierten-Thrombozytopenie Typ 2 (HIT 2) sowie bei thromboembolischen Komplikationen, statt. Einen Vorteil, dass das Hirudin (80) gegenüber dem Heparin vorzuweisen hat ist, dass die Wirkung unabhängig vom AT III

erfolgen kann und es nicht an Plasmaproteine gebunden wird. Ein Nachteil ist jedoch, dass bisher noch kein Antidot zur Neutralisation des Hirudins verfügbar ist.

1995 versuchte die HELVETICA-Studie (The Hirudin in a European Trial Versus Heparin in the Prevention of Restenosis after PTCA) von Serruys PW et al (30) die Effekte einer 1-3-Tage-Hirudin Therapie nach PTCA bei 1141 Patienten zu evaluieren. Trotz signifikanter Senkung der Rate frühischämischer Ereignisse durch Gabe des Hirudins, konnte jedoch nach 7 Monaten kein Unterschied der Restenose-Inzidenz beobachtet werden.

4.5.2 Kalzium-Antagonisten

Kalziumkanäle haben die Aufgabe, intrazellulär die Kalziumkonzentration zu erhöhen, was nachfolgend zu einer gesteigerten Kontraktilität kardialer und vaskulärer glatter Muskelzellen führt. Man unterscheidet hierbei zwischen spannungsabhängigen (Voltage Operated Calcium Channels = VOCC) und rezeptorabhängigen (Receptor Operated Calcium Channels = ROCC) Kanälen (82), wobei hiervon insbesondere die VOCC's, im Rahmen der gängigen medikamentösen therapeutischen Behandlung, von Bedeutung sind. Unter den VOCC's gibt es wiederum Subtypen von Kanälen (L-, T-, P-, N-Kanäle), wobei hier wiederum dem L-Kanal die größte Bedeutung zukommt, an dem die bisherigen Kalzium-Antagonisten (Nifedipin-, Diltiazem-, Verapamil-Typ) vorzugsweise agieren (82).

In neueren Studien versuchte man herauszufinden, ob neben den üblichen Indikation der Kalzium-Antagonisten (arterielle Hypertonie / hypertensive Krise, Angina Pectoris, teils auch supraventrikuläre HRST) sich auch ein Vorteil im Rahmen der Restenoseprophylaxe nach erfolgter PTCA ergab.

In der NICOLE (The Nisoldipine in Coronary artery disease in Leuven)-Studie (31) wird über eine Laufzeit von drei Jahren getestet, ob das Nisoldipin, ein Dihydropyridin vom Nifedipin-Typ, die Progression von minimalen koronaren Läsionen reduziert und ob eine verminderte Restenoserate unter Gabe des Nisoldipins, nach erfolgreicher PTCA, zu verzeichnen ist. In dieser randomisierten Doppel-Blind-Studie, in der 826 Patienten eingeschleust wurden, wurde einem Teil der Patienten täglich 40 mg des

Nisoldipin verabreicht, während der andere Teil ein Placebo erhielt. Vor Beginn der Untersuchungsphase, erfolgte ein Angiogramm in dem alle koronaren Segmente gemessen wurden. Anschließend erfolgten Kontrolluntersuchungen nach 6 Monaten sowie nach 3 Jahren. Als Restenose wurden alle Verengungen bewertet (gemäß der „National Heart, Lung and Blood Institute Criterion IV“), die mindestens einen Rückgang der Gefäßweite, ausgehend vom initialen Gefäßdurchmesser post-PTCA, um 50% oder mehr aufwiesen. Das erste Kontroll-Angiogramm nach 6 Monaten zeigte bei insgesamt 646 untersuchten Patienten, dass in 49%, der 308 mit Nisoldipin behandelten Gruppe, eine Restenosierung nach oben genannter Definition nachweisbar war. In der Placebo Gruppe, mit insgesamt 338 Patienten, war der Anteil mit 55% Restenoserate merklich höher. Die Todes- und Myocardinfarkt-Rate waren in beiden Gruppen, was eine vorzeitige dringliche PTCA bedeutete, verhältnismäßig niedrig. So lag diese in Nisoldipin-Gruppe bei 18%, während in der Placebo-Gruppe 26% der Patienten eine notfallmäßige PTCA benötigten. Insgesamt waren vorzeitige dringliche Angiographien, bedingt durch eine erneute Restenosierung, in der Nisoldipin-Gruppe bei 32% und in der Placebo-Gruppe bei 41% vonnöten. Da die Studie zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist, fehlen somit die Ergebnisse der „3-Jahres-Angiographien“. Jedoch lässt aus den bisherigen Resultaten schlussfolgern, dass zwar die Restenosierungsrate sich nicht signifikant senken ließ, zumindest jedoch die Anzahl der wiederholten Revaskularisationsprozeduren reduziert werden konnte, was wiederum die anti-anginöse Wirkung der Kalzium-Antagonisten widerspiegelt.

Die CAPARES (Coronary Angioplasty Amlodipine Restenosis)-Studie (32) untersuchte den Einfluss des Amlodipin, wie Nisoldipin auch ein Dihydropyridin, in Bezug auf die Restenosierung und das klinische „outcome“ der Patienten nach erfolgter PTCA. In der mit 635 Patienten eingeschleusten randomisierten Doppel-Blind-Studie erhielt ein Teil der Patienten täglich 10 mg Amlodipin, während der andere Teil der Patienten ein Placebo-Präparat zugewiesen bekam. Die Studie wurde mit der medikamentösen Vorbehandlung, (zwei Wochen im Voraus einer anstehenden PTCA) begonnen und sollte nach vier Monaten mit Hilfe Abschluss-Angiogramms ausgewertet werden. Es zeigte sich in der Abschlussuntersuchung, dass der Rückgang des mittleren Lumendurchmessers (MLD) in der mit Amlodipin behandelten Gruppe im Durchschnitt

bei 0.30 (\pm 0.45) mm lag. Die Placebo-Gruppe wies Durchschnittswerte um 0.29 (\pm 0.49) mm auf. Hinsichtlich einer erneuten, notwendigen PTCA, war zeigte sich ein Vorteil in der mit Amlodipin behandelten Gruppe gegenüber der Gruppe mit dem Placebo-Präparat. Von 236 mit Amlodipin behandelten Patienten, mussten lediglich 10 Patienten [entspricht prozentual 3.1%] sich einer erneuten PTCA unterziehen. In der Placebo-Gruppe mit 215 Patienten, waren es schon 23 Patienten [7.3%].

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass zwar ein Beginn einer medikamentösen Therapie mit Amlodipin, zwei Wochen im Voraus einer anstehenden PTCA, den Rückgang des Gefäßdurchmessers nicht nennenswert aufhalten kann, jedoch immerhin die Inzidenz erneuter PTCA's signifikant senken kann.

4.5.3 Thrombozytenaggregationshemmer

Zu den geläufigsten Vertretern dieser Gruppe, mit teils unterschiedlichem Wirkmechanismus gehören u.a. Acetylsalicylsäure [ASS] (83), Abciximab (84) und Clopidogrel (85). Die Wirkung dieser Medikamente beruht darauf, dass die Thrombozyten eine Anzahl verschiedener Rezeptoren auf ihrer Membranoberfläche exprimieren. Hierzu gehören beispielsweise Rezeptoren für Thromboxan A₂ (TXA₂), Thrombin, Fibrinogen (GP IIb/IIIa), Adrenalin, Kollagen, Platelet-Activating-Factor (PAF), Adrenalin, ADP und der „von Willebrand Faktor“ (GP Ib, GP IIb/IIIa). Eben diese genannten Plättchenstimuli binden an ihre spezifischen Rezeptoren und setzen somit eine Aktivierungskaskade in Gang (Thrombozytenaktivierung). Aktivierte Thrombozyten (86) wiederum degranulieren und setzen u.a. ADP und TXA₂ frei, welche wiederum an den spezifischen Rezeptoren binden und die Thrombozytenaktivierung verstärken. Zudem wird noch die TXA₂-Synthese in den Thrombozyten angeregt. Zuletzt haften die aktivierten und degranulierten Thrombozyten, durch eine Quervernetzung mit Hilfe des Fibrinogens, aneinander (Thrombozytenaggregation) und bilden einen okkludierenden Thrombus an der Endothelläsion.

Das ASS (83) entfaltet seine Wirkung durch eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase, was eine Hemmung der TXA₂-Synthese und wiederum eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung mit nachfolgender Hemmung der Thrombozytenaggregation bedeutet. Als gesicherte Indikationen für ASS gelten

heutzutage eine instabile Angina pectoris (instabile AP), ein akuter Myokardinfarkt, eine PTCA/Stentimplantation, zur Sekundärprophylaxe der KHK sowie zerebrale Ischämien bzw. Rezidive einer zerebralen Ischämie. Fraglich ist, ob eine Indikation zur Primärprophylaxe einer KHK, als sinnvoll erscheint.

Das Abciximab [ReoPro®] (84) ist ein sog. Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonist (GP IIb/IIIa) und bindet an seinem gleichnamigen Rezeptor (GP IIb/IIIa-Rezeptor). Infolgedessen verhindert es die Bindung von Fibrinogen und hemmt damit die Thrombozytenaggregation. Bisherige Indikationen zur Gabe der GP IIb/IIIa-Antagonisten (meist in Kombination mit Heparin und ASS) stellen dar: PTCA-Hochrisiko-Patienten zur Vermeidung ischämischer Komplikationen, instabile AP und der non-Q-Wave-Infarkt (nicht-transmuraler Infarkt).

Ein weiterer wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Clopidogrel (85). Clopidogrel ist ein Antagonist des P2/Y1-Rezeptors, welcher physiologischerweise die Anheftung der Liganden ADP und Kollagen ermöglicht. Durch die Antagonisierung wird die Thrombozytendegranulierung und damit die Thrombozytenaktivierung verhindert. Die häufigste Anwendung findet als Ersatz bei Patienten mit einer ASS-Unverträglichkeit statt. Eine besondere Indikation ergibt sich in der Kardiologie als Reokklusionsprophylaxe nach koronarer Stentimplantation, jedoch in Kombination mit ASS.

Zu diesen o.g. Stoffen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Ein weiterer interessanter Wirkstoff, welcher unter Umständen Einfluß nehmen kann auf die Restenose ist das Stickstoffmonoxid (NO), welches 1980 durch Furchgott et al (90) entdeckt wurde und später unter auch unter dem Namen „endothelium derived relaxing factor“ (**EDRF**) bekannt wurde.

Das NO bzw. EDRF (90) wird normalerweise nur aus ungeschädigtem Endothel freigesetzt. Die Freisetzung des EDRF erfolgt entweder durch mechanische Stimulation (Schubspannung des strömenden Blutes) oder durch Rezeptoraktivierung (Acetylcholin, Serotonin, Histamin). Das lokal wirkende NO bewirkt v.a. eine Relaxation der glatten Muskulatur (vorzugsweise an den Venen und großen Koronararterien) sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Andere Wirkungen, wie Dilatation der Bronchialmuskulatur, Einsatz als Neurotransmitter oder die zytostatische/-toxische

Wirkung in der unspezifischen Immunabwehr sollen hier nur vollständigerweise erwähnt werden. Ein weiterer Faktor, der noch diskutiert wird, ist der physiologische Alterungsprozess des Gefäßendothels, was per se zu einer Abnahme der NO-Synthese führt und somit zusätzlich eine Restenosierung begünstigen soll.

Diesen Effekt des NOs machten sich Napoli et al. (33) in ihrer Studie zu Nutze, in dem sie die Effizienz sowie altersbedingten Effekte von ASS und einem Stickstoffmonoxid(NO)-freisetzenden-ASS, dem NCX-4016, ermittelten.

Hierfür wurden sowohl 6 Monate als auch 24 Monate alte Sprague-Dawley Ratten verwendet, die jeweils 7 Tage vor und 21 Tage nach einer iatrogen zugefügten Karotisverletzung, mittels Ballondilatation, entweder mit NCX-4016 (55 mg/kg) oder mit ASS (30 mg/kg) behandelt wurden. Das Ergebnis der Untersuchung zeigte, durch zu Hilfenahme von histologischen und immunhistochemischen Methoden (zur Bestimmung der Restenose) sowie der Chemilumineszenz (zum Nachweis des NOs), dass die Behandlung mit NCX-4016, insbesondere bei den älteren Ratten, zu einer Erhöhung des bioaktiven NOs im Vergleich zu den gleichaltrigen mit ASS behandelten Ratten führte. Des Weiteren konnte experimentell eine verminderte Restenosierung, bei den mit NCX-4016 behandelten älteren Ratten nachgewiesen werden als die Vergleichsgruppe mit ASS. Dieser Effekt beruht auf einer verminderten Proliferation der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Folglich spielen die, z.T. auch altersbedingten Veränderungen des NO-Stoffwechsels eine Rolle in der Entwicklung der Restenose. Letztlich konnte auch gezeigt werden, dass ASS keinen nennenswerten Einfluss auf die Restenosierung hat.

Auch eine Studie von Garachemani et al. (28), bezüglich einer Therapie zur Prävention einer Restenose, mittels ASS oder Coumadin (ein Cumarin-Derivat) und Heparin, ergab in beiden Fällen das gleiche Ergebnis, wie die oben beschriebene Studie von Napoli et al (33).

Einige Studien befassten sich mit den GP IIb/IIIa Antagonisten. So untersuchte die Studie von Moustapha et al. (34) das klinische „outcome“ von Patienten nach Gabe des Abciximab nach stattgehabter PTCA. Über einen Zeitraum von 1996 bis 1999 wurden 322 Patienten akquiriert, wovon 157 Patienten mit dem Medikament behandelt wurden

und der Rest eine Behandlung erhielt, die jedoch nur dem Leiter der Studie bekannt war. Im Bezug auf die Inzidenz einer Angina pectoris bzw. eines Myokardinfarktes oder erneuter Revaskularisationsmaßnahmen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Somit scheint eine Therapie mit einem GP IIb/IIIa Antagonisten keine signifikantere Besserung gegenüber den herkömmlichen Therapieschemata herbeizuführen.

Eine Studie von Schneiderman et al (35) testete auch die Wirkung des Abciximab, jedoch an einer kleinen Anzahl von Patienten (n = 16) mit gestenteten Karotiden im Hinblick auf die Prävention neuauftretender cerebraler Embolien sowie der Prävention von Restenosen. Bei keinem der Patienten traten nach einer Kontrolluntersuchung von 12 Monaten sowohl cerebrale Ereignisse als auch signifikante Restenosen der Gefäße auf. Ob letzten Endes diese Stoffgruppe eine echte Alternative zu den bisher gängigen Behandlungsmethoden darstellt, müssen noch weitere Studien mit größeren Patientenzahlen belegen.

Eine Studie von Strecker et al (36) befasste sich mit der Offenheitsrate von femoropoplitealen Stents durch eine orale Kombinationsbehandlung von Clopidogrel und Aspirin. Die Ergebnisse wurden dann mit retrospektiven Daten anderer Therapieregime verglichen. Für die Studie wurden 31 Patienten akquiriert, wovon jeder einzelne zum einen 100 mg ASS/ Tag sowie zusätzlich eine Aufsättigungsdosis von 300 mg Clopidogrel bekam. Diese einmalige Gabe von 300 mg wurde danach durch eine tägliche Einnahme von 75 mg Clopidogrel über 28 Tage ersetzt. Die Ergebnisse waren durchaus viel versprechend, so lagen die prozentualen Offenheitsraten für das erste Jahr bei 76% und für das zweite Jahr bei immerhin 70%. Vergleichsweise mit Daten von Patienten die nur das ASS einnahmen (1. Jahr 75% / 2. Jahr 50%) zeigt sich hier jedoch eine deutliche Verbesserung der Restenoserate, bezüglich der o.g. Kombinationstherapie. Trotz allem erzielen die oben genannten Wirkstoffkombinationen nicht ganz die Ergebnisse wie die Kombination eines niedermolekularen Heparins mit Aspirin (1. Jahr 87% / 2. Jahr 72%). So ist durchaus die Kombination eines Stoffes, wie Clopidogrel mit ASS als alternative anzusehen im Hinblick auf eine Prävention einer Restenose.

Jedoch sind auch hier weitere Studien mit weitaus größeren Patientenzahlen von Nöten, um eine bessere Aussagekraft treffen zu können.

4.5.4 ACE-Hemmer

Ein in der Leber und Fettgewebe gebildetes α -2-Globulin, das Angiotensinogen (87), wird durch das in der Niere hauptsächlich gebildete Hormon Renin in Angiotensin I (AT I) umgewandelt (88). AT I wird nun durch das sogenannte Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in das blutdruckerhöhende Angiotensin II (AT II) umgewandelt (88). Genau hier liegt der Ansatzpunkt der ACE-Hemmer (89), die die Umwandlung des AT II verhindern und somit das AT II seinen direkten vasokonstriktorisches Effekt nicht ausüben kann. Des Weiteren verhindert es indirekt die Freisetzung des Aldosterons aus der Nebennierenrinde (NNR), dessen Freisetzung durch das AT II vermittelt wird. Die Effekte des Aldosterons bestehen u.a. durch eine vermehrte Na^+ -Rückresorption sowie eine vermehrte K^+ -Exkretion, was folglich zu einer Blutdruckerhöhung führt. Ein weiterer nennenswerter AT II Effekt ist die Stimulation der vermehrten Expression proto-onkogener Wachstumsfaktoren, was zu einer vaskulären und kardialen Hypertrophie sowie zu einem Remodeling, insbesondere nach einem Myokardinfarkt, führen kann.

Eben diese Induktion von ACE sowie das AT II scheinen in der lokalen Antwort auf eine Gefäßverletzung nach einer Angioplastie mit beteiligt zu sein (37).

Ribichini et al (38) untersuchten diesen Sachverhalt an 897 Patienten, die mindestens einen oder mehrere koronare Stents nach durchgeführter PTCA erhielten. Bei den 282 Patienten, die regelmäßig einen ACE-Hemmer einnahmen, zeigte sich in einer Nachuntersuchung in 36.6% der Fälle eine erneute Restenosierung der Gefäße. In der Kontrollgruppe (615 Patienten) fand sich eine erneute Restenose lediglich in 22.9% der Fälle. Traten zusätzlich noch Nebenerkrankungen, wie ein Diabetes mellitus oder eine arterielle Hypertonie hinzu, so konnte der Vorgang einer Restenosierung in den Gefäßen durch orale Zugabe des ACE-Hemmers begünstigt werden. Trotz solcher Ergebnisse lässt sich der klinische Nutzen der ACE-Hemmer im alltäglichen klinischen Gebrauch nicht verleugnen. Jedoch ist die Gabe eines solchen Medikamentes mit Vorsicht zu genießen, wenn eine Stent-Implantation bevorsteht.

Mit dem gleichen Sachverhalt befassten sich Okimoto et al (39). Sie testeten einen gezielten ACE-Hemmer, das Quinapril, welches eine besondere Affinität aufweist zu dem im Gewebe befindlichen ACE. An dieser randomisierten, offenen, non-Placebo kontrollierten Studie nahmen 253 Patienten teil, die alle eine angioplastische Maßnahme hinter sich gebracht hatten. Die Gruppe mit dem Präparat erhielt täglich 10–20 mg per os über 3-6 Monate bis zur nächsten Kontrolluntersuchung. In der Quinapril-Gruppe fanden sich bei den Kontrolluntersuchungen in 34.3% der Fälle nennenswerte Restenosen, während Restenosen in der Kontrollgruppe in 47.7% der Fälle nachzuweisen waren. Daraus lässt sich schließen, dass ACE-Hemmer, insbesondere das Quinapril, durchaus einen präventiven Effekt auf eine erneute Restenosierung haben können. Dieses Ergebnis lässt sich vielleicht hieraus erklären, dass ein weiteres Substrat, das Bradykinin, welches sich v.a. im Blutplasma aufhält, auch durch das ACE proteolytisch gespalten und somit aktiviert wird. Wird nun auch das ACE im Blut gehemmt, so führt dies zu einem verzögernden Abbau des Bradykinins, was wiederum den Restenoseprozess begünstigt kann.

Diesen negativen Effekt des Bradykinins konnten Yau et al (40) auch in ihrer Studie nachweisen, wonach das Bradykinin die Zellproliferation der glatten Muskelzellen nach einer Gefäßverletzung vorantrieb.

In Anbetracht der oben genannten Aspekte untersuchten Peters et al (41) in einer groß angelegten Studie, die ValPREST (Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions)-Studie, den Einfluss des AT₁-Rezeptorblockers, Valsartan, in Bezug auf die Entwicklung möglicher „In-Stent-Restenosen“ nach einer regelmäßigen Verabreichung von 80 mg/d über 6 Monate. Der Unterschied zwischen den gängigen ACE-Hemmern und dem AT₁-Rezeptorenblocker liegt darin, dass im Gegensatz zu den ACE-Hemmern, der Abbau des Bradykinins durch die AT₁-Rezeptorenblocker nicht verzögert wird, jedoch der proliferative Effekt des AT II auf die glatten Muskelzellen eingedämmt wird. Ein Kontrollangiogramm nach 6 Monaten zeigte in der mit Valsartan behandelten Gruppe eine Restenoserate von 19.2%, während die Placebo-Gruppe eine Rate von 38.6% aufwies. Auch lies sich ein erheblicher Unterschied im

Lumendurchmesser der gestenteten Gefäße nachweisen. So betrug die Lumenweite im Durchschnitt in der Valsartan-Gruppe 2.17 (\pm 0.27) mm, während die Kontrollgruppe einen erheblichen Lumenverlust, mit einer Weite von 1.60 (\pm 0.20) mm einbüßen musste. Somit konnte ein präventiver Effekt der AT₁-Rezeptorenblocker nachgewiesen werden.

Dass das Valsartan einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der glatten Muskelzellen ausübt, bestätigte auch eine Studie von Mueck et al (42), die diesen Wirkstoff in vitro an humanen, koronaren, glatten Muskelzellen testeten. Wie diese Studien belegten besteht durchaus ein Potential in der Anwendung eines ACE-Hemmers, wobei vorzugsweise auf die AT₁-Rezeptorenblocker zurückgegriffen werden sollte, in Anbetracht des gegenteiligen Effektes des Bradykinins.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es die dosisabhängigen Effekte des CA-4 in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit, die klonogene Aktivität sowie den Zellzyklus in vitro an humanen, aortalen, glatten Muskelzellen zu untersuchen. Es konnte ein dosisabhängiger, bei Dosen von 5×10^{-9} M sogar ein prolongierter Effekt des Combretastatins A-4 nachgewiesen werden. Inwieweit sich diese Ergebnisse auch in vivo übertragen lassen können, muss im Tiermodell und - bei Erfolg - nachfolgend in klinischen Studien evaluiert werden. Die gewonnenen in vitro Ergebnisse geben Anlass zur Hoffnung, dass mit dem Combretastatin A-4 eine Alternativsubstanz zur Restenosebehandlung mittels DEB und DES gegeben ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Pettit GR, Cragg GM, Singh SB. Antineoplastic agents, 122. Constituents of *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod.* 1987 ; 50 : 386-391.
2. Pettit GR, Singh SB, Hamel E, Lin CM, Alberts DS, Garcia-Kendall D. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combrestatin A-4. *Experientia* 1989; 45: 209-211.
3. Sackett DL. Podophyllotoxin, steganacin and combrestatin: natural products that bind at the colchicines site of tubulin. *Pharmacol. Ther.* 1993; 59: 163-228.
4. El-Zayat AA, Degen D, Drabek S, Clark GM, Pettit GR, Von Hoff DD. In vitro evaluation of the antineoplastic activity of combrestatin A-4, a natural product from *Combretum Caffrum* (arid shrub). *Anticancer Drugs* 1993; 4:19-25.
5. Dotter CT, Judkins MP: Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction: Description of a new technique and a preliminary report of its application. *Circulation* 1964; 30:654-670.
6. Grüntzig A, Hopff H: Perkutane Rekanalisation chronischer arterieller Verschlüsse mit einem neuen Dilatationskatheter. Modifikation der Dotter-Technik. *Dtsch Med Wochenschr* 1974; 99: 2502-2505.
7. Roth FJ, Heimig T, Berliner P, Grün B, Koppers B, Krings W: Perkutane Rekanalisation peripherer Gefäße, in Günther RW, Thelen M (eds): *Interventionelle Radiologie*. Stuttgart, New York, Thieme, 1988, pp 20-44.
8. Horvath W, Oertl M, Haidinger D: Percutaneous transluminal angioplasty of crural arteries. *Radiology* 1990; 177:565-569.
9. Aschauer M, Hausegger KA, Lammer J, Klein GE, Fluckiger F, Lafer M, Pilger E: Percutaneous recanalization of iliac artery occlusions-- retrospective analysis before and following availability of stents. *Vasa Suppl* 1991; 33:197-198.
10. Popma JJ, Topol EJ: Factors influencing restenosis after coronary angioplasty. *Am J Med* 1990; 88:16N-24N.
11. Kuntz RE, Safian RD, Levine MJ, Reis GJ, Diver DJ, Baim DS: Novel approach to the analysis of restenosis after the use of three new coronary devices. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:1493-1499.
12. Hanke H, Hassenstein S, Ulmer A, Kamenz J, Oberhoff M, Haase KK, Baumbach A, Gown AM, Karsch KR: Accumulation of macrophages in the arterial vessel wall following experimental balloon angioplasty. *Eur Heart J* 1994; 15: 691-698.
13. Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR: Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res* 1990; 67:651-659.
14. Huppert PE, Duda SH, Helber U, Karsch KR, Claussen CD: Comparison of pulsed laser-assisted angioplasty and balloon angioplasty in femoropopliteal artery occlusions. *Radiology* 1992; 184: 363-367.

15. Fitzgerald PJ, Yock PG: Mechanisms and outcomes of angioplasty and atherectomy assessed by intravascular ultrasound imaging. *J Clin Ultrasound* 1993;21:579-588.
16. Simons M, Leclerc G, Safian RD, Isner JM, Weir L, Baim DS: Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after atherectomy. *N Engl J Med* 1993; 328: 608-613.
17. White GH, Liew SC, Waugh RC, Stephen MS, Harris JP, Kidd J, Sachinwalla T, Yu W, May J: Early outcome and intermediate follow-up of vascular stents in the femoral and popliteal arteries without long-term anticoagulation. *J Vasc Surg* 1995; 21: 270-279.
18. Violaris AG, Ozaki Y, Serruys PW: Endovascular stents: a 'break through technology', future challenges. *Int J Card Imaging* 1997; 13:3-13.
19. Carter AJ, Laird JR, Kufs WM, Bailey L, Hoopes TG, Reeves T, Farb A, Virmani R: Coronary stenting with a novel stainless steel balloon-expandable stent: determinants of neointimal formation and changes in arterial geometry after placement in an atherosclerotic model. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 1270-1277.
20. Lefkovits J., Topol E.J.: Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Progress in cardiovascular diseases*, 40, 141-158, 1997.
21. Riessen R., Oberhoff M., Karsch K.R.: Concepts for local therapy of restenosis (Konzepte zur lokalen Therapie der Restenose). *Z. Kardiol.*, 85, Suppl. 1, 87-98, 1996.
22. Bauters C., Isner J. M.: The biology of restenosis. *Progress in Cardiovascular diseases*, 40, 107-116, 1997.
23. Bauters et al: Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury. First marker of the cellular process leading to restenosis after angioplasty? *Eur Heart J*, 13, 556-559, 1992.xxx.
24. Bauriedel G., Kandolf R., Welsch U., Höfling B.: Mechanismen der Re-Stenosierung nach Angioplastie. *Z. Kardiol.* 83, Suppl. 4, 31-41, 1994.
25. Wilcox J.N.: Thrombin and other potential mechanism underlying restenosis. *Circulation*, 84, 431-435, 1991.xxx.
26. Frebellius S., Hedin U., Swedenborg J.: Thrombogenicity of the injured vessel wall-role of antithrombin and heparin. *Thromb. Haemost.*, 71, 147-153, 1994.
27. Doucet S; Malekianpour M; Theroux P et al.: Randomized trial comparing intravenous nitroglycerin and heparin for treatment of unstable angina secondary to restenosis after coronary artery angioplasty. *Circulation* 2000 Mar 7; 101(9):955-61 (ISSN:1524-4539).
28. Garachemani AR; Fleisch M; Windecker S; Pfiffner D; Meier B: Heparin and coumadin versus acetylsalicylic acid for prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002 Mar; 55(3):315-20 (ISSN: 1522-1946).

29. Grassman ED; Leya F; Fareed J; Lewis BE; Bacher P; Loeb HS; Moran JF: A randomized trial of the low-molecular-weight heparin certoparin to prevent restenosis following coronary angioplasty. *J Invasive Cardiol* 2001 Nov;13(11):723-8 (ISSN: 1042-3931).
30. Serruys P.W. et al: A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N. Engl. J. Med.*, 333, 757-736, 1995.
31. Dens JA; Desmet WJ; Coussement P; De Scheerder IK; Kostopoulos K; Kerdsinchai P; Supanantarook C; Piessens JH: Usefulness of Nisoldipine for prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (results of the NICOLE study). NIsoldipine in COronary artery disease in LEuven. *Am J Cardiol* 2001 Jan 1; 87(1): 28-33 (ISSN: 0002-9149).
32. Jorgensen B; Simonsen S; Endresen K; Forfang K; Vatne K; Hansen J; Webb J; Buller C; Goulet G; Erikssen J; Thaulow E: Restenosis and clinical outcome in patients treated with amlodipine after angioplasty: results from the Coronary AngioPlasty Amlodipine REStenosis Study (CAPARES). *J Am Coll Cardiol* 2000 Mar 1; 35(3): 592-9 (ISSN: 0735-1097).
33. Napoli C; Aldini G; Wallace JL; de Nigris F; Maffei R; Abete P; Bonaduce D; Condorelli G: Efficacy and age-related effects of nitric oxide-releasing aspirin on experimental restenosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Feb 5; 99(3):1689-94 (ISSN: 0027-8424).
34. Moustapha A; Assali AR; Sdringola S; Yusuf SW; Vaughn WK; Fish RD; Schroth GW; Krajcer Z; Rosales OR; Smalling RW; Anderson HV: Abciximab administration and clinical outcomes after percutaneous intervention for in-stent restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002 Jun; 56(2): 184-7 (ISSN: 1522-1946).
35. Schneiderman J; Morag B; Gerniak A; Rimon U; Varon D; Seligsohn U; Shotan A; Adar R: Abciximab in carotid stenting for postsurgical carotid restenosis: intermediate results. *J Endovasc Ther* 2000 Aug; 7(4): 263-72 (ISSN: 1526-6028).
36. Strecker EP; Boos IB; Gottmann D; Vetter S: Clopidogrel plus long-term aspirin after femoro-popliteal stenting. The CLAFS project: 1- and 2-year results; *Eur Radiol* 2003 Jul 10; p S0938-7994.
37. Powell J.S., Muller R.K.M., Baumgartner H.R.: Suppression of the vascular response to injury: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 17, 137B-142B, 1991.
38. Ribichini F; Wijns W; Ferrero V; Matullo G; Camilla T; Feola M; Guarrera S; Vado A; Piazza A; Uslenghi E: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis after coronary stenting. *Am J Cardiol* 2003 Jan 15; 91(2): 154-8 (ISSN: 0002-9149).
39. Okimoto T; Imazu M; Hayashi Y; Gomyo Y; Sekiguchi Y; Yanagihara K; Shimohara Y; Sumii K; Yamamoto H; Tadehara F; Toyofuku M; Kohno N: Quinapril with high affinity to tissue angiotensin-converting enzyme reduces restenosis after percutaneous transcatheter coronary intervention. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001 Jul; 15(4): 323-9 (ISSN: 0920-3206)

40. Yau L; Wilson DP; Werner JP; Zahradka P: Bradykinin receptor antagonists attenuate neointimal proliferation postangioplasty. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Oct; 281(4): H1648-56 (ISSN: 0363-6135).
41. Peters S; Gotting B; Trummel M; Rust H; Brattstrom A: Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions: the VAL-PREST trial. *J Invasive Cardiol* 2001 Feb; 13(2):93-7 (ISSN: 1042-3931)
42. Mueck AO; Seeger H; Lippert TH: Valsartan inhibits angiotensin II-stimulated proliferation of smooth muscle cells from human coronary artery. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999 Jul; 37(7):365-6 (ISSN: 0946-1965).
43. Holmes DR; Savage M; La Blanche JM; Grip L; Serruys PW; Fitzgerald P; Fischman D et al.: Results of Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation* 2002 Sep 3; 106(10): 1243-50 (ISSN: 1524-4539).
44. Axel DI, Kunert W, Göggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Küttner A, Wild DH, Brehm BR, Riessen R, Köveker G, Karsch KR: Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* 1997; 96:636-645.
45. Galbraith SM; Maxwell RJ; Lodge MA et al.: Combretastatin A4 phosphate has tumor antivascular activity in rat and man as demonstrated by dynamic magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol* 2003 Aug 1; 21(15): 2831-42 (ISSN: 0732-183X).
46. Cooney MM; Radivoyevitch T; Dowlati A; Overmoyer B et al.: Cardiovascular safety profile of combretastatin a4 phosphate in a single-dose phase I study in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Jan 1; 10(1 Pt 1):96-100 (ISSN: 1078-0432).
47. Nambu H; Nambu R; Melia M; Campochiaro PA: Combretastatin A-4 phosphate suppresses development and induces regression of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 Aug; 44(8):3650-5 (ISSN: 0146-0404).
48. Crissman HA, Mullany PF, Steinkamp JA (1975): Methods and application of flow systems for analysis and sorting in mammalian cells. In: *Methods in Cell Biology* (Hrsg. Prescott D.M.), Vol. 9, Academic Press New York, S. 179-246.
49. Bildquelle: <http://www.vcell.de/chromosomenpark/chromosomenpark-zellteilung-und-mitose-unendlicher-ersatz/> Stand: 22.01.2013.
50. Griggs J; Skepper JN; Smith GA; Brindle KM; Metcalfe JC; Hesketh R: Inhibition of proliferative retinopathy by the anti-vascular agent combretastatin-A4. *Am J Pathol* 2002 Mar; 160(3): 1097-103 (ISSN: 0002-9440).
51. Dordjevic B and Szybalski W: Genetics of human cell lines. III Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity. *J Exp Med* 112: 509-531, 1960.
52. Gonchoroff NJ, Greipp PR, Kyle RA and Katzmann JA: A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. *Cytometry* 6: 506-512, 1985.

53. Porstmann T, Ternynck T and Avrameas S, Quantitation of 5-bromo-2- deoxyuridine incorporation into DNA: An enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Methods* 82: 169-179, 1985.
54. Bildquelle: <http://www.flickr.com/photos/27949362@N02/2616415782/>, Stand 22.01.2013.
55. Vincent L, Kermani P, Young LM, Cheng J et al: Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *J Clin Invest.* 2005 Nov; 115(11):2992-3006. Epub 2005 Oct 13.
56. Wall M, Wani M et al.: “The Discovery of Camptothecin and Taxol” commemorative booklet produced by the National Historic Chemical Landmarks program of the American Chemical Society in 2003.
57. Wiskirchen J1, Schöber W, Schart N, Kehlbach R, Wersebe A, Tepe G, Claussen CD, Duda SH: The effects of paclitaxel on the three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study. *Invest Radiol.* 2004 Sep; 39(9):565-71.
58. URL: <http://www.chemie.de/lexikon/Dexamethason.html> (Stand: 30.11.2014).
59. Bitzer M1, Wiskirchen J, Schöber W, Schart N, Kehlbach R, Khorchidi S, Claussen CD, Duda SH: Possibilities of the prophylaxis of arterial restenoses with dexamethasone - an in-vitro study of human aortic smooth muscle cells. *Rofo.* 2004 Oct;176(10):1485-92.
60. Todd D. Reil, M.D., Vikram S. Kashyap, M.D., Rajabrata Sarkar, M.D., Ph.D., Julie Freishlag, M.D., Hugh A. Gelabert: Dexamethasone Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Journal of Surgical Research*, Volume 85 (1) – Jul 1, 1999.
61. Haery C, Sachar R, Ellis SG. Drug-eluting stents: The beginning of the end of restenosis? *Cleve Clin J Med* 2004; 71815– 824.
62. Panwalkar A1, Verstovsek S, Giles FJ.: Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer.* 2004 Feb 15; 100(4): 657-66.
63. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995; 76:412–417.
64. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE; SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003 Oct 2; 349(14): 1315-23.
65. Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ, Topol EJ: Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Mar 15; 29(4): 808-16.

66. Pesarini G1, Ferrero V, Tomai F, Paloscia L, De Cesare N, Tamburino C, Piscione F, Vassanelli F, Ribichini F: Steroid-eluting stents in patients with acute coronary syndromes. Angiographic results of DESIRE: Dexamethasone-Eluting Stent Italian REgistry. *J Invasive Cardiol.* 2009 Mar; 21(3): 86-91.
67. Anthony Gershlick, MB, BS; Ivan De Scheerder, MD, PhD; Bernard Chevalier, MD; Amanda Stephens-Lloyd, RN, BA; Edoardo Camenzind, MD; Christian Vrints, MD et al.: The European evaLUation of pacliTaxel Eluting Stent (ELUTES) Trial - Inhibition of Restenosis With a Paclitaxel-Eluting, Polymer-Free Coronary Stent. *Circulation.* 2004;109:487-493.
68. Zeller T1, Dake MD, Tepe G, Brechtel K, Noory E, Beschorner U, Kultgen PL, Rastan A: Treatment of femoropopliteal in-stent restenosis with paclitaxel-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv.* 2013 Mar; 6(3): 274-81.
69. Loh JP, Stella PR, Sangiorgi G, Silber S, Stahnke S, von Strandmann RP, Torguson R, Waksman R: Paclitaxel-coated balloon for the treatment of drug-eluting stent restenosis: subanalysis results from the Valentines I trial. *Cardiovasc Revasc Med.* 2014 Jan; 15(1): 23-8.
70. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tranilast>, 10.08.2015.
71. Masayuki Isaji, Hiroshi Miyata, Yoshiyuki Ajisawa, Yasuo Takehana, Nagahisa Yoshimura: Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *British Journal of Pharmacology* (1997) 122, 1061-1066.
72. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Flufenaminsäure>, 10.08.2015.
73. Schöber W1, Wiskirchen J, Kehlbach R, Gebert R, Rodegerdts E, Betsch A, Johst U, Claussen CD, Duda SH: Flufenamic acid: Growth modulating effects on human aortic smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Interv Radiol.* 2002 Jan; 13(1): 89-96.
74. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Anthranilsäure>, 10.08.2015.
75. Schöber W1, Tran QB, Muringaseril M, Wiskirchen J, Kehlbach R, Rodegerdts E, Wiesinger B, Claussen CD, Duda SH: Impact of glafenine hydrochloride on human endothelial cells and human vascular smooth muscle cells: a substance reducing proliferation, migration and extracellular matrix synthesis. *Cell Biol Int.* 2003; 27(12): 987-96.
76. Jean-Jacques Goy, MD, FESC, Jean-Christophe Stauffer, MD, FACC, Manon Siegenthaler, Alain Benoît, Charles Seydoux, MD: A Prospective Randomized Comparison Between Paclitaxel and Sirolimus Stents in the Real World of Interventional Cardiology. The TAXi trial. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 308.
77. Kastrati A1, Mehilli J, von Beckerath N, Dibra A, Hausleiter J, Pache J, Schühlen H, Schmitt C, Dirschinger J, Schömig A; ISAR-DESIRE Study Investigators: 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 Jan 12; 293(2): 165-71.

78. Morice MC1, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, Sousa E, Stoll HP; REALITY Trial Investigators: Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Feb 22; 295(8): 895-904.
79. Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage. Urban & Fischer Verlag München, 2011. Seite 514-516.
80. Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage. Urban & Fischer Verlag München, 2011. Seite 519-520.
81. Bernd Pötzsch, Katharina Madlener: Hämostaseologie - Grundlagen, Diagnostik und Therapie, 2. Auflage. Springer Verlag 2010. Seite 781.
82. Sher E, Biancardi E, Passafaro M, Clementi F: Physiopathology of neuronal voltage operated calcium channels. CNR Center of Cytopharmacology and Department of Medical Pharmacology, University of Milan, Italy. *The FASEB Journal*, Vol. 5: 2677–2683.
83. Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage. Urban & Fischer Verlag München, 2011. Seite 213-215.
84. URL: <http://www.janssenbiotech.com/assets/reopro.pdf>, 10.08.2015.
85. Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Auflage. Urban & Fischer Verlag München, 2011. Seite 511-512.
86. Florian Horn: Biochemie des Menschen, 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2009. Seite 525-529.
87. Florian Horn: Biochemie des Menschen, 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2009. Seite 383-384.
88. Florian Horn: Biochemie des Menschen, 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2009. Seite 383-385.
89. Florian Horn: Biochemie des Menschen, 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 2009. Seite 385.
90. Todd J. Anderson, MD, Ian T. Meredith, MD, PHD, Peter Ganz, MD, FACC, Andrew P. Selwyn, MD, FACC, Alan C. Yeung, MD, FACC: Nitric oxide and nitro vasodilators: Similarities, differences and potential interactions. *Journal of the American College of Cardiology*. Volume 24, Issue 2, August 1994, Pages 555–566.
91. M. Schlumpf: 30 Jahre Ballonkatheter: Andreas Grüntzig, ein Pionier in Zürich. *Schweizerische Ärztezeitung / Bulletin des médecins suisses / Bollettino dei medici svizzeri* 2004;85: Nr 7, Seite 346 – 351
92. Rensing BJ, Walter RM Hermans et al: Quantitative Angiographic Assessment of Elastic Recoil After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *The American Journal of Cardiology*. November 1990, Volume 66, Pages 1039 – 1044.

93. Haude M, Erbel R et al: Quantative Analysis of Elastic Recoil After Balloon Angioplasty And After Intracoronary Implantation of Balloon-Expandable Palmaz-Schatz Stents. JACC Vol 21., No. 1, January 1993: p. 26-34.
94. Post MJ, Borst C, Kuntz RE: The Relative Importance of Arterial Remodeling Compared With Intimal Hyperplasia in Lumen Renarrowing After Balloon Angioplasty. Circulation, American Heart Association. 1994;89: p. 2816-2821
95. Bauters C, Thibaud M, Hamon M et al: Mechanism and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. Cardiovascular Research, Elsevier. 31 (1996): p. 835-846.
96. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Zellzyklus>, 02.11.2016
97. Howard, A., Pelc, S. R.: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity **6** (Suppl.), 261–273 (1953).

Erklärung zum Eigenanteil der Arbeit

Die Arbeit sowie die verwendeten Geräte und Materialien wurden im “Zentrum für Medizinische Forschung” (Waldhörlestr. 22, 72072 Derendingen - Tübingen) der Abteilung für diagnostische und interventionelle Radiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Jakob Wiskirchen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. J. Wiskirchen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Rainer Kehlbach (Diplom-Biologe).

Sämtliche Versuche (Proliferationskinetik, Koloniebildungs-Test (KOB), Durchflußzytometrie) wurden nach entsprechender Einarbeitung durch folgende Labormitglieder - Dr. rer. nat. Rainer Kehlbach und Dr. rer. nat. Rüdiger Bantleon - von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte in gemeinsamer Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz aus dem Institut für Medizinische Biometrie in Tübingen und unter Verwendung des JMP-Programms.

Die in der Dissertation verwendeten Tabellen 5-10 wurden von mir mit Hilfe des Excel-Programms erstellt.

Die folgenden Tabellen 1-4 wurden gemeinsam von Herrn Dr. Rainer Kehlbach und mir mit Hilfe des Excel-Programms erstellt.

Die Abbildung 1 wurde aus dem Internet unter folgender Quellenangabe verwendet:
<http://www.flickr.com/photos/27949362@N02/2616415782/>, Stand: 22.01.2013.

Die Abbildung 2 wurde gemeinsam von mir und Herrn Dr. Rainer Kehlbach mit Hilfe des Excel-Programms erstellt.

Die Abbildungen 3,4,5 sowie 7 und 8 wurden gemeinsam von Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz und mir mit Hilfe des JMP-Programms erstellt.

Die Abbildung 6 wurde aus dem Internet unter folgender Quellenangabe verwendet:
<http://www.vcell.de/chromosomenpark/chromosomenpark-zellteilung-und-mitose-unendlicher-ersatz/> Stand: 22.01.2013.

Die Literatur-Recherche erfolgte durch mich aus dem Internet unter Verwendung von Suchprogrammen wie PubMed, Medline-Datenbank, Google-Suchmaschine und Wikipedia.

Ich versichere hiermit, dass ich das Manuskript der Dissertation selbständig verfasst habe und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Danksagung

Ganz großen Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Jakob Wiskirchen, für die Überlassung des Themas sowie die außerordentliche Unterstützung und Geduld in der gesamten Zeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Rainer Kehlbach sowie Herrn Dr. Rüdiger Bantleon bedanken für die große Unterstützung, die Geduld und das Anlernen der Untersuchungsmethoden.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Klaus Dietz. Ein wirklicher Meister beim Umgang mit den Zahlen. Er war mir eine große Hilfe beim Erstellen der Kurvenmodelle und der Diagramme.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es mir überhaupt ermöglicht haben, dass ich diesen Beruf erlernen konnte und durfte.

Ihnen ganz besonders widme ich diese Arbeit!

LEBENS LAUF

Name: Ibrahim Andraos

Geburtsdatum: 25.08.1975

Geburtsort: Mannheim

Schulbildung: 1995 Abitur an der Carl-Engler-Schule in Karlsruhe

Studium: 1996 – 2000 Humanmedizin an der Universität Rostock
2000 – 2003 Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
- 3. Staatsexamen am 20.11.2003

Berufl. Ausbildung: 01.02.2004 - 30.09.2004: Arzt im Praktikum, Herzchirurgie
Karlsruhe
01.10.2004 - 31.12.2004: Assistenzarzt in der Herzchirurgie
Karlsruhe
01.01.2005 – 31.05.2006: Assistenzarzt für Chirurgie,
Asklepios Klinik Germersheim
01.06.2006 – 28.02.2010: Assistenzarzt für Chirurgie,
Klinikum Crailsheim
01.03.2010 – 29.02.2012: Als Facharzt für Chirurgie,
Visceral- & Gefäßchirurgische
Abteilung,
Stauferklinikum Mutlangen
01.03.2012 – 31.12.2012: Oberarzt in der Gefäßchirurgie,
Caritasklinik St. Theresia in
Saarbrücken
14.01.2013 – 14.01.2016: Als Facharzt für Chirurgie in
der Gefäß- & Thoraxchirurgie,
Städtisches Klinikum Karlsruhe
01.02.2016 – bis jetzt: Oberarzt in der Gefäßchirurgie,
Klinikum Idar-Oberstein

Qualifikationen: **Approbation** als Arzt seit 01.10.2004
Fachkunde Strahlenschutz für Ärzte seit 17.01.2008
Facharzt für Chirurgie seit 26.10.2009
Facharzt für Gefäßchirurgie seit 14.12.2015